

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Cotutelle internationale avec :

Présentée et soutenue par :

Jordan SEIRA

Le vendredi 05 avril 2013

Titre :

Rôle de la sorption et de la biodégradation dans l'élimination de micropolluants par des procédés d'épuration biologique : application aux molécules anticancéreuses traitées par bioréacteur à membrane

ED MEGEP : Génie des procédés et de l'Environnement

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique - UMR 5503

Directeur(s) de Thèse :

Claire ALBASI (Directrice de Recherche, Université de Toulouse)

Caroline SABLAYROLLES (Maître de conférences, Université de Toulouse)

Rapporteurs :

Christelle WISNIEWSKI (Professeur, Université Montpellier I)

Marina COQUERY (Directrice de Recherche, IRSTEA)

Autre(s) membre(s) du jury :

Claire JOANNIS-CASSAN (Maître de conférences, Université de Toulouse)

Chrystelle BANCON-MONTIGNY (Maître de conférences, Université Montpellier II)

Dominique PATUREAU (Directrice de Recherche, LBE)

Christophe DAGOT (Professeur, Université de Limoges)

Luis CASTILLO (Expert contaminants émergents, VERI)

RESUME

Les travaux de recherche effectués dans le cadre de ce travail de thèse ont eu pour objectif de caractériser le rôle joué par les mécanismes de sorption et de biodégradation dans l'élimination de micropolluants organiques par les boues biologiques, et notamment celles de bioréacteur à membrane.

La première étape a consisté en la mise au point d'une méthode d'analyse de molécules anticancéreuses depuis les phases aqueuse et solide des boues. L'extraction des molécules contenues dans la phase aqueuse a été réalisée par une combinaison de cartouches SPE permettant la récupération sélective d'espèces acides, neutres et basiques. L'extraction depuis la phase solide a été rendue possible grâce à l'utilisation de la technique sous solvant pressurisé et à chaud PLE, suivie par une étape de purification directement inspirée de la méthode développée pour la phase aqueuse.

Une procédure originale de préparation d'échantillons de boues a été proposée pour estimer rigoureusement le phénomène de sorption. Le modèle de Freundlich est celui qui a donné les corrélations les plus satisfaisantes et a été sélectionné. La détermination des paramètres du modèle a mis en évidence des comportements de sorption différents pour les molécules ciblées, mais toujours caractérisés par des aptitudes de sorption faibles. La mise en relation des propriétés physico-chimiques des molécules, des boues et des paramètres de sorption n'a pas révélé de corrélations évidentes entre ces différents paramètres et ne permet pas de proposer de modèle capable de prédire la sorption en fonction des caractéristiques des boues et des polluants.

La caractérisation du comportement d'un cocktail d'anticancéreux lors du traitement par un pilote de bioréacteur à membrane externe a révélé que le mécanisme majeur à l'origine de leur élimination était la biodégradation. Les interactions entre les microorganismes et les micropolluants ciblés sont liées au cométabolisme. Une étude approfondie du mécanisme a révélé que ces mêmes interactions étaient à l'origine d'une limitation de la biodégradation et doivent être intensifiées pour améliorer les performances de traitement sur ce point.

Mots –clés : sorption, biodégradation, molécules anticancéreuses, boue, méthode analytique, bioréacteur à membrane

ABSTRACT

The aim of the present work was to characterize the sorption mechanisms and biodegradation role in the removal of some organic micropollutants (*i.e.* anticancer drugs) by biological sludges, including those of membrane bioreactor (MBR).

The first step consisted in the development of an analytical method for the trace determination of anticancer drugs from sludge aqueous and solid phases. The extraction from the aqueous matrix was performed by a combination of SPE cartridges, allowing the selective recovery of acid, neutral and basic species. The extraction from the solid matrix was possible thanks to an extractive step performed by pressurized liquid extraction, followed by a purification step whose procedure was directly inspired from the method developed for aqueous samples.

An original procedure for the conditioning of sludge samples before sorption experiments has been proposed. The Freundlich isotherm gave the satisfactoriest correlations and has been selected. The determination of the model parameters highlights different trends of sorption between targeted compounds, but always characterized by low sorption affinities. Physico-chemical properties of both compounds and sludge did not show any link with sorption parameters. Consequently, it is not possible to propose a predictive model for the sorption of polar micropollutants depending on both compounds and sludge properties.

The removal of a "cocktail" of anticancer drugs by treatment through a side stream pilot-scale MBR has been investigated. Biodegradation appeared as the prevailing mechanism and was explained by cometabolic interactions. However, these interactions were also responsible for the limitation of biodegradation phenomenon and must be intensify to enhance the removal of these compounds.

Keywords: sorption, biodegradation, anticancer drugs, sludge, analytical method, membrane bioreactor

...Tous les coups sont permis pour résoudre les problèmes...

Guiraud in Albasi (1987), cours sur les cinétiques hétérogènes (ENSIGC – 2^{ème} année)

***...La veille de ta soutenance, t'as pas de shampoing...Allô...
le mec, la veille de sa soutenance de thèse, il a pas de shampoing...***

Valentine S., aux alentours de 23 h 00, le 04 avril 2013

Les remerciements, partie la plus facile ou la plus difficile à écrire ? Je dirais plutôt un passage important où il est délicat de se remémorer toutes les personnes croisées au cours de ces trois années (et demie) et qui ont participé, d'une manière ou d'une autre, à façonner cet écrit. Comme ma mémoire est loin d'être infallible, je m'excuse par avance auprès de ceux dont j'aurai pu momentanément oublier les prénoms, mais qui doivent certainement être logés quelque part dans ma tête (ah...on me dit au fond à gauche).

Je tiens tout d'abord à remercier mes trois directrices de thèse, Claire Joannis-Cassan, Caroline Sablayrolles et Claire Albasi, pour leur confiance, leur disponibilité, les connaissances échangées mais surtout, pour m'avoir intégré dans l'univers (très féminin) du projet BioMedBoue, sans quoi je n'aurais pas pu écrire ces quelques lignes. Je les remercie également pour avoir su composer avec ma manière de travailler sans (trop) râler ou s'inquiéter. J'espère vous avoir démontré qu'un électron libre, aussi imprévisible soit-il, finit toujours par retrouver son orbitale ☺

Je remercie vivement tous les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. Merci donc aux rapportrices Christelle Wisniewski et Marina Coquery pour tout l'enthousiasme mis dans la lecture du manuscrit et lors de la soutenance, à Chrystelle Bancon-Montigny, probablement la première à avoir décelé la graine de tournesol...euh...de chercheur qui sommeillait en moi, à Dominique Patureau pour son énergie toujours très positive et ses expressions bien languedociennes (ceux qui savent ce qu'est un « titoulet » lèvent la main...), à Luis Castillo pour son regard industriel sur mes travaux de recherche, et à Christophe Dagot pour la pertinence de ses questions et pour avoir présidé le jury de la soutenance. Merci à vous pour cette belle journée.

Un grand merci à tout le consortium BioMedBoue pour avoir toujours su dynamiser les recherches. Merci à Mireille Vignoles, Sylvie Schétrite et Hélène Carrère pour leur apport sur le projet. Merci en particulier à Abigail pour l'énorme quantité d'échantillons traités qui m'ont permis de produire une partie de ce manuscrit. Enfin et même si elle ne faisait pas partie du projet, je remercie profondément Catherine (aka Cathy) Claparols pour sa compréhension et son aide dans la résolution des tracas de l'analytique, et pour sa présence le jour de la soutenance.

Mes remerciements vont ensuite à l'ensemble du personnel du LCA qui font de ce laboratoire un lieu d'échanges tout à fait appréciable. Je remercie notamment Emmanuelle, toujours prête à rendre service, Didier et son savoir-faire logistique, Céline pour ses conseils techniques mais surtout, pour sa très grande sympathie. Je remercie également toutes les autres personnes que je n'ai pas eu l'occasion de vraiment connaître mais avec lesquelles les échanges ont toujours été très amicaux (Anne, Laure, Jean-François...). Un grand merci aux occupants du bureau 1-R2-14 (Julie, Julien, Nadjib...) pour avoir accepté les rires peu discrets quand je discutais avec Audrey.

Je voudrais remercier les doctorants LCAiens qui contribuent à rendre l'atmosphère de travail des plus agréables et ce, de manière très significative ($p < 0,05$). Je pense notamment aux « anciens » Emilie, Dorothée, Lupita, Sylvain...à mes « contemporains » Anaïs, Julien, Leslie, Manon...et aux « nouveaux » Assad, Baptiste, Cécile...Je n'ai jamais pu partager un de vos bureaux, mais les discussions et rires échangés pendant cette thèse me confortent dans l'idée que l'aventure aurait été tout aussi plaisante en votre compagnie.

Un immense merci à tous mes compagnons du « labo bleu » sans qui les journées n'auraient pas eu la même saveur. Je remercie Louise (aka Loulou) pour les nombreux fous rires, l'imitation du cri de la baleine, la pissette « Louse » et parce que partager une hotte CMR : ça crée des liens, Clément pour les check-coudes (ne participent pas à la transmission des virus et bactéries) et pour ses talents de chanteur à gorge, Jibé pour notre passion commune pour la traduction des paroles de chansons de Rihanna (...sérieux, où étais-tuuuuuu Jibé...), la danse du pied qui râcle (j'envisage de déposer une enveloppe Soleau) et les fous rires interminables, Benjamin (aka Platos) pour sa

vision platonique de l'amour (parce que dans platonique il y a plato...), Alla pour ses beaux yeux bleus et son extrême gentillesse, Nicoleta (aka Oana) pour son dynamisme et sa bonne humeur perpétuelle, et les stagiaires Margaux, Isabelle, Audrey, Oumayna, Fabien et Lucas pour les moments sympathiques vécus dans cette salle.

Pour clore le chapitre des « remerciements LCA », il ne me reste plus qu'à remercier toute l'équipe « Environnement » pour tous les moments de partage dans et en dehors du labo. Merci à Claire (et son débit de paroles) pour son dynamisme sans faille et son amitié, à Stéphanie pour les fous rires et les discussions analytiques, à Guillaume pour sa bonhomie, à Pranudda et son sourire permanent, à Olivier et sa voix qui chante, et à ceux qui sont passés plus furtivement dans l'équipe mais qui m'ont laissé de très bons souvenirs. Audrey, rassure-toi, je ne t'ai pas oublié ;)

Je souhaite à présent remercier l'ensemble du personnel technique et administratif du LGC, pour leur aide précieuse dans le bon déroulement de mes recherches. Je remercie Dany et son accueil toujours très chaleureux, Claudine et sa grande réactivité avec les bons de commande, Bernard et la gestion du Kangoo, mais surtout Alain, gardien au cœur d'or, toujours prêt à rendre service et probablement une de mes plus belles rencontres dans l'établissement.

Ces remerciements perdraient de leur sens si j'oubliais les doctorants (ou assimilés) avec qui j'ai partagé les bureaux, couloirs ou labos de l'équipe BioSym. Je remercie (le grand) Julien pour sa gouaille inimitable, Raphaël pour sa nonchalance et les discussions psychologo-philosophiques, Caroline et son caractère affirmé, (Marjopleur-)Marjorie, Noura et le liquide de vibration, Joyce et les fous rires dans le grand labo (...j'ai hâte de jouer un air sur ta guitare...), Laurence et sa bienveillance...Merci à vous pour ces bons moments.

Je remercie en particulier Etienne, « mon » co-bureau/co-équipier de thèse, pour les nombreuses discussions scientifiques ou moins scientifiques, pour le partage (équitable ?) des galères BAM et surtout, pour son extrême souplesse vis-à-vis de mon emploi du temps et la récupération des eaux usées ! Le sauvetage désespéré du caillebotis restera pour moi un de nos meilleurs moments !

Je remercie également les nombreux stagiaires que j'ai pu encadrer et grâce à qui une partie des résultats a été rendue possible. A la manière d'un générique de fin, je citerai (par ordre d'apparition) : Christophe, Lisa, Hugo, Florian, Jihane, Ekin (« c'est pas grouave »), Jesus (« la purre du bioréacteur ») et Claire. Encore merci à Hugo et Claire pour avoir été présents à la soutenance.

Je n'oublierai pas de remercier les permanents du département et en particulier Marion pour avoir été ma co-pilote de prélèvement d'eaux usées pendant les vacances de Noël, pour les discussions agréables que nous avons pu échanger et pour le (magnifique) message déposé dans le livre d'or de la thèse. Un immense merci à Sylvie, tout simplement parce qu'elle est Sylvie ! Merci pour toutes tes connaissances en traitement d'eau, ta passion pour le bidouillage, ton ouverture d'esprit (scientifique)... J'ai une question qui me trotte dans la tête et je te la pose : « Si tu étais un colloïde et que tu vois une molécule de cyclophosphamide tu : (a) fuis avec ton potentiel zéta, (b) interagis avec le colloïde voisin, (c) te sorbes sur la boue car tu es lâche et que tu ne veux pas affronter la molécule, (d) continues ta vie de colloïde comme si de rien n'était, (e) further research is required ». Réponse attendue à la prochaine thèse. Ca me fait également penser que je ne peux oublier de remercier Mallorie, co-bureau de Sylvie, pour sa bonne humeur et sa participation active aux conversations « Tu te sens plus colloïde ou électron aujourd'hui ? ». Le limachien scelle définitivement notre entente ! Je n'oublierai pas non plus de remercier Isariebel (« Ma qué »), pétillante cubaine, pour son dynamisme, sa bonne humeur et ses encouragements quotidiens.

Parce que la thèse ce n'est pas qu'une histoire de science(s), c'est aussi une histoire de binôme. Je tiens alors à remercier tout particulièrement ceux que je considère respectivement comme mes binômes LGC et LCA. Binômes de bêtises bien entendu. Youssef, un grand merci (au moins en Arial 90) pour tous les bons moments passés au laboratoire et en dehors. Les parties (endiablées) de qpucc et tlmvpsp, les rires interminables dans la salle 1-a1-39 (...les murs résonnent encore...), les soirées Haga Feeki et j'en passe ! Audrey, un grand merci pour t'être lancée corps et âme dans l'explication du (non-)fonctionnement de la LC-MS, pour la danse du « papillon-DCO », les discussions du vendredi soir, ou encore pour la voix calme et « sexy » que tu as au téléphone (...oui, j'ai osé le mettre...) ! J'espère sincèrement que nos destins, scientifiques ou non, seront amenés à se recroiser le plus souvent possible.

Un énorme merci à Valentine, qui restera pour moi ma « best binôme ever ». Que dire...Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que l'on a partagé depuis l'IUT. Merci encore pour tes encouragements durant la thèse, ta relecture (attentive) des deux premiers chapitres mais surtout, pour ton amitié. J'espère pouvoir te rendre la pareille. Merci également aux amis de longue date (Henri, Boulette, Gaël, Jus de Fruit...) pour avoir toujours entretenu le contact, même parfois à plusieurs milliers de kilomètres.

Je remercie évidemment ma famille, pour avoir écouté les râles incessants du dimanche soir sur « Comment ça a été ta semaine ? », pour le soutien sans faille qu'elle m'apporte depuis toujours et surtout, pour m'avoir laissé prendre mes propres décisions depuis le plus jeune âge.

Enfin, je finirai mes remerciements par citer une Jeune Chercheuse que j'apprécie particulièrement :

« Voilà c'est (à peu près) tout...et c'est déjà pas mal... »

Table des matières

Nomenclature	xvii
Liste des figures	xxiii
Liste des tableaux	xxix
Introduction Générale	1
Chapitre I. Cycle de vie de médicaments anticancéreux : de leur utilisation jusqu'à leur détection dans l'Environnement	7
I.1) Le cancer et son environnement	11
I.1.1) A propos du cancer	11
I.1.2) Classification des médicaments anticancéreux	11
I.1.3) Tendances de consommation et prévisions	13
I.1.4) Propriétés physico-chimiques des molécules anticancéreuses	14
I.1.5) Sélection des molécules d'intérêt	16
I.2) Les molécules anticancéreuses et l'Environnement	16
I.2.1) Prise médicamenteuse et devenir dans le corps humain	20
I.2.2) Acheminement et traitement des eaux en station d'épuration	22
I.2.3) Présence dans les eaux de surface et risques potentiels	24
I.3) Comprendre et réduire l'impact environnemental	27
I.3.1) Comment et où peut-on agir ?	27
I.3.2) Définition des objectifs globaux du travail de thèse	27
Chapitre II. Mise au point d'une méthode d'analyse de molécules anticancéreuses en matrice environnementale complexe : application aux boues biologiques	29
II.1) Revue bibliographique	33
II.1.1) Introduction et structuration de la partie	33
II.1.2) Prise en charge d'échantillons aqueux	33
II.1.2.1) Conditionnement des échantillons aqueux	33
II.1.2.2) Extraction des composés cibles et concentration	34
II.1.3) Prise en charge d'échantillons solides	37
II.1.3.1) Conditionnement des échantillons particuliers	37
II.1.3.2) Récupération des molécules cibles depuis la matrice solide	38
II.1.3.3) Purification des extraits et concentration	39
II.1.4) Analyse des anticancéreux : techniques séparatives et détection	41
II.1.4.1) Séparation des molécules cibles contenues dans les extraits	41
II.1.4.2) Systèmes de détection pour l'analyse des molécules cibles	43
II.1.4) Synthèse et description des choix analytiques	45
II.2) Matériel et Méthodes	47
II.2.1) Solvants, sels et adsorbants	47
II.2.2) Préparation de solutions et précautions de manipulation	48

II.2.3) Prétraitement des échantillons de boues	48
II.2.3.1) Collecte d'échantillon et séparation des phases	48
II.2.3.2) Prise en charge de la phase aqueuse et stockage	49
II.2.3.3) Prise en charge de la phase particulaire et stockage	49
II.2.4) Extraction des molécules cibles	50
II.2.4.1) Extraction depuis les échantillons aqueux	50
II.2.4.2) Extraction depuis les échantillons particulaires	52
II.2.5) Concentration des extraits	53
II.2.6) Raffinage des extraits issus de la phase particulaire	54
II.2.7) Traitement de finition et stockage des extraits	54
II.2.8) Analyse des extraits	55
II.2.8.1) Séparation et détection par HPLC-UV/MS	55
II.2.8.2) Séparation et détection par UHPLC-MS/MS	56
II.2.8.3) Structure des séquences analytiques et exploitation	58
II.2.9) Performances de méthode et éléments de validation	59
II.3) Résultats et Discussion	62
II.3.1) Développement et validation des méthodes de séparation et détection	62
II.3.1.1) Développement de l'analyse par HPLC-UV/MS	62
II.3.1.1.a) Caractérisation et optimisation de la détection MS	62
II.3.1.1.b) Caractérisation et optimisation de la séparation HPLC	63
II.3.1.2) Développement de l'analyse par UHPLC-MS/MS	66
II.3.1.3) Validation instrumentale	67
II.3.2) Développement et validation du protocole pour la phase aqueuse	67
II.3.2.1) Sélection de l'adsorbant	67
II.3.2.2) Optimisation de l'extraction sur eau ultrapure	70
II.3.2.3) Ajustement de la méthode aux matrices réelles et conséquences	71
II.3.2.4) Performances de la méthode et validation	72
II.3.2.4.a) Efficacité de la méthode entière	74
II.3.2.4.b) Rendement de l'extraction	74
II.3.2.4.c) Estimation de l'effet matrice	75
II.3.2.4.d) Limites de détection et de quantification	75
II.3.2.5) Autour de la méthode...	76
II.3.2.5.a) Gain possible sur l'analyse ?	76
II.3.2.5.b) Evaluation de la stabilité des analytes	76
II.3.2.6) Application de la méthode à un échantillon environnemental	77
II.3.3) Développement du protocole pour la phase particulaire	78
II.3.3.1) Sélection de la technique d'extraction	78
II.3.3.2) Sélection de la procédure de purification	79
II.3.3.3) Développement de la procédure d'extraction	79
II.3.3.3.a) Recherche du solvant d'extraction	79
II.3.3.3.b) Optimisation des paramètres opérationnels	80
II.3.3.3.c) Validation de l'optimum et caractérisation de l'extraction	88
II.3.3.4) Performances de la méthode et validation	88
II.3.3.4.a) Efficacité de la méthode entière pour différentes boues	91
II.3.3.4.b) Limites de détection et quantification	91
II.3.3.5) Autour de la méthode...	92
II.3.3.5.a) La méthode est-elle adéquate pour les échantillons environnementaux ?	92
II.3.3.5.b) Quelle étape analytique est la plus limitante ?	92
II.3.3.6) Application de la méthode aux échantillons environnementaux	94
II.4) Conclusion du chapitre	95

Chapitre III. Caractérisation de la sorption de molécules anticancéreuses dans les boues biologiques : vers une possible prédiction ?	97
III.1) Revue bibliographique	101
III.1.1) Généralités et structuration de la partie	101
III.1.2) Caractéristiques de la matrice étudiée	101
III.1.3) Sorption dans les boues : définitions et grandeurs caractéristiques	103
III.1.4) Cinétique et thermodynamique de la sorption	104
III.1.4.1) Cinétiques de sorption sur les boues	104
III.1.4.2) Description des interactions de sorption	106
III.1.5) Méthodologie de détermination de la sorption dans les boues	107
III.1.5.1) Conditionnement des échantillons de boue	107
III.1.5.2) Réalisation des essais et exploitation des données	108
III.1.5.2.a) Définition des conditions et stratégies opératoires	108
III.1.5.2.b) Description des données : outils et considérations mathématiques	109
III.1.5.2.c) Détermination des coefficients de distribution du système triphasique	111
III.1.6) Quelles caractéristiques influencent la sorption ?	112
III.1.6.1) Caractéristiques de la matrice	113
III.1.6.2) Caractéristiques du polluant	114
III.1.6.3) Caractéristiques des conditions opératoires	114
III.1.7) Prédire la sorption dans les boues sans utiliser les isothermes ?	115
III.1.8) Récapitulatif et définition des objectifs	118
III.2) Matériels et méthodes	120
III.2.1) Boues étudiées	120
III.2.2) Préparation originale des solutions de dopage et des boues	120
III.2.2.1) Procédure de préparation des solutions de dopage	120
III.2.2.2) Procédure de préparation des échantillons des boues	120
III.2.3) Calage du test en système diphasique	122
III.2.3.1) Caractérisation de la stabilité des analytes	122
III.2.3.2) Caractérisation des dynamiques de sorption	122
III.2.3.2.a) Influence de la présence de compétiteurs sur les dynamiques	122
III.2.3.2.b) Influence de la nature de la boue sur les dynamiques	123
III.2.3.3) Détermination des isothermes de sorption	123
III.2.4) Calage du test en système triphasique	125
III.2.4.1) Recherche du niveau de dopage des essais	125
III.2.4.2) Détermination des équilibres K_{part} et K_{DCM}	126
III.2.5) Outils d'analyse de données	128
III.2.5.1) Modélisation des données expérimentales	128
III.2.5.2) Significativité des paramètres modélisés	128
III.2.6) Caractérisation des boues	128
III.2.6.1) Caractérisations physiques	130
III.2.6.1.a) Détermination des matières colloïdales et dissoutes DCM	130
III.2.6.1.b) Détermination de l'aspect des floes par morphogranulométrie	130
III.2.6.1.c) Détermination de la résistance spécifique	131
III.2.6.1.d) Détermination des densités minérale et organique	131
III.2.6.1.e) Ultrafractionnement de la phase aqueuse	132
III.2.6.2) Caractérisations chimiques	133
III.2.6.2.a) Détermination des matières sèches MS et volatiles MV	133
III.2.6.2.b) Détermination de la demande chimique en oxygène DCO	133
III.2.6.2.c) Détermination des teneurs en carbone organique, inorganique et total	133

III.2.6.2.d) Détermination des protéines et des substances humiques	134
III.2.6.2.e) Détermination des sucres	134
III.2.6.2.f) Détermination des lipides	134
III.2.6.2.g) Détermination des acides gras volatils AGV	135
III.2.6.3) Exploitation des mesures	135
III.2.7) Recherche de corrélations par analyse en composante principale	136
III.3) Résultats et Discussion	137
III.3.1) Précision sur le conditionnement des boues avant essai	137
III.3.2) Etude de la stabilité des analytes	137
III.3.3) Etude préliminaire sur les dynamiques de sorption	138
III.3.3.1) Dynamique de sorption du tamoxifène	139
III.3.3.2) Effet du cocktail de médicaments sur la dynamique de sorption d'IFO	140
III.3.3.3) Effet de la nature de la boue sur la dynamique de sorption de CP	142
III.3.4) Détermination des équilibres de sorption : système diphasique	143
III.3.4.1) Validation de la procédure de sorption	143
III.3.4.2) Adéquation de l'isotherme de sorption	144
III.3.4.3) Limites de l'application des isothermes	149
III.3.4.4) Exploitation des paramètres de l'isotherme sélectionnée	150
III.3.4.4.a) Comparaison des comportements et capacités de sorption	150
III.3.4.4.b) Application au devenir des polluants lors du traitement en STEP	153
III.3.4.5) Limites de la démarche appliquée dans le tracé des isothermes	155
III.3.5) Détermination des équilibres de sorption : système triphasique	157
III.3.5.1) Recherche du niveau de dopage des essais	157
III.3.5.2) Vérification des bilans matière	158
III.3.5.3) Détermination des coefficients de distribution K_{part} et K_{DCM}	159
III.3.5.4) Limites du test	161
III.3.6) Mise en lien des caractéristiques des boues et de la sorption	161
III.3.6.1) Exploitation des données de caractérisation physico-chimique des boues	161
III.3.6.1.a) Paramètres de la phase solide	161
III.3.6.1.b) Paramètres de la phase aqueuse	162
III.3.6.2) Recherche de corrélations « boue/polluant/sorption »	164
III.3.6.2.a) Précisions sur les objectifs du « modèle »	164
III.3.6.2.b) Corrélations « boue/polluant/sorption » pour la phase solide	164
III.4) Conclusion du chapitre	167

Chapitre IV. Identification et caractérisation des processus d'élimination de molécules anticancéreuses en traitement d'effluents contaminés : application au fonctionnement d'un bioréacteur à membrane	169
IV.1) Revue bibliographique	173
IV.1.1) Introduction et structuration de la partie	173
IV.1.2) Autour de la technologie du bioréacteur à membrane	173
IV.1.2.1) Configurations existantes	173
IV.1.2.1.a) Le bioréacteur à membrane externe	173
IV.1.2.1.b) Le bioréacteur à membrane interne et configuration dérivée	174
IV.1.2.2) Quel est l'intérêt d'utiliser les bioréacteurs à membrane ?	175
IV.1.2.3) Marché actuel et évolution possible	176
IV.1.3) Quelle est la contribution des procédés biologiques dans l'élimination des produits pharmaceutiques ?	177
IV.1.3.1) Avantages potentiels des BAM sur les BA	177
IV.1.3.2) Réalité sur l'élimination de produits pharmaceutiques	177
IV.1.3.2.a) Observations pour les produits pharmaceutiques en général	177
IV.1.3.2.b) Observations pour les molécules ciblées	179
IV.1.3.3) Quels paramètres favoriseraient l'élimination ?	179
IV.1.3.4) A propos de la toxicité des produits pharmaceutiques sur les boues	180
IV.1.4) Biodégradation de molécules organiques traces	181
IV.1.4.1) Généralités et positionnement de la synthèse bibliographique	181
IV.1.4.2) Caractérisation de la biodégradation : procédures expérimentales	181
IV.1.4.2.a) Essais à haute concentration en polluant (> 10 – 100 mg/L)	181
IV.1.4.2.b) Essais à basse concentration en polluant (< 10 – 100 µg/L)	182
IV.1.4.3) Concepts mathématiques	183
IV.1.4.4) Quels paramètres peuvent influencer la biodégradation ?	186
IV.1.5) Récapitulatif et définition des objectifs	188
IV.2) Matériels et méthodes	189
IV.2.1) Pilote de BAME : description et suivi	189
IV.2.1.1) Fonctionnement hydraulique	189
IV.2.1.2) Fonctionnement biologique	191
IV.2.1.2.a) Boue d'ensemencement	191
IV.2.1.2.b) Caractéristiques de l'eau d'alimentation	191
IV.2.1.2.c) Caractéristiques de la boue du pilote	193
IV.2.1.3) Système membranaire	193
IV.2.1.4) Suivi du process	193
IV.2.1.4.a) Déroulement expérimental	193
IV.2.1.4.b) Prélèvements	194
IV.2.1.4.c) Techniques analytiques	194
IV.2.2) Caractérisation des interactions de sorption	195
IV.2.2.1) Caractérisation de la nature de la sorption	195
IV.2.2.2) Etude de sorption sur boues contaminées	196
IV.2.3) Caractérisation de la biodégradation	197
IV.2.3.1) Réponse à une injection « pulse » sans co-substrat	197
IV.2.3.2) Réponse à une injection « pulse » avec co-substrat	199
IV.2.4) Compréhension des interactions avec la matière colloïdale	199
IV.2.5) Caractérisation fonctionnelle par fluorescence tridimensionnelle F3D	202
IV.3) Résultats et Discussion	203
IV.3.1) Fonctionnement du procédé sur l'intégralité de la campagne	203

IV.3.1.1) Evolution du débit de perméat	203
IV.3.1.2) Evolution des MES et MVS dans le pilote	204
IV.3.1.3) Performances épuratoires sur les paramètres globaux	205
IV.3.1.3.a) Elimination de la demande chimique en oxygène DCO	205
IV.3.1.3.b) Elimination de l'azote total N_{Total}	206
IV.3.1.3.c) Performance épuratoire sur les matières colloïdales et dissoutes DCM	206
IV.3.1.4) Bilan sur le devenir des molécules anticancéreuses	208
IV.3.2) Caractérisation des interactions de sorption	210
IV.3.2.1) Détail sur les comportements de sorption dans le pilote	210
IV.3.2.2) Etude thermodynamique : physisorption ou chimisorption	211
IV.3.2.2.a) Vérification des bilans matière	211
IV.3.2.2.b) Identification de la nature de la sorption d'IFO sur les boues	212
IV.3.2.3) Potentiel de sorption et désorption de matrices déjà contaminées	214
IV.3.3) Caractérisation des réponses de biodégradation	215
IV.3.3.1) Détail sur les comportements de biodégradation dans le pilote	215
IV.3.3.2) Réponse à une injection « pulse » sans co-substrat	216
IV.3.3.3) Réponse à une injection « pulse » avec co-substrat	218
IV.3.4) Compréhension des interactions « molécules anticancéreuses/matière colloïdale et dissoute »	221
IV.3.4.1) Evolution du comportement de sorption suivant les conditions opératoires	221
IV.3.4.2) Répartition des micropolluants dans les différentes fractions de la phase aqueuse et lien avec les paramètres physico-chimiques	222
IV.3.4.3) Exploitation des spectres de fluorescence tridimensionnelle	226
IV.3.4.3.a) Image de la phase aqueuse de la boue non contaminée et non dopée (T_0)	226
IV.3.4.3.b) Comparaison des spectres de la fraction à 1,2 μm pour la boue non contaminée et les différentes conditions opératoires appliquées	229
IV.3.4.3.c) Comparaison des spectres de la fraction à 1,2 μm pour la boue contaminée et les différentes conditions opératoires appliquées	230
IV.3.4.3.d) Lien des résultats de fluorescence avec la spéciation des polluants	232
IV.4) Conclusion du chapitre	233
Conclusion générale et Perspectives	235
Références bibliographiques	245
Annexes	273

Nomenclature

Lettres grecques

$\mu_{micropolluant}^{max\imum}$	taux maximal de croissance en utilisant le micropolluant comme substrat (h^{-1})
α	résistance spécifique (m/kg)
Ω	surface de la membrane (m^2)
σ	écart-type
σ_c	conductivité ($\mu S/cm$)
λ_{em}	longueur d'onde d'émission représentées en abscisse (nm)
λ_{ex}	longueur d'onde d'excitation représentées en ordonnée (nm)
$\sigma_{méthode}$	écart-type de la méthode (analytique)
ΔG°	énergie libre de Gibbs (kJ/mol)
ΔH°	variation d'enthalpie (kJ/mol)
ΔP	différence de pression imposée (Pa)
ΔS°	variation d'entropie (J/(mol.K))
μ	viscosité du filtrat (considérée ici comme égale à celle de l'eau (10^{-3} Pa.s))

Lettres latines

AB	âge de boues (jours)
ACN	acétonitrile
ACP	analyse en composantes principales
AGV	acides gras volatils
A_{native}	aire dans l'extrait d'un échantillon non dopé
AMO	ammonium oxydase (enzyme)
AP	axes principaux (de l'ACP)
$A_{préanalyse}$	aire dans l'extrait dopé juste avant analyse
A_{spike}	aire correspondante au niveau de dopage
ATU	allylthourée (inhibiteur sélectif de l'activité de nitrification autotrophe)
BA	procédé à boues activées
BAM	bioréacteur à membrane
BAME	bioréacteur à membrane à boucle externe
BAMI	bioréacteur à membrane immergée
C	concentration en MES de la boue (kg/m^3)
$C_{aqueuse}$	concentration dans la phase aqueuse ($\mu g/L$)
C_{DCM}	concentration dans la phase colloïdale ($\mu g/kg_{DCM}$)
CE	électrophorèse capillaire
CE_c	carré des écarts
C_{libre}	concentration dans la phase autre que particulaire ou colloïdale ($\mu g/L$)
C_m	charge massique ($g_{substrat}/g_{MVS.j}$)
CMR	cancérigène, mutagène et toxique pour la reproduction
C^{native}	concentrations natives dans chacune des phases (aqueux : ng/L ou solide : ng/g_{part})
CP	cyclophosphamide
C_{solide}	concentration dans la phase solide ($\mu g/kg_{part}$)
C_T	concentration totale en polluant ($\mu g/L$)
C_v	charge volumique ($g_{substrat}/L.j$)
d	détecté mais non quantifié
nd	non déterminé

Nomenclature

DCM	matière colloïdale et dissoute (g_{DCM}/L)
DCO	demande chimique en oxygène (mgO_2/l)
DHC	10,11 – dihydrocarbamazépine
EE2	17 α -éthynylestradiol
EH	équivalent habitant
EM	effet matrice
EPS	exopolymères
ERH	eaux résiduaires hospitalières
ERU	eaux résiduaires urbaines
ESI	ionisation par ElectroSpray
F_i	fractions issues de l'ultrafractionnement $0,1 < F_1 < 1,2 \mu m$; $10 \text{ kDa} < F_2 < 0,1 \mu m$; $1 < F_3 < 10 \text{ kDa}$ et $F_4 < 1 \text{ kDa}$
f_{oc}	fraction de carbone organique présente dans l'adsorbant (kg_{OC}/kg_{part})
5-FU	5-fluorouracile
GC	chromatographie en phase gaz
GPC	chromatographie sur gel perméable
HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
IC	carbone inorganique
IDL	limite de détection instrumentale
IFO	ifosfamide
IL	limite instrumentale considérée (IDL ou IQL)
IQL	limite de quantification instrumentale
k_{biol}	constante cinétique de biodégradation ($L/g_{MVS.j}$)
K_{DCM}	coefficient d'équilibre entre les concentrations du polluant lié à la DCM (C_{DCM}) et libre (C_{libre}) (L/kg_{DCM})
$k_{désorption}$	constante cinétique de désorption ($kg_{part}/(L.j)$)
$K_{Distrib}$	coefficient de distribution entre les concentrations à l'équilibre du polluant lié à la matière particulaire (C_{solide}) et en phase aqueuse ($C_{aqueuse}$) (diphasique : L/kg_{part})
K_F	coefficient de Freundlich ($\mu g^{(1-1/n)}.L^{1/n}/kg_{part}$)
K_{global}	coefficient de distribution entre les concentrations à l'équilibre du polluant lié à la matière particulaire (C_{solide}) et en phase aqueuse ($C_{aqueuse}$) (triphasique : L/kg_{part})
K_H	constante de Henry ($atm.m^3/mol$)
K_L	coefficient de Langmuir ($L/\mu g$)
K_{Lin}	coefficient de l'isotherme linéaire (L/kg_{part})
$K_{micropolluant}$	constante de demi-saturation pour le micropolluant ($\mu g/L$)
K_{oc}	coefficient de distribution carbone organique – eau (L/kg_{OC})
K_{ow}	coefficient de partage octanol – eau
K_{part}	coefficient d'équilibre entre les concentrations du polluant lié à la matière particulaire (C_{solide}) et libre (C_{libre}) (L/kg_{part})
$k_{sorption}$	constante cinétique de sorption ($L/(kg_{part}.j)$)
LBE	Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (Narbonne)
LC	chromatographie en phase liquide
LCA	Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (Toulouse)
LGC	Laboratoire de Génie Chimique (Toulouse)
LOD	limite de détection

LOD _{min}	limite de détection la plus basse relevée dans la littérature
Log D _{ow}	logarithme du coefficient de partage octanol – eau (dépendant du pH)
Log K _{oc}	logarithme du coefficient de distribution octanol – carbone
Log K _{ow}	logarithme du coefficient de partage octanol – eau
LOQ	limite de quantification
LOQ _{solide}	limite de quantification sur l'échantillon solide ($\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{part}}$)
MEff	efficacité de la méthode entière
M _{Effabs}	efficacité absolue de la méthode ($0 < M_{\text{Effabs}} < 1$)
MeOH	méthanol
MES	concentration en matières en suspension (en $\text{kg}_{\text{part}}/\text{L}$).
MIX Deutérés	CP-d ₄ (2 mg/L), IFO-d ₄ (2 mg/L), 5-FU-6-d ₁ (30 mg/L), TAM-d ₅ (0,3 mg/L)
MIX Etalonnage	CP (1 mg/L), IFO (1 mg/L), 5-FU (10 mg/L), TAM (0,1 mg/L), PHO (10 mg/L), NOR (10 mg/L)
MIX Standards	CP (2 mg/L), IFO (2 mg/L), 5-FU (40 mg/L), TAM (0,3 mg/L)
MRM	multiple reaction monitoring
MS	spectrométrie de masse
MS	matière sèche ($\text{g}_{\text{MS}}/\text{L}$)
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem
MSPD	dispersion de la matrice en phase solide
MVS	matières volatiles en suspension ($\text{g}_{\text{MVS}}/\text{L}$)
MWE	extraction sous micro-ondes
n	degré de non linéarité par rapport à une isotherme linéaire
NOR	moutarde norazotée
NP	nonylphénol
NPOC	carbone organique non purgeable
PDMS	polydiméthylsiloxane
PEC	concentration environnementale prédite
Pente _{étalonnage}	pente de la courbe d'étalonnage
Pente _{méthode}	pente entre les quantités mesurées en fonction des niveaux dopés
PEX	plan d'expériences
PHO	moutarde de phospharamide
PLE	extraction par solvant pressurisé et à chaud
PNEC	concentration seuil sans effet sur les organismes ciblés
POC	carbone organique purgeable
PTM	pression transmembranaire (bar)
Purge _{quotidienne}	volume de boue retiré quotidiennement (L/j)
Q	quadrupôle
Q ₀	capacité maximale de sorption ($\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{part}}$)
Q _{abiotique}	quantité perdue par pertes abiotiques (μg)
Q _{aqueuse}	quantité présente dans la phase aqueuse (μg)
Q _{aqueuse finale}	quantité présente dans la phase aqueuse à la fin de l'essai (ng)
Q _{biodég.}	quantité éliminée par biodégradation (μg)
QC	contrôle qualité
Q _{cocktail}	débit du cocktail de médicaments (L/j)
Q _{entrant}	quantité totale présente en entrée de système (en μg)

Q_{ERU}	débit d'ERU (L/j)
Q_{native}	quantité initialement présente (ng)
q_{native}	quantité native en micropolluants dans chacune des phases (ng)
$q_{perméat}$	quantité sortante dans le perméat (μg)
$Q_{postextraction}$	quantité mesurée dans l'extrait dopé après extraction (ng)
$Q_{postpurification}$	quantité mesurée dans l'extrait dopé après purification (ng)
$Q_{préextraction}$	quantité dans l'extrait après procédure entière (ng)
$q_{solide_{finale}}$	quantité présente en phase solide à la fin des essais (ng)
$Q_{solution_saline}$	débit de la solution saline synthétique (L/j)
$q_{sorbée}$	quantité sorbée sur la boue (μg)
Q_{spike}	quantité correspondante au niveau de dopage (ng)
q_{spike}	quantité dopée (ng)
Rdt	rendement
Répéta.	répétabilité
Repro.	reproductibilité
R_m	résistance de la membrane (1/m)
$r_{spécifiqueCP}$	vitesse de consommation de micropolluant par unité de bactéries ($\mu\text{g}/\text{g}_{MVS}\cdot\text{j}$)
$R_{substrat}$	taux de dégradation d'un substrat facilement biodégradable ($\text{g}_{substrat}/\text{L}\cdot\text{h}$)
$r_{volumiqueCP}$	vitesse de consommation par unité de volume ($\mu\text{g}/\text{L}\cdot\text{j}$)
SBSE	microextraction sur barreau aimanté
SCE	somme des carrés des écarts
SFC	extraction par fluide supercritique
SPE	extraction sur phase solide
SPME	microextraction sur phase solide
STEP	STations d'Épuration
t	temps de filtration (s)
T	température (K)
$T_{substrat_{micropolluant}}$	taux de bioconversion du micropolluant impliqué dans le cométabolisme ($\mu\text{g}/\text{g}_{substrat}$)
TAM	tamoxifène
TC	carbone total
TOC	teneur en carbone organique total
TOF	analyseur à temps de vol
TRAP	piège à ions
TSH	temps de séjour hydraulique (h)
UHPLC	chromatographie liquide à ultra haute performance
UV	ultraviolet
V	volume filtré (m^3)
V_{boue}	volume de boue (L, identique entre chaque composite)
$V_{extrait}$	volume d'extrait final (mL)
$V_{volume_{réacteur}}$	volume du bioréacteur (L)
$V_{phase_aqueuse}$	volume de phase aqueuse (L)
$Y_{micropolluant}$	taux de bioconversion en utilisant le micropolluant comme substrat ($\text{g}_{MVS}/\mu\text{g}$)

Liste des figures

Figure I-1 : Consommation (tonnage) de médicaments anticancéreux en France en 2008	14
Figure I-2: Structures chimiques du 5-fluorouracile (gauche) et de la vincristine (droite).....	14
Figure I-3 : Sources et voies de dissémination possibles de produits médicamenteux dans l'Environnement.....	17
Figure I-4 : Représentation du devenir des molécules cibles dans le métabolisme humain	21
Figure I-5 : Gradient de concentration en anticancéreux dans diverses matrices aqueuses.....	22
Figure I-6 : Représentation standard d'une station d'épuration par boues activées.....	23
Figure II-1 : Procédure standard d'extraction par SPE.....	35
Figure II-2 : Principe de l'ionisation par ESI.....	44
Figure II-3 : Structure et principe d'un analyseur de type quadrupôle.....	44
Figure II-4 : Méthodologies de détermination possibles de molécules anticancéreuses contenues dans des échantillons de boues.....	46
Figure II-5 : Procédure de prétraitement des phases aqueuse et particulaire.....	49
Figure II-6 : Matériel utilisé pour l'extraction par SPE.....	51
Figure II-7 : Représentation schématique de la procédure SPE.....	51
Figure II-8 : Représentation et montage d'une cellule d'extraction.....	52
Figure II-9 : Matériel utilisé pour l'extraction par PLE.....	53
Figure II-10 : Procédure de concentration des différents extraits générés.....	53
Figure II-11 : Equipement analytique utilisé pour l'analyse par HPLC-UV/MS.....	55
Figure II-12 : Gradient et débit d'élution appliqués en HPLC.....	55
Figure II-13 : Gradient et débit d'élution appliqués en UHPLC.....	57
Figure II-14 : Principe de l'étalonnage interne.....	59
Figure II-16 : Allure d'un chromatogramme type en HPLC-UV/MS.....	65
Figure II-17 : Allure d'un chromatogramme type en UHPLC-MS/MS.....	66
Figure II-18 : Représentation des interactions possibles entre les molécules cibles et les adsorbants lors de l'extraction par SPE.....	69
Figure II-19 : Schéma de dopage des performances de la méthode en phase aqueuse.....	72
Figure II-20 : Estimation de l'efficacité de la méthode d'extraction en phase aqueuse sur plusieurs niveaux de concentration.....	73
Figure II-21 : Evaluation de la stabilité des analytes dans les échantillons et les extraits.....	77
Figure II-22 : Représentation spatiale d'un plan à trois facteurs.....	81
Figure II-23 : Représentation graphique des résidus obtenus pour le second modèle.....	84
Figure II-24 : Diagramme de Pareto représentant les facteurs les plus influents lors de l'extraction d'IFO dans la boue de Brax.....	85

Figure II-25 : Représentation de l'effet du ratio de solvant, de la température, de la durée et du nombre de cycles d'extraction sur le rendement de récupération d'IFO	87
Figure II-26 : Profil de l'extraction du CP et d'IFO pour la boue de Brax	88
Figure II-27 : Estimation de la linéarité de la méthode en phase solide pour trois types de boues sur plusieurs niveaux de concentration	90
Figure II-28 : Evaluation de l'efficacité des différentes étapes de la procédure pour deux boues différentes	93
Figure III-1 : Représentation d'un floc de boue (activée) et de sa structuration.....	102
Figure III-2 : Représentation des interactions de sorption possibles dans la boue (activée) suivant une vision diphasique ou triphasique du système étudié	104
Figure III-3 : Allure des différentes isothermes les plus répandues.....	111
Figure III-4 : Méthodologie de détermination des coefficients du système triphasique	112
Figure III-5 : Synthèse des expériences réalisées pour le calage des essais de sorption en diphasique.....	124
Figure III-6 : Méthodologie développée pour faire varier la DCM	125
Figure III-7 : Détermination de la concentration de travail en système triphasique	126
Figure III-8 : Représentation de la méthodologie appliquée en système triphasique	127
Figure III-9 : Méthodologie de caractérisation des échantillons de boues.....	129
Figure III-10 : Définition des paramètres mesurés par le morphogranulomètre	130
Figure III-11 : Détermination de la résistance spécifique d'une boue	131
Figure III-12 : Principe de l'ultrafractionnement et équations associées	132
Figure III-13 : Représentation arbitraire d'un jeu de données par ACP	136
Figure III-14 : Evolution de la stabilité des analytes dans le temps (t = 0, 24 et 48 heures) .	137
Figure III-15 : Evolution de la stabilité des analytes dans le temps.....	138
(t = 0, 5 minutes et 4 heures).....	138
Figure III-16 : Evolution de la distribution de TAM en phase aqueuse - essai boue.....	139
Figure III-17 : Evolution de la distribution d'IFO en phase aqueuse suivant la présence ou non de compétiteurs pour différents temps de contact	140
Figure III-18 : Evolution de la distribution de CP en phase aqueuse suivant la nature de la boue pour différents temps de contact.....	142
Figure III-19 : Isothermes de sorption pour IFO – Calage par isotherme de Freundlich.....	147
Figure III-20 : Isothermes de sorption pour CP – Calage par isotherme de Freundlich	148
Figure III-21 : Evolution du K_{Distrib} pour IFO pour les différents types de boues en fonction de la concentration en phase aqueuse en micropolluants à l'équilibre	150

Figure III-22 : Evolution du K_{Distrib} pour IFO et CP pour les différents types de boues pour des concentrations en phase aqueuse comprises entre 1 et 10 $\mu\text{g/L}$	151
Figure III-23 : Allure des isothermes d'IFO pour la boue de Ginestous suivant la stratégie de calcul sélectionnée.....	155
Figure III-24 : Identification des plages de « linéarité apparente » pour IFO et CP	157
Figure III-25 : Evolution de K_{global} pour IFO (g.) et CP (dr.) en fonction de la DCM.....	160
Figure III-26 : Cercles des corrélations obtenues pour IFO et CP entre caractéristiques physico-chimiques du culot et de la sorption	166
Figure IV-1 : Bioréacteur à membrane en configuration externe	173
Figure IV-2 : Bioréacteur à membrane en configuration interne (a) et semi-externe (b)	174
Figure IV-3 : Représentation des fonctions facilement biodégradables (haut) et peu biodégradables (bas) d'après la synthèse réalisée par Tunkel <i>et al.</i> (2000).....	186
Figure IV-4 : Représentation du pilote de BAME et des points de prélèvement.....	190
Figure IV-5 : Organisation de l'étude thermodynamique de la sorption	196
Figure IV-6 : Principe des essais de sorption sur la boue contaminée.....	196
Figure IV-7 : Synoptique des essais de biodégradation pour deux réacteurs fonctionnant en parallèle	198
Figure IV-8 : Synoptique des manipulations d'ultrafractionnement et de caractérisation.....	200
Figure IV-9 : Représentation d'un spectre (g.) et de son interprétation possible (dr.).....	202
Figure IV-10 : Evolution du débit de perméat dans le pilote durant la campagne.....	203
Figure IV-11 : Evolution des MES, MVS et du ratio MVS/MES dans le pilote	204
Figure IV-12 : Evolution des flux et de l'élimination de la DCO durant la campagne	205
Figure IV-13 : Evolution des flux et de l'élimination de l'azote total durant la campagne...	206
Figure IV-14 : Evolution des flux et de l'élimination de la DCM (a), et des concentrations en DCM dans les différentes matrices du pilote (b) durant la campagne	207
Figure IV-15 : Evolution de la distribution de CP entre les différents flux du BAME au cours de la campagne de contamination	209
Figure IV-16 : Evolution des K_{Distrib} pour IFO et CP dans la boue du pilote.....	210
Figure IV-17 : Evolution des concentrations en CP dans les deux phases de boues	211
Figure IV-18 : Evolution de $\ln K_{\text{Distrib}}$ en fonction de $1/T$	213
Figure IV-19 : Principe des essais de désorption sur la boue contaminée	214
Figure IV-20 : Evolution des vitesses d'élimination de CP dans le pilote.....	215
Figure IV-21 : Evolution de la vitesse spécifique de dégradation du CP en fonction de la charge massique en DCO (a) et en azote (b).....	216

Figure IV-22 : Evolution du rapport des quantités Q/Q_0 (gauche) et des concentrations en phase aqueuse et solide (droite) dans le temps pour IFO et CP en absence de co-substrat ...	217
Figure IV-23 : Evolution de la biodégradation pour CP dans le pilote.....	219
Figure IV-24 : Evolution des concentrations dans les différentes phases de la boue lors de l'essai de biodégradation du CP dans le pilote.....	221
Figure IV-25 : Répartition des polluants et des paramètres physico-chimiques suivant les différentes fractions pour la boue non contaminée	224
Figure IV-26 : Répartition des polluants et des paramètres physico-chimiques suivant les différentes fractions pour la boue contaminée	225
Figure IV-27 : Décomposition du profil d'ultrafractionnement de la phase aqueuse de la boue du pilote non contaminée par fluorescence tridimensionnelle	227
Figure IV-28 : Répartition qualitative des espèces fluorescentes dans la phase aqueuse de la boue du pilote non contaminée.....	228
Figure IV-29 : Répartition quantitative des protéines et des substances humiques dans la phase aqueuse de la boue du pilote non contaminée	228
Figure IV-30 : Spectres de fluorescence obtenus sur la fraction à 1,2 μm pour les différentes conditions opératoires testées sur la boue non contaminée.....	229
Figure IV-31 : Spectres de fluorescence obtenus sur la fraction à 1,2 μm pour les différentes conditions opératoires testées sur la boue contaminée	231
Figure IV-32 : Structure possible d'une substance humique(-like)	232

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Propriétés physico-chimiques limites des molécules anticancéreuses	15
Tableau I-2 : Concentrations relevées en cyclophosphamide (gauche) et ifosfamide (droite) dans diverses matrices environnementales	18
Tableau I-3 : Concentrations relevées en 5-fluorouracile (gauche) et tamoxifène (droite) dans diverses matrices environnementales	18
Tableau I-4 : Données de toxicité des molécules cibles vis-à-vis d'espèces aquatiques	26
Tableau II-1 : Méthodes d'extraction liquide-solide et occurrence pour les anticancéreux	34
Tableau II-2 : Descriptif des méthodes SPE appliquées pour les anticancéreux	36
Tableau II-3 : Méthodes et rendements d'extraction pour les anticancéreux dans les boues	38
Tableau II-4 : Techniques séparatives identifiées et occurrence pour les anticancéreux	41
Tableau II-5 : Systèmes de détection identifiés et occurrences pour les anticancéreux	43
Tableau II-6 : Quelques propriétés des solvants organiques utilisés.....	47
Tableau II-7 : Propriétés des adsorbants utilisés	47
Tableau II-8 : Récapitulatif de la procédure de purification des extraits PLE	54
Tableau II-9 : Caractérisation des molécules ciblées en HPLC-UV/MS	56
Tableau II-10 : Caractérisation des molécules ciblées en UHPLC-MS/MS	57
Tableau II-11 : Préparation des étalons et domaines de linéarité.....	58
Tableau II-12 : Description des paramètres utilisés dans la validation de méthode	60
Tableau II-13 : Eléments de validation instrumentale sur les deux équipements	67
Tableau II-14 : Schémas d'extraction appliqués et rendements absolus obtenus	68
Tableau II-15 : Rendements des étapes d'optimisation de l'extraction sur eau ultrapure	70
Tableau II-16 : Résultats des performances et de la validation de la méthode analytique en phase aqueuse.....	73
Tableau II-17 : Critères évalués dans la sélection de la technique la plus appropriée	78
Tableau II-18 : Détermination de l'adsorbant SPE adéquat pour la purification.....	79
Tableau II-19 : Définition du plan d'expériences appliqué (valeurs codées ; valeurs réelles) et rendements obtenus pour les molécules ciblées	81
Tableau II-20 : Rendements du PEX regroupés suivant une stratégie inspirée du Box-Plot	82
Tableau II-21 : Valeurs des coefficients du modèle et significativité statistique.....	83
Tableau II-22 : Résultats des performances et de validation de la méthode en phase solide... ..	89
Tableau II-23 : Niveaux de concentration mesurés dans les échantillons solides non dopés	94
Tableau III-1 : Description des modèles du pseudo-premier et second ordre.....	105
Tableau III-2 : Distribution d'IFO, CP et TAM dans les matrices environnementales	112
Tableau III-3 : Synthèse des stratégies de détermination de la sorption dans les boues.....	118

Tableau III-4 : Caractéristiques des boues étudiées et implication dans les essais de sorption	121
Tableau III-5 : Conditions expérimentales de détermination des isothermes	123
Tableau III-6 : Exemple d’obtention de composites pour une des boues étudiées	127
Tableau III-7 : Equations des modèles cinétiques des pseudo-premier et second ordres pour le suivi de l’évolution des concentrations en phase aqueuse	141
Tableau III-8 : Obtention des paramètres de cinétiques pour IFO suivant le modèle et le nombre de points considérés	141
Tableau III-9 : Vérification du bouclage du bilan matière – système diphasique.....	144
Tableau III-10 : Calage des isothermes de sorption et estimation des paramètres pour IFO – système diphasique.....	146
Tableau III-11 : Calage des isothermes de sorption et estimation des paramètres pour CP – système diphasique.....	146
Tableau III-12 : Limites de prédiction du comportement de sorption	149
Tableau III-13 : $K_{Distrib}$ et équivalences en pourcentage sorbé pour trois niveaux de concentrations en phase aqueuse en IFO et CP dans les boues.....	152
Tableau III-14 : Pourcentage d’élimination d’IFO et CP par sorption lors du traitement en STEP pour deux productions de boues secondaires différentes.....	154
Tableau III-15 : Vérification du bouclage du bilan matière – système triphasique	158
Tableau III-16 : Caractéristiques physico-chimiques des différentes fractions des boues étudiées.....	163
Tableau IV-1 : Quelques rendements d’élimination de produits pharmaceutiques en BA et BAM d’après l’étude de Verlicchi <i>et al.</i> , 2012	178
Tableau IV-2 : Rendements d’élimination des molécules ciblées dans les BA et les BAM..	179
Tableau IV-3 : Taux d’élimination des molécules ciblées pour des essais de biodégradation à haute concentration (> mg/L).....	182
Tableau IV-4 : Taux d’élimination des molécules ciblées pour des essais de biodégradation à basse concentration (< 50 µg/L).....	183
Tableau IV-5 : Concepts mathématiques pour la modélisation de la biodégradation.....	185
Tableau IV-6 : Quelques caractéristiques de l’ERU de Ginestous	191
Tableau IV-7 : Caractéristiques de la solution saline synthétique	191
Tableau IV-8 : Caractéristiques de la solution de dopage en médicaments.....	192
Tableau IV-9 : Caractéristiques attendues de l’eau d’alimentation	192
Tableau IV-10 : Caractéristiques des membranes utilisées.....	193

Tableau IV-11 : Bilan des analyses effectuées sur l'intégralité de la campagne	194
Tableau IV-12 : Vérification du bouclage du bilan matière pour la sorption d'IFO et CP sur la boue de BAME non contaminée à différentes températures	211
Tableau IV-13 : Coefficients de distribution calculés pour certains niveaux de dopage et à différentes concentrations – cas d'IFO pour la boue de BAME	212
Tableau IV-14 : Bilans matière et K_{Distrib} pour CP sur la boue de BAME contaminée	214
Tableau IV-15 : Evolution des bilans lors de l'essai de biodégradation dans le pilote.....	218
Tableau IV-16 : Caractérisation du comportement de sorption d'IFO et CP en fonction des conditions opératoires appliquées	221

Introduction Générale

La pollution des milieux naturels est une réalité connue de tous. L'AFNOR définit le terme polluant comme « un altéragène biologique, physique ou chimique, qui au-delà d'un certain seuil, et parfois dans certaines conditions, développe des impacts négatifs sur tout ou partie d'un écosystème ou de l'Environnement en général ». Qu'elle soit de nature atmosphérique, terrestre ou aquatique, la pollution présente une menace sérieuse pour tous les organismes vivants, allant du plus simple des microorganismes jusqu'à l'Homme.

La pollution aquatique est une thématique qui attise la curiosité de nombreux acteurs scientifiques et non-scientifiques car elle touche à un élément vital : l'Eau. Source de vie et parfois de conflit, l'Eau est un bien rare qui mérite d'être protégé et notamment sur ce point précis qu'est la pollution. Le profil des matières polluantes retrouvées dans l'Eau n'est pas unique. Parmi ces polluants, on peut identifier la présence de matières en grande quantité ($> \text{mg/L}$), puis d'autres matières présentes en quantité plus modeste ($\mu\text{g/L}$ et moins). Dans cette dernière catégorie de polluants qu'on appelle micropolluants, on peut notamment identifier les produits pharmaceutiques.

Grâce à l'amélioration considérable des techniques analytiques, la présence quasi systématique de produits pharmaceutiques dans les eaux de surface a été rapportée, et plus occasionnellement dans les eaux de boisson. Ces produits appartiennent à des classes très diverses, les principales étant les antibiotiques, les anti-inflammatoires ou les produits hormonaux. Si la nocivité intrinsèque de certaines de ces molécules est connue pour des doses thérapeutiques, leurs effets aux concentrations rencontrées dans l'Environnement sont peu connus et difficiles à quantifier. Cette remarque est également valable pour leurs produits de dégradation : les métabolites. Citons toutefois la relation établie entre la présence d'hormones contraceptives dans les eaux de surface et la féminisation des poissons. Les perturbations écologiques peuvent donc être dramatiques.

Bien que les origines de cette pollution puissent être diverses, l'émission de produits pharmaceutiques contenus dans les rejets de station d'épuration est la principale retenue. De nombreux programmes d'envergure nationale (AMPERES, France, 2005 – 2008 ; U.S. Geological Survey, Etats-Unis, 2007 – 2011) ou européenne (Poséidon, 2001 – 2004 ; Norman, 2005 – 2008 ; PILLS, 2007 – 2012) ont montré que ces molécules étaient éliminées avec des taux très variables, compris entre 10 et plus de 90 %. Les interactions permettant d'expliquer ces taux sont toutefois peu connues et peuvent être liées à l'élimination de la molécule par biodégradation, ou simplement à son transfert depuis la phase liquide vers la phase solide de la boue activée qui a traité l'effluent. Il est à présent nécessaire de caractériser la part jouée par ces mécanismes dans l'élimination, et de voir si un ou plusieurs de ces mécanismes peuvent être intensifiés dans l'objectif de produire des rejets de meilleure qualité chimique, participant dans le même temps à la conservation et à la reconquête des milieux naturels. Ce dernier point constitue par ailleurs un objectif clé de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE 2000/600/CE), visant à atteindre un « bon état chimique et écologique » des masses d'eau à l'horizon 2015.

L'ensemble des projets précédemment cités ne s'est toutefois pas intéressé à la présence d'une famille de produits pharmaceutiques bien spécifique : les produits anticancéreux. Ces molécules sont principalement utilisées pour combattre les cellules malignes impliquées dans le développement du cancer. La plupart de ces composés sont considérés comme Cancérogènes, Mutagènes et toxiques pour la Reproduction (CMR), et sont donc *a priori* toxiques pour tout composant biologique. Elles sont de plus très persistantes car peu biodégradables. Ces raisons amènent certains auteurs à penser que ces molécules sont parmi les plus dangereuses dans l'Environnement et préconisent leur suivi (Johnson *et al.*, 2008 ; Besse *et al.*, 2012). De récents programmes européens (PHARMAS, 2011 – 2013 ; Cytotox, 2011 – 2013) commencent à s'intéresser à leur devenir dans le cycle de l'Eau. Les quelques études jusqu'ici publiées ont montré que les produits anticancéreux étaient dans l'ensemble très peu voire non éliminés lors de leur passage en station d'épuration. Il est donc important de comprendre pourquoi ces molécules sont

peu ou pas éliminées, et si cette élimination peut être améliorée en optimisant les installations existantes ou en impliquant des technologies de traitement plus aptes à traiter ce type de pollution.

Des travaux de recherche réalisés en laboratoire semblent démontrer le potentiel intéressant de la technologie de bioréacteur à membrane dans le traitement d'effluents contaminés par ces molécules. Le bioréacteur à membrane est un procédé couplant un traitement biologique et une séparation liquide/solide par membrane. Ce couplage offre au procédé une grande flexibilité dans la gestion des conditions opératoires, et permet notamment l'application de concentrations et d'âges de boues élevés. Ces raisons pourraient en partie être à l'origine du taux d'élimination de 80 % observé par [Delgado \(2009\)](#) lors du traitement par bioréacteur à membrane d'effluents contaminés par un agent anticancéreux, le cyclophosphamide. Toutefois, les mécanismes à l'origine de cette élimination sont encore mal connus : **dégradation biologique et/ou adsorption sur les boues ?** L'adsorption éventuelle de ces composés influence non seulement la disponibilité du polluant pour la dégradation biologique mais constitue aussi une contrainte supplémentaire lors de l'élimination de ces boues, qui constituent quel que soit le procédé un rejet à traiter. De plus, la connaissance des mécanismes régissant la disparition de ces molécules est essentielle, d'une part pour participer à la compréhension du fonctionnement du procédé, et d'autre part pour améliorer les performances de traitement et éventuellement aboutir à une élimination totale. Ces questions sont d'autant plus importantes puisqu'il est probable qu'à plus ou moins long terme, des mesures coercitives soient mises en place et impliquent l'élimination complète de cette pollution. Ces questions constituent les bases du travail présenté.

Ce travail de thèse fait partie du projet de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) – Jeunes Chercheurs (JC) « BioMedBoue », destiné à caractériser la biodisponibilité de médicaments dans les boues biologiques, et plus précisément des molécules anticancéreuses. Les objectifs purement scientifiques de ce projet sont :

- (i) Comprendre les phénomènes d'adsorption des molécules anticancéreuses dans les boues, et notamment celles de bioréacteurs à membrane ;
- (ii) Déterminer les paramètres explicatifs des propriétés d'adsorption en rapport avec les caractéristiques des boues et les propriétés des molécules anticancéreuses ;
- (iii) Quantifier la disponibilité de ces molécules pour la biodégradation.

A cela s'est ajouté *de facto* un objectif davantage technique qui est :

- (iv) Analyser quantitativement les molécules anticancéreuses dans les boues et à faibles concentrations (0,1 – 1 µg/L).

Ce projet et ce travail de thèse sont à l'interface de plusieurs disciplines scientifiques regroupant notamment la chimie analytique, le génie des procédés et la caractérisation physico-chimique de matrices complexes. Trois laboratoires ont été réunis autour de ce projet : le Laboratoire de Génie Chimique (LGC, Toulouse) pour ses compétences en génie des procédés, le Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA, Toulouse) pour ses compétences en développement de méthodes analytiques appliquées aux échantillons environnementaux, et le laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE, Narbonne) pour ses compétences dans la compréhension des interactions entre polluants et populations microbiennes.

Les objectifs de ce travail de thèse correspondent aux objectifs (i), (ii) et (iv) du projet « BioMedBoue », auquel s'ajoute un objectif supplémentaire qui concerne l'identification des mécanismes à l'origine de l'élimination de molécules anticancéreuses par la technologie de bioréacteur à membrane. Les recherches ont été principalement ciblées autour de deux agents

anticancéreux : le cyclophosphamide et l'ifosfamide. Le manuscrit de thèse présente les réponses à ces objectifs suivant une organisation en quatre chapitres.

A travers une courte synthèse bibliographique, le chapitre I retrace le parcours de médicaments anticancéreux entre le moment de leur consommation et leur détection dans les matrices environnementales. Des considérations générales sur leur devenir lors du traitement des eaux usées seront abordées puis approfondies au fil du manuscrit.

Les trois autres chapitres sont construits sur une même base et se décomposent chronologiquement en un état des connaissances et des besoins scientifiques sur la thématique abordée, une description des matériels et méthodes utilisés ou développés, puis une présentation des résultats obtenus, complétés par une discussion.

Le chapitre II détaille la mise au point d'une méthode d'analyse de molécules anticancéreuses dans les phases aqueuse et solide des boues, premier élément indispensable à la poursuite des recherches. Un soin particulier est apporté à la description des techniques d'extraction, d'analyse et des méthodes de validation utilisées pour atteindre cet objectif.

Le chapitre III présente les stratégies développées pour la caractérisation du phénomène de sorption de ces molécules dans les boues. Il y est notamment décrit une procédure originale permettant l'estimation de la distribution des polluants suivant les différentes phases de la boue. L'objectif principal de ces travaux concerne la proposition d'un modèle prédictif reliant les propriétés physico-chimiques des molécules et des boues, avec les comportements de sorption.

Enfin, le chapitre IV s'intéresse à l'identification des mécanismes à l'origine de l'élimination d'un cocktail de produits anticancéreux lors du traitement par bioréacteur à membrane. Ces recherches ont pour but principal de compléter les résultats de la thèse de Luis Delgado (2009) portant sur l'utilisation de cette technologie pour le traitement d'effluents contaminés par ces molécules. Un focus est établi sur les interactions de sorption, de biodégradation et avec la matière colloïdale et dissoute dans les boues.

Des conclusions partielles jalonnent chacun de ces chapitres et seront utilisées dans la conclusion générale de ce travail de thèse et comme base à la proposition de nouvelles perspectives de recherche.

Chapitre I.

Cycle de vie de médicaments anticancéreux : de leur utilisation jusqu'à leur détection dans l'Environnement

Ce premier chapitre s'intéresse à la problématique des médicaments anticancéreux et de leurs interactions avec l'Environnement. Il a été rédigé dans un effort d'harmonisation des connaissances à ce sujet, que ce soit pour des lecteurs avertis ou moins informés. Ainsi, des considérations parfois très scientifiques seront simplement évoquées mais approfondies au fil du manuscrit.

Ce chapitre s'articule autour de 3 parties. La première partie expose rapidement quelques connaissances sur le cancer dans nos sociétés et l'utilisation de médicaments dans son traitement. La seconde partie retrace le parcours de ces médicaments entre le moment de leur prise et celui où ils atteignent l'Environnement. Enfin, la troisième et dernière partie s'attache à développer les questions techniques et scientifiques qui constituent les objectifs de ce travail de thèse.



I.1) Le cancer et son environnement

I.1.1) A propos du cancer

Le cancer est une maladie décrite depuis l'antiquité. C'est le médecin grec Hippocrate qui en comparant l'aspect des tumeurs à un crabe leur a donné pour la première fois les noms grecs de « karkinos » et « karkinoma » (INCa, non daté). Au sens strictement biologique, le cancer est défini comme un « ensemble de cellules indifférenciées qui, en échappant au contrôle de l'organisme, se multiplie indéfiniment, envahissant les tissus voisins en les détruisant, et se répandent dans l'organisme en métastases ; la maladie qui en résulte » (Larousse, 2011). La définition est simple. La maîtrise de la maladie est pourtant délicate. En effet, le cancer est un véritable problème de santé publique et ce, dans de très nombreux pays. Longtemps perçu avec une charge symbolique forte, le cancer bénéficie dorénavant d'une meilleure visibilité et acceptation sociale, notamment grâce aux progrès incontestables et continus dans le domaine de la prévention, du dépistage ou encore de la prise en charge.

Le cancer est un terme générique désignant un groupe de maladies très diverses. Plus d'une centaine de types sont répertoriés, chacun affectant différentes régions de l'organisme. Partout dans le monde, le nombre et la nature des cancers diagnostiqués connaissent une évolution constante. Les formes les plus courantes varient selon qu'il s'agisse d'un pays à revenus importants ou pas. Ainsi, les cancers du poumon, du sein et de la prostate dominent dans les pays à revenus élevés, alors que les cancers de l'estomac, du foie et du col de l'utérus sont les plus répandus dans les pays à moindres ressources (IARC, 2008). On estime que près de 25 millions de personnes dans la population mondiale vivent avec un cancer. L'incidence, définie comme le nombre de nouveaux cas estimés par an, est d'environ 180 pour 100 000 personnes. Une hausse de ces chiffres est à prévoir en raison (i) de l'augmentation et du vieillissement de la population, (ii) de l'élimination des maladies infectieuses et (iii) de l'augmentation réelle de la maladie due à la multiplication et au croisement des facteurs de risque (Globocan, 2008).

L'origine précise des cancers est mal connue. Cependant, deux composantes sont généralement retenues dans leur explication. La première définit les risques dits endogènes, provenant de l'organisme. Ces risques sont liés aux prédispositions génétiques via l'hérédité. La seconde définit les risques dits exogènes et donc extérieurs à l'organisme. Ces risques sont pour partie induits par l'environnement (pollution atmosphérique, radiations UV...) et par le comportement des individus (alcool, tabac, déséquilibre nutritionnel...). Alors que les facteurs liés à l'hérédité sont difficilement évitables, les facteurs « environnementaux » sont eux davantage contrôlables. En effet, on estime à près de 50 % la réduction possible du nombre de cancers en faisant évoluer les comportements (Ligue Contre le Cancer, 2009). Actuellement, de nombreuses actions sont menées en ce sens, à l'image du Plan Cancer en France destiné à caractériser les facteurs de risque et développer les méthodes de traitement.

Les formes de cancer étant multiples, les possibilités de traitement le sont également. Trois grandes disciplines sont identifiées et sollicitées, parfois de manière combinée pour optimiser l'efficacité des traitements : la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicaux. Cette dernière branche regroupe, entre autres, l'immunothérapie, l'hormonothérapie ainsi que la chimiothérapie, toutes utilisant de nombreux médicaments.

I.1.2) Classification des médicaments anticancéreux

Le terme anticancéreux regroupe sous un même nom des composés exerçant des activités biologiques très différentes. Plus d'une cinquantaine de produits sont régulièrement utilisés (Johnson *et al.*, 2008). On distingue alors les agents cytotoxiques, les cytostatiques et ceux

des thérapies endocriniennes. D'après le système de classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique (ATC), les agents cytotoxiques et cytostatiques appartiennent à la classe ATC L01, communément appelée groupement des agents antinéoplasiques (Besse *et al.*, 2012).

Les composés cytotoxiques interagissent directement avec l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ils causent de sévères altérations métaboliques et morphologiques aux cellules cancéreuses, aboutissant à leur mort. La famille des cytotoxiques est très ramifiée, notamment en raison des mécanismes d'action des molécules. Parmi les principales classes, on identifie :

- (i) les agents alkylants et apparentés. Ils forment des liaisons covalentes avec les nucléotides de la chaîne d'ADN et inhibent ainsi la réplication. Les organoplatines (cisplatine), les dérivés nitroso-urée (carmustine, lomustine) et les moutardes azotées (cyclophosphamide, ifosfamide) en font partie ;
- (ii) les antimétabolites. Ils bloquent ou détournent plusieurs voies de synthèse de l'ADN. Les antifoliques (méthotrexate) et les antipirimidiques (5-fluorouracile, capecitabine) en font notamment partie ;
- (iii) les agents intercalants. Ils s'intercalent entre les brins d'ADN et inhibent la division cellulaire. Les anthracyclines (doxorubicine), d'origine antibiotique, en font partie ;
- (iv) les agents tubulo-affines et apparentés. Ils gênent la formation et le fonctionnement normal du fuseau, système permettant la migration des chromosomes lors de la division cellulaire. Les alcaloïdes (vincristine) et les taxanes (docétaxel) en font partie.

Les composés cytostatiques n'interagissent pas directement avec l'ADN. Comme pour les cytotoxiques, leurs mécanismes d'action sont très variés et permettent de distinguer :

- (i) les modificateurs de la réponse autoimmune. Ils ont pour objectif de stimuler la réponse immune anticancéreuse. Les anticorps monoclonaux (trastuzumab, rituximab) en sont les représentants ;
- (ii) Les inhibiteurs de l'activité protéine-tyrosine kinase (imatinib). Ils ont pour cible le système enzymatique responsable de l'activation cellulaire des cellules cancéreuses.

Les molécules utilisées en thérapies endocriniennes appartiennent à la classe ATC L02 (Besse *et al.*, 2012). Elles ont pour objectif de traiter les cancers hormono-dépendants. On distingue :

- (i) les analogues hormonaux. Ils bloquent la libération de la gonadotrophine, hormone stimulant la production des hormones sexuelles qui parfois aggravent certains cancers ;
- (ii) les antagonistes hormonaux. Ils modifient la réponse d'une hormone avec son récepteur en se substituant à l'hormone originelle, limitant la prolifération des cellules. Les antiandrogènes (bicalutamide) et les antiœstrogènes (tamoxifène) en font partie.

De par leurs actions, la plupart de ces médicaments possède une toxicité importante pour de très nombreuses cellules, notamment celles à croissance rapide (épithélium, système pileux...). En effet, d'après la classification établie par le Centre International de Recherches sur le Cancer (CIRC), les anticancéreux sont reconnus comme cancérogènes pour l'homme (groupe 1), cancérogènes probables (groupe 2A) et cancérogènes possibles (groupe 2B). Le caractère Cancérogène, Mutagène et toxique pour la Reproduction (CMR) est souvent retenu (Rowney *et al.*, 2009). Paradoxalement, l'utilisation de produits anticancéreux peut ainsi aboutir au développement d'autres affections ou pathologies.

I.1.3) Tendances de consommation et prévisions

Indépendamment des classes thérapeutiques disponibles sur le marché, la consommation mondiale de médicaments augmente continuellement et de manière quasi-linéaire (8 %) sur les 10 dernières années. Le vieillissement de la population, l'amélioration des soins et du niveau de vie en sont les principales raisons (Zorita, 2008).

Le positionnement de la consommation mondiale de produits anticancéreux (exprimée en milliards d'euros) est surprenant. De toutes les classes thérapeutiques, ils figurent parmi la plus vendue, loin devant les régulateurs lipidiques et les agents respiratoires qui sont respectivement en 2^{ème} et 3^{ème} position (IMS, 2010). Cette observation est valable sur les quatre années renseignées (2006 – 2010). En 2010, ces différentes classes occupaient chacune 7,1, 4,6 et 4,5 % du marché mondial, estimé à près de 625 milliards d'euros. Toutefois, elles ne figuraient pas parmi celles qui connaissent les plus fortes progressions : les agents auto-immuns (+ 14,7 %), les agents utilisés dans le traitement des scléroses (+ 13,8 %) et ceux utilisés contre le diabète (+ 12,2 %). Ces tendances sont encore valables.

La consommation en France (exprimée en milliards d'euros) est assez peu différente. En effet, les produits anticancéreux sont également les plus vendus, suivis par les médicaments utilisés dans les traitements cardiovasculaires puis du système nerveux (ANSM, 2011). En 2011, chacune de ces classes occupait 17,5, 14,3 et 14,1 % du marché français, estimé à près de 28 milliards d'euros. Ce marché est cependant hétérogène. Les prescriptions de médicaments sont très différentes suivant la consommation en milieu hospitalier ou celle dite « en ville » (pharmacies). A l'hôpital, les produits anticancéreux constituent de loin le premier poste de dépense de médicaments, s'élevant à 38 % du chiffre d'affaire total de 6 milliards d'euros. En ville, les produits anticancéreux n'occupent plus « que » la 4^{ème} place, représentant 12 % du chiffre d'affaire total de 22 milliards d'euros. Cette différence peut être expliquée par les habitudes de consommation de médicaments propres à chacun de ces secteurs. Alors que les formes injectables sont favorisées en milieu hospitalier (64 % des conditionnements), la prise orale par voie sèche (comprimés) ou liquides (solutions buvables) est très répandue en ville (79 %) (ANSM, 2011). On estime que près de 80 % des traitements anticancéreux sont administrés par intraveineuse contre 20 % oralement (Allwood *et al.*, 2002). Ces estimations sont cohérentes avec la répartition précédente.

Raisonnement sur des estimations de consommation en milliards d'euros ne donne toutefois pas d'informations précieuses sur les quantités utilisées. Les médicaments anticancéreux, souvent marqués par une innovation importante, ont un coût unitaire très élevé. Alors qu'ils représentaient 12 % du chiffre d'affaire total en ville, les médicaments anticancéreux ne représentent plus que 0,5 % du nombre total d'unités vendues estimé à 3 milliards (ANSM, 2011). Ainsi, la consommation d'agents anticancéreux pourrait paraître faible. Cette donnée est toutefois incomplète. En effet, certains médicaments sont *a priori* d'usage strictement hospitalier et ne figurent donc pas dans cette liste. C'est notamment le cas de l'ifosfamide, un cytotoxique alkylant, dont le profil d'effets secondaires implique une hospitalisation quasi-systématique (Mullot, 2009). Raisonnement sur le nombre d'unités vendues est donc un bon indicateur mais encore insuffisant pour estimer les quantités administrées.

Obtenir des informations précises de tonnage est une démarche longue et difficile. Besse *et al.* (2012) ont toutefois pu établir une estimation des quantités totales de médicaments anticancéreux administrés en récoltant des données fournies par l'AFSSAPS. Une synthèse de ces données est présentée sur la Figure I-1, donnant la répartition des différentes familles au sein de la consommation totale d'anticancéreux ainsi que les 5 plus administrés.

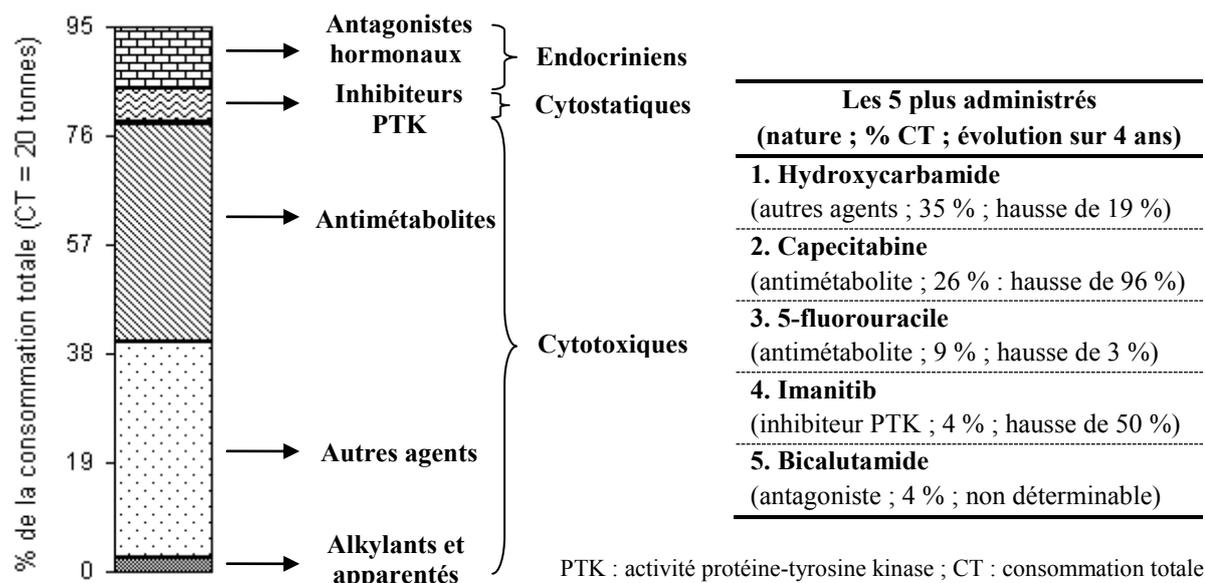


Figure I-1 : Consommation (tonnage) de médicaments anticancéreux en France en 2008

Sur cette figure, seuls les 20 médicaments les plus administrés ont été considérés. Ils représentent près de 95 % de la consommation totale d'anticancéreux et sont donc suffisamment représentatifs. Les agents cytotoxiques sont ainsi très largement administrés (80 %). Le type antimétabolite est le plus répandu (37 %), suivi de près par les autres agents cytotoxiques (36 %). Cette catégorie désigne tout agent cytotoxique n'appartenant pas à un type clairement identifié (partie I.1.2). L'hydroxycarbamide représente la consommation la plus élevée. La capecitabine et le 5-fluorouracile sont aussi très consommés. La capecitabine étant convertie par l'organisme en 5-fluorouracile, l'utilisation de cette molécule est finalement très importante. La plupart des agents anticancéreux connaissent une consommation en hausse et à différents degrés. Cette augmentation est justifiée par une demande en traitement chimiothérapeutique de plus en plus forte et estimée à près de 10 % par an (Summerhayes, 2003). Une diversification de la prise médicamenteuse est également attendue, s'orientant davantage vers une prise orale et au domicile du patient (Allwood *et al.*, 2002). Le profil de consommation est donc amené à évoluer. Ce constat pourrait être accentué par la prise en compte des traitements anticancéreux en médecine vétérinaire, dont une augmentation et une diversification sont également prévues (Castegnaro et Hansel, 2006).

I.1.4) Propriétés physico-chimiques des molécules anticancéreuses

Contrairement à certaines familles de produits pharmaceutiques, il n'existe pas de structure standard pour décrire les produits anticancéreux. La multiplicité des cancers et des objectifs de traitement en est probablement la meilleure explication. La structure peut donc être simple, mais également très complexe suivant la molécule considérée (Figure I-2).

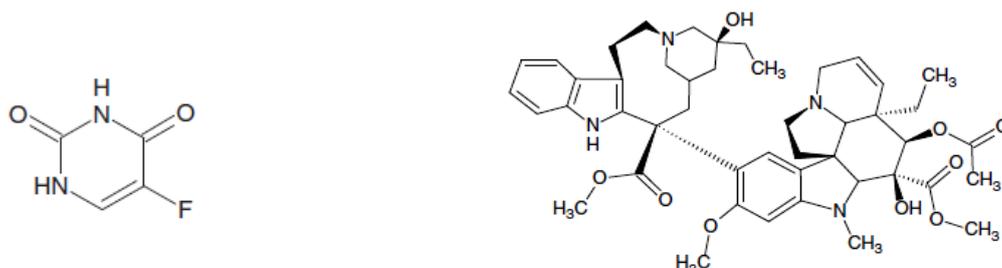


Figure I-2: Structures chimiques du 5-fluorouracile (gauche) et de la vincristine (droite)

Ces grandes différences de structure confèrent aux produits anticancéreux des caractéristiques physico-chimiques très diverses. Le nombre de molécules étant très important et les données disponibles très partielles, seuls les ordres de grandeur des caractéristiques les plus pertinentes sont renseignés (Tableau I-1) et désignent :

- (a) l'affinité pour la matière organique (*i.e.* caractère lipophile) à travers le logarithme du coefficient de partage octanol-eau $\text{Log } K_{ow}$;
- (b) l'affinité pour la phase aqueuse (*i.e.* caractère hydrophile) à travers la solubilité dans l'eau Sol_{eau} . Les paramètres $\text{Log } K_{ow}$ et Sol_{eau} sont corrélés négativement ;
- (c) l'aptitude à former des espèces chargées à travers le logarithme de la constante d'acidité pKa ;
- (d) l'équilibre entre phase aqueuse et phase gazeuse à travers la constante de Henry K_H .

Tableau I-1 : Propriétés physico-chimiques limites des molécules anticancéreuses

Caractéristiques	Valeurs limites	
	Minimum (molécule)	Maximum (molécule)
Masse molaire (g/mol)	76 (hydroxycarbamide)	1416 (bléomycine)
$\text{Log } K_{ow}^a$	-2,5 (cytarabine)	> 6 (tamoxifène)
Sol_{eau} à 25 °C (mg/L) ^a	$\sim 10^{-2}$ (vinblastine)	$\sim 10^4$ (cytarabine)
pKa^a	2,8 (cyclophosphamide)	9,8 (étoposide)
K_H (atm.m ³ /mol) ^a	$\sim 10^{-31}$ (méthotrexate)	$\sim 10^{-10}$ (chlorambucil)

a : Kosjek et Heath, 2011

L'occurrence et la distribution des produits anticancéreux dans l'environnement résulteront de ces caractéristiques. Ainsi, les molécules présentant les plus fortes valeurs de $\text{Log } K_{ow}$ auront tendance à se fixer sur les matières organiques et pourront s'y retrouver dans des quantités « facilement » quantifiables. Le potentiel de bioaccumulation sera également très important. A l'inverse, les molécules présentant les solubilités les plus grandes seront préférentiellement retrouvées dans la phase aqueuse. Les valeurs de pKa indiquent que les produits anticancéreux possèdent des propriétés d'acides faibles, d'espèces neutres ou de bases faibles. A pH environnemental ($\text{pH} \sim 7$), certains composés pourront se retrouver sous forme anionique (-) ou cationique (+) et posséderont (i) une meilleure mobilité en phase aqueuse et (ii) une plus grande aptitude à développer des interactions spécifiques avec certains éléments constitutifs des matrices rencontrées (Kosjek et Heath, 2011). Les molécules anticancéreuses ne présentent toutefois pas de sensibilité apparente à la volatilisation. En effet, les molécules ayant un K_H inférieur à 10^{-5} atm.m³/mol n'ont pas d'aptitude à se volatiliser (Lesage, 2009). Leur présence dans les environnements gazeux est donc très faible.

Généraliser le devenir des produits anticancéreux dans l'Environnement n'apparaît donc pas pertinent. Le ciblage par famille thérapeutique pourrait être davantage approprié. Toutefois, d'importantes différences peuvent également exister au sein d'une même famille. Le tamoxifène et l'anastrozole, issus du groupe des antagonistes hormonaux (antiœstrogènes), présentent une différence de plus de 4 unités pour la valeur de $\text{Log } K_{ow}$ (Xie, 2012). Ainsi, la

compréhension du comportement des produits anticancéreux requiert une caractérisation précise par molécule.

I.1.5) Sélection des molécules d'intérêt

Réaliser une bibliographie exhaustive sur l'occurrence des produits anticancéreux dans l'Environnement n'est pas une tâche envisageable. Pour orienter les recherches, plusieurs critères ont donc été retenus dans la sélection des molécules à suivre. Ces critères se basent principalement sur :

- (i) les données et pratiques de consommation. La probabilité de détection dans les matrices environnementales est d'autant plus grande qu'une molécule est consommée en grande quantité ;
- (ii) les propriétés physico-chimiques. Afin d'apprécier au mieux le devenir des produits anticancéreux, les propriétés doivent être suffisamment éloignées pour caractériser des comportements *a priori* différents ;
- (iii) les connaissances scientifiques. La disponibilité de données d'occurrence environnementale, d'écotoxicité ou encore de méthodes analytiques renseignent sur le dynamisme scientifique associé à la molécule et la pertinence de son suivi ;
- (iv) la visibilité scientifique et éventuellement sociale. Certains produits anticancéreux constitueraient de meilleurs représentants dans une perspective de diffusion des connaissances à grande échelle.

Ainsi, notre choix s'est porté sur 4 produits anticancéreux distincts : le **cyclophosphamide (CP)** et l'**ifosfamide (IFO)** du groupe des cytotoxiques de type alkylant ; le **5-fluorouracile (5-FU)** du groupe des cytotoxiques de type antimétabolite ; le **tamoxifène (TAM)** du groupe des thérapies endocriniennes de type antagoniste hormonal. Le manuscrit sera à présent orienté sur ces molécules. Elles seront principalement caractérisées par leurs abréviations dans le reste du document. Les données de consommation et les propriétés physico-chimiques des molécules sont renseignées en annexe ([Annexe A](#)). Quelques arguments complémentaires aux critères (iii) et (iv) sont également inclus.

I.2) Les molécules anticancéreuses et l'Environnement

Cette partie détaille le comportement de médicaments anticancéreux le long du continuum « consommation → traitement en station → émission vers l'environnement », définissant ainsi les bornes du système considéré. Les étapes en amont (fabrication du médicament, autorisation de mise sur le marché...) et en aval (réutilisation d'eau, production d'eau potable...) ne seront donc pas abordées. Ce parcours est représenté sous forme de schéma de synthèse et est proposé sur la [Figure I-3](#). Un lien sera régulièrement établi entre ce schéma et les différentes-sous parties.

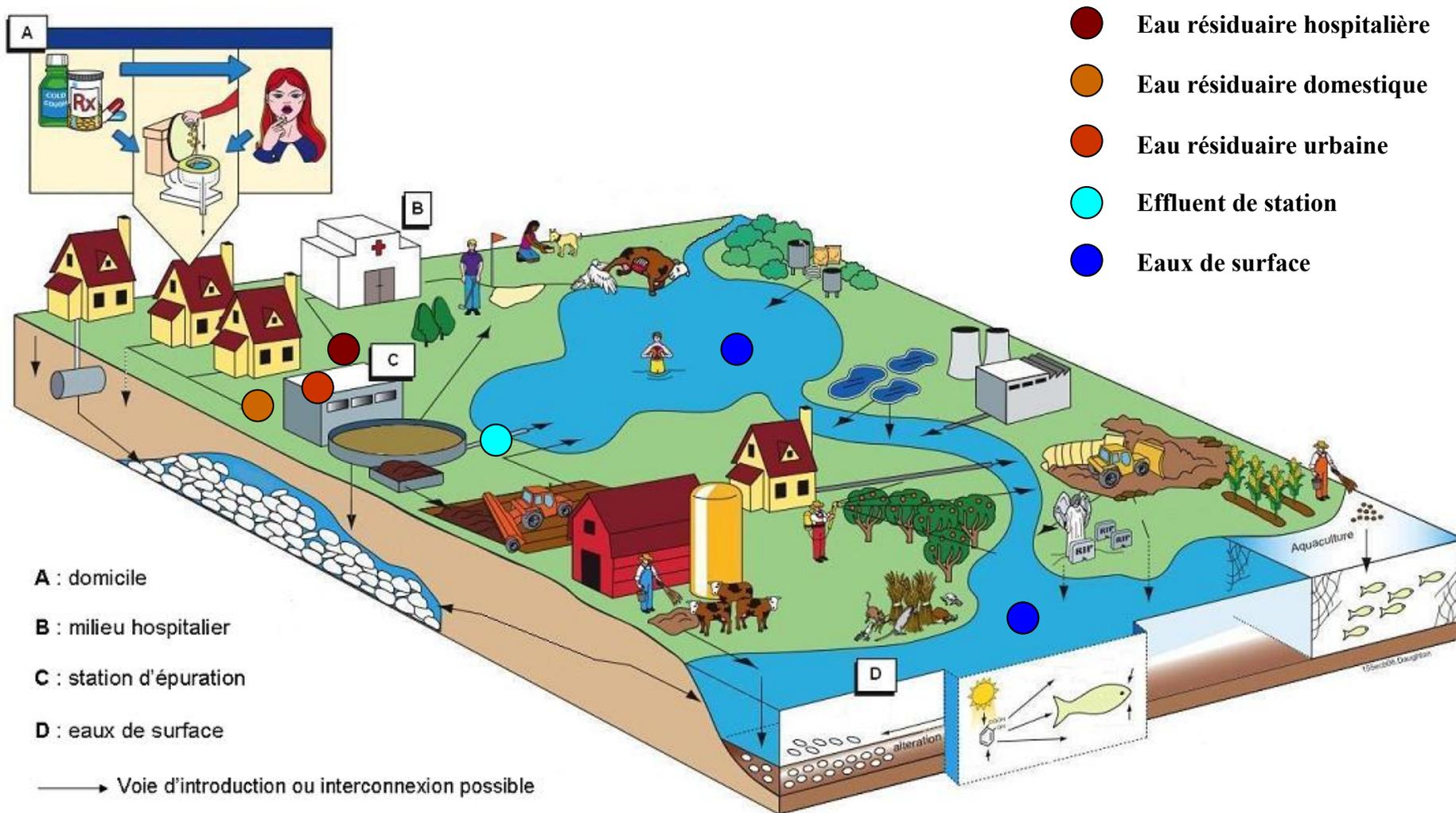


Figure I-3 : Sources et voies de dissémination possibles de produits médicamenteux dans l'Environnement (inspiré de Daughton, 2006)

Tableau I-2 : Concentrations relevées en cyclophosphamide (gauche) et ifosfamide (droite) dans diverses matrices environnementales

Matrice (fraction dissoute)	Concentration en CP (ng/L)	Pays	Référence	Matrice (fraction dissoute)	Concentration en IFO (ng/L)	Pays	Référence
Eau Résiduaire Hospitalière (ERH)	146	Allemagne	Steger-Hartmann <i>et al.</i> , 1996	Eau Résiduaire Hospitalière (ERH)	24	Allemagne	Steger-Hartmann <i>et al.</i> , 1996
	19 – 4500	Allemagne	Steger-Hartmann <i>et al.</i> , 1997		1914 (mx)	Allemagne	Kummerer <i>et al.</i> , 1997
	30 – 900	France	Catastini <i>et al.</i> , 2008		30 – 900	France	Catastini <i>et al.</i> , 2008
	4400 (mx)	France	Zini <i>et al.</i> , 2008		3900 (mx)	France	Zini <i>et al.</i> , 2008
	~300 ^a	France	Mulot, 2009		~100 ^a	France	Mulot, 2009
	6 – 2000 (mx)	Chine	Yin <i>et al.</i> , 2010		2 – 10647 (mx)	Chine	Yin <i>et al.</i> , 2010
	12100	Slovénie	Cesen <i>et al.</i> , 2012		10500	Slovénie	Cesen <i>et al.</i> , 2012
Eau Résiduaire Urbaine (ERU)	5340	Espagne	Gomez-Canela <i>et al.</i> , 2012	Eau Résiduaire Urbaine (ERU)	< 6 – 29	Allemagne	Kummerer <i>et al.</i> , 1997
	6 – 143	Allemagne	Steger-Hartmann <i>et al.</i> , 1997		1,4 – 5	Suisse	Buerge <i>et al.</i> , 2006
	2 – 11	Suisse	Buerge <i>et al.</i> , 2006		300	France	Zini <i>et al.</i> , 2008
	400	France	Zini <i>et al.</i> , 2008	Effluent de station*	< 6 – 43	Allemagne	Kummerer <i>et al.</i> , 1997
	9	Canada	Garcia-Ac, 2010		2900 (mx)	Allemagne	Ternes, 1998
	~100 ^a	France	Mulot, 2009		1,7 – 6	Suisse	Buerge <i>et al.</i> , 2006
	13100	Espagne	Gomez-Canela <i>et al.</i> , 2012		100 (m)	France	Catastini <i>et al.</i> , 2008
Effluent de station*	6 – 17	Allemagne	Steger-Hartmann <i>et al.</i> , 1997	100	France	Zini <i>et al.</i> , 2008	
	2400 (mx)	Allemagne	Ternes, 1998	Eau de rivière	0,08 – 0,14	Suisse	Buerge <i>et al.</i> , 2006
	2,1 – 9	Italie	Castiglioni <i>et al.</i> , 2005		0,6 – 1	Allemagne	Kummerer et Al-Ahmad, 2010
	0,6 (md)	Italie	Zuccato <i>et al.</i> , 2005		41	Espagne	Valcarcel <i>et al.</i> , 2011
	2,1 – 10	Suisse	Buerge <i>et al.</i> , 2006	Eau de lac	0,05	Suisse	Buerge <i>et al.</i> , 2006
	300 (m)	France	Catastini <i>et al.</i> , 2008				
	300	France	Zini <i>et al.</i> , 2008				
Eau de rivière	0,19 – 3,5	Angleterre	Llewellyn <i>et al.</i> , 2011				
	2,2 – 10,1	Italie	Zuccato <i>et al.</i> , 2000				
	0,17	Suisse	Buerge <i>et al.</i> , 2006				
	64,8	Roumanie	Moldovan, 2006				
	0,6 – 0,7	Allemagne	Kummerer et Al-Ahmad, 2010				
Eau de lac	0,07 – 0,15	Suisse	Buerge <i>et al.</i> , 2006				

a : ordre de grandeur ; m : moyenne ; md : médiane ; mx : maximum
 Pour mémoire : effluent de décharge, 97 – 192 ng/L, Allemagne, Jjemba, 2008
 CP a été recherché mais non quantifié ou détecté dans les matrices suivantes :
 (a) ERU : Busetti *et al.*, 2009 (Australie)
 (b) Boue : Ternes *et al.*, 2005 (Allemagne)
 (c) Effluent de station : Metcalfe *et al.*, 2003 (Canada) ; Brun *et al.*, 2006 (Canada) ; Laven *et al.*, 2009 (Suède) ; Hogenboom *et al.*, 2009 (Pays-Bas) ; McArdell *et al.*, 2011 (Suisse)
 (d) Eaux de surface : Ternes, 1998 (Allemagne) ; Zuccato *et al.*, 2005 (Italie) ; Paffoni *et al.*, 2006 (France)

a : ordre de grandeur ; m : moyenne ; md : médiane ; mx : maximum
 Pour mémoire : effluent de décharge, 32 – 42 ng/L, Allemagne, Jjemba, 2008
 IFO a été recherché mais non quantifié ou détecté dans les matrices suivantes :
 (a) ERU : Mulot, 2009 (France)
 (b) Boue : Ternes *et al.*, 2005a (Allemagne)
 (c) Effluent de station : Coetsier *et al.*, 2009 (France) ; Hogenboom *et al.*, 2009 (Pays-Bas) ; Llewellyn *et al.*, 2011 (Angleterre)
 (d) Eaux de surface : Ternes, 1998 (Allemagne) ; Paffoni *et al.*, 2006 (France)

Tableau I-3 : Concentrations relevées en 5-fluorouracile (gauche) et tamoxifène (droite) dans diverses matrices environnementales

Matrice (fraction dissoute)	Concentration en 5-FU (ng/L)	Pays	Référence
Eau Résiduaire Hospitalière	< 20 – 122000	Autriche	Mahnik et al., 2004
	124400 (mx)	Autriche	Mahnik et al., 2007
	800 (m)	France	Mullot et al., 2008
	6700 (mx)	France	Zini et al., 2008
	27 (mx)	Suisse	Kovalova et al., 2009
	10000 – 24000 ^a	Autriche	Ferk et al., 2009
	8000000 (mx)	Allemagne	Weissbrodt et al., 2009

a : ordre de grandeur ; m : moyenne ; mx : maximum

5-FU a été recherché mais non quantifié ou détecté dans les matrices suivantes :

(a) ERU : [Tauxe Wursch, 2005](#) (Suisse) ; [Yu et al., 2006](#) (Etats-Unis)

[Ud-Daula et al. \(2012\)](#) citent de nombreuses études où 5-FU aurait été détecté voire quantifié dans des eaux de station, de rivière, de lac ou même de nappe souterraine. Toutefois, les références correspondantes n'étaient pas disponibles ou ne donnaient pas d'indication concrète du niveau de concentration.

Matrice (fraction dissoute)	Concentration en TAM (ng/L)	Pays	Référence
Eau Résiduaire Hospitalière (ERH)	143	France	Zini et al., 2008
	369 (mx)	-	Haguenoer, 2010
	0,2 – 8,2	Chine	Liu et al., 2010
Eau Résiduaire Urbaine (ERU)	170	Angleterre	Roberts et Thomas, 2006
	0,2 – 1,5	Angleterre	Zhou et al., 2009
	0,28	Chine	Liu et al., 2010
Effluent de station*	42 (mx)	Angleterre	Ashton et al., 2004
	20 – 40	Angleterre	Thomas et Hilton, 2004
	238 ^a	Angleterre	Roberts et Thomas, 2006
	146 (m)	France	Zini et al., 2008
	5,8 – 102	France	Coetsier et al., 2009
	0,2 – 0,7	Angleterre	Zhou et al., 2009
Eau de rivière	13 – 71	Angleterre	Thomas et Hilton, 2004
	27 – 212	Angleterre	Roberts et Thomas, 2006
	25 (mx)	France	Coetsier et al., 2009

a : 603 ng/L en amont du traitement de finition UV ; m : moyenne ; mx : maximum

TAM a été recherché mais non quantifié ou détecté dans les matrices suivantes :

(a) ERH : [Verlicchi et al., 2012](#) (Italie)

(b) ERU : [Tauxe Wursch, 2005](#) (Suisse) ; [Nebot et al., 2007](#) (Angleterre) ; [Tan et al., 2007](#) (Australie) ; [Huerta-Fontela et al., 2009](#) (Espagne)

(c) Boue : [Tan et al., 2007](#) (Australie)

(d) Effluent de station : [Hilton et Thomas, 2003](#) (Angleterre) ; [Verlicchi et al., 2012](#) (Italie)

(e) Eaux de surface : [Hilton et Thomas, 2003](#) (Angleterre) ; [Nebot et al., 2007](#) (Angleterre) ; [Zhang et Zhou, 2007](#) (Angleterre)

* Les stations étudiées sont uniquement du type boues activées

I.2.1) Prise médicamenteuse et devenir dans le corps humain

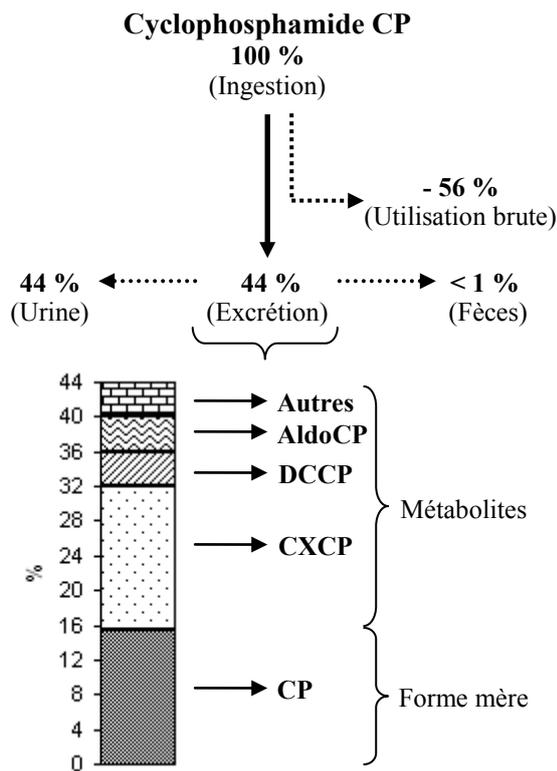
Peu importe le type de prise ou le lieu d'administration (annotations **A** et **B** de la [Figure I-3](#)), les médicaments anticancéreux subissent des réactions métaboliques complexes à l'intérieur du corps. Ces réactions induisent la disparition totale ou partielle de la molécule originelle et l'apparition de plusieurs métabolites au cours du temps ([Bohnenstengel et al., 1995](#)). La [Figure I-4](#) caractérise le devenir des 4 molécules d'intérêt. Les formes et pourcentages donnés peuvent être très variables. Cela peut venir, entre autres, de l'état physiologique du patient ([Castegnaro et Hansel, 2006](#)), de possibles interactions avec d'autres médicaments, ainsi que d'un manque de connaissances des voies métaboliques ou des moyens analytiques.

Suivant les transformations subies, des métabolites de phase I ou II peuvent être générés. Les métabolites de phase I sont issus de réactions d'hydrolyse, d'oxydation ou d'alkylation et sont souvent plus réactifs que la forme mère ([Halling-Sorensen et al., 1998](#)). C'est notamment le cas de AldoCP dans le cycle du CP ou de IPM dans celui d'IFO. Les métabolites de phase II impliquent des réactions de conjugaison (glucuronides, méthyl, sulfates...) et deviennent ainsi ponctuellement ou de manière permanente inactifs ([Halling-Sorensen et al., 1998](#)). C'est le cas du FBAL dans le cycle du 5-FU ou du ND-TAM dans celui du TAM. Outre leur réactivité, l'ensemble de ces métabolites peuvent également présenter une toxicité plus importante que la molécule mère.

Quel que soit le type de phase considéré, la métabolisation entraîne de profonds changements du comportement physico-chimique des produits anticancéreux, les rendant notamment plus solubles que la forme mère. Ces modifications vont influencer la distribution des métabolites suivant les différents excréta. Ainsi, pour CP, IFO et 5-FU, les métabolites et la molécule mère se retrouvent exclusivement dans les urines. TAM et ses métabolites présentent un profil plus varié où les formes se répartissent soit dans l'urine ou les fèces suivant l'affinité pour la matière. Partant d'une forme médicamenteuse unique, plusieurs types d'excréta peuvent donc être contaminés et par différentes formes après passage du médicament dans le corps.

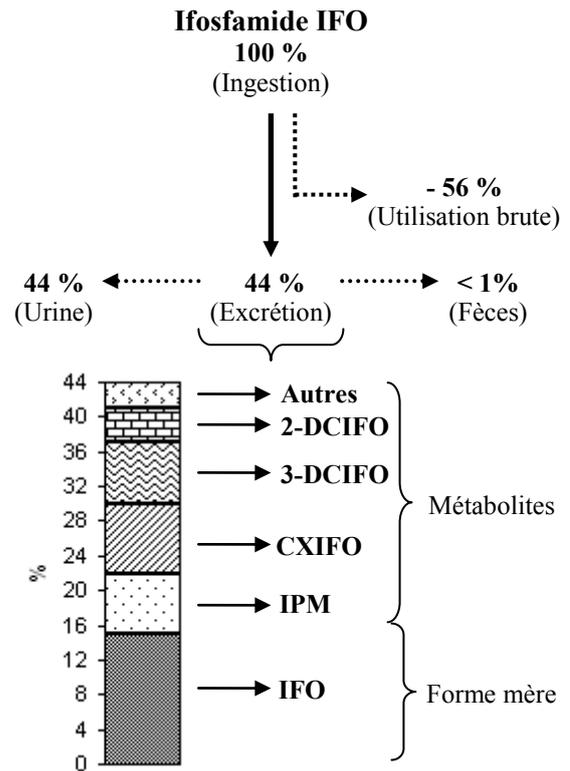
La contamination peut être encore plus large. En effet, les médicaments anticancéreux ont une demi-vie d'élimination corporelle assez longue, variant de quelques heures pour CP (12 heures) jusqu'à plusieurs jours pour TAM (> 5 jours). La génération de métabolites suit également ces variations. Le traitement en ambulatoire est une pratique en pleine évolution, la possibilité de concentrer les formes excrétées en un seul endroit est donc très difficile. Ainsi, les voies de dissémination sont multiples et l'élimination diffuse des métabolites et de leur forme mère par le corps leur confère un caractère probablement ubiquiste et pseudo-persistant.

Après excrétion, toutes ces formes sont ensuite mélangées dans le réseau avec les eaux récoltées pour constituer les eaux dites usées. Leur quantité peut éventuellement augmenter, notamment pour les molécules originelles. En effet, le jet de médicaments périmés ou non aux toilettes ([Ruhoy et Daughton, 2007](#)) ainsi que les résidus d'industrie pharmaceutique ([Larsen et al., 2007](#)) peuvent être des sources supplémentaires. Pour les anticancéreux, ces sources semblent cependant très limitées. L'utilisation contrôlée de médicaments lors des thérapies et l'application du décret CMR 2001 aux industries, impliquant une totale prise en charge des déchets générés par la fabrication ou le conditionnement des médicaments, n'encouragent pas ces voies.



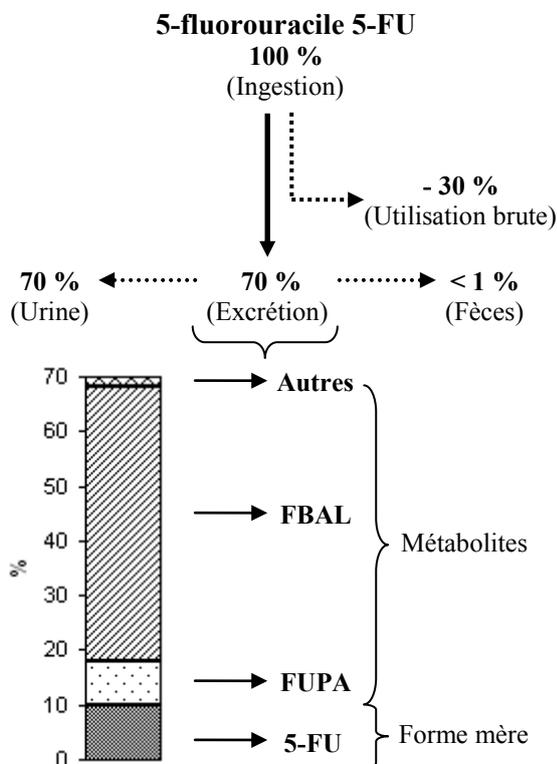
Répartition des formes (Joqueviel *et al.*, 1998)

CXCP : carboxyCP ; DCCP : deschloroéthylCP
AldoCP : aldophosphamide ; Autres : moutardes...



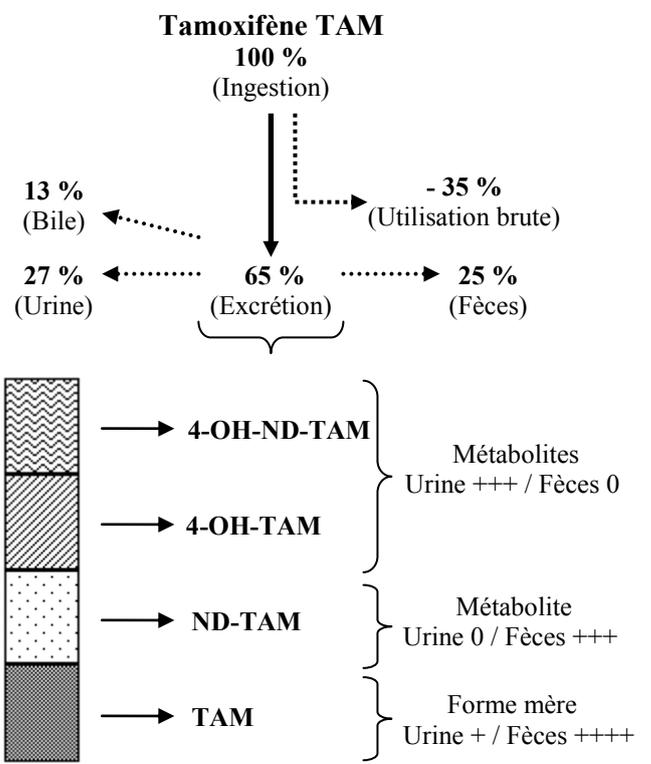
Répartition des formes (Boddy *et al.*, 1995)

IPM : moutarde d'isophosphoramide ; CXIFO : carboxyIFO
DCIFO : deschloroéthylIFO ; Autres : moutardes...



Répartition des formes (Heggie *et al.*, 1987)

FUPA : acide α -fluoro-uréidopropionique
FBAL : α -fluoro- β -alanine ; Autres : 5-fluorodihydrouracile...



Répartition qualitative des formes (Kisanga *et al.*, 2005)

ND-TAM : N-desméthylTAM ; 4-OH-TAM : 4-hydroxyTAM
4-OH-ND-TAM : 4-hydroxy-N-desméthylTAM

Figure I-4 : Représentation du devenir des molécules cibles dans le métabolisme humain

I.2.2) Acheminement et traitement des eaux en station d'épuration

Figurant parmi les premières molécules anticancéreuses recherchées, les concentrations en molécules cibles rapportées dans l'Environnement ont été caractérisées par quelques études pionnières à la fin des années 1990 (Steger-Hartmann *et al.*, 1996 ; Kümmerer *et al.*, 1997 ; Ternes, 1998), avant de connaître une franche évolution vers la fin des années 2000. Le nombre de publications donnant les résultats de mesures ponctuelles ou continues est en progression. Ces données sont consignées dans les Tableaux I-2 et I-3 (matrices aqueuses dissoutes).

L'étendue des valeurs présentées est très importante. Plusieurs ordres de grandeurs séparent ces concentrations et parfois pour une molécule donnée dans une matrice donnée. Ceci peut être en partie expliqué par les différences de stratégie d'échantillonnage, de pratiques de consommation ou de méthodes analytiques employées. De plus, il est fréquent de trouver des présentations de résultats sous forme de valeur moyenne, médiane ou de maximum. Les comparaisons de concentrations sont alors rendues difficiles et impliquent la manipulation de ces données avec précaution. Toutefois, les données des Tableaux I-2 et I-3 suggèrent l'existence d'un gradient de concentration suivant la logique présentée sur la Figure I-5, probablement attribuable aux dilutions et éliminations successives. Les ordres de grandeur pourront tout de même être exploités.

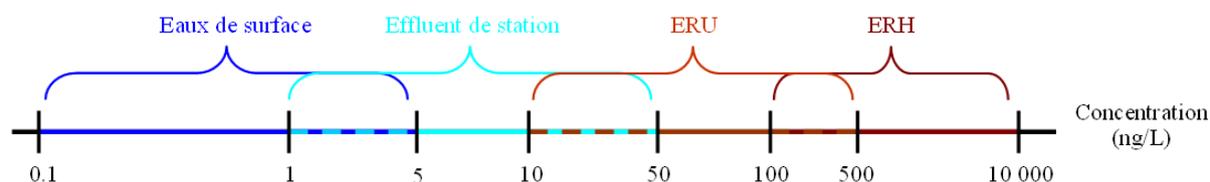


Figure I-5 : Gradient de concentration en anticancéreux dans diverses matrices aqueuses

La rencontre entre les Eaux Résiduaire Domestiques (ERD) et Hospitalières (ERH) constitue le premier point de contact dans le cycle épuratoire. Leur mélange est communément appelé Eau Résiduaire Urbaine (ERU). La concentration en molécules cibles dans les ERH est souvent plus importante que pour les ERU et ce, pour l'ensemble des molécules considérées. Les concentrations moyennes sont de l'ordre de 5000 ng/L pour les ERH contre 50 – 100 ng/L pour les ERU. De plus, les anticancéreux sont quantifiés de façon quasi-systématique dans les ERH, ce qui n'est pas le cas des ERU où la détection semble nettement plus aléatoire (Tableaux I-2 et I-3). Ces différences de concentrations et de détection soulèvent la question de la contribution des hôpitaux dans les flux de médicaments anticancéreux. Les données de contribution quantitative sont très parcellaires et s'intéressent davantage aux médicaments d'usage peu spécifiques (Schuster *et al.*, 2008 ; Ort *et al.*, 2010). Trois études ont toutefois été identifiées pour les molécules cibles. Mullot (2009) a estimé que la contribution directe moyenne des hôpitaux serait de l'ordre de 35 % (3 – 62 %) pour CP et 63 % (30 – 69 %) pour 5-FU. D'après une étude de Besse et Garric (2007), Mullot (2009) évalue que 30 % des flux pour CP et 98 % pour IFO sont imputables aux hôpitaux. L'utilisation stricte d'IFO en milieu hospitalier est retrouvée. Enfin, Langford et Thomas (2009) ont évalué une contribution inférieure à 0,01 % pour deux hôpitaux majeurs de la région d'Oslo dans les flux de TAM. Ces différentes contributions sont révélatrices de tendances de consommation mais mettent aussi en évidence l'étendue de la contamination qui ne peut être réduite à une source unique. Ces flux convergent ensuite vers les Stations d'Épuration (STEP) via les ERU.

Les STEP (annotation C de la Figure I-3) sont des unités de traitement qui consistent à réduire la charge en matières organiques et minérales des ERU, par transfert depuis une phase liquide vers une phase solide (boue) et une phase gazeuse (CO₂) (Barret, 2009). Bien que les moyens de

traitement puissent se décliner sous différentes technologies, le procédé à boues activées est de loin le plus répandu et reste un outil de choix dans la palette des spécialistes du traitement d'eaux usées. Une représentation est donnée sur la Figure I-6 et constituera la suite de la réflexion.

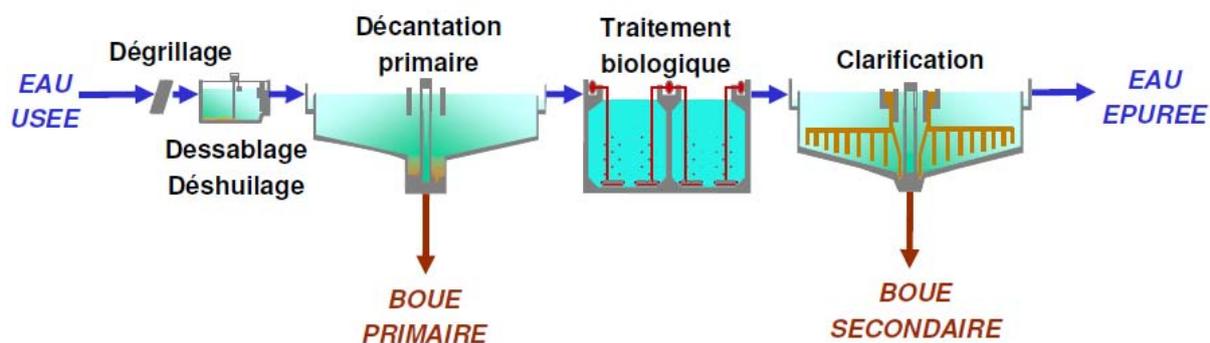


Figure I-6 : Représentation standard d'une station d'épuration par boues activées
(extrait de Barret, 2009)

Brièvement, l'épuration des eaux par boues activées obéit au principe suivant. Les eaux sont d'abord débarrassées des matières et particules les plus grossières via un prétraitement (dégrillage, dessablage, déshuilage). Le traitement primaire permet ensuite de récupérer une fraction des particules non retenues lors du prétraitement. Il génère des boues primaires, de composition fortement organique. L'étape suivante, dite traitement secondaire, consiste en une épuration biologique durant laquelle les microorganismes en place vont dégrader et minéraliser la matière organique ($> \text{g/L}$) suivant des phases aérobie et anoxie. Cette biomasse porte le nom de boue secondaire ou boue activée.

Dans sa description la plus sommaire, la boue activée est un enchevêtrement de bactéries, de matières organiques et inorganiques maintenues ensemble par une gangue de substances polymériques (Garnier *et al.*, 2005 ; Ramesh *et al.*, 2006). Cette structuration et son caractère biologiquement actif font de la boue le siège d'interactions complexes avec les polluants et notamment les produits anticancéreux. Ces interactions vont conditionner le devenir des polluants lors du traitement des eaux usées. Miège *et al.* (2009) citent alors les mécanismes suivants : la volatilisation, la sorption sur les particules et la biodégradation.

La volatilisation a précédemment été définie comme négligeable pour les médicaments anticancéreux. Les autres mécanismes sont renseignés dans la littérature. Ternes *et al.* (2004) ont étudié la sorption du CP et d'IFO en contact avec des boues primaires et secondaires. Leur étude a mis en évidence que seule une fraction de 2 % de ces molécules était retenue sur les boues. En revanche, Barron *et al.* (2009) ont démontré que TAM se sorbait à plus de 95 % sur la matrice boue, caractérisant ainsi des comportements de sorption apparemment différents. Parmi les études de biodégradation identifiées, les molécules anticancéreuses cibles sont présentées comme principalement réfractaires à toute forme de biodégradation (Steger-Hartmann *et al.*, 1997 ; Kümmerer et Al-Ahmad, 1997 ; Kiffmeyer *et al.*, 1998). Toutefois, des conclusions parfois contradictoires sont rapportées, notamment dans le cas du 5-FU (Kümmerer et Al-Ahmad, 1997 ; Kiffmeyer *et al.*, 1998). Ainsi, des questions se posent sur la conduite de telles expériences et de leur adéquation avec la réalité du traitement des eaux. Ceci est d'autant plus vrai que l'ensemble de ces tests est réalisé *ex-situ*. Ces études, largement isolées dans le paysage scientifique, ne doivent donc pas être prises comme des caractéristiques indiscutables du comportement des molécules ciblées dans le cycle épuratoire. Des considérations scientifiques plus profondes sur la sorption et la biodégradation seront respectivement développées dans les chapitres III et IV du manuscrit.

A l'exception de quelques études renseignées dans les [Tableaux I-2](#) et [I-3](#), il n'est pas possible d'établir des bilans d'élimination précis entre l'entrée et la sortie du traitement. De plus, les bilans éventuels sont partagés entre une absence totale d'élimination pour CP ([Buerge et al., 2006](#)), IFO ([Kümmerer et al., 1997](#) ; [Buerge et al., 2006](#)) et TAM ([Zhou et al., 2009](#)), et des rendements plus significatifs de 25 % pour CP ([Zini et al., 2008](#)) et 67 % pour IFO ([Zini et al., 2008](#)). Ainsi, cette grande variabilité traduit finalement des mécanismes d'interactions peu connus et des conditions d'élimination peu maîtrisées. Cette remarque est d'autant plus valable que les molécules (i) ont été très peu recherchées dans les boues, seule une étude rigoureuse est recensée, (ii) n'ont pas été détectées, notamment en raison des difficultés analytiques liées à la matrice ([Ternes et al., 2005a](#)).

Le cas du TAM dans l'étude de [Roberts et Thomas \(2006\)](#) est pertinent ([Tableau I-3](#)). En effet, par rapport à l'entrée du système, une concentration nettement plus importante est mesurée en sortie, avec un pic relevé lors du traitement de finition. L'explication la plus recevable concerne la déconjugaison possible de métabolites de type glucuronide ou autre avec retour sous la forme mère. Cette caractéristique est déjà établie et largement documentée pour le 17α -éthynylestradiol (EE2), une puissante hormone synthétique ([D'Ascenzo et al., 2003](#)). Par ailleurs, ce mécanisme peut avoir lieu plus en amont et notamment dans le réseau d'acheminement ([Clouzot, 2009](#)). Ce comportement pose alors la problématique du seul suivi des formes mères (et libres) pour caractériser la pollution médicamenteuse.

Ainsi, les STEP constituent de véritables réservoirs à polluants anticancéreux et dérivés et possèdent un pouvoir de dissémination important. Outre l'émission vers les eaux de surface d'effluents insuffisamment raffinés, une contamination des sols est également possible lors de l'épandage de boues d'épuration ([Lapen et al., 2008](#)). Le lessivage de tels sols peut également accroître le niveau de pollution des eaux continentales et au-delà ([Sabourin et al., 2009](#)). Cependant, il est important de préciser que les STEP n'ont jamais été pensées et dimensionnées pour traiter cette pollution. A l'heure actuelle, ce n'est toujours pas leur objectif (premier).

I.2.3) Présence dans les eaux de surface et risques potentiels

Les études relatant la présence de médicaments anticancéreux dans les eaux de surface (annotation **D** de la [Figure I-3](#)) sont encore moins nombreuses ([Tableaux I-2](#) et [I-3](#)). Le faible taux de détection dans ces matrices résulte d'une limite des méthodes analytiques, globalement insuffisantes pour caractériser ces molécules à des concentrations très diluées. En effet, les niveaux de contamination relevés sont de l'ordre du ng/L voire moins. Pour estimer les concentrations dans ces eaux sans recourir aux outils analytiques, de plus en plus d'auteurs utilisent des approches prédictives, basées sur les données de consommation et d'excrétion des molécules. Ces données sont connues sous le nom de concentration environnementale prédite (PEC). Des PEC de l'ordre de 1 ng/L ([Kümmerer, 2001](#)), 3,4 – 11 ng/L ([McArdell et al., 2011](#)), 1,75 ng/L ([Besse et al., 2012](#)) pour CP ; 1,2 ng/L pour IFO ([Besse et al., 2012](#)) ; 1 ng/L ([Kummerer, 2001](#)), 23 ng/L ([Johnson et al., 2008](#)) pour 5-FU et 8,6 ng/L pour TAM ([Besse et al., 2012](#)) sont ainsi proposées. Parfois cohérentes avec les mesures expérimentales, ces approches sont toutefois limitées, notamment par la prise en compte de l'élimination en STEP uniquement et non dans l'Environnement.

Dans les eaux de surface, les interactions des produits anticancéreux reposent probablement sur les mêmes mécanismes que ceux décrits en station. La photolyse peut également être considérée comme un mécanisme d'élimination supplémentaire. Toutefois, aucun des composés d'intérêt ne possède de sensibilité franche à la photolyse ([Buerge et al., 2006](#) ; [Kosjek et Heath, 2011](#)) et la contribution à l'élimination peut être considérée comme négligeable. Ainsi, le caractère pseudo-persistant de ces molécules anticancéreuses semble se confirmer. Ce constat est encore plus évident d'après l'étude de [Buerge et al. \(2006\)](#). En effet, la présence du CP et d'IFO a été

identifiée dans des eaux de lac, plusieurs kilomètres en aval du rejet. Ainsi, la pollution et les effets potentiels ne semblent pas confinés au seul point de rejet et peuvent être davantage étendus.

La toxicité de ces molécules vis-à-vis d'organismes aquatiques est une thématique de recherche en évolution constante. De nombreux tests ont été effectués en laboratoire et sont synthétisés dans le [Tableau I-4](#). Des exemples de toxicité ont donc été rapportés pour des espèces aquatiques issues de différents milieux (eau douce, eau de mer...) et de nature ou physiologie très diverses (algue, poisson, étoile de mer...). Les seuils de toxicité observés sont très variables suivant la molécule et l'espèce considérée et peuvent s'étendre du µg/L pour TAM ([DellaGreca et al., 2007](#)), jusqu'à plusieurs centaines de mg/L pour CP ([Canty et al., 2009](#)). Ces résultats suggèrent une importante variabilité inter-espèces. Des réponses différentes peuvent aussi exister pour une même espèce, ce qui est notamment le cas de l'anguille en contact avec du CP ([Santos et Pacheco, 1995](#) ; [Rodriguez-Cea et al., 2003](#)). Une variabilité intra-espèce, possiblement liée au stade de croissance, est donc possible.

L'accumulation de tels composés par les organismes et leur transmission le long de la chaîne trophique est questionnable. [Ud-Daula et al. \(2012\)](#) ont démontré que du 5-FU était retrouvé dans un protozoaire après consommation d'algue où 5-FU avait été fortement bioaccumulé. Le devenir de ces composés au sein des organismes est tout aussi préoccupant. [Meredith-Williams et al. \(2012\)](#) ont ainsi démontré qu'après une période d'accumulation, la concentration interne en 5-FU diminuait lentement dans des gammarés. La disparition de la molécule suggère une action biologique possible et l'apparition de métabolites au cours du temps, aux activités peu connues.

[Zurita et al. \(2007\)](#) ont étudié l'effet d'un métabolite possible du 5-FU, le fluoroacétate de sodium, sur des algues et crustacés. Une inhibition de la croissance a été observée pour des concentrations comparables aux seuils de toxicité rapportés dans le [Tableau I-4](#) pour 5-FU. La toxicité des métabolites doit donc être considérée. [DellaGreca et al. \(2007\)](#) ont également démontré la toxicité du TAM et de ses produits de photodégradation éventuels, à de très faibles doses (centaine de ng/L). Ce résultat soulève ainsi la problématique liée à la capacité des mélanges à induire des altérations, via des effets additifs ou de synergie ([Anway et al., 2005](#)). Des questions concernant la toxicité de sédiments contaminés ou la transmission de tels effets via l'héritage génétique sont ouvertes.

Ces seuils de toxicité sont toutefois nettement supérieurs aux concentrations mesurées ou prédites. Le risque environnemental n'est donc pas clairement établi et de surcroît mal évalué, compte-tenu du manque d'étude *in-situ* ([Garric et Ferrari, 2005](#)). Une concentration prédite sans effet biologique (PNEC) de 10 ng/L est classiquement retenue ([Straub, 2002](#)) mais reste très arbitraire et non nécessairement valable pour tous les polluants. Ce manque de données est d'autant plus préoccupant que les anticancéreux sont reconnus comme les contaminants potentiellement les plus dangereux du cycle de l'eau ([Johnson et al., 2008](#) ; [Besse et al., 2012](#)).

Alors que le risque en milieu hospitalier a largement été démontré pour le personnel médical ([De Méo et al., 1995](#) ; [Eitel et al., 2000](#)), le risque pour l'homme aux très basses concentrations est moins évident. Plusieurs études, basées sur des probabilités d'exposition ou de consommation d'eau contaminée, concluent à un effet très limité ([Kroes et al., 2000](#) ; [Johnson et al., 2008](#)) ou inexistant ([Schulman et al., 2002](#)). Cependant, [Pomati et al. \(2008\)](#) ont mis en évidence l'effet d'un cocktail de 13 produits pharmaceutiques sur l'inhibition de la croissance de cellules embryonnaires humaines HEK293. Le cocktail contenait notamment du CP à une concentration voisine de 10 ng/L. De plus, il est fortement supposé qu'une concentration en anticancéreux proche du ng/L serait susceptible d'induire des dommages génétiques aux organismes de type eucaryote ([Johnson et al., 2008](#) ; [Kovalova et al., 2009](#)). Ainsi, le risque environnemental pour l'homme peut être considéré ([Webb et al., 2003](#)).

Tableau I-4 : Données de toxicité des molécules cibles vis-à-vis d'espèces aquatiques

	Espèce	Perturbations relevées	Référence
CP	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (A)	EC ₅₀ > 100 mg/L	Grung <i>et al.</i> , 2008
	<i>Daphnia magna</i> (C)	Immobilisation : EC ₅₀ > 1 mg/L LOEC = 100 mg/L	Zoukova <i>et al.</i> , 2007 Grung <i>et al.</i> , 2008
	<i>Asterias rubens</i> (Em)	ET = 56 mg/L ; dommages génétiques	Canty <i>et al.</i> , 2009
	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Es)	Malformations (+) ; CP > 1 mg/L	Nakano <i>et al.</i> , 2003
	<i>Mytilus edulis</i> (M)	ET = 180 mg/L ; dommages génétiques	Canty <i>et al.</i> , 2009
	<i>Anguilla anguilla</i> (P)	Altération d'érythrocytes	Santos et Pacheco, 1995
	<i>Astyanax bimaculatus</i> (P)	Adulte : pas de tendance (CP = 50 mg/L)	Rodriguez-Cea <i>et al.</i> , 2003
	<i>Pimephales promelas</i> (P)	Altération d'érythrocytes ; CP > 8 mg/kg Pas de tendance (CP = 400 mg/kg)	Matsumoto et Colus, 2000 Winter <i>et al.</i> , 2007
	<i>Phoximus phoximus</i> (P)	Juvénile : dommages génétiques	Rodriguez-Cea <i>et al.</i> , 2003
	<i>Salmo trutta</i> (P)	Adulte : dommages génétiques	Rodriguez-Cea <i>et al.</i> , 2003
	<i>Tilapia rendalli</i> (P)	Dommages génétiques	Grisolia, 2002
IFO	<i>Daphnia magna</i> (C)	EC ₅₀ = 162 mg/L	Schecker <i>et al.</i> , 1998
	<i>Salmo gaiderni</i> (P)	LC ₅₀ > 1000 mg/L	Schecker <i>et al.</i> , 1998
5-FU	<i>Desmodesmus subspicatus</i> (A)	LOEC = 40 mg/L ; EC ₅₀ = 48 mg/L	Zoukova <i>et al.</i> , 2010
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (A)	EC ₅₀ = 0,13 mg/L	Bergoc <i>et al.</i> , 2012
	<i>Scenedesmus vacuolatus</i> (A)	NOEC = 0,08 mg/L ; EC ₂₀ = 54,25 mg/L Intégration dans les cellules et le génome	Ud-Daoula <i>et al.</i> , 2012
	<i>Artemia salina</i> (C)	Immobilisation : LC(EC) ₅₀ > 100 mg/L	Zaleska-Radziwill <i>et al.</i> , 2011
	<i>Daphnia magna</i> (C)	Immobilisation : LC(EC) ₅₀ > 100 mg/L Reproduction : LC(EC) ₅₀ = 1,5 µg/L	Zaleska-Radziwill <i>et al.</i> , 2011
	<i>Ciprinus carpio</i> (P)	Dommages génétiques ; pic à 7 jours	Grisolia et Cordeiro, 2000
	<i>Danio rerio</i> (P)	Survie : LC(EC) ₅₀ > 100 mg/L Croissance : NOEC < 1,56 mg/L	Zaleska-Radziwill <i>et al.</i> , 2011
	<i>Lebistes reticulatus</i> (P)	Survie : LC(EC) ₅₀ > 100 mg/L Croissance : NOEC < 1,56 mg/L	Zaleska-Radziwill <i>et al.</i> , 2011
	<i>Oreochromis niloticus</i> (P)	Dommages génétiques ; pic à 7 jours	Grisolia et Cordeiro, 2000
		<i>Tilapia rendalli</i> (P)	Dommages génétiques ; pic à 7 jours
TAM	<i>Acartia tonsa</i> (C)	EC ₅₀ = 49 µg/L	Andersen <i>et al.</i> , 2001
	<i>Cerodaphnia dubia</i> (C)	LC(EC) ₅₀ = 0,8 µg/L	DellaGreca <i>et al.</i> , 2007
	<i>Daphnia magna</i> (C)	LC(EC) ₅₀ = 1,53 mg/L	DellaGreca <i>et al.</i> , 2007
	<i>Thamnocephalus platyurus</i> (C)	EC ₅₀ = 0,4 mg/L	DellaGreca <i>et al.</i> , 2007
	<i>Paracentrotus lividus</i> (O)	Développement : LOEC = 3,7 µg/L	Pagano <i>et al.</i> , 2001
	<i>Spherechinus granularis</i> (O)	Mortalité : LOEC = 3,7 µg/L	Pagano <i>et al.</i> , 2001
	<i>Oryzias latipes</i> (P)	Mâle : VTG (+) ; Femelle : VTG (-) Mâle : VTG (+) ; Femelle : VTG (-) Éclosion (-) ; Retard à l'éclosion (+)	Chikae <i>et al.</i> , 2004 Sun <i>et al.</i> , 2007
	<i>Onchorynchus mykiss</i> (P)	EC ₅₀ = 7,1 mg/L	Caminada <i>et al.</i> , 2006
	<i>Oreochromis niloticus</i> (P)	Mâle : Testostérone (-) Mortalité (+) ; Croissance (+)	Leanos-Castaneda <i>et al.</i> , 2002 Singh <i>et al.</i> , 2012
	<i>Pimephales promelas</i> (P)	NOEC = 5,1 µg/L ; LOEC = 5,6 µg/L	Williams <i>et al.</i> , 2007
	<i>Poeciliopsis lucida</i> (P)	EC ₅₀ = 7,4 mg/L	Caminada <i>et al.</i> , 2006
	<i>Pseudobagrus fulvidraco</i> (P)	Mortalité (+) ; Croissance (+)	Park <i>et al.</i> , 2003
	<i>Brachionus calyciflorus</i> (R)	Mortalité : CL(CE) ₅₀ = 0,9 mg/L Croissance : CE ₅₀ = 0,25 mg/L	DellaGreca <i>et al.</i> , 2007

(A) : algue ; (C) : crustacé ; (Em) : étoile de mer ; (Es) : escargot ; (M) : moule ; (O) : oursin ; (P) : poisson ; (R) : rotifère ; VTG : vitélogénine ; (+) : augmentation ; (-) : diminution ; ET = effet toxique
 EC_{xx} : concentration du produit qui induit une réponse à XX % entre la ligne de base et l'effet maximum observé
 LC₅₀ : concentration du produit qui induit la mort de 50 % d'une population donnée
 LOEC : plus petite concentration induisant un effet ; NOEC : plus grande concentration n'induisant pas d'effet

I.3) Comprendre et réduire l'impact environnemental

I.3.1) Comment et où peut-on agir ?

Les stratégies de réduction de l'impact potentiel des médicaments anticancéreux dans l'Environnement sont multiples et peuvent être envisagées sur plusieurs niveaux. On peut en citer quelques exemples basés sur :

- (i) l'innovation pharmaceutique, en favorisant davantage la mise au point de médicaments « écologiques » biodégradables. Pour les composés anticancéreux, le glufosfamide, de structure quasi analogue à l'ifosfamide, possède une biodégradabilité largement plus importante tout en ne perdant pas l'efficacité de traitement due à sa structure originelle (Keil, 2008) ;
- (ii) les actions de communication, en sensibilisant les populations à l'utilisation raisonnée de médicaments et à leur prise en charge une fois le traitement terminé ou la date limite de consommation atteinte ;
- (iii) le développement technique, en favorisant la réduction des pollutions à la source, notamment en contexte hospitalier. La gestion pourrait être optimisée en séparant et concentrant les différents flux de matière (urines, fèces...). La mise en œuvre de technologies de traitement innovantes pour raffiner les effluents avant émission est indispensable. Le bioréacteur à membranes (BAM) est par exemple un outil au potentiel intéressant (projet ANR ToxeauBam, 2006 – 2009) ;
- (iv) la biologie, en exploitant le potentiel de « captage » et de dégradation par les bactéries contenues dans les boues d'épuration.

Toutefois, la mise en place d'une ou plusieurs de ces stratégies passe impérativement par une phase importante d'acquisition de données, d'exploitation et de compréhension, avant de pouvoir proposer **(i) des mesures restrictives (totalement absentes à l'heure actuelle), (ii) des suggestions d'optimisation de technologies de traitement ou (iii) de nouveaux schémas épuratoires.**

En tant que point de convergence de pratiquement toutes les pollutions, **la STEP semble être le meilleur point de contrôle.** Ceci est d'autant plus indispensable que le pouvoir de dissémination de la pollution depuis les stations est grand. De par son caractère biologique actif, **la boue d'épuration est probablement la composante clé des interactions et rétroactions avec ces polluants. Elle constitue la zone d'investigations à privilégier.**

I.3.2) Définition des objectifs globaux du travail de thèse

La boue d'épuration constitue donc l'élément central de ce travail de thèse. Les interactions qu'elle développe avec les médicaments anticancéreux sont ambiguës et peu documentées. Ainsi, les questions scientifiques posées sont les suivantes :

- (i) Les médicaments anticancéreux peuvent-ils se sorber sur la boue ?
- (ii) Existe-t-il des caractéristiques qui permettent d'expliquer qu'un polluant ira se sorber ou non sur la boue ? Le comportement peut-il être anticipé ?
- (iii) Ces médicaments peuvent-ils être biodégradés et dans quelles conditions ?
- (iv) Les mécanismes de sorption et de biodégradation sont-ils liés ?

Pour donner des éléments de réponse, il faut déjà être capable de qualifier et quantifier la présence des médicaments anticancéreux dans la matrice boue et à des concentrations où le défi analytique prend toute son importance.

Le premier verrou à lever dans ce travail est donc d'ordre technique. Il repose sur la mise au point d'une méthode d'analyse de produits anticancéreux dans la matrice boue. La difficulté principale réside dans l'analyse de traces dans une matrice excessivement complexe. De nos lectures, il est apparu que l'étude du devenir de métabolites était très peu renseignée. Or, elle est importante pour apprécier le comportement des produits de dégradation lors du traitement en STEP et dans le milieu récepteur. Ainsi, deux métabolites du CP ont été rajoutés aux molécules précédemment définies : la **moutarde de phosphoramide (PHO)** et la **moutarde nor-azotée (NOR)**. Leurs caractéristiques physico-chimiques sont données sur l'[Annexe B](#). Le nombre d'analytes recherchés est donc de 6.

Les autres verrous sont davantage liés à des questions scientifiques autour de la problématique du devenir de molécules traces dans l'Environnement. Ils reposent sur la compréhension des interactions « anticancéreux/boue », que ce soit au travers de l'étude du phénomène de sorption, de biodégradation et finalement de leur couplage. Ces objectifs sont toutefois ici présentés de manière très générale. Ils seront repris plus en détail dans les prochains chapitres de ce manuscrit.

Chapitre II.

Mise au point d'une méthode d'analyse de molécules anticancéreuses en matrice environnementale complexe : application aux boues biologiques

Les molécules anticancéreuses ciblées n'étant pas analysées au laboratoire, il a été nécessaire de développer une procédure analytique fiable. Cette procédure devait prendre en compte plusieurs critères comme (i) la possibilité d'une analyse des quantités contenues dans les phases aqueuse et particulaire des boues, (ii) la nécessité d'atteindre des performances suffisamment élevées pour rendre compte de caractéristiques environnementales, (iii) les limitations pratiques tels que la disponibilité des appareillages ou des volumes d'échantillon par exemple.

Ce second chapitre se décompose en trois parties. La première partie est une revue bibliographique décrivant la prise en charge d'échantillons de boue, ainsi que les méthodes d'extraction et d'analyse de produits anticancéreux à des fins environnementales. La seconde partie présente les différentes stratégies appliquées via la présentation des matériels et des méthodes utilisés. La dernière partie propose une synthèse et une discussion autour des résultats générés. Cette synthèse se décline principalement sous la forme d'une étape de développement et de validation de procédures analytiques. L'ensemble s'appuie sur une démarche originale.



II.1) Revue bibliographique

II.1.1) Introduction et structuration de la partie

Les connaissances en matière d'analyse de produits anticancéreux sont largement documentées et maîtrisées pour les matrices biologiques humaines telles que le plasma sanguin (Huitema *et al.*, 2001 ; Ekhart *et al.*, 2007), l'urine (Paci *et al.*, 2001) ou les sérums (Corlett et Chrystyn, 1996). En revanche, la prise de conscience d'une présence environnementale est plutôt récente et les difficultés expérimentales qui y sont liées en font un domaine très peu renseigné (Kostopoulou et Nikolaou, 2008). L'analyse d'échantillons environnementaux connaît une évolution constante, impliquant des techniques d'extraction toujours plus sélectives et des systèmes de détection de plus en plus performants (Nussbaumer *et al.*, 2011). La multiplication de stratégies analytiques originales est ainsi prévue pour les molécules anticancéreuses.

La boue est une matrice environnementale qui possède la particularité d'être composée à la fois d'une phase aqueuse et d'une phase solide. La séparation physique de ces deux phases peut être assurée soit par filtration (Saggadi, 2009), soit par centrifugation (Stevens-Garmon *et al.*, 2011). La prise en charge de chacune de ces phases se décompose chronologiquement suivant des étapes de prétraitement, d'extraction, de purification et de concentration, destinées à rendre l'analyse possible. La synthèse proposée décrit ces stratégies. Les matrices aqueuses renseignées correspondent aux effluents hospitaliers, de STEP et aux eaux de surface, pour lesquelles la disponibilité de données était suffisante (Chapitre I). Les matrices solides sont uniquement orientées sur la phase solide de boue, seule matrice étudiée pour les molécules recherchées. Aucune information sur les moutardes NOR et PHO en contexte environnemental n'a été recensée. Lorsque les données étaient très parcellaires, des considérations générales sur l'analyse de produits pharmaceutiques ont été sélectionnées.

II.1.2) Prise en charge d'échantillons aqueux

Depuis la découverte historique d'une pollution d'eau de lac par l'acide clofibrique (Garrison *et al.*, 1976), les matrices aqueuses environnementales ont bénéficié d'une attention particulière. A ce jour, le caractère ubiquiste des produits pharmaceutiques dans divers compartiments aquatiques a été largement confirmé. Détecter ces molécules impose la transposition depuis un échantillon très dilué vers un extrait concentré, au fil d'une procédure analytique caractéristique.

II.1.2.1) Conditionnement des échantillons aqueux

Les matrices aqueuses échantillonnées contiennent généralement des particules de taille et en quantité variables. La présence de particules peut diminuer la qualité de l'extraction, que ce soit au niveau du déroulement de la procédure ou de l'efficacité de la méthode (*e.g* baisse de rendement). Une étape de filtration est donc quasi systématique et habituellement réalisée sur filtre en fibre de verre ou membrane en nylon. Le seuil de coupure est régulièrement discuté. En effet, sept seuils de coupure différents, compris entre 0,2 et 2,7 μm , ont été identifiés pour la filtration de matrices aqueuses en vue d'une extraction de produits anticancéreux. La communauté scientifique éprouve une certaine difficulté à définir une frontière entre espèces particulières et « non particulières », commune à tout type de matrice. Toutefois, le seuil de 1,2 μm est le plus fréquemment retenu. Le filtrat obtenu peut éventuellement subir d'autres traitements, notamment lorsque l'extraction n'est pas immédiate et qu'un risque de dégradation existe. Pour stabiliser les échantillons, des adjuvants chimiques peuvent être utilisés. L'azide de sodium ou le formaldéhyde sont des puissants inhibiteurs de l'activité bactérienne et limitent la dégradation des polluants par cette voie. L'acide ascorbique est parfois utilisé pour son action anti-oxydante, limitant la réactivité de la matière organique avec les polluants. L'ajustement du pH est le plus souvent

effectué. Il permet, entre autres, de maintenir les polluants sous une forme parfois plus stable et de limiter fortement l'activité bactérienne. La valeur d'ajustement est souvent pensée en relation avec le pH de travail requis pour l'étape d'extraction. Les échantillons prétraités sont ensuite conservés dans un flacon adapté, à 4 °C ou plus rarement à - 20 °C, et à l'obscurité jusqu'à l'extraction. De nombreux auteurs soulignent la nécessité d'extraire les échantillons le plus rapidement possible, idéalement sous 24 heures (Castiglioni *et al.*, 2005 ; Brun *et al.*, 2006 ; Mullot, 2009).

II.1.2.2) Extraction des composés cibles et concentration

L'extraction de produits pharmaceutiques contenus dans les matrices aqueuses peut être réalisée par des méthodes d'extraction liquide-liquide ou liquide-solide. Historiquement réalisée par voie liquide-liquide, ces applications deviennent de plus en plus minoritaires, malgré leur facilité d'utilisation et l'implication d'un matériel peu coûteux. En effet, l'extraction liquide-liquide (LLE) est classiquement réalisée avec une ampoule à décanter, en mélangeant un volume d'échantillon important (> 250 mL) avec un solvant organique de volume variable (25 – 150 mL). Les produits pharmaceutiques possédant principalement des caractéristiques polaires, la difficulté réside dans la recherche d'un solvant à la fois non miscible avec l'eau et pour lequel les analytes auraient une affinité plus importante. De plus, de multiples extractions sont souvent nécessaires pour récupérer l'intégralité des analytes, rendant la méthode longue, parfois peu reproductible et consommatrice de grandes quantités de solvants (Baugros, 2008). Aucune application n'a été identifiée pour les produits anticancéreux. Les méthodes d'extraction liquide-solide sont davantage appropriées et ont été systématiquement utilisées pour les molécules recherchées. Le Tableau II-1 reprend ces méthodes et le nombre recensé. Le détail des références est donné en annexe (Annexe C).

Tableau II-1 : Méthodes d'extraction liquide-solide et occurrence pour les anticancéreux

Molécule	Méthode d'extraction liquide-solide		
	SBSE	SPE	Bag-SPE
CP	0	22	1
IFO	0	11	0
5-FU	0	6	0
TAM	1	10	0

La microextraction sur barreau (SBSE) est basée sur l'extraction de molécules par sorption à l'aide d'un barreau magnétique de 1 à 2 cm de longueur, recouvert d'un polymère et agité par le biais d'un agitateur magnétique. La SBSE est une méthode dérivée de la microextraction sur phase solide (SPME) dans laquelle les analytes sont sorbés sur un polymère adéquat recouvrant une fibre de silice. L'épaisseur de polymère est environ 50 à 250 fois plus importante en SBSE qu'en SPME, rendant l'extraction souvent plus efficace (Fontanals *et al.*, 2010). Tan *et al.* (2007) ont essayé de récupérer du TAM contenu dans de la phase aqueuse de boues par SBSE. Leur méthodologie n'a pas permis d'estimer de rendement de la méthode en phase aqueuse, le dopage étant réalisé sur l'échantillon brut avant centrifugation. Par ailleurs, leurs rendements de récupération sur la boue « totale » étaient très variables, entre 20 et 89 % suivant l'échantillon. Plusieurs raisons expliquent le peu d'applications de la SBSE pour l'extraction de produits pharmaceutiques. En effet, la récupération des analytes passe soit par une désorption liquide peu maîtrisée soit par une thermodésorption, pouvant dégrader les composés polaires les plus sensibles (Bicchi *et al.*, 2009). De plus, le polymère recouvrant les barreaux est en PolyDiMéthylSiloxane (PDMS), aux caractéristiques fortement apolaires. L'affinité des produits pharmaceutiques pour ce type de phase est très limitée voire inexistante. Le développement de phases davantage polaires est toujours en cours (Bicchi *et al.*, 2009) et pourrait favoriser les applications.

L'extraction sur phase solide (SPE) est de loin la technique la plus utilisée et probablement la plus mature dans l'extraction de micropolluants. Le principe de la SPE est basé sur la fixation et l'élution de molécules d'intérêt sur un adsorbant, avec une sélectivité plus ou moins intéressante suivant la nature des phases et les conditions expérimentales appliquées. L'extraction par SPE suit une procédure précise représentée sur la [Figure II-1](#) et explicitée dans le paragraphe suivant.

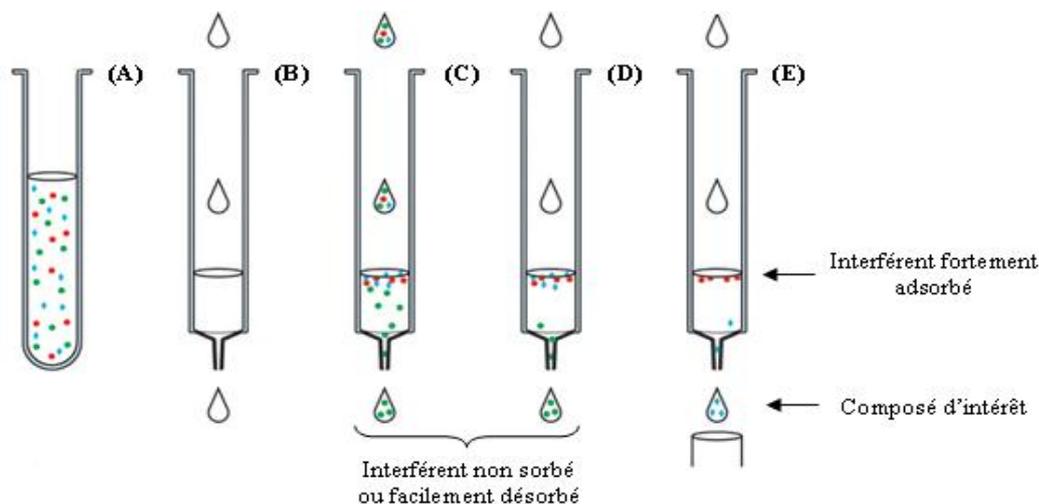


Figure II-1 : Procédure standard d'extraction par SPE

L'étape (A) consiste à affiner le prétraitement de l'échantillon de manière à le rendre exploitable. Les étapes précédentes (filtration...) constituaient déjà un conditionnement. Un nouvel ajustement du pH est parfois nécessaire pour favoriser la rétention des composés cibles. En interactions hydrophobes, un pH acide est souvent favorable aux espèces acides ([Barcelo et Petrovic, 2005](#)) alors qu'un pH neutre ou basique l'est davantage aux espèces basiques ([Vieno et al., 2006](#)). La force ionique est parfois corrigée pour faciliter les interactions, notamment pour les espèces hydrophobes ([McClure et Wong, 2007](#)). L'ajout d'agents chélatants tels que le sulfate de sodium ([Feitosa-Felizzola et al., 2007](#)) ou l'EDTA ([Castiglioni et al., 2005](#)) est également possible pour les espèces susceptibles de se fixer aux substances humiques et/ou protéiques de la matrice. L'ensemble de ces produits doivent toutefois être additionnés en quantité contrôlée pour ne pas limiter la qualité de l'extraction. L'étape (B), dite de solvatation, consiste à conditionner la cartouche avec un ou plusieurs solvants organiques (méthanol, acétone...) afin d'activer les sites de fixation. Le dernier solvant ajouté, souvent proche de celui de la matrice à étudier, permet de pré-équilibrer la cartouche et préparer la réception de l'échantillon, d'un volume généralement compris entre 50 et 1000 mL. L'échantillon est alors chargé sur la cartouche et percole (étape (C)). Les composés d'intérêt ou à forte affinité pour l'adsorbant seront efficacement retenus. Ceux qui ne présentent pas d'affinité particulière seront soit légèrement retenus, soit entraînés avec l'échantillon aqueux. Une étape de lavage (étape (D)) est classiquement effectuée de manière à éliminer les interférents faiblement adsorbés et raffiner l'extrait à venir. Elle est réalisée avec un solvant éluant approprié pour ne pas entraîner les composés d'intérêt. Son contenu est parfois légèrement organique (< 10 %). Une étape facultative de séchage de la cartouche peut ensuite être appliquée et permet d'éliminer l'eau résiduelle. Les composés cibles sont finalement élués (étape (E)) avec un solvant spécifiquement choisi pour rompre les interactions avec le support, tout en évitant au maximum de rompre les liaisons formées par des interférents fortement adsorbés. Les solvants, généralement le méthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle, sont utilisés purs, en mélange ou avec un pH contrôlé pour améliorer la sélectivité ([Gros et al., 2006](#)).

Sur les deux dernières décennies, l'extraction par SPE a concentré d'importants efforts de recherche. Elle bénéficie à présent d'une grande polyvalence et souplesse d'utilisation, notamment grâce à son automatisation et la diversification des adsorbants. Ainsi, la récupération des anticancéreux depuis les matrices aqueuses est rendue possible et continuellement plus efficace. Le [Tableau II-2](#) retrace cette évolution pour les molécules cibles. Les références sont détaillées en annexe ([Annexe C](#)).

Tableau II-2 : Descriptif des méthodes SPE appliquées pour les anticancéreux

	Support	Type de phase	Matrice extraite	Rendements extrêmes (%)	Commentaires	Nombre de références
CP	C ₁₈	Silice greffée chaîne apolaire	ERH / ERU	72 / 89	< Années 2000	1 / 1
			Effluent	47 – 57	Variabilité élevée	2
	XAD-4	S-DVB	Effluent / EdS	nd / nd	-	1 / 1
	PPL – Bond Elut	S-DVB	EdS	71	-	1
	Bio Beads	PS-DVB	ERU	74 – 88	-	1
			Effluent / EdS	nd / 80 – 94	-	1 / 1
	Lichrolut EN	PS-DVB non fonctionnalisé	ERH	87	-	1
			Effluent	107	-	1
	Strata X	Polymère S-DVB/NVP	Effluent / EdS	59 – 148 / 148	Variabilité ± 5 %	3 / 1
	Oasis HLB	Copolymère PS-DVB/NVP	ERH / ERU	>50 / 95	Variabilité ± 10 %	1 / 2
Effluent / EdS			82 – 95 / 68 – 84	2 / 3		
Oasis MCX/MAX	Base HLB échange d'ions ^a	ERU	87	Très récent	1	
		Effluent	92		1	
IFO	C ₁₈	Silice greffée chaîne apolaire	ERH	99	< Années 2000	1
			Effluent	45 – 51	Variabilité élevée	2
	PPL – Bond Elut	S-DVB	EdS	73	-	1
	Bio Beads	PS-DVB	ERU	75 – 93	-	1
			Effluent / EdS	nd / 90 – 102	-	1 / 1
	Lichrolut EN	PS-DVB non fonctionnalisé	ERH	96	-	1
	Strata X	Polymère S-DVB/NVP	Effluent / EdS	69 - 94 / 94	Variabilité ± 5 %	2 / 1
	Oasis HLB	Copolymère PS-DVB/NVP	ERH	>50	Variabilité ± 10 %	1
			EdS	81		1
5-FU	Strata X	Polymère S-DVB/NVP	ERH	nd	-	1
			Effluent	nd		1
	Isolute ENV+	S-DVB fonction OH	ERH / ERU	46 – 96 / 73	Variabilité ± 5 %	3 / 1
TAM	Strata X	Polymère S-DVB/NVP	ERU	73	Variabilité élevée	1
			Effluent ; EdS	19 – 71 / 71		3 / 1
	Oasis HLB	Copolymère PS-DVB/NVP	ERH ; ERU	50 – 92 / 50 – 110	Variabilité < 15 %	3 / 4
			Effluent	52 – 110		5

S : styrène ; DVB : divinylbenzène ; NVP : N-vinylpyrrolidone ; PS : polystyrène ; EdS : eau de surface ; HLB : balance hydrophile/hydrophobe ; nd : non déterminé ; a : cations (MCX) et anions (MAX)

Les premiers adsorbants disponibles utilisaient des corps de silice greffés avec des groupements non polaires de type de C₁₈, favorisant des interactions de même nature. Ces supports ont donc montré des limites dans la récupération de molécules polaires. La tenue aux pH extrêmes était peu satisfaisante et les rendements d'extraction présentaient parfois une très faible reproductibilité, notamment en raison d'une qualité de greffage variable. Les cartouches polymériques (PPL-Bond Elut, Lichrolut EN, Isolute ENV+) ont progressivement remplacé ces adsorbants. Dotés d'une meilleure tenue aux pH extrêmes et d'une capacité d'adsorption plus élevée, ces adsorbants ont permis d'obtenir des rendements bien plus importants avec une reproductibilité plus intéressante. Ces phases ne sont toutefois utilisées que pour l'extraction spécifique de composés apolaires ou

polaires suivant la nature du support. De nouvelles phases polymériques plus polyvalentes ont été développées (StrataX, Oasis HLB). Ces supports possèdent des propriétés mixtes hydrophiles et hydrophobes, permettant d'extraire des composés polaires et moins polaires simultanément. Les deux cartouches donnent des performances sensiblement équivalentes. La dernière génération de supports disponibles utilise à la fois des phases mixtes et échangeuses d'ions (Oasis MAX et MCX). Suivant les conditions opératoires, ces adsorbants peuvent produire des interactions hydrophiles, hydrophobes et ioniques et permettent de réaliser des extractions avec une grande sélectivité. L'utilisation de ces supports et/ou l'association de plusieurs types de phases en série présentent un intérêt certain pour l'extraction simultanée de composés aux comportements physico-chimiques très différents. Les rendements fournis dans le [Tableau II-2](#) présentent des écarts importants, fonction de l'adsorbant utilisé, de la molécule étudiée et de la matrice à extraire. Pour tous ces supports, l'évaluation précise des rendements et la compensation des pertes éventuelles et/ou variables passent nécessairement par l'utilisation d'un étalon d'extraction introduit avant percolation.

Citée pour mémoire, [Magner *et al.* \(2009\)](#) ont utilisé une méthode dérivée de la SPE pour l'extraction du CP dans des eaux de STEP : la bag-SPE. La méthode consiste en une résine en polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) introduite dans un petit sac en polyester. Le sac a été mis en contact avec l'échantillon et lentement agité pour favoriser l'adsorption des composés. La désorption a ensuite été réalisée avec un solvant organique. La méthode a été comparée avec l'extraction SPE. Le rendement en bag-SPE (45 %) était significativement moins élevé qu'en SPE (73 %) mais l'extrait était plus raffiné (*i.e* moins d'interférents).

Les différents extraits organiques obtenus doivent généralement être concentrés afin que les teneurs en composés cibles soient quantifiables avec la technique analytique sélectionnée. Pour des volumes d'extrait importants (> 10 mL), l'évaporation rotative sous vide avec chauffage léger peut être appliquée. L'utilisation d'un TurboVap, évaporant simultanément plusieurs extraits sous un courant d'azote en spirale à des températures contrôlées, est possible et plus avantageuse ([Foan, 2012](#)). L'évaporation sous flux d'azote, à froid, est préférée pour des volumes plus modestes.

II.1.3) Prise en charge d'échantillons solides

Les échantillons particuliers sont classiquement moins étudiés que les échantillons aqueux. Ceci peut notamment être expliqué par les difficultés liées à la complexité de ces échantillons, que ce soit au niveau de l'étape d'extraction ou lors de l'analyse. Pourtant, la demande de méthodes analytiques fiables est croissante. En effet, la tendance actuelle est à l'acquisition de données d'occurrence de micropolluants dans les boues (projet AMPERES). L'idée qui en découle repose sur l'estimation du risque d'exposition lors de l'épandage de boues contaminées, qui pourrait éventuellement aboutir à la mise en place de nouvelles directives sanitaires. Premier jalon d'une chaîne complexe, l'évaluation des niveaux de contamination suit déjà une démarche délicate et précise.

II.1.3.1) Conditionnement des échantillons particuliers

Après centrifugation ou filtration, le culot ou dépôt est encore très humide et biologiquement actif. Lors de l'extraction, l'eau contenue peut limiter fortement la diffusion des analytes depuis la matrice vers le solvant, surtout avec l'utilisation de solvants apolaires ([Dionex, 2008](#)). Pour assurer une élimination complète de l'eau et limiter par ailleurs l'activité bactérienne, trois stratégies peuvent être envisagées. La première consiste en un séchage par injection d'air et à température ambiante ([Helaleh *et al.*, 2005](#) ; [Smyth *et al.*, 2007](#)). Cette procédure implique des temps de travail très longs. La seconde repose sur le séchage par déshydratation thermique dans un four ([Miège *et al.*, 2003](#)). Des températures élevées sont parfois appliquées (> 80 °C), ce qui peut poser des problèmes pour les composés sensibles à la volatilisation ou à la dégradation thermique. La lyophilisation constitue la dernière voie. Elle consiste à assécher l'échantillon par

sublimation de l'eau, caractérisant le passage de l'état solide à l'état gazeux. La lyophilisation est souvent préférée aux autres techniques car elle est assez rapide et préserve l'intégrité des échantillons (Meesters et Schröder, 2002). Ainsi, toutes ces étapes aboutissent à l'obtention d'une phase solide sèche et fortement hétérogène. Pour assurer une extraction optimale, l'homogénéité des échantillons est souvent requise et obtenue par broyage. Suivant la quantité d'échantillon disponible, le broyage sera effectué soit à l'aide d'un blender (quantité importante), soit à l'aide d'un mortier et d'un pilon (quantité modeste). Si la granulométrie des particules obtenues est trop importante (> 2 mm), une étape de tamisage peut éventuellement être intégrée (Nieto, 2010). L'échantillon final se présente sous la forme d'une fine poudre pulvérulente. Il est classiquement conservé dans un flacon adapté, hermétiquement clos, à 4 ou -20 °C avant extraction.

II.1.3.2) Récupération des molécules cibles depuis la matrice solide

De nombreuses techniques d'extraction de matrices solides ont été développées au cours des trois dernières décennies (Wan et Wong, 1996). On distingue les méthodes « traditionnelles » telles que le Soxtec ou les ultrasons (USE), des méthodes plus « récentes » telles que les micro-ondes (MWE) ou l'extraction par solvant pressurisé et à chaud (PLE), toutes utilisant principalement des solvants organiques pour extraire des masses d'échantillons classiquement comprises entre 0,25 et 2 g. Dans tous les cas, des étalons commerciaux sont injectés avant l'extraction de manière à évaluer les rendements et/ou corriger les pertes éventuelles. Pour la récupération de composés anticancéreux, seules des applications boues ont été identifiées, au nombre de quatre. Ces études sont répertoriées dans le Tableau II-3. Les références sont détaillées en annexe (Annexe C).

Tableau II-3 : Méthodes et rendements d'extraction pour les anticancéreux dans les boues

Molécule	Méthodes traditionnelles				Méthode récente	
	Soxtec	Rendement	USE	Rendement	PLE	Rendement
CP	1	~ 20 %	2	58 – 85 %	1	82 %
IFO	1	~ 20 %	1	53 – 59 %	-	-
5-FU	-	-	-	-	-	-
TAM	-	-	-	-	-	-

Le Soxtec est une technique dérivée du Soxhlet et fonctionnant sur le principe de l'entraînement de vapeurs organiques, suivie de leur condensation et macération avec la matrice à extraire. Saggadi (2009) a réalisé l'extraction du CP et d'IFO dans des boues suivant cette technique. Les rendements obtenus étaient faibles, de l'ordre de 20 %, pour une méthode non optimisée.

L'utilisation de l'USE a déjà été décrite dans la littérature pour les produits anticancéreux. Elle repose sur le principe de la cavitation. Induites par la fréquence des ultrasons, des bulles microscopiques vont éclater au voisinage de la matrice suivant des phases de compression et décompression, rendant la récupération d'analytes possible. Ternes *et al.* (2004) et Okuda *et al.* (2009) ont appliqué l'USE dans leur méthode d'extraction du CP et/ou de IFO dans les boues. Les rendements observés ont été assez satisfaisants mais variables. La reproductibilité de l'USE est donc souvent discutée (Luque-Garcia et Luque de Castro, 2003) notamment en raison du peu de contrôle sur la température.

D'autres méthodes d'extraction « traditionnelles » sont également possibles, telles que l'agitation manuelle ou mécanique par exemple. Très répandues, toutes ces méthodes ne fournissent pourtant pas suffisamment d'énergie pour libérer rapidement les analytes emprisonnés dans la matrice boue (Zuloaga *et al.*, 2012). Elles consomment donc beaucoup de solvants et de temps. Elles sont alors progressivement remplacées par des méthodes plus innovantes et souvent plus performantes.

Les techniques MWE et PLE nécessitent l'usage d'appareils très spécifiques. L'extraction par micro-ondes est réalisée dans un four dans lequel une mixture formée par l'échantillon à extraire et le solvant va être chauffée par l'énergie des ondes produites. L'agitation moléculaire engendrée va déstructurer la matrice et permettre la diffusion des analytes vers le solvant. Des applications pour l'extraction de produits pharmaceutiques ont été identifiées (Vega-Morales *et al.*, 2011), mais aucune pour les molécules anticancéreuses. Nécessitant l'utilisation de solvants présentant des moments dipolaires permanents pour être efficace, la MWE encourage l'utilisation d'échantillons partiellement humides, l'eau présentant une telle caractéristique. Le mélange entre l'échantillon à extraire et le solvant implique une étape de filtration indispensable pour récupérer l'extrait.

La PLE, aussi connue sous le nom d'extraction accélérée par solvant ASE (marque déposée par la société Dionex), est une technique mettant en jeu des pressions élevées, ce qui permet de réaliser l'extraction à des hautes températures tout en gardant les solvants dans leur état liquide. Il en résulte une meilleure solubilité des analytes et des vitesses de transfert plus importantes. Le couplage de pressions et températures élevées permet d'imprégner efficacement la matrice à extraire, avec un volume de solvant peu important et des temps d'extraction rapides. Okuda *et al.* (2009) ont appliqué cette méthode pour l'extraction du CP dans les boues. Ils ont obtenu un rendement de récupération (82 %) sensiblement équivalent à celui obtenu en USE (85 %), mais avec un confort de manipulation notable pour la PLE. De plus, les méthodes par PLE bénéficient souvent d'une très bonne répétabilité (variabilité < 5 %) et sont donc de plus en plus utilisées (Zuloaga *et al.*, 2012), au prix d'une phase d'optimisation importante.

Une variante de la PLE repose sur l'utilisation seule de l'eau comme solvant d'extraction. Sous des conditions de température et de pression bien précises, l'eau possède des propriétés extractantes comparables à celles des solvants organiques usuels et peut donc s'y substituer. Peu d'exemples d'application à l'extraction de composés traces dans les boues ont été identifiés (Saleh *et al.*, 2011). Cependant, le développement d'une chimie moins consommatrice de solvants organiques, et donc davantage respectueuse de l'Environnement devrait favoriser son application.

D'autres méthodes d'extraction « récentes » telles que la micro-extraction sur phase liquide (LPME), la dispersion de la matrice en phase solide (MSPD), l'extraction par fluide supercritique (SFC) sont possibles. Ces applications sont toutefois très secondaires. Leur adéquation reste parfois à démontrer.

Parmi les méthodes proposées dans la littérature, deux stratégies d'extraction sont généralement opposées. La première consiste en une stratégie d'épuisement de la matrice durant laquelle les composés d'intérêt sont récupérés en appliquant des conditions opératoires les plus extrêmes possibles. La seconde stratégie est davantage sélective en recherchant scrupuleusement les conditions opératoires optimales pour l'extraction des composés cibles (Runnqvist *et al.*, 2010). Ces deux stratégies sont souvent suffisantes pour extraire quantitativement les molécules d'intérêt. Elles peuvent s'accompagner de l'extraction de composés interférents, parfois en quantité importante, et qui peuvent perturber l'analyse. Leur élimination implique souvent une phase de purification.

II.1.3.3) Purification des extraits et concentration

Les procédures de purification sont nombreuses et peuvent être employées seules ou en association lorsque l'extrait obtenu est jugé trop chargé. Les principales procédures identifiées dans la littérature sont la neutralisation du soufre, la chromatographie sur gel perméable (GPC) et la SPE (Zuloaga *et al.*, 2012).

Le soufre et ses dérivés sont des composés suffisamment solubles pour être co-extraits avec les analytes recherchés, produisant des massifs parasites lors de la détection. Leur neutralisation implique, entre autres, l'utilisation de cuivre activé (Bressy, 2010). La GPC est classiquement employée pour l'élimination des lipides, des protéines et des interférents à haut poids moléculaire (Mitra et Brukh, 2003). Elle repose sur des mécanismes d'exclusion stérique entre les constituants de l'extrait et les pores d'un gel polymère. La technique est relativement répandue (Kupper *et al.*, 2008), bien que nécessitant un équipement coûteux et l'utilisation de solvants toxiques. Son couplage avec la SPE est fréquent.

La SPE constitue la technique de purification la plus utilisée. Parmi les 150 études identifiées par Zuloaga *et al.* (2012) dans l'extraction de micropolluants organiques contenus dans les boues, plus de la moitié ont utilisé la SPE. Les méthodes de Ternes *et al.* (2005a) et Okuda *et al.* (2009) ont notamment utilisé ce moyen de purification dans l'analyse d'extraits de boues contenant CP et/ou IFO. Les extraits d'échantillons particuliers contiennent généralement des quantités d'impuretés bien plus importantes que dans les échantillons aqueux. Ainsi, les masses d'adsorbants utilisés sont environ deux fois plus importantes, de l'ordre de 0,5 à plus d'1 g. Les phases normales (alumine, silice...) et inverses (C₁₈, Isolute ENV...) sont les plus répandues. Les phases normales sont classiquement utilisées pour éliminer les interférents polaires et notamment les pigments (chlorophylle...), responsables de la coloration des extraits. Les phases inverses sont utilisées pour retenir les composés peu polaires et notamment les lipides. Contrairement aux phases normales, les phases inverses impliquent souvent la dilution de l'extrait avec de l'eau pour favoriser les mécanismes de rétention. Ces types de phases sont toutefois réputés pour avoir des sélectivités limitées. L'émergence actuelle des adsorbants à interactions mixtes élargit les perspectives de purification sélective. Les applications sont encore relatives mais en progression certaine (Carballa *et al.*, 2007 ; Kimura *et al.*, 2007).

Plus récemment, une technique de purification « en ligne » et originale se développe pour les extractions par PLE. Elle repose sur l'addition d'adsorbants dérivés de la SPE (alumine, silice, Florisil®...) ou de réactifs « purifiants » (hydroxyde de potassium, cuivre...) disposés en couche ou mélangés avec l'échantillon à extraire (Zuloaga *et al.*, 2012). Lors de l'extraction, les composés interférents sont ainsi retenus, ce qui permet d'augmenter sensiblement la sélectivité de la méthode. De plus, elle a l'avantage de ne pas entraîner de « rupture physique » entre les étapes d'extraction et de purification, réduisant sensiblement le temps de manipulation. Pour l'extraction de produits pharmaceutiques, le nombre de méthodes PLE impliquant ce type de purification est croissant (Pena *et al.*, 2010 ; Martinez-Moral et Tena, 2011). Il arrive parfois que cette procédure donne des extraits suffisamment clairs et raffinés pour permettre leur analyse directe (Nieto *et al.*, 2009). Toutefois, le couplage avec la SPE est souvent requis (Diaz-Cruz *et al.*, 2006). En effet, le choix d'adsorbants disponibles est encore limité aux phases normale ou inverse, dont la sélectivité a déjà montré quelques limites. Il est par ailleurs difficile d'optimiser les conditions opératoires compte-tenu du caractère simultané des étapes d'extraction et de purification. La diversification des adsorbants et des stratégies d'optimisation permettraient son développement. Il est à noter qu'aucune étude ne fait état de l'utilisation de ces adsorbants pour la fixation de composés cibles (*i.e* « première extraction »), suivie de leur élution (*i.e* « seconde extraction »).

La concentration des extraits obtenus à la suite des purifications suit les mêmes procédures que celles précédemment décrites pour les extraits d'échantillons aqueux.

II.1.4) Analyse des anticancéreux : techniques séparatives et détection

Peu importe la qualité de l'extraction ou de la purification obtenue, chaque extrait d'échantillon environnemental est un mélange complexe de composés d'intérêt et d'autres éléments matriciels qui ne peuvent encore être distingués. Isoler ces composés avant détection passe nécessairement par une étape de séparation.

II.1.4.1) Séparation des molécules cibles contenues dans les extraits

Pour les anticancéreux recherchés en matrices environnementales, trois techniques séparatives ont été utilisées : l'électrophorèse capillaire (CE), la chromatographie en phase gaz (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC). Le [Tableau II-4](#) reprend le nombre de méthodes identifiées pour chacune de ces techniques par composé ciblé. Le détail des références est disponible dans les annexes ([Annexe C](#)).

Tableau II-4 : Techniques séparatives identifiées et occurrence pour les anticancéreux

Molécule	Techniques séparatives identifiées et occurrence		
	CE	GC	LC
CP	0	5	22
IFO	0	4	8
5-FU	1	3	2
TAM	0	3	8

La CE consiste à séparer, sous l'influence d'un champ électrique, des molécules chargées injectées dans un tube capillaire rempli d'une solution tampon. Cette solution est un milieu conducteur qui permet le transport des espèces. La séparation est le résultat de plusieurs composantes telles que la mobilité propre de l'espèce, influencée à la fois par sa charge et sa taille, et la mobilité du tampon, influencée par le pH et l'électrolyte employé. Seuls [Manhik et al. \(2004 et 2007\)](#) ont utilisé la CE pour séparer du 5-FU contenu dans des ERH. Des difficultés de déplacement du temps de migration ont été rapportées, nécessitant une maîtrise absolue de la composition du tampon et obtenue pour une salinité très élevée (160 mM en borate de sodium). Cette salinité est peu compatible avec bon nombre de systèmes de détection. De plus, la CE semble limitée aux seules molécules pouvant être chargées. Ces raisons peuvent expliquer l'utilisation ici marginale de cette technique.

L'utilisation de la GC est plus répandue. Elle s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Les températures de travail sont donc élevées (> 100 °C). Transportés par un gaz vecteur (phase mobile), les constituants du mélange vaporisé vont interagir le long d'une colonne (phase stationnaire) avec une affinité plus ou moins importante en fonction des propriétés physico-chimiques du système. Ces différents équilibres vont permettre la séparation des constituants dans le temps. Chacune des molécules anticancéreuses ciblées ont été séparées au moins une fois par GC ([Tableau II-4](#)). L'utilisation est cependant assez limitée. En effet, les composés anticancéreux sont comme la majorité des produits pharmaceutiques, des molécules polaires présentant une faible volatilité et une thermosensibilité reconnue. Pour augmenter la stabilité et améliorer la séparation, une étape de dérivatisation est souvent incluse avant l'injection. Elle consiste à modifier chimiquement une partie de la molécule par ajout d'un groupement rendant la séparation possible. Cette étape est délicate et parfois considérée comme peu maîtrisable ([Kosjek et Heath, 2011](#)). De plus, pour des raisons de compatibilité des matériaux avec les températures de travail, le choix de colonnes est relativement restreint. Les temps d'analyse sont souvent longs et peuvent atteindre 60 minutes voire plus. Ainsi, la GC n'est classiquement pas retenue comme technique de séparation de premier choix pour les molécules anticancéreuses et plus largement pharmaceutiques.

La LC est de loin la technique séparative la plus employée (Tableau II-4). Elle s'applique aux composés de toute nature mais est souvent employée pour ceux ayant un caractère très polaire à modérément polaire (Coetsier, 2009). Son principe repose sur l'entraînement à travers une colonne (phase stationnaire) d'un mélange liquide par l'action d'une phase également liquide (phase mobile). Les interactions entre la colonne, les composés et la phase mobile vont conditionner l'ordre d'élution des constituants du mélange.

La LC a fait des progrès considérables au cours des deux dernières décennies et a atteint une maturité et une polyvalence certaines. Différentes phases stationnaires pour différents types de colonnes chromatographiques sont à présent disponibles. La séparation des anticancéreux est très largement effectuée en phase inverse, sur des colonnes apolaires de type C₁₈ (Annexe C), avec un diamètre de particule moyen entre 3 et 5 µm. Les interactions sont donc liées à l'hydrophobicité, même si d'autres mécanismes tels que les interactions électrostatiques ne peuvent être exclus. L'élution est alors effectuée par une phase mobile majoritairement aqueuse, entraînant rapidement les composés polaires. Toutefois, ce type de chromatographie est souvent peu adapté aux composés très polaires, entraînés trop rapidement. C'est notamment le cas des métabolites de produits pharmaceutiques (Nieto, 2010). Un nouveau type de chromatographie a récemment été développée et appliquée dans la séparation du 5-FU et d'un de ces métabolites (le FBAL) pour leur détermination dans les ERH (Kovalova *et al.*, 2009). Basée essentiellement sur des interactions hydrophiles, la chromatographie dite HILIC peut être considérée comme une variante de la phase normale. Contrairement au précédent type de chromatographie, l'élution est réalisée par une phase mobile avec un fort contenu organique, principalement du méthanol ou de l'acétonitrile. L'ordre d'élution des composés en HILIC est *a priori* l'inverse de celui en C₁₈.

Peu importe le type de colonne utilisée en LC, la composition de la phase mobile doit être scrupuleusement contrôlée pour assurer une rétention optimale (Miao et Metcalfe, 2007). Les molécules anticancéreuses possèdent des propriétés acides, neutres ou basiques suivant leur pK_a et le pH appliqué. Ainsi, les composés acides, chargés négativement à pH basique et les composés basiques, chargés positivement à pH acide, pourront interagir via des interactions électrostatiques qui amélioreront parfois la rétention et la résolution. Nebot *et al.* (2007) précisent que les pH acides auraient tendance à limiter les co-élutions de composés et ainsi mieux définir les pics chromatographiques. Des sels sont aussi couramment employés. Souvent utilisés pour améliorer la détection, les sels permettraient d'améliorer la rétention sur la colonne, notamment à travers des mécanismes d'appariement d'ions qui favoriseraient un seul type d'interaction pour les composés chargés. L'utilisation conjointe de sels et l'ajustement du pH de la phase mobile est connue sous le nom de tampon. Ahrer *et al.* (2001) indiquent que les tampons assurent notamment une meilleure reproductibilité des rétentions dans le temps. Le rôle joué par la composition de la phase mobile dans la détection sera décrit dans la prochaine partie.

Outre l'évolution des types de colonnes, la LC, souvent qualifiée de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), tend à se diversifier avec l'émergence de la chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC). Utilisant des colonnes avec des diamètres de particule bien inférieurs à ceux utilisés en HPLC (facteur 2), l'UHPLC peut fonctionner avec des pressions plus élevées. Il en résulte notamment une séparation et une résolution de plus grande qualité, de même qu'une diminution significative de la quantité de phase mobile consommée à travers un temps d'analyse réduit. L'UHPLC a déjà été appliquée avec succès pour CP contenu dans des eaux de STEP (Lavén *et al.*, 2009), permettant une réduction du temps d'analyse d'un facteur 4 et de la consommation de phase mobile d'un facteur 8 par rapport à une analyse HPLC standard (40 minutes ; 25 mL). Son coût est cependant trop élevé pour répandre son utilisation. Toutefois, la multiplication récente de publications relatant de son application pour l'analyse d'échantillons environnementaux indique une tendance à plus d'utilisation.

II.1.4.2) Systèmes de détection pour l'analyse des molécules cibles

Une technique séparative seule ne présente pas d'intérêt sans son couplage avec une détection adéquate. Dans le contexte d'analyses environnementales, le système de détection doit être compatible avec la détermination de traces. Le [Tableau II-5](#) reprend les différents détecteurs utilisés dans la recherche des molécules anticancéreuses. Le détail des références est renseigné en annexe ([Annexe C](#)).

Tableau II-5 : Systèmes de détection identifiés et occurrences pour les anticancéreux

Molécule	Systèmes de détection identifiés (occurrence et limites)					
	UV	LOD _{min}	MS	LOD _{min}	MS/MS	LOD _{min}
CP	1	> 50 µg/L	9	6 ng/L	15	0,02 ng/L
IFO	0	-	3	7 ng/L	9	0,02 ng/L
5-FU	2	8,6 µg/L	2	50 ng/L	2	5 ng/L
TAM	0	-	3	4 ng/L	8	< 0,01 ng/L

LOD_{min} : limite de détection la plus basse relevée dans la littérature
La MS et la MS/MS peuvent être assimilés au même type de détection

La spectroscopie ultra-violet (UV) est une méthode optique qui repose sur l'utilisation de photons dont les longueurs d'onde sont comprises entre 200 et 400 nm. Soumises à ce rayonnement, les molécules sont susceptibles de subir une ou plusieurs transitions électroniques. Ces transitions vont se traduire par des différences d'absorption de l'intensité lumineuse. Seules trois études ont été identifiées dans la littérature pour les anticancéreux. CP a été recherché en UV par [Kiffmeyer et al. \(1998\)](#) et 5-FU par [Kiffmeyer et al. \(1998\)](#) et [Mahnik et al. \(2004 et 2007\)](#). Ce mode de détection a rapidement montré quelques faiblesses. En effet, les limites de détection atteintes pour les méthodes utilisant l'UV dépassent classiquement les 5 µg/L et sont donc élevées pour de l'analyse environnementale. De plus, il est indispensable que les composés étudiés aient des propriétés optiques particulières. Les groupements chromophores sont responsables du phénomène d'absorption. CP et IFO possèdent des groupements chromophores « mous », absorbant peu et à la limite basse du domaine de l'UV (195-200 nm) ([Kosjek et Heath, 2011](#)). Il est donc peu pertinent d'utiliser des méthodes optiques pour la quantification des anticancéreux dans des échantillons environnementaux.

La spectrométrie de masse (MS) est incontestablement le mode de détection le plus appliqué dans la détermination des molécules anticancéreuses à l'état de traces ([Tableau II-5](#)). Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La détection en MS nécessite l'association d'une source pour ioniser les substances, d'un analyseur pour séparer les ions générés et d'un détecteur pour comptabiliser les ions et éventuellement amplifier le signal ([Bouchoux et Sablier, 2005](#)).

Les sources sont différentes suivant le couplage GC ou LC. En GC-MS, l'ionisation par impact électronique (EI), basée sur l'arrachement d'un électron aux molécules à analyser, induisant leur fragmentation, est la plus couramment utilisée. Elle a déjà été employée par [Tauxe-Wursch \(2005\)](#) dans la détection du TAM et du 5-FU dans des ERH. En LC-MS, l'ionisation par ElectroSpray (ESI) est largement répandue pour les produits pharmaceutiques, notamment parce qu'elle ne fragmente pas les molécules et qu'elle permet une analyse rapide, précise et souvent sensible ([Al-Odaini et al., 2010](#)). Elle repose sur la formation d'un fin nuage de gouttelettes à haute densité de charge, après passage sur un capillaire où un potentiel positif (+) ou négatif (-) a été appliqué. Sous l'effet d'un courant de gaz chauffé, les gouttelettes s'évaporent progressivement. La densité de charge devenant trop importante, les gouttelettes explosent, libérant des

microgouttelettes constituées de molécules portant des charges variables suivant la nature du potentiel précédemment appliqué. Le principe de l'ESI est illustré sur la [Figure II-2](#).

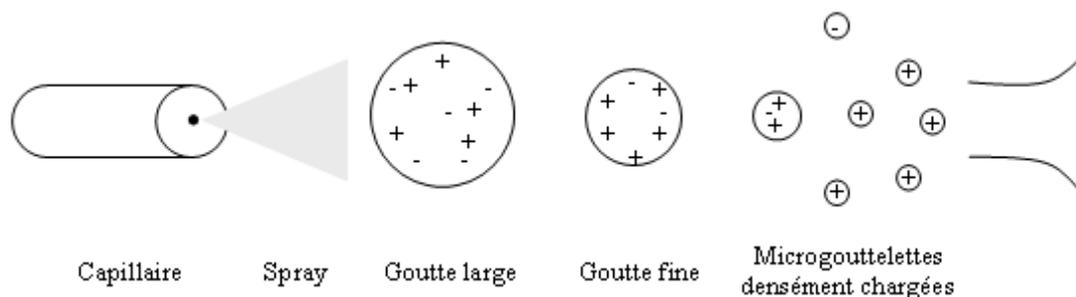


Figure II-2 : Principe de l'ionisation par ESI
(inspiré de [Menet, 2011](#))

Les analyseurs en MS doivent être à la fois sensibles, spécifiques et relativement polyvalents dans les applications. Trois types sont utilisés dans la détection de produits pharmaceutiques dans les matrices environnementales : le piège à ions (TRAP), l'analyseur à temps de vol (TOF) et le quadropôle (Q). Le TRAP consiste à piéger les ions dans un système de trois électrodes puis à sélectionner les ions et orienter leur trajectoire vers le détecteur en augmentant progressivement la différence de potentiel. Le TOF consiste à mesurer le temps que met un ion à parcourir une distance donnée jusqu'au détecteur, ce temps dépendant notamment du rapport m/z . L'analyseur Q est de loin le plus employé pour les composés anticancéreux ([Annexe C](#)). Le système utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon leur rapport m/z , en fonction d'un champ électrique. L'analyseur Q est constitué de quatre barres, portées à des potentiels tantôt négatifs (-) tantôt positifs (+), permettant le changement de direction et la focalisation des ions ([Figure II-3](#)). Sa souplesse d'utilisation, sa résolution, sa vitesse de balayage et son adaptabilité avec les interfaces GC et LC en font souvent un outil de premier choix ([Baugros, 2008](#)).

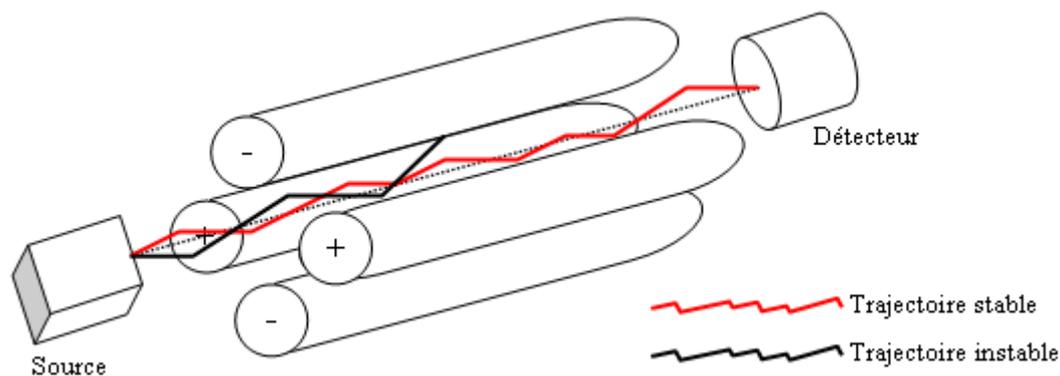


Figure II-3 : Structure et principe d'un analyseur de type quadropôle
(inspiré de [Menet, 2011](#))

En analyse de traces, les dernières années ont été marquées par l'apparition de modes particuliers d'utilisation de la MS ([Mullot, 2009](#)) : la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), impliquant soit un jeu de triple quadropôle (QqQ), soit le couplage d'un quadropôle et d'un analyseur à temps de vol (Q-TOF) ou l'utilisation d'autres couplages hybrides. L'association MS/MS offre des possibilités d'analyse intéressantes et des seuils de détection très bas. Le consensus actuel est que les analyseurs de type QqQ sont les plus sensibles et offrent une sélectivité très acceptable pour la détection des produits pharmaceutiques ([Petrovic et al., 2006](#)). L'analyse des anticancéreux s'inscrit dans cette tendance. Par ailleurs, il est souvent considéré que la sensibilité d'une GC-MS est comparable à celle d'une LC-MS/MS ([Kosjek et Heath, 2011](#)).

Malgré ses avantages incontestables dans l'analyse de traces, la MS connaît certaines limitations qui doivent être prises en compte suivant le couplage considéré. Alors que la détection en GC-MS est peu ou pas influencée par la nature de l'échantillon, l'analyse en LC-MS (/MS) est à la fois influencée par la composition de la phase mobile et par la nature des constituants de l'échantillon. A faible concentration, Le tampon peut permettre d'amplifier significativement le signal mais des concentrations trop élevées résultent souvent en une perte de sensibilité partielle et parfois totale (Ahner *et al.*, 2001). Co-élus avec les analytes ou élués dans des régions chromatographiques proches, les interférents contenus dans l'extrait vont perturber significativement l'ionisation par ESI, résultant en une diminution du signal ou plus rarement en une augmentation (Huerta-Fontela *et al.*, 2011). Cet effet est largement connu et documenté dans la littérature sous le nom d'effet matrice (EM). L'EM peut réduire la précision et la reproductibilité de la détection et biaiser les résultats. Il est souvent plus prononcé dans les extraits issus d'échantillons particuliers que dans ceux issus d'échantillons aqueux, notamment en raison de leur complexité (Radjenovic *et al.*, 2009). Les moyens de réduction ou de prise en compte de l'EM sont cependant bien connus.

Une réduction possible peut être attendue en utilisant des méthodes d'extraction très sélectives, notamment la SPME ou la LPME (Quintana *et al.*, 2004). L'influence du lavage des cartouches SPE sur l'EM est avérée. Lee *et al.* (2007) ont montré qu'un lavage efficace permet une réduction de 50 à 90 %. Il est également possible de diluer les extraits SPE avant analyse. Un facteur de dilution par 2 peut parfois être suffisant pour réduire significativement l'impact des interférents (Gomez *et al.*, 2007). La dilution augmente toutefois les limites analytiques et remet en cause l'intérêt de préconcentrer les échantillons.

Lorsque la réduction est insuffisante, des stratégies de prise en compte de l'EM peuvent être appliquées. La méthode des ajouts dosés, basée sur l'addition de quantités croissantes en molécules cibles dans l'extrait, permet d'aboutir à une quantification précise au prix d'une procédure longue. Vieno *et al.* (2006) ont réussi à évaluer l'EM suivant la procédure singulière du « pic écho », durant laquelle un échantillon et un étalon sont injectés dans un intervalle de temps très court, et sont *a priori* soumis aux mêmes effets. Enfin, l'utilisation d'un standard interne est de loin la méthode la plus connue et probablement la plus appliquée. Ce composé doit regrouper certaines caractéristiques importantes telles qu'une physico-chimie proche de la molécule à tracer, son absence dans l'échantillon initial et son élution dans une région chromatographique proche, de manière à subir les mêmes effets que le composé standard qu'il « doit » corriger. La principale difficulté réside dans l'obtention d'une molécule remplissant ces critères (Gros *et al.*, 2006).

II.1.4) Synthèse et description des choix analytiques

Analyser les molécules anticancéreuses dans les échantillons environnementaux est donc une tâche longue et délicate, nécessitant le développement de stratégies réfléchies. La Figure II-4 est un arbre décrivant la prise en charge complète d'un échantillon de boue suivant les méthodes identifiées.

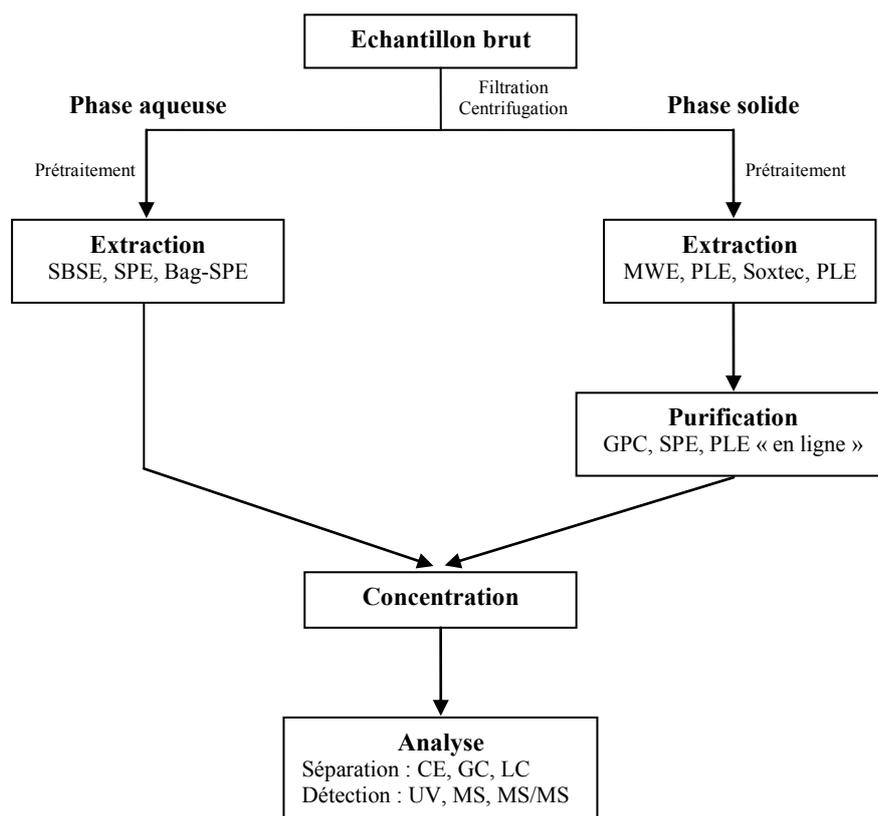


Figure II-4 : Méthodologies de détermination possibles de molécules anticancéreuses contenues dans des échantillons de boues

Parmi les molécules étudiées, il existe une réelle diversité de structures chimiques et par conséquent, de propriétés physico-chimiques. Ces différences induisent une problématique analytique importante, qui peut être abordée suivant deux stratégies (Candido *et al.*, 2010). La première consiste à mettre au point plusieurs techniques analytiques pour chaque composé ou pour des composés de caractéristiques proches. La seconde consiste en une approche multi-résidus, visant à étudier l'ensemble des molécules via une méthode unique, au prix de quelques compromis quant aux résultats de l'étude des paramètres analytiques. **La tendance actuelle est au développement de méthodes multi-résidus, permettant une réduction significative des temps de manipulation ou des besoins matériels. Cette stratégie a ici été sélectionnée.**

Suivant ce principe, les impératifs matériels (disponibilité d'équipement, volume d'échantillon...) et la maturité des méthodologies de détermination présentées sur la Figure II-4, notre choix s'est porté sur l'utilisation de la SPE pour l'extraction des molécules cibles contenues dans la phase aqueuse. L'extraction depuis la matrice solide reste à déterminer et justifier, même si l'utilisation de la PLE semble plutôt avantageuse. La SPE a également été retenue comme moyen de purification éventuelle. La LC en phase inverse, couplée à la MS, s'impose comme la technique analytique de premier choix. Les procédures proposées ont été optimisées et validées suivant une démarche rigoureuse. Il est important de préciser que le travail analytique proposé a été initié en 2009. Les mutations perpétuelles en analyse d'échantillons environnementaux ont permis de développer des approches originales, approches qui pourraient encore être amenées à évoluer.

II.2) Matériel et Méthodes

II.2.1) Solvants, sels et adsorbants

Les solvants organiques utilisés pour l'ensemble des procédures analytiques sont de qualité adéquate pour l'analyse de composés présents à l'état de traces. L'acétone, l'acétonitrile (ACN) et le méthanol (MeOH), de type « Multisolvent HPLC-grade ACS UV-Vis », sont fournis par VWR Scharlau (Espagne). Quelques propriétés de ces solvants sont présentées dans le [Tableau II-6](#).

Tableau II-6 : Quelques propriétés des solvants organiques utilisés

Solvant ^a	CAS	Pureté (%)	Densité à 20 °C (-)	T _f (°C)	T _{eb} (°C)	ε ₀ ^b (-)
Acétone (C ₃ H ₆ O)	67-64-1	> 99,8	0,79	- 95	56	0,56
Acétonitrile (CH ₃ CN)	75-05-8	> 99,9	0,79	-46	82	0,65
Méthanol (CH ₃ OH)	67-56-1	> 99,9	0,79	-98	65	0,93

T_f : température de fusion ; T_{eb} : température d'ébullition ; ε₀ : force éluante

a : d'après les données fournisseur (Scharlau)

b : sur alumine (phase polaire), d'après www.lachimie.fr (consulté le 10/11/12)

Les solvants minéraux utilisés sont de qualité analytique. L'acide chlorhydrique (HCl) 37 %, l'acide formique (HCOOH) 99 % et l'acide acétique (CH₃COOH) 100 % sont fournis par VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). L'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) 35 % est fourni par Fischer Chemical (Loughborough, Angleterre). L'eau ultrapure, utilisée aussi bien pour la préparation des solutions SPE et des phases mobiles, est produite à partir d'eau déminéralisée par un système Millipore (Molsheim, France).

Trois sels ont été utilisés. Le formate d'ammonium (NH₄HCOO) 97 % est fourni par Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne). L'acétate d'ammonium (NH₄CH₃COO) 98 % est fourni par Merck (Darmstadt, Allemagne). Le sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique (Na₂EDTA) est fourni par ICN BioMedicals (Aurora, Etats-Unis). Différents adsorbants SPE ont également été utilisés et leurs propriétés sont renseignées dans le [Tableau II-7](#).

Tableau II-7 : Propriétés des adsorbants utilisés

Cartouche ^a	Type de Phase	Volume/Masse (cm ³ / mg)	Surface spécifique (m ² /g)	Diamètre de particule (μm)	Diamètre de pore (Å)	Autre
Lichrolut RP	Silice greffée	6/500	< 500 ?	40 – 63	-	-
Oasis HLB	PS-DVB/NVP	6/200	810	30	80	-
Oasis MAX	PS-DVB/NVP	3/60	809	30	81	AEC
	+ N ⁺ (C ₆ H ₁₅)	6/150				0,27 meq/g
Oasis MCX	PS-DVB/NVP	3/60	804	29	83	CEC
	+ SO ₃ ⁻	6/150				0,95 meq/g

RP : phase inverse ; HLB : balance hydrophile-hydrophobe ; PS : polystyrène ; DVB : divinylbenzène ; NVP : N-vinylpyrrolidone ; MAX/MCX : échangeur d'anions (A)/cations (C) à support de mode mixte AEC/CEC : capacité d'échange anionique (A)/cationique (C)

a : d'après les données fournisseur (Merck ; Lichrolut) (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France ; Oasis)

II.2.2) Préparation de solutions et précautions de manipulation

Les différents standards et équivalents deutérés commerciaux se présentent sous la forme de fines poudres cristallines blanches. Le cyclophosphamide monohydraté, l'ifosfamide, le 5-fluorouracile et le tamoxifène sont fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin de Fallavier, France). Les moutardes de phosphoramidite et nor-azotée sont fournies par Niomech (Bielefeld, Allemagne). La 10,11 - dihydrocarbamazépine (DHC) (utilisée comme étalon de contrôle) est fournie par Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne). Les deutérés cyclophosphamide- d_4 (CP- d_4), l'ifosfamide- d_4 (IFO- d_4), le 5-fluorouracile- $6-d_1$ (5-FU- $6-d_1$) et le tamoxifène- d_5 (TAM- d_5) sont fournis par Toronto Research Chemicals (North York, Canada). Toutes ces poudres sont conservées dans des flacons ambrés et en chambre froide à 4 °C.

A l'exception de la DHC, la manipulation des molécules chimiques pulvérulentes nécessite des précautions de manipulation, notamment en raison du caractère volatile et CMR des poudres d'anticancéreux. Lors de chaque pesée, le manipulateur doit porter les équipements de protection individuels (EPI) « classiques » (blouse, lunettes, gants) ainsi qu'un masque antiparticules FFP3. Les gants, nitriles ou latex, peuvent être doublés. Une fois en solution, la manipulation d'anticancéreux représente un danger plus modéré. Le port du masque n'est plus indispensable.

Des solutions mères à 1 g/L de chaque standard et chaque deutéré sont préparées en dissolvant la quantité appropriée dans du MeOH sous une sorbonne. La fréquence de préparation est d'une fois tous les quatre mois pour les standards et une fois par an pour les deutérés. Les solutions filles, issues de dilutions successives depuis les solutions mères, sont préparées dans du MeOH avant chaque série de manipulations. Trois mixtures distinctes sont également préparées. La première contient un mélange de CP (1 mg/L), d'IFO (1 mg/L), de 5-FU (10 mg/L), de TAM (0,1 mg/L), de PHO (10 mg/L) et de NOR (10 mg/L). La seconde contient un mélange de CP (2 mg/L), d'IFO (2 mg/L), de 5-FU (40 mg/L) et de TAM (0,3 mg/L). La troisième contient un mélange de CP- d_4 (2 mg/L), d'IFO- d_4 (2 mg/L), de 5-FU- $6-d_1$ (30 mg/L) et de TAM- d_5 (0,3 mg/L). **Pour des raisons pratiques, les appellations MIX Etalonnage, MIX Standards et MIX Deutérés désignent respectivement ces trois solutions et sont ainsi dénommées par la suite.** Toutes les solutions préparées sont enveloppées dans de l'aluminium et conservées à - 20 °C jusqu'à leur utilisation. Le MeOH permet de maintenir les solutions à l'état liquide, même à basses températures (Tableau II-6). La stabilité des solutions a été vérifiée et validée par des analyses en HPLC-UV/MS.

II.2.3) Prétraitement des échantillons de boues

II.2.3.1) Collecte d'échantillon et séparation des phases

Plusieurs campagnes d'échantillonnage ponctuelles ont été menées entre mars 2009 et novembre 2011 sur différentes STEP et pilotes des régions Midi-Pyrénées et Languedoc-Roussillon. A chaque prélèvement, un volume de boue voisin de 20 L a été récupéré à l'aide de bidons en polypropylène préalablement rincés à l'eau du robinet. Les caractéristiques des boues et des STEP ou pilotes dont elles sont originaires sont données dans le Tableau III-4 du chapitre III.

Rapidement après transport au laboratoire, la boue est laissée pour décantation pendant 20 minutes. Le surnageant est transféré dans des béchers en verre. Le décantat est récupéré et centrifugé pour assurer la séparation complète entre les phases aqueuse et particulaire. A chaque cycle, près d'1 L de boue est centrifugé pendant 20 minutes à une vitesse de 5000g, à l'aide d'une centrifugeuse Megafuge 40 R de chez Fischer Scientific (Illkirch, France) et thermostatée à la température de la boue. Tous les surnageants sont alors combinés pour constituer la phase aqueuse totale. Les culots sont rassemblés pour constituer la phase particulaire totale.

II.2.3.2) Prise en charge de la phase aqueuse et stockage

Pour assurer l'élimination complète des particules en suspension, la phase aqueuse est filtrée sous vide sur filtre en fibre de verre Whatman GF/C (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Le seuil de coupure correspondant est de 1.2 μm . Le filtrat obtenu est transféré dans des flacons ambrés en polycarbonate, de volume utile 125 mL (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Le pH est corrigé jusqu'à 2 unités avec quelques gouttes d'HCl commercial, puis les flacons sont entreposés en chambre froide à 4 °C jusqu'à extraction. La méthodologie est illustrée sur la [Figure II-5](#). Cette procédure minimise la dégradation bactérienne et assure la conservation des analytes. D'après des essais de stabilité (partie II.3.2.5.2), la prise en charge des extractions doit être réalisée sous 3 jours.

II.2.3.3) Prise en charge de la phase particulaire et stockage

La présence d'eau dans les échantillons solides est éliminée par lyophilisation. La phase particulaire est d'abord congelée à - 20 °C pendant au minimum 24 heures. Les culots congelés sont ensuite lyophilisés pendant 72 heures, à l'aide d'un lyophilisateur Christ Alpha 1-2 LD de chez Bioblock Scientific (Illkirch, France). Les conditions finales de lyophilisation sont une température de - 60 °C et une pression de 0,045 bar. Le lyophilisateur est également recouvert d'aluminium pour éviter toute perte par photo-oxydation.

Pour favoriser l'extraction, l'homogénéité des échantillons est indispensable. Avant de manipuler, il est important de s'équiper d'un masque antiparticules FFP3. Les culots lyophilisés sont finement broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Le diamètre des particules obtenues est voisin de 500 μm . Les broyats sont alors transférés dans des piluliers (en verre) ambrés et conservés à - 20 °C jusqu'à extraction. La procédure est illustrée sur la [Figure II-5](#).

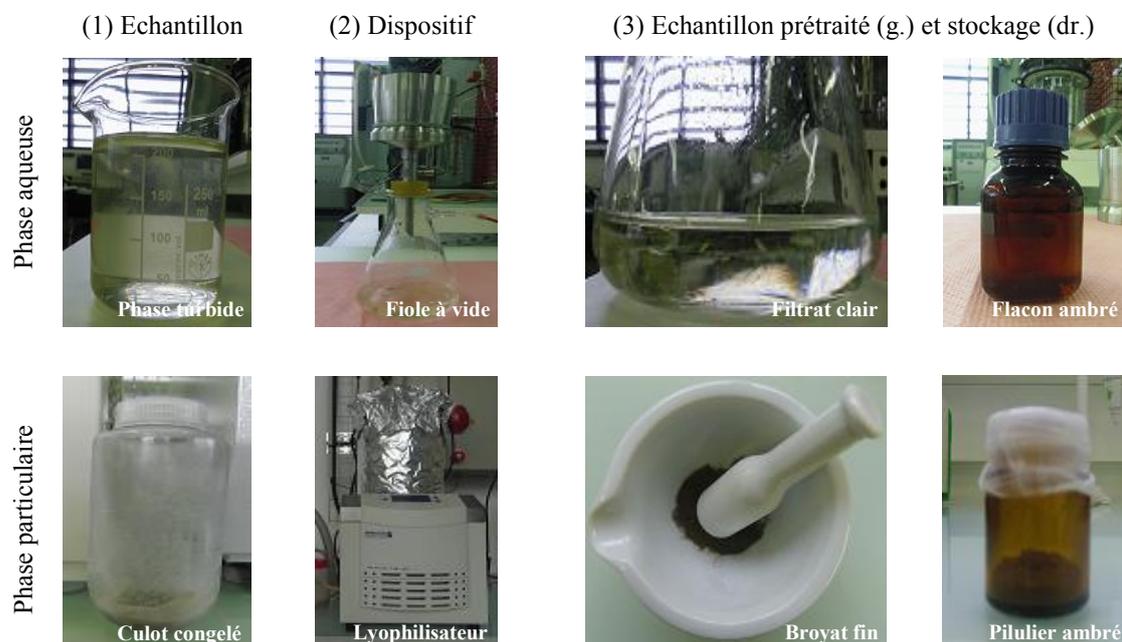


Figure II-5 : Procédure de prétraitement des phases aqueuse et particulaire

II.2.4) Extraction des molécules cibles

II.2.4.1) Extraction depuis les échantillons aqueux

L'extraction des molécules cibles contenues dans la matrice aqueuse est effectuée par SPE. Elle repose ici sur l'utilisation d'adsorbants en tandem, présentant des capacités d'échanges hydrophiles, hydrophobes et ioniques. La procédure proposée est le fruit de nombreux essais et optimisations détaillés dans la partie II.3.2.2. **Les deux moutardes PHO et NOR n'ont pas pu être extraites.**

Un volume d'échantillon de près de 100 mL est extrait dans les conditions suivantes. Tout d'abord, le pH de l'échantillon est ramené à 12 avec quelques gouttes de NH_4OH commercial. Le pH est contrôlé à l'aide de bandelettes pH fournies par Merck (Darmstadt, Allemagne). 100 μL d'une solution de Na_2EDTA 10 % sont ajoutés, soit 0,01 % (m/m) dans l'échantillon. 100 μL de MIX Deutérisés sont aussi ajoutés comme étalons d'extraction. L'échantillon est manuellement agité.

Un portoir « manifold » (Supelco, France) pour 12 cartouches SPE (Figure II-6), connecté à un manomètre qui contrôle le vide créé par une pompe, a été utilisé dans la suite de la procédure. L'extraction est donc réalisée par dépression. Une cartouche rouge Oasis MAX (3 cm^3 , 60 mg) est conditionnée par le passage successif de 2 mL de MeOH, 2 mL d'acétone (activation des sites) et 2 mL de NH_4OH 0,5 % (pré-équilibration). Un réservoir pour SPE de 70 mL en polypropylène (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) est ensuite emboîté sur la cartouche. L'échantillon est alors chargé et percole à une vitesse voisine de 1 mL/min, soit 1 goutte toutes les 2 secondes. Ce faible débit permet de favoriser les interactions avec l'adsorbant, notamment dans le cas d'interactions électrostatiques. Pour éliminer les interférents faiblement ou non adsorbés, la cartouche est lavée avec 2 mL d'une solution de NH_4OH 0,5 % contenant 5 % de MeOH. Une élution par 2 mL de MeOH suivie par 4 mL d'acétone permet de collecter dans une même fraction les espèces neutres et basiques (**CP**, **IFO** et **TAM**). La troisième élution est réalisée avec 2 mL d'une solution de CH_3COOH 2 % dans un mélange MeOH/Acétone (75/25 ; v/v) et permet de récupérer les espèces acides (**S-FU**). Entre chacune de ces éluions, un temps de contact de 5 minutes entre le solvant et l'adsorbant est appliqué pour assurer la désorption totale des molécules. Les différentes fractions sont récoltées dans des piluliers ambrés.

La fraction contenant les espèces neutres et basiques est soumise à une extraction supplémentaire. Des échantillons organiques (>5 %) peuvent parfois être responsables de l'élution prématurée des composés cibles. Pour limiter ce phénomène, le volume de la fraction est d'abord réduit à 2 mL grâce à un flux d'azote gazeux N_2 . Le concentrat est ensuite dilué par 50 mL d'eau ultrapure et corrigé à pH 2 par quelques gouttes d' HCl commercial. Une cartouche verte Oasis MCX (3 cm^3 , 60 mg) est conditionnée par le passage successif de 2 mL de MeOH, 2 mL d'acétone et 2 mL d'eau ultrapure à pH 2. L'échantillon est chargé grâce au réservoir SPE et percole à travers la cartouche à un débit de 1 mL/min. La cartouche est ensuite rincée par 2 mL d'une solution d'eau ultrapure à pH 2, contenant 5 % de MeOH. L'eau en excès présente dans la cartouche est éliminée en augmentant graduellement le vide avec le manomètre. L'adsorbant est ensuite totalement séché sous un flux de N_2 pendant 15 minutes. Après 10 minutes de trempage de l'adsorbant avec 2 mL de MeOH, les espèces neutres (**CP** et **IFO**) sont éluées. Dans une autre fraction, les espèces basiques (**TAM**) sont éluées par 4 mL de NH_4OH 2 % dans l'acétone.

Ainsi après extraction, chaque échantillon génère trois fractions distinctes, contenant une ou plusieurs des molécules d'intérêt. La procédure analytique correspondante est résumée sur la Figure II-7. Les différentes solutions SPE utilisées ont été préparées chaque semaine et conservées à 4 °C.

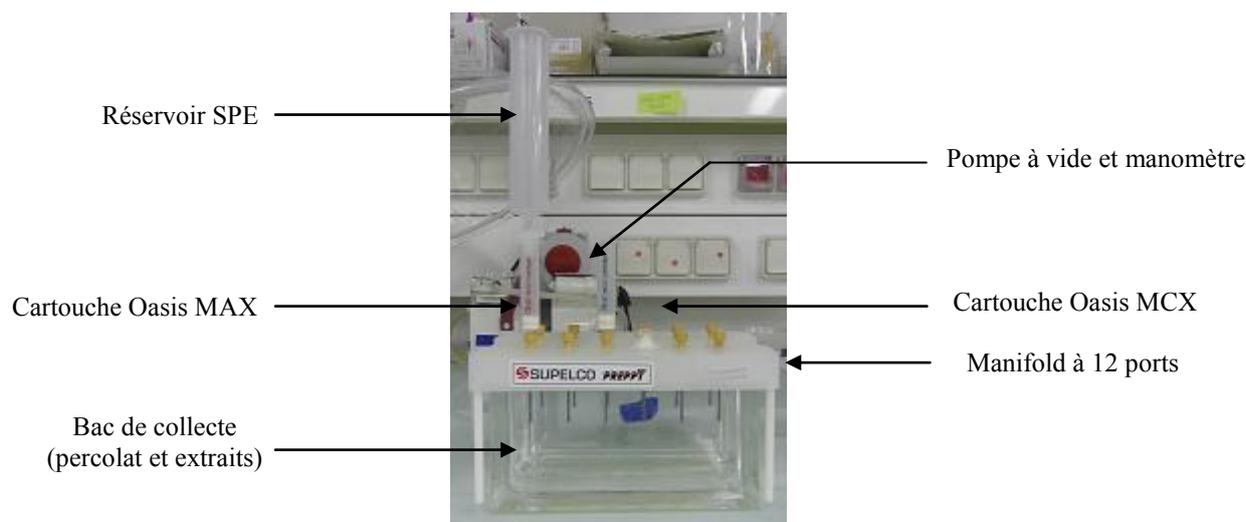


Figure II-6 : Matériel utilisé pour l'extraction par SPE

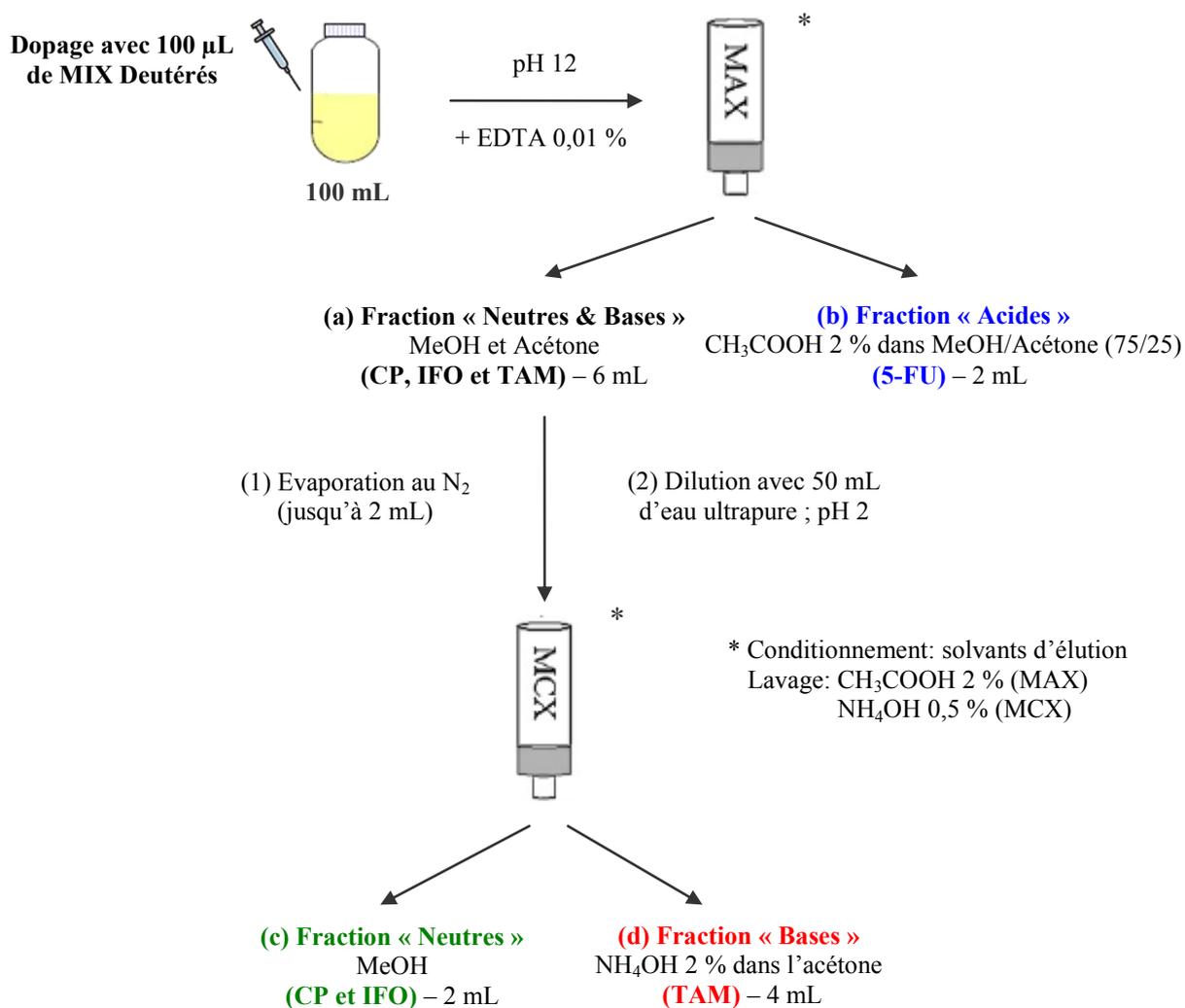


Figure II-7 : Représentation schématique de la procédure SPE

II.2.4.2) Extraction depuis les échantillons particuliers

L'extraction des molécules cibles emprisonnées dans la matrice particulaire est réalisée par PLE. Une masse de solide voisine de 0,35 g de matière sèche (MS) est classiquement extraite. Des cellules de 11 mL en acier inoxydable sont utilisées. Le montage d'une cellule d'extraction suit une démarche précise. Au pied de chaque cellule, un filtre en fibre de verre (Dionex, Voisins-le-Bretonneux, France) est disposé pour assurer la filtration d'extraits semi-aqueux. Une fine couche de sable de 0,5 cm d'épaisseur (Fischer Scientific, Loughborough, Angleterre) est ensuite appliquée en tant qu'étape de pré-filtration. L'échantillon est dopé avec 100 μ L de MIX Deutérés, mélangé rigoureusement avec du sable, et compacté au-dessus de la première couche. Le ratio entre la masse d'échantillon rapportée à la masse de sable est de l'ordre de 0,035. L'utilisation de sable en tant qu'agent dispersant permet de limiter l'agrégation des particules lors de l'extraction, ainsi que le bouchage des cellules ou l'apparition d'écoulement préférentiel. Une couche additionnelle de sable d'épaisseur 1 cm est ajoutée. Un espace d'au moins 0,25 cm entre la dernière couche et la hauteur maximale de la cellule doit être laissé pour protéger le système de vissage. La préparation de cellule étant une étape délicate et facilement génératrice d'erreurs, la procédure est détaillée sur la [Figure II-8](#). Pour favoriser l'adsorption des molécules cibles, les cellules sont laissées à température ambiante pendant au minimum 24 heures avant extraction.

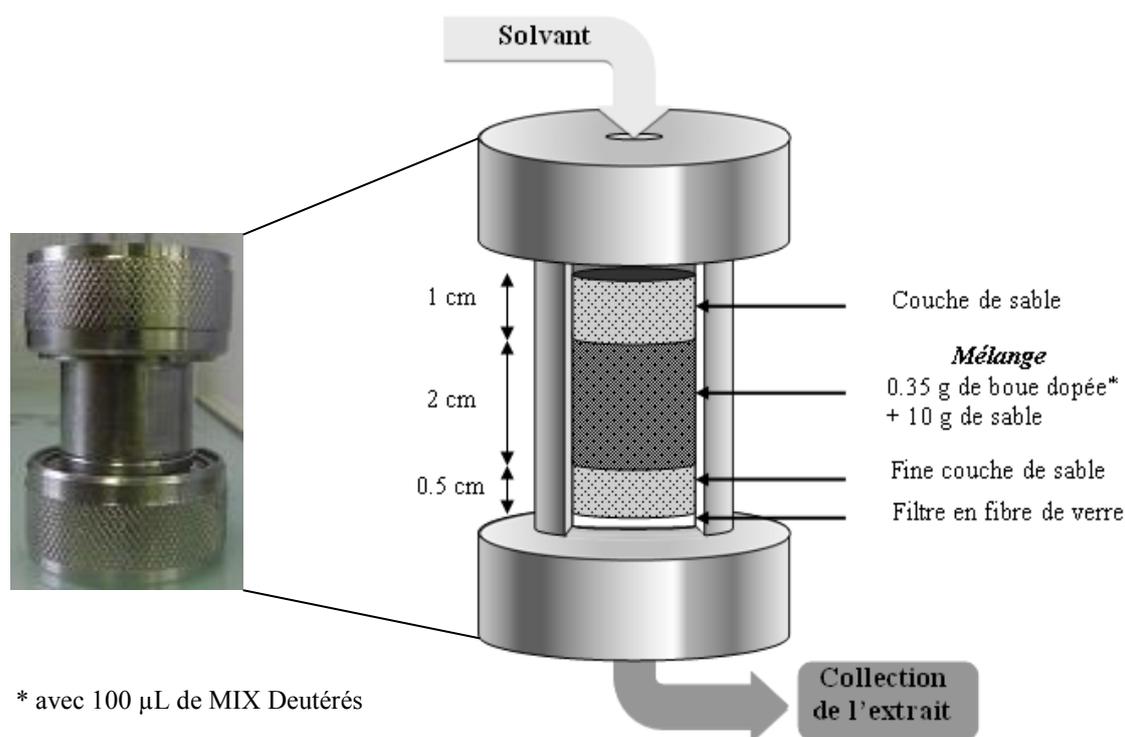


Figure II-8 : Représentation et montage d'une cellule d'extraction

L'extraction est ensuite réalisée par un extracteur accéléré par solvant de type ASE 200 (Dionex, Sunnyvale, Etats-Unis). Il est composé d'un rack de solvants à 4 voies, d'un mélangeur, d'un four à compression et de deux carrousels sur lesquels sont respectivement placés une cellule d'extraction et le vial de collection d'extrait correspondant (60 mL). L'extracteur et ses composants sont représentés sur la [Figure II-9](#). Les conditions opératoires appliquées en ASE ont été optimisées par une approche chimiométrique détaillée dans la partie II.3.3.3.2.

Les extractions sont réalisées par un mélange MeOH/Eau ultrapure (65/35 ; v/v), sous une pression de 85 bar, à une température de 100 °C. Chaque cellule est extraite 4 fois pour une durée fixée à 9 minutes par extraction. Entre chaque extraction, le solvant est renouvelé à hauteur de 15 % du volume de remplissage initial (soit 60 % sur l'ensemble de la procédure). A la fin de l'extraction, les cellules sont purgées avec du N₂ purifié pendant 120 secondes. Suivant ce protocole, des extraits de volumes proches de 15 ± 2 mL sont générés.



Figure II-9 : Matériel utilisé pour l'extraction par PLE

II.2.5) Concentration des extraits

Les différents extraits obtenus sont concentrés sous N₂ purifié à 99,99 % (Alpha 1, Air Liquide, France). Les extraits issus de la phase aqueuse sont concentrés à 1 mL, à froid, avec un dispositif similaire au portoir manifold. Les extraits issus de la phase solide sont concentrés à 5 mL, sous une pression de 1 bar et une température de 25 °C, à l'aide d'un dispositif de type TurboVap II (Caliper Life Sciences, Hopkinton, Etats-Unis). La procédure de concentration est donnée sur la Figure II-10.

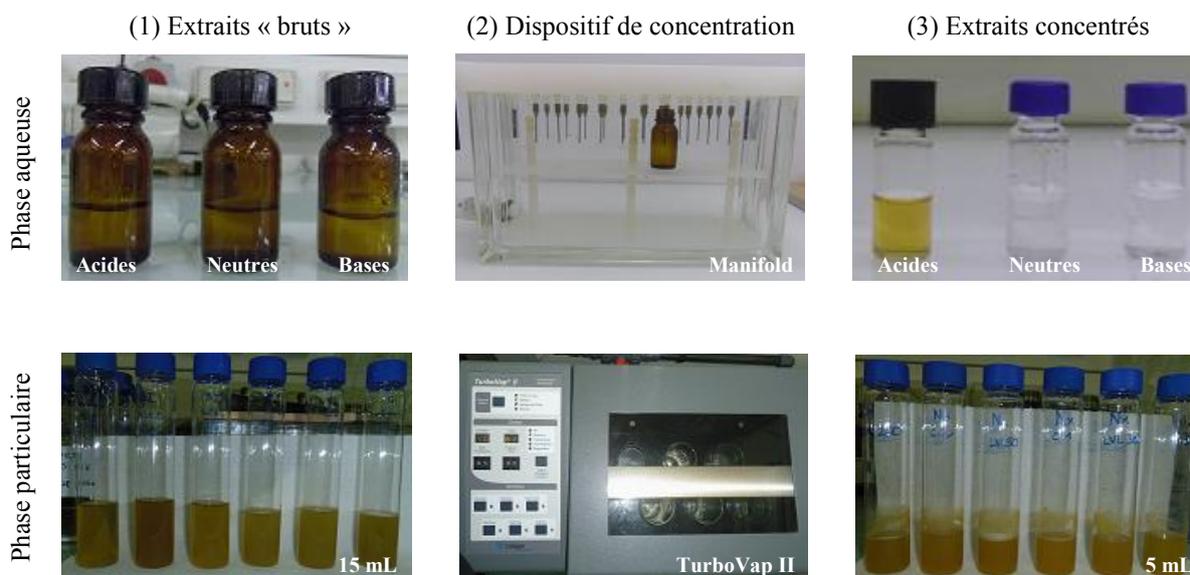


Figure II-10 : Procédure de concentration des différents extraits générés

II.2.6) Raffinage des extraits issus de la phase particulaire

La purification des extraits PLE concentrés par TurboVap a été réalisée suivant le même principe que l'extraction SPE développée pour la phase aqueuse. Les extraits d'échantillons particulaires étant visuellement très « sales », les masses d'adsorbants ont été doublées, de même que la plupart des volumes de travail. Un récapitulatif de la procédure est proposé dans le [Tableau II-8](#).

Tableau II-8 : Récapitulatif de la procédure de purification des extraits PLE

Etape (chronologie)	Extraction 1 : Cartouche Oasis MAX (6 cm ³ , 150 mg)	Extraction 2 : Cartouche Oasis MCX (6 cm ³ , 150 mg)
Echantillon	5 mL (extrait) + 195 mL (eau ultrapure) + 500 µL de Na ₂ EDTA 10 % (0,05 %) Correction du pH jusqu'à 12	Concentration fraction (a) jusqu'à 2 mL 2 mL (extrait) + 70 mL (eau ultrapure) Correction du pH jusqu'à 2
Conditionnement	4 mL MeOH 4 mL Acétone 4 mL NH ₄ OH 0,5 %	4 mL MeOH 4 mL Acétone 4 mL eau ultrapure pH 2
Percolation	1 mL/min	1 mL/min
Lavage	4 mL NH ₄ OH 0,5 % avec MeOH 5 %	4 mL eau ultrapure pH 2 avec MeOH 5 %
Séchage	-	15 minutes sous vide 20 minutes sous N ₂
Elution	(a) Fraction « Neutres & Bases » 4 mL MeOH + 6 mL Acétone (b) Fraction « Acides » 4 mL CH ₃ COOH 2 % dans MeOH/Acétone (75/25;v/v)	(c) Fraction « Neutres » 4 mL MeOH (d) Fraction « Bases » 6 mL NH ₄ OH 2 % dans l'acétone
Concentration des fractions « Acides », « Neutres » et « Bases » à 1 mL		

II.2.7) Traitement de finition et stockage des extraits

Des extraits organiques de volume voisin de 1 mL ont été générés. L'intégralité de ces extraits est transférée dans des vials de 1,7 mL fournis par Agilent Technologies (Massy, France). Les vials sont ensuite évaporés jusqu'à sec, sous flux de N₂ et à froid. Différentes stratégies de reprise sont appliquées suivant les analyses à effectuer :

- (i) Les échantillons pour analyse par HPLC-UV/MS sont repris dans 100 µL d'une solution de DHC à 1 mg/L dans le MeOH ;
- (ii) Les échantillons pour analyse par UHPLC-MS/MS sont repris dans 1000 µL d'une mixture de phases mobiles (A)/(B) (75/25 ; v/v). La composition de ces phases est donnée dans la partie II.2.8.2. Cette procédure concerne, notamment, l'ensemble des extraits raffinés issus des échantillons particulaires.

Les résidus secs sont alors resuspendus et homogénéisés grâce à un appareil de type vortex (Fischer Scientific, Illkirch, France). Pour faciliter le piquage de l'échantillon lors de l'analyse, les 100 µL d'extrait pour analyse HPLC-UV/MS sont transférés à un restricteur de vial (Xilab, Bruges, France). Les extraits raffinés de la phase particulaire sont très colorés et parfois turbides. Afin d'éliminer d'éventuelles particules qui pourraient perturber la séparation chromatographique, ces extraits sont filtrés à 0,45 µm sur filtre seringue Spartan RC (VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

Les extraits finaux sont alors conservés en chambre froide à 4 °C et à l'obscurité avant analyse. Des essais de stabilité (partie II.3.2.5.2) ont montré une prise en charge nécessaire sous 7 jours.

II.2.8) Analyse des extraits

II.2.8.1) Séparation et détection par HPLC-UV/MS

La séparation est effectuée par un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC) comprenant un rack pour phase mobile SOR-100 avec une unité de dégazage, une pompe binaire P680 HPLC, un passeur d'échantillons automatique ASI-100 et un four thermostaté pour colonnes TCC-100 (Figure II-11). L'ensemble de l'équipement est fourni par Dionex (France). Le système est équipé d'une colonne Lichrospher RP-C₁₈ (L : 250 mm, Φ_{interne} : 4 mm, d_p : 5 μm) et d'une colonne de garde (L : 4 mm, Φ_{interne} : 4 mm, d_p : 5 μm), toutes deux fournies par Merck (Darmstadt, Allemagne). La séparation a été optimisée après plusieurs essais présentés dans la partie II.3.1.1.

L'élution des composés est réalisée par un gradient de solvant binaire constitué d'un mélange ACN/Eau ultrapure (1/9 ; v/v), tamponné par 1 mM de NH₄CH₃COO et 0,3 % d'HCOOH pour la phase A, et d'un mélange ACN/Eau ultrapure (9/1 ; v/v), tamponné par 1 mM de NH₄CH₃COO et 0,3 % d'HCOOH pour la phase B. Le gradient et le débit d'élution sont donnés sur la Figure II-12. A chaque analyse, 35 μL d'échantillon sont injectés. La température de la colonne est maintenue à 25 °C, évitant ainsi tout déplacement de rétention dans le temps. L'analyse dure au total 39 min.

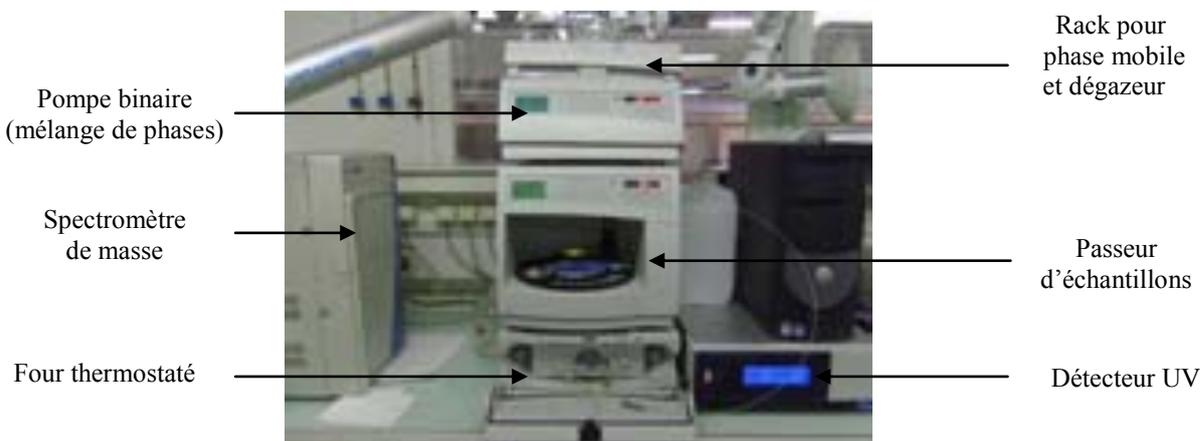


Figure II-11 : Equipement analytique utilisé pour l'analyse par HPLC-UV/MS

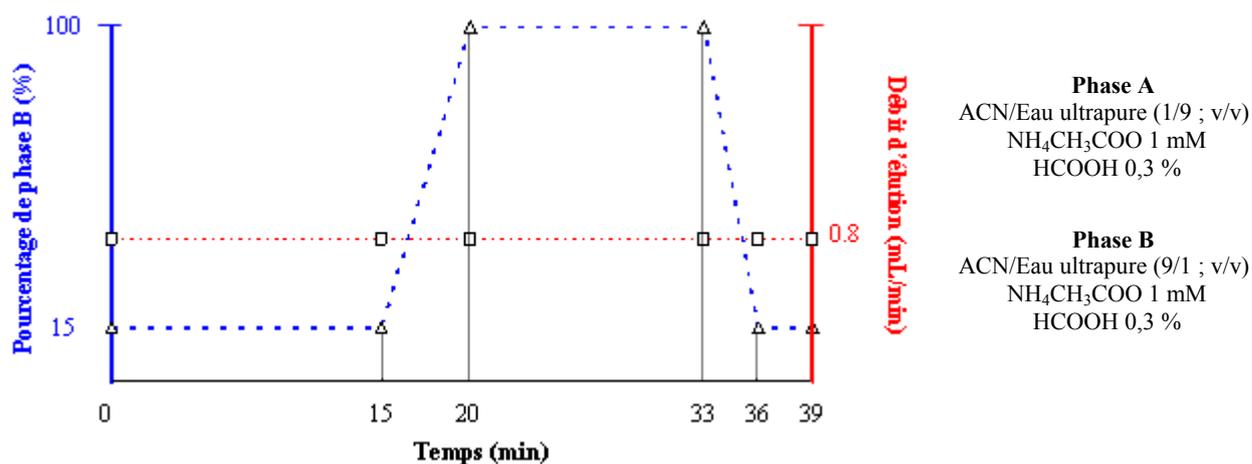


Figure II-12 : Gradient et débit d'élution appliqués en HPLC

La détection est assurée par le couplage d'un détecteur UV Ultimate 3000 RS (Dionex, Les Ulis, France) avec un spectromètre de masse MS Surveyor de type simple quadropôle (Thermo Finnigan, France) (Figure II-11). En détection MS, l'ionisation est assurée par une sonde ElectroSpray Ionization (ESI) fonctionnant alternativement en mode positif (+) ou négatif (-). Le mode Single Ion Monitoring (SIM) est appliqué, avec un temps de scan de 0,5 s pour chaque ion suivi. Les conditions opératoires optimisées sont les suivantes : voltage du capillaire, 3000 V ; température de la source, 350 °C ; voltage du cône d'entrée, 40 V ; gaz de travail, N₂ à 75 psi. Avant chaque série d'analyses, un nettoyage sommaire du cône d'entrée est réalisé. L'acquisition de spectres de masse est réalisée à l'aide du logiciel XCalibur 1.0 (Thermo Finnigan, France). L'acquisition des chromatogrammes est réalisée à l'aide du logiciel Chromeleon 6.8 (Dionex, France).

Un minimum de 2 voire 3 points d'identification est utilisé pour caractériser les molécules recherchées. Chaque composé est identifié par (i) son temps de rétention t_R comparé à celui du standard correspondant avec une tolérance de $\pm 2,5\%$, (ii) son ion caractéristique le plus abondant (ion de quantification), (iii) un autre ion caractéristique présent dans le spectre de masse ou lorsqu'aucun ion de confirmation n'est généré, sa détection en UV à une longueur d'onde donnée pour laquelle l'absorbance est maximale, (iv) sa présence dans un des trois extraits SPE. Le détail des points d'identification utilisés pour les composés recherchés est donné dans le Tableau II-9.

Tableau II-9 : Caractérisation des molécules ciblées en HPLC-UV/MS

	Ion de quantification (m/z)	Moyen de confirmation			
		Extrait SPE	t_R (min)	MS (m/z)	UV (nm)
Détection en ESI +					
PHO	138	-	4,8	106	-
NOR	152	-	6,4	120	-
IFO	261	Neutres	17,7	523	-
IFO-d ₄	265	Neutres	17,7	553	-
CP	261	Neutres	19,7	523	-
CP-d ₄	265	Neutres	19,7	551	-
DHC	239	-	22,3	499	-
TAM	372	Bases	30,7	-	265
TAM-d ₅	377	Bases	30,7	116	-
Détection en ESI -					
5-FU	129	Acides	3,5	-	265
5-FU-6-d ₁	135	Acides	3,5	163	-

II.2.8.2) Séparation et détection par UHPLC-MS/MS

Des difficultés liées à l'utilisation du système HPLC-UV/MS sont apparues au cours de la thèse et ont nécessité la transposition de la méthode à un nouvel équipement de type UHPLC-MS/MS. L'équipement est géré par le Service Commun de Spectrométrie de Masse de l'Université Paul Sabatier (UPS) à Toulouse. **Seuls les extraits « Neutres » et « Bases » ont été analysés.**

La séparation est effectuée par un système de chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) composé d'un rack pour solvants, d'une pompe quaternaire, d'un passeur d'échantillons automatique à 120 puits et thermostaté, ainsi que d'un four à colonne également thermostaté, tout cet équipement étant de marque Dionex (France). La colonne utilisée pour la séparation est une ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (L : 50 mm, Φ_{interne} : 2,1 mm, d_p : 1,7 μm) fournie par Waters (Saint-Quentin en Yvelines, France). La séparation a été améliorée après plusieurs essais.

L'éluion des composés est réalisée par un gradient binaire constitué d'un mélange d'ACN/Eau ultrapure (1/9 ; v/v), complété par 1 mM de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ et 0,3 % d' HCOOH pour la phase A, et d'ACN pur pour la phase B. Le gradient et le débit d'éluion sont donnés sur la Figure II-13. A chaque analyse, 10 μL d'échantillon sont injectés depuis le passeur automatique, maintenu à 15 °C. La température de la colonne est maintenue à 25 °C. L'analyse dure 10 min.

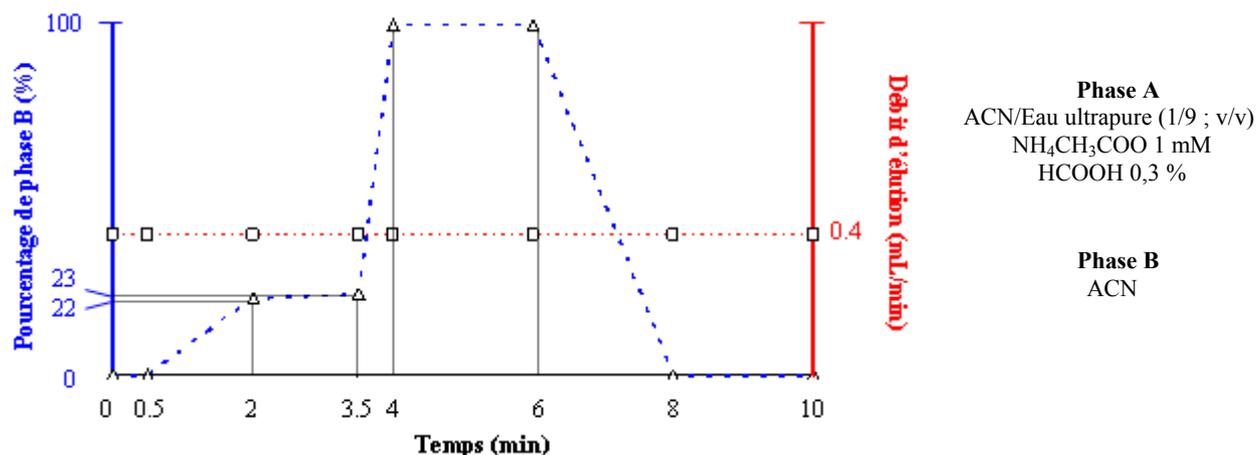


Figure II-13 : Gradient et débit d'éluion appliqués en UHPLC

La détection est réalisée par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), utilisant un système hybride QTRAP® de type triple quadrupôle - trappe ionique linéaire (QqLIT), commercialisé par Applied Biosystems Sciex (Foster City, Etats-Unis). L'ionisation est réalisée par ESI (+). Le mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) a été sélectionné, avec un temps de scan de 0,08 s pour chaque transition suivie. Les conditions appliquées aux détecteurs ont été optimisées : voltage du capillaire, 5000 V ; température de la source, 450 °C ; gaz de travail, N_2 ; pression dans la source d'ion 1, 20 (unité arbitraire) ; pression dans la source d'ion 2, 70 (unité arbitraire). Avant chaque série, un nettoyage sommaire du cône d'entrée est réalisé pour conserver des performances optimales. L'acquisition des spectres et chromatogrammes est réalisée à l'aide du logiciel Analyst 1.6.1 (Foster City, Etats-Unis).

L'identification des molécules recherchées (Tableau II-10) est basée sur le même principe que celui décrit précédemment pour l'analyse HPLC-UV/MS. L'utilisation des transitions de quantification et confirmation pourrait constituer à elle seule un moyen d'identification univoque.

Tableau II-10 : Caractérisation des molécules ciblées en UHPLC-MS/MS

Extrait SPE	t_R (min)	Caractérisation en MS/MS						
		Transition de quantification (m/z)	Transition de confirmation (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	
Détection en ESI +								
IFO	Neutres	3,2	261,1>92	261,1>153,8	65	10	30	12
IFO-d ₄	Neutres	3,2	265,1>94	265,1>155,9	65	10	30	12
CP	Neutres	3,3	261,1>139,8	261,1>105,9	65	10	27	12
CP-d ₄	Neutres	3,3	265,1>139,9	265,1>105,8	65	10	27	12
TAM	Bases	5,5	372,4>72	372,4>128,9	65	10	40	15
TAM-d ₅	Bases	5,5	377,4>72	372,4>129	65	10	40	15

DP : potentiel de fragmentation ; EP : potentiel d'entrée ; CE : énergie de collision ; CXP : potentiel de sortie de la cellule de collision

II.2.8.3) Structure des séquences analytiques et exploitation

Peu importe la nature de l'équipement utilisé, une séquence analytique est structurée et exploitée de la manière suivante : (i) une séquence contient en moyenne entre 100 et 150 échantillons, tous types confondus, (ii) en début et milieu de séquence, une courbe de calibration est générée pour étudier le domaine de linéarité de la réponse et apprécier l'état d'encrassement du détecteur, (iii) sept étalons de concentration croissante sont alors injectés. La procédure de préparations des étalons étant quelque peu différente entre les deux équipements, elle est explicitée dans le [Tableau II-11](#). La méthode de quantification est décrite plus loin.

Tableau II-11 : Préparation des étalons et domaines de linéarité

Etape (chronologie)	Analyse par HPLC-UV/MS	Analyse par UHPLC-MS/MS
Sélection des dopages	1 µL, 10 µL, 25 µL, 50 µL, 100 µL, 250 µL, 500 µL de MIX Etalonnage	
Evaporation	+ 100 µL de MIX Deutérés par étalon	
Reprise (au vortex)	100 µL de DHC (1 mg/L) préparée dans du MeOH	1000 µL d'une mixture de phase mobile phase(A)/phase(B) (75/25 ; v/v) + Filtration à 0,45 µm
Domaines de linéarité observés	5-FU : 1000 – 50 000 µg/L PHO : non déterminé NOR : non déterminé CP : 50 – 5000 µg/L IFO : 50 – 5000 µg/L TAM : 5 – 500 µg/L	CP : 1 – 500 µg/L IFO : 1 – 250 µg/L TAM : non déterminé

Des contrôles qualité (QC) sont effectués au cours des séquences (tous les 20 échantillons) pour confirmer la validité des courbes d'étalonnage dans le temps. En effet, l'encrassement du détecteur pouvant évoluer au cours des injections, une perte de signal est possible et peut entraîner une dérive significative de la courbe d'étalonnage. Les QC correspondent à un point bas (25 µL) et un point haut (250 µL) de la gamme et sont comparés à la valeur correspondante de l'étalonnage. Une déviation maximale de 20 % est acceptable et n'a pas été dépassée. Des blancs (solvants de reprise sans analytes) sont également injectés au cours de la séquence. La fréquence est d'un tous les sept échantillons pour les extraits de phase aqueuse et d'un tous les quatre échantillons pour les extraits de phase particulaire. Aucune contamination croisée n'a été identifiée. A la fin de chaque séquence, les colonnes sont rincées avec de l'eau ultrapure acidifiée (pH 3), suivi par de l'ACN pur.

L'ion le plus abondant en HPLC-UV/MS et la transition « ion précurseur/ion produit » en UHPLC-MS/MS ont servi de base à la quantification et la construction des courbes d'étalonnage. Pour chaque analyte, les courbes ont été construites en représentant le ratio entre l'aire du standard et l'aire du deutéré correspondant, en fonction du ratio entre la concentration du standard et du deutéré. Le principe est connu sous le nom d'étalonnage interne ([Figure II-14](#)). Les aires des moutardes NOR et PHO, pour lesquelles il n'y a pas d'équivalents deutérés, sont corrigées par l'aire de la DHC. Les concentrations dans les extraits ont été calculées à l'aide de l'équation décrivant la courbe d'étalonnage.

Les capacités des équipements ont été évaluées via la définition des limites de détection et quantification instrumentales (IDL et IQL). Elles ont été déterminées à partir de dilutions successives de chaque standard jusqu'à une concentration voisine de 250 ng/L. L'IDL et l'IQL ont été définies pour un standard donnant respectivement un rapport signal sur bruit (S/N) de 3 et 10.

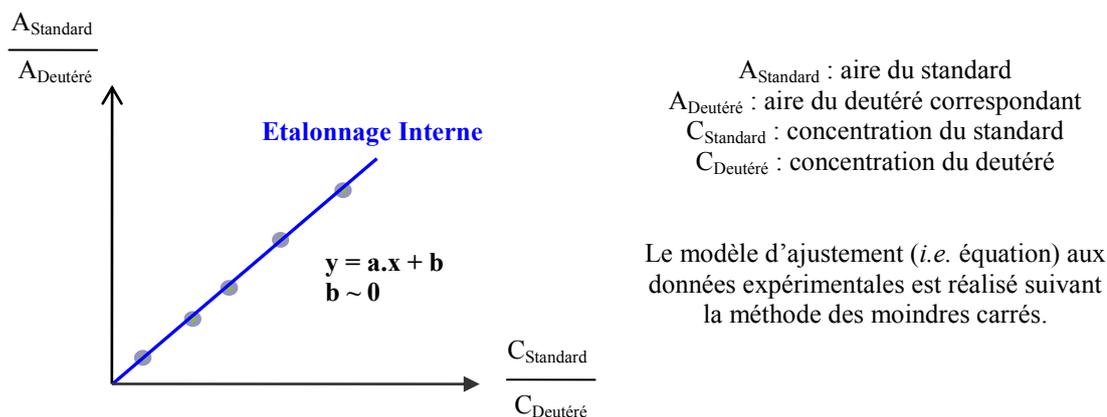


Figure II-14 : Principe de l'étalonnage interne

II.2.9) Performances de méthode et éléments de validation

Evaluer les performances d'une méthode passe systématiquement par une phase de validation. Une validation complète est une tâche longue mais indispensable pour s'assurer de la fiabilité d'une procédure analytique. Il existe de nombreux éléments pour qualifier et « quantifier » la validité d'une méthode. Différentes stratégies sont parfois utilisées pour évaluer un même élément, rendant les comparaisons de méthode délicates. **Ces stratégies doivent toutefois être scrupuleusement détaillées pour attester du bien-fondé de la démarche.**

Les éléments retenus dans la validation pour les phases aqueuse et particulaire sont (i) l'efficacité globale de la méthode pour un ou plusieurs niveaux de concentration, (ii) la répétabilité et la reproductibilité de la méthode proposée, (iii) l'efficacité des étapes d'extraction et/ou de purification, (iv) l'estimation de l'effet matrice et (v) l'évaluation des limites analytiques. La définition de chacun de ces éléments de validation, comprenant la procédure d'évaluation pour chacune des phases de la boue et les équations de calcul associées, est donnée dans le [Tableau II-12](#). La linéarité et les limites instrumentales, décrites dans la partie II.2.8, ont aussi été considérées comme partie de la validation.

La plupart des éléments de validation présentés sont inspirés de normes ou de la littérature. L'efficacité globale de la méthode est adaptée d'une procédure proposée par [Lavén et al. \(2009\)](#). L'estimation de la répétabilité et de la reproductibilité a été réalisée d'après les préconisations de la norme AFNOR XP T 90-210 ([AFNOR, 1999](#)). L'évaluation des performances le long des différentes étapes du protocole est inspirée d'une procédure originale proposée par [Gabet-Giraud et al. \(2010\)](#). L'estimation de l'effet matrice est une procédure couramment décrite dans la littérature.

Quel que soit le paramètre, les notions de mesure relative et absolue ont été développées dans ce manuscrit : toute mesure dite relative correspond à une correction de la quantité ou de l'aire d'un analyte par celle de l'équivalent deutéré. Elle permet notamment de caractériser l'aptitude des deutérés à compenser ou non les pertes le long de la procédure. Inversement, une mesure dite absolue n'a bénéficié d'aucune correction et atteste de l'efficacité « brute » de l'étape évaluée.

La [Figure II-15](#) est un schéma récapitulatif de la prise en charge d'un échantillon de boue, depuis la matrice initiale jusqu'à l'analyse, suivant la méthodologie développée au cours de la thèse. Il permet notamment de visualiser efficacement les différentes étapes qui ont fait l'objet d'une validation.

Tableau II-12 : Description des paramètres utilisés dans la validation de méthode

Paramètre de validation	Définition du paramètre et description de la procédure		Equation correspondante
	Phase aqueuse (aq)	Phase solide (sol)	
Efficacité de la méthode (1 niveau de concentration) MEff – exprimée en %	Dopage de phase aqueuse avec 100 µL des MIX Standards et Deutérés avant l'extraction SPE	Dopage de culot lyophilisé avec 100 µL des MIX Standards et Deutérés avant l'extraction PLE	$\frac{Q_{préextraction} - Q_{native}}{Q_{spike}} \times 100$ (II-1)
Efficacité de la méthode (4 niveaux de concentration) MEff – exprimée en %	Dopage de phases aqueuses avec 10, 25, 50, 100 µL de MIX Standards et 100 µL de MIX Deutérés avant l'extraction SPE	Dopage de culots lyophilisés avec 10, 50, 100, 200 µL de MIX Standards et 100 µL de MIX Deutérés avant l'extraction PLE	$\frac{Pente_{méthode}}{Pente_{étalonnage}} \times 100$ (II-2)
Répétabilité de la méthode – exprimée en %	Dopage de phases aqueuses avec 100 µL des MIX Standards et Deutérés avant l'extraction SPE, réalisée le même jour	Dopage de culots lyophilisés avec 100 µL des MIX Standards et Deutérés avant l'extraction PLE, réalisée le même jour	$\frac{\sigma_{méthode}}{Q_{préextraction}} \times 100$ (II-3)
Reproductibilité de la méthode – exprimée en %	Dopage de phases aqueuses avec 100 µL des MIX Standards et Deutérés avant l'extraction SPE, réalisée à des jours différents	Dopage de culots lyophilisés avec 100 µL des MIX Standards et Deutérés avant l'extraction PLE, réalisée à des jours différents	
Efficacité de l'extraction seule – exprimée en %	Comparaison des pertes induites par la méthode entière et des pertes induites par l'effet matrice	Comparaison des pertes induites par la méthode entière et des pertes induites au-delà de l'extraction PLE	$\frac{Q_{préextraction} - Q_{native}}{Q_{postextraction} - Q_{native}} \times 100$ (II-4)
Efficacité de la purification seule – exprimée en %	-	Comparaison des pertes induites par la méthode au-delà de l'extraction PLE et des pertes induites par l'effet matrice	$\frac{Q_{postextraction} - Q_{native}}{Q_{postpurification} - Q_{native}} \times 100$ (II-5)
Effet matrice EM – exprimé en %	Extraits SPE dopés avec 100 µL des MIX Standards et Deutérés juste avant évaporation à sec puis reprise et analyse	Extraits PLE raffinés dopés avec 100 µL des MIX Standards et Deutérés juste avant évaporation à sec puis reprise et analyse	$(\frac{A_{préanalyse} - A_{native}}{A_{spike}} - 1) \times 100$ (II-6)
Sensibilité de la méthode (sur échantillon réel) – exprimée en ng/L (aq) ou µg/kg (sol)	Limite de détection : rapport S/N = 3 Limite de quantification : rapport S/N = 10 <i>F</i> = volume de l'échantillon (mL)	Limite de détection : rapport S/N = 3 Limite de quantification : rapport S/N = 10 <i>F</i> = masse extraite (g)	$\frac{IL \times V_{extrait}}{MEff_{abs} \times F}$ (II-7)

$Q_{préextraction}$: quantité dans l'extrait après procédure entière (ng) ; Q_{native} : quantité initialement présente (ng) ; Q_{spike} : quantité correspondante au niveau de dopage (ng)
 $Pente_{méthode}$: pente entre les quantités mesurées en fonction des niveaux dopés ; $Pente_{étalonnage}$: pente de la courbe d'étalonnage ; $\sigma_{méthode}$: écart-type de la méthode
 $Q_{postextraction}$: quantité mesurée dans l'extrait dopé après extraction (ng) ; $Q_{postpurification}$: quantité mesurée dans l'extrait dopé après purification (ng)
 $A_{préanalyse}$: aire dans l'extrait dopé juste avant analyse ; A_{native} : aire dans l'extrait d'un échantillon non dopé ; A_{spike} : aire correspondante au niveau de dopage
 IL : limite instrumentale considérée (IDL ou IQL) ; $V_{extrait}$: volume d'extrait final (mL) ; $MEff_{abs}$: efficacité absolue de la méthode ($0 < MEff_{abs} < 1$)

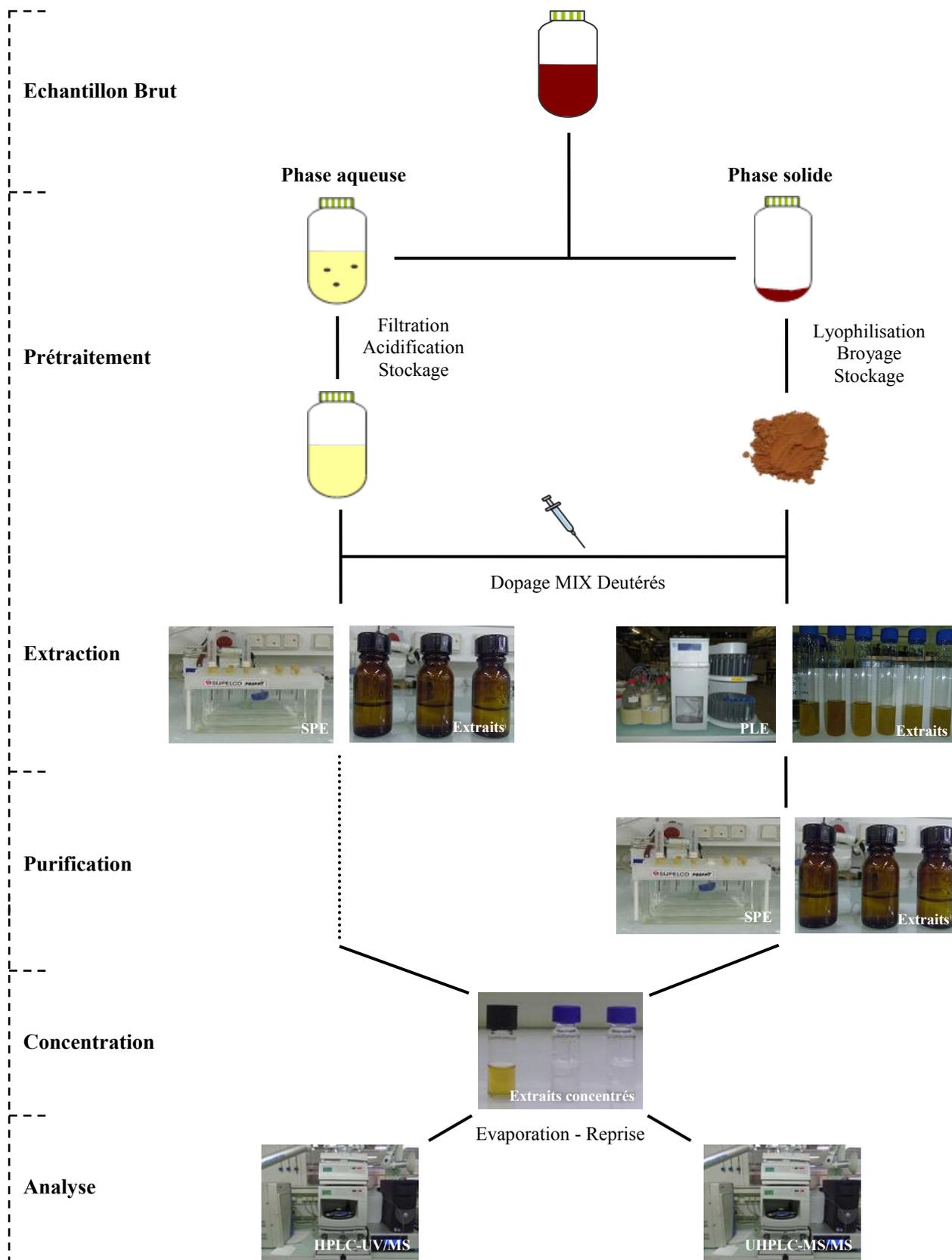


Figure II-15 : Schéma récapitulatif de l'analyse des molécules ciblées de la boue

II.3) Résultats et Discussion

Le schéma analytique proposé sur la [Figure II-4](#) s'exploite dans une stratégie « inverse » à celle présentée. Il est d'abord nécessaire de mettre au point et valider la méthode d'analyse (séparation et détection). Le développement de méthodes d'extraction constitue l'étape suivante, en partant d'une matrice de complexité relative (phase aqueuse) puis en allant vers une matrice de complexité notable (phase solide). Les résultats et discussions présentés suivent cette logique.

II.3.1) Développement et validation des méthodes de séparation et détection

II.3.1.1) Développement de l'analyse par HPLC-UV/MS

II.3.1.1.a) Caractérisation et optimisation de la détection MS

Pour caractériser la réponse en MS, des expériences par injection directe dans le débit de phase mobile ont été réalisées. Des solutions de standards purs en concentration élevée (0,1 – 5 mg/L) ont été injectées et entraînées directement à l'aide d'une phase mobile constituée d'un mélange MeOH/Eau ultrapure (50/50 ; v/v), tamponné par 1 mM de NH_4HCOO et 0,3 % d' HCOOH . Les conditions de la MS, opérée en mode full SCAN, ont d'abord été réglées sur des valeurs arbitraires : voltage du capillaire, 2500 V ; voltage du cône, 30 V et température de désolvation, 300 °C.

A l'exception du 5-FU, l'ensemble des analytes ont donné une réponse en mode d'ionisation positif ESI (+). Ce résultat est cohérent puisque 5-FU possède des propriétés légèrement acides, rendant la formation d'ions $[\text{M}-\text{H}]^+$ (M : ion moléculaire) plus facile. Un seul ion très intense a été généré pour TAM et un seul ion d'intensité très relative pour 5-FU. Aucun des composés étudiés n'a répondu dans les deux modes d'ionisation. Des ions caractéristiques ont pu être sélectionnés pour chaque analyte (mode SIM), rendant la détection plus sélective et sensible. IFO et CP ont généré les mêmes ions, induisant un problème évident en cas d'élution (quasi) simultanée.

Les paramètres de la MS n'ont été définitivement optimisés qu'une fois le gradient d'élution mis au point. Pour être en accord avec les conditions de séparation chromatographique, le calage des paramètres de la MS a été réalisé en utilisant la composition de la phase mobile exacte au moment de l'élution des analytes. La composition de la phase peut être déterminée à l'aide des t_R des analytes et de la [Figure II-12](#). Ces expériences ont permis de montrer que :

- (i) l'organicité de la phase mobile a grandement influencé la qualité de l'ionisation et du signal. Dans nos conditions, le MeOH a donné des réponses plus intenses que l'ACN, qui lui-même a donné des réponses plus intenses que l'eau. Ainsi, plus le contenu de la phase mobile était organique et plus le signal était intense et inversement ;
- (ii) l'utilisation d'acide dans la phase mobile a favorisé la formation de l'ion moléculaire M en mode ESI (+). De plus, le pH acide de la phase mobile (pH ~ 3) a permis de protoner les espèces basiques et notamment TAM. L'ionisation ESI est utile pour les composés ionisés ([Gao et al., 2005](#)). L'obtention d'un signal unique et intense pour TAM peut donc être expliquée ;
- (iii) le mode ESI (-) a généré des signaux plus faibles et un bruit de fond plus important qu'en mode ESI (+), ce qui est cohérent avec la littérature ([Stolker et al., 2004](#)). De plus, l'utilisation d'acide dans des proportions assez importantes a pu gêner l'ionisation en ESI (-) en raison de la présence d'un excès de protons au voisinage du capillaire ([Buseti et al., 2009](#)). L'obtention d'un signal unique et faible pour 5-FU pourrait donc en être le résultat.

(iv) l'utilisation et la nature du sel ont influencé l'ionisation. Deux sels d'ammonium (NH_4HCOO et $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$) ont été testés car leur volatilité et adéquation pour l'analyse de produits pharmaceutiques est reconnue (Quintana *et al.*, 2004). Le $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ a donné des signaux légèrement plus intenses que le NH_4HCOO (1,2 fois) et a donc été sélectionné. L'influence de la force ionique a été évaluée avec des concentrations en sels de 5 ; 1 ; 0,5 et 0 mM. L'absence de sel a conduit à l'obtention de faibles signaux ou leur disparition totale. On suppose donc que l'utilisation de sels a permis la création d'une couche d'ions autour des molécules, rendant leur ionisation plus efficace. Des mécanismes d'appariement d'ions ne sont pas exclus. La concentration de 5 mM a induit une perte significative du signal. Des concentrations élevées sont souvent responsables d'une diminution de la qualité d'ionisation (Ahner *et al.*, 2001). Une concentration de 1 mM a donné les résultats les plus satisfaisants.

Les conditions de la MS ont donc été optimisées pour chaque analyte en faisant varier le voltage du capillaire (2000, 2500 et 3000 V), le voltage du cône d'entrée (30, 40 et 50 V) et la température de désolvatation (300 et 350 °C). Les limites supérieures correspondaient à des valeurs proches des conditions maximales autorisées par le détecteur avant possible détérioration. Un voltage de capillaire de 3000 V a donné les résultats les plus intéressants. Un voltage du cône d'entrée de 40 V a donné les meilleurs résultats pour toutes les molécules à l'exception du TAM (50 V). Comme TAM a donné des signaux systématiquement très intenses, la valeur de 40 V a été retenue. Une température de 350 °C a donné les résultats les plus intéressants. Les mêmes comportements ont été observés pour les deutérés.

II.3.1.1.b) Caractérisation et optimisation de la séparation HPLC

La séparation a été réalisée sur une colonne C_{18} standard, en phase inverse, qui est le type de chromatographie liquide le plus maîtrisé. Notre choix s'est porté sur une colonne de longueur relativement importante (25 cm) de manière à faciliter la séparation des isomères IFO et CP. Comme les analytes présentent des différences physico-chimiques notables, un gradient linéaire avec plateaux a été appliqué. Le programme d'élution initial est inspiré d'une procédure existante dans la littérature pour l'élution du CP (Brun *et al.*, 2006). Il repose sur un mélange de phases mobiles. La phase mobile (A) est constituée d'un mélange Eau ultrapure/MeOH (9/1 ; v/v), tamponnée par 1 mM de NH_4HCOO avec 0,3 % d' HCOOH et la phase (B) est constituée de 0,3 % d' HCOOH dans le MeOH. L'utilisation première d'un gradient à base de MeOH est justifiée par les problèmes de pénurie mondiale d'ACN au moment du calage de la séparation (2009). De nombreux essais ont été nécessaires pour assurer (i) l'élution complète des sept molécules recherchées dans une même analyse, avec un temps d'élution acceptable pour de l'HPLC et (ii) la séparation entre IFO et CP. Seuls les plus pertinents sont discutés et ont porté sur l'effet du solvant organique, du tampon, du débit de phase et de la température de la colonne sur la forme et la séparation des pics.

L'utilisation de l'ACN en remplacement du MeOH a permis d'améliorer significativement la forme des pics et de réduire la co-élution entre IFO et CP, notamment par l'obtention de pics plus étroits. Ce constat a déjà été rapporté dans la littérature (Huerta-Fontela *et al.*, 2010). En chromatographie en phase inverse, le MeOH possède une force éluante moins intéressante que celle de l'ACN et inversement en chromatographie en phase normale (Tableau II-6). Ainsi, une résistance au transfert de masse et une diffusion intra-particulaire plus importante sont possibles avec du MeOH, conduisant à l'obtention de pics plus larges et peu adéquats pour une quantification. Par conséquent, l'ACN a été substitué au MeOH.

L'effet du tampon sur la forme des pics chromatographiques n'a pas ici été clairement établi. Cependant, la nécessité d'une force ionique constante le long de l'analyse a été mise en évidence. Elle a permis d'obtenir des t_R plus reproductibles dans le temps pour les composés

élus pendant un changement de gradient, ce qui est notamment le cas pour IFO et CP. Le sel d'ammonium a donc été ajouté dans la phase (B), composée alors d'acide et d'ACN pur. Toutefois, les sels d'ammonium ont une dissolution très faible dans l'ACN. Ainsi, le contenu organique de la phase (B) a été légèrement diminué à 90 % en ajoutant de l'eau ultrapure. Une dissolution complète a été obtenue, de même qu'un décalage des t_R dans le temps d'environ + 3 % jugé acceptable. Le sel $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ s'est révélé plus intéressant dans la détection MS et a donc été gardé. L'effet de l'acide (nature et concentration) n'a pas été exploré.

L'effet du débit de la phase et de la température a succinctement été étudié. Un débit d'élution de 0,8 mL/min a été un bon compromis entre (i) une séparation entre IFO et CP convenable, (ii) un temps d'analyse acceptable et (iii) les limitations induites par le cône d'entrée en MS qui ne peut recevoir des débits supérieurs à 1 mL/min. En contrepartie, la consommation de phases mobiles est assez importante. Une augmentation de la température a entraîné une diminution des t_R mais une co-élution plus importante entre IFO et CP. Une température de 25 °C a donc été retenue. L'allure type d'un chromatogramme obtenu dans les conditions déterminées est donnée sur la [Figure II-16](#) et commentée dans les paragraphes suivants.

5-FU est élué le plus rapidement et TAM le plus tardivement, ce qui est cohérent avec leur $\text{Log } K_{ow}$. 5-FU est une molécule très polaire de faible poids moléculaire qui interagit peu avec les chaînes C_{18} et est donc peu retenue. TAM possède une structure triphényléthylénique qui interagit fortement avec la phase stationnaire et principalement par interactions hydrophobes, induisant une rétention très élevée. L'ordre d'élution des autres composés n'est pas expliqué par leur $\text{Log } K_{ow}$. Les interactions liées à l'hydrophobicité ne sont probablement pas les seules. Des interactions électrostatiques peuvent être une explication.

Il apparaît que la méthode de séparation et détection mise au point n'est pas adéquate pour l'analyse des moutardes NOR et PHO. En effet, les pics obtenus ([Figure II-16](#)) ne présentent pas une allure gaussienne, avec un étalement évoluant dans le temps surtout pour NOR. Ceci peut être dû à (i) des interactions secondaires importantes dans la colonne, (ii) une résistance importante au transfert de masse, notamment en raison d'un diamètre de particules (4 μm) peu adapté ou (iii) une sensibilité aux conditions opératoires en MS. La composition de la phase mobile ou le type de chromatographie employé n'étaient probablement pas adéquats. **Ainsi, l'étude des molécules NOR et PHO a été abandonnée.** Ce résultat met en évidence la difficulté d'analyser les produits de dégradation.

L'élution des cinq analytes conservés dure au total 39 minutes, qui est une durée classique en analyse par HPLC et surtout acceptable compte-tenu de la difficulté induite par l'élution de composés possédant des caractéristiques très différentes. Les pics sont dans l'ensemble bien résolus et d'une largeur convenable pour la granulométrie de la colonne utilisée (4 μm). Le gradient défini a permis d'obtenir des chromatogrammes reproductibles dans le temps. Les composés deutérés ont présenté exactement les mêmes profils chromatographiques que ceux de leurs standards respectifs mais ont pu être distingués grâce à leur réponse différente en MS.

Par ailleurs, rappelons que la détection en UV est juste un moyen de confirmation de présence du 5-FU et du TAM. Elle n'a donc bénéficié d'aucune optimisation.

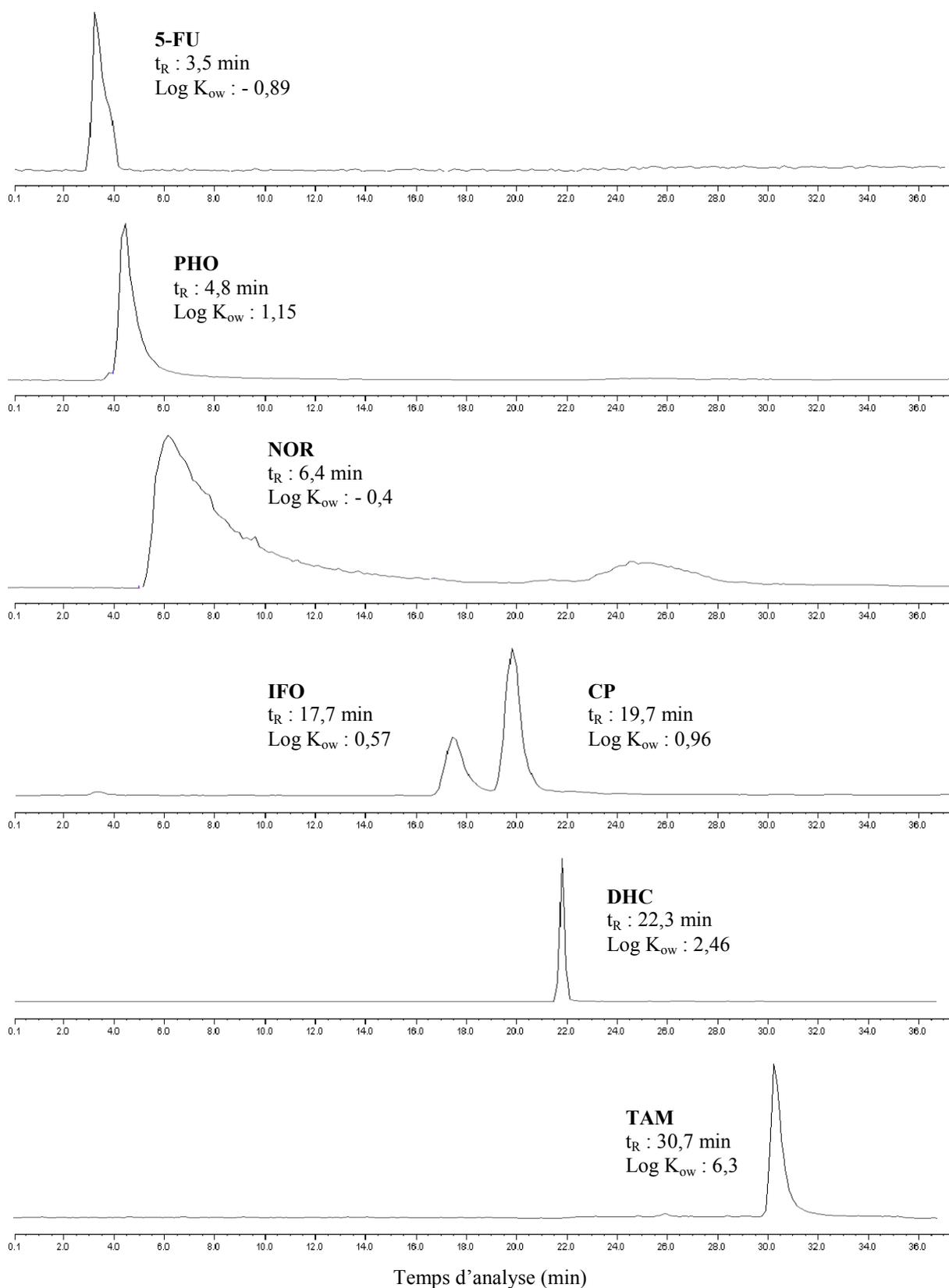


Figure II-16 : Allure d'un chromatogramme type en HPLC-UV/MS

II.3.1.2) Développement de l'analyse par UHPLC-MS/MS

Le gradient mis au point en HPLC a été affiné pour l'analyse UHPLC en utilisant un détecteur à barrettes de diodes (PDA) couplé à un détecteur à diffusion de lumière après évaporation (ELSD). Les composés cibles ont par la suite été caractérisés en MS/MS par injection de standards purs à 1 mg/L en infusion directe. On rappelle que seuls les composés à caractère neutre (IFO et CP) ou basique (TAM) ont été recherchés sous cette méthode. IFO et CP ont généré des transitions bien différentes, permettant de les distinguer de manière univoque. La séparation chromatographique a été contrôlée en injectant un mélange des molécules recherchées dissoutes dans le MeOH. Les molécules IFO, CP et les analogues deutérés sont apparus sous la forme de triple pics plus ou moins étroits et donc inadéquats pour une quantification. Des problèmes de polarité diverses entre la phase stationnaire (C_{18}), la phase mobile (ACN/Eau), le solvant de dissolution/reprise des molécules (MeOH) et leurs possibles interactions ambivalentes pourraient expliquer ce manque de résolution. La nature du solvant de reprise a donc été changée, plus respectueuse de la composition de la phase mobile (Tableau II-11) et donnant pour chacune des molécules, un pic unique et très étroit. Les améliorations apportées au gradient ont abouti à l'obtention du chromatogramme présenté sur la Figure II-17. Par comparaison avec la séparation par HPLC, la méthode UHPLC permet de diviser par 4 le temps d'analyse, par 8 la largeur des pics et par 8 la consommation de phases mobiles par analyse. Un léger effet de traîne est observé pour TAM, probablement en raison d'une affinité très importante avec la phase stationnaire et d'un effet de concentration : plus un analyte est concentré, plus il aura tendance à traîner si son interaction avec la colonne est importante.

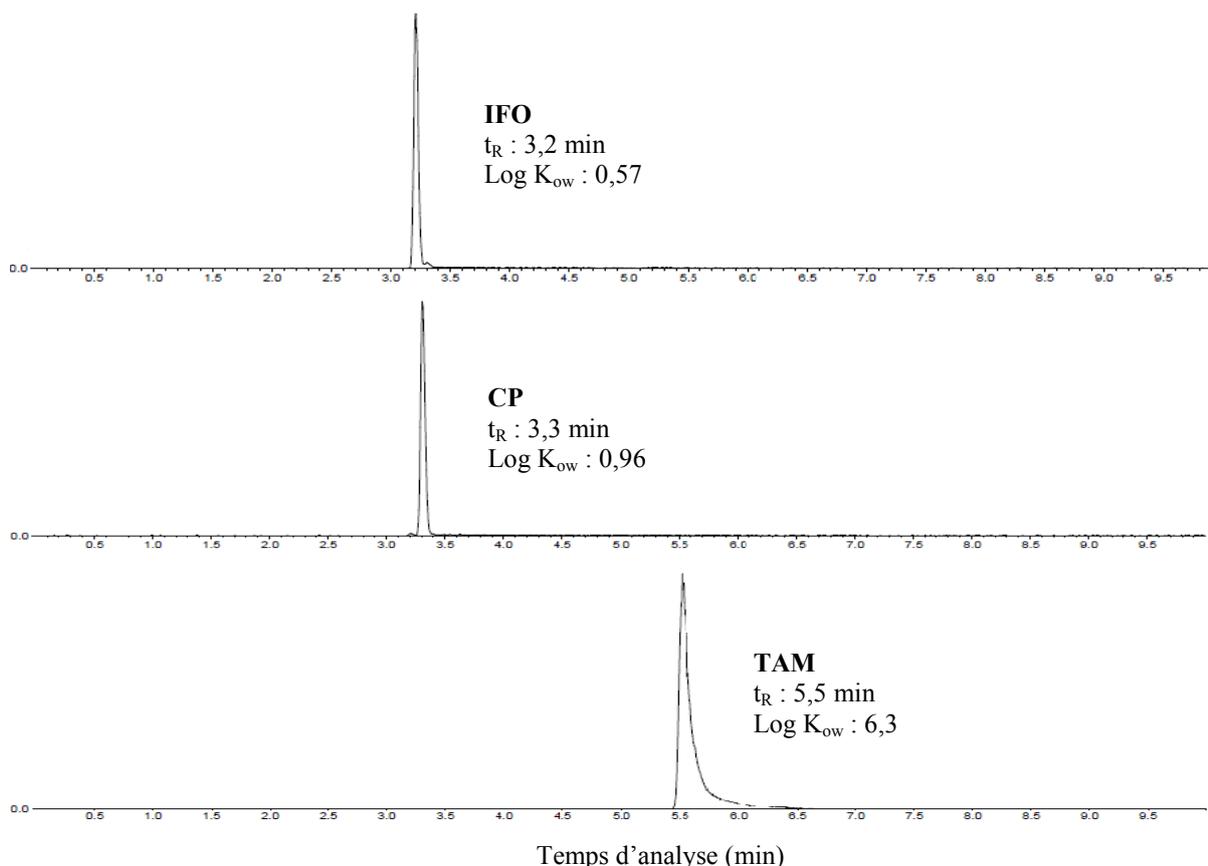


Figure II-17 : Allure d'un chromatogramme type en UHPLC-MS/MS

II.3.1.3) Validation instrumentale

La validation des performances des équipements utilisés a été appréciée suivant plusieurs critères : les limites instrumentales de détection (IDL) et de quantification (IQL) définies dans la partie II.2.8.3, la répétabilité instrumentale définie comme l'écart-type relatif sur cinq injections successives d'un échantillon de concentration dix fois supérieure à l'IQL, la plage de linéarité de la réponse et le coefficient de corrélation R^2 associé. Les résultats sont consignés dans le [Tableau II-13](#).

Tableau II-13 : Eléments de validation instrumentale sur les deux équipements

Molécule	Analyse HPLC-UV/MS			Analyse UHPLC-MS/MS		
	IDL IQL	Répétabilité (%)	Linéarité Corrélation R^2	IDL IQL	Répétabilité (%)	Linéarité Corrélation R^2
5-FU	500 µg/L 1000 µg/L	6	1000 – 50000 µg/L 0,995 – 0,998			
IFO	20 µg/L 50 µg/L	1	50 – 5000 µg/L 0,995 – 1	250 ng/L 1 µg/L	5	1 – 250 µg/L ≥ 0,999
CP	20 µg/L 50 µg/L	6	50 – 5000 µg/L 0,995 – 1	250 ng/L 1 µg/L	4	1 – 500 µg/L ≥ 0,999
TAM	0,5 µg/L 1 µg/L	6	1 – 500 µg/L 0,996 – 0,999	non déterminé *		

* : explications partie II.3.3.3.b

Les IDL et IQL obtenues sont très différentes, avec un écart de trois décades entre l'analyte le mieux détecté et le moins bien détecté en MS simple. L'analyse par MS/MS est environ 80 fois plus sensible. Ces résultats ont pu être anticipés grâce aux explications précédentes. La répétabilité est très satisfaisante pour tous les analytes et inférieure à 6 %. Les coefficients de corrélation obtenus sur une période de deux mois (soit au moins cinq étalonnages) étaient systématiquement supérieurs ou égaux à 0,995, confirmant d'une part la relation linéaire et d'autre part la fiabilité de l'analyse dans le temps. L'utilisation de ces équipements est donc validée.

II.3.2) Développement et validation du protocole pour la phase aqueuse

II.3.2.1) Sélection de l'adsorbant

Assurer des taux de recouvrement convenables pour tous les analytes est probablement l'étape analytique la plus délicate d'une méthode multi-résidus. Trouver l'adsorbant le plus adéquat peut être appréhendé suivant deux schémas : (1) extraire tous les analytes en une étape en utilisant un adsorbant universel ou (2) extraire tous les analytes en plusieurs étapes en utilisant des adsorbants plus spécifiques. Chacun de ces schémas implique différents compromis. Le schéma (1) se traduit souvent par une méthode peu sélective et des extraits insuffisamment raffinés, le schéma (2) peut entraîner des taux de recouvrement variables suivant les analytes et nécessite une manipulation importante. **Le critère déterminant dans le choix de l'adsorbant a ici été la récupération de l'intégralité des analytes depuis une matrice eau ultrapure (100 mL) dopée avec 100 µL de MIX Standards (n = 2). Des rendements faibles n'ont pas été considérés comme un facteur limitant.** En raison de leur coût particulièrement élevé, les composés deutérés n'ont pas été ajoutés. Cependant, l'aire de l'étalon de contrôle DHC, injecté juste avant l'analyse, a été comparée entre les étalons de calibration et les extraits générés. Aucune différence significative n'a été observée, ce qui indique l'absence d'effet matrice dans les extraits. Ainsi, toute diminution du signal n'a été induite que par des pertes durant l'extraction. Le [Tableau II-14](#) renseigne les différents essais et résultats.

Tableau II-14 : Schémas d'extraction appliqués et rendements absolus obtenus

Molécule	Schéma (1)		Schéma (2)
	Oasis HLB	Oasis MCX/MAX	Oasis MAX/MCX
5-FU	0 %	0 %	> 25 %
IFO	> 80 %	> 70 %	> 60 %
CP	> 80 %	> 70 %	> 60 %
TAM	> 80 %	> 50 %	> 15 %

Dans une première approche, le schéma (1) a été appliqué en utilisant l'adsorbant Oasis HLB (200 mg). Ce type d'adsorbant est très utilisé dans l'extraction de produits pharmaceutiques contenus dans les matrices environnementales (Al-Odaini *et al.*, 2010). De plus, sa balance hydrophile-hydrophobe a déjà prouvée sa polyvalence et son efficacité dans la récupération d'analytes aux propriétés physico-chimiques diverses (Tarcomnicu *et al.*, 2011). Un protocole d'utilisation de cet adsorbant était disponible dans la littérature et a été appliqué (Brun *et al.*, 2006). Des rendements satisfaisants ont été obtenus pour IFO, CP et TAM (> 80 %) tandis que 5-FU n'a pas été extrait par cette méthode. IFO, CP et TAM interagissent avec le polymère HLB via des interactions hydrophobes de type Van der Waals (non aromatiques) ou $\pi - \pi$ (aromatiques) (Bauerlein *et al.*, 2012). Un ajustement du pH de l'eau ultrapure n'a pas permis d'améliorer la récupération du 5-FU. Des interactions hydrophobes ne sont pas attendues avec l'adsorbant. De plus, le groupement amine du 5-FU possède une qualité de donneur de proton, rendant les interactions avec l'eau (accepteur de proton) plus favorable d'où une rétention nulle. Le manque de rétention de l'adsorbant HLB a été démontré dans la littérature pour une autre molécule très polaire, la metformine ($\text{Log } K_{ow} = -0,5$) (Cahill *et al.*, 2004). Le caractère universel de l'adsorbant peut être remis en cause. Ce schéma a été abandonné.

Le schéma (2) a donc été testé en utilisant une combinaison de cartouches en série : Oasis MCX (60 mg) puis Oasis MAX (60 mg). Ces deux cartouches possèdent le squelette de base de l'Oasis HLB et peuvent donc produire les mêmes interactions. De plus, l'Oasis MCX est modifiée chimiquement avec l'acide sulfonique alors que l'Oasis MAX est modifiée avec des ammoniums quaternaires, leur permettant de produire respectivement des interactions cationiques et anioniques fortes suivant le pH appliqué. Un protocole d'utilisation de cette combinaison était disponible et a été sélectionné (Lavén *et al.*, 2009). Des rendements acceptables ont été obtenus pour IFO, CP et TAM (> 50 %) alors que 5-FU n'a pas été récupéré. La baisse de rendements pour les trois premières molécules pourrait être expliquée par une diminution du nombre total de sites d'adsorption HLB en raison de l'addition des groupements fonctionnels (Bauerlein *et al.*, 2012). L'Oasis MCX implique un travail à pH acide. Dans ces conditions, 5-FU est protoné et ne peut interagir qu'avec le squelette HLB, expliquant l'absence de récupération. L'association de cartouches a été conservée mais inversée (Oasis MAX puis MCX). L'ensemble des analytes a pu être récupéré avec des taux de recouvrement très variables (Tableau II-14). Cette combinaison de cartouches a donc été retenue et permet de réaliser une extraction sélective.

Sous cette configuration, le pH de l'échantillon est initialement ajusté à 12 pour déprotoner 5-FU et favoriser les interactions anioniques avec l'ammonium quaternaire via des forces de Coulomb (électrostatiques). Les autres molécules sont retenues sur le squelette HLB par des interactions hydrophobes. La récupération d'IFO, CP et TAM a été réalisée grâce à un solvant organique de force éluante appropriée, suivie par celle du 5-FU à l'aide d'un solvant organique basique destiné à protoner la molécule et faciliter son élution. La séparation d'IFO, CP et TAM n'étant pas effective, un traitement supplémentaire est nécessaire. Le pH de l'échantillon généré est ajusté à 2 pour protoner TAM et favoriser les interactions cationiques électrostatiques avec l'acide sulfonique. IFO et CP sont retenus par le même mécanisme précédemment décrit. L'élution est réalisée sur le même

principe que pour 5-FU en éluant d'abord IFO et CP puis en remplaçant le solvant organique basique par un plus acide pour déprotoner et éluer facilement TAM. Une représentation des interactions possibles est donnée sur la Figure II-18.

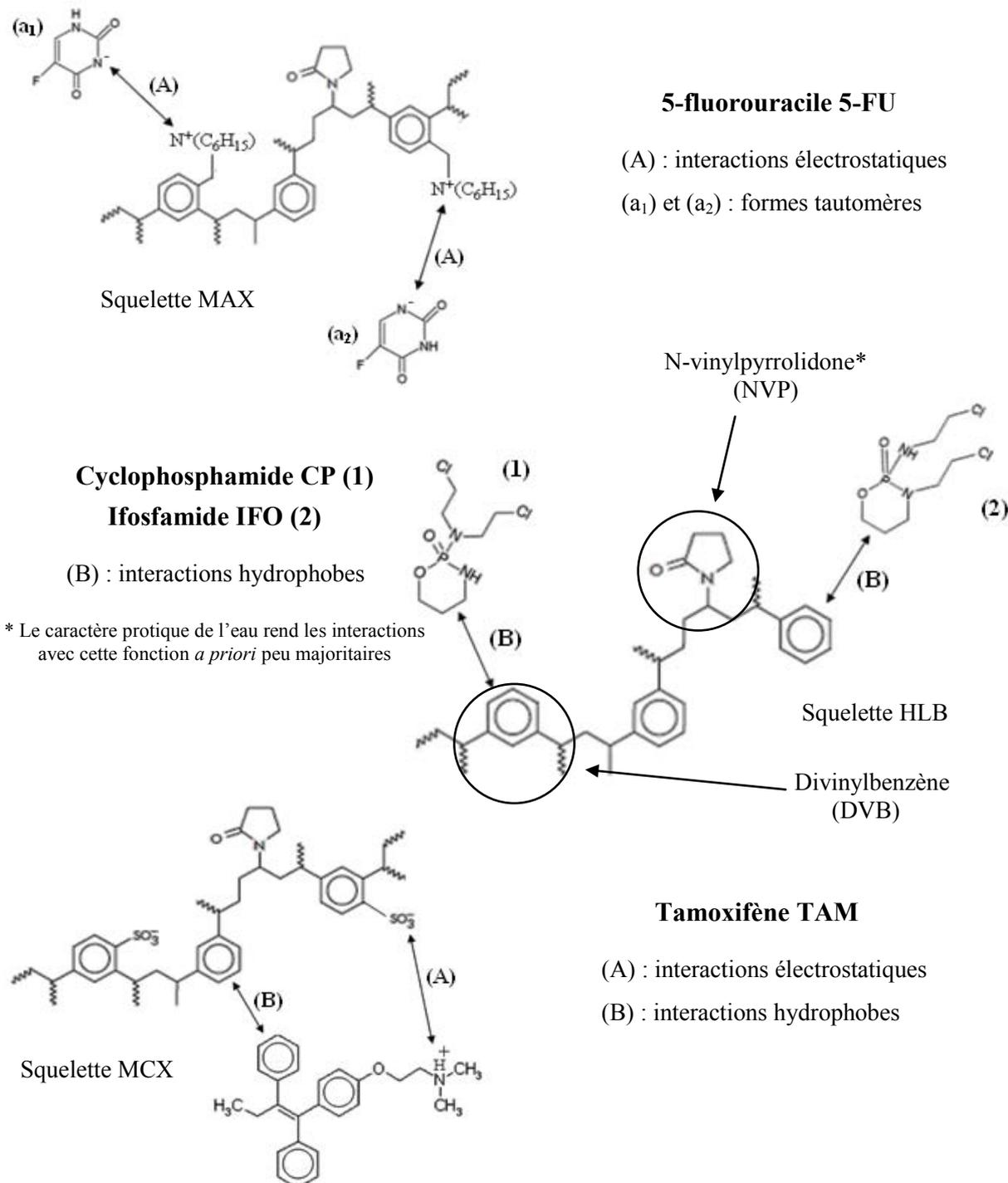


Figure II-18 : Représentation des interactions possibles entre les molécules cibles et les adsorbants lors de l'extraction par SPE

II.3.2.2) Optimisation de l'extraction sur eau ultrapure

Les rendements d'extraction du 5-FU et du TAM étant relativement bas, différents essais ont été effectués pour les maximiser autant que possible. La stratégie adoptée a reposé sur une optimisation de proche en proche, en ne faisant varier qu'un seul paramètre à la fois. Les paramètres d'intérêt ont été la nature du ou des solvants d'élution, leur volume, ainsi que la nature et le ratio d'acide ou de base utilisé dans l'élution du 5-FU et du TAM respectivement. Les expériences ont été répétées trois fois sur une matrice eau ultrapure (100 mL), dopée avec 100 µL de MIX Standards. La stratégie de calcul des rendements d'extraction est la même que celle définie dans la partie précédente, de même que le protocole de référence. Le [Tableau II-15](#) reprend ces essais et les rendements calculés.

Tableau II-15 : Rendements des étapes d'optimisation de l'extraction sur eau ultrapure

Etape de recherche (chronologie)		Rendements absolus (%) ± écart-type (n = 3)			
		5-FU	IFO	CP	TAM
Nature du solvant d'élution	MeOH	25 ± 3	63 ± 2	74 ± 3	16 ± 2
	Acétone	25 ± 3	15 ± 5	24 ± 7	25 ± 7
	ACN	13 ± 3	21 ± 2	34 ± 4	15 ± 7
	MeOH/Acétone 50/50 (v/v)	33 ± 2	21 ± 2	37 ± 5	19 ± 9
	MeOH/Acétone 25/75 (v/v)	31 ± 2	nd	nd	nd
	MeOH/Acétone 75/25 (v/v)	37 ± 1	nd	nd	nd
Volume du solvant d'élution	2 mL	35 ± 2	66 ± 4	77 ± 2	14 ± 4
	3 mL	30 ± 4	62 ± 3	71 ± 4	20 ± 3
	4 mL	35 ± 6	63 ± 6	71 ± 3	28 ± 4
	8 mL	nd	nd	nd	27 ± 4
Nature de l'acide ou de la base dans le solvant d'élution	HCOOH (acide)	33 ± 1	nd	nd	nd
	CH ₃ COOH (acide)	39 ± 1	nd	nd	nd
	NaOH (base)	nd	nd	nd	0 ^a
	NH ₄ OH (base)	nd	nd	nd	26 ± 5
Ratio de l'acide ou de la base dans le solvant d'élution	2 %	38 ± 2	nd	nd	26 ± 5
	5 %	37 ± 3	nd	nd	24 ± 4

a : recrystallisation de l'extrait lors de l'évaporation ; nd : non déterminé

les rendements les plus élevés sont donnés en gras et correspondent à la condition sélectionnée

L'effet de la nature du solvant d'élution a été étudié à travers l'utilisation du MeOH, de l'acétone, de l'ACN et de mélanges MeOH/Acétone. Le choix de ces solvants est dû à leur miscibilité totale avec l'eau et sont donc de polarité relativement élevée. Le MeOH permet de récupérer quantitativement IFO et CP, avec une efficacité environ deux à trois fois supérieure à celle des autres solvants. L'acétone a permis d'obtenir des rendements plus intéressants pour TAM, alors que 5-FU a nécessité un mélange MeOH/Acétone (75/25 ; v/v). Les rendements de récupération pour 5-FU et TAM sont encore bas. A l'exception du TAM, les écarts-types obtenus sont relativement faibles et confirment la fiabilité de l'extraction sélective. Cet essai a permis de mettre en évidence la nécessité d'utiliser des solvants de polarité variable pour extraire les analytes recherchés.

L'effet du volume de solvant d'élution a été étudié à travers quatre volumes (2, 3, 4 et 8 mL). Un volume d'élution supérieur à 2 mL n'a pas permis d'améliorer significativement la récupération de 5-FU, IFO et CP. Un volume de 4 mL a été la condition d'intérêt pour l'élution de TAM. Le volume d'élution doit être le plus faible possible. Dans l'extraction des composés à partir de matrices « réelles », des volumes d'élution trop importants peuvent aboutir à la récupération d'interférents en quantité non négligeable, augmentant l'effet matrice et diminuant par la même occasion l'intérêt de la SPE.

Plusieurs natures et ratios d'acides (HCOOH et CH₃COOH) et de bases (NaOH et NH₄OH) ont été étudiés pour caractériser l'influence sur la récupération du 5-FU et du TAM. Le CH₃COOH donne des rendements plus intéressants pour 5-FU. Les raisons ne sont pas claires mais pourraient être attribuées à une meilleure activation des sites anioniques lors de la pré-équilibration de la cartouche, résultant en une capacité de fixation plus importante. La récupération du TAM n'a pu être réalisée avec du NaOH en raison de la recristallisation de l'extrait lors de l'évaporation. Le NH₄OH a donc été conservé. Enfin, le pourcentage d'acide ou de base le plus faible a donné des rendements équivalents aux ratios plus élevés et a été retenu. Par ailleurs, l'évaporation de 100 µL d'eau sous N₂ dure 2 heures. La pureté du NH₄OH étant de 35 %, le ratio le plus faible était ainsi préférable pour limiter la durée d'évaporation.

Une masse d'adsorbant très petite (60 mg) a été utilisée pour réaliser ces essais. Comme une limitation des rendements en 5-FU et TAM pouvait être possible, une masse d'adsorbant plus importante (150 mg) a été testée. Les volumes de solvant précédemment déterminés ont été doublés pour assurer une extraction convenable. Aucune amélioration significative des rendements n'a été observée. Le coût d'une cartouche de 150 mg est environ trois fois supérieur à celui d'une cartouche de 60 mg, rendant les extractions économiquement peu soutenables sur le long terme. La masse de 60 mg a été conservée.

Bien que les rendements obtenus pour 5-FU et TAM aient été respectivement multipliés par 1,5 et 1,8 depuis la méthode initiale, ils demeurent assez bas. Pour 5-FU, l'étape limitante a été identifiée. Un volume de 100 mL d'eau ultrapure dopée au 5-FU a été soumis à l'extraction SPE puis récupéré avant d'être soumis à une nouvelle extraction. Du 5-FU a été quantifié lors de la seconde extraction. Ainsi, 5-FU subit une auto-élution par l'eau lors de la percolation, en raison de sa très grande solubilité renforcée par son caractère ionique. Son rendement pourrait donc être fonction du volume d'échantillon percolé. Pour TAM, des problèmes d'encombrement stérique résultant en une difficulté de sorption pourraient expliquer le faible taux de récupération. A l'inverse, une affinité trop importante pour le support l'expliquerait également. Il est important de rappeler que TAM bénéficie d'une analyse très sensible en MS. Un rendement relativement bas n'est donc pas préjudiciable pour sa quantification. Par ailleurs, la bonne répétabilité des différents essais permet de confirmer la qualité de l'extraction.

La procédure optimisée présente ainsi l'avantage de permettre la récupération sélective d'analytes aux caractéristiques diverses, à partir d'un échantillon unique de faible volume. **La nécessité d'une extraction globale à partir de seulement 100 mL d'échantillon était une contrainte forte de cette étude.**

II.3.2.3) Ajustement de la méthode aux matrices réelles et conséquences

Quelques ajustements de méthode ont été réalisés grâce à l'étude qualitative de l'extraction de 100 mL d'une matrice réelle (phase aqueuse de boue de Ginestous). L'utilisation d'une faible quantité de solvant organique (MeOH 5 % ; v/v) dans le solvant de lavage des cartouches a permis d'obtenir des chromatogrammes moins parasités. Il est donc possible que le contenu légèrement organique du lavage soit responsable de l'entraînement de substances interférentes légèrement sorbées, résultant en un extrait plus raffiné. Cette observation a déjà été effectuée par [Bijlsma *et al.* \(2009\)](#) et confirme la nécessité d'un lavage pour diminuer la présence d'interférents. L'EDTA est classiquement utilisé pour favoriser la désorption de composés à haut pouvoir de sorption, que ce soit sur le flaconnage ou aux constituants de la matrice. Dans nos expériences, l'EDTA (0,01 % ; m/m) a simplement permis de maintenir constant le débit de percolation de 1 mL/min. Il est possible que l'EDTA interagisse avec la matière colloïdale colmatante, permettant de retarder le bouchage des cartouches. Une capacité à dissoudre les espèces organiques et minérales est également possible.

II.3.2.4) Performances de la méthode et validation

L'évaluation des performances analytiques a porté sur l'efficacité de la méthode entière pour un ou plusieurs niveaux de concentration, le rendement de l'adsorbant SPE, l'effet matrice et les limites de détection et quantification. La matrice retenue pour la validation est de la phase aqueuse de boue, obtenue après centrifugation puis filtration d'un échantillon récupéré du bassin à boues activées moyenne charge de la STEP de Ginestous (Tableau III-4). Plusieurs échantillons de volume 100 mL ont été produits et dopés à différentes étapes de la procédure. Pour caractériser les pertes, le MIX Deutérés a été injecté. La procédure de dopage et les critères de performance sont explicités sur la Figure II-19. La validation a uniquement été effectuée sur l'HPLC-UV/MS.

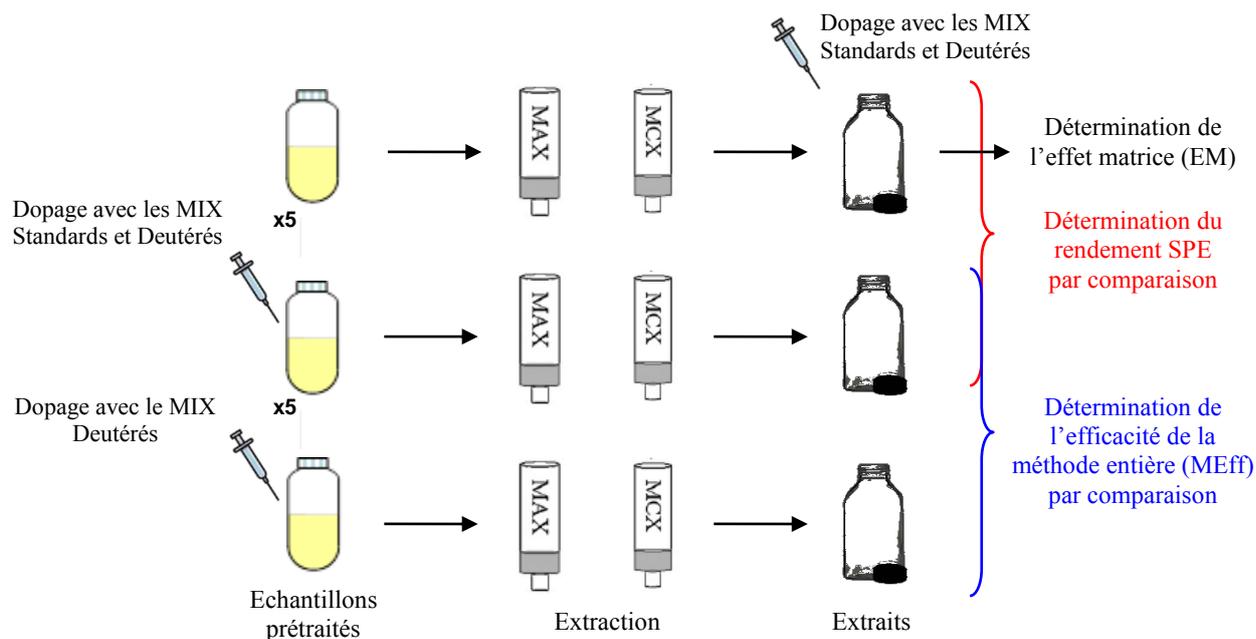


Figure II-19 : Schéma de dopage des performances de la méthode en phase aqueuse

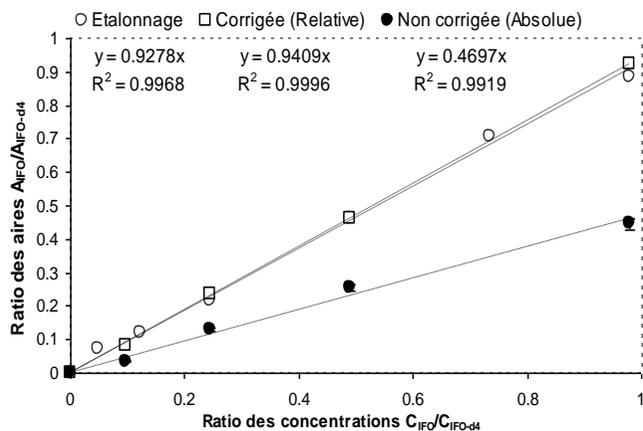
La méthodologie développée ci-dessus possède les caractéristiques suivantes. En dopant l'échantillon avant l'extraction, l'efficacité de la méthode entière (MEff) prend à la fois en compte les pertes induites par l'extraction SPE et l'effet matrice (EM). Le dopage des extraits juste avant l'analyse permet de rendre compte uniquement de l'EM induit par les interférents. Ainsi, la comparaison des deux procédures de dopage permet d'aboutir à l'efficacité de l'extraction SPE. Ces expériences ont été menées en quintuplicat. Pour éviter une surestimation des performances, la présence éventuelle des composés d'intérêt dans les échantillons d'origine a également été prise en compte. Le quintuplicat précédent a permis de déterminer la répétabilité de la méthode. La reproductibilité a été déterminée à l'aide de dix répétitions effectuées par deux opérateurs distincts comme suggéré par la norme AFNOR XP-T 90-210 (AFNOR, 1999). La période de validation correspondante est de deux mois. Enfin, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont pu être calculées. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau II-16. L'originalité de ces résultats est mise en évidence par la présentation des critères de performance sans et avec correction, contrairement à ce qui est généralement proposé dans les validations de méthode rencontrées dans la littérature, utilisant uniquement les valeurs corrigées souvent bien plus avantageuses.

Tableau II-16 : Résultats des performances et de la validation de la méthode analytique en phase aqueuse

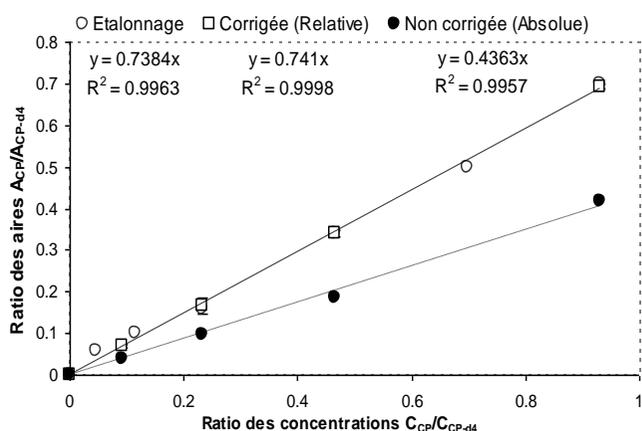
Paramètre	MEff (%) ± σ		MEff (%) ± σ		Répéta. (%)	Repro. (%)	Rdt SPE (%) ± σ		EM (%) ± σ		LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
	n = 5 ; 1 niveau		n = 2 ; 4 niveaux				n = 5 ; 1 niveau	n = 10 ; 1 niveau	n = 5 ; 1 niveau			
	Eq. (II-1)		Eq. (II-2)		Eq. (II-3)	Eq. (II-3)	Eq. (II-4)		Eq. (II-6)		Eq. (II-7)	Eq. (II-7)
Calcul	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Sur les quantités corrigées		Absolu	Relatif	Absolu	Relatif		
5-FU ⁽ⁱ⁾	d	d	-	-	nd	nd	nd	nd	- 84 ± 2	4 ± 5	nd	nd
IFO ⁽ⁱⁱ⁾	50 ± 6	95 ± 7	51 ± 4	101 ± 2	7	4	65 ± 4	99 ± 3	- 27 ± 6	- 2 ± 3	40	100
CP ⁽ⁱⁱⁱ⁾	61 ± 5	104 ± 7	59 ± 3	100 ± 3	7	5	87 ± 8	98 ± 7	- 30 ± 6	6 ± 8	33	82
TAM ^(iv)	20 ± 3	100 ± 3	21 ± 3	101 ± 3	3	8	30 ± 5	101 ± 4	- 33 ± 5	5 ± 8	2	5

MEff : efficacité de la méthode entière ; σ : écart-type ; Répéta. : répétabilité ; Repro. : reproductibilité ; Rdt : rendement ; EM : effet matrice
 LOD : limite de détection de la méthode entière ; LOQ : limite de quantification de la méthode entière ; d : détecté mais non quantifié ; nd : non déterminable
 Equivalents deutérés : (i) 5-FU-6-d₁ ; (ii) IFO-d₄ ; (iii) CP-d₄ ; (iv) TAM-d₅

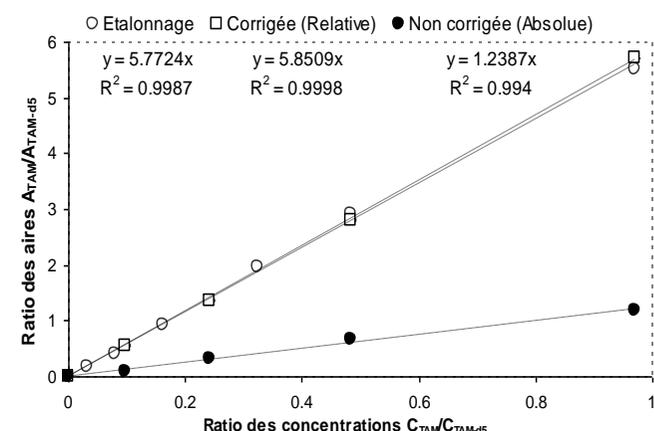
Ifosfamide IFO



Cyclophosphamide CP



Tamoxifène TAM



Les pentes et coefficients de corrélation correspondants sont fournis sous chacun des items
 Les écarts-types sont renseignés sur ces graphiques mais trop petits pour être visibles

Figure II-20 : Estimation de l'efficacité de la méthode d'extraction en phase aqueuse sur plusieurs niveaux de concentration

II.3.2.4.a) Efficacité de la méthode entière

La détermination de la MEff n'a pas été possible pour 5-FU. La molécule a été seulement détectée dans les extraits, traduisant un taux de récupération faible et/ou un EM très important. L'origine sera prochainement discutée. Les MEff (un niveau de concentration) pour les autres molécules ont pu être calculées. Les MEff absolues pour IFO et CP sont satisfaisantes et supérieures à 50 %. Une MEff absolue de 60 % avait été obtenue par [Lavén et al. \(2009\)](#) pour l'extraction du CP depuis des eaux de STEP, à travers l'utilisation du tandem Oasis MCX puis MAX. Ainsi, l'association de ces supports semble être une alternative pertinente et efficace pour l'extraction du CP et de IFO depuis les matrices complexes. La MEff absolue du TAM est quant à elle plus relative (20 %) mais ne remet pas en doute l'intérêt de l'approche tandem. Les MEff relatives ont donné des résultats très répétables et reproductibles voisins de 100 %, traduisant l'adéquation totale des composés deutérés avec la procédure analytique et leur capacité à corriger efficacement les biais. Il est important de noter qu'il aurait pu être possible d'utiliser un seul composé deutéré pour corriger les pertes en IFO et CP puisque ces deux molécules subissent les mêmes conditions d'extraction et de séparation. Cependant et à notre connaissance, l'utilisation de CP-d₄ et de IFO-d₄ n'a pas été rapportée dans la littérature, probablement en raison d'une ancienne indisponibilité commerciale. Ce travail a ainsi permis de démontrer la pertinence de leur utilisation pour les matrices aqueuses et de s'affranchir de l'application d'un facteur correctif supplémentaire.

Une comparaison intéressante entre les MEff sur un et plusieurs niveaux de concentration est disponible. Les différentes concentrations de travail ont été réfléchies en cohérence avec les performances de l'équipement et les données environnementales résumées dans le Chapitre I. Ainsi, la MEff a été étudiée sur une plage de 0,2 à 2 µg/L pour IFO et CP et 0,03 à 0,3 µg/L pour TAM. [La Figure II-20](#) caractérise ce paramètre via la représentation du ratio des aires « standard/deutééré » en fonction du ratio des concentrations dopées. Lorsque cela était possible, une relation linéaire sans ordonnée à l'origine a été définie comme suggérée dans la littérature ([Badertscher et Pretsch, 2006](#)). Les différents cas présentés ont rempli ce critère. Ainsi, on remarque toujours la parfaite compensation des pertes par les deutérés puisque la droite générée est parfaitement confondue avec la droite d'étalonnage qui elle n'a subi que l'analyse, sans extraction, ni EM. Les courbes nommées « Non corrigée » mettent en évidence la présence de pertes proportionnelles à la concentration. La comparaison des pentes a permis de calculer la MEff sur toutes les étendues considérées. La détermination des MEff pour un ou plusieurs niveaux de concentration n'a pas donné de différence significative ([Tableau II-16](#)). L'approche sur un seul niveau était donc suffisante et caractéristique de l'extraction. Elle a été conservée pour le calcul des LOD et LOQ.

II.3.2.4.b) Rendement de l'extraction

A l'exception du 5-FU pour lequel un calcul de rendement n'a pas été possible, l'ensemble des analytes ont présenté des taux de récupération absolus comparables entre les échantillons réels et l'eau ultrapure. Ces taux sont satisfaisants pour IFO et CP (> 60 %) et assez faibles pour TAM (> 30 %). La présence de composés non ciblés n'a pas entraîné d'effet de compétition, ni de limitation des cinétiques de sorption. Bien que peu conventionnelle, la faible masse d'adsorbant utilisé est ici suffisante. Avec des rendements relatifs proches de 100 %, les deutérés ont compensé efficacement les pertes. Leur utilisation est donc nécessaire pour s'affranchir des problèmes usuels en SPE tels que la variabilité de la matrice, la compétition pour les sites de fixation ou encore, la formation possible d'écoulement préférentiel dans la cartouche lors du travail par dépression, résultant en une exploitation très partielle du lit adsorbant.

II.3.2.4.c) Estimation de l'effet matrice

L'ensemble des analytes est affecté par un EM plus ou moins important (Tableau II-16). IFO, CP et TAM subissent respectivement un EM absolu de - 27, - 30 et - 33 %. Pour de nombreux auteurs, L'EM est corrélé au volume de reprise : plus le volume sera faible et plus l'EM sera présent voire très présent. Les EM ici renseignés sont bas. On peut donc considérer que les extraits SPE sont d'une pureté très satisfaisante. Les EM relatifs sont tous très proches de 0 % et démontrent à nouveau l'adéquation des composés deutérés.

La détection du 5-FU est sévèrement impactée par un EM de - 84 %. Deux raisons sont possibles. L'environnement boue est composé de molécules (très) polaires telles que des protéines, des sucres et des acides aminés, en quantité parfois importante (Sauvignet et Mechouk, 2010). En supposant leur présence dans l'extrait SPE contenant 5-FU, il est possible que ces composés aient pu être élués dans des régions chromatographiques proches, diminuant son signal. Plusieurs auteurs (Hernando *et al.*, 2006) ont rapporté que les composés élués en début du gradient était généralement très affectés par l'EM. Par ailleurs, la matière organique des boues est constituée de molécules hydrophobes telles que les substances humiques et fulviques, au caractère acide (Sauvignet et Mechouk, 2010). Lors de l'extraction sur Oasis MAX, le pH acide assure leur déprotonation et fixation sur l'ammonium quaternaire. Une compétition de sorption avec 5-FU a pu être possible, réduisant ainsi le taux de récupération. De plus, les substances humiques sont responsables de la coloration brune des boues. La coloration jaune-marron des extraits SPE acides (Figure II-10) pourrait signifier la récupération de ces espèces lors de l'élution du 5-FU. L'extrait contiendrait alors des quantités d'interférents non négligeables qui diminuent la sensibilité de l'analyse. Néanmoins, la perte de signal est efficacement corrigée par le composé deutéré.

II.3.2.4.d) Limites de détection et de quantification

Il est difficile de discuter et comparer avec la littérature des valeurs de LOD et LOQ uniques. En effet, il existe de nombreuses méthodes de détermination des limites analytiques, sur des équipements et des matrices de qualité différentes. De plus, la composition entre les échantillons peut être variable lors de la validation et entraîner des limites différentes. Ainsi, seuls les ordres de grandeur sont discutés.

Les LOD et LOQ pour IFO et CP sont proches et de l'ordre de 40 et 100 ng/L. Elles ne sont bien évidemment pas comparables aux LOD et LOQ obtenues en MS/MS pour des eaux de STEP, qui sont environ vingt à cinquante fois plus basses. Nos limites analytiques sont toutefois intéressantes pour la détection et quantification dans les effluents hospitaliers. TAM bénéficie de LOD et LOQ très basses, de l'ordre de quelques ng/L (Tableau II-16). Ces limites sont parfois comparables aux limites obtenues en MS/MS par différents auteurs (Thomas et Hilton, 2004 ; Gros *et al.*, 2009). Elles sont de plus compatibles avec les niveaux de concentration relevés dans l'Environnement. Les performances de méthode pour cette molécule sont donc très satisfaisantes. Par ailleurs, des LOD et LOQ plus basses pourraient être attendues sur des matrices de complexité moins importante.

En conclusion de cette étude de validation, on retiendra que la méthode d'extraction proposée est robuste et validée pour IFO, CP et TAM mais n'apparaît pas adéquate pour quantifier 5-FU dans les matrices aqueuses. De nouveaux efforts de recherche seraient nécessaires.

II.3.2.5) Autour de la méthode...

II.3.2.5.a) Gain possible sur l'analyse ?

Après extraction, chaque échantillon génère trois extraits dont deux « viables », ce qui implique un cumul d'analyse important. Une expérience a été menée dans le sens d'une réduction du temps total d'analyse. Elle a consisté à rassembler, après la procédure d'extraction entière, les extraits neutres et bases en un seul extrait puis à l'analyser. Les aires obtenues ont été comparées à celles d'extraits séparés. Une diminution du signal d'un facteur proche de 1,1 a été observée pour tous les analytes dans l'extrait combiné. Ce résultat est certainement dû à un EM plus important. **Pour ne pas diminuer l'efficacité de la méthode, il a donc été décidé de conserver la stratégie d'analyse des fractions séparées.** Extraire les analytes sur la cartouche Oasis MAX seule a aussi été envisagé. Toutefois, le résultat précédent indique que l'élimination de l'extraction sur Oasis MCX entraînerait probablement une baisse critique de la MEff, notamment en raison d'un EM très significatif. Cette stratégie n'a donc pas été testée.

II.3.2.5.b) Evaluation de la stabilité des analytes

Peu de données de stabilité sont disponibles dans la littérature. Il a donc été décidé de vérifier la stabilité des analytes dans l'échantillon aqueux de départ ainsi que dans l'extrait final. Pour la matrice aqueuse, deux conditions de pH ont été testées (pH 2 et 12) sur une durée de conservation de 3 jours à l'obscurité et à 4 °C. Les essais ont porté sur des échantillons de phase aqueuse de boues de Ginestous, dopés simultanément avec 100 µL de MIX Standards puis extraits et analysés le jour correspondant (jour 0, jour 1, jour 2, jour 3). Pour les extraits, l'évolution de la concentration sur 14 jours de conservation à l'obscurité et à -20 °C a été contrôlée. Six échantillons de 100 mL de phase aqueuse de boue ont été dopés avec 100 µL de MIX Standards et soumis à la procédure analytique le même jour. Les extraits obtenus ont ensuite été analysés le jour correspondant (jour 0, jour 1, jour 2, jour 3, jour 7, jour 14). Les résultats de cette étude sont donnés sur la [Figure II-21](#). Ils représentent l'évolution dans le temps de la concentration en analyte rapportée à la concentration attendue (dénommée cible). L'expérience n'ayant été menée qu'une seule fois, les barres d'erreur indiquées sur les graphes ont été calculées à partir des données de reproductibilité de méthode du [Tableau II-16](#).

Pour les matrices aqueuses, IFO et CP ont montré une stabilité satisfaisante aux pH sur la période étudiée. Ce résultat était prévisible puisque leur persistance a été rapportée dans la littérature ([Buerge et al., 2006](#) ; [Llewellyn et al., 2011](#)). TAM a présenté une décroissance significative lors de la conservation à pH 12, qui pourrait être expliquée par des mécanismes d'adsorption au flaconnage ou aux colloïdes, de biodégradation et/ou d'hydrolyse. Le pH basique limite *a priori* la biodégradation et oriente sur les autres mécanismes. Ainsi, une conservation de la matrice à pH 2 pendant 3 jours est validée. La question pour des durées de conservation plus longues est toujours ouverte.

Pour les extraits, IFO et CP ont montré une très bonne stabilité sur les 14 jours de l'essai. Une diminution de la concentration en TAM a été relevée au-delà du 7^{ème} jour. Elle pourrait être expliquée par des mécanismes d'adsorption ou d'hydrolyse. De plus, ce test a mis en évidence le manque d'aptitude du composé deutéré à compenser les pertes sur du long terme. Ainsi, une durée de conservation des extraits maximale de 7 jours est requise pour une estimation rigoureuse des concentrations en TAM.

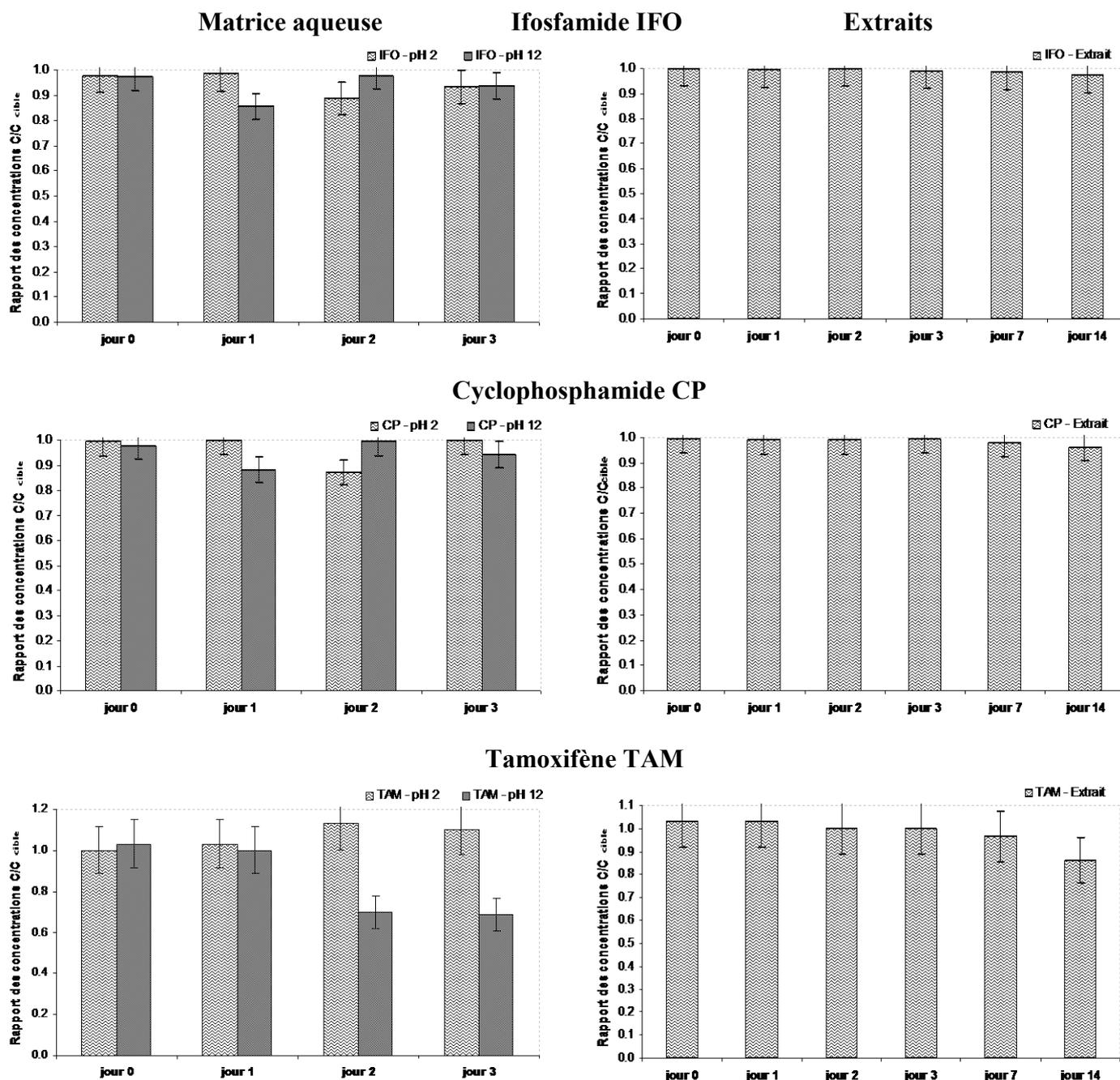


Figure II-21 : Evaluation de la stabilité des analytes dans les échantillons et les extraits

II.3.2.6) Application de la méthode à un échantillon environnemental

La procédure analytique entière a été appliquée à un échantillon de boue fraîchement récupéré à la station de Ginestous. Les analyses ont été effectuées sur l'HPLC-UV/MS. Parmi les trois molécules recherchées, aucune n'a pu être détectée. Ce résultat était prévisible pour IFO et CP en raison des performances d'analyse plutôt élevées. Pour TAM, l'adéquation de la performance de détection avec les concentrations environnementales n'est *a priori* pas limitante. La consommation relative de cette molécule pourrait induire une présence et une détection aléatoires dans les eaux usées et donc dans les boues. Une éventuelle biodégradation aurait pu être explicative mais TAM n'a présenté aucune aptitude à la biodégradation lors du test OECD 301C ([Brixham Environmental Laboratory, 1991](#)). Compte-tenu de sa très grande hydrophobicité, sa fixation sur les matières particulaires

semble être une hypothèse intéressante. Ainsi, la détection du TAM dans la **phase solide** est attendue et **nécessite le développement d'une méthode analytique** pour le confirmer. La nature des boues primaires est fortement organique, avec un contenu lipophile bien plus important que dans les boues secondaires. Intuitivement, des niveaux de concentration en TAM supérieurs dans les boues primaires pourraient être mesurés. Par ailleurs, des considérations relatives à la sorption de molécules pharmaceutiques en fonction du diamètre des particules pourraient être envisagées et reste à démontrer.

II.3.3) Développement du protocole pour la phase particulière

II.3.3.1) Sélection de la technique d'extraction

Quatre techniques d'extraction de matrices solides disponibles au laboratoire ont été identifiées : la MWE, l'USE, le Soxtec et la PLE. Afin de sélectionner la plus appropriée à l'extraction des culots de boue, elles ont été comparées suivant plusieurs critères qualitatifs. Les critères retenus ont caractérisé chacune des étapes de traitement de l'échantillon : le conditionnement (confection de l'échantillon), l'extraction (nature et volume de solvant, aspect de l'extrait, possibilité d'extractions quotidiennes) et le raffinage de l'extrait. Lorsqu'un protocole pour l'extraction de molécules anticancéreuses était disponible dans la littérature, il a été appliqué. Le cas échéant, un protocole pour l'extraction de produits pharmaceutiques a été sélectionné. Les résultats sont présentés dans le [Tableau II-17](#). Les cellules en rouge clair caractérisent un critère pénalisant, celles en vert clair un critère positif.

Tableau II-17 : Critères évalués dans la sélection de la technique la plus appropriée

Technique	MWE	USE	Soxtec	PLE	
Protocole de référence	Dobor et al., 2010	Ternes et al., 2004	Saggadi, 2009	Okuda et al., 2009	
Confection d'échantillon (min)	15	10	25	20	
Extraction	Solvant(s) de 1 ^{er} choix	Eau	MeOH Acétone	MeOH	MeOH/Eau
	Volume utilisé (mL)	50	30	100	20
	Aspect de l'extrait	Très sombre	Très sombre	Clair	Turbide
	Traitabilité (n/j)	15	8	4	15
Pré-purification	Resuspension dans l'eau	Centrifugation Evaporation Resuspension	Evaporation Resuspension	Evaporation Resuspension	
Purification SPE	Bouchage	Bouchage	Réussie	Réussie	
Décision (cause)	Rejetée (purification)	Rejetée (purification)	Rejetée (traitabilité)	Retenue	

Pour ne regrouper que des critères positifs, la méthode devait présenter les caractéristiques suivantes : une confection d'échantillon la plus rapide possible, l'utilisation d'un solvant le plus respectueux de l'Environnement et utilisé en faible quantité, la possibilité d'extraire quotidiennement un nombre d'échantillons important, et une procédure de purification facilitée par l'obtention d'extraits clairs. **La technique regroupant le maximum de critères positifs a été la PLE.** Elle a donc été sélectionnée.

II.3.3.2) Sélection de la procédure de purification

L'utilisation de la PLE permet l'application d'une procédure de purification « en ligne » présentée dans la bibliographie. Toutefois, cette stratégie n'a pas pu être envisagée. En effet, la disponibilité d'adsorbants ne permettait pas d'en trouver un favorisant à la fois l'extraction optimale des composés polaires et apolaires, sans porter préjudice aux rendements. La SPE a donc été sélectionnée. Plusieurs adsorbants ont été testés, de même que la stratégie de purification sélective développée pour la phase aqueuse. Les résultats sont consignés dans le [Tableau II-18](#). Ils ont été obtenus sur l'HPLC-UV/MS, après dopage d'extraits générés par PLE à partir d'une boue de référence (Brax) ([Tableau III-4](#)).

Tableau II-18 : Détermination de l'adsorbant SPE adéquat pour la purification

Adsorbant (masse) Protocole utilisé	RP-C ₁₈ (500 mg) Ternes et al., 2005a	Oasis HLB (200 mg) Okuda et al., 2009	Oasis MAX/MCX (150 mg) Cette étude *
IFO	0 %	~ 20 %	> 60 %
CP	0 %	~ 20 %	> 60 %
TAM	~ 25 %	~ 30 %	> 20 %

* La masse d'adsorbant utilisé étant 2,5 fois plus importante que pour l'extraction de la phase aqueuse, les volumes de conditionnement et d'élution ont été doublés.

L'adsorbant RP-C₁₈ n'a pas permis la quantification d'IFO et CP et a donc été rejeté. Les taux obtenus pour la cartouche HLB ont été meilleurs mais faibles, probablement en raison d'un EM très important et attesté par l'aspect marron très intense des extraits purifiés. Malgré des efficacités très diverses, l'approche tandem développée dans cette thèse a donc été retenue. Sa sélectivité, ici traduite par sa capacité à produire des extraits peu colorés et non turbides, est probablement un atout pour son application sur d'autres échantillons aux compositions très différentes.

II.3.3.3) Développement de la procédure d'extraction

II.3.3.3.a) Recherche du solvant d'extraction

Le solvant d'extraction doit être capable de solubiliser les analytes tout en extrayant le moins d'interférents possibles. La stratégie de sélection a été ici basée sur (i) l'utilisation de solvants couramment employés en extraction et (ii) la concordance avec la polarité des analytes. Le choix s'est porté sur des solvants purs ou utilisés en mixture. Neuf combinaisons ont alors été testées : l'acétone, l'ACN, le MeOH, l'eau ultrapure (pH 6) et des mixtures acétone/ACN (50/50 ; v/v), MeOH/ACN (50/50 ; v/v), acétone/eau (50/50 ; v/v), MeOH/eau (50/50 ; v/v) et ACN/eau (50/50 ; v/v). La boue candidate a été la boue de Brax ([Tableau III-4](#)) parce qu'elle ne contenait pas de traces d'analyte. Les expériences ont été conduites en duplicat (n = 2), sur des culots de boue lyophilisée et dopés avec le MIX Standards avant application de la procédure entière. Les conditions opératoires en PLE ont été sélectionnées à partir d'une procédure déjà existante ([Okuda et al., 2009](#)). L'efficacité des mixtures a été contrôlée en comparant les aires des analytes dans les extraits finals. Cette stratégie renseigne donc à la fois l'efficacité combinée de l'extraction, de la purification et de l'analyse. En parallèle, des cellules d'extraction ont été remplies uniquement d'agent dispersant, dopées puis extraites dans les mêmes conditions, de manière à contrôler la sensibilité des analytes. Aucune perte significative n'a été observée, confirmant la stabilité des molécules.

A l'issue des extractions, des extraits d'aspects très différents ont été obtenus. Les solvants organiques purs et les mixtures de solvants organiques ont donné des extraits très colorés et clairs. L'eau a donné des extraits très sombres et surtout très turbides. Les extraits semi-organiques ont montré des profils intermédiaires. Lors de la purification, les extraits strictement aqueux ont été

responsables du bouchage de la cartouche après seulement quelques mL. **L'eau comme solvant d'extraction n'a donc pas été retenue.** Lors de l'analyse des autres types d'extraits, des aires différentes ont été mesurées et ont permis la comparaison. La mixture MeOH/Eau a été la plus efficace dans l'extraction de IFO et du CP, alors que le MeOH pur a été le plus intéressant pour la récupération de TAM. L'ACN et les mixtures dérivées ont souvent montré des efficacités les plus basses, ce qui est cohérent avec les conclusions de la littérature concernant l'extraction de produits pharmaceutiques depuis les matrices solides à l'aide de l'ACN (Nieto *et al.*, 2007 et 2009). L'application d'une extraction fractionnée en PLE, utilisant plusieurs solvants d'extraction, est possible mais chronophage et peut conduire à la récupération d'interférents en quantité importante. De plus, l'optimisation de méthode en utilisant plusieurs solvants est rendue très délicate et augmente sensiblement le nombre d'essais. **La mixture MeOH/Eau a donné une intensité de signal satisfaisante pour TAM, elle a donc été sélectionnée.**

II.3.3.3.b) Optimisation des paramètres opérationnels

De nombreux paramètres (> 10) peuvent être optimisés en PLE. D'après la littérature, seuls cinq sont régulièrement retenus comme pouvant exercer une influence notable sur la qualité de l'extraction : **la nature du solvant, la température, la pression, la durée d'un cycle d'extraction et leur nombre** (Nieto, 2010). Ils ont donc été sélectionnés. La stratégie d'optimisation en PLE se limite généralement à une démarche univariée, consistant à optimiser un paramètre en maintenant les autres constants. Cette approche possède toutefois deux inconvénients majeurs : elle nécessite beaucoup d'essais et donc de temps, et ne prend pas en compte les interactions possibles entre certains paramètres. Pour caractériser simultanément l'effet des cinq paramètres sur les rendements d'extraction, un plan d'expériences (PEX) a été appliqué. Le PEX est une méthode destinée à obtenir, en un minimum d'essais, un maximum d'informations telles que la mise en évidence d'interactions entre facteurs ou la détermination précise d'un optimum opératoire.

Le PEX appliqué dans cette étude est un plan composite centré, composé : (i) d'un plan factoriel fractionnaire incluant les cinq variables (ici nommées facteurs) sur deux niveaux (-1 et +1) (2^{5-1} expériences), (ii) de dix points « en étoile » aux niveaux $-\alpha$ et $+\alpha$, (iii) de six points au niveau 0 (centre). Le nombre d'expériences total est donc de 32. α représente la distance du point « en étoile » jusqu'au centre du domaine et a été défini à la valeur $\sqrt[4]{2^{5-1}} = 2$ pour assurer un plan isovariant par rotation. L'isovariance par rotation est une propriété qui conduit à des erreurs de prévision identiques à une même distance du centre du domaine. La représentation d'un tel plan dans l'espace est impossible pour 5 facteurs. A titre d'exemple, une représentation pour trois facteurs est donnée sur la Figure II-22. Les limites de variation des variables opératoires ont été définies d'après les études disponibles dans la littérature concernant l'extraction par PLE de produits pharmaceutiques dans les matrices solides (Zuloaga *et al.*, 2012 ; Nieto, 2010). Les bornes étaient donc : 10 – 90 % pour le ratio de solvant (MeOH/Eau), 70 – 110 °C pour la température, 70 – 130 bar pour la pression, 4 – 16 minutes pour la durée d'une extraction et 1 – 5 pour le nombre de cycles d'extraction à appliquer. La définition complète du plan est donnée dans le Tableau II-19. La boue utilisée pour l'optimisation de méthode est la boue de Brax (Tableau III-4). Pour évaluer l'efficacité de l'extraction, des culots de 0,35 g ont été dopés avec 100 μ L de MIX Standards avant la PLE. Les extraits obtenus ont par la suite été dopés avec 100 μ L de MIX Deutérés. La compensation des pertes au-delà de la PLE a donc été supposée, permettant de s'assurer que les pertes observées étaient uniquement imputables à l'extraction. Les analyses ont été effectuées par HPLC-UV/MS.

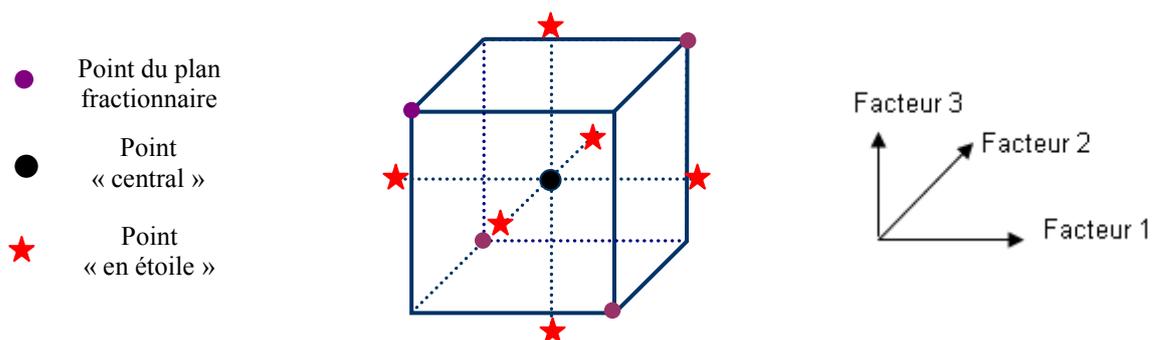


Figure II-22 : Représentation spatiale d'un plan à trois facteurs

Tableau II-19 : Définition du plan d'expériences appliqué (valeurs codées ; valeurs réelles) et rendements obtenus pour les molécules ciblées

Plan	Expérience	Facteur A MeOH/Eau (% MeOH)	Facteur B Température (°C)	Facteur C Pression (bar)	Facteur D Durée d'un cycle (min)	Facteur E Nombre de cycles (-)	Rendement (%)		
							IFO	CP	TAM
Plan factoriel fractionnaire (2^{5-1} essais)	1	-1 ; 30	-1 ; 80	-1 ; 85	-1 ; 7	1 ; 4	101	97	11
	2	1 ; 70	-1 ; 80	-1 ; 85	-1 ; 7	-1 ; 2	103	80	25
	3	-1 ; 30	1 ; 100	-1 ; 85	-1 ; 7	-1 ; 2	167	150	56
	4	1 ; 70	1 ; 100	-1 ; 85	-1 ; 7	1 ; 4	92	105	30
	5	-1 ; 30	-1 ; 80	1 ; 115	-1 ; 7	-1 ; 2	114	76	53
	6	1 ; 70	-1 ; 80	1 ; 115	-1 ; 7	1 ; 4	111	98	0
	7	-1 ; 30	1 ; 100	1 ; 115	-1 ; 7	1 ; 4	102	95	36
	8	1 ; 70	1 ; 100	1 ; 115	-1 ; 7	-1 ; 2	0	0	0
	9	-1 ; 30	-1 ; 80	-1 ; 85	1 ; 13	-1 ; 2	109	109	30
	10	1 ; 70	-1 ; 80	-1 ; 85	1 ; 13	1 ; 4	87	103	205
	11	-1 ; 30	1 ; 100	-1 ; 85	1 ; 13	1 ; 4	65	81	36
	12	1 ; 70	1 ; 100	-1 ; 85	1 ; 13	-1 ; 2	141	82	0
	13	-1 ; 30	-1 ; 80	1 ; 115	1 ; 13	1 ; 4	102	102	168
	14	1 ; 70	-1 ; 80	1 ; 115	1 ; 13	-1 ; 2	194	155	0
	15	-1 ; 30	1 ; 100	1 ; 115	1 ; 13	-1 ; 2	109	71	50
	16	1 ; 70	1 ; 100	1 ; 115	1 ; 13	1 ; 4	85	87	2
Points « en étoile »	17	-2 ; 10	0 ; 90	0 ; 100	0 ; 10	0 ; 3	97	88	8
	18	2 ; 90	0 ; 90	0 ; 100	0 ; 10	0 ; 3	4	8	5
	19	0 ; 50	-2 ; 70	0 ; 100	0 ; 10	0 ; 3	105	101	52
	20	0 ; 50	2 ; 110	0 ; 100	0 ; 10	0 ; 3	117	103	25
	21	0 ; 50	0 ; 90	-2 ; 70	0 ; 10	0 ; 3	103	92	11
	22	0 ; 50	0 ; 90	2 ; 130	0 ; 10	0 ; 3	94	77	6
	23	0 ; 50	0 ; 90	0 ; 100	-2 ; 3	0 ; 3	114	79	14
	24	0 ; 50	0 ; 90	0 ; 100	2 ; 16	0 ; 3	105	76	0
	25	0 ; 50	0 ; 90	0 ; 100	0 ; 10	-2 ; 1	101	70	30
	26	0 ; 50	0 ; 90	0 ; 100	0 ; 10	2 ; 5	117	94	0
Points « centraux »	27	0 ; 50	0 ; 90	0 ; 100	0 ; 10	0 ; 3	119	110	17
	28	0 ; 50	0 ; 90	0 ; 100	0 ; 10	0 ; 3	112	111	7
	29	0 ; 50	0 ; 90	0 ; 100	0 ; 10	0 ; 3	111	93	4
	30	0 ; 50	0 ; 90	0 ; 100	0 ; 10	0 ; 3	112	82	168
	31	0 ; 50	0 ; 90	0 ; 100	0 ; 10	0 ; 3	106	88	18
	32	0 ; 50	0 ; 90	0 ; 100	0 ; 10	0 ; 3	103	90	13

Les rendements obtenus pour chacun des analytes sont donnés dans le [Tableau II-19](#). Pour un plus grand confort de lecture, les résultats sont regroupés dans le [Tableau II-20](#) en s'inspirant des paramètres utilisés classiquement pour les représentations Box-Plot.

Tableau II-20 : Rendements du PEX regroupés suivant une stratégie inspirée du Box-Plot

Molécule	Valeur minimale	25 ^{ème} percentile	Valeur moyenne	Valeur médiane	75 ^{ème} percentile	Valeur maximale	Variabilité*
IFO	0 %	100 %	103 %	105 %	112 %	194 %	6 %
CP	0 %	80 %	94 %	91 %	102 %	300 %	13 %
TAM	0 %	6 %	34 %	16 %	36 %	205 %	nd

* calculée sur les six points au centre ; nd : non déterminée

Il apparaît que certains rendements sont supérieurs à 100 %, ce qui pourrait être attribué aux erreurs de méthode, au manque d'homogénéité de certains échantillons ([Saleh et al., 2011](#)) ou encore à une amplification anormale du signal lors de l'analyse. Pour IFO et CP, l'ensemble des valeurs sont voisines de 100 % et indiquent une extraction de bonne qualité. Pour TAM, on remarque que les valeurs sont très éloignées de 100 % et surtout très dispersées. Par ailleurs, le jeu de données brutes ([Tableau II-19](#)) révèle quelques contradictions entre certains points du domaine expérimental très proches. Ce résultat suggère que TAM est affecté par une condition opératoire non prise en compte lors de l'extraction, ou alors par un processus inconnu. **En raison de sa grande hydrophobicité, des pertes par adsorption ont été suspectées. Tout le système PLE (cellules, tuyaux...) a subi un nettoyage organique et le volume collecté a été concentré puis analysé. TAM a été mesuré à des teneurs quantifiables, confirmant ainsi le phénomène d'adsorption. Par conséquent, le protocole envisagé n'est pas adapté à l'étude de cette molécule. Les résultats pour TAM ne seront plus discutés jusqu'à la fin de ce chapitre.** Pour les autres analytes, les rendements ont pu être exploités. L'analyse du PEX est ici présentée pour IFO. Elle est disponible en annexe pour CP ([Annexe E](#)).

Les résultats ont été étudiés à l'aide du logiciel Minitab[®]. Grâce au plan défini, les coefficients d'un modèle du second ordre ont été identifiés pour décrire l'effet des différents facteurs sur le rendement d'extraction en IFO. L'équation du modèle est de la forme suivante :

$$\begin{aligned}
 Y = & a_0 + a_1 * A + a_2 * B + a_3 * C + a_4 * D + a_5 * E + \\
 & a_{12} * A * B + a_{13} * A * C + a_{14} * A * D + a_{15} * A * E + \\
 & a_{23} * B * C + a_{24} * B * D + a_{25} * B * E + \\
 & a_{34} * C * D + a_{35} * C * E + \\
 & a_{45} * D * E + \\
 & a_{11} * A^2 + a_{22} * B^2 + a_{33} * C^2 + a_{44} * D^2 + a_{55} * E^2
 \end{aligned}
 \tag{II-8}$$

Avec Y le rendement en IFO (%) ; a_0 le terme constant ; a_1, a_2, a_3, a_4 et a_5 , les coefficients de régression liés aux facteurs seuls ; $a_{12}, a_{13}, a_{14}, a_{15}, a_{23}, a_{24}, a_{25}, a_{34}, a_{35}$ et a_{45} , les coefficients de régression liés aux interactions des facteurs ; $a_{11}, a_{22}, a_{33}, a_{44}$ et a_{55} , les coefficients de régression liés aux termes quadratiques.

Comme le plan factoriel est fractionné, il est supposé que l'interaction entre les facteurs A, B, C et D peut être négligée. Par ailleurs, on considère que les effets d'un seul facteur sont confondus avec les interactions des quatre autres (*e.g.* $A * B * C * D = E$) et que les interactions entre deux facteurs sont confondues avec les interactions des trois autres (*e.g.* $A * B = C * D * E$).

La méthode de résolution ici appliquée a été la méthode des moindres carrés. Elle repose sur deux hypothèses importantes à vérifier : (i) la valeur de l'erreur aléatoire attendue est zéro et sa variance ne dépend pas du domaine expérimental étudié, (ii) il n'y a pas d'interactions entre les erreurs aléatoires sur tout le domaine étudié.

Un premier modèle a été généré avec les 32 expériences du PEX. Les valeurs des coefficients de l'équation II-8 sont données dans le [Tableau II-21](#), Pour déterminer la significativité des coefficients, un test de Student a été réalisé. Ainsi, les coefficients présentant des probabilités critiques (*i.e.* p-value) inférieures à 0,05, traduisant un effet sur le rendement significativement différent de zéro pour un niveau de confiance de 95 %, ont été mis en évidence. Par ailleurs, une étude de la variance des résultats du plan a été réalisée par un test de Fischer (test du manque d'adéquation). Elle permet de savoir si le modèle décrit fidèlement les données expérimentales. Quand la p-value de ce test est inférieure à 0,05, cela indique qu'il y a un manque d'adéquation significatif à un niveau de confiance de 95 %.

Tableau II-21 : Valeurs des coefficients du modèle et significativité statistique

Variable	Premier modèle (avec 32 expériences)		Second modèle (avec 29 expériences)	
	Valeurs	Significativité	Valeurs	Significativité
Ordonnée	108,009	-	109,988	-
A	-10,036	oui	-42,593	oui
B	-5,526	-	11,469	oui
C	-2,797	-	-6,894	-
D	3,536	-	-2,237	-
E	-6,657	-	9,208	oui
A*B	-12,141	oui	-5,028	-
A*C	-1,059	-	-32,165	oui
A*D	18,795	oui	71,28	oui
A*E	4,179	-	60,252	oui
B*C	-18,248	oui	-45,063	oui
B*D	-1,464	-	-1,953	-
B*E	2,855	-	-32,118	oui
C*D	13,987	oui	-11,617	-
C*E	9,832	-	67,255	oui
D*E	-14,653	oui	-54,711	oui
A ²	-12,587	oui	-58,265	oui
B ²	2,576	-	2,387	-
C ²	-0,714	-	-10,772	-
D ²	2,168	-	0,756	-
E ²	2,029	-	0,199	-
Qualité du modèle proposé				
R ²	85 %		99 %	
Test du manque d'adéquation	Modèle inadéquat (p = 0,001)		Modèle adéquat (p = 0,21)	

Pour ce premier modèle, peu de coefficients ont montré une influence significative. Par ailleurs, le test du manque d'adéquation a clairement démontré que ce modèle ne décrivait pas correctement nos données et ne pouvait donc pas être utilisé. Cela indique qu'une ou plusieurs expériences du plan ont pu introduire un biais important dans la détermination des coefficients. Pour les identifier, une étude des résidus a été effectuée et est donnée sur l'[Annexe D](#). Le raisonnement sur des résidus « studentisés » a été préféré car ils mettent davantage en évidence les expériences douteuses. Des résidus studentisés hors du domaine $[-2 ; +2]$ ont souvent pour origine une valeur incohérente. Par ailleurs, pour valider ces valeurs incohérentes, il est utile de calculer la distance de Cook. Ce paramètre évalue la modification qu'induirait l'élimination de l'expérience testée sur l'estimation des coefficients du modèle. Une distance de Cook supérieure à 1 est synonyme d'une influence « anormale » de l'expérience. En combinant ces deux paramètres, il est apparu que trois expériences du PEX (expériences 2, 7 et 14) influençaient trop fortement les résultats. Il a donc été décidé d'éliminer ces expériences, ramenant le nombre total à 29, et de faire une nouvelle analyse du plan et des coefficients. Les valeurs et significativité des coefficients du second modèle sont données sur le [Tableau II-21](#).

Pour ce modèle, davantage de coefficients ont une significativité statistique élevée par rapport au premier. De plus, l'analyse de la variance a donné une corrélation nettement plus élevée entre les valeurs expérimentales et prédites ($r^2 = 99 \%$) et validée par le test de Fischer ($p\text{-value} > 0,05$). L'étude des résidus pour ce second modèle n'a pas révélé de valeur « anormale », ce qui amène à penser que l'adéquation du modèle est totale. Pour le confirmer et vérifier par la même occasion l'adéquation des deux hypothèses faites lors de l'application de la méthode des moindres carrés, une analyse poussée des résidus a été effectuée. En représentant les résidus en fonction des valeurs prédites par le modèle ([Figure II-23 \(a\)](#)), on remarque qu'ils sont équitablement répartis autour de l'axe des abscisses, avec une erreur en moyenne nulle. Ce résultat indique que la variance est indépendante du rendement en IFO. La ligne en pointillée de la [Figure II-23 \(b\)](#) représente l'allure théorique d'une répartition obéissant à une loi normale. On remarque que les résidus suivent cette droite : les variations observées pour les résidus sont donc dues à un phénomène aléatoire. Tous ces arguments permettent de penser que le modèle est satisfaisant pour représenter les variations d'IFO sur le domaine étudié.

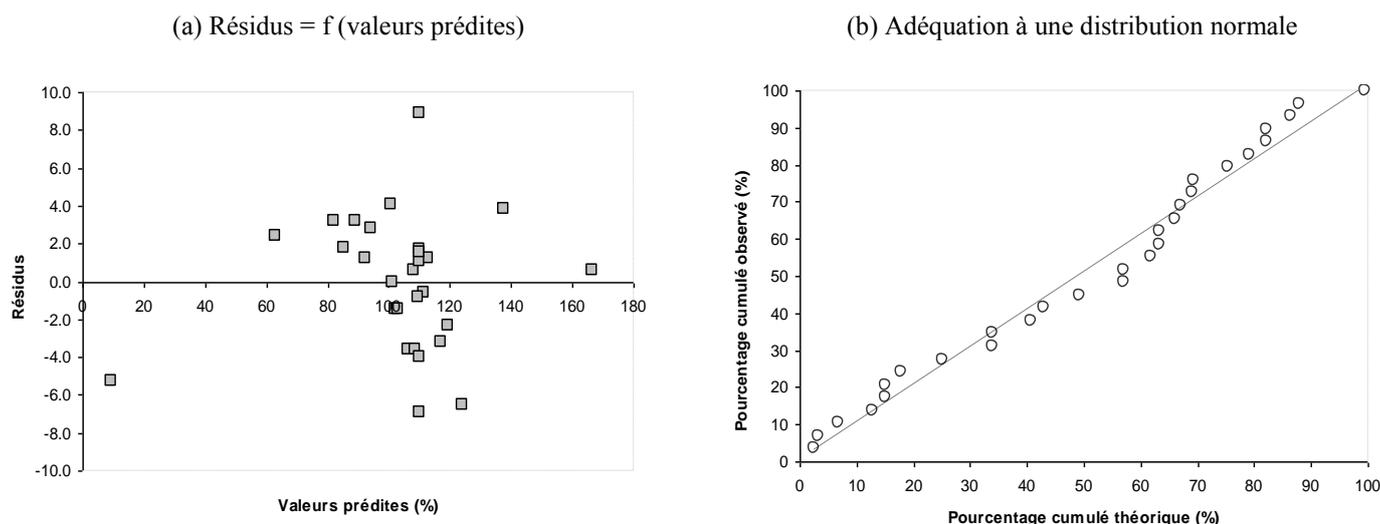


Figure II-23 : Représentation graphique des résidus obtenus pour le second modèle

Pour le modèle sélectionné, un nombre important de coefficients ont été significatifs. Pour identifier les plus influents, un diagramme de Pareto normalisé a été construit et est donné sur la [Figure II-24](#). La ligne verticale est la limite de significativité.

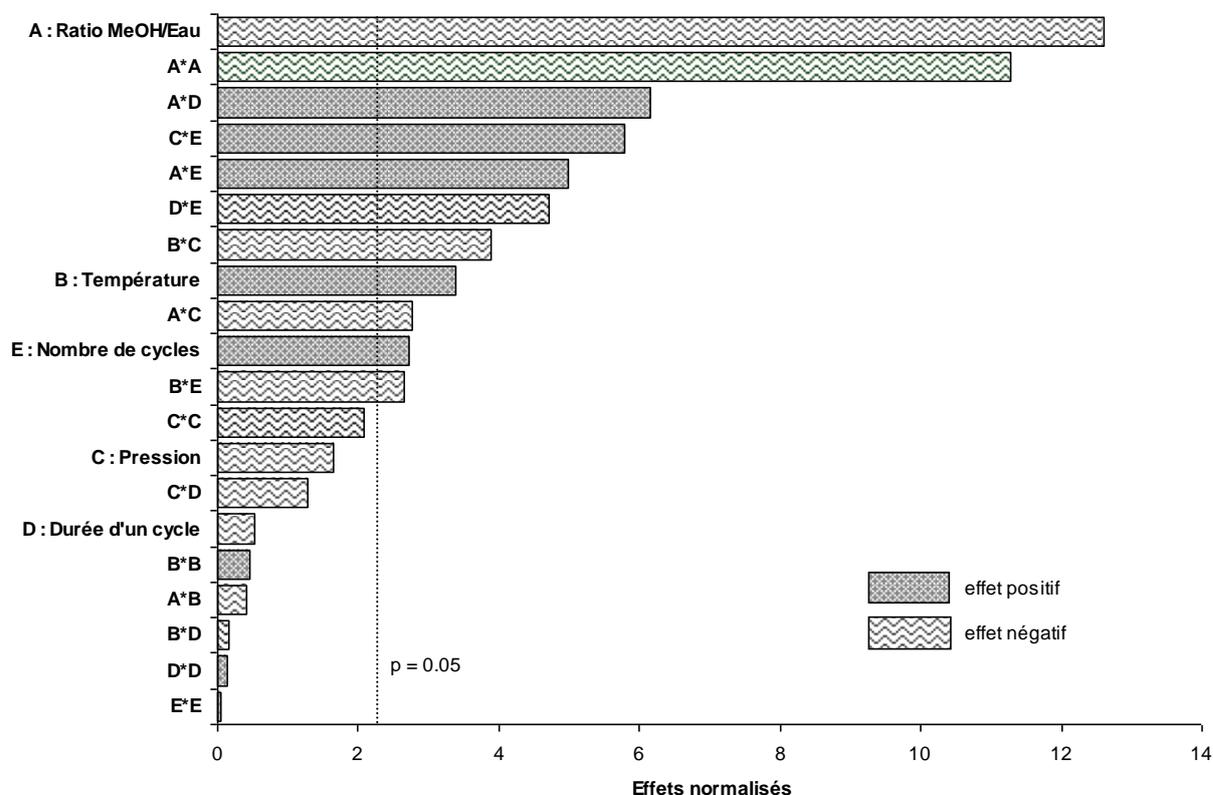


Figure II-24 : Diagramme de Pareto représentant les facteurs les plus influents lors de l'extraction d'IFO dans la boue de Brax

Le facteur A, représentant le ratio MeOH/Eau, est probablement le facteur le plus influent. Son effet normalisé est très significatif et par ailleurs négatif. Toutefois, ce facteur intervient également dans de nombreuses interactions elles aussi significatives (*e.g* A*D, A*E, A*C) et parfois de sens contraire. Il est donc difficile d'évaluer clairement l'influence de ce facteur, même si un effet plutôt négatif semble être distingué. Les facteurs B (la température) et E (nombre de cycles) ont aussi une influence significative sur l'extraction mais dans une moindre mesure. La pression (facteur C) et la durée d'un cycle (facteur D) ont présenté des effets moins significatifs. Depuis cette représentation, il apparaît que certaines interactions entre facteurs, telles que A*D ou C*E par exemple, ont un effet notable sur la qualité de l'extraction. Cela indique que les variations de rendement en IFO n'étaient pas strictement attribuables à un facteur unique mais pouvaient être le résultat d'effets de synergie entre deux facteurs. Un tel résultat n'aurait pas pu être identifié avec une stratégie d'optimisation de proche en proche. Ainsi, l'utilisation d'un PEX était particulièrement pertinente pour révéler le potentiel des différents facteurs influençant la PLE. Par ailleurs, le diagramme de Pareto normalisé pour CP a dans l'ensemble confirmé ces tendances ([Annexe E](#)).

Les conditions « optimales » recherchées sont les valeurs des facteurs permettant d'observer un rendement de 100 ± 5 %. La solution n'étant pas unique, ces valeurs optimales ont été choisies à partir du tracé des surfaces de réponse. Celles-ci permettent d'observer les variations de rendement d'extraction en fonction des valeurs des facteurs. Pour limiter le domaine de recherche de l'optimum et afin de mieux visualiser les surfaces de réponse, des considérations expérimentales ont été prises en compte.

Tout d'abord, la pression n'a pas montré d'influence significative. Cette conclusion a également été rapportée par de nombreux auteurs (Baugros *et al.*, 2009 ; Nieto *et al.*, 2009 ; Saleh *et al.*, 2011). Son rôle est de maintenir le solvant à l'état liquide lors de l'application de températures élevées. **Une pression (facteur C) faible était donc suffisante. Elle a ici été fixée pour une valeur codée de -1 soit 85 bar.** La durée d'un cycle et leur nombre ont été déterminés de façon concomitante. Des cycles d'extraction longs peuvent conduire à une meilleure diffusion des analytes mais des cycles d'extraction courts répétés peuvent être favorables aux rendements d'extraction (Dionex, 2008). En effet, l'introduction d'un nouveau volume de solvant « frais » entre chaque extraction permet la création de nouveaux équilibres dynamiques entre les analytes et le solvant, favorisant la récupération des composés les plus emprisonnés dans la matrice. Par conséquent, **l'étude de l'influence de ces facteurs a été orientée sur la partie basse du domaine expérimental (entre -2 et 0) pour la durée d'un cycle (facteur D), et sur la partie haute (entre 0 et +2) pour le nombre d'extractions (facteur E).** La Figure II-25 représente les surfaces de réponse obtenues pour IFO. Elle montre les variations des facteurs les plus influents (A et B) sur l'ensemble du domaine pour 3 valeurs particulières des facteurs D et E, le facteur C étant fixé à -1. La même représentation est disponible pour CP en annexe (Annexe E). Parmi les zones « optimales » possibles, des zones correspondant à **des températures (facteur B) relativement élevées (proche de 1)** ont été préférées. En effet, l'application de températures élevées permet de réduire la viscosité des solvants, favorisant ainsi leur pénétration en profondeur dans la matrice et augmentant la capacité à solubiliser les molécules d'intérêt (Jelic *et al.*, 2009). Des vitesses d'extraction plus rapides sont également attendues (Dionex, 2008). L'application de températures élevées peut toutefois conduire à l'extraction d'interférents en grande quantité, rendant la méthode d'extraction moins sélective (Jelic *et al.*, 2009). Il apparaît ainsi sur les surfaces de réponse, que **le facteur A (Ratio MeOH/Eau) doit être choisi dans le milieu haut du domaine expérimental (entre 0 et +2)**. Cela est en accord avec le fait que des extraits avec un contenu purement ou fortement aqueux ne sont pas à privilégier en raison d'un possible bouchage des cartouches SPE lors de la purification. Par ailleurs, il est reconnu que les solvants les plus polaires sont souvent ceux qui entraînent le moins de sélectivité dans l'extraction (Dionex, 2008).

Ces considérations ont permis de localiser une zone d'intérêt (Figure II-25). En confrontant ces résultats avec ceux obtenus pour CP, la combinaison suivante a été retenue comme « optimale » : **A (Ratio de solvant MeOH/Eau) = 0,78 (soit 65,6 %), B (Température) = 1 (soit 100 °C), C (Pression) = -1 (soit 85 bar), D (durée d'un cycle) = - 0,38 (soit 8,8 min) et E (nombre de cycles) = 1 (soit 4)**. Les facteurs A et D ont été respectivement arrondis à 65 % et 9 min pour pouvoir être appliqués comme consignes. Il est important de rappeler que les valeurs ici sélectionnées ont été influencées par d'autres paramètres fixés avant l'optimisation tels que la masse d'échantillon à extraire, la nature de l'agent dispersant ou le ratio « masse d'échantillon/masse d'agent dispersant » par exemple. D'autres conclusions pourraient être attendues en étudiant l'influence de ces paramètres.

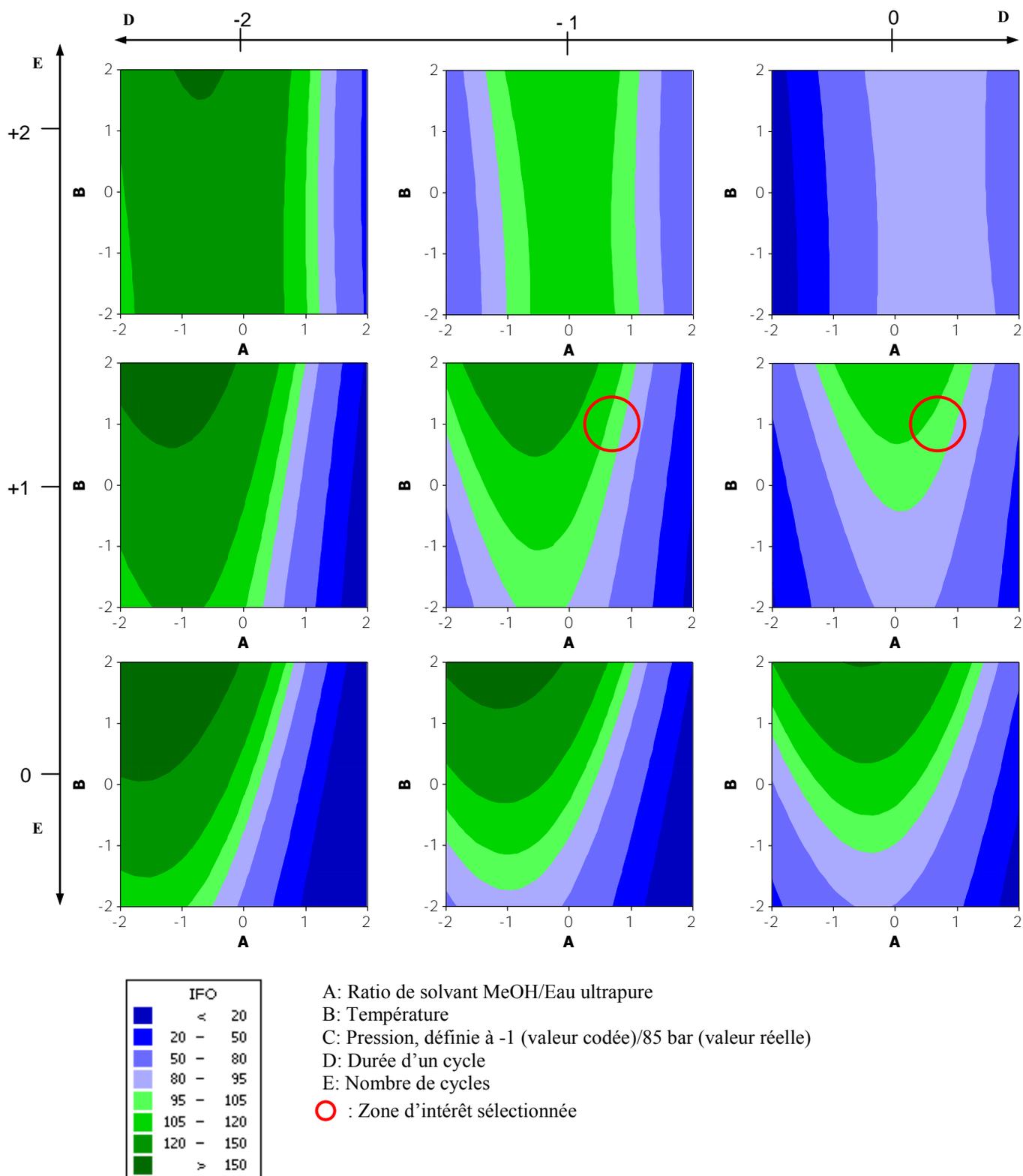


Figure II-25 : Représentation de l'effet du ratio de solvant, de la température, de la durée et du nombre de cycles d'extraction sur le rendement de récupération d'IFO

II.3.3.3.c) Validation de l'optimum et caractérisation de l'extraction

Les conditions « optimales » ont été testées par la réalisation de cinq répétitions de la procédure d'extraction sur la boue de Brax (Tableau III-4). Les extraits ont dû être analysés par UHPLC-MS/MS. Pour CP, les répétitions ont donné un rendement de 85 ± 4 % et pour IFO un rendement de 85 ± 5 %. Ces deux rendements sont identiques, répétables, et permettent de confirmer que les conditions opératoires trouvées pour IFO étaient effectivement satisfaisantes pour l'extraction du CP. Toutefois, ces valeurs sont quelque peu éloignées des valeurs théoriques attendues (95 – 105 %). Deux justifications sont possibles. L'application des conditions optimales exactes n'a pu être permise par l'équipement pour les facteurs A et D : il a pu en résulter un léger décalage du rendement attendu. L'explication la plus recevable repose sur la dualité entre l'optimisation via les analyses HPLC-UV/MS et la validation via l'UHPLC-MS/MS. La qualité d'intégration en MS étant moins bonne qu'en MS/MS, les rendements obtenus lors de l'optimisation ont pu être légèrement surestimés et introduire un biais. Nous avons toutefois considéré que cet éventuel biais était le même entre tous les rendements et permet de conserver les tendances. **Ainsi, les rendements à l'optimum ont été décidés comme satisfaisants, en réponse à l'objectif d'une extraction quantitative.**

Une expérience a été réalisée pour étudier le profil de l'extraction au fil des cycles. Sur un même culot dopé, cinq extractions successives ont été appliquées et les fractions obtenues à l'issue de chaque extraction ont été purifiées puis analysées. La Figure II-26 décrit ce profil.

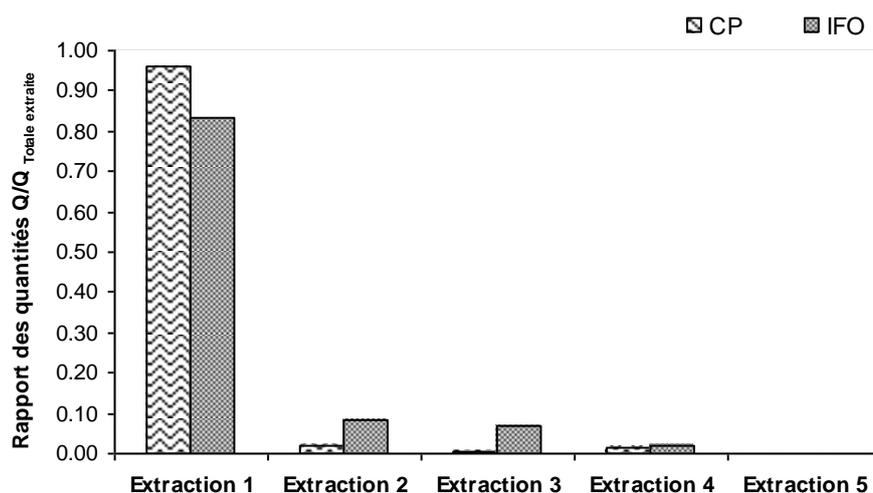


Figure II-26 : Profil de l'extraction du CP et d'IFO pour la boue de Brax

Il apparaît que la quasi-totalité des analytes est extraite dans la 1^{ère} fraction. Pour réaliser une extraction vraiment complète, quatre cycles étaient effectivement nécessaires.

II.3.3.4) Performances de la méthode et validation

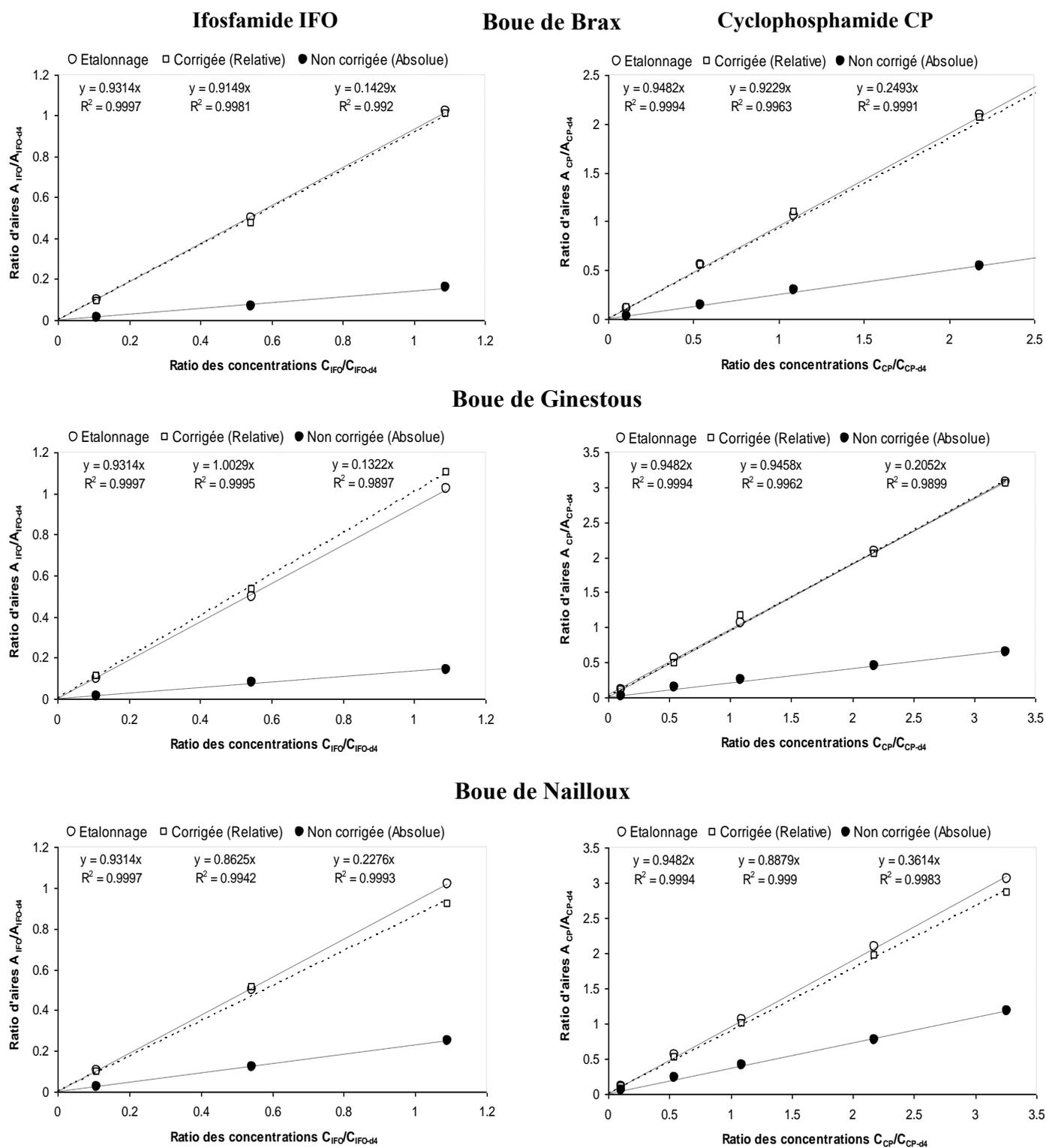
Les critères de validation ont largement été inspirés de ceux décrits pour la phase aqueuse. Ainsi, les MEff absolues et relatives ont été déterminées sur un ou plusieurs niveaux de concentration et accompagnées des mesures de répétabilité, reproductibilité, de LOD et de LOQ. Il n'existe pas de matériau certifié pour évaluer ces paramètres. Des culots de 0,35 g_{MS} de boues lyophilisées ont donc été utilisés et dopés. Sept boues de nature différente ont servi de matrices candidates à la validation et sont détaillées dans le Tableau III-4. La validation a été effectuée sur l'UHPLC-MS/MS. Les résultats de cette étude sont fournis dans le Tableau II-22 et sur la Figure II-27.

Tableau II-22 : Résultats des performances et de validation de la méthode en phase solide

Ifosfamide IFO ⁽ⁱ⁾								
Paramètre Répétition Calcul	MEff (%) ± σ n = 4 ; 1 niveau		MEff (%) n = 1 ; 3 niveaux		Répéta. (%) n = 4 ; 1 niveau	Repro. (%) n = 3 ; 1 niveau	LOD (µg/kg _{MS})	LOQ (µg/kg _{MS})
	Eq. (II-1)		Eq. (II-2)		Eq. (II-3)	Eq. (II-3)	Eq. (II-7)	Eq. (II-7)
Boue	Absolue	Relative	Absolue	Relative	Sur quantités corrigées			
Narbonne	29 ± 0	104 ± 3	-	-	3	-	4	10
Brax	16 ± 1	99 ± 7	15	98	7	7	7	18
Ginestous	14 ± 2	110 ± 13	15	108	12	14	8	20
Nailloux	29 ± 2	104 ± 10	28	95	10	9	4	10
LGC_BAME	33 ± 3	106 ± 4	-	-	4	-	3	9
LGC_BAMI	20 ± 1	104 ± 3	-	-	3	-	6	15
Muret	1,5 ± 0,2	106 ± 4	-	-	4	-	74	186

Cyclophosphamide CP ⁽ⁱⁱ⁾								
Paramètre Répétition Calcul	MEff (%) ± σ n = 4 ; 1 niveau		MEff (%) n = 1 ; 4 niveaux		Répéta. (%) n = 4 ; 1 niveau	Repro. (%) n = 3 ; 1 niveau	LOD (µg/kg _{MS})	LOQ (µg/kg _{MS})
	Eq. (II-1)		Eq. (II-2)		Eq. (II-3)	Eq. (II-3)	Eq. (II-7)	Eq. (II-7)
Boue	Absolue	Relative	Absolue	Relative	Sur quantités corrigées			
Narbonne	38 ± 5	99 ± 11	-	-	11	-	3	8
Brax	27 ± 1	100 ± 3	26	97	3	2	4	10
Ginestous	24 ± 3	105 ± 12	22	100	11	13	5	12
Nailloux	40 ± 1	97 ± 6	38	94	6	3	3	7
LGC_BAME	47 ± 2	96 ± 4	-	-	4	-	2	6
LGC_BAMI	35 ± 1	98 ± 1	-	-	1	-	3	8
Muret	2,2 ± 0,3	92 ± 5	-	-	6	-	51	128

MEff : efficacité de la méthode entière ; σ : écart-type ; Répéta. : répétabilité ; Repro. : reproductibilité ; LOD : limite de détection de la méthode entière
 LOQ : limite de quantification de la méthode entière ; MS : matière sèche
 Equivalents deutérés : (i) IFO-d₄ ; (ii) CP-d₄



Les pentes et coefficients de corrélation correspondants sont fournis sous chacun des items

Figure II-27 : Estimation de la linéarité de la méthode en phase solide pour trois types de boues sur plusieurs niveaux de concentration

II.3.3.4.a) Efficacité de la méthode entière pour différentes boues

Les MEff absolues pour un niveau de concentration présentent des différences très importantes en fonction de la molécule et surtout de la boue. Ces résultats caractérisent ainsi la pertinence d'une évaluation et validation de méthode sur plusieurs échantillons et non sur un échantillon unique comme cela est classiquement réalisé. Les valeurs sont comprises entre 1,5 et 33 % pour IFO et entre 2,2 et 47 % pour CP. Il apparaît que l'efficacité de la méthode est limitée (< 50 %). Cette limitation est cependant dépassée par la très bonne sensibilité de la détection en MS/MS. La très faible efficacité de la MEff absolue pour la boue de Muret modère l'aspect quantitatif de la méthode. La boue étant partiellement digérée, il est possible que ses caractéristiques physico-chimiques soient nettement plus complexes que celles des autres boues. Par conséquent, l'environnement de la boue de Muret a pu induire des difficultés notables lors de l'extraction et/ou de la purification. Un EM très important peut aussi être une explication recevable. Par ailleurs, une corrélation a tenté d'être établie entre les MEff absolues, le pH des boues, leurs MVS, et le procédé de traitement biologique. Aucun lien n'a pu être déduit. Une idée reçue « dit » que les boues avec un contenu organique très important sont celles qui donnent les rendements de méthode les plus faibles. L'absence de corrélation suggère ici que l'organicité de la boue, traduite par les MVS, n'est pas un paramètre suffisant pour définir l'efficacité d'une méthode analytique. Ce constat est d'autant plus vrai pour la boue de Muret qui a présenté l'organicité la plus faible pour une efficacité de méthode très faible.

Peu importe la nature de la boue, les MEff relatives sont toutes voisines de 100 %, démontrant l'adéquation totale des composés deutérés pour de tels objectifs analytiques. L'utilisation de ces étalons a permis d'obtenir une méthode très répétable, avec une variabilité maximum de 12 % pour IFO et 11 % pour CP sur la boue de Ginestous. La reproductibilité est également très bonne et inférieure à 14 %, caractérisant par la même occasion la robustesse de la méthode. De plus, l'utilisation d'un seul étalon correctif le long de la procédure permet d'obtenir des résultats plus précis que les méthodes qui utilisent au minimum deux étalons de correction, un pour l'extraction et l'autre pour l'analyse (Jelic *et al.*, 2009 ; Radjenovic *et al.*, 2009).

Une nouvelle comparaison entre les MEff sur un et plusieurs niveaux de concentration a été effectuée pour trois boues (Narbonne, Ginestous et Nailloux). Les niveaux de dopage appliqués dans les boues étaient d'environ 50, 280, 570 et 1100 $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{MS}}$. Les graphes correspondants sont donnés sur la [Figure II-27](#). Les différentes courbes tracées mettent à nouveau en évidence la parfaite compensation des pertes par les deutérés et la proportionnalité entre les pertes et les niveaux de concentration. On peut en déduire que la méthode analytique présente une très bonne spécificité dans l'analyse d'IFO et CP. La détermination des MEff pour un ou plusieurs niveaux de concentration n'a pas donné de différence significative ([Tableau II-22](#)). L'approche sur un seul niveau était donc suffisante et ce, pour tous les types de boues. Elles ont donc été conservées pour calculer les LOD et les LOQ.

II.3.3.4.b) Limites de détection et quantification

A l'exception de la boue de Muret, les LOD et LOQ calculées sont respectivement inférieures à 10 et 20 $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{MS}}$ pour les deux analytes et caractérisent une méthode sensible. A l'heure actuelle, il s'agit de la méthode analytique la plus sensible parmi celles identifiées dans la littérature, la méthode de [Ternes *et al.* \(2005a\)](#) donnant jusqu'ici les meilleures limites avec une LOQ de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{MS}}$. Ce résultat est d'autant plus intéressant puisque la méthode implique l'utilisation d'une quantité d'échantillon très faible par extraction, et d'une masse d'adsorbant faible et peu commune pour la purification.

En conclusion de cette étude, on retiendra que la méthode analytique est validée et qu'elle est une des plus sensibles et polyvalentes dans l'analyse d'IFO et CP contenus dans les boues. Assurer la détection et la quantification précise du TAM dans les boues nécessite des considérations expérimentales dépassant le cadre de cette thèse.

II.3.3.5) Autour de la méthode...

II.3.3.5.a) La méthode est-elle adéquate pour les échantillons environnementaux ?

La méthode proposée a été rigoureusement validée pour des échantillons dopés. Or, il est important de se poser des questions quant à la représentativité de cette procédure vis-à-vis d'échantillons environnementaux non dopés. En effet, en raison d'une limitation de la diffusion et des cinétiques de sorption, les analytes fraîchement injectés seront toujours moins retenus que des analytes initialement présents dans la matrice (Burford *et al.*, 1993), et même si le temps de contact entre les analytes dopés et la matrice est long (de quelques heures à plusieurs jours). Il peut en résulter des efficacités de méthode surestimées pour les échantillons dopés par rapport aux efficacités pour les échantillons non dopés (Saleh *et al.*, 2011). Pour vérifier l'adéquation de la méthode, une expérience a été menée en tirant profit de la boue générée par le pilote de BAME décrit dans le chapitre IV. Le procédé a été continuellement contaminé par une mixture de composés anticancéreux pendant une période d'environ 80 jours. Cette procédure permet de contaminer davantage le cœur de la boue (volume) plus que la surface. La boue a été échantillonnée aux jours 10, 30 et 60 de la campagne d'essai, correspondant respectivement à 0,5, 1,5 et 3 fois l'âge de boue. Chaque échantillon a subi la procédure de prétraitement et a été équitablement séparé en deux. Un des deux échantillons a reçu un dopage supplémentaire de 10 µL de MIX Standards avant l'extraction. La quantité mesurée dans l'extrait dopé a été corrigée en y soustrayant la quantité du dopage pour évaluer le niveau de contamination initialement présent. Cette quantité a été comparée à l'échantillon non dopé. Aucune différence significative n'a été constatée pour IFO (écart relatif < 4 %), ni pour CP (écart relatif < 3 %). Ainsi, la méthode proposée n'est pas seulement spécifique des échantillons dopés et peut s'appliquer à des échantillons environnementaux non dopés plus ou moins « âgés ». Cela peut être attribué aux nombreux cycles appliqués lors de l'extraction PLE, permettant l'épuisement de la matrice depuis des compartiments facilement accessibles (analytes dopés) vers des compartiments d'accessibilité moindre (analytes non dopés). Par ailleurs, on peut penser que les interactions de sorption « analytes/matrice » sur des échantillons fraîchement dopés et non dopés sont comparables.

II.3.3.5.b) Quelle étape analytique est la plus limitante ?

La validation de procédure a mis en évidence une limitation certaine de l'efficacité de la méthode. Comme la nature des boues peut grandement influencer la qualité d'une procédure, l'objectif ici développé était de savoir si la limitation était induite par une étape analytique précise ou plusieurs. Pour ce faire, deux boues de composition organique différente ont été sélectionnées : la boue de Ginestous pour son contenu fortement organique (MVS : 91 %) et la boue de Nailloux pour son contenu organique plus relatif (MVS : 75 %). La boue de Muret n'a pas été utilisée en raison des difficultés analytiques précédentes. La méthodologie de dopage est inspirée d'une procédure originale proposée par Gabet-Giraud *et al.* (2010). Différents échantillons de boue lyophilisée ont donc été dopés (n = 3) à des étapes analytiques distinctes : (i) avant la lyophilisation, (ii) avant l'extraction, (iii) avant la purification Oasis MAX, (iv) avant la purification Oasis MCX et (v) avant l'analyse. Les profils obtenus sont présentés sur la Figure II-28. La comparaison des rendements de proche en proche permet d'obtenir des indications sur l'efficacité des différentes étapes et est donnée sur l'Annexe F.

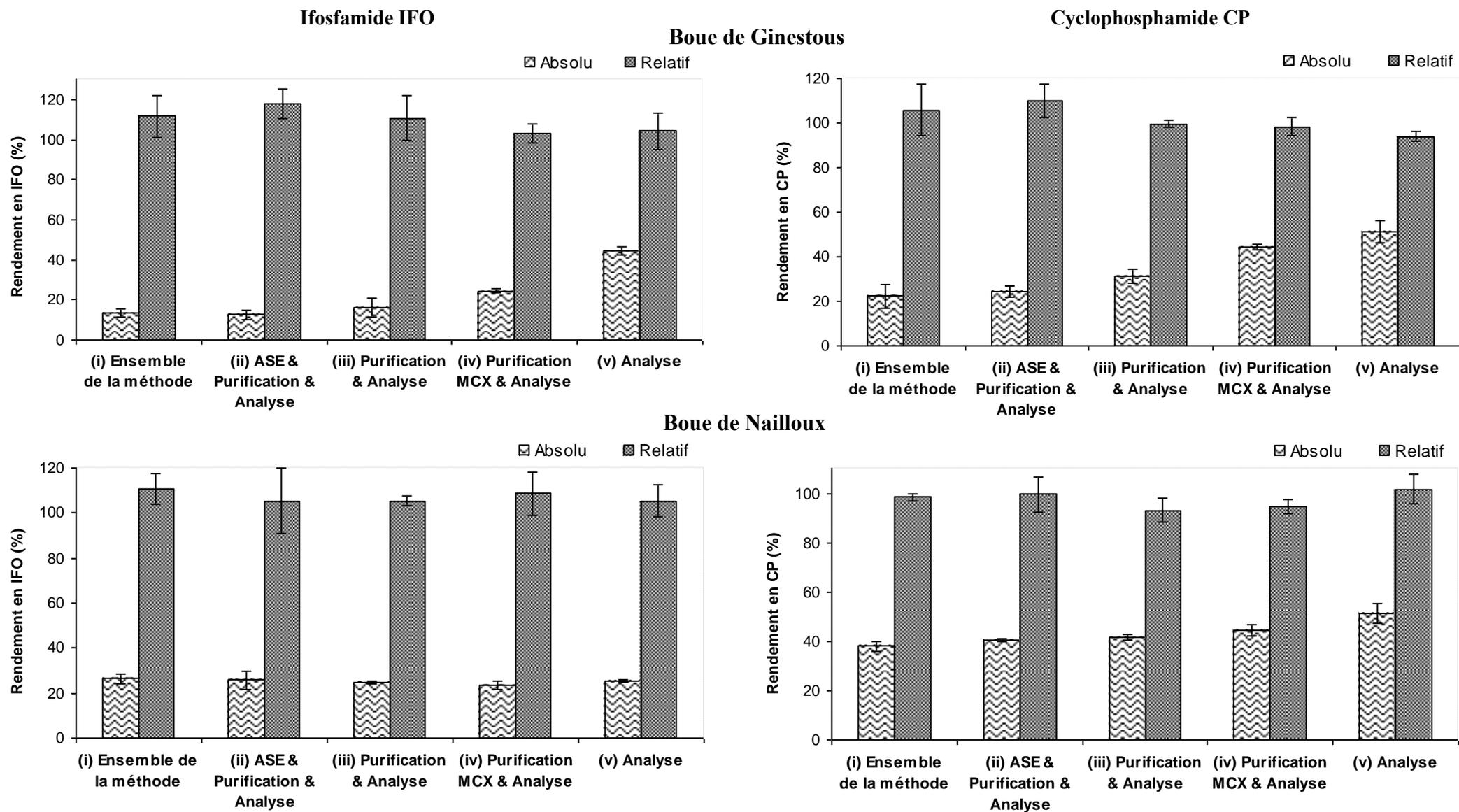


Figure II-28 : Evaluation de l'efficacité des différentes étapes de la procédure pour deux boues différentes

Les rendements relatifs ont systématiquement donné des valeurs proches de 100 % : ils ne seront plus discutés. Pour l'ensemble des analytes, on remarque que les rendements absolus liés à l'étape d'analyse (v) sont comparables ou légèrement supérieurs au rendement de la méthode entière (i). On peut donc en déduire que l'analyse d'IFO et CP est affectée par un EM important. L'utilisation de solvants semi-organiques lors de l'extraction est souvent responsable de la récupération d'interférents en quantité non négligeable (Nieto, 2010 ; Zuloaga *et al.*, 2012) et pourrait expliquer ce résultat.

La comparaison entre les étapes (i) et (ii) renseigne l'effet du prétraitement. Le prétraitement prend en compte la lyophilisation et le broyage. Leur effet est habituellement négligé dans le développement de méthode, bien que la lyophilisation puisse entraîner d'une part les composés les plus volatils, et que le broyage puisse créer d'autre part des échauffements locaux de l'échantillon et donc des pertes possibles. Pour les deux boues étudiées, il n'y a pas eu de pertes significatives. **Par conséquent, l'utilisation de culots de boues lyophilisés puis dopés pour la validation de méthode était une procédure suffisante.** La comparaison des étapes (ii) et (iii) a permis de montrer que l'extraction PLE donnait des rendements satisfaisants, compris entre 80 et 105 % (Annexe F). La polyvalence de la méthode d'extraction est démontrée. L'efficacité de la purification, obtenue par comparaison des étapes (iii) et (v), est davantage discutable. En effet, la qualité de la purification pour la boue de Nailloux est excellente alors que celle de la boue de Ginestous connaît des limitations plus fortes. La nature des constituants de la boue, potentiels compétiteurs, pourrait en être la cause. Il est également intéressant de noter que les phases d'évaporation entre certaines étapes n'ont pas induit de pertes.

Ainsi et à travers l'EM, l'analyse était l'étape la plus limitante dans la quantification d'IFO et CP et l'était probablement pour tous les types de boues étudiés. Ceci est d'autant plus vrai que IFO et CP ont été entièrement récupérés sur les étapes préalables pour la boue de Nailloux. CP subit un EM de 49 % pour les deux boues. IFO subit respectivement un EM de 55 et 75 % pour les boues de Ginestous et Nailloux. De plus, il apparaît une nouvelle fois que l'organocité de la boue n'était pas suffisante pour expliquer l'EM. Bien que la mesure de MVS soit rapide et facile, il semble qu'une caractérisation plus fine serait plus pertinente dans la compréhension des origines de l'EM.

II.3.3.6) Application de la méthode aux échantillons environnementaux

La procédure analytique optimisée a été appliquée aux échantillons solides utilisés pour la validation. Deux échantillons par boue ont été extraits. Les analyses ont été effectuées sur l'UHPLC-MS/MS. Les résultats sont consignés dans le [Tableau II-23](#).

Tableau II-23 : Niveaux de concentration mesurés dans les échantillons solides non dopés

Boue	IFO	CP
	C ($\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{MS}}$)	C ($\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{MS}}$)
Narbonne	11 \pm 2	< LOQ
Brax	< LOD	< LOD
Ginestous	41 \pm 23	13 \pm 5
Nailloux	43 \pm 15	< LOQ
BAME Pilote	< LOQ	< LOD
BAMI Pilote	< LOQ	< LOQ
Muret	< LOQ	< LOQ

MS : matière sèche ; LOD : limite de détection ; LOQ : limite de quantification
Les concentrations sont renseignées sous la forme moyenne \pm écart-type (n = 2)

A l'exception de la boue de Brax, un seul ou deux des analytes recherchés ont été détectés dans les boues étudiées. La présence de médicaments anticancéreux dans les boues est donc avérée. De nos résultats, il apparaît que IFO a été détecté plus souvent que CP et quantifié dans des concentrations plus élevées. Ainsi, des concentrations comprises entre 11 et 43 $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{MS}}$ ont été mesurées pour IFO contre une concentration unique de 13 $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{MS}}$ pour CP. Les raisons ne sont pas clairement identifiées. Par ailleurs, les résultats présentent une grande variabilité. Ceci peut être dû à des échantillons d'homogénéité variable. Vu la proximité entre les niveaux mesurés et les LOQ de méthode, une difficulté à une quantification précise pourrait aussi l'expliquer.

Les boues traitant quotidiennement des volumes d'eaux usées importants (Narbonne et Ginestous) apparaissent contaminées. On pourrait donc penser que la contamination est davantage liée aux flux traités plutôt qu'à la nature physico-chimique de la boue. La quantification d'IFO dans la boue de Nailloux est explicable. La boue de Nailloux a un âge voisin de 100 jours. La biodégradation d'IFO n'est pas attendue, comme il a été déjà démontré dans des essais en laboratoire (Halling-Sorensen *et al.*, 1998 ; Buerge *et al.*, 2006). Ainsi, une accumulation dans la boue sur du long terme a pu être possible, pourvu qu'il y ait eu sorption.

Dans l'ensemble, les niveaux de contamination mesurés sont très bas. Ce constat est cohérent avec les concentrations supposées par de nombreux auteurs (Kummerer *et al.*, 1997 ; Ternes *et al.*, 2005b). Il pourrait être expliqué par la consommation très relative de ces produits et/ou une faible aptitude à la sorption compte-tenu du caractère polaire de ces molécules. Toutefois, il est important de rappeler que des niveaux de contamination très bas n'ont pas nécessairement la signification d'un potentiel de toxicité bas pour les micro-organismes et dans le milieu récepteur.

II.4) Conclusion du chapitre

Une méthode d'analyse de six produits anticancéreux et dérivés (IFO, CP, TAM, 5-FU, NOR, PHO) contenus dans la matrice complexe boue a ici été développée. Les moutardes NOR et PHO n'ont pu être correctement séparées dans les conditions chromatographiques appliquées et ont été abandonnées. L'extraction d'IFO, CP, TAM et 5-FU depuis la phase aqueuse a été réalisée par une combinaison de cartouches SPE Oasis permettant la récupération sélective d'espèces acides, neutres et basiques à partir d'un échantillon unique et de faible volume. Un effet matrice trop important n'a toutefois pas permis la quantification du 5-FU. L'extraction du CP et de IFO depuis la matrice solide a été réalisée par PLE et optimisée au moyen d'une approche multivariée, révélant par ailleurs l'influence notable sur l'extraction des synergies entre paramètres opératoires. Une forte sorption du TAM sur le matériel analytique a aussi été observée et n'autorise pas son dosage avec rigueur. Enfin, la phase d'analyse a permis de démontrer le grand potentiel de l'UHPLC-MS/MS, aussi bien au niveau de la séparation que de la détection. Ces méthodes ont toutes été rigoureusement détaillées et validées, permettant ainsi d'assurer leur adéquation aux différents objectifs de ce travail de thèse.

Ce travail a fait l'objet de deux publications. Le travail sur la phase aqueuse intitulé « Development and validation of a method for the trace determination of 4 anticancer drugs in sludge aqueous phase using mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography – mass spectrometry » a été soumis à International Journal of Environmental Analytical Chemistry. Le travail sur la phase solide intitulé « Optimization of pressurized liquid extraction using a multivariate chemometric approach for the determination of anticancer in sludge by ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry » a été accepté dans Journal of Chromatography A.

Le travail présenté peut encore être amélioré. Des suggestions méthodologiques seront proposées dans le chapitre Conclusion et Perspectives en fin de manuscrit.

Chapitre III.

Caractérisation de la sorption de molécules anticancéreuses dans les boues biologiques : vers une possible prédiction ?

Le chapitre précédent a décrit une méthode analytique fiable et assez sensible pour permettre la détection de molécules anticancéreuses dans des boues et ce, indépendamment de leur nature. L'objectif principal de ce chapitre est de caractériser finement le phénomène de sorption de molécules anticancéreuses sur des boues, afin de voir s'il est possible d'établir un modèle prédictif ou plus modestement, de le corrélérer avec certaines caractéristiques du système triple « boue – micropolluant – conditions opératoires ».

Ce troisième chapitre s'articule autour de trois parties mères. La première partie est un état de l'art à propos de la compréhension et l'évaluation du phénomène de sorption dans les boues. Il y est notamment décrit deux représentations de la boue, dont l'une est peu répandue dans la littérature. La seconde partie détaille les expériences menées avec précaution ainsi que les matériels et méthodes associés. La troisième partie décrit les résultats générés par les différents essais, que ce soit en termes de calage de méthodes, d'évaluation de paramètres de sorption ou de caractérisation de systèmes complexes. La pertinence des approches est régulièrement discutée.



III.1) Revue bibliographique

III.1.1) Généralités et structuration de la partie

La sorption, classiquement citée sous le terme d'adsorption, est un phénomène universel dans lequel les molécules d'un liquide ou d'un gaz (soluté) vont être transférées à une phase solide (adsorbant). C'est un processus bien connu depuis l'Antiquité, où les propriétés adsorbantes des argiles étaient utilisées pour dessaler l'eau par exemple. Il a toutefois fallu attendre les années 1900 pour qu'émergent des concepts mathématiques permettant de décrire et interpréter les observations, agissant comme de véritables tremplins dans l'étude du phénomène (Rouquerol *et al.*, 1998). Aujourd'hui, les travaux sont nombreux et touchent des disciplines variées : traitement de l'air vicié sur colonne à garnissage, traitement d'effluents sur charbon actif, devenir de polluants dans les sédiments ou les sols... Malgré tout, il existe encore de nombreux supports pour lesquels le phénomène est peu étudié : la boue d'épuration en est un excellent candidat.

La prise de conscience du pouvoir de « captage » de polluants par les boues lors du traitement des eaux usées est récente. Les études de sorption dans les boues sont donc parmi les plus parcellaires dans le paysage scientifique. De plus, l'intérêt relatif porté aux molécules anticancéreuses accentue ici cet état. Or, le besoin de données est devenu nécessaire pour caractériser le phénomène et à terme, le prédire voire le maîtriser. La synthèse proposée identifie les démarches possibles en lien avec cette ambition. Il y est notamment décrit, pour les micropolluants organiques, comment le phénomène peut être perçu dans la matrice boue (activée), les méthodes développées pour le caractériser, et ce qui peut l'influencer. Les connaissances sur l'adsorption de produits pharmaceutiques sont ici favorisées. Certaines informations s'appuient parfois sur des considérations pour l'adsorption de polluants sur des sols et des sédiments, pour lesquels les connaissances scientifiques sont davantage répandues et possiblement applicables aux boues.

III.1.2) Caractéristiques de la matrice étudiée

Comprendre les interactions de sorption avec la boue nécessite en premier lieu de connaître la composition de la matrice en présence. D'après la représentation du fonctionnement d'une STEP donnée dans le chapitre I (partie I.2.2), trois types de boues peuvent être générées. La boue primaire est constituée de la fraction la plus décantable des matières particulaires des eaux usées, sans traitement biologique, et possède donc un contenu organique important. La boue secondaire est majoritairement constituée de biomasse et de matières réfractaires à la biodégradation aérobie. Son degré de minéralisation dépend notamment de son temps de séjour dans le bassin de traitement. Les boues mixtes caractérisent un mélange des deux précédentes et possèdent donc un profil physico-chimique intermédiaire. Toutes ces boues ont une forte teneur en eau, voisine de 95 % du poids total.

Comme toutes les matrices biologiques, la boue contient une quantité très importante de microorganismes, dont les principaux représentant sont les bactéries (10^{12} à $10^{13}/g_{\text{boue}}$), les champignons, les protozoaires et les métazoaires. Pourtant, cette part ne représente qu'une fraction de 5 à 20 % de la matière totale, le reste étant constitué de matières organiques et minérales principalement extracellulaires (Nielsen *et al.*, 2004). Cet amas de cellules et de matières est responsable d'une structuration complexe et hétérogène appelée floc.

Un floc de boue est caractérisé par plusieurs niveaux d'organisation : une microstructure résultant de la biofloculation par les microorganismes (microfloc), et d'une macrostructure où les microorganismes filamenteux créent un réseau tridimensionnel (macrofloc), support sur lesquels les petits flocs peuvent adhérer, formant ainsi des flocs plus gros et relativement solides (Laurent, 2009). Les bactéries filamenteuses contribuent donc à l'ossature des flocs, mais ce sont

essentiellement les interactions entre microorganismes, matières minérales (cations divalents...) et exopolymères qui conditionnent la structure (Figure III-1).

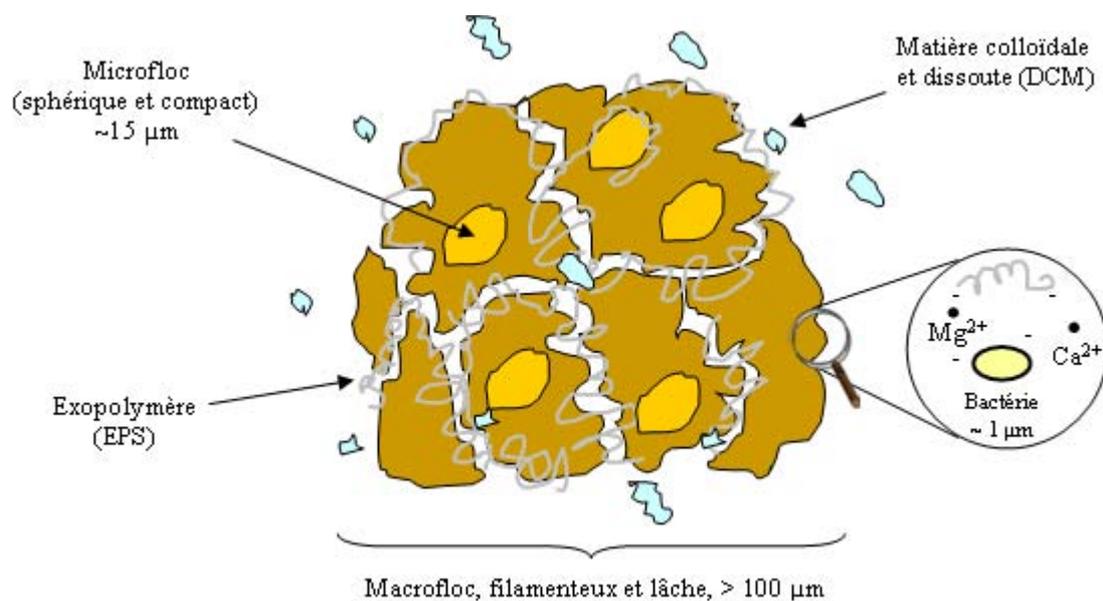


Figure III-1 : Représentation d'un floccule de boue (activée) et de sa structuration

Les exopolymères (EPS) rassemblent plusieurs familles biochimiques de molécules organiques telles que les polysaccharides (*i.e.* sucres) et les protéines en quantité assez importante, puis des substances humiques, des acides uroniques, nucléiques et des phospholipides en quantité plus modeste (Frolund *et al.*, 1996). Les EPS peuvent être produits lors de l'activité microbienne ou libérés par lyse cellulaire. Ils peuvent également être apportés par les eaux usées. La présence de molécules à caractère acide confère aux EPS une charge globalement négative aux pH des eaux usées. Ainsi, des interactions ioniques électrostatiques sont créées avec les espèces cationiques (Ca^{2+} , Mg^{2+} ...), permettant de favoriser l'agrégation et la stabilisation de la matrice (Sobeck et Higgins, 2002). Par ailleurs, d'autres types d'interactions sont possibles telles que des interactions polysaccharides-protéines (Higgins et Novak, 1997), des interactions hydrophobes et stériques (Jorand *et al.*, 1995) ou encore l'enchevêtrement de polymères (Wilen *et al.*, 2000).

Ces floccules constituent la phase particulaire de la boue, également appelée matière en suspension. La matière « non particulaire » peut faire partie de deux autres compartiments structurels : le compartiment colloïdal ou le compartiment soluble (Barret, 2009). Les matières colloïdales sont des solides finement divisés, caractérisés par une surface spécifique importante et une charge électrostatique généralement négative (Lead et Wilkinson, 2006). Leur constitution est très hétérogène, partagée entre une fraction inorganique principalement à base d'oxydes de fer et une fraction organique majoritairement composée de substances humiques et d'EPS (Cea Barcia, 2012). Les colloïdes sont un état intermédiaire entre phase particulaire et phase dissoute (Figure III-1).

La distinction entre ces compartiments est sujette à discussion. Le critère généralement retenu dans la distinction « particulaire/non particulaire » est la taille, en référence aux diamètres de pores des filtres et membranes utilisés pour la séparation (Barret, 2009). Déjà abordé dans le chapitre précédent, le seuil limitrophe varie très fortement suivant les auteurs. La taille de 1,2 μm est la plus souvent retenue, probablement parce qu'elle est préconisée par la norme NF EN 872 pour la détermination des matières en suspension contenues dans les eaux usées. Ainsi, toute matière inférieure à 1,2 μm sera ici considérée comme entité de la matière colloïdale et dissoute (DCM). La frontière entre espèces colloïdales et dissoutes est également obscure. Une

valeur de 1 nm (soit ~ 1 kDa) est toutefois donnée dans la littérature pour les boues (Degrémont, 1989) et les sédiments (Maskaoui et Zhou, 2010 ; Yang *et al.*, 2011), et peut donc être retenue.

III.1.3) Sorption dans les boues : définitions et grandeurs caractéristiques

La sorption dans les boues, parfois appelée biosorption, est un processus au cours duquel des molécules vont se répartir entre une phase aqueuse et une phase particulaire, évoluant vers un **équilibre** dynamique. La sorption fait ici référence à deux phénomènes : l'adsorption et l'absorption. L'adsorption serait décrite comme des interactions électrostatiques entre la surface négative des bactéries ou des EPS, et les charges positives portées par certaines molécules (Schwarzenbach *et al.*, 2003). Elle pourrait être considérée comme un mécanisme de surface. L'absorption décrirait des interactions hydrophobes des groupements aliphatiques et aromatiques des molécules, avec la membrane cellulaire lipidique des bactéries (Ternes *et al.*, 2004). Elle pourrait être considérée comme un mécanisme plutôt volumique, impliquant probablement une pénétration dans la matrice. Ces deux définitions sont toutefois incertaines. De plus et à l'échelle des procédés d'épuration des eaux, ces deux mécanismes sont très difficiles à distinguer. A l'heure actuelle, aucune étude n'est parvenue à quantifier la part respective de chacun de ces processus. **Ainsi, le terme général de sorption sera ici employé pour désigner à la fois adsorption et absorption et ce, dans le reste du manuscrit.**

La boue a très longuement été décrite comme un système diphasique, comprenant une phase aqueuse et une phase particulaire. Les études de sorption de produits pharmaceutiques, ou plus largement de polluants traces, ont donc suivi ce principe (Gobel *et al.*, 2005 ; Maurer *et al.*, 2007 ; Carballa *et al.*, 2008) et demeure une vision très courante (Horsing *et al.*, 2011 ; Stevens-Garmon *et al.*, 2011 ; Hyland *et al.*, 2012). L'aptitude d'un polluant à se sorber sur un support est ici caractérisée par un coefficient de distribution appelé K_{Distrib} , défini comme le rapport des concentrations d'équilibre d'une espèce dissoute, partagée entre une phase particulaire ($C_{\text{solide}}^{\text{équilibre}}$) et une phase aqueuse ($C_{\text{aqueuse}}^{\text{équilibre}}$). Le principe et l'équation traduisant ce phénomène sont donnés sur la Figure III-2. Des auteurs comme Ternes *et al.* (2004) et Zhao *et al.* (2008) estiment que la sorption de micropolluants en STEP peut rigoureusement être évaluée par K_{Distrib} . Clara *et al.* (2004), Joss *et al.* (2005) et Ternes *et al.* (2005a) proposent respectivement des valeurs de K_{Distrib} de 100, 300 et 500 L/kg_{part} en-dessous desquelles la sorption peut être négligée. L'étendue des seuils précédemment cités suggère toutefois une réelle difficulté à appréhender clairement le mécanisme et ses limites.

Un pas supplémentaire a récemment été franchi dans la compréhension du mécanisme de sorption. En effet, Barret *et al.* (2010) ont démontré que des molécules hydrophobes (HAP) interagissaient très fortement avec la DCM des boues. Des études antérieures sur la boue (Holbrook *et al.*, 2004 ; Katsoyiannis et Samara, 2007) avaient fortement suggéré l'effet de cette « troisième phase » (« third-phase effect ») sur la distribution de micropolluants dans les différents compartiments. Ainsi, la matrice boue ne devrait pas seulement être décrite comme un système diphasique dans les équilibres de sorption. Un micropolluant pourra donc se retrouver libre, lié à la DCM ou lié à la matière particulaire. Deux équilibres sont alors à considérer (Figure III-2) : un équilibre K_{part} entre la concentration du polluant sur le solide ($C_{\text{solide}}^{\text{équilibre}}$) et celle du polluant à l'état libre ($C_{\text{libre}}^{\text{équilibre}}$), et un équilibre K_{DCM} entre la concentration sur la DCM ($C_{\text{DCM}}^{\text{équilibre}}$) et celle du polluant à l'état libre ($C_{\text{libre}}^{\text{équilibre}}$). Par ailleurs, Barret (2009) a démontré qu'un équilibre « polluant sorbé à la DCM, elle-même sorbée à la matière particulaire » n'était pas envisageable : la représentation triphasique paraît donc suffisante. Il est intéressant de noter qu'aucune étude ne s'est attachée à explorer le potentiel de piégeage de produits pharmaceutiques par la DCM des boues.

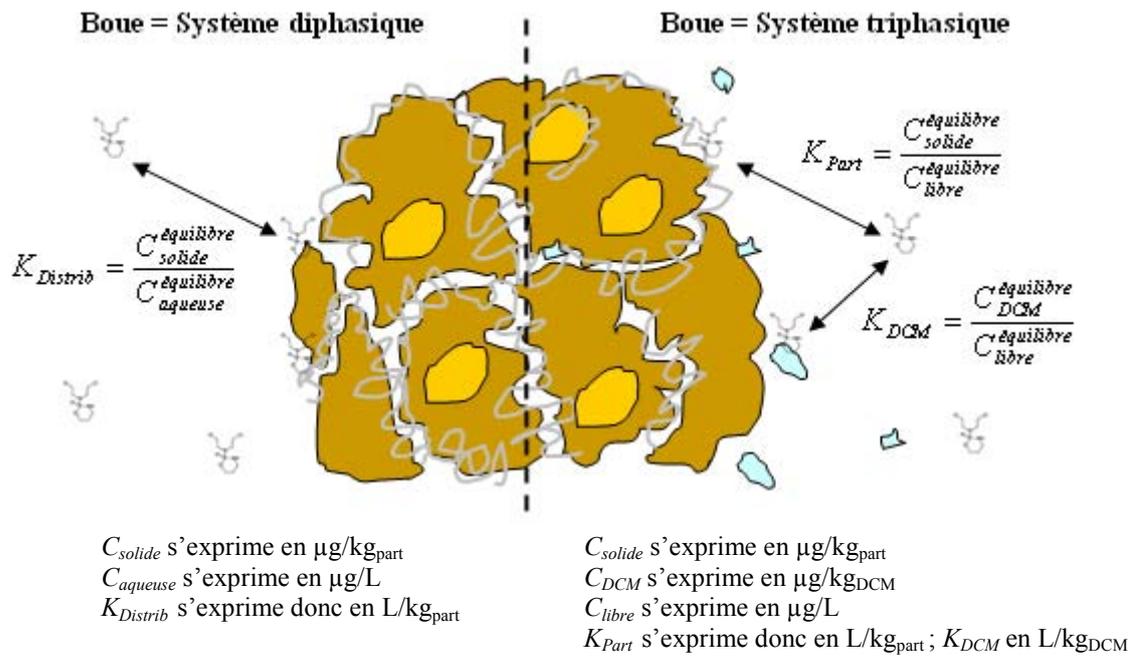


Figure III-2 : Représentation des interactions de sorption possibles dans la boue (activée) suivant une vision diphasique ou triphasique du système étudié

La suite de la bibliographie sera construite sur une présentation croisée des considérations autour de la sorption de micropolluants, d'après une vision de la boue en deux ou trois compartiments. Sauf précision, les informations développées dans les prochains paragraphes seront considérées valables pour les deux types de représentation.

III.1.4) Cinétique et thermodynamique de la sorption

III.1.4.1) Cinétiques de sorption sur les boues

Outre les définitions données dans la Figure III-2, les coefficients de distribution sont également le résultat d'un équilibre entre les vitesses de sorption et son pendant, la désorption. L'équilibre est atteint lorsque le rapport des vitesses de sorption et de désorption est constant, donné par la relation (Pomiès *et al.*, 2013) :

$$K_{Distrib} = \frac{k_{sorption}}{k_{désorption}} \cdot MES \quad \text{Eq. (III-1)}$$

où $k_{sorption}$ est la constante cinétique de sorption (en $\text{L}/(\text{kg}_{part} \cdot \text{j})$), $k_{désorption}$ est la constante cinétique de désorption (en $\text{kg}_{part}/(\text{L} \cdot \text{j})$) et MES la concentration en matières en suspension (en $\text{kg}_{part}/\text{L}$).

La démarche pour caractériser les cinétiques retrace l'évolution de la concentration en polluants sorbés dans le temps. Bien que cela paraisse manquer de rigueur, le suivi se base sur une mesure des concentrations en phase aqueuse, permettant de déduire les concentrations sorbées par bilan matière. Pour décrire les données, il existe de nombreux modèles cinétiques, comptant notamment les modèles de diffusion intra-particulaire ou d'Elovich (Elovich et Larinov, 1962) pour les plus élaborés. Les plus simples considèrent des modèles cinétiques du pseudo ordre zéro, du pseudo-premier ordre (Lagergren, 1898) et du pseudo-second ordre (Ho et McKay, 1999). Le terme pseudo est employé pour caractériser qu'un des réactants est présent en large excès par rapport aux autres constituants, qu'on peut considérer sa concentration comme constante au fil de la réaction et « s'en

affranchir ». Dans les essais de sorption de micropolluants sur les boues, on ne considère que l'ordre de la réaction par rapport à la concentration du micropolluant. **Les modèles du pseudo-premier et pseudo-second ordre sont souvent utilisés dans les études de sorption et sont de plus adéquats (Tableau III-1).**

Tableau III-1 : Description des modèles du pseudo-premier et second ordre

Modèle du pseudo-premier ordre
$\frac{dC_{solide}^t}{dt} = k_1 \cdot (C_{solide}^{équilibre} - C_{solide}^t)$
Intégration entre 0 et t
$\ln(C_{solide}^{équilibre} - C_{solide}^t) = \ln(C_{solide}^{équilibre} - C_{solide}^0) - k_1 \cdot t$
Modèle du pseudo-second ordre
$\frac{dC_{solide}^t}{dt} = k_2 \cdot (C_{solide}^{équilibre} - C_{solide}^t)^2$
Intégration entre 0 et t
$\frac{1}{(C_{solide}^{équilibre} - C_{solide}^t)} = \frac{1}{(C_{solide}^{équilibre} - C_{solide}^0)} + k_2 \cdot t$

où k_1 représente la constante de cinétique de pseudo-premier ordre (en j^{-1}), k_2 représente la constante de cinétique de pseudo-second ordre (en $kg_{part}/(\mu g \cdot j)$), C_{solide}^0 et C_{solide}^t représentent les concentrations au temps initial t_0 et en fonction du temps (en $\mu g/kg_{part}$). [Al Mardini \(2008\)](#) précise que les constantes de cinétique sont généralement déterminées pour un avancement de la réaction ne dépassant pas 80 à 90 % de l'équilibre.

Les données de cinétiques de sorption dans les boues sont rares. Certains auteurs considèrent que la sorption de micropolluants est un phénomène instantané, pour lequel une constante de cinétique n'a pas lieu d'être calculée. La plupart estime que le phénomène est très rapide, notamment par comparaison avec celui de biodégradation. En effet, les temps d'équilibre renseignés dans la littérature font souvent état d'équilibres de sorption atteints en quelques minutes ([Ternes et al., 2004](#) ; [Ren et al., 2007](#)) voire quelques heures ([Zhao et al., 2008](#)), alors que les études de biodégradation nécessitent classiquement plusieurs jours ([Joss et al., 2006](#)). Bien que le phénomène de sorption paraisse effectivement rapide, les temps d'équilibre relevés ne sont pas équivalents. Ces différences dépendent de la nature physico-chimique de la matrice et du polluant, ainsi que des conditions opératoires appliquées. [During et al. \(2002\)](#) ont ainsi démontré que la vitesse d'agitation avait une influence sur les cinétiques de sorption dans les sols, une vitesse importante permettant d'atteindre l'équilibre plus rapidement. La comparaison des temps d'équilibre est donc peu évidente.

A partir de données présentes dans la littérature, [Pomiès et al. \(2013\)](#) ont pu caractériser quelques constantes cinétiques pour les produits pharmaceutiques ([Urase et Kikuta, 2005](#)), le nonylphénol (NP) et les HAP sur les boues ([Dionisi et al., 2006](#)). Partant de la base du modèle cinétique de pseudo-premier ordre, les constantes de sorption de l'ibuprofène ont été estimées entre 3 et 62 $L/(g_{part} \cdot j)$, celles du kétoprofène entre 3 et 600 $L/(g_{part} \cdot j)$. La constante de sorption du NP a été estimée à 16 $L/(g_{part} \cdot j)$, celles du naphtalène et du pyrène à 80 et 462 $L/(g_{part} \cdot j)$. Ces quelques données semblent indiquer une grande variabilité pour une molécule donnée (équilibres de sorption atteints plus ou moins rapidement), de même qu'un lien peu évident entre constantes cinétiques et caractéristiques physico-chimiques des molécules. Cette tendance est difficilement généralisable,

peu de substances ayant été évaluées dans la littérature. Des données supplémentaires sont donc nécessaires pour qualifier et quantifier ces vitesses pour d'autres polluants et types de boue. Cette remarque est également valable pour les vitesses de désorption, souvent considérées plus lentes (Pomiès *et al.*, 2013). La sorption à la DCM est quant à elle considérée comme un mécanisme instantané, sans constante de vitesse finie (Vinken *et al.*, 2004).

III.1.4.2) Description des interactions de sorption

Afin de comprendre les interactions de sorption avec la boue, plusieurs auteurs basent leur réflexion sur des considérations thermodynamiques (Wang *et al.*, 2006 ; Ren *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2008 ; Ifelebuegu *et al.*, 2010 ; Feng *et al.*, 2010). La thermodynamique a pour but de mettre en évidence des relations qui permettent de caractériser les « échanges d'énergie » mis en jeu dans chaque processus qui provoque une modification de la matière. Comme toute réaction thermodynamiquement possible, les interactions de sorption suivent l'équation :

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \cdot \Delta S^{\circ} \quad \text{Eq. (III-2)}$$

où ΔG° est l'énergie libre de Gibbs (kJ/mol), ΔH° est la variation d'enthalpie (kJ/mol), T la température (°K) et ΔS° est la variation d'entropie (J/(mol.K)).

Les variations d'enthalpie sont très utilisées pour caractériser la nature de la sorption. En effet, suivant l'énergie mise en jeu, on peut distinguer les processus physiques (physisorption) et les processus chimiques (chimisorption). Selon Weber et Di Giano (1996), la physisorption est associée à des variations enthalpiques de l'ordre de 5 à 20 kJ/mol. Elle met en jeu des liaisons faibles (Hulscher et Cornelissen, 1996) et réversibles (Xu *et al.*, 2008). La sorption sur la DCM est considérée comme réversible (Vinken *et al.*, 2004) et pourrait donc être de nature physique. Les types de forces engagées peuvent être non spécifiques (*e.g* forces de Van der Waals) ou spécifiques (*e.g* ponts hydrogène, forces polaires, forces de Coulomb électrostatiques : échanges d'ions, pontages ioniques etc.). La chimisorption est associée à des variations enthalpiques de l'ordre de 100 à 400 kJ/mol (Weber et Di Giano, 1996) : elle met donc en jeu des liaisons bien plus importantes. Xu *et al.* (2008) considèrent que la chimisorption est un processus irréversible ou très peu réversible. Elle caractérise des liaisons covalentes (échange d'électrons). Ces liaisons peuvent entraîner des modifications profondes de la répartition des charges des molécules. Elles peuvent parfois être mises en évidence par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (Choi et Yun, 2006).

D'après Xu *et al.* (2008), la physisorption est limitée par la diffusion alors que la chimisorption est typiquement limitée par la vitesse de réaction. En effet, Nollet *et al.* (2003) précisent que les processus de chimisorption nécessitent des énergies d'activation élevées (40 à 800 kJ/mol), qui caractérisent des cinétiques lentes. A l'inverse, l'énergie d'activation de la physisorption est faible (0 à 40 kJ/mol) et peut donc se faire très rapidement. La physisorption peut parfois servir de précurseur à la chimisorption. De plus, Annamalai et Puri (2002) ajoutent que les paramètres thermodynamiques associés au processus de sorption, et par extension à la physi- et à la chimisorption, ne dépendent pas des concentrations appliqués.

Dans la littérature, les approches thermodynamiques les plus répandues pour les micropolluants traitent de la sorption de la molécule EE2 sur des boues. Ren *et al.* (2007), Xu *et al.* (2008) et Ifelebuegu *et al.* (2010) ont observé que sa sorption sur des boues activées était spontanée ($\Delta G^{\circ} < 0$), exothermique ($\Delta H^{\circ} < 0$) et de type physisorption. Le même comportement a été observé sur des boues de bioréacteurs à membranes (Xu *et al.*, 2008). La nature des forces n'a cependant pas pu être déterminée.

III.1.5) Méthodologie de détermination de la sorption dans les boues

III.1.5.1) Conditionnement des échantillons de boue

L'activité biologique des boues induit une difficulté supplémentaire dans les essais de sorption. En effet, sans action « extérieure », des processus de biodégradation peuvent avoir lieu. Pour estimer le seul phénomène de sorption, les stratégies identifiées dans la littérature sont multiples et seront ici classées en trois catégories : (i) inhibition de la biodégradation par voie chimique, (ii) inhibition de la biodégradation par des méthodes non chimiques et (iii) prise en compte de la biodégradation.

L'inhibition voire l'élimination de l'activité biologique par voie chimique est probablement la technique la plus utilisée. Elle a notamment été appliquée par (Ren *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2008 ; Maurer *et al.*, 2007 ; Wick *et al.*, 2009 ; Horsing *et al.*, 2011) dans l'estimation de la sorption de produits pharmaceutiques. L'adjuvant le plus connu est l'azide de sodium (NaN_3), mais d'autres produits tels que l'allylthourée (ATU) ou les poisons de type HgCl_2 et BaCl_2 ont déjà été employés. Toutefois, l'impact de ces adjuvants soulève quelques interrogations quant à l'effet sur la boue et sur la sorption. L'ATU est un inhibiteur sélectif de l'activité de nitrification autotrophe des boues : il ne permet donc pas de s'affranchir de l'activité hétérotrophe. Les poisons peuvent, en cas de dissociation, devenir des compétiteurs de sorption. Clouzot (2009) a démontré que l'utilisation de NaN_3 conduisait à une défloculation des boues activées, mais ne modifiait pas les équilibres de sorption d'EE2 entre une boue acclimatée et non acclimatée au polluant, même si cela ne permet pas d'affirmer l'absence d'effet par rapport à une boue non traitée. Parallèlement, (Stevens-Garmon *et al.*, 2011 ; Wick *et al.*, 2011 ; Yang *et al.*, 2011) ont démontré que cet adjuvant influençait nettement la sorption des molécules, notamment celles chargées positivement. L'effet de ce type de traitement n'est donc pas clairement établi et surtout, n'impacterait pas de manière équivalente les comportements de sorption. Par ailleurs, Xu *et al.* (2008) a démontré qu'une concentration en NaN_3 supérieure à 0,2 g/L entraînait une augmentation de la teneur en sucres de la phase aqueuse, à la suite d'une lyse cellulaire. Une modification de la DCM est donc possible.

Les méthodes d'inactivation sans adjuvant chimique sont très diverses et leur adéquation souvent peu justifiée. Wang *et al.* (1999) ont proposé de rincer abondamment la boue avec de l'eau distillée de manière à pouvoir remplacer la phase aqueuse. L'effet de l'eau distillée, de pH légèrement acide et de minéralisation quasi existante, n'est pas renseigné. Zhao *et al.* (2008) ont proposé de stériliser la boue par autoclavage. Cette technique entraîne l'éclatement des cellules bactériennes et la libération de leur contenu dans le milieu interstitiel, modifiant probablement les propriétés de surface et la nature de la DCM. La déshydratation des boues est régulièrement proposée comme méthode d'inactivation, que ce soit par étuvage (Ren *et al.*, 2007) ou par lyophilisation (Kerr *et al.*, 2000, Horsing *et al.*, 2011). Il arrive parfois que les boues séchées soient broyées avant essai (Gonzalez-Guzman, 2008) ou resuspendues dans des solutions salines synthétiques (Andersen *et al.*, 2005 ; Horsing *et al.*, 2011) dont on ne peut exclure un effet sur la sorption et/ou sur les cinétiques. Des méthodes plus douces d'épuisement de substrat par injection continue d'oxygène pendant 12 heures (Zhao *et al.*, 2008) ou de remplacement de l'oxygène par un nuage d'argon (Ternes *et al.*, 2004) ont été appliquées. Le comportement des bactéries en réponse à l'injection prolongée d'oxygène ou de gaz étranger n'est pas maîtrisé. Par ailleurs, l'influence de la présence ou non d'oxygène sur les équilibres de sorption n'est pas connue.

La dernière stratégie a été appliquée par Urase et Kikuta (2005) et Xue *et al.* (2010). Ces auteurs ont jugé que la sorption était suffisamment rapide devant la biodégradation pour permettre une caractérisation satisfaisante du phénomène, sans intervention sur la matrice. Cet argument est probablement valable pour les composés à sorption rapide et/ou biodégradation lente, mais reste questionnable pour les composés à sorption lente et/ou biodégradation rapide. Des considérations sur les cinétiques propres à chacun des processus permettraient certainement

d'éclairer cette hypothèse. Par ailleurs, il manque des précisions notables sur ce que l'on appelle une cinétique rapide et une cinétique lente. L'appréciation « cinétique rapide/cinétique lente » paraît subjective et mériterait peut-être de considérer un rapport entre les différentes cinétiques pour plus d'objectivité et d'applicabilité à tout type de polluant.

Aucun consensus ne semble se dégager parmi les différentes stratégies énoncées. Même si les méthodes d'inactivation par voie chimique présentent des inconvénients reconnus, il n'est pas évident d'en proposer une plus intéressante que les autres. Certaines ont également un pouvoir d'inactivation limitée dans le temps. Ainsi, il arrive parfois que des auteurs appliquent plusieurs méthodes d'inactivation dans un même essai (Horsing *et al.*, 2011), probablement en raison d'une difficulté à apprécier l'efficacité des unes par rapport aux autres. Les méthodes sans inactivation semblent les plus recevables dans l'objectif d'une estimation rigoureuse de la sorption. Ces méthodes requièrent cependant certaines validations ou à défaut, la proposition d'autres stratégies.

III.1.5.2) Réalisation des essais et exploitation des données

III.1.5.2.a) Définition des conditions et stratégies opératoires

Dans les essais de sorption sur les boues, la concentration de travail de la matrice a récemment été discutée dans la littérature. Horsing *et al.* (2011) ont étudié l'influence de la quantité de boue (1 g/L, 10 g/L, 50 g/L) sur les équilibres de sorption de 75 produits pharmaceutiques. Ils ont comparé les valeurs de $K_{Distrib}$ pour une seule concentration en micropolluants (10 µg/L) et ont observé une différence moyenne peu significative (< 4 %). La condition de 1 g/L a été retenue, d'une part parce qu'elle représente 5 à 10 fois la production réelle de boue dans une STEP (justification des auteurs), et d'autre part parce que cela amène à un résultat standardisé sur une même quantité de matière (explication personnelle). Aussi, l'hypothèse sous-jacente pourrait être que seule la boue fraîchement générée en STEP est disponible pour la sorption, contrairement à la boue « vieillie » qui elle est déjà en équilibre. L'hypothèse peut être discutée. Par ailleurs et pour des raisons analytiques, le travail avec des boues très diluées est probablement intéressant pour les polluants à forte capacité de sorption, mais peu pertinent pour les boues à faible capacité de sorption, une telle condition favorisant leur distribution uniquement dans la fraction aqueuse.

Une fois la boue conditionnée et sa quantité définie, les essais de sorption sont réalisés par dopage des molécules étudiées à différentes concentrations, de manière à acquérir la réponse de sorption sur une plage généralement représentative des concentrations environnementales. **Les expériences sont menées dans des conditions de pression, de température, d'agitation, de pH, de force ionique contrôlées.** Au bout de plusieurs minutes voire plusieurs heures, la distribution est **estimée**. En effet, la quasi intégralité des mesures de distribution est réalisée sur la phase aqueuse, et la concentration en phase solide est **estimée** par bilan matière. Très peu d'auteurs ont vérifié la solidité de cette approche en dosant à la fois les quantités en phase aqueuse et solide (Wick *et al.*, 2011 ; Hyland *et al.*, 2012). Ces études ont parfois mis en évidence une grande variabilité entre les quantités mesurées et estimées sur la phase solide, entraînant un biais important dans la détermination des coefficients de distribution. De plus, doser la phase solide permet (i) de confirmer que les molécules à faible capacité de sorption « estimée » sont effectivement sorbées, (ii) d'augmenter la précision sur $K_{Distrib}$ pour les molécules à forte capacité de sorption, pour lesquelles des concentrations proches des limites analytiques sont souvent mesurées dans la phase aqueuse, (iii) de confirmer que la diminution dans la phase aqueuse n'est pas due à la biodégradation, notamment dans le cas où la diminution de concentration est très rapide.

III.1.5.2.b) Description des données : outils et considérations mathématiques

Pour décrire les données expérimentales et/ou estimées à l'équilibre de sorption, il existe de nombreux « modèles » mathématiques connus sous le nom d'isothermes (Limousin *et al.*, 2007). Ces isothermes décrivent ici l'évolution de la concentration d'un micropolluant dans la phase solide, en fonction de sa concentration en phase aqueuse. Essentiellement de nature empirique, on distingue des isothermes à deux paramètres (Langmuir, Freundlich...), des isothermes à trois paramètres et plus (Toth, Redlich-Peterson...) ou des isothermes spécifiques de certaines interactions (*e.g.* échanges d'ions) (Limousin *et al.*, 2007). En raison de leur « universalité », **les isothermes de Langmuir, Freundlich et Linéaire, cas particulier de l'isotherme de Freundlich, ont été systématiquement appliquées dans les études de sorption de micropolluants sur les boues et se sont révélées suffisantes.** Pour respecter les fondements énoncés par leurs auteurs, le terme adsorption sera exceptionnellement employé dans cette sous-partie.

Isotherme de Langmuir

L'isotherme de Langmuir a initialement été développée pour des équilibres solide-gaz puis a été transposée aux équilibres solide-liquide. La théorie proposée par Langmuir (1916) repose sur une vision cinétique de l'adsorption : les molécules ne s'accumulent pas, elles sont continuellement « bombardées » sur la surface, et un équilibre d'adsorption/désorption des molécules est mis en place (Do, 1998). Les hypothèses de ce modèle sont que :

- (i) les sites d'adsorption sont supposés homogènes d'un point de vue énergétique ;
- (ii) un site ne peut adsorber qu'une seule molécule et qu'une seule couche de molécules peut se former ;
- (iii) il n'y a pas d'interactions entre molécules adsorbées.

L'expression décrivant cette isotherme est donnée par l'équation (III-3) :

$$C_{solide}^{équilibre} = \frac{Q_0 \cdot K_L \cdot C_{aqueuse}^{équilibre}}{1 + K_L \cdot C_{aqueuse}^{équilibre}} \quad \text{Eq. (III-3)}$$

où Q_0 représente la concentration maximale que le solide peut sorber ($\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{part}}$), K_L le coefficient de Langmuir dépendant de la température ($\text{L}/\mu\text{g}$).

Bancon-Montigny (2001) indique que le coefficient de Langmuir peut représenter l'énergie de liaison entre les molécules adsorbées et le support, mais que la signification est incertaine.

Isotherme de Freundlich

Basé sur une approche purement empirique, l'isotherme de Freundlich (Freundlich, 1926) permet de décrire des surfaces hétérogènes constituées de sites possédant des énergies d'interactions différentes. L'adsorption sur chaque site peut être décrite par une relation de type Langmuir, ce qui lui vaut parfois l'appellation de Langmuir « multi-sites ». L'isotherme de Freundlich est très répandue dans la caractérisation de l'adsorption de polluants organiques dans l'eau (Clara *et al.*, 2004). L'expression décrivant cette isotherme est donnée par l'équation (III-4) :

$$C_{solide}^{équilibre} = K_F \cdot C_{aqueuse}^{équilibre^{1/n}} \quad \text{Eq. (III-4)}$$

où K_F représente le coefficient de Freundlich ($(\mu\text{g}^{(1-1/n)} \cdot \text{L}^{1/n})/\text{kg}_{\text{part}}$), n le degré de non linéarité par rapport à une isotherme linéaire.

Les paramètres K_F et n sont respectivement liés à la capacité et à l'intensité d'adsorption. Ils sont dépendants du couple soluté-adsorbant et de la température (Delgado, 2009). Une valeur de n supérieure à 1 aura la signification d'une adsorption favorable à faibles concentrations et inversement.

Extraction des paramètres des isothermes

La détermination des paramètres des isothermes est généralement effectuée après linéarisation des équations. La relation de Langmuir subit le plus souvent une transformation inverse, celle de Freundlich une transformation logarithmique. Ces stratégies permettent de se ramener à des systèmes faciles à exploiter, où les paramètres sont obtenus à l'aide des pentes et ordonnées à l'origine. La linéarisation est une méthode répandue et appréciée par de très nombreux auteurs. Cependant, elle engendre parfois des distorsions et les résultats peuvent grandement différer d'une forme linéarisée à une autre (Boulinguez *et al.*, 2008). Statistiquement, ces linéarisations sont incorrectes puisqu'elles ne conservent pas l'homogénéité des variances lors de la transformation (Badertscher et Pretsch, 2006). Il peut en résulter une incohérence des résultats et une mauvaise estimation des incertitudes sur les valeurs calculées (Laurent, 2009). **Ainsi, l'analyse quantitative doit être réalisée par des méthodes d'optimisation numérique de régressions non-linéaires.** Les formes linéarisées ont toutefois le mérite de donner une approximation rapide des paramètres, qui peuvent servir de base dans les processus itératifs utilisés pour les régressions non-linéaires.

Cas particulier : l'isotherme linéaire

Il existe un cas particulier de l'isotherme de Freundlich pour lequel la constante K_F prend une signification certaine. Lorsque le paramètre n est égal à 1, les concentrations en polluants en phases solide et liquide à l'équilibre sont corrélées linéairement. Il en résulte que la constante K_F est égale au coefficient de distribution $K_{Distrib}$. Cette vision est très largement répandue dans l'étude de sorption de micropolluants dans les boues, notamment parce qu'un tel comportement est admis aux concentrations les plus basses. Il est assez fréquent de trouver dans la littérature des valeurs de $K_{Distrib}$ calculées à partir d'une seule mesure des concentrations en phases solide et liquide (Ternes *et al.*, 2004 ; Carballa *et al.*, 2008 ; Radjenovic *et al.*, 2009). La valeur obtenue est souvent jugée caractéristique du comportement de sorption aux concentrations rencontrées en STEP (0,1 – 10 $\mu\text{g/L}$). Hyland *et al.* (2012) ont récemment démontré sur plusieurs types de boues et à très faibles concentrations en micropolluants (0 – 10 $\mu\text{g/L}$), que l'isotherme linéaire n'était pas régulièrement vérifiée et ne permettait donc pas d'extrapoler le comportement de sorption à toutes les concentrations. D'autres données sont encore nécessaires pour compléter la base de résultats et affiner les conclusions. **Pour éviter toute confusion, une distinction entre le coefficient de distribution $K_{Distrib}$, et celui pour une isotherme linéaire K_{Lin} , sera à présent strictement appliquée dans la suite du manuscrit.**

Limites des isothermes

Tous ces concepts sont des outils de modélisation globale (Figure III-3). Ils ne permettent pas, *a priori*, de couvrir l'ensemble du jeu de données, ni d'expliquer les mécanismes de sorption. Par ailleurs, les isothermes de Langmuir et Freundlich peuvent parfois décrire une même isotherme expérimentale sur un même intervalle, rendant le choix du modèle et ses conclusions délicats (Wang *et al.*, 2009). Le domaine d'application des isothermes est un thème récurrent dans les études de sorption de polluants sur les boues. Ce ou ces domaines ne sont pas clairement définis. D'autres données expérimentales pour différentes molécules et boues seraient alors nécessaires pour faire la lumière sur ce point.

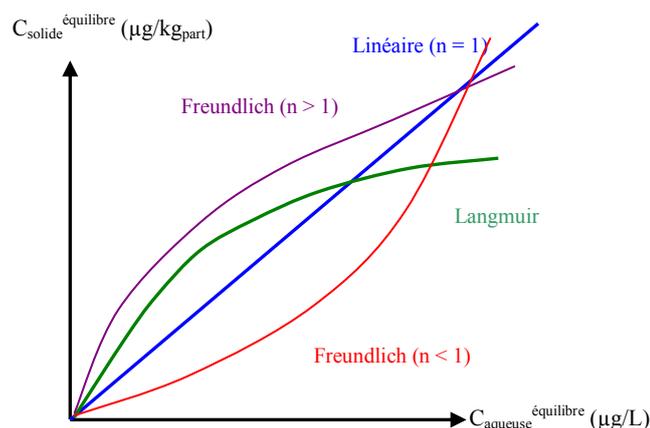


Figure III-3 : Allure des différentes isothermes les plus répandues

Les modèles présentés permettent seulement de décrire des équilibres mono-constituants. Dans le cas où plusieurs espèces sont impliquées dans la sorption et parfois en compétition, des isothermes multi-constituants (Langmuir généralisé, Langmuir-Freundlich...) peuvent être appliqués. Ces approches sont familières dans les études d'isothermes de sorption sur les charbons actifs dans lesquelles (i) la composition de la matrice aqueuse et le nombre de ses constituants sont souvent maîtrisés, et (ii) les concentrations étudiées sont importantes, de l'ordre de plusieurs mg/L. Pour une application de ces modèles la plus rigoureuse possible, l'ensemble des comportements doit être caractérisé. **Objectivement, aucun de ces deux critères ne semble applicable aux études sur la matrice boue.** Les approches mono-constituants seront donc privilégiées dans ce travail.

III.1.5.2.c) Détermination des coefficients de distribution du système triphasique

Pour déterminer les coefficients K_{part} et K_{DCM} du système triphasique, il est indispensable de connaître les concentrations en micropolluants libres et liés à la DCM dans la phase aqueuse. [Cea Barcia \(2012\)](#) a pu déterminer avec précision ces coefficients de distribution en quantifiant des HAP libres et sorbés à la DCM. La méthode utilisée implique une extraction depuis la phase aqueuse par SPME, suivie par une thermodesorption et analyse par GC-MS. La quantification des HAP libres ou liés a été effectuée à l'aide d'étalons deutérés spécifiques de chacun des états. Il a été démontré dans le chapitre précédent que le couplage SPME-GC-MS présentait un intérêt très limité pour les molécules les plus polaires sans dérivatisation. Ce traitement n'est pas envisageable puisqu'il pourrait modifier les équilibres. **A l'heure actuelle, l'analyse rapide des molécules polaires pharmaceutiques libres ou liées à la DCM n'est donc pas rendue possible.** En revanche, accéder aux concentrations en phase aqueuse et particulaire est relativement facile. Pour étudier de manière concomitante les deux équilibres, une méthodologie est disponible ([Barret, 2009](#)). Elle est basée sur la mesure du coefficient de distribution entre phase particulaire et phase aqueuse, nommée K_{global} . Une estimation de K_{global} est donnée par l'équation (III-5) :

$$K_{global} = \frac{C_{solide}^{équilibre}}{C_{aqueuse}^{équilibre}} = \frac{K_{part} \cdot C_{libre}^{équilibre}}{K_{DCM} \cdot C_{libre}^{équilibre} \cdot [DCM] + C_{libre}^{équilibre}} = \frac{K_{part}}{K_{DCM} \cdot [DCM] + 1} \quad \text{Eq. (III-5)}$$

où K_{global} est exprimée en L/kg_{part}, [DCM] est la concentration en DCM exprimée en g_{DCM}/L.

Bien qu'il soit fortement apparenté au $K_{Distrib}$, K_{global} n'est pas une constante thermodynamique mais est un coefficient dépendant du système étudié. Il a déjà été employé avec succès par [Barret \(2009\)](#) pour évaluer la distribution de HAP dans les différents compartiments de boues issues de la digestion anaérobie. **L'adéquation aux molécules polaires et/ou ionisées reste à démontrer.**

La forme de l'équation indique la dépendance de K_{global} à la valeur de la DCM. Pour accéder à K_{part} et K_{DCM} , il est donc nécessaire de déterminer K_{global} pour plusieurs concentrations en DCM. Barret (2009) précise qu'à DCM constante, la linéarité des équilibres de sorption permet d'aboutir à l'obtention d'un K_{global} constant. Cette hypothèse rejoint l'idée d'une isotherme linéaire. Pour chaque DCM, un K_{global} peut ainsi être extrait (Figure III-4(a)). La représentation de K_{global} en fonction de la DCM décrit une allure hyperbolique plus ou moins prononcée (Figure III-4(b)). La détermination des paramètres (*i.e* K_{part} et K_{DCM}) est réalisée par un algorithme de régression non-linéaire de type Levenberg-Marquardt (Levenberg, 1944).

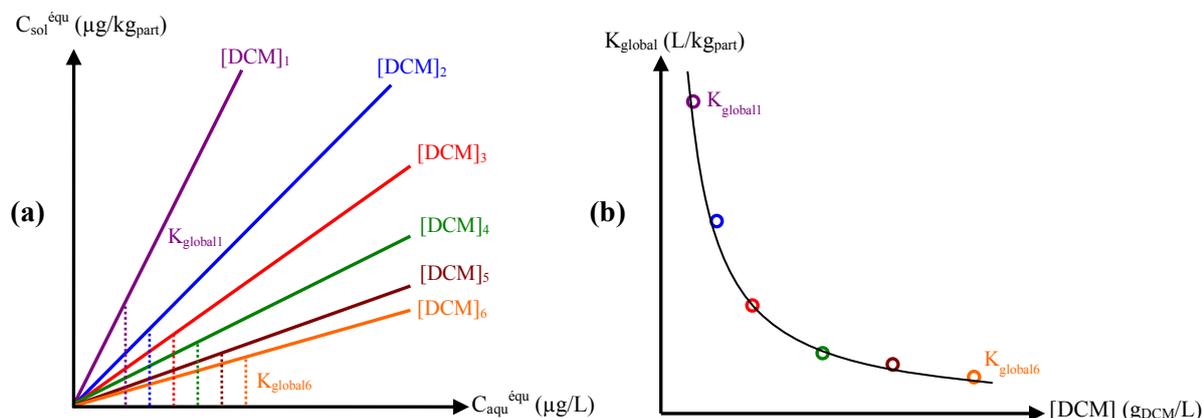


Figure III-4 : Méthodologie de détermination des coefficients du système triphasique

III.1.6) Quelles caractéristiques influencent la sorption ?

Les données de sorption des molécules cibles sur les matrices environnementales sont renseignées dans le Tableau III-2. Les études sur le charbon actif (5-FU ; Lehnberg *et al.*, 2009) ou sur les membranes filtrantes (CP ; Verliefe *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2009) ne sont pas développées.

Ces résultats montrent des différences de coefficients de distribution importantes que ce soit (i) pour une molécule donnée, suivant la nature de la matrice ; (ii) pour une matrice donnée, suivant les propriétés de la molécule. Il est donc important de caractériser les paramètres qui peuvent influencer les réponses de sorption, qu'ils soient liés aux propriétés de la matrice (point (i)), à celles des polluants (point (ii)) et aux conditions opératoires dans lesquelles ces données ont été acquises. **Toutefois, cette liste sera difficilement exhaustive.**

Tableau III-2 : Distribution d'IFO, CP et TAM dans les matrices environnementales

Molécule	Matrice	Paramètre de sorption	Référence
IFO	Boue primaire	$K_{\text{Distrib}} = 22 \pm 14 \text{ L/kg}_{\text{part}}$	Ternes <i>et al.</i> , 2004
	Boue secondaire	$K_{\text{Distrib}} = 1,4 \pm 0,4 \text{ L/kg}_{\text{part}}$	
CP	Boue primaire	$K_{\text{Distrib}} = 55 \pm 20 \text{ L/kg}_{\text{part}}$	Ternes <i>et al.</i> , 2004
	Boue secondaire	$K_{\text{Distrib}} = 2,4 \pm 0,5 \text{ L/kg}_{\text{part}}$	
TAM	Sol agricole	$K_{\text{Distrib}} = 1328 \pm 282 \text{ L/kg}_{\text{part}}$	Barron <i>et al.</i> , 2009
	Boue digérée	$K_{\text{Distrib}} = 2944 \pm 344 \text{ L/kg}_{\text{part}}$	Barron <i>et al.</i> , 2009
	Sédiment	$K_{\text{Distrib}}^{\text{b,c}} \sim 22000 \text{ L/kg}_{\text{part}}$	Yang <i>et al.</i> , 2011
	DCM ^a eau de surface	$K_{\text{part}}^{\text{b,c}} \sim 35000 \text{ L/kg}_{\text{part}}$ $K_{\text{DCM}}^{\text{b,c}} \sim 4,4 \cdot 10^7 \text{ L/kg}_{\text{part}}$	Yang <i>et al.</i> , 2011

a : la matière colloïdale a été déterminée entre 1 kDa et 0,7 µm

b : les auteurs n'ont pas donné ces dénominations et les correspondances ont ici été déduites

c : seuls coefficients déterminés sur des matrices « naturelles » (*i.e* non dopées)

III.1.6.1) Caractéristiques de la matrice

La taille des particules et la surface spécifique

Yi et Harper Jr. (2007) ont démontré que la valeur de K_{Distrib} pour EE2 dans les boues était influencée par la taille des particules : plus les particules étaient grosses et plus le coefficient de distribution était petit. Dans l'hypothèse d'une représentation sphérique (et simplifiée) des agrégats de boues, la taille des particules et la surface spécifique sont liées par une relation linéaire inverse. Ainsi, plus la surface spécifique et donc d'échange sera importante, plus le coefficient de distribution sera élevé. Ce comportement a été identifié pour la sorption de pesticides dans les sols (Gao *et al.*, 1998), de HAP sur des sédiments (Lau et Stenstrom, 2005), du bisphénol A sur de la boue digérée (Ivashechkin *et al.*, 2004), et pourrait être considérée comme généralisable. Par ailleurs, Beulke *et al.* (2001) indiquent que pour les cinétiques de sorption de polluants sur les sols, les particules de grande taille favorisent les mécanismes de diffusion au sein de la matière, caractérisés par des vitesses lentes. Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre est donc plus long.

L'âge de boues et les propriétés de surface

L'âge de boues, paramètre clé du fonctionnement d'une STEP, est susceptible de modifier la forme des floes et leurs propriétés de surface. Par exemple, Liao *et al.* (2006) ont montré que les floes jeunes avaient une forme beaucoup plus irrégulière que les floes âgés, plus sphériques, et possédaient donc une surface d'échange plus importante. Par ailleurs, la structure compacte des floes âgés peut limiter les mécanismes de diffusion et conduire à des cinétiques plus lentes. Liao *et al.* (2001) ajoutent que les floes âgés ont souvent une densité d'EPS plus importante que les floes jeunes, et sont de ce fait plus hydrophobes et de charge négative moindre. L'effet de l'âge de boues sur la sorption est donc probable. Cependant, de nombreux auteurs (Yi *et al.*, 2006 ; Yi et Harper Jr., 2007 ; Huang *et al.*, 2008 ; Stasinakis *et al.*, 2010) ont des difficultés à lier sorption de micropolluants organiques (EE2, phtalates...) et âge de boues tant les modifications de la matière sont variées et peu maîtrisées. Ainsi, le paramètre âge de boues ne peut constituer un point de comparaison satisfaisant dans les études de sorption.

La teneur en matière organique

La matière organique (MO) est considérée par de nombreux auteurs comme le siège fondamental des interactions de sorption dans les matrices environnementales (Matter-Muller *et al.*, 1980 ; Gao *et al.*, 1998 ; Ivashechkin *et al.*, 2004 ; Lertpaitoonpan *et al.*, 2009). Cette pensée est justifiée car un lien entre sorption et carbone organique a très régulièrement été mis en évidence : plus la teneur en carbone organique d'un échantillon est importante, et plus la sorption l'est. Par ailleurs, il existe une relation de proportionnalité assez évidente qui sera développée dans la partie III.1.7. Le rôle unique de la MO dans les équilibres de sorption a été discuté car des interactions avec la matière minérale sont possibles (Sun *et al.*, 2012). Ces liens sont moins évidents car moins renseignés.

Les propriétés de la DCM

Bien que très peu étudiée, la DCM des boues semble piloter les interactions de sorption avec les polluants. Barret (2009) et Cea Barcia (2012) ont mis en évidence son effet sur la sorption de HAP dans des boues de nature très variée (aérobie, anaérobie, thermolysée...), en observant notamment des coefficients de distribution comparables entre les polluants sorbés à la boue et ceux sorbés à la DCM. La sorption de micropolluants de type pharmaceutiques moyennement polaires à apolaires a été confirmée sur des matières colloïdales environnementales (Pan *et al.*, 2009 ; Maskouei et Zhou, 2010 ; Yang *et al.*, 2011). A l'image du Log K_{DCM} pour le TAM dans le Tableau III-2, le potentiel de piégeage de ces matières peut être très important et beaucoup plus élevé que les matières particulaires, ce qui peut indiquer une aptitude des colloïdes à séquestrer les polluants et à les

entraîner sur de très longues distances, sans connaissance précise de leur devenir. [Hernandez-Ruiz et al. \(2012\)](#) ont également démontré que les produits pharmaceutiques interagissaient avec la matière organique dissoute des eaux usées et ont pu mettre en évidence certains liens grâce à une caractérisation fonctionnelle de la matière par fluorescence tridimensionnelle¹. Il a été observé que l'ibuprofène et la carbamazépine interagissaient fortement avec les acides fulviques-like. Pour des colloïdes d'eau de surface, le même comportement de l'ibuprofène a été observé, alors que la carbamazépine interagissait avec les acides humiques-like. Ainsi, la nature de la DCM affecte la distribution et de manière certainement peu équivalente entre les différentes matrices environnementales. **Le comportement de produits pharmaceutiques vis-à-vis de la DCM des boues doit donc être caractérisé.**

III.1.6.2) Caractéristiques du polluant

L'hydrophobicité

L'hydrophobicité d'une molécule est souvent considérée comme un des paramètres les plus déterminants dans la sorption, notamment en raison de son lien fort avec la matière organique. Les molécules avec les $\text{Log } K_{ow}$ les plus élevés seront efficacement sorbées et inversement. Ce constat se vérifie pour le TAM ($\text{Log } K_{ow} \sim 6$), dont les coefficients de distribution sont très nettement supérieurs à ceux d'IFO et de CP ($\text{Log } K_{ow} \sim 1$) ([Tableau III-2](#)). Ce lien est cependant discutable, des molécules de $\text{Log } K_{ow}$ proches pouvant avoir des différences de distribution très notables ([Hyland et al., 2012](#)). L'hydrophobicité peut ne pas être considérée comme un critère suffisant dans les explications de sorption. Cet argument est complété dans les prochains paragraphes.

La charge portée par le polluant

L'état d'ionisation des molécules est susceptible de jouer un rôle important dans la nature des interactions. Les molécules portant des charges peuvent développer des interactions spécifiques électrostatiques avec certains groupements fonctionnels des matrices. Cela pourrait notamment être le cas de substances cationiques avec les fonctions carboxyles des EPS, chargées négativement à pH neutre ou basique ([Sheng et al., 2008](#)). Le comportement des zwitterions (espèces portant les deux charges) est quant à lui moins connu et mérite d'être approfondi. Le caractère ionique d'une molécule est fortement lié à son pKa et au pH de la matrice. Le comportement des espèces ionisées sera développé dans ce prochain paragraphe.

III.1.6.3) Caractéristiques des conditions opératoires

La température

La température influence à la fois les cinétiques et les équilibres de sorption. Une hausse de la température accélère sensiblement les cinétiques de sorption ([Feng et al., 2010](#)). Parallèlement, une très grande majorité d'auteurs observent que le coefficient de distribution $K_{Distrib}$ diminue lorsque la température augmente ([Xu et al., 2008](#) ; [Zhao et al., 2008](#) ; [Feng et al., 2010](#) ; [Ren et al., 2011](#)) et ce, quelle que soit la nature du polluant étudié. Ainsi, lorsque la température augmente, les équilibres de sorption sont atteints plus rapidement, résultant d'une accélération des cinétiques et d'une diminution de la distribution dans la phase solide. En revanche, [Ottmar et al. \(2012\)](#) n'ont pas observé cet effet significatif de la température dans la sorption de statines sur les boues, la distribution restant constante sur l'intervalle étudié (5-32 °C). Les raisons ne sont pas claires. Par ailleurs, certains auteurs estiment que lors d'une augmentation de la température, un déplacement de l'équilibre vers la phase aqueuse est synonyme de réactions de physisorption ([Zhao et al., 2008](#) ; [Xu et al., 2008](#)).

¹ Le principe de cette technique est décrit dans le matériel et méthodes du chapitre IV

Le pH

L'effet du pH sur les équilibres est différent suivant la nature des analytes. La sorption de molécules à caractère neutre est généralement peu impactée par une évolution du pH. Aux pH rencontrés en traitement des eaux (6,5 à 8), les molécules à caractère acide présentent une charge négative alors que celles à caractère basique présentent une charge positive. [Stevens-Garmon et al. \(2011\)](#) et [Horsing et al. \(2012\)](#) ont ainsi démontré que les molécules chargées positivement possédaient globalement des capacités de sorption sur la boue plus importantes que les molécules neutres, qui elles-mêmes possédaient une capacité plus importante que les molécules chargées négativement. Ce constat met en avant l'importance des interactions électrostatiques. En effet, la surface des boues étant de charge négative ([Kerr et al., 2000](#)), des mécanismes d'attraction et de répulsion pourraient expliquer ces quelques tendances. Des considérations complémentaires seront développées dans la partie III.1.7.

La force ionique

L'influence de la force ionique (ou conductivité σ_c) sur les équilibres de sorption dans les boues a été observée par [Ren et al. \(2011\)](#). Pour une augmentation de la concentration en NaCl entre 0 et 1 mol/L (soit $\Delta\sigma_c \sim 1250 \mu\text{S/cm}$), la quantité d'ammoniums quaternaires sorbées diminuait. La diminution peut être expliquée par des mécanismes de compétition entre les ions Na^+ et les ammoniums quaternaires (chargés positivement) pour les mêmes sites actifs. Il est également précisé que l'ajout de sels peut modifier la solubilité aqueuse des composés et produire une redistribution des équilibres. [Feng et al. \(2010\)](#) ont observé le même effet de la force ionique sur les équilibres de distribution d'EE2 sur une boue inactivée, uniquement au-delà d'une concentration de 0,1 mol/L en NaNO_3 . Pour des concentrations inférieures, le comportement inverse a été observé. Les raisons ne sont pas évidentes mais pourraient être liées à la présence d'une double couche électrique entre la surface de la boue et EE2. L'effet de la force ionique semble donc avérer mais difficilement généralisable, les influences identifiées pouvant être attribuées soit au polluant soit à la matrice soit à la nature du sel. De plus, les variations de force ionique entre les boues peuvent être très relatives, ce qui pourrait finalement diminuer l'importance de l'effet.

Autres caractéristiques

Pour rappel, les méthodes d'inactivation de l'activité de biodégradation, la vitesse d'agitation lors des essais, et la présence de compétiteurs de sorption sont susceptibles d'influencer les équilibres et/ou les cinétiques de sorption.

III.1.7) Prédire la sorption dans les boues sans utiliser les isothermes ?

Lorsque des données de K_{Distrib} ne sont pas disponibles, il y a la possibilité d'utiliser des modèles prédictifs plus ou moins précis. Ils sont directement hérités pour la plupart de modèles utilisés pour la sorption de polluants organiques sur les sols. L'approche la plus ancienne et la plus répandue est basée sur le prédicteur $\text{Log } K_{\text{ow}}$. De nombreux auteurs ([Matter-Muller et al., 1980](#) ; [Barton, 1987](#) ; [Jacobsen et al., 1993](#)) ont suggéré que $\text{Log } K_{\text{Distrib}}$ et $\text{Log } K_{\text{ow}}$ sont liés par une relation du type :

$$\text{Log}K_{\text{Distrib}} = a \cdot \text{Log}K_{\text{ow}} + b \quad \text{Eq. (III-6)}$$

où a et b sont des constantes estimées à partir d'un nombre important de données expérimentales. Ces constantes sont variables suivant la matrice considérée. Par ailleurs, ces valeurs ne sont pas uniques pour la seule matrice boue, comprises de façon générale entre 0,58 et 0,67 pour a, et entre 0,39 et 1,14 pour b suivant les auteurs.

L'utilisation de $\text{Log } K_{ow}$ comme seul prédicteur implique une vision du coefficient de distribution $K_{Distrib}$ comme une propriété physico-chimique intrinsèque de chaque polluant et liée à son hydrophobicité. Le modèle manque cependant de précision pour expliquer les différences de distribution entre matrices de « même nature » (e.g. boues secondaires), notamment en raison de son indépendance aux caractéristiques physico-chimiques de l'adsorbant.

Un modèle plus récent et plus robuste prend davantage en compte la nature de l'adsorbant. Il est admis par de très nombreux auteurs que la sorption dépend presque exclusivement de la teneur en matière organique des échantillons (Schwarzenbach *et al.*, 2003 ; Yamamoto *et al.*, 2005 ; Tulp *et al.*, 2009 ; Hyland *et al.*, 2012). Le coefficient $K_{Distrib}$ est alors lié au contenu organique par la relation :

$$K_{Distrib} = K_{oc} \cdot f_{oc} \quad \text{Eq. (III-7)}$$

où K_{oc} représente le coefficient de distribution carbone organique – eau (L/kg_{OC}) et f_{oc} la fraction de carbone organique présente dans l'adsorbant (kg_{OC}/kg_{part}). En injectant cette relation dans l'équation (III-6), il vient la relation :

$$\text{Log}K_{oc} = a' \cdot \text{Log}K_{ow} + b' \quad \text{Eq. (III-8)}$$

Ce modèle permet de prédire de manière satisfaisante la sorption de molécules apolaires et polaires à caractère neutre (Carballa *et al.*, 2008 ; Stevens-Garmon *et al.*, 2011 ; Hyland *et al.*, 2012). Les molécules avec un $\text{Log } K_{ow}$ inférieur à 2,5 auront un potentiel de sorption faible, alors que celles présentant un $\text{Log } K_{ow}$ supérieur à 4 auront un potentiel élevé (Jones *et al.*, 2005). Ce principe est toutefois difficilement applicable aux molécules ionisées et notamment pharmaceutiques. Golet *et al.* (2003) ont démontré que la norfloxacine, de $\text{Log } K_{ow}$ égal à 1 et chargée positivement au pH des boues (pH 7), avait un potentiel de sorption élevé ($\text{Log } K_{Distrib} \sim 4$). Le prédicteur $\text{Log } K_{ow}$ n'est pas suffisant puisqu'il ne permet de décrire que des interactions hydrophobes non spécifiques.

Pour prendre en compte à la fois le caractère hydrophobe et ionisé de certaines molécules, le prédicteur $\text{Log } D_{ow}$ est utilisé, caractérisant la dépendance du $\text{Log } K_{ow}$ en fonction du pH et du pKa. Deux relations sont utilisées suivant le caractère acide ou basique des molécules et sont injectées à la place de $\text{Log } K_{ow}$:

$$\text{Log}D_{ow} = \text{Log}K_{ow} + \text{Log} \frac{1}{1 + 10^{pH - pKa}} \quad \text{pour les molécules acides} \quad \text{Eq. (III-9)}$$

$$\text{Log}D_{ow} = \text{Log}K_{ow} + \text{Log} \frac{1}{1 + 10^{pKa - pH}} \quad \text{pour les molécules basiques} \quad \text{Eq. (III-10)}$$

Les récentes études de Stevens-Garmon *et al.* (2011) et Horsing *et al.* (2012) ont permis de faire le point sur l'adéquation du modèle $\text{Log } K_{oc}$ en fonction de $\text{Log } D_{ow}$. Ces auteurs ont observé que le prédicteur $\text{Log } D_{ow}$ était suffisant pour les molécules neutres quelle que soit sa valeur, et pour les molécules de charge négative avec un $\text{Log } D_{ow}$ supérieur à 2. En effet, en-dessous de cette valeur, il n'y a plus de corrélation évidente entre $\text{Log } K_{oc}$ et $\text{Log } D_{ow}$. Pour l'expliquer, ces auteurs suggèrent que pour $\text{Log } D_{ow} > 2$, les interactions hydrophobes sont suffisamment importantes par rapport aux interactions électrostatiques pour être décrites convenablement par ce modèle. Par ailleurs, aucune corrélation n'a été trouvée pour les molécules chargées positivement. Ainsi, le prédicteur $\text{Log } D_{ow}$ ne rendrait finalement compte que d'interactions non spécifiques et serait d'intérêt limité. Pour les molécules ionisées, la part jouée par chacune des interactions est encore peu claire. L'existence de plusieurs prédicteurs autre que le seul $\text{Log } D_{ow}$ est alors à envisager.

L'ensemble de ces modèles suppose que seule la matière organique des boues serait déterminante dans les processus de sorption, et que la seule valeur de K_{OC} caractérise suffisamment cette matière. Barret (2009) a démontré que la sorption de HAP sur les boues (K_{part}) pouvait être fonction de plusieurs prédictors « forts » : des prédictors « micropolluants » comme $\log K_{ow}$ ou la masse molaire, et des prédictors « boues » en lien direct avec la matière organique (protéines, densité organique...) mais aussi en lien avec la matière minérale (densité minérale). Les prédictors « boues » ont par ailleurs été les plus déterminants. Il apparaît donc que la sorption de molécules hydrophobes est un mécanisme assez complexe, faisant intervenir à la fois les caractéristiques des polluants et les caractéristiques organiques et minérales du support. L'existence d'un lien entre la matière minérale et la sorption de molécules hydrophobes soulève des questions quant à un lien possible avec la sorption de molécules davantage polaires et/ou ionisées. L'avantage du modèle proposé par Barret (2009) réside dans sa très bonne précision. Cependant, il nécessite une caractérisation fine de la matrice d'étude et est donc moins accessible que les modèles précédents. Par ailleurs, le poids de chacun des prédictors a été déterminé sur un nombre restreint de boues et peut donc manquer de généralité, comme précisé par l'auteur.

Dans le même travail, Barret (2009) a démontré que la sorption des HAP sur la DCM (K_{DCM}) était également fonction de nombreux prédictors à la fois « micropolluants » et « boues ». Certains de ces prédictors forts sont communs avec le modèle précédent (*e.g.* densité minérale), d'autres ne le sont pas (*e.g.* acides gras volatils). Ces différences de caractérisation suggèrent des conclusions de sorption difficilement extrapolables entre compartiments. Le compartiment colloïdal devrait donc être pris en compte dans la description du phénomène de sorption et la proposition de nouveaux modèles (Pomiès *et al.*, 2013). Par ailleurs, tous les modèles ici présentés ne font état que de corrélations linéaires supposées : d'autres types de corrélations pourraient alors être explorés.

III.1.8) Récapitulatif et définition des objectifs

Le [Tableau III-3](#) récapitule les stratégies identifiées dans la littérature pour l'évaluation de la sorption dans les boues.

Tableau III-3 : Synthèse des stratégies de détermination de la sorption dans les boues

	Deux compartiments	Trois compartiments
Représentation de la boue		
Considération sur les cinétiques	Modèle du pseudo-premier ordre $\frac{dC_{solide}^t}{dt} = k_1 \cdot (C_{solide}^{équilibre} - C_{solide}^t)$	Sorption aux particules Modèle du pseudo-premier ordre Modèle du pseudo-second ordre
	Modèle du pseudo-second ordre $\frac{dC_{solide}^t}{dt} = k_2 \cdot (C_{solide}^{équilibre} - C_{solide}^t)^2$	Sorption à la DCM Supposée instantanée
Conditionnement de la boue	Traitement chimique ? Traitement non chimique ? Pas de traitement ? Conditions opératoires (T°, pH, ΔP, σ, agitation...) contrôlées	
Estimation de la sorption		
	Extraction de $K_{Distrib}$	Extraction de K_{part} et K_{DCM}
Modèles Disponibles	(i) $\text{Log } K_{Distrib} = a \text{ Log } K_{ow} + b$ (ii) $\text{Log } K_{oc} = a' \text{ Log } K_{ow} + b'$ (iii) $\text{Log } K_{oc} = a'' \text{ Log } D_{ow} + b''$ Qualité de prédiction limitée	$\text{Log } K_{part} = \alpha + \beta \text{ Log } K_{ow} + \gamma \dots$ $\text{Log } K_{DCM} = \alpha' + \beta' \text{ Log } K_{ow} + \gamma' \dots$ Utilisation encore marginale

L'objectif principal est donc d'**évaluer avec rigueur la sorption de molécules anticancéreuses dans les boues**, puis d'**explorer les liens éventuels** entre les propriétés physico-chimiques des **polluants** et des **matrices** étudiés. En ce sens, la méthodologie développée est caractérisée par plusieurs points clés :

- (i) la recherche d'une stratégie permettant de **limiter les processus de biodégradation lors des essais de sorption et de caractérisation de cinétiques**. En raison de leur capacité éventuelle à altérer l'environnement aqueux ou les propriétés de surface des boues, les méthodes d'inactivation seront évitées ;
- (ii) **observer et si possible caractériser les cinétiques de sorption** en présence ou non de compétiteurs et pour différentes matrices, pour lesquels les études sont inexistantes ;
- (iii) la **détermination des coefficients de distribution** suivant une représentation de la **boue en deux ou trois compartiments**. Les enjeux propres à chacune de ces représentations ont été détaillés dans l'état de l'art ;
- (iv) une **description poussée des différentes fractions** des boues afin d'identifier les **caractéristiques qui pilotent la sorption** de ces molécules. Bien qu'il soulève de très nombreuses questions, le phénomène de désorption ne sera ici abordé que de manière très superficielle dans le reste du manuscrit, en préliminaire à une étude plus longue et plus complète qui devra être menée.

III.2) Matériels et méthodes

La plupart des références du matériel utilisé lors de ces tests ont déjà été détaillées dans le chapitre II. Elles ne seront pas reprises. Seules les références de matériels nouveaux seront donc renseignées. **A l'exception de NOR et PHO, tous les analytes ont ici été impliqués.**

III.2.1) Boues étudiées

Les expériences menées dans ce chapitre ont nécessité l'utilisation de 9 boues d'origine et de propriétés physico-chimiques différentes. La nature de ces boues et leur implication dans les tests sont recensées dans le [Tableau III-4](#). Une boue (Ginestous_1) a été utilisée pour caractériser l'effet de la présence de compétiteurs sur les cinétiques de sorption, 3 boues (BAMI_1, BAME_1 et Ginestous_1) ont été utilisées pour caractériser l'influence de la nature de la boue sur les cinétiques, 6 boues (BAMI_2, Ginestous_2, Muret, Narbonne, BAME_2, Nailloux) ont été utilisées pour l'étude des isothermes de sorption en diphasique, 1 boue (Narbonne) a été employée pour caractériser le domaine de linéarité possible de la sorption et 5 boues (BAMI_2, Ginestous_2, Narbonne, BAME_2, Nailloux) ont été testées pour l'application du système triphasique.

III.2.2) Préparation originale des solutions de dopage et des boues

III.2.2.1) Procédure de préparation des solutions de dopage

Il n'était pas envisageable de doper les échantillons de boues à partir des solutions méthanoliques mères des molécules anticancéreuses (chapitre II). En effet, le MeOH est considéré comme un substrat carboné facilement consommable par les bactéries. Il pourrait en résulter une stimulation de la biodégradation des molécules cibles, entraînant un biais important dans l'objectif d'une estimation seule du phénomène de sorption. La procédure adoptée a donc été la suivante. Dans un pilulier ambré d'environ 15 mL, 500 μ L de MeOH commercial ont été dopés avec un volume précis de solutions méthanoliques d'anticancéreux à 1 g/L. La mixture obtenue a été évaporée entièrement sous un flux de N_2 et à froid. A l'aide d'un appareil de type vortex, le résidu sec a été resuspendu dans un volume précis d'eau ultrapure pour confectionner la solution de dopage. Les volumes de dopage (quelques μ L) et de resuspension dans l'eau (quelques mL) ont été définis de manière à atteindre les concentrations voulues, de l'ordre de 1 à 10 mg/L suivant la nature du test. Il est important de préciser que les produits de solubilité dans l'eau n'ont pas été dépassés, de manière à s'assurer que la concentration finale de la solution de dopage était effectivement cohérente avec celle attendue.

III.2.2.2) Procédure de préparation des échantillons des boues

Afin de limiter l'activité biologique pendant la durée des tests, sans modifier la structure des boues, les procédures d'inactivation thermique, chimique ou par autoclavage proposées dans la littérature ont été évitées. Le protocole de conditionnement suivant a été appliqué. Un premier bullage de 15 minutes sous un flux d' O_2 a permis d'oxyder les substrats résiduels (carbone, ammoniums...) présents dans la boue. Une seconde étape d'anoxie, pendant une durée d'environ 30 minutes, a été appliquée pour éliminer les nitrates initialement présents ou produits lors de la conversion des ammoniums à l'issue du bullage précédent. Enfin, un bullage de N_2 a été appliqué pour éliminer les traces d' O_2 dissous et assurer une atmosphère inerte. Cette procédure permet ainsi de limiter très fortement la présence de substrats facilement assimilables et par la même occasion, l'activité de biodégradation. Les tests ont donc été réalisés sur des boues en condition de respiration endogène. Il a été admis que la présence mineure de sulfates dans les boues, pour lesquels une utilisation lors de la minéralisation de la matière organique a déjà été mise en évidence ([Gijzen, 2001](#)), n'était pas suffisante pour induire une activité de biodégradation.

Tableau III-4 : Caractéristiques des boues étudiées et implication dans les essais de sorption

Boue et Paramètres	Caractéristiques des boues étudiées ^a									
	Echelle	Procédé	Charge massique	Age de Boues (j)	Capacité (EH)	[Part] = MES (g _{part} /L)	MES/MVS (%)	DCM (g _{DCM} /L)	pH	σ_c (μ S/cm)
LGC_BAMI	Pilote	BAMI ^b	Faible	20	15 L	(1) 9,7	88	0,96	-	-
						(2) 11,1	89	1,04	7,5	910
Ginestous	Réelle	BA	Moyenne	-	400 000	(1) 5,75	90	-	-	-
						(2) 6,13	91	0,85	7,2	650
Muret^c	Réelle	Épaississeur ^c	-	-	>30 000	11,18	71	1,06	7,75	1650
Narbonne	Réelle	BA	Faible	-	120 000	4,86	79	0,67	8,35	1290
LGC_BAME	Pilote	BAME ^b	Faible	20	20 L	(1) 6,8	89	-	-	-
						(2) 5,95	85	0,94	7,85	1520
Nailloux	Réelle	BAMI	Très faible	100	9000	9,57	75	0,41	7,5	730
Brax^d	Réelle	BA	Faible	-	2000	-	83	-	-	-

Boue et nature des essais réalisés	Caractéristiques des essais de sorption				
	Système diphasique			Système triphasique	
	Cinétique et cocktail	Cinétique et boues	Détermination de l'isotherme	Zone de "linéarité"	Détermination de K _{part} et K _{DCM}
LGC_BAMI	(1)	-	X	-	-
	(2)	-	-	X	X
Ginestous	(1)	X	X	-	-
	(2)	-	-	X	X
Muret^c		-	-	X	-
Narbonne		-	-	X	X
LGC_BAME	(1)	-	X	-	X
	(2)	-	-	X	X
Nailloux		-	-	X	X

EH : équivalent habitant ; Part : particules = MES : matières en suspension ; MVS : matières volatiles en suspension ; DCM : matière colloïdale et dissoute ; pH : potentiel hydrogène ; σ_c : conductivité ; BAMI : bioréacteur à membrane immergée ; BA : procédé à boues activées ; BAME : bioréacteur à membrane externe

a : les valeurs renseignées sont des valeurs moyennes

b : le principe de fonctionnement des procédés est expliqué dans le chapitre IV

c : la boue de Muret est une boue mixte primaire-secondaire ; elle est extraite d'un méthaniseur hors service, fonctionnant comme un épaisseur-digester

d : utilisée uniquement pour le développement analytique sur la phase solide

III.2.3) Calage du test en système diphasique

III.2.3.1) Caractérisation de la stabilité des analytes

La boue de Ginestous a été utilisée pour caractériser la stabilité des analytes dans les conditions des tests. Un volume important de boue a été centrifugé à 5000g pendant 20 minutes et la phase aqueuse a été filtrée sur filtre en fibre de verre 1,2 μm . Plusieurs aliquotes de 100 mL de phase aqueuse filtrée ont été transférées dans des flacons à centrifuger transparents en carbonate de polypropylène (PPCO), de volume utile 250 mL (Nalgène, VWR, Fontenay-Sous-Bois, France). La phase aqueuse contient encore de nombreuses bactéries actives. Pour « désactiver » la matrice, les flacons ont été disposés dans un autoclave et soumis à plusieurs cycles de montées en pression et température. L'activité de biodégradation a ainsi été éliminée. Tous les flacons ont ensuite été recouverts d'aluminium pour éviter toute perte par photo-oxydation, puis disposés sur une table à agitation elliptique (TAE) Innova 2100 (New Brunswick Scientific, Edison, Etats-Unis). Chacun des flacons a été dopé avec une mixture d'IFO, de CP, de 5-FU et de TAM. Les concentrations visées dans la phase aqueuse étaient de 10 $\mu\text{g/L}$ en IFO, 10 $\mu\text{g/L}$ en CP, 50 $\mu\text{g/L}$ en 5-FU et 5 $\mu\text{g/L}$ en TAM. Les flacons ont été agités à une vitesse de 150 rpm. La température des essais a été fixée à 23 ± 2 °C, grâce à une pièce thermorégulée. Une première série d'essais a été effectuée en analysant un flacon aux temps de contact 0 min (T_0), 24 heures ($T_{24\text{h}}$) et 48 heures ($T_{48\text{h}}$). Une seconde série d'essais a été effectuée en analysant un flacon aux temps de contact 0 min (T_0), 5 minutes ($T_{5\text{min}}$) et 4 heures ($T_{4\text{h}}$). Les différents échantillons ont ensuite été transférés dans des flacons ambrés en polycarbonate, acidifié à pH 2 et conservé à 4 °C. 25 mL de chacun des flacons ont été extraits puis dosés suivant la procédure analytique décrite dans le chapitre II, et permettent de suivre l'évolution des concentrations dans le temps. Seuls IFO, CP et TAM ont été analysés.

III.2.3.2) Caractérisation des dynamiques de sorption

III.2.3.2.a) Influence de la présence de compétiteurs sur les dynamiques

La boue de Ginestous a été utilisée pour caractériser l'influence de la présence ou non de compétiteurs sur les dynamiques de sorption des molécules cibles. Plusieurs aliquotes de 100 mL de boue « conditionnée » ont été transférées dans des flacons en PPCO de 250 mL et recouverts d'aluminium. Une première série a été effectuée en dopant chaque flacon avec une solution pure d'IFO, de CP et de TAM. Une seconde série a été effectuée en dopant chaque flacon avec une mixture d'IFO, de CP, de 5-FU et de TAM. Dans chacun de ces essais, la concentration visée dans la boue était de 10 $\mu\text{g/L}$ en IFO, 10 $\mu\text{g/L}$ en CP, 50 $\mu\text{g/L}$ en 5-FU et 5 $\mu\text{g/L}$ en TAM. La concentration d'essai (C_0) a été précisément déterminée en dopant puis dosant 100 mL de phase aqueuse désactivée. Les flacons ont été agités à une vitesse de 150 rpm, pour une température d'essai de 23 ± 2 °C. Un flacon a été sacrifié aux temps de contact 5 minutes ($T_{5\text{min}}$), 30 minutes ($T_{30\text{min}}$), 1 heure ($T_{1\text{h}}$), 2 heures 30 minutes ($T_{2\text{h}30\text{min}}$), 4 heures ($T_{4\text{h}}$) et 6 heures ($T_{6\text{h}}$). Les deux phases ont été séparées par centrifugation des échantillons à 5000g pendant 20 minutes, avec une centrifugeuse thermorégulée à la température des essais. Les échantillons aqueux ont été filtrés puis traités suivant les procédures déjà décrites. Les quantités en phase aqueuse (C_{aqueuse}) ont été dosées sur 25 mL. L'évolution de l'équilibre de sorption a été calculée pour chaque temps suivant l'équation :

$$\text{Evolution de l'équilibre} = \frac{C_{\text{aqueuse}}}{C_0} \quad \text{Eq. (III-11)}$$

La possible présence originelle de composés cibles a été prise en compte par dosage des phases aqueuse et solide d'un échantillon de boue non dopé. Seuls CP, IFO et TAM ont été analysés.

III.2.3.2.b) Influence de la nature de la boue sur les dynamiques

La même expérience a été reconduite sur deux boues supplémentaires pour caractériser l'influence de la nature de la matrice sur les cinétiques. Toutefois, seuls des essais impliquant une mixture des molécules cibles ont été réalisés. Les mêmes méthodologies (concentration, temps, calcul...) ont été appliquées. A partir de ces essais, **seuls les comportements d'IFO et de CP ont été étudiés.**

III.2.3.3) Détermination des isothermes de sorption

Six boues de nature variée ont été utilisées pour caractériser d'éventuelles différences dans la sorption des molécules cibles. Plusieurs aliquotes de 100 mL de boue « conditionnée », protégées de la lumière, ont été contaminées par injection de quantités croissantes d'une mixture d'IFO, de CP, de 5-FU et de TAM. Les concentrations visées sur six niveaux en IFO et CP étaient comprises en moyenne entre 1 et 50 µg/L, ce qui correspond à des quantités de polluant par gramme de particules comprises entre environ 0,2 et 8 µg/g_{part.} Pour information, les concentrations en 5-FU et TAM étaient sensiblement du même ordre de grandeur. L'expérience a été menée en doublon pour deux niveaux de concentration (5 et 25 µg/L). Les flacons ont été agités à une vitesse de 150 rpm, pendant la durée d'équilibre définie à l'issue des essais précédents (4 heures), et à une température de 23 ± 2 °C. Les deux phases ont été séparées par centrifugation. La présence originelle des composés cibles dans les deux phases a été prise en compte. Les concentrations en phase aqueuse à l'équilibre ($C_{\text{aqueuse}}^{\text{équilibre}}$ en µg/L) ont été déterminées pour chaque flacon. Les concentrations à l'équilibre d'IFO et CP sorbés sur les boues ($C_{\text{solide}}^{\text{équilibre}}$ en µg/kg_{part.}) ont été déterminées expérimentalement d'après le protocole développé dans le chapitre II, et par le calcul suivant l'équation :

$$C_{\text{solide}}^{\text{équilibre}} = \frac{(C_0 - C_{\text{aqueuse}}^{\text{équilibre}})}{[\text{Part}]} \quad \text{Eq. (III-12)}$$

La méthodologie de détermination de C_0 **pour chaque niveau** a été la suivante. Trois phases aqueuses désactivées distinctes ont été dopées à un niveau bas (2,5 µg/L), moyen (10 µg/L) et haut (30 µg/L) des essais de sorption. Les concentrations mesurées ont permis de remonter à la concentration de la solution de dopage pour chacun des cas. Ces trois valeurs ont ensuite été moyennées pour définir une concentration unique de la solution initiale. A partir de ce résultat, les concentrations dopées dans chacun des flacons ont pu être précisément déterminées. Par ailleurs, il a été parfois nécessaire de diluer certaines phases aqueuses de manière à mesurer des concentrations comprises dans les gammes de linéarité de la méthode analytique. Le [Tableau III-5](#) reprend l'ensemble des considérations du test.

Tableau III-5 : Conditions expérimentales de détermination des isothermes

Caractéristiques de l'essai						
Niveau de dopage (µg/L)	1,25	2,5	5	10	25	50
Equivalence ^a (µg/g _{part.})	0,2	0,4	0,8	2	4	8
Détermination de C_0	-	oui	-	oui	-	oui
Répétition	-	-	oui	-	oui	-
Facteur de dilution	1	1	2	4	10	20

a : pour la boue de LGC_BAME

La [Figure III-5](#) récapitule les tests effectués pour caler la procédure de sorption en considérant la boue comme un système diphasique.

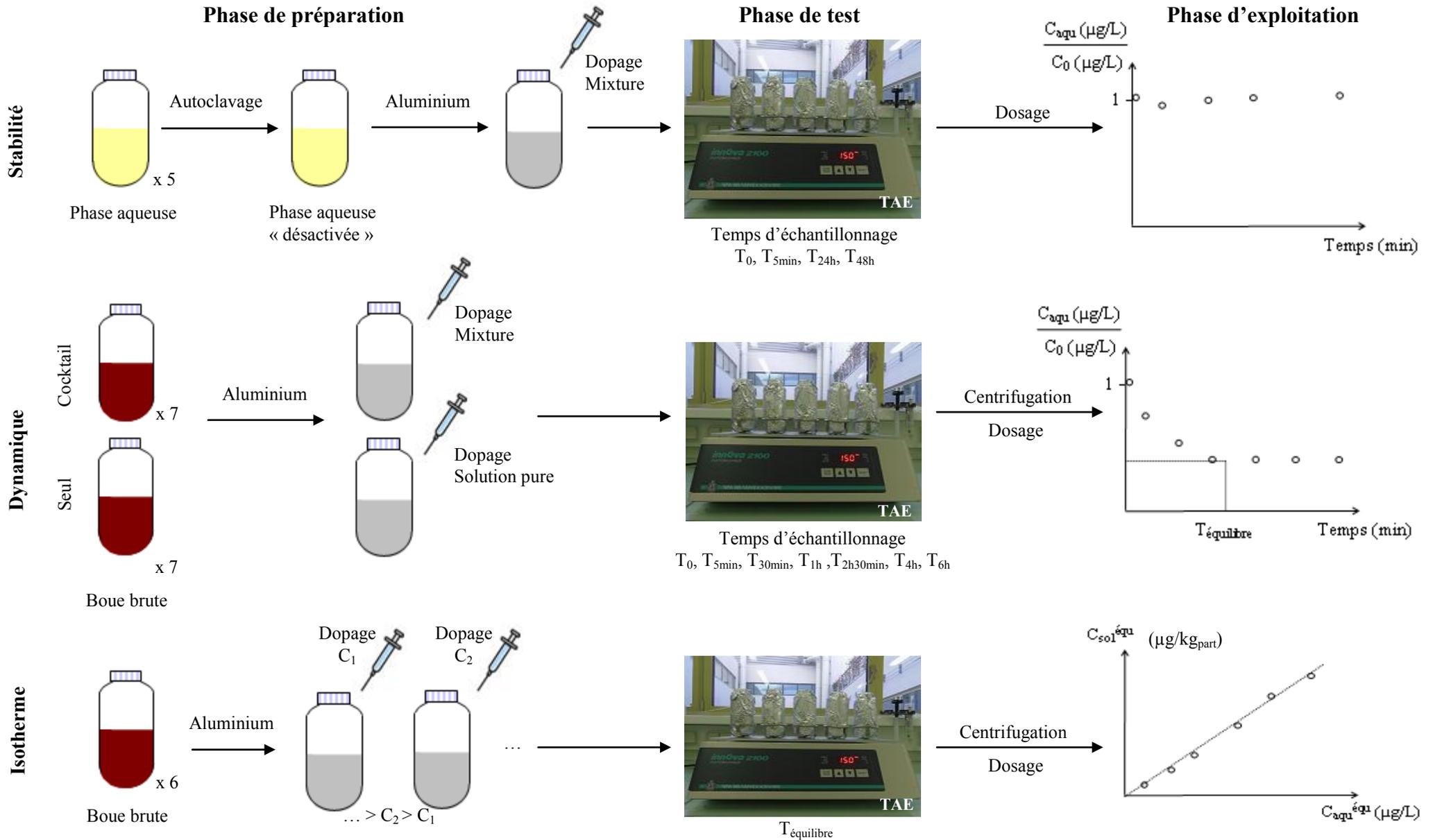


Figure III-5 : Synthèse des expériences réalisées pour le calage des essais de sorption en diphasique

III.2.4) Calage du test en système triphasique

III.2.4.1) Recherche du niveau de dopage des essais

On rappelle que l'application du système triphasique repose sur une hypothèse forte : à DCM constante, la linéarité des deux équilibres de sorption K_{part} et K_{DCM} implique un coefficient K_{global} constant. Il est indispensable d'évaluer le domaine de concentrations pour lequel cette hypothèse est vérifiée. Une boue de référence (Narbonne) a ici été utilisée. Par ailleurs, l'influence de la quantité de DCM sur les zones de « linéarité » a été étudiée.

Pour faire varier la quantité de DCM par échantillon, (Barret, 2009) propose une méthode originale consistant à mélanger trois volumes dans des proportions variables : un volume de boue brute fixe (destiné à maintenir une concentration en particules constante), un volume de sa phase aqueuse préalablement séparée, et un volume d'eau du robinet. La méthodologie imaginée est représentée sur la Figure III-6.

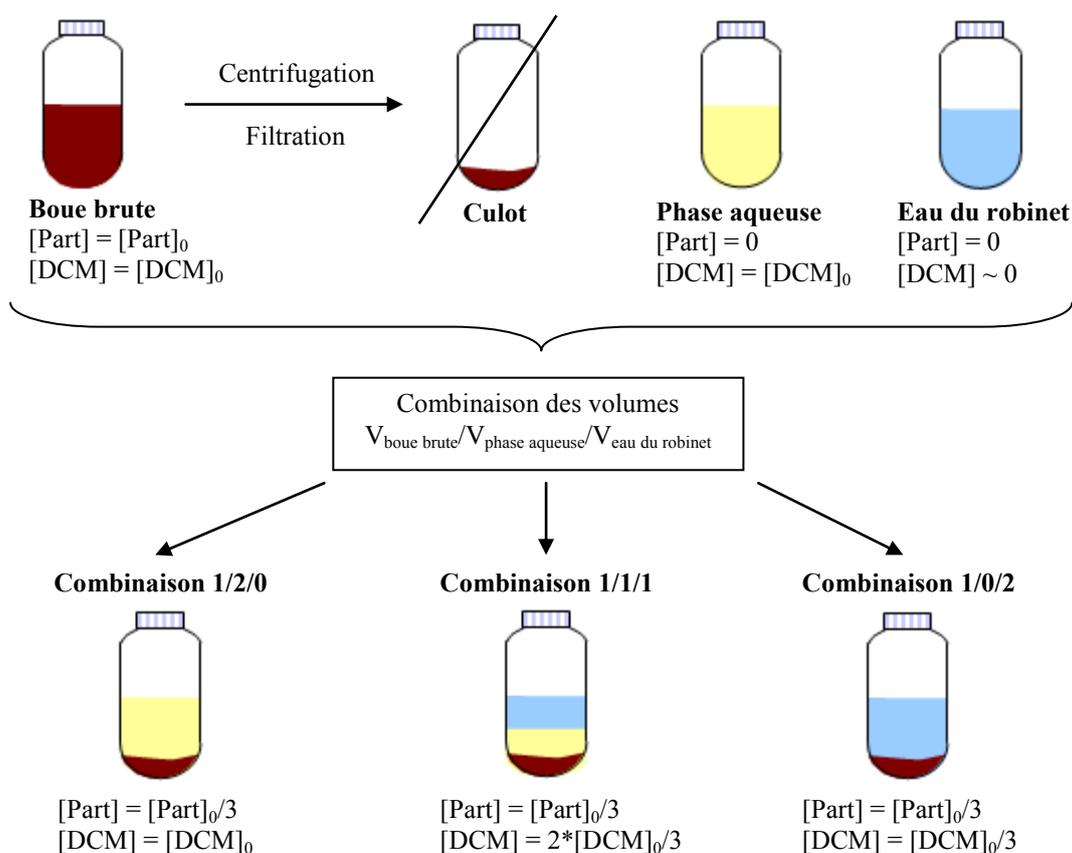


Figure III-6 : Méthodologie développée pour faire varier la DCM
(inspiré de Barret, 2009)

Les expériences sur la boue de Narbonne ont donc été menées dans le sens suivant. Deux séries, l'une à DCM maximale et l'autre à DCM minimale, ont été effectuées. Plusieurs aliquotes de 50 mL de boue « conditionnée » ont été versées dans des flacons en PPCO de 250 mL et recouverts d'aluminium. Les flacons à « DCM maximale » ont été complétés avec 150 mL de sa phase aqueuse. Les flacons à « DCM minimale » ont été complétés avec 150 mL d'eau du robinet (dilution visée : facteur 4), corrigée en pH et conductivité. En effet, le pH et la conductivité de l'eau du robinet sont différents de celui de la boue et peuvent avoir une influence notable sur les équilibres de sorption du système triphasique. Ainsi, le pH de l'eau du robinet a été corrigé au pH de la boue avec quelques gouttes d'HCl 0,1 M ou de NaOH 0,1 M. La conductivité a été corrigée

avec quelques gouttes d'une solution de NaCl 2 M. **Nous avons fait l'hypothèse que la DCM apportée par l'eau du robinet et par les solutions d'équilibrage du pH et de la conductivité était uniquement de la matière dissoute, et n'avait pas d'influence sur les équilibres de sorption.** Ces différents flacons ont par la suite été contaminés par injection de quantités croissantes d'une mixture d'IFO, de CP, de 5-FU et de TAM, et mis en œuvre suivant la procédure expérimentale décrite en III.2.3.3 (niveaux de dopage, vitesse d'agitation, temps d'équilibre...). Les expériences ont été menées une fois. 100 mL de phase aqueuse ont été dosées. La confrontation des zones de linéarité a permis de définir une concentration de travail (en $\mu\text{g/L}$, puis traduite en $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$) la plus représentative du système. La stratégie est schématisée sur la **Figure III-7**. **Pour les expériences en système triphasique, nous ne raisonnerons qu'en $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$, MS représentant la somme des particules Part ($\text{g}_{\text{part}}/\text{L}$) et de la DCM ($\text{g}_{\text{DCM}}/\text{L}$).**

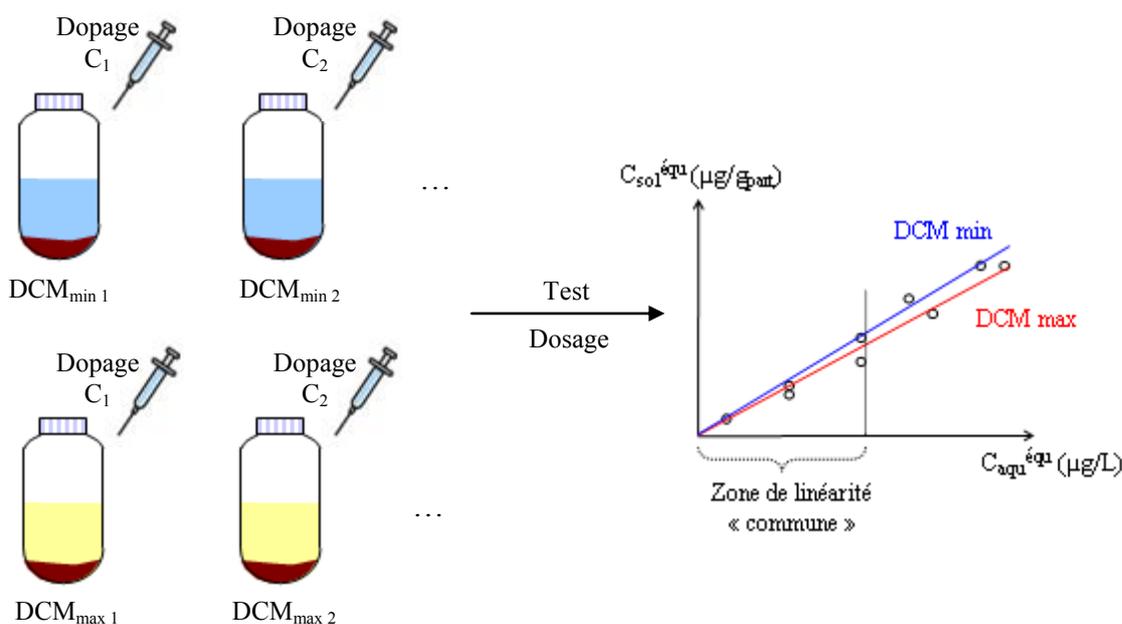


Figure III-7 : Détermination de la concentration de travail en système triphasique

III.2.4.2) Détermination des équilibres K_{part} et K_{DCM}

L'influence de la DCM sur les équilibres de partition K_{part} et K_{DCM} a été recherchée sur cinq boues. Différentes concentrations en DCM ont été obtenues en faisant varier les volumes de boue, de phase aqueuse et d'eau du robinet corrigée en pH et conductivité, suivant la méthodologie décrite dans la partie précédente. Les gammes de concentrations en DCM et particules dans les différents flacons, ici nommés composites, résultent de deux limitations pratiques :

- (i) la concentration maximale en DCM (DCM_{max}) est imposée par la concentration de la DCM dans la boue initiale ;
- (ii) la concentration minimale en DCM (DCM_{min}) est imposée par le volume minimal de la boue brute, et le volume maximum exploitable dans le flacon à centrifuger. Le volume minimal de boue est défini par la quantité de particules nécessaire pour l'analyse des polluants sorbés, soit $0,3 \pm 0,05 \text{ g}_{\text{part}}$. Le volume maximum exploitable dans le flacon est défini à 80 % du volume utile, soit 200 mL. Au-delà, des conditions de mélange satisfaisantes n'étaient plus assurées.

Lors de la préparation des composites, les volumes exacts de boue, de phase aqueuse et d'eau du robinet corrigée sont déterminés par pesée et permettent de calculer précisément les concentrations en DCM et particules (Tableau III-6). Sept composites sont générés pour chaque boue. Tous ces composites sont recouverts d'aluminium, disposés sur la TAE et dopés à une concentration précise définie lors de l'essai sur la boue de référence, soit $1 \mu\text{g/g}_{\text{MS}}$. Pour vérifier que le niveau de dopage par flacon était bien voisin de $1 \mu\text{g/g}_{\text{MS}}$, trois phases aqueuses désactivées ont été dopées dans les mêmes conditions que celles des composites de niveaux pairs (2, 4, 6). Les concentrations mesurées ont permis de remonter à la concentration de la solution de dopage pour chacun des cas. Ces trois valeurs ont ensuite été moyennées pour définir une concentration unique de la solution de dopage et obtenir précisément la quantité de polluant effectivement apportée (μg) par gramme de matière sèche (g_{MS}) pour chaque composite. En plus des sept composites par niveau, les composites de niveaux impairs (1, 3, 5, 7) ont été réalisés en doublon. Tous les flacons ont été agités à une vitesse de 150 rpm, durant 4h, et à une température de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Après séparation des phases, la concentration en phase aqueuse à l'équilibre a été déterminée sur 100 mL pour chacun des composites. Les concentrations à l'équilibre d'IFO et du CP sorbés sur les boues ont été déterminées par l'expérience. Ainsi, pour chaque analyte et chaque boue d'étude, différents couples de valeurs ($[\text{DCM}] ; K_{\text{global}}$) ont été déterminés. La Figure III-8 reprend le déroulement de la procédure et l'exploitation pour une des boues.

Tableau III-6 : Exemple d'obtention de composites pour une des boues étudiées

Boue	Composite	V_{boue} (mL)	$V_{\text{phase aqueuse}}$ (mL)	$V_{\text{eau robinet}}$ (mL)	[Particules] ($\text{g}_{\text{part}}/\text{L} ; \text{g}_{\text{MS}}$)	[DCM]* ($\text{g}_{\text{DCM}}/\text{L} ; \text{g}_{\text{MS}}$)	$\Sigma \text{ g}_{\text{MS}}$
Nailloux	Nx_1	40	0	160	1,86 ; 0,37	0,08 ; 0,02	0,38
	Nx_2	40	10	150	1,86 ; 0,37	0,10 ; 0,02	0,39
9,3 g/L	Nx_3	40	25	135	1,86 ; 0,37	0,13 ; 0,03	0,40
	Nx_4	40	50	110	1,86 ; 0,37	0,18 ; 0,04	0,41
[DCM] ₀ 0,41 g/L	Nx_5	40	80	80	1,86 ; 0,37	0,25 ; 0,05	0,42
	Nx_6	40	110	50	1,86 ; 0,37	0,31 ; 0,06	0,43
	Nx_7	40	160	0	1,86 ; 0,37	0,41 ; 0,08	0,45

* La DCM a été calculée à partir de la relation $(V_{\text{boue}} + V_{\text{phase aqueuse}}) \cdot [\text{DCM}]_0 / (V_{\text{boue}} + V_{\text{phase aqueuse}} + V_{\text{eau robinet}})$. On rappelle que la DCM de l'eau du robinet corrigée n'a pas été prise en compte dans le calcul.

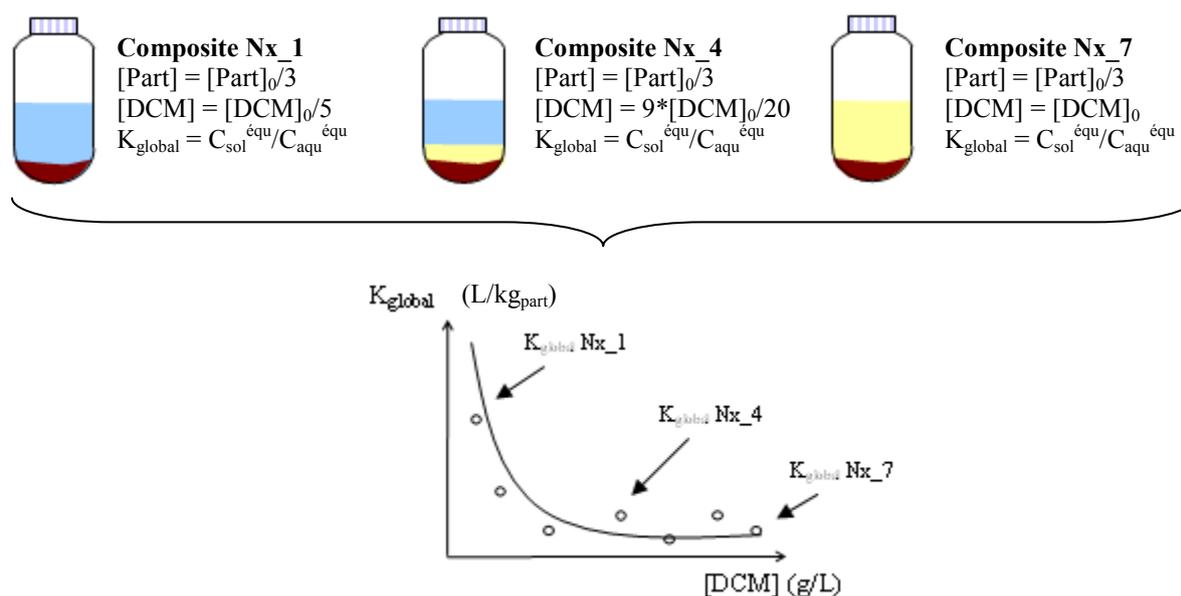


Figure III-8 : Représentation de la méthodologie appliquée en système triphasique

III.2.5) Outils d'analyse de données

III.2.5.1) Modélisation des données expérimentales

Que ce soit pour les constantes de cinétiques, les paramètres des isothermes de sorption en système diphasique, ou l'obtention des coefficients de partage en système triphasique, et pour des régressions linéaires comme non linéaires, l'adéquation entre les données expérimentales et celles prédites par le(s) modèle(s) a été réalisée grâce à la somme des carrés des écarts (SCE). Le meilleur ajustement a été obtenu en minimisant le terme SCE, défini d'après l'équation :

$$SCE = \sum_{i=1}^n (y_{\text{exp}}^i - y_{\text{prédit}}^i)^2 \quad \text{Eq. (III-13)}$$

où n représente le nombre d'expériences (= niveau), y_{exp} est la valeur expérimentale au niveau considéré, $y_{\text{prédit}}$ est la valeur prédite par le modèle pour le niveau considéré.

Cette procédure a notamment été recommandée par [Boulinguez et al. \(2008\)](#) pour l'estimation des paramètres d'isothermes de sorption. La résolution a été effectuée grâce à l'outil Solveur de Microsoft Excel[®] suite au développement d'un tableur dynamique. [Bolster et Hornberger \(2007\)](#) ont démontré que l'utilisation de cette application était largement suffisante pour de tels objectifs et aussi performante que des logiciels davantage spécialisés.

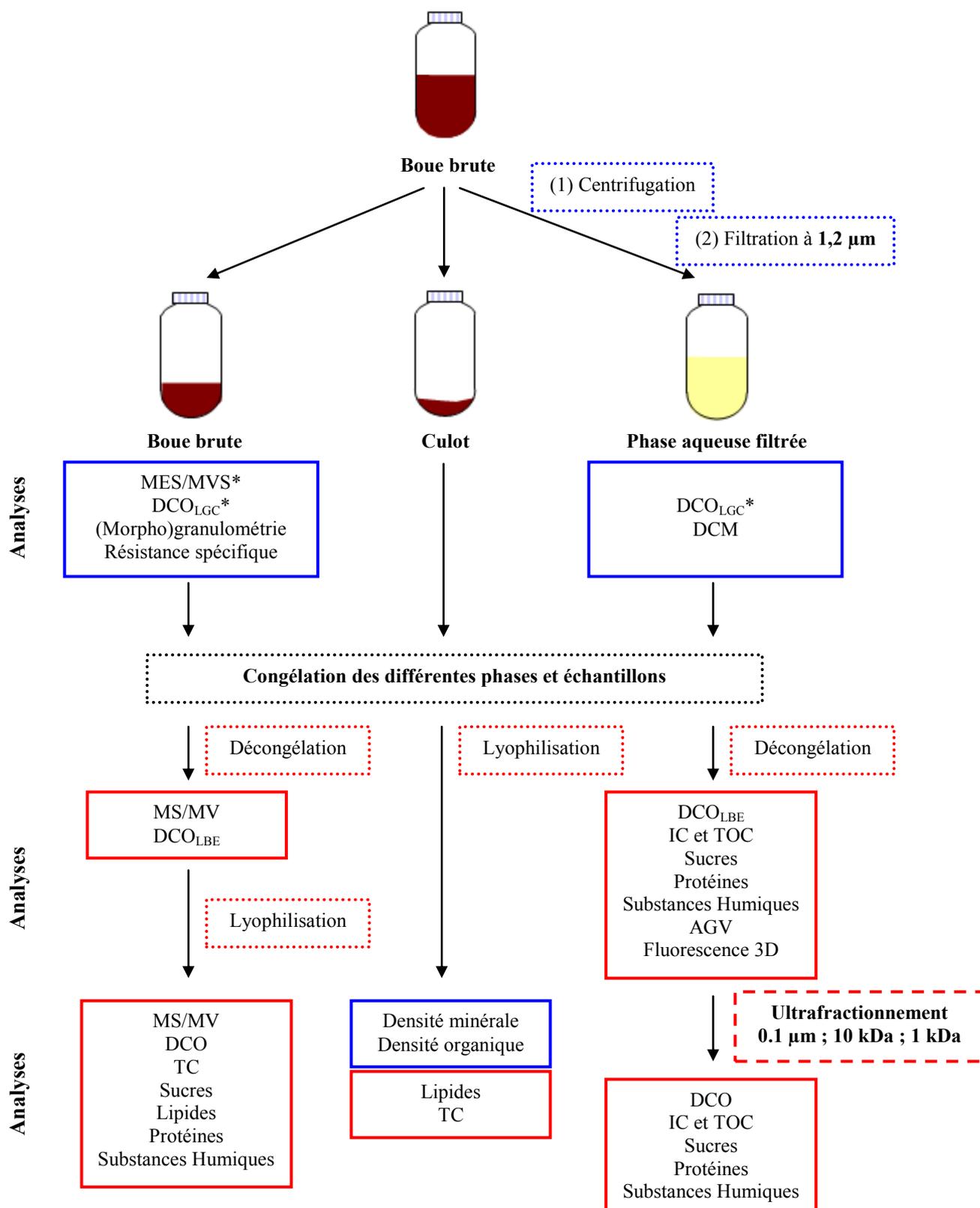
III.2.5.2) Significativité des paramètres modélisés

Le degré de significativité des différences observées entre les paramètres modélisés a été déterminé via une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur. Les échantillons de données générées sont de petite taille : nous ne pouvons donc pas vérifier s'ils suivent une loi normale, ni même s'ils possèdent une variance identique. Ces deux hypothèses ont donc été posées. L'analyse a été mise en œuvre suite au développement d'un tableur sous Microsoft Excel[®].

Le principe de l'ANOVA repose sur un test d'hypothèse. L'hypothèse à vérifier (H_0) est que tous les échantillons considérés ont la même moyenne. L'hypothèse alternative (H_1) est qu'au moins un des échantillons possède une moyenne différente des autres. Le test décompose la variance intra-classe (répétitions pour un même échantillon) et inter-classe (entre les échantillons) puis calcule un coefficient de Fischer F. Si $F_{\text{observé}}$ est supérieur au F_{critique} , alors l'hypothèse H_0 est rejetée. La p-value, dite probabilité critique, est couramment employée pour décrire le résultat de tels tests. Dans notre cas, si la p-value est inférieure à 0,05, alors H_0 est rejetée avec 5 % de risque. Si la p-value est supérieure à 0,05, le risque est trop grand pour rejeter H_0 , l'hypothèse nulle est donc validée.

III.2.6) Caractérisation des boues

L'analyse des échantillons a été réalisée suivant des caractérisations physiques, chimiques et fonctionnelles des matrices, menée conjointement par le LGC et le LBE. Les analyses au LBE ont été prises en charge par Abigail Pereira, ingénieure d'études recrutée dans le cadre du projet ANR « BioMedBoue ». Le schéma de caractérisation appliquée pour les différentes fractions de boue est décomposé sur la [Figure III-9](#). Sauf indication contraire, les analyses ont été réalisées en triplicat. Les écarts-types de répétabilité pour la plupart des méthodes appliquées ont été extraits de [Barret \(2009\)](#) et [Cea Barcia \(2012\)](#).



Les étapes et analyses effectuées par le LGC sont encadrées en **bleu**
 Les étapes et analyses effectuées par le LBE sont encadrées en **rouge**
 * Les protocoles sont décrits dans le chapitre IV

Figure III-9 : Méthodologie de caractérisation des échantillons de boues

III.2.6.1) Caractérisations physiques

III.2.6.1.a) Détermination des matières colloïdales et dissoutes DCM

Après centrifugation et filtration sur filtre en fibre de verre à 1,2 μm , un volume V de 50 mL de phase aqueuse est transféré dans un erlenmeyer vide, de masse connue (m_0). L'erlenmeyer est ensuite placé à l'étuve, à 105 $^{\circ}\text{C}$, pendant 48 heures, afin d'évaporer l'eau. Après stockage au dessiccateur pendant une heure, l'erlenmeyer est à nouveau pesé (m_1). La concentration en DCM de l'échantillon est alors donnée par l'équation :

$$\text{DCM (g/L)} = \frac{m_1(\text{g}) - m_0(\text{g})}{V(\text{mL})} \cdot 1000 \quad \text{Eq. (III-14)}$$

L'erreur de mesure a été évaluée : elle est de l'ordre de 5 %.

III.2.6.1.b) Détermination de l'aspect des floccs par morphogranulométrie

L'aspect des floccs a été caractérisé par l'utilisation d'un appareil de type Morphologi G3 (Malvern Instruments), couplant un microscope et un logiciel de traitement d'images. Cinq gouttes d'un échantillon de boue diluée dix fois sont prélevées grâce à une pipette et déposées sur la platine pour mesure. L'analyse permet d'accéder au diamètre moyen volumique des particules via le $d_{[4,3]}$ (en μm). D'autres informations sur l'aspect des floccs sont également renseignées telles que les indices de circularité, de convexité, de solidité et d'élongation (Figure III-10). Toutes ces informations sont ici renseignées pour le volume des particules (et non leur nombre) et la valeur médiane obtenue. L'erreur commise sur l'ensemble de ces mesures a été vérifiée et est inférieure à 8 % (Braak, 2012).

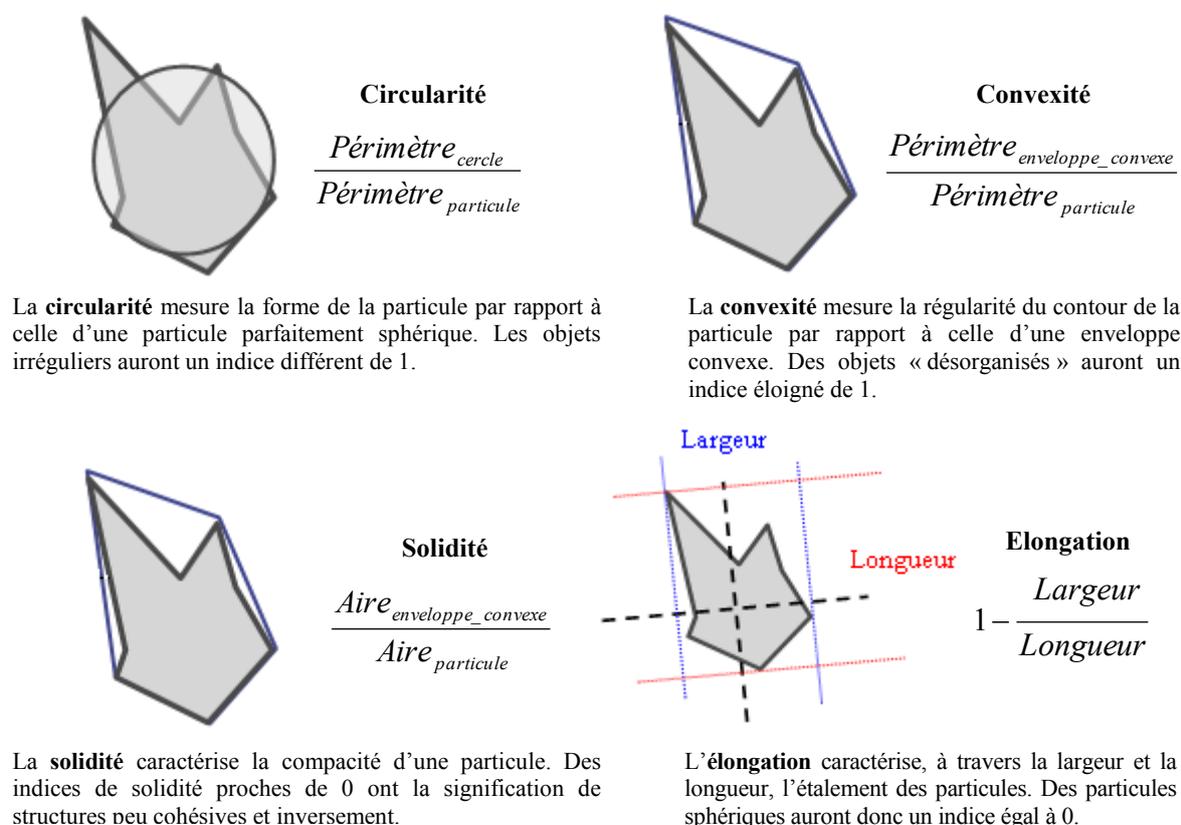


Figure III-10 : Définition des paramètres mesurés par le morphogranulomètre (inspiré de Oliveira, 2012)

III.2.6.1.c) Détermination de la résistance spécifique

La mesure de résistance spécifique permet de caractériser la filtrabilité de la boue (*i.e.* son pouvoir colmatant) par une microfiltration frontale. La boue est mise sous pression dans une cellule de filtration cylindrique de volume 60 mL. Les filtres utilisés ($\Phi = 47$ mm) sont en acétate de cellulose, avec une taille de pores de $0,2 \mu\text{m}$ (Sartorius AG, France). La filtration est réalisée sans agitation, à pression constante de 0,5 bar. Le filtrat est mesuré par pesée et enregistré au cours du temps à l'aide du logiciel LabView. L'expression ci-dessous caractérise l'évolution du volume filtré en fonction des caractéristiques de la manipulation :

$$\frac{t}{V} = \frac{\mu}{\Delta P \cdot \Omega} \left[\frac{\alpha \cdot C}{2\Omega} \cdot V + R_m \right] \quad \text{Eq. (III-15)}$$

où t est le temps de filtration (s), V le volume filtré (m^3), μ la viscosité du filtrat, considérée ici comme égale à celle de l'eau (10^{-3} Pa.s), ΔP la différence de pression imposée (Pa), Ω la surface de la membrane (m^2), α la résistance spécifique (m/kg), C la concentration en MES de la boue (kg/m^3) et R_m la résistance de la membrane ($1/\text{m}$).

La résistance spécifique est évaluée en traçant la courbe $t/V=f(V)$ qui est une fonction affine (Figure III-11). On obtient la résistance spécifique en fonction de la pente déterminée, avec une erreur de l'ordre de 8 à 10 % :

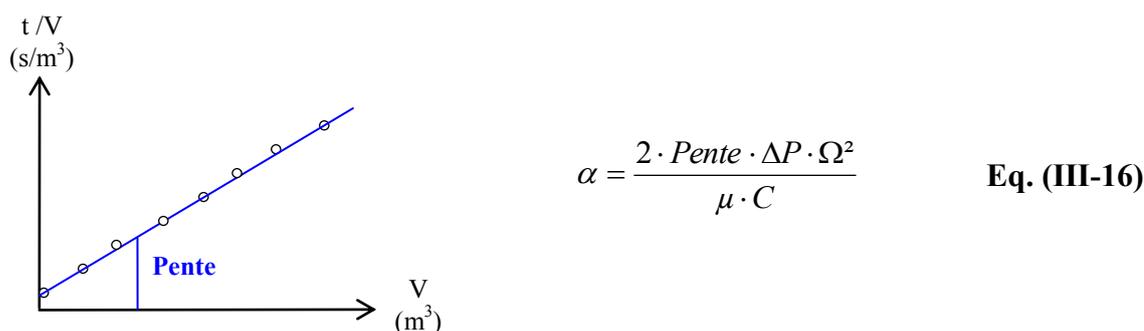


Figure III-11 : Détermination de la résistance spécifique d'une boue

III.2.6.1.d) Détermination des densités minérale et organique

Les densités de la matière totale (ρ_{tot}) et minérale (ρ_{min}) des boues sont mesurées par pycnométrie à hélium sur des échantillons secs et broyés. Dans un appareil ACCUPYC 1330 TC, une masse précise d'échantillon voisine de 0,5 g ($m_{\text{éch}}$) est introduite. De l'hélium est introduit dans la chambre de l'échantillon dont le volume est connu (V_{cell}), jusqu'à atteindre une pression fixe (P_1). La vanne reliant la chambre de l'échantillon à la chambre d'expansion (aussi de volume connu, V_{exp}) est alors ouverte. Une différence de pression s'opère jusqu'à atteindre une pression d'équilibre (P_2), directement reliée au volume occupé par l'échantillon ($V_{\text{éch}}$). Le ratio entre la masse de l'échantillon et le volume qu'il occupe donne sa densité :

$$\rho \text{ (g/mL)} = \frac{m_{\text{éch}} \text{ (g)}}{V_{\text{éch}} \text{ (mL)}} = \frac{m_{\text{éch}}}{V_{\text{cell}} - \frac{V_{\text{exp}}}{\frac{P_1}{P_2} - 1}} \quad \text{Eq. (III-17)}$$

La densité de la matière minérale ρ_{min} a été déterminée sur des échantillons de boues calcinés à $550 \text{ }^\circ\text{C}$. La densité de la matière totale ρ_{tot} (organique & minérale) a été déterminée sur des

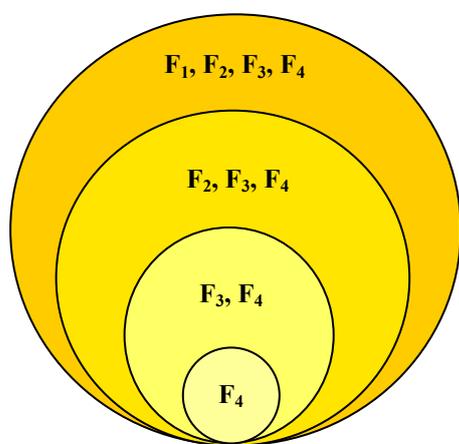
échantillons de boues séchés à 105 °C. D'après une loi des mixtures donnée par Ruiz *et al.* (2007), on peut facilement accéder à la densité de la matière organique ρ_{org} :

$$\rho_{org} = \frac{\rho_{min} \cdot \rho_{tot} \cdot \frac{MVS}{MES}}{\rho_{min} - \rho_{tot} \cdot \left(1 - \frac{MVS}{MES}\right)} \quad \text{Eq. (III-18)}$$

où MES et MVS représentent les teneurs en matières en suspension et volatiles en suspension. L'erreur de mesure a été évaluée et est inférieure à 2 % pour les échantillons analysés.

III.2.6.1.e) Ultrafractionnement de la phase aqueuse

Le critère physique défini pour la caractérisation de la matière dissoute et colloïdale est sa répartition en classes de taille. **Quatre fractions sont définies : F₁ concerne les molécules comprises entre 0,1 et 1,2 µm, F₂ entre 10 kDa et 0,1 µm, F₃ entre 1 et 10 kDa et F₄ en dessous de 1 kDa** (Figure III-12). La filtration à 1,2 µm a été réalisée sur filtre en fibre de verre et sous vide. Pour les autres filtrations, il est nécessaire d'utiliser des cellules amicon® qui fonctionnent sous pression d'air, et avec une agitation magnétique afin d'éviter le colmatage des filtres. Les membranes utilisées sont en acétate de cellulose régénérable (hydrophiles) et possèdent une bonne résistance aux pressions élevées. Les pressions appliquées sont de l'ordre de 1 à 3 bars suivant le seuil de coupure : plus le seuil sera fin et plus la pression de filtration à appliquer devra être importante. Chaque filtrat des différentes boues a été finement caractérisé. Un profil de répartition suivant les différentes fractions générées est calculé comme suit (X désigne un paramètre arbitraire) :



$$F_1 = \frac{X_{<1,2\mu m} - X_{<0,1\mu m}}{X_{<1,2\mu m}} \quad \text{Eq. (III-19)}$$

$$F_2 = \frac{X_{<0,1\mu m} - X_{<10kDa}}{X_{<1,2\mu m}} \quad \text{Eq. (III-20)}$$

$$F_3 = \frac{X_{<10kDa} - X_{<1kDa}}{X_{<1,2\mu m}} \quad \text{Eq. (III-21)}$$

$$F_4 = \frac{X_{<1kDa}}{X_{<1,2\mu m}} \quad \text{Eq. (III-22)}$$

Figure III-12 : Principe de l'ultrafractionnement et équations associées (inspiré de Pereira, 2012)

Entre chaque filtration, le contenu des filtres a été soigneusement récupéré à l'aide d'eau ultrapure et conservé. Les membranes peuvent être utilisées plusieurs fois, mais une régénération est nécessaire entre chaque utilisation. La régénération des membranes a été effectuée par trempage dans une solution basique et légèrement éthanolique (10 %). Au maximum, dix régénérations peuvent être assurées.

III.2.6.2) Caractérisations chimiques

III.2.6.2.a) Détermination des matières sèches MS et volatiles MV

Dans un creuset en céramique taré (m_T), environ 50 mL d'échantillon (boue totale ou phase particulaire ou phase aqueuse) sont introduits. Le creuset est ensuite pesé (m_0), puis placé à l'étuve à 105 °C pendant 24 h afin d'évaporer l'eau. Après stockage au dessiccateur, le creuset est à nouveau pesé (m_{105}). Enfin, l'échantillon est disposé dans un four à 550 °C pendant 2h, et pesé à nouveau (m_{550}). La comparaison des différentes pesées permet d'accéder aux concentrations en matières sèches (MS) et volatiles (MV) suivant les équations :

$$MS \text{ (g/kg)} = \frac{m_{105}(g) - m_T(g)}{m_0(g) - m_T(g)} \cdot 1000 \quad \text{Eq. (III-23)}$$

$$MV \text{ (g/kg)} = \frac{m_{105}(g) - m_{550}(g)}{m_0(g) - m_T(g)} \cdot 1000 \quad \text{Eq. (III-24)}$$

L'erreur commise est de 2 % pour des échantillons liquides, et de 5 % pour des boues totales.

III.2.6.2.b) Détermination de la demande chimique en oxygène DCO

La demande chimique en oxygène (DCO) des boues totales ou de leur phase aqueuse est mesurée à l'aide de kits Spectroquant (Merck), en accord avec la norme ISO 15 705. Les tubes commercialisés dans lesquels 2 mL d'échantillon sont introduits contiennent un excès de dichromate de potassium qui permet l'oxydation totale de la matière après 2 heures, en conditions acides, et à 150 °C. La détection est assurée par spectrophotométrie à 562 nm, dans la gamme 15 – 150 mg_{O₂}/L pour les échantillons aqueux et 150 – 1500 mg_{O₂}/L pour les échantillons particulaires. L'erreur commise sur les échantillons liquide est de 5 %, et atteint 10 à 15 % en présence de particules, notamment du fait de l'hétérogénéité de la matrice et du faible volume prélevé (Barret, 2009).

III.2.6.2.c) Détermination des teneurs en carbone organique, inorganique et total

Les teneurs en carbone organique total (TOC), carbone inorganique (IC) et carbone total (TC) ont été mesurées à l'aide d'un analyseur de carbone TOC-V (Shimadzu), qui utilise une méthode de combustion catalytique à haute température pour la fraction organique et une méthode chimique de déplacement de l'équilibre acido-basique pour la fraction minérale. Le CO₂ produit est détecté par infrarouge. Les différentes teneurs sont reliées par les équations suivantes :

$$TC = TOC + IC \quad \text{Eq. (III-25)}$$

$$TOC = POC + NPOC \quad \text{Eq. (III-26)}$$

$$TC = POC + NPOC + IC \quad \text{Eq. (III-27)}$$

où POC est le carbone organique purgeable et NPOC le carbone organique non purgeable.

Le TC a été mesuré sur les échantillons solides (g_{TC}/g_{part}). Il a été obtenu après combustion totale à 680 °C avec un catalyseur cobalt/platine (Co/Pt) en présence d'oxygène pur. Pour les échantillons liquides, le TC (mg_{TC}/L) a été calculée à partir des mesures d'IC (mg_{IC}/L) et de TOC (mg_{TOC}/L). L'IC de l'échantillon a été obtenu après acidification et dégazage à l'oxygène. D'après l'équation (III-26), le TOC correspond à la somme du POC et NPOC des échantillons. Le NPOC a ici été supposé nul : le TOC est donc égal au POC. Le POC a été obtenu après acidification, dégazage et combustion totale du liquide minéralisé dans les mêmes conditions que le TC.

III.2.6.2.d) Détermination des protéines et des substances humiques

Les protéines sont dosées suivant la méthode de Lowry modifiée par [Frolund *et al.* \(1996\)](#). Elle consiste à former un complexe entre les liaisons peptidiques des atomes d'azote et le sulfate de cuivre CuSO_4 , en milieu alcalin. Ce complexe réduit alors les acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques du réactif Phénol-Folin-Ciocalteau pour donner un second complexe de couleur bleue et mesuré au spectrophotomètre à 750 nm. Lors de l'utilisation de cette méthode, des interférences dues à la présence de substances humiques sont possibles lors de la lecture spectrophotométrique. Ainsi, [Frolund *et al.* \(1996\)](#) ont modifié la méthode établie par Lowry pour prendre en compte les substances humiques dans la mesure des protéines. Cette méthode est basée sur la mesure du développement de couleur en présence et en absence de CuSO_4 .

En présence de CuSO_4 , aussi bien les protéines que les substances humiques sont dosées. En l'absence de CuSO_4 , le développement de couleur est dû aux composés humiques et aux acides aminés, alors que la coloration développée par l'albumine de sérum bovin BSA est réduite de 20 % ([Frolund *et al.*, 1996](#)). A partir des différentes absorbances lues (Abs), il est possible de déterminer l'absorbance des protéines et des substances humiques suivant le système :

$$\text{Abs totale (avec CuSO}_4) = \text{Abs protéines} + \text{Abs substances humiques} \quad \text{Eq. (III-28)}$$

$$\text{Abs totale (sans CuSO}_4) = 0,2 \cdot \text{Abs protéines} + \text{Abs substances humiques} \quad \text{Eq. (III-29)}$$

$$\text{Abs protéines} = 1,25 \cdot (\text{Abs totale (avec CuSO}_4) - \text{Abs totale (sans CuSO}_4)) \quad \text{Eq. (III-30)}$$

$$\text{Abs substances humiques} = \text{Abs totale (sans CuSO}_4) - 0,2 \cdot \text{Abs protéines} \quad \text{Eq. (III-31)}$$

Les concentrations en protéines et en substances humiques sont établies à partir de gammes étalons de concentrations 20, 40, 80, 100 mg/L, réalisées respectivement avec du BSA (Sigma A7906) et des acides humiques AH (Fluka 53680). Les résultats sont donc exprimés en équivalent $\text{g}_{\text{BSA}}/\text{L}$ pour les protéines, et en équivalent $\text{g}_{\text{AH}}/\text{L}$ pour les substances humiques. L'erreur de mesure est de 5 % pour la concentration en protéines solubles.

III.2.6.2.e) Détermination des sucres

Le dosage des sucres dans les boues totales ou leur phase aqueuse est basé sur la réaction avec l'anthrone ([Dreywood, 1946](#)). La solution de réactif est préparée par dilution d'anthrone dans de l'acide sulfurique à 98 %, à raison de 2 g/L.

L'étalonnage est réalisé grâce à des solutions de glucose à 20, 40, 60, 80 et 100 mg/L. 1 mL d'échantillon ou de standard ainsi que 1 mL de solution de réactif sont disposés dans des tubes à essais, puis plongés dans un bain-marie à 95 °C pendant 10 minutes. A cette température et en milieu acide, les sucres réducteurs sont déshydratés pour donner des dérivés furfuraliques. Ces derniers se condensent avec l'anthrone, générant une couleur verte pour les hexoses. Après refroidissement dans de la glace, l'absorbance est lue à 625 nm et permet d'obtenir la concentration en sucres en équivalent glucose ($\text{g}_{\text{glucose}}/\text{L}$). L'erreur de mesure est inférieure à 10 %.

III.2.6.2.f) Détermination des lipides

Le dosage des lipides dans les échantillons lyophilisés et finement broyés est mené grâce à un extracteur de type ASE 200 (Dionex). Les cellules ASE sont remplies d'1 g d'échantillon. L'extraction est réalisée à l'éther de pétrole, à une température de 105 °C et une pression de 67 bars, pendant 10 minutes. Chaque cellule subit trois cycles sous ces conditions. A chaque cycle, l'intégralité du solvant contenu dans les cellules est purgé. Les extraits sont récupérés dans des collecteurs préalablement tarés. L'éther de pétrole est évaporé à l'aide d'un Mutlivapor (Büchi) dans

lequel les échantillons sont agités, chauffés à 45 °C, sous vide (0.5 bar), et l'éther de pétrole est condensé à 4 °C. Les traces de solvant restantes sont ensuite éliminées à l'étuve à 105 °C, avant pesée du vial après dessiccation. La différence par rapport à la tare permet de mesurer la masse de matière extractible à l'éther de pétrole par unité de masse d'échantillon, à 5 % près.

III.2.6.2.g) Détermination des acides gras volatils AGV

Les acides gras volatils (AGV) sont dosés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). 1 µL d'un mélange 50/50 (v/v) de phase aqueuse de boue et d'étalon interne à 1 g/L (acide éthyl-2-butyrique) sont injectés dans la colonne capillaire Econocap FFAP Altech (L = 15 m ; $\Phi_{\text{colonne}} = 0,53$ mm ; épaisseur de phase = 1,2 µm). Le gaz vecteur est composé de N₂ (25 bar), d'H₂ (50 bar) et d'air (100 bar). L'injecteur est maintenu à 250 °C, le détecteur à 275 °C, alors que le four à colonne adopte un gradient de 80 °C à 120 °C en 3 minutes. La quantification est réalisée par des étalons externes à 1 g/L et permet de mesurer les acides acétique (t_R : 3,8 min), propionique (t_R : 4,8 min), isobutyrique (t_R : 5,2 min), butyrique (t_R : 6,3 min), iso-valérique (t_R : 7,3 min) et valérique (t_R : 9,2 min). La limite de quantification est de 100 mg/L, pour une erreur de mesure de 2 %.

III.2.6.3) Exploitation des mesures

Les analyses de sucres, protéines, substances humiques, DCO et MS/MV réalisées sur la boue totale et la phase aqueuse filtrée à 1,2 µm ont permis d'accéder aux concentrations dans la phase particulaire. Pour assurer une comparaison entre toutes les mesures en phase particulaire, les concentrations ont été rapportées à la mesure de matières sèches (g_{part}/L) et sont donc exprimées en $g.../g_{\text{part}}$. Pour les fractions aqueuses ultrafiltrées, il n'y a pas de mesure de matière sèche sous forme DCM (g_{DCM}/L) pour toutes les fractions. Les concentrations ont donc été rapportées au carbone total (TC en mg_{TC}/L) et sont exprimées en $mg.../mg_{\text{TC}}$. Bien que très souvent appliquée (Holbrook *et al.*, 2004), la normalisation par rapport à la mesure du carbone organique total (TOC en mg_{TOC}/L) n'a pas été choisie car jugée trop restrictive sur le rôle de la matière des boues dans les phénomènes de sorption.

III.2.7) Recherche de corrélations par analyse en composante principale

La mise en relation des caractéristiques de sorption (paramètres) avec les caractéristiques physico-chimiques des boues et des analytes étudiés implique l'accumulation et la confrontation d'un nombre de données conséquent : la recherche de corrélations possibles de proche en proche n'est donc pas une démarche envisageable. Pour mettre rapidement en évidence les liens entre plusieurs variables sur un jeu de données important, l'utilisation de l'analyse en composantes principales (ACP) est privilégiée. L'ACP explore les relations linéaires entre variables, bien que d'autres types de relations puissent exister. Les relations linéaires peuvent toutefois être considérées comme une approximation souvent satisfaisante dans une première approche.

L'ACP est une méthode puissante à visée descriptive : elle permet de condenser les informations pour les interpréter plus facilement. L'objectif de cette analyse est de représenter un nuage de points multidimensionnel, constitué de n individus et p variables quantitatives, selon des axes de projection privilégiés appelés axes principaux (AP). Elle revient donc à chercher le meilleur espace de représentation de dimension réduite, permettant au mieux de visualiser la forme d'un nuage à p dimensions. L'ACP peut être décomposée en quatre étapes fondamentales : (i) l'obtention de variables centrées réduites, (ii) l'obtention des AP, (iii) la projection des variables et (iv) la projection des individus. L'obtention de variables centrées réduites, appelée également standardisation, permet d'accorder la même importance à chaque variable, s'affranchissant ainsi des problèmes liés aux unités ou aux différences de variances importantes. La définition des AP est ensuite réalisée par la diagonalisation de la matrice des corrélations, qui en extrait les vecteurs propres et les valeurs propres associées. La valeur propre s'interprète comme la « variance expliquée » par l'axe considéré. On sélectionnera donc des valeurs propres élevées pour avoir une qualité de représentation des données la plus satisfaisante possible. La projection des variables sur les AP permet d'estimer la qualité de leur représentation dans le plan considéré, et est évaluée à partir de la distance au bord d'un cercle de rayon 1 : plus la variable sera proche du bord, mieux elle sera représentée. Ainsi sur la [Figure III-13](#), les variables sont dans l'ensemble bien représentées. De plus, les variables E et D sont colinéaires et corrélées positivement, les variables A et B sont colinéaires et corrélées négativement, la variable C est orthogonale aux variables A et B : il n'y a pas de corrélation.

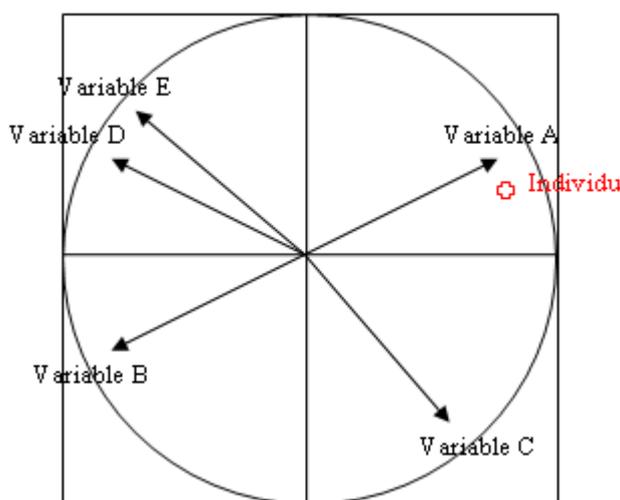


Figure III-13 : Représentation arbitraire d'un jeu de données par ACP

III.3) Résultats et Discussion

III.3.1) Précision sur le conditionnement des boues avant essai

Dans chaque flacon et en début de test, le remplacement de l'oxygène dissous O_2 par l'azote N_2 a été vérifié par mesure à l'aide d'une sonde à oxygène Mettler Toledo 4100°. Les concentrations relevées étaient voisines de 0 mg/L, confirmant une teneur en O_2 dissous très résiduelle et l'intérêt du bullage au N_2 . On peut alors supposer que l'activité bactérienne est fortement limitée durant les essais, sans confirmer sa inhibition totale. En effet, nous avons conscience que lorsque la boue entre en possible phase anoxie, traduisant l'absence d' O_2 dissous mais pas d'oxygène lié, la mesure perd de son utilité et ne rend plus compte de ce qui se passe au sein de la matière. Il aurait été préférable d'utiliser une sonde RedOx qui mesure une différence de potentiel caractéristique de chacune des « phases épuratoires » de la boue (aérobie, anoxie, anaérobie), et aurait permis d'affiner le comportement. Les précautions de manipulation appliquées permettent toutefois d'envisager des variations de potentiel négligeables. Nous avons considéré que le bullage de N_2 n'entraînait pas de défloculation, ce qui pourrait être apprécié par (morpho)granulométrie. Par ailleurs, le transfert d' O_2 lors de l'agitation n'a pas été contrôlé à la fin des essais. On rappelle cependant que les flacons sont hermétiquement clos et limitent donc ce phénomène.

III.3.2) Etude de la stabilité des analytes

La Figure III-14 retrace l'évolution dans le temps de la concentration en IFO, CP et TAM rapportée à la concentration initiale C_0 . La valeur de C_0 est renseignée et résulte d'un compromis entre concentration environnementale possible et confort d'analyse. Les barres d'erreur ont été obtenues à partir des écarts-type évalués lors de la validation de méthode sur la phase aqueuse, décrite dans le chapitre II. On rappelle que 5-FU a été ajouté à une concentration de 50 $\mu\text{g/L}$.

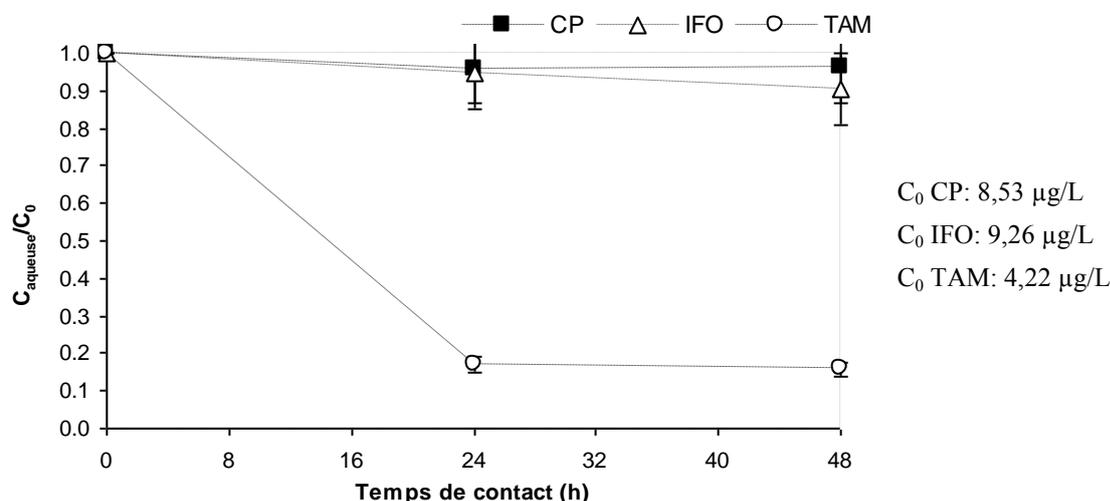


Figure III-14 : Evolution de la stabilité des analytes dans le temps ($t = 0, 24$ et 48 heures)

Sur les différents prélèvements, la concentration en IFO et CP est stable. Ce premier résultat permet donc de s'assurer qu'il n'y aura pas de perte abiotique pendant la durée des essais de sorption, certainement inférieure à 48 heures. Cette observation peut être étendue à d'éventuels essais de biodégradation de même durée (Joss *et al.*, 2006). La concentration en TAM montre une diminution franche entre t_0 et t_{24} , puis reste constante au-delà. Compte-tenu des précautions de manipulation, des pertes par photodégradation et biodégradation ne sont pas envisageables. Des pertes par hydrolyse, adsorption sur les parois du flaconnage et sur le matériel biologique dénaturé par autoclavage pourraient avoir lieu. Cependant, le mécanisme précis est difficilement identifiable.

Pour augmenter la résolution aux faibles de temps de contact, l'expérience a été renouvelée en diminuant le pas de temps et l'intervalle d'étude. Le résultat est donné sur la [Figure III-15](#).

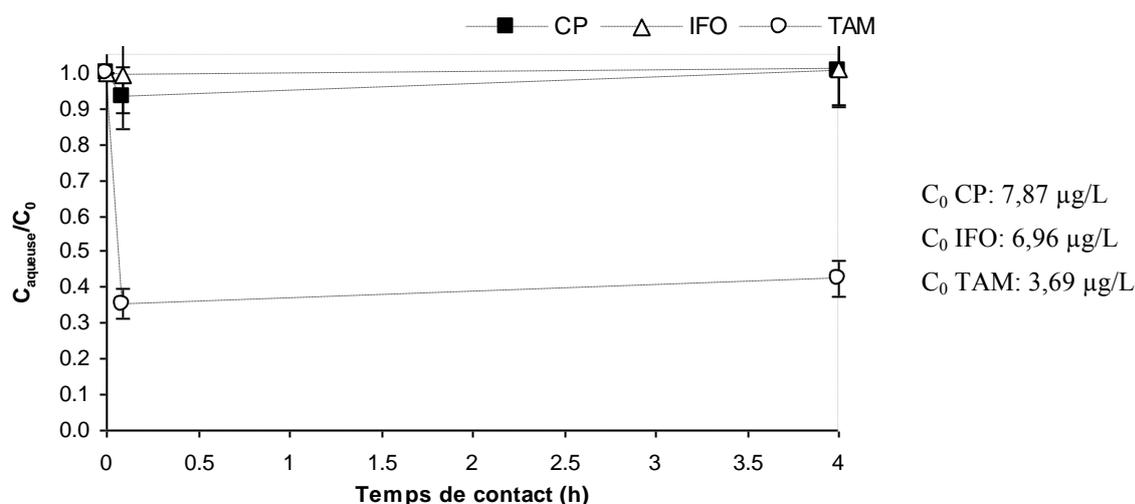


Figure III-15 : Evolution de la stabilité des analytes dans le temps (t = 0, 5 minutes et 4 heures)

Le même profil est obtenu pour CP et IFO alors que la concentration en TAM présente une diminution instantanée puis reste stable. L'hypothèse d'une adsorption sur les parois est forte. Elle a été validée en dosant qualitativement les eaux de rinçage des flacons : **le TAM était présent dès la première eau et après plusieurs rinçages, même avec de l'eau acidifiée**. Ce comportement était prévisible puisque nous avons déjà démontré l'adsorption du TAM lors du développement de la méthode analytique pour la phase solide. Ce résultat complémentaire met en évidence l'affinité du TAM pour différents types de supports et soulève des questions quant aux moyens à mettre en œuvre pour caractériser son devenir dans l'environnement, ou plus généralement au-delà de son excrétion. Même qualitativement, évaluer la sorption du TAM sur la boue peut être intéressant. En effet, même si l'affinité pour le flaconnage est avérée, l'introduction de matière particulièrement fortement organique est susceptible de déplacer cet équilibre. L'expérience mérite donc d'être conduite en milieu boue.

III.3.3) Etude préliminaire sur les dynamiques de sorption

Les objectifs principaux des expériences menées dans cette sous-partie consistaient à évaluer (i) le temps d'équilibre de sorption des molécules cibles sur les boues, et (ii) l'influence éventuelle de l'addition simultanée de plusieurs polluants sur les équilibres de sorption. **L'obtention de constantes de cinétique ne constituait qu'un objectif très secondaire. Par ailleurs, seule la phase aqueuse des échantillons a ici été analysée.**

III.3.3.1) Dynamique de sorption du tamoxifène

Le comportement du TAM lors de l'addition de boue activée (Ginestous_1) a été étudié pour un dopage de la molécule seule, ou en cocktail. La Figure III-16 présente l'évolution de la concentration en TAM dans le temps, rapportée à la concentration initiale C_0 .

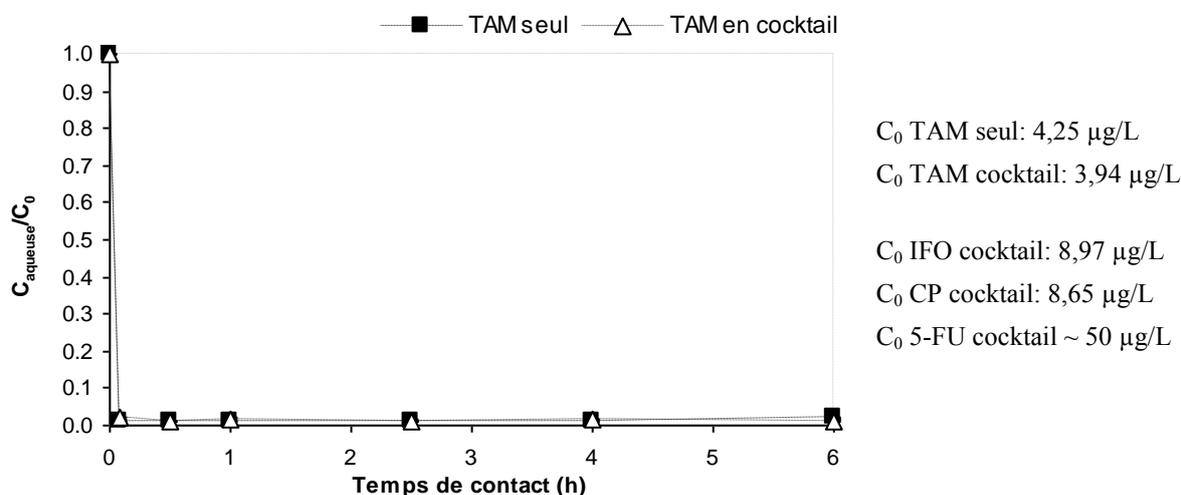


Figure III-16 : Evolution de la distribution de TAM en phase aqueuse - essai boue

Comme pour le précédent essai, la sorption du TAM et son équilibre sont instantanés (< 5 minutes). Il n'est donc pas possible de la caractériser par une constante cinétique. De plus, la présence ou non d'autres polluants ne semble pas affecter la dynamique de sorption. Une sorption très rapide est généralement observée pour les molécules possédant des propriétés hydrophobes, qu'elle soit seule (Feng *et al.*, 2010) ou en présence d'autres polluants (Urase et Kikuta, 2005 ; Barret, 2009). On peut penser qu'un possible lien existe entre caractéristiques physico-chimiques des polluants et cinétiques de sorption, mais ce lien est difficilement descriptible avec le peu de données à disposition.

Cet essai met en évidence une sorption très importante du TAM, ce qui est cohérent avec la littérature (Barron *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2011). Près de 99 % de la quantité introduite est sorbée, ce qui équivaudrait à un coefficient de distribution apparent de 10 000 L/kg_{part}. Par ailleurs, il n'y a pas de phénomène apparent de compétition ou de synergie. Le terme apparent peut être expliqué suivant trois raisonnements : on pourrait considérer (i) une absence réelle de compétition si la sorption du TAM et des autres molécules n'impliquent pas les mêmes sites d'interactions, (ii) une absence possible de compétition si la disponibilité de sites est suffisamment importante par rapport aux concentrations injectées, (iii) le TAM est lui-même un compétiteur fort et sa sorption est préférentielle par rapport aux autres analytes. Les mécanismes de sorption ne sont pas clairs. On peut toutefois supposer des interactions liées à l'hydrophobicité ($\text{Log } K_{ow} = 6,3$) de même que des interactions électrostatiques puisque TAM possède des propriétés basiques et est très légèrement protoné au pH de l'essai (2,2 % à pH 7,2).

Pour résumer, on peut caractériser la sorption du TAM comme instantanée et forte sur la boue activée et le flaconnage, mais il est impossible de la quantifier précisément, d'une part parce qu'une méthode sur la phase solide n'a pu être mise au point, et d'autre part parce que la concentration en phase aqueuse est proche de la limite analytique basse et associée à une erreur importante. **Par conséquent, il n'est pas possible de proposer une procédure de sorption fiable pour cette molécule : elle ne sera plus discutée jusqu'à la fin du manuscrit, ni recherchée, mais conservée dans le cocktail.**

III.3.3.2) Effet du cocktail de médicaments sur la dynamique de sorption d'IFO

L'effet de la présence ou non de compétiteurs sur la distribution d'IFO a été étudié pour un échantillon de boues (Ginestous_1). La Figure III-17(a) représente l'évolution des concentrations rapportées à C_0 en fonction du moment du prélèvement. La Figure III-17(b) est orientée sur les faibles temps de contact. L'écart-type a été calculé pour le temps de contact le plus long (*i.e.* 6 heures) et supposé identique ou proche pour les autres prélèvements. En raison de problèmes analytiques, les cinétiques pour CP (et TAM) ne sont pas disponibles.

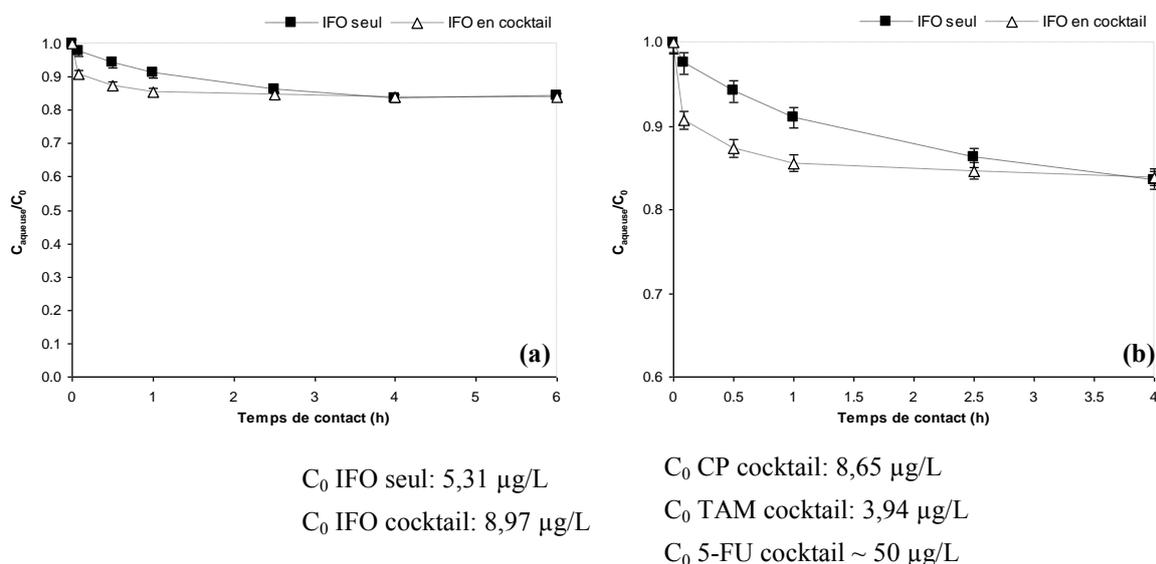


Figure III-17 : Evolution de la distribution d'IFO en phase aqueuse suivant la présence ou non de compétiteurs pour différents temps de contact

Peu importe l'essai considéré, la sorption d'IFO se réalise de manière « rapide » (mais non instantanée) pendant les 2 premières heures, puis se stabilise ou évolue très peu pour des temps de contact plus importants. On peut émettre l'hypothèse d'une sorption d'IFO en plusieurs (deux ?) temps : (i) une sorption de surface pour des sites d'accessibilité directe ou de forte affinité puis, (ii.a) une sorption (de surface ?) pour des sites d'accessibilité plus relative ou de faible affinité ou, (ii.b) une sorption davantage dans le volume de la matrice et cinétiquement contrôlée par des mécanismes de diffusion, considérés comme lents voire très lents. Des temps de contact plus longs auraient peut-être permis d'appuyer une des deux dernières hypothèses. Tous ces processus pourraient également se dérouler de façon concomitante, tout comme d'autres mécanismes. Leur identification ne constitue pas dans cet essai un objectif de recherche. Par ailleurs, le plateau observé au-delà de 4 heures de temps de contact suggère que les processus de biodégradation ont été fortement limités pendant toute la durée de l'essai et permet de valider les tendances. Quoiqu'il en soit, la dynamique d'IFO est influencée par la présence ou non d'autres médicaments, contrairement à celle observée pour TAM sur la même boue. La nature physico-chimique des polluants est donc déterminante dans les cinétiques de sorption. En cocktail, la sorption d'IFO s'effectue de manière plus rapide que lorsque la molécule est seule. Pour caractériser ces vitesses, les modèles cinétiques présentés dans l'état de l'art ont été utilisés. Pour être respectueux des concentrations suivies, il a été nécessaire de retravailler ces équations qui étaient établies pour représenter l'évolution des concentrations en phase solide et non en phase aqueuse. Les équations déduites sont données dans le Tableau III-7.

Tableau III-7 : Equations des modèles cinétiques des pseudo-premier et second ordres pour le suivi de l'évolution des concentrations en phase aqueuse

Modèle du pseudo-premier ordre
$\frac{dC_t^{aqueux}}{dt} = -k_1 \cdot (C_{\text{équilibre}}^{aqueux} - C_t^{aqueux})$
Intégration entre 0 et t
$\ln(C_t^{aqueux} - C_{\text{équilibre}}^{aqueux}) = \ln(C_0^{aqueux} - C_{\text{équilibre}}^{aqueux}) - k_1 \cdot t$
Modèle du pseudo-second ordre
$\frac{dC_t^{aqueux}}{dt} = -k_2 \cdot (C_{\text{équilibre}}^{aqueux} - C_t^{aqueux})^2$
Intégration entre 0 et t
$\frac{1}{(C_t^{aqueux} - C_{\text{équilibre}}^{aqueux})} = \frac{1}{(C_0^{aqueux} - C_{\text{équilibre}}^{aqueux})} + k_2 \cdot t$

Pour chacun des essais, on dispose de 7 points de cinétiques. D'après les préconisations d'[Al Mardini \(2008\)](#) pour la détermination des modèles cinétiques, seuls 4 des 7 points ne dépassent pas 80 à 90 % de l'équilibre et ont été exploités. Le résultat du calage des paramètres est donné dans le [Tableau III-8](#).

Tableau III-8 : Obtention des paramètres de cinétiques pour IFO suivant le modèle et le nombre de points considérés

Essai	Nombre de points	Pseudo-premier ordre		Pseudo-second ordre	
		k_1 (L/(g _{part} .j))	R ²	k_2 (10 ⁻⁴ g _{part} /(ng.min))	R ²
IFO seul	4 points	2,36	0,884	0,22	0,962
IFO en cocktail	4 points	7,05	0,623	3,91	0,971

D'après le seul critère du coefficient de détermination R², les résultats du [Tableau III-8](#) indiquent que le modèle du pseudo second-ordre est le plus adéquat pour décrire les cinétiques de sorption d'IFO. Ce résultat est rarement observé dans la littérature ([Feng et al., 2010](#)) et soulève des interrogations quant à sa signification. En effet, il pourrait être le fruit d'une réalité physique, mais également dû à une forte approximation en raison du peu de points disponibles pour le calage des modèles. Par prudence, nous n'exploiterons que de manière très générale ces paramètres.

Les valeurs de k₁ obtenues pour le pseudo-premier ordre sont dans l'ordre de grandeur bas de celles rapportées par [Pomiès et al. \(2013\)](#) pour l'ibuprofène en cocktail (3 à 62 L/(g_{part}.j)). Peu importe le modèle, les constantes k sont plus élevées lorsqu'IFO est en cocktail. Pour l'expliquer, on peut supposer que la présence d'autres molécules, introduites dans des quantités équivalentes et en compétition, entraînent un effet de concentration au voisinage du solide et permettent à IFO une adhésion plus rapide sur la surface. D'après cette observation, la vitesse de sorption d'un micropolluant sur la boue pourrait dépendre de la concentration en « micropolluants totaux » au voisinage de la surface : plus la concentration totale sera importante et plus la cinétique de sorption sera rapide et l'équilibre atteint plus rapidement. Cet effet a pu être accentué par la légère différence de concentration en IFO entre les deux conditions de test. Pour caractériser les influences, ces expériences méritent d'être reconduites sur plusieurs essais avec (i) une concentration en IFO

identique pour des concentrations variables en micropolluants totaux et (ii) une concentration en IFO variable pour des concentrations identiques en micropolluants totaux. Les observations pourraient cependant être difficilement extrapolables à la dynamique de sorption en STEP, le nombre de polluants (centaines voire milliers), leur nature (micro- ou macro-) et leur quantité (ng/L - g/L) étant peu maîtrisés, tout comme leur comportement.

Des résultats de la [Figure III-17](#), il apparaît que l'équilibre de sorption est strictement identique entre les deux essais et permet de montrer qu'aux concentrations étudiées, l'équilibre de sorption n'est pas limité par la présence d'autres molécules. Le modèle de sorption n'aura pas besoin d'intégrer de termes correctifs liés à la compétition ou à la synergie entre molécules pour ces deux composés. Cet équilibre est atteint au bout de 4 heures. La sorption d'IFO est alors très modérée, avec seulement 15 à 16 % d'IFO sorbé par rapport à la quantité initiale. Nous avons supposé que la sorption de CP suit les mêmes influences et tendances ([Figure III-18](#)), en raison de leur grande similitude de structure physico-chimique. En accord avec ces résultats et dans un double objectif de confort de manipulation et de souci de réalisme par rapport à la pollution multi-contaminants en STEP, les prochaines expériences de sorption seront menées avec le cocktail médicamenteux.

III.3.3.3) Effet de la nature de la boue sur la dynamique de sorption de CP

L'influence de la nature de la boue sur la dynamique de sorption du CP a été étudiée pour trois échantillons de boues de nature variée. La [Figure III-18](#) représente l'évolution des concentrations rapportées à C_0 , en fonction du temps de contact pour les boues étudiées. L'écart-type a été calculé pour le temps de contact le plus long et supposé identique ou proche pour les autres prélèvements.

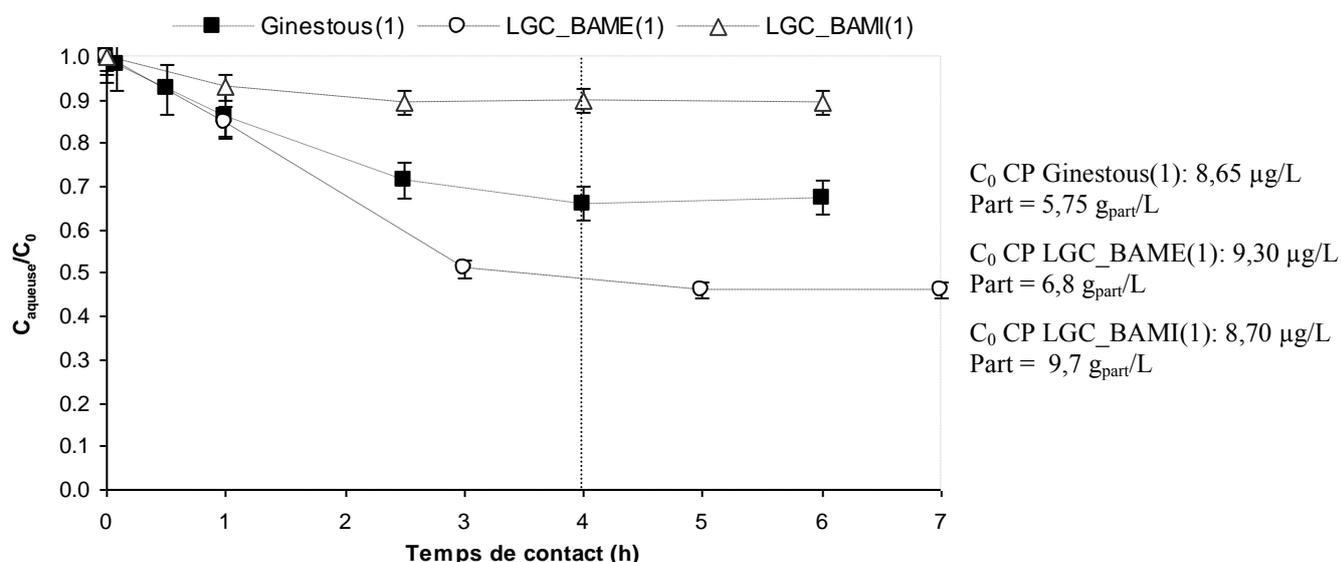


Figure III-18 : Evolution de la distribution de CP en phase aqueuse suivant la nature de la boue pour différents temps de contact

Peu importe la qualité de la boue, la sorption de CP se réalise « rapidement » pendant les 2 voire 3 premières heures puis évolue plus lentement et paraît stable au-delà de 4 heures. Cette similitude suggère des processus de sorption de CP comparables entre les échantillons.

Il n'est pas possible de calculer de constantes de cinétiques pour les boues de LGC_BAME(1) et de LGC_BAMI(1). En effet, le nombre de points aux faibles de temps de contact est insuffisant pour tenter un calage de paramètre. Afin de mener des études cinétiques robustes, il est donc nécessaire de multiplier les prélèvements aux faibles de temps de contact (0 à 1 heure) pour augmenter la résolution et la qualité de la modélisation. Les modèles ont toutefois été appliqués aux 5 premiers points de la boue de Ginestous(1) pour en extraire un ordre de grandeur. Le modèle du pseudo-premier ordre est celui qui a donné la corrélation la plus satisfaisante ($R^2 = 0,942$ vs $0,838$), pour une constante k_1 égale à $2,33 \text{ L}/(\text{g}_{\text{part}} \cdot \text{j})$. Elle est inférieure à celle obtenue pour IFO dans les mêmes conditions de test et de modélisation (Tableau III-8), mais reste dans le même ordre de grandeur. Le fait que les cinétiques d'IFO et CP soient correctement représentées par des modèles différents nécessite de mener une étude plus rigoureuse pour en comprendre la signification.

Les quantités injectées en CP étant comparables entre les essais, les concentrations à l'équilibre peuvent être utilisées pour remonter à une valeur de K_{Distrib} . La boue de LGC_BAME(1) présente ici la capacité de sorption du CP la plus élevée ($156 \text{ L}/\text{kg}_{\text{part}}$), devant celle de Ginestous(1) ($84 \text{ L}/\text{kg}_{\text{part}}$) puis LGC_BAMI(1) ($12 \text{ L}/\text{kg}_{\text{part}}$). Ces tendances indiquent des capacités très relatives et sont à confirmer. Ce résultat permet d'ores et déjà d'affirmer que K_{Distrib} n'est pas uniquement une propriété physico-chimique intrinsèque du polluant mais est aussi matrice-dépendant. Ne faisant pas l'objet de l'étude, les pourcentages sorbés ne seront pas ici discutés.

Ces études cinétiques montrent que l'équilibre de sorption du CP est atteint au bout de 4 heures, ce qui avait déjà été observé pour la dynamique d'IFO. De plus, l'observation d'un plateau pour des temps de contact importants suggère l'absence de biodégradation dans les conditions du test. Ainsi, un temps d'équilibre de 4 heures est donc fixé pour les prochaines expériences. Le traitement des eaux résiduaires par boues biologiques implique classiquement des temps de contact de 10 à 40 heures entre l'eau à épurer et la liqueur mixte. On peut donc considérer que la sorption de ces molécules sur les boues lors du traitement en STEP ne sera pas limitée par le temps d'équilibre. Le modèle de sorption n'aura pas besoin d'intégrer de dimension temporelle.

Pour résumer les enseignements de ces tests, on retiendra que (i) la sorption d'IFO et du CP atteint son équilibre au bout de 4 heures et ce, quelle que soit la nature de la boue, (ii) la présence d'autres molécules et possibles compétitrices de sorption n'a pas d'influence apparente sur l'équilibre final, contrairement à ce qui a été observé le long du profil dynamique, (iii) les études cinétiques méritent d'être approfondies en tenant compte des suggestions méthodologiques. Le modèle de sorption envisagé ne fera pas intervenir le temps de contact, ni un coefficient correctif lié à la compétition/synergie.

III.3.4) Détermination des équilibres de sorption : système diphasique

III.3.4.1) Validation de la procédure de sorption

Afin de valider le protocole mis en place pour limiter la biodégradation des molécules cibles pendant le test de sorption, nous avons comparé les quantités présentes entre l'instant initial (q_0 , en ng) et récupérées en fin des expériences (q_f , en ng) selon la relation :

$$\text{Bilan matière (\%)} = \frac{q_f}{q_0} \cdot 100 = \frac{q_{\text{aqueuse}}^{\text{finale}} + q_{\text{solide}}^{\text{finale}}}{q_{\text{spike}} + q_{\text{aqueuse}}^{\text{native}} + q_{\text{solide}}^{\text{native}}} \cdot 100 \quad \text{Eq. (III-32)}$$

où $q_{\text{aqueuse}}^{\text{finale}}$ est la quantité présente dans la phase aqueuse à la fin de l'essai (en ng), $q_{\text{solide}}^{\text{finale}}$ est la quantité présente en phase solide à la fin des essais (en ng), q_{spike} la quantité dopée (en ng) et $q_{\text{aqueuse}}^{\text{native}}$ et $q_{\text{solide}}^{\text{native}}$ les quantités natives en micropolluants dans chacune des phases (en ng). Le Tableau III-9 présente les bilans obtenus pour les deux molécules, pour plusieurs boues et niveaux de dopages.

Tableau III-9 : Vérification du bouclage du bilan matière – système diphasique

Boue \ Niveau ^a	Bilan matière (%) – Ifosfamide							Bilan matière (%) – Cyclophosphamide						
	1	2	3	4	5	6	Moy ± σ	1	2	3	4	5	6	Moy ± σ
LGC_BAMI(2)	non déterminé							95	87	95	-	-	-	92 ± 5
Ginestous(2)	96	83	-	88	92	91	90 ± 5	non déterminé						
Muret	non déterminé							x	x	-	102	92	93	96 ± 6
Narbonne	96	-	98	-	101	-	98 ± 3	99	-	98	-	93	-	97 ± 3
LGC_BAME(2)	92	-	102	-	99	-	98 ± 5	101	-	86	-	83	-	90 ± 10
Nailloux	98	-	103	-	101	-	101 ± 3	89	-	85	-	86	-	87 ± 2

- : phase solide non dosée ; x : limitation analytique ; Moy ± σ : moyenne ± écart-type
a : niveau de dopage croissant (1 < 2... < 6)

Sur l'intégralité des niveaux étudiés, les bilans matière moyens sont bouclés entre 87 et 101 %, avec une tolérance de ± 5 à 10 %. Ces intervalles de confiance sont satisfaisants et cohérents avec ceux identifiés dans la littérature en vue d'une validation de procédure d'estimation de sorption de micropolluants sur les boues (Wick *et al.*, 2011 ; Hyland *et al.*, 2012). Ainsi, le protocole proposé permet (i) d'estimer la sorption en limitant fortement l'activité de biodégradation, sans modifier les propriétés de surface ou du surnageant, (ii) de redémontrer la robustesse de la procédure analytique, applicable à différents types de boues. **Pour la construction des isothermes, la quantité en phase solide sera estimée à partir d'une mesure de la concentration en phase aqueuse et suivant l'équation III-12.** Compte-tenu de l'impossibilité de vérifier le bilan matière sur les deux premiers niveaux en IFO de la boue de Muret (difficultés analytiques), ces points ont été exclus pour le calage des modèles de sorption sur cette boue et pour les deux molécules.

III.3.4.2) Adéquation de l'isotherme de sorption

A partir des données expérimentales et déduites, trois isothermes de sorption ont été testées sur chaque type de boue. Il a été décidé de choisir l'isotherme parmi les 3 retenues qui représente le mieux l'adsorption des molécules sur l'ensemble des boues. Ainsi pour chacune des isothermes et chacune des molécules, les carrés des écarts (CE_c) obtenus entre les valeurs expérimentales et prédites pour chaque boue ont été additionnés (SCE). L'isotherme donnant la somme la plus petite, indiquant une qualité de représentation et une généralité des plus satisfaisantes, a été préférentiellement sélectionnée.

Les Tableaux III-10 et III-11 présentent les résultats obtenus à l'issue du calage des paramètres des isothermes de sorption, incluant le CE_c et la qualité de représentation (R²) pour chaque boue, de même que la SCE.

Pour IFO, les isothermes de Langmuir et Freundlich présentent des qualités de représentation comparables et plus intéressantes que l'isotherme Linéaire. Pour CP, l'isotherme de Freundlich est celui qui convient le plus, avec une SCE plus faible (8,5.10⁴) que pour les isothermes de Langmuir (6.10⁶) et Linéaire (2,8.10⁵). **Par conséquent, l'isotherme de Freundlich est celle qui est retenue pour le tracé.** Pour l'ensemble des boues et des analytes, les coefficients de détermination R² sont supérieurs à 0,95 et indiquent une adéquation satisfaisante entre les valeurs expérimentales et prédites par l'isotherme de Freundlich. L'exploitation des paramètres de l'isotherme sera réalisée dans une prochaine partie (partie III.3.4.4).

Réflexion sur les isothermes non sélectionnées et tracées

L'isotherme de Langmuir n'est applicable que lorsqu'elle décrit une allure concave. Ainsi, lorsque l'allure est convexe (majoritairement le cas du CP), le système diverge et donne une estimation des paramètres incohérente. Pour IFO où l'application a été possible, l'isotherme fait intervenir une capacité maximale de sorption (Q_0 , en $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{part}}$) qui n'a pu être observée dans les expériences (absence de « plateau strict »), et pourrait donc manquer de réalisme. Par ailleurs et pour un même jeu de données, nous avons constaté que suivant les valeurs de K_L et Q_0 entrées pour les processus itératifs de la régression non-linéaire², différents couples (K_L ; Q_0) peuvent être obtenus, ce qui incite à une certaine vigilance quant aux estimations, leur cohérence et la manière de les exploiter. Même si le sens physique de l'isotherme de Langmuir est plus établi que pour les deux autres, son utilisation et adéquation à de tels objectifs peuvent ici être remises en cause.

Il apparaît que l'isotherme linéaire décrit rarement les données expérimentales et ne s'applique pas à toutes les boues étudiées. La non-linéarité est particulièrement observée pour IFO. Il est difficile d'expliquer pourquoi pour une même molécule sur une même gamme de concentrations, l'isotherme linéaire est observée pour une boue et pas une autre. L'hypothèse générale suivant laquelle la sorption de micropolluants sur les boues suit une isotherme linéaire n'est donc pas entièrement confirmée et rejoint les conclusions de l'étude d'Hyland *et al.* (2012). Ce propos est probablement à nuancer en fonction de la nature du micropolluant (et de la matrice). Par ailleurs et même si la qualité de représentation est variable, les valeurs obtenues pour K_{Lin} indiquent qu'IFO et CP sont globalement caractérisés par une aptitude de sorption très modérée ($K_{\text{Lin}} < 100 \text{ L}/\text{kg}_{\text{part}}$). Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles rapportés par Ternes *et al.* (2004) pour une boue primaire en contact avec IFO et CP (22 – 55 $\text{L}/\text{kg}_{\text{part}}$). Même si son utilisation n'est ici pas recommandée, le coefficient K_{Lin} peut tout de même donner une estimation rapide et grossière de la distribution d'un polluant et peut renseigner sur son comportement de sorption en STEP, pourvu que les concentrations entre les essais et celles observées lors du traitement des eaux soient proches.

Les isothermes ont été tracées pour IFO et CP suivant l'isotherme de Freundlich et sont disponibles sur les Figures III-19 et III-20. Pour les deux molécules, les écarts-types obtenus pour les niveaux 3 et 5 (respectivement ~ 5 et $\sim 20 \mu\text{g}/\text{L}$) montrent que la manipulation est très répétable et que les estimations de paramètres peuvent être considérées comme satisfaisantes pour la mise en évidence de tendances de sorption. On remarque toutefois que la représentation d'IFO est parfois limitée à des intervalles de concentrations très réduits (aussi bien pour la phase aqueuse que pour la phase solide) et suggère des difficultés avec la concentration de la solution de dopage. **Dans la suite du manuscrit, nous verrons que ce problème est récurrent et très variable, sans explication claire et arrêtée à ce jour.** Ce problème est cependant propre à IFO car il n'a pas été observé pour CP. Des explications et considérations sur la solution de dopage sont données dans les annexes (Annexe G). Rappelons cependant que même si l'étendue des isothermes n'est pas équivalente, la zone d'intérêt est située au niveau des faibles concentrations (chapitre I) et minorise le problème observé pour IFO.

² Estimées à partir du système linéarisé
$$\frac{C_{\text{aqueuse}}^{\text{équilibre}}}{C_{\text{solide}}^{\text{équilibre}}} = \frac{C_{\text{aqueuse}}^{\text{équilibre}}}{Q_0} + \frac{1}{K_L \cdot Q_0}$$

Tableau III-10 : Calage des isothermes de sorption et estimation des paramètres pour IFO – système diphasique

Adéquation des isothermes – Ifosfamide IFO											
Modèle	Langmuir				Freundlich				Linéaire		
Paramètre	K_L	Q_0	CE	R^2	K_F	n	CE	R^2	K_{Lin}	CE	R^2
Boue	(L/ μ g)	(μ g/kg _{part})			(μ g ^(1-1/n) .L ^{1/n} /kg _{part})				(L/kg _{part})		
LGC_BAMI(2)	0,021	841	1766	0,983	31	1,47	2354	0,978	10	10990	0,896
Ginestous(2)	0,024	2644	3186	0,996	99	1,39	261	0,999	40	31466	0,959
Muret	0,019	1284	216	0,997	45	1,47	8	0,999	15	10180	0,846
Narbonne	0,044	2251	6232	0,940	108	1,22	5060	0,952	81	7023	0,934
LGC_BAME(2)	0,160	551	457	0,992	79	1,57	1026	0,982	46	5891	0,896
Nailloux	1,033	234	2245	0,913	112	2,28	954	0,963	69	8926	0,653
		SCE	1,4.10 ⁴			SCE	9,7.10 ³		SCE	7,5.10 ⁴	

Tableau III-11 : Calage des isothermes de sorption et estimation des paramètres pour CP – système diphasique

Adéquation des isothermes – Cyclophosphamide CP											
Modèle	Langmuir				Freundlich				Linéaire		
Paramètre	K_L	Q_0	CE	R^2	K_F	n	CE	R^2	K_{Lin}	CE	R^2
Boue	(L/ μ g)	(μ g/kg _{part})			(μ g ^(1-1/n) .L ^{1/n} /kg _{part})				(L/g _{part})		
LGC_BAMI(2)	0,013	972	581	0,994	20	1,30	1170	0,987	9	4400	0,951
Ginestous(2)	0,003	4717	3223	0,984	13	1,05	3265	0,982	11	3386	0,982
Muret	> 3,10 ⁷	471	> 4,10 ⁵	-*	2	0,65	11037	0,974	17	45942	0,890
Narbonne	> 5,10 ⁷	473	> 1,10 ⁶	-*	44	0,95	39583	0,972	52	41573	0,971
LGC_BAME(2)	> 5,10 ⁷	536	> 2,10 ⁶	-*	6	0,56	27104	0,988	61	184280	0,917
Nailloux	> 2,10 ⁶	246	> 2,10 ⁵	-*	34	1,06	3193	0,989	29	3623	0,987
		SCE	6.10 ⁶			SCE	8,5.10 ⁴		SCE	2,8.10 ⁵	

* ne présente aucun sens car le modèle n'est pas applicable

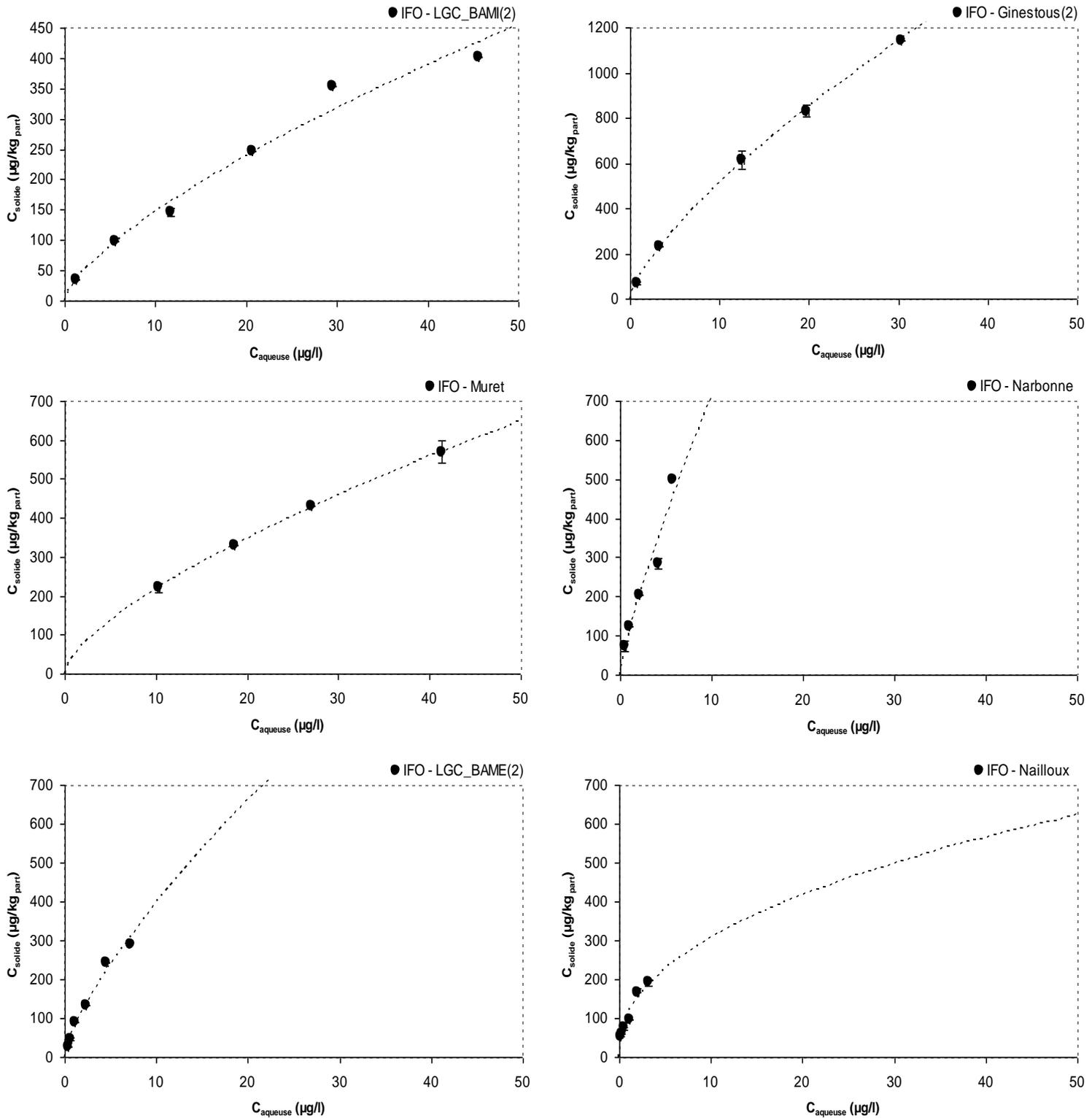


Figure III-19 : Isothermes de sorption pour IFO – Calage par isotherme de Freundlich

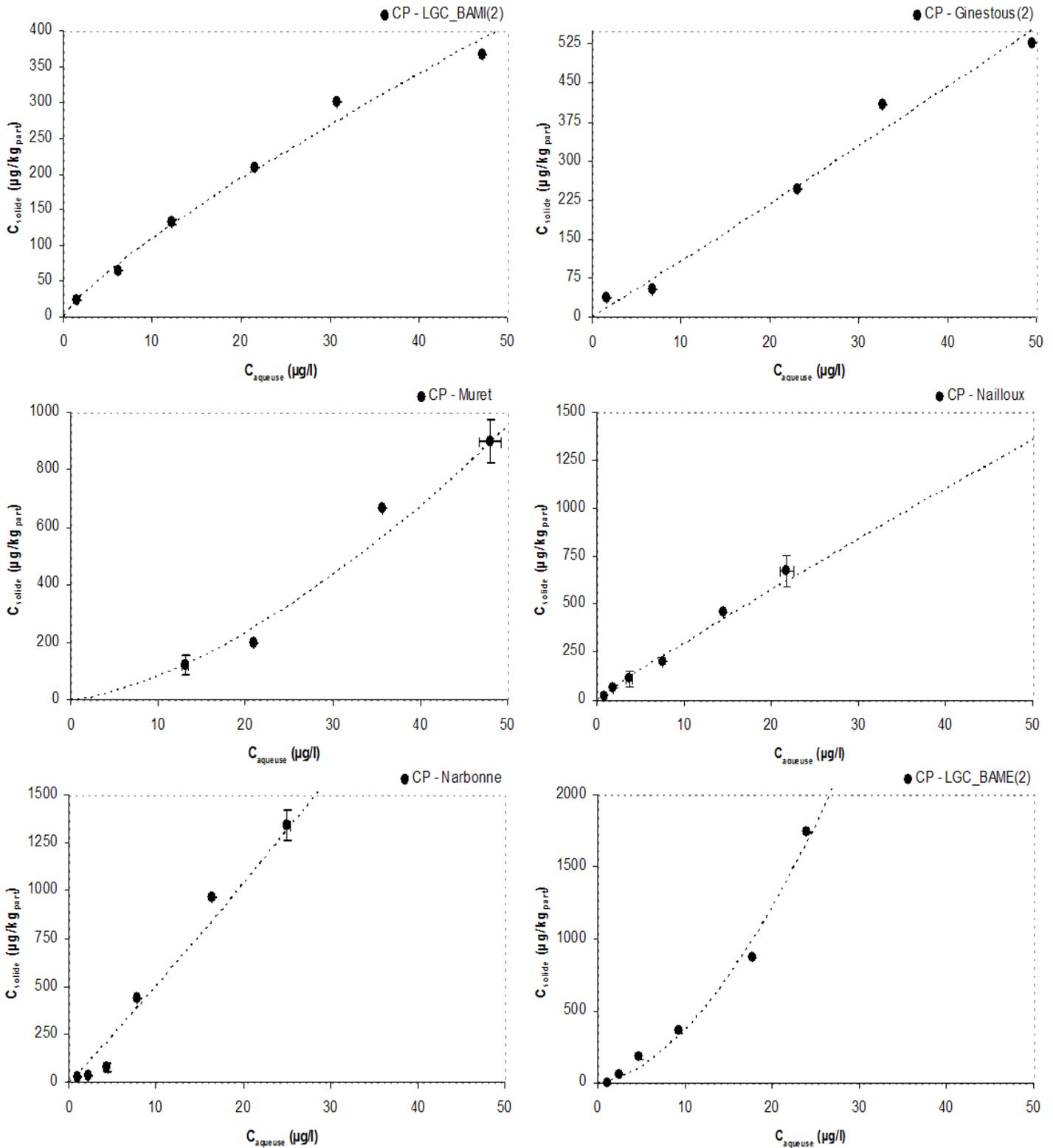


Figure III-20 : Isothermes de sorption pour CP – Calage par isotherme de Freundlich

III.3.4.3) Limites de l'application des isothermes

Le domaine expérimental balayé lors de l'étude des isothermes ne permet pas, *a priori*, de connaître le comportement de sorption pour des concentrations supérieures à 30 µg/L et inférieures à 1 µg/L. A partir des limites de la méthode analytique, il est possible d'évaluer jusqu'où l'extrapolation des tendances observées pourrait être appliquée. Pour ce faire, il faut comparer le $K_{Distrib}$ estimé à partir du modèle calé, avec le $K_{Distrib}$ estimé à partir des limites analytiques. Les molécules ayant des aptitudes de sorption faibles, l'intérêt est porté sur les performances en phase solide (chapitre II) pour connaître la précision aux faibles concentrations. Les équations correspondantes sont les suivantes :

$$K_{Distrib}^{calage_isotherme} = \frac{C_{solide}^{équilibre}}{C_{aqueuse}^{équilibre}} = \frac{K_F \cdot C_{aqueuse}^{équilibre^{1/n}}}{C_{aqueuse}^{équilibre}} = K_F \cdot C_{aqueuse}^{équilibre^{1/n-1}} \quad \text{Eq. (III-33)}$$

$$K_{Distrib}^{limite_analytique} = \frac{C_{solide}^{équilibre}}{C_{aqueuse}^{équilibre}} = \frac{LOQ_{solide}}{C_T - LOQ_{solide} \cdot [Part]} \quad \text{Eq. (III-34)}$$

où C_T désigne la concentration totale en polluant (µg/L), LOQ_{solide} la limite de quantification sur l'échantillon solide (µg/kg_{part}), [Part] (MES) la concentration en particules (kg_{part}/L). La recherche de l'intersection entre ces deux équations permet de définir la concentration minimale en-dessous de laquelle le comportement ne pourra pas être évalué. Le [Tableau III-12](#) renseigne ces valeurs limites (correspondance concentration totale – concentration en phase aqueuse, à l'équilibre) pour les deux molécules. Les graphes correspondants sont disponibles sur l'[Annexe H](#).

Tableau III-12 : Limites de prédiction du comportement de sorption

Boue	Ifosfamide		Cyclophosphamide	
	C_T (µg/L)	$C_{aqueuse}$ (µg/L)	C_T (µg/L)	$C_{aqueuse}$ (µg/L)
LGC_BAMI(2)	0,368	0,053	0,510	0,420
Ginestous(2)	0,198	0,077	1,246	0,974
Muret	10,43	8,35	17,32	15,89
Narbonne	0,075	0,027	0,627	0,590
LGC_BAME(2)	0,109	0,057	0,983	0,947
Nailloux	0,099	0,003	0,306	0,238

La qualité de prédiction est très variable. Il apparaît que la complexité de la boue de Muret ne permet pas de prédire avec rigueur le comportement de sorption en-dessous d'une concentration en phase aqueuse de 8 – 16 µg/L, qui est un niveau de contamination à peine envisageable pour une ERH. Pour les autres boues, les concentrations totales comprises entre 0,1 et 1 µg/L montrent qu'il aurait été possible de réaliser les essais de sorption à une concentration inférieure à 1 µg/L. Les concentrations en phase aqueuse sont de l'ordre de 50 ng/L pour IFO et 500 ng/L pour CP. Bien que les performances de la méthode soient très satisfaisantes, elles ne permettraient pas d'évaluer le comportement pour des concentrations aqueuses inférieures à 50 – 500 ng/L, qui représentent des niveaux de contamination hauts voire très hauts pour des eaux de STEP (chapitre I). **Pour ces polluants, l'évaluation précise de la sorption aux concentrations rencontrées en STEP est donc peu envisageable tant que l'analyse sera limitante.** Il est toutefois important de rappeler que les paramètres de $K_{Distrib}^{calage_isotherme}$ ont été estimés à partir de la seule mesure en phase aqueuse. Pour affiner ce raisonnement et la portée des conclusions, il serait donc utile de doser les deux phases de boue.

III.3.4.4) Exploitation des paramètres de l'isotherme sélectionnée

III.3.4.4.a) Comparaison des comportements et capacités de sorption

Paramètre de Freundlich n

D'après le [Tableau III-10](#), la sorption d'IFO sur les boues étudiées est caractérisée par un coefficient n supérieur à 1 (1,22 – 2,28) qui indique une affinité pour la boue plus importante aux faibles concentrations en phase aqueuse (< quelques $\mu\text{g/L}$) plutôt qu'aux fortes. Dans de telles conditions, cet effet est d'autant plus marqué que le coefficient n est grand. Ces résultats montrent également que les valeurs de K_{Lin} , parfois déterminées pour un seul point et à des concentrations élevées, peuvent sous-estimer la capacité de sorption aux concentrations environnementales. Dans l'ensemble, le paramètre n indique ici que les tendances sont respectées entre tous les échantillons et pourrait traduire des similitudes dans le comportement de sorption d'IFO.

Pour CP, les valeurs de n (0,56 – 1,30) indiquent un comportement plus contrasté où d'après la nature de la boue, la sorption peut être considérée comme favorable ou défavorable suivant la plage de concentrations considérée. Outre le fait que toutes ces valeurs de n indiquent que l'isotherme linéaire n'est effectivement pas généralisable, il apparaît que (i) la nature du polluant influencerait les tendances de sorption, les résultats suggérant ici des comportements apparents peu équivalents entre 2 molécules de physico-chimie pourtant très proches, et (ii) la constitution de la boue influencerait très probablement le caractère favorable ou non de la sorption, sans connaissance des caractéristiques qui pourraient être déterminantes. Ces tendances ne donnent toutefois aucune indication sur de possibles mécanismes.

Paramètre de Freundlich K_F

Compte-tenu de la dépendance de l'unité de K_F à la valeur de n, il n'est pas rigoureux de comparer ces constantes entre boues lorsque n est très différent. Par ailleurs, la signification de cette constante seule n'est pas clairement établie. L'évolution du K_{Distrib} en fonction de la concentration en phase aqueuse à l'équilibre (souvent la seule dosée) peut faciliter la comparaison. K_{Distrib} a été calculé à partir de l'équation III-33. La [Figure III-21](#) représente l'évolution du K_{Distrib} d'IFO pour chacune des boues.

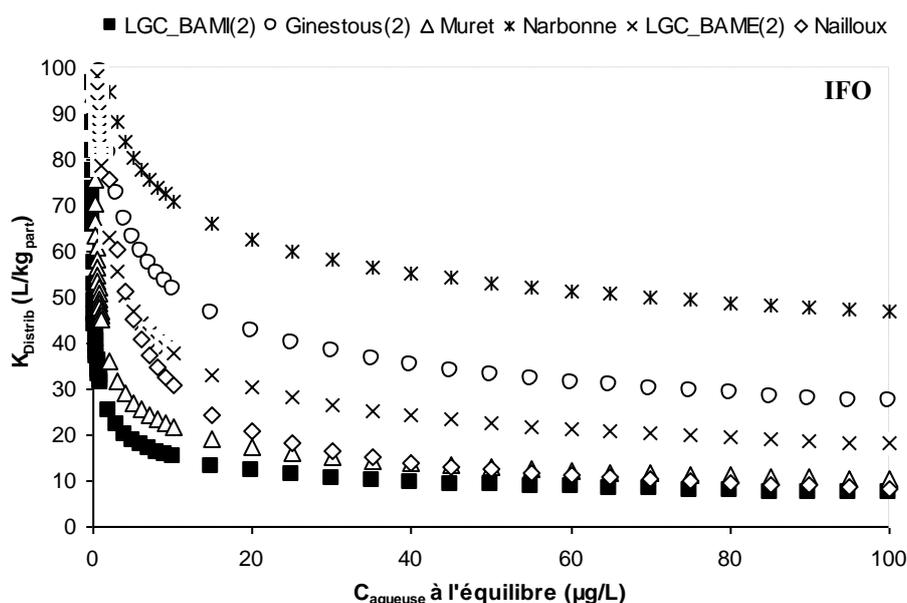


Figure III-21 : Evolution du K_{Distrib} pour IFO pour les différents types de boues en fonction de la concentration en phase aqueuse en micropolluants à l'équilibre

Les tendances de la [Figure III-21](#) montrent que la comparaison des $K_{Distrib}$ pour IFO est rendue très délicate en raison d'un effet de concentration. A l'exception de la boue de Narbonne qui semble avoir une capacité de sorption légèrement plus intéressante sur l'intervalle présenté, les autres boues ont des capacités très équivalentes et très modérées. Compte-tenu des variations observées sur n pour CP, on peut redouter des tendances de sorption encore plus délicates à analyser. Les concentrations supérieures à 10 $\mu\text{g/L}$ étant peu réalistes, l'évolution des $K_{Distrib}$ est à présent suivie sur un intervalle plus restreint, compris entre 1 et 10 $\mu\text{g/L}$. Les tendances sont renseignées pour IFO et CP sur la [Figure III-22](#). Les tendances pour Muret sont données mais très peu exploitables.

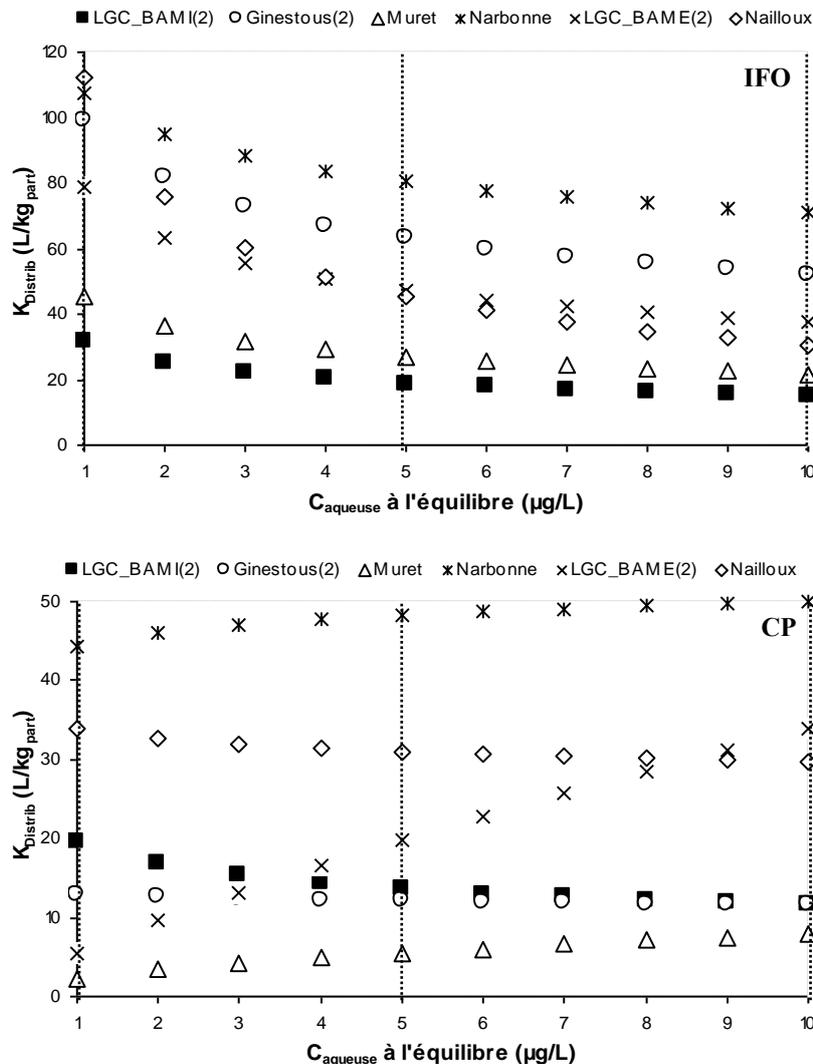


Figure III-22 : Evolution du $K_{Distrib}$ pour IFO et CP pour les différents types de boues pour des concentrations en phase aqueuse comprises entre 1 et 10 $\mu\text{g/L}$

Pour faciliter les comparaisons, les $K_{Distrib}$ obtenus pour les concentrations de 1, 5 et 10 $\mu\text{g/L}$ (traits verticaux) sont uniquement discutés. Le [Tableau III-13](#) reprend ces valeurs, de même que l'équivalence en quantité sorbée à la boue durant les essais et calculée d'après l'équation :

$$\eta_{sorbé}(\%) = \frac{C_{solide}^{équilibre}}{C_{solide}^{équilibre} + C_{aqueuse}^{équilibre}} \cdot 100 = \frac{[Part] \cdot K_F \cdot C_{aqueuse}^{équilibre^{1/n-1}}}{[Part] \cdot K_F \cdot C_{aqueuse}^{équilibre^{1/n-1}} + 1} \cdot 100 \quad \text{Eq. (III-35)}$$

où [Part] (MES) désigne la concentration en particules ($\text{kg}_{part}/\text{L}$), détaillée dans le [Tableau III-13](#).

Tableau III-13 : K_{Distrib} et équivalences en pourcentage sorbé pour trois niveaux de concentrations en phase aqueuse en IFO et CP dans les boues

Boue	Paramètres ^a	Ifosfamide IFO					
		$K_{\text{Distrib}}^{1\mu\text{g/L}}$ (L/kg _{part})	$K_{\text{Distrib}}^{5\mu\text{g/L}}$ (L/kg _{part})	$K_{\text{Distrib}}^{10\mu\text{g/L}}$ (L/kg _{part})	$\eta_{\text{sorbé}}^{1\mu\text{g/L}}$ (%)	$\eta_{\text{sorbé}}^{5\mu\text{g/L}}$ (%)	$\eta_{\text{sorbé}}^{10\mu\text{g/L}}$ (%)
LGC_BAMI(2)	$K_F = 31$ $n = 1,47$	31	19	15	9	5	4
Ginestous(2)	$K_F = 99$ $n = 1,39$	99	63	52	38	28	24
Muret	$K_F = 45$ $n = 1,47$	nd	nd	22	nd	nd	6
Narbonne	$K_F = 108$ $n = 1,22$	108	81	71	24	20	18
LGC_BAME(2)	$K_F = 79$ $n = 1,47$	79	47	38	19	12	10
Nailloux	$K_F = 112$ $n = 2,28$	112	45	31	52	30	23

Boue	Paramètres ^a	Cyclophosphamide CP					
		$K_{\text{Distrib}}^{1\mu\text{g/L}}$ (L/kg _{part})	$K_{\text{Distrib}}^{5\mu\text{g/L}}$ (L/kg _{part})	$K_{\text{Distrib}}^{10\mu\text{g/L}}$ (L/kg _{part})	$\eta_{\text{sorbé}}^{1\mu\text{g/L}}$ (%)	$\eta_{\text{sorbé}}^{5\mu\text{g/L}}$ (%)	$\eta_{\text{sorbé}}^{10\mu\text{g/L}}$ (%)
LGC_BAMI(2)	$K_F = 20$ $n = 1,30$	20	14	12	18	13	11
Ginestous(2)	$K_F = 13$ $n = 1,05$	13	12	12	7	7	7
Muret	$K_F = 2$ $n = 0,65$	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Narbonne	$K_F = 44$ $n = 0,95$	44	48	50	18	19	20
LGC_BAME(2)	$K_F = 6$ $n = 0,56$	6	20	34	3	11	17
Nailloux	$K_F = 34$ $n = 1,06$	34	31	30	25	23	22

a : l'unité de K_F est $\mu\text{g}^{(1-1/n)} \cdot \text{L}^{1/n} / \text{kg}_{\text{part}}$; nd : non déterminé

A l'exception du K_{Distrib} calculé pour 1 $\mu\text{g/L}$, la valeur de K_F ne peut constituer un point de comparaison entre les capacités de sorption des boues quand n est différent. En effet, il apparaît par exemple que les boues de Narbonne et Nailloux ont des K_F équivalents pour IFO, mais des valeurs de K_{Distrib} très différentes pour des concentrations autres que 1 $\mu\text{g/L}$. Ainsi, l'exploitation de cette constante devrait être accompagnée de sa valeur de n pour apprécier les tendances.

Pour les boues et concentrations renseignées, les valeurs de K_{Distrib} pour les deux molécules évoluent entre environ 10 et 100 $\text{L/kg}_{\text{part}}$. Ces valeurs sont dans l'ordre de grandeur trouvé par [Stevens-Garmon et al. \(2011\)](#) pour la sorption de molécules polaires et neutres sur des boues de nature variée. Pour une concentration de 1 $\mu\text{g/L}$, ces auteurs ont trouvé des coefficients de distribution compris entre < 30 et 162 $\text{L/kg}_{\text{part}}$. Pour une concentration de 10 $\mu\text{g/L}$, les coefficients présentés sont également du même ordre que ceux trouvés par [Ternes et al. \(2004\)](#) pour la sorption d'IFO et de CP sur une boue primaire (22 et 52 $\text{L/kg}_{\text{part}}$), mais nettement différents de ceux observés pour une boue secondaire (1,4 et 2,4 $\text{L/kg}_{\text{part}}$). Ces différences pourraient être attribuées aux caractéristiques des boues, tout comme à la mise en œuvre des essais, aux méthodes analytiques, aux méthodes de calculs... De plus, IFO semble être caractérisé par une sorption plus intéressante que CP, ce qui n'a pas été observé par [Ternes et al. \(2004\)](#). Soulignons cependant que ces différences intra- et inter-études restent toujours très délicates par manque de référentiel commun.

Même si les tendances sont assez discutables entre les échantillons, on peut remarquer que les boues de Narbonne et Nailloux seraient caractérisées par les K_{Distrib} les plus élevés, alors que la boue de LGC_BAMI(2) serait caractérisée par les K_{Distrib} les plus faibles. Cette remarque semble d'autant plus vraie que la concentration en phase aqueuse à l'équilibre est faible. La réflexion de [Yi *et al.* \(2006\)](#) et [Yi et Harper Jr. \(2007\)](#) suivant laquelle les boues de BAM possèdent une capacité de sorption plus élevée que les boues activées conventionnelles n'est pas nécessairement vraie pour ces molécules, d'une part parce qu'il est important de comparer les coefficients de distribution pour des concentrations à l'équilibre équivalentes, et d'autre part parce que la boue LGC_BAMI(2) présente des capacités de sorption plutôt équivalentes ou inférieures à celles de Ginestous(2), et sont pourtant issues du même inoculum (Ginestous). Par ailleurs, ce travail est le premier à s'être intéressé à la sorption de médicaments anticancéreux sur des boues de BAM.

Pour compléter le paragraphe précédent, il est important de préciser qu'un coagulant de type polychlorure d'aluminium (PAX) est ajouté dans le bassin biologique de la STEP de Nailloux pour finaliser le traitement du phosphore. L'effet d'adjuvant chimique de type coagulant (et/ou floculant) sur les capacités de sorption est loin d'être connu. A l'image de la valeur singulière de n trouvée pour la sorption d'IFO sur cette boue ([Tableau III-10](#)), on peut supposer un effet très important. Ce résultat est par ailleurs soutenu par la quantification d'IFO dans la phase solide (Chapitre II) et la non-détection dans la phase aqueuse (dosée par UHPLC-MS/MS lors des essais de sorption). L'influence de ce type traitement sur la sorption de micropolluants mérite d'être approfondie.

Ces faibles K_{Distrib} occultent toutefois l'étendue des valeurs de la fraction sorbée. En effet, même si les pourcentages de sorption restent pour la plupart assez faibles et dépassent rarement 25 %, ils ne peuvent être négligés comme cela est classiquement pensé pour les molécules à faible K_{Distrib} ([Clara *et al.*, 2004](#)). Ces pourcentages sont bien évidemment dépendants de la concentration en particules lors des essais. Ainsi, toute suggestion de K_{Distrib} « limite » à partir duquel la sorption peut être négligée nécessite de préciser les concentrations en particules pour compléter le propos.

III.3.4.4.b) Application au devenir des polluants lors du traitement en STEP

Afin d'évaluer la fraction d'IFO et CP éliminée par sorption lors du traitement en STEP, les K_{Distrib} obtenus pour une concentration en phase aqueuse de 1 $\mu\text{g/L}$ ont été retenus. Plusieurs hypothèses sont nécessaires pour valider ces calculs :

- (i) les molécules ne sont pas affectées par la biodégradation, ni par la volatilisation. D'après le chapitre I, ces mécanismes sont supposés mineurs pour IFO et CP ;
- (ii) les polluants sont en condition d'équilibre de sorption lors du traitement. Cette hypothèse est soutenue par les valeurs des temps d'équilibre de sorption qui restent inférieures aux durées du traitement en STEP. Par ailleurs, K_{Distrib} obtenu en essai batch est considéré comme suffisamment représentatif du comportement en STEP ;
- (iii) du fait de cet équilibre, seule la concentration de la boue fraîchement générée est considérée comme disponible pour la sorption. Ainsi, cette hypothèse revient à se placer dans le cas le plus défavorable où la boue déjà en équilibre n'intervient plus.

Pour maintenir une concentration en boues constante dans les bassins, les boues éliminées par soutirage correspondent globalement à la quantité de boues nouvellement générées. La production de boue (secondaire) quotidienne est en moyenne évaluée entre 0,1 et 0,4 $\text{g}_{\text{part}}/\text{L}$ suivant le fonctionnement du procédé ([Wick *et al.*, 2011](#)) et a été observée par [Delgado \(2009\)](#) pour un pilote de BAME (0,2 $\text{g}_{\text{part}}/\text{L}$), et valide cette fourchette pour l'ensemble des procédés biologiques. Ainsi, la fraction éliminée par sorption peut être déterminée d'après l'équation (III-36) :

$$Fraction_{sorption}(\%) = \frac{Soutirage \cdot K_{Distrib}^{1\mu g/L}}{1 + Soutirage \cdot K_{Distrib}^{1\mu g/L}} \cdot 100 \quad \text{Eq. (III-36)}$$

où Soutirage représente la quantité de boue soutirée par jour (en kg_{part}/L). Le [Tableau III-14](#) présente les résultats obtenus pour les productions journalières extrêmes.

Tableau III-14 : Pourcentage d'élimination d'IFO et CP par sorption lors du traitement en STEP pour deux productions de boues secondaires différentes

Boue	Production = 0,1 g _{part} /L		Production = 0,4 g _{part} /L	
	Elim. IFO (%)	Elim. CP (%)	Elim. IFO (%)	Elim. CP (%)
LGC_BAMI(2)	< 1	< 1	1	< 1
Ginestous	1	< 1	4	< 1
Muret	nd	nd	nd	nd
Narbonne	1	< 1	4	2
LGC_BAME(2)	< 1	< 1	3	< 1
Nailloux	1	< 1	4	1

Elim. : élimination par sorption ; nd : non déterminé

Peu importe la nature et la production journalière de boue, les pourcentages d'élimination d'IFO et CP par sorption aux boues secondaires et soutirage sont très faibles et inférieurs à 5 %. Ainsi, plus de 95 % de la quantité entrante resterait en phase aqueuse, ce qui serait cohérent avec leur log K_{ow} inférieurs à 1. L'approche proposée ne considère toutefois que l'élimination par sorption, et au niveau de la seule boue secondaire et non sur l'intégralité de la ligne boue. L'influence des autres soutirages est cependant supposée mineure. Ce résultat est en accord avec les quelques données de la littérature évoquant une réduction très partielle ou inexistante des produits anticancéreux polaires lors du traitement des eaux (review de [Zhang et al., 2013](#)). Pour éliminer cette pollution avant rejet dans le milieu naturel, les effluents de STEP nécessiteraient donc d'être raffinés par des traitements poussés et notamment du type procédé d'oxydation avancée (POA).

Il est toutefois important de préciser que ces estimations restent larges puisque les concentrations en STEP sont bien plus basses qu'1 µg/L et que l'on ne connaît pas, pour l'heure actuelle, le comportement de sorption à de telles concentrations.

III.3.4.5) Limites de la démarche appliquée dans le tracé des isothermes

Bien que les bilans matière aient dans l'ensemble montré une bonne cohérence avec les niveaux de dopage, on peut se poser des questions quant à l'influence que peut avoir sur l'allure de l'isotherme et sur la valeur de $K_{Distrib}$, le fait de considérer la concentration d'une phase puis d'estimer celle de l'autre par bilan matière. Pour la boue de Ginestous, nous avons estimé les paramètres de Freundlich en considérant trois cas différents : (i) cas 1 : on estime la concentration en phase solide à partir de la mesure en phase aqueuse, avec un bilan bouclé (cas précédemment retenu) ; (ii) cas 2 : on estime la concentration en phase aqueuse à partir de la mesure en phase solide, avec un bilan bouclé ; (iii) cas 3 : on mesure les concentrations dans les deux phases. Seuls les résultats pour IFO sont disponibles. Pour chacun des cas, les isothermes correspondantes sont données sur la Figure III-23 et accompagnées des paramètres.

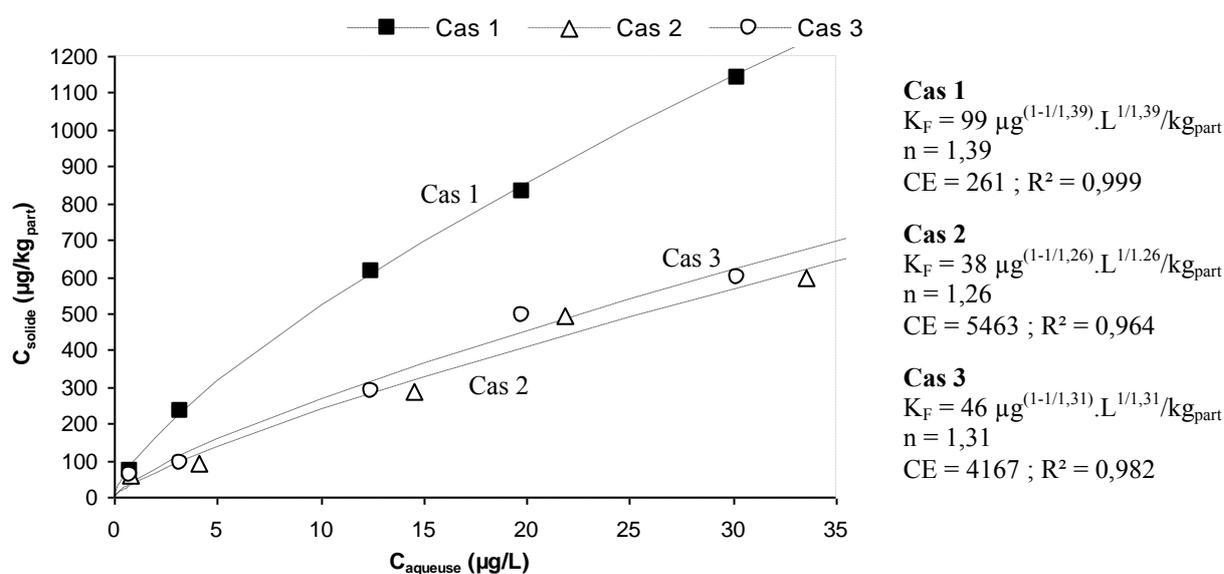


Figure III-23 : Allure des isothermes d'IFO pour la boue de Ginestous suivant la stratégie de calcul sélectionnée

Les isothermes tracées ne sont pas superposables. La stratégie de calcul a bien une influence sur le calage des paramètres de sorption et *a fortiori*, sur l'estimation de la partition. L'allure des isothermes des cas 2 et 3 est identique et traduit un biais faible entre les deux stratégies de calcul. En revanche, l'allure de l'isotherme du cas 1 doit être discutée. Nous avons démontré que les molécules étudiées avaient une aptitude de sorption faible, avec des quantités en phase solide excédant rarement les $500 \mu\text{g}/\text{kg}_{\text{part}}$ (soit $\sim 3 \mu\text{g}/\text{L}$) pour un dopage de $30 \mu\text{g}/\text{L}$. Pour ce niveau, la mesure en phase aqueuse nécessite une dilution qui a pour effet d'augmenter l'incertitude sur la mesure. Il est donc probable que l'incertitude expérimentale sur la phase aqueuse soit égale à la quantité sorbée sur le solide, ce qui permet de justifier l'allure de l'isotherme. Cette remarque est d'autant plus vraie que le niveau de dopage est important : les points de concentrations « élevées » seront les plus déterminants dans l'allure des isothermes. Malgré tout, le coefficient n est globalement équivalent entre les 3 cas étudiés, ce qui permet tout de même de conserver la tendance générale de sorption. Par ailleurs, la possible comparaison des K_F permet de dire que le $K_{Distrib}$ du cas 1 est probablement surestimé, et environ 2 à 2,5 fois plus important que celui des deux autres cas. Malgré ce biais, la faible aptitude de sorption est *a priori* conservée et ne modifie pas les conclusions et hypothèses précédentes. **Pour cette molécule et ce comportement de sorption, il apparaît ainsi qu'un bilan matière bouclé en moyenne même à près de 90 % peut avoir des conséquences importantes sur l'estimation de la partition.**

Partant de ce constat et dans l'optique de ne mesurer la concentration que d'une seule des deux phases, il est important de considérer ces quelques généralités avant de tracer les isothermes :

- (i) pour une molécule à faible tendance de sorption, il est préférable de déterminer la concentration en phase solide et d'en déduire la concentration en phase aqueuse ;
- (ii) pour une molécule à forte tendance de sorption, il est préférable de déterminer la concentration en phase aqueuse et d'en déduire la concentration en phase solide ;
- (iii) pour les molécules avec des tendances de sorption « intermédiaires », seule la disponibilité de la méthode analytique pour une des deux phases sera déterminante.

Il n'est pas possible de définir clairement ce que représente une tendance de sorption faible et forte. Il paraît important d'étudier l'influence de la stratégie pour d'autres molécules, de manière à affiner ces généralités. Il va de soi que la stratégie consistant à mesurer les concentrations dans les deux phases est à prioriser. Par ailleurs, il ne semble pas possible de caractériser finement la distribution pour des molécules entièrement ou non sorbées, l'analyse étant limitante. Dans ces cas précis, on peut douter de la pertinence des isothermes.

La signification de la mesure sur la phase solide et par extension, la qualité du bilan matière, sont également discutables. En effet, après centrifugation, le culot de la boue est encore très humide et nécessite une lyophilisation pour être rendu exploitable. Ainsi, la mesure en phase solide serait le résultat d'une quantité effectivement sorbée, et d'une quantité strictement présente dans l'environnement aqueux du culot. La concentration dans la phase solide pourrait donc être plus faible que celle mesurée, et inversement pour la phase aqueuse : K_{Distrib} serait surestimé. On rappelle que les boues étudiées ont des siccités (*i.e.* teneur en matière sèche) très faibles et justifient donc ce questionnement. De nouvelles considérations expérimentales pourraient être envisagées afin de tenir davantage compte de cette caractéristique de la matrice. Une réflexion complémentaire est proposée dans le chapitre Conclusions et Perspectives de ce manuscrit.

III.3.5) Détermination des équilibres de sorption : système triphasique

III.3.5.1) Recherche du niveau de dopage des essais

L'application du système triphasique nécessite l'identification d'une zone de linéarité entre les concentrations en phases aqueuse et solide. Bien que nous ayons précédemment démontré que l'isotherme linéaire était difficilement envisageable, nous avons pu identifier certaines plages de concentration où le comportement s'en rapprocherait. **Nous introduirons alors le concept de « linéaire apparent » pour désigner cette approximation.** La boue de Narbonne a été sélectionnée comme boue de référence pour identifier ce comportement. Les essais ont été menés pour les concentrations extrêmes en DCM afin d'apprécier l'influence de la DCM sur un large domaine expérimental. Malgré les limites précédemment reconnues, la concentration en phase solide a été estimée à partir de la concentration en phase aqueuse pour respecter la démarche de tracé des isothermes. Les résultats sont présentés sur la [Figure III-24](#). Les graphes sont limités aux basses concentrations. La représentation sur tout le domaine est donnée sur l'[Annexe I](#).

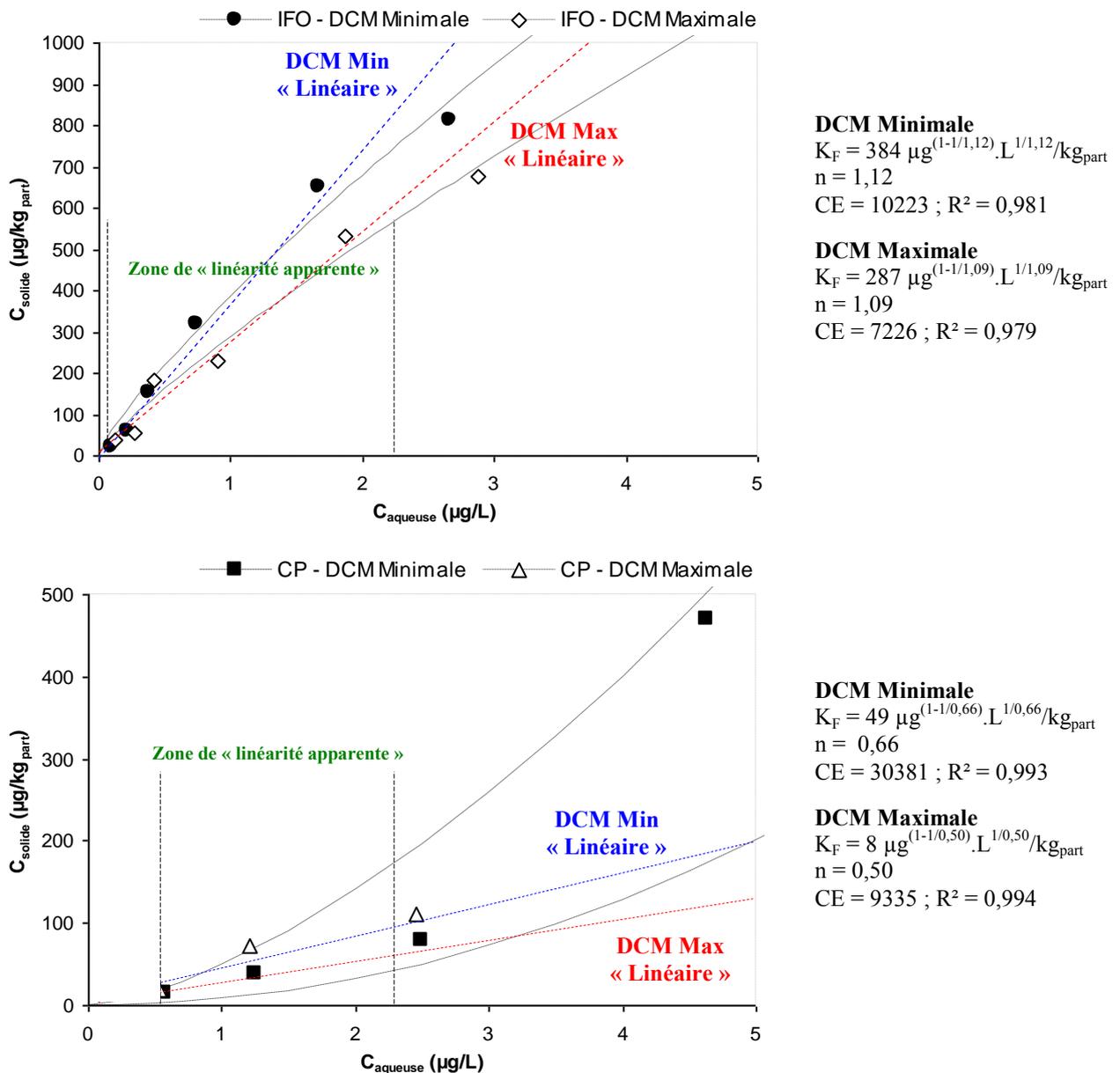


Figure III-24 : Identification des plages de « linéarité apparente » pour IFO et CP

Les isothermes obtenues pour deux concentrations extrêmes en DCM ne sont pas superposables, ce qui traduit une influence du compartiment sur les équilibres, notamment pour les concentrations les plus élevées. L'influence n'est pas assez notable pour induire des tendances de sorption différentes entre les deux DCM. De plus, on remarque que le cas à « DCM Minimale » favorise la distribution dans la phase solide, ce qui est cohérent avec le principe du test. Les paramètres de Freundlich estimés pour ces différents cas sont du même ordre de grandeur que ceux présentés lors des essais de sorption en système diphasique, suggérant une méthodologie valable. Les isothermes pour IFO révèlent un comportement intéressant. En effet, la concentration de la solution de dopage en IFO était nettement en-dessous de la concentration attendue, permettant ainsi d'augmenter la résolution aux niveaux de dopage les plus faibles. Un coefficient n de Freundlich proche de 1 traduit une isotherme relativement linéaire à de telles concentrations, ce qui conforte l'idée de recherche d'une zone de « linéarité apparente ». Pour les deux molécules et concentrations en DCM, les tendances de « linéarité » ont été tracées et permettent de dire que le comportement « linéaire apparent » pourrait être une approximation recevable sur une plage variant entre 0,5 et 2,3 $\mu\text{g/L}$ de polluant en phase aqueuse, soit environ 0,4 à 2 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$. Pour limiter le nombre de composites à générer pour chaque boue, une concentration de dopage unique de 1 $\mu\text{g/g}_{\text{MS}}$ a été retenue et considérée comme suffisamment représentative de cet intervalle. A l'exception de la boue de Muret, ce dopage a été appliqué à tous les composites des autres boues. Cette valeur est par ailleurs soutenue par les essais de sorption en diphasique, où les différents isothermes ont montré dans l'ensemble un comportement « linéaire apparent » autour de ce niveau de dopage. La boue de Muret a été écartée des prochains essais compte tenu des difficultés analytiques.

III.3.5.2) Vérification des bilans matière

Une nouvelle étude des bilans matière a été réalisée afin d'apprécier la robustesse de la méthodologie initialement proposée par Barret (2009) et adaptée dans ce travail aux molécules cibles. Les quantités présentes entre l'instant initial (q_0 , en ng) et récupérées en fin des expériences (q_f , en ng) ont été comparées suivant l'équation III-32. Les relations utilisées pour déterminer les quantités natives q^{native} (en ng) dans les deux phases sont explicitées :

$$q_{\text{aqueuse}}^{\text{native}} = C_{\text{aqueuse}}^{\text{native}} \cdot (V_{\text{phase_aqueuse}} + V_{\text{boue}}) \quad \text{Eq. (III-37)}$$

$$q_{\text{aqueuse}}^{\text{solide}} = \frac{C_{\text{solide}}^{\text{native}} \cdot V_{\text{boue}}}{[\text{Part}]} \quad \text{Eq. (III-38)}$$

où C^{native} désignent les concentrations natives dans chacune des phases (ng/L pour la phase aqueuse, ng/g_{part} pour la phase solide), $V_{\text{phase_aqueuse}}$ le volume de phase aqueuse (en L), V_{boue} le volume de boue (en L, identique entre chaque composite), [Part] (MES) la teneur en matières particulaires (g_{part}/L). Le Tableau III-15 présente les bilans matière obtenus pour les deux molécules, pour plusieurs boues et composites.

Tableau III-15 : Vérification du bouclage du bilan matière – système triphasique

Composite Boue	Bilan matière (%) – Ifosfamide							Bilan matière (%) - Cyclophosphamide								
	1	2	3	4	5	6	7	Moy ± σ	1	2	3	4	5	6	7	Moy ± σ
LGC_BAMI(2)	87	113	118	-	34	-	60	82 ± 36	85	100	95	-	86	-	83	90 ± 7
Ginestous(2)	83	76	74	-	91	-	75	80 ± 7	non déterminé							
Narbonne	non déterminé								103	93	88	95	88	96	86	93 ± 6
LGC_BAME(2)	71	72	61	-	72	-	62	68 ± 6	92	97	85	-	81	-	87	88 ± 6
Nailloux	89	105	-	81	65	-	54	79 ± 20	94	99	97	-	98	-	101	98 ± 3

- : phase solide non dosée ; Moy ± σ : moyenne ± écart-type

Alors que les bilans matière sont très satisfaisants pour CP, ceux d'IFO sont caractérisés par des valeurs moyennes plus faibles et parfois très variables. Les molécules ne présenteraient pas la même sensibilité aux conditions du test, ce qui pourrait être expliqué par leurs comportements de sorption. Les raisons de cette variabilité ne sont pas évidentes. Elles pourraient davantage être liées à la procédure analytique plutôt qu'au test. En effet, il est important de rappeler que les niveaux de dopage ont été déterminés sur de la phase aqueuse autoclavée, alors que certains composites peuvent avoir des concentrations en NaCl élevées, dues à l'addition de volumes variables d'eau du robinet corrigée en conductivité et pH. Les échantillons ont alors pu subir des extractions et/ou des analyses de qualité très différentes en relation avec la teneur en NaCl. Cette hypothèse mérite d'être vérifiée. Par prudence, il n'est donc pas pertinent d'analyser la concentration d'une phase puis d'estimer l'autre par bilan matière. **Ainsi, les phases aqueuse et solide seront ici dosées, ce qui permet d'envisager la détermination de K_{global} avec une précision satisfaisante, même si le bilan matière n'est pas totalement bouclé.**

III.3.5.3) Détermination des coefficients de distribution K_{part} et K_{DCM}

L'évolution de K_{global} pour CP et IFO en fonction de la DCM est donnée sur la [Figure III-25](#). La représentation d'IFO pour la boue de Narbonne a été exclue en raison de résultats incohérents.

Aussi bien pour CP que pour IFO pour une boue donnée, les valeurs de K_{global} sont du même ordre de grandeur (15 – 100 L/kg_{part}) que celles de K_{Distrib} estimées lors des essais en système diphasique (10 – 90 L/kg_{part}). On retrouve également une sorption équivalente ou plus importante d'IFO par rapport à CP.

Peu importe la nature de l'analyte ou de la boue, l'allure hyperbolique de K_{global} en fonction de la DCM n'est pas évidente. Afin de savoir si les différences de K_{global} étaient significatives, une ANOVA a été réalisée. La p-value est renseignée pour chacun des graphes ([Figure III-25](#)). Les valeurs obtenues ne permettent pas de rejeter l'hypothèse nulle. L'influence de la DCM sur les équilibres n'est donc pas démontrée. Bien que l'intérêt soit très limité, l'algorithme de Levenberg-Marquardt a été appliqué : les coefficients de corrélation obtenus (R^2) ont très rarement dépassées 0,3 et des problèmes de convergence³ ont été rencontrés. **En accord avec les tendances de l'ANOVA, la détermination de K_{part} et K_{DCM} était donc peu pertinente.**

Ces observations soulèvent des questions quant à la procédure et plus particulièrement sur l'effet des corrections de pH et conductivité. Cet effet peut être multiple. Il pourrait modifier les équilibres de distribution dans un sens peu prévisible. Les variations de K_{global} ont pu être tamponnées en raison de compositions ioniques très différentes entre composites (mais de conductivités équivalentes). Par ailleurs, la DCM de l'eau du robinet corrigée n'a pas été prise en compte. Quelques manipulations par ultrafractionnement ont permis de démontrer que l'eau du robinet non corrigée contenait environ 150 mg/L de DCM uniquement sous forme dissoute (< 1 kDa). Après correction, la concentration était environ d'1 g/L de DCM, toujours sous forme dissoute. Comme pour K_{global} , les variations de DCM entre composites ont pu être largement tamponnées, réduisant finalement le domaine de DCM exploré et les possibilités de mise en évidence du phénomène. La méthodologie développée pourrait être reconsidérée. Une discussion complémentaire sur les limites du test est prochainement proposée.

³ Une astuce mathématique permet de contourner cette difficulté et est abordée dans [Barret \(2009\)](#)

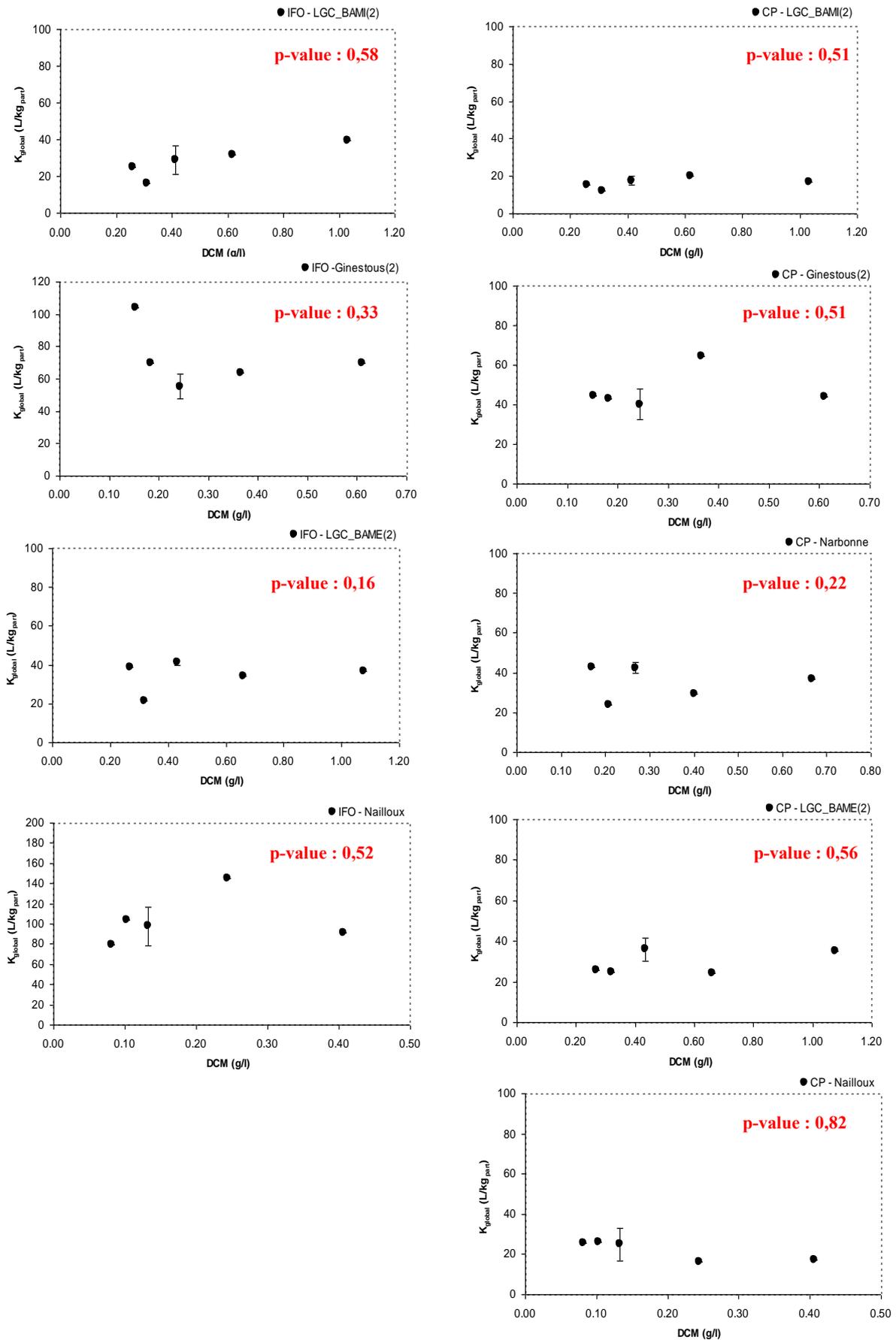


Figure III-25 : Evolution de K_{global} pour IFO (g.) et CP (dr.) en fonction de la DCM

III.3.5.4) Limites du test

De nombreux arguments permettent d'expliquer la difficulté de déterminer les coefficients du modèle triphasique pour ce type de polluants. On peut citer :

- (i) un manque de résolution expérimentale aux très basses DCM, là où l'effet est *a priori* le plus prononcé. Méthodologiquement, il semble très difficile d'atteindre ces valeurs de DCM sans risquer de trop modifier les caractéristiques de la boue ou des composites ;
- (ii) la nécessité d'une méthode analytique sensible et très répétable. Les variations de K_{global} mesurées correspondent parfois à l'erreur analytique. Ainsi, l'erreur analytique a pu cacher une variation effective du K_{global} en fonction de la DCM ;
- (iii) les polluants étudiés n'interagissent pas ou trop peu avec la DCM des boues, il est donc difficile de mettre en évidence un tel phénomène. Plus spécifiquement, on peut penser que les polluants n'interagissent pas avec la DCM des boues étudiées et seulement celles-ci ;
- (iv) l'hypothèse d'une zone de « linéarité apparente » est peut-être trop forte et ne permet pas d'appliquer le modèle triphasique dans ce cas précis ;
- (v) la détermination des coefficients de distribution K_{part} et K_{DCM} suivant un principe calculatoire n'est peut-être pas le plus pertinent et nécessite le recours à des outils analytiques pour permettre la quantification précise des quantités de polluants libres et liés. La SPME non-déplétive est prometteuse mais encore peu intéressante pour les molécules polaires. Des techniques d'isolement de polluants en fonction de la taille de la DCM (*i.e* ultrafractionnement) sont probablement plus appropriées ;
- (vi) repenser la méthodologie développée afin de limiter le biais engendré par l'utilisation de solutions salines. L'eau de dilution devra avoir un pH et une conductivité proches de la boue, tout en limitant très fortement l'apport de DCM.

III.3.6) Mise en lien des caractéristiques des boues et de la sorption

III.3.6.1) Exploitation des données de caractérisation physico-chimique des boues

III.3.6.1.a) Paramètres de la phase solide

Les caractéristiques physico-chimiques des phases solides des boues sont données dans le [Tableau III-16](#). Parmi les échantillons disponibles, la boue de Muret est celle qui présente la teneur en lipides la plus élevée. Ce résultat est cohérent puisque cette boue est mélangée avec des boues primaires, souvent marquées par une fraction lipidique plus importante que pour les boues secondaires ([Ternes *et al.*, 2004](#)). La boue de Ginestous (2) se distingue par ses teneurs élevées en sucres, protéines et substances humiques. Cette boue activée est jeune et fonctionne dans le domaine de la moyenne charge. L'activité biologique y est probablement très importante et la division cellulaire rapide. Ces teneurs doivent donc dépendre d'une part des concentrations dans l'eau d'alimentation, et d'autre part de l'activité de la boue puisque les bactéries excrètent, lors des réactions biologiques, d'importantes quantités d'EPS riches en protéines et sucres. Par ailleurs, la forte teneur observée pour les substances humiques a pu être influencée par la méthode de dosage indirecte décrite dans la partie III.2.6.2.d). Les mesures de MV sont cohérentes avec le fonctionnement du procédé : les boues à moyenne charge et/ou âge de boues faibles sont caractérisées par des teneurs relativement élevées (> 85 %), alors que celles traitant des charges plus faibles et/ou avec des âges de boues grands sont davantage minéralisées (< 80 %). La boue de Muret présente la teneur en MV la plus faible, probablement parce que la matière organique est partiellement digérée et stabilisée en raison de conditions anaérobies. Cette donnée est supportée

par la mesure de DCO (valeur la plus faible). La nature de la matière générée doit toutefois être très différente mais n'a été mise en évidence. Les boues de Muret et LGC_BAME(2) sont caractérisées par des résistances spécifiques plus élevées que pour les autres boues ($2,5 \cdot 10^{12}$ et $8,5 \cdot 10^{11}$ m/kg_{part}). Braak (2012) a observé un lien entre résistance spécifique et DCO de la phase aqueuse des boues : plus la DCO est élevée et plus la résistance spécifique est importante. Ce même lien est ici trouvé où les boues de Muret et LGC_BAME(2) ont des teneurs en DCO en phase aqueuse plus importantes que pour les autres boues (268 et 110 mg d'O₂/L contre ~ 20 mg d'O₂/L) (données brutes disponibles en annexe, Annexe J). La DCO de la phase aqueuse serait donc la plus déterminante dans la mesure de résistance spécifique, résultat en accord avec la littérature (Van Kaam, 2005). Enfin, la boue LGC_BAME(2) est de loin caractérisée par sa très faible granulométrie, de même que par des indices de circularité, convexité et solidité plus faibles que pour les autres boues. Dans ce procédé, les boues sont recirculées à une vitesse de près de 4 – 5 m/s et subissent donc des contraintes de cisaillement très importantes. Cette vitesse entraîne probablement la rupture des agrégats et la dispersion de floccs de très petites tailles. De plus, les indices de morphogranulométrie indiquent que la boue possède les floccs les moins circulaires, aux contours les plus irréguliers et à la structure peu cohésive. Ces observations nous paraissent cohérentes.

III.3.6.1.b) Paramètres de la phase aqueuse

A l'examen des données du Tableau III-16, traduites sous forme de graphes disponibles en annexe (Annexe K), il apparaît que certaines valeurs des paramètres physico-chimiques obtenues après filtration à un seuil donné sont parfois supérieures aux valeurs obtenues avant filtration et pourraient traduire un problème ponctuel lors de la filtration ou de l'analyse. Les teneurs en sucres de la boue LGC_BAMI(2) en sont un exemple. Ce problème n'a pas été induit par la concentration en carbone total (TC) puisque les teneurs mesurées sont équivalentes ou diminuent au fur et à mesure de l'ultrafractionnement. Les comparaisons pourront parfois être délicates.

Dans l'ensemble, les concentrations entre les différentes phases aqueuses des boues sont relativement proches, tout comme les profils de fractionnement. Ainsi, on remarque que le carbone inorganique (IC) est une caractéristique de la fraction la plus ultrafiltrée (matière dissoute). Le carbone organique non purgeable (NPOC) suit la même tendance. Pour toutes les boues, les fractions obtenues sont caractérisées par des teneurs en sucres très faibles, et on peut identifier une corrélation possible entre les mesures de protéines et la DCO (et NPOC). Le profil des substances humiques est lié à celui des protéines pour la raison précédemment évoquée. Les données brutes (valeurs non rapportées) pour toutes les boues (et les deux phases) sont disponibles dans les annexes (Annexe J). On remarque que la phase aqueuse de la boue de Muret est la seule à avoir des concentrations très différentes de celles des autres boues. Elle est également la seule à contenir des AGV, notamment parce qu'elle est en possible digestion anaérobie (acidogénèse, acétogénèse, méthanisation...). Rappelons qu'il n'a pas été possible de caractériser la sorption d'IFO et CP pour cette boue. **La mise en lien des caractéristiques des phases aqueuses et de sorption est par conséquent très discutable.**

Tableau III-16 : Caractéristiques physico-chimiques des différentes fractions des boues étudiées

Paramètres	Caractéristiques de la phase solide																	
	ρ_{tot} (g/cm ³)	ρ_{min} (g/cm ³)	ρ_{org} (g/cm ³)	Lipides (g/gPart)	CT (g _{CT} /gPart)	Sucres (g _{Glu} /gPart)	Protéines (g _{BSA} /gPart)	Substances Humiques (g _{AH} /gPart)	DCO (g _{O2} /gPart)	pH	σ (μ S/cm)	R. α (m/kg)	MV (g _{MV} /gPart)	d _[4,3] (μ m)	Convex.	Circ.	Solid.	Elong.
LGC_BAMI(2)	1,43	2,59	1,35	0,04	0,42	0,07	0,12	0,09	1,05	7,45	906	5,1.10 ¹⁰	0,89	88	0,93	0,72	0,92	0,34
Ginestous (2)	1,34	2,56	1,28	0,07	0,44	0,41	1,37	0,91	1,06	7,2	650	4,2.10 ¹⁰	0,91	120	0,92	0,70	0,91	0,35
Muret	1,46	2,48	1,25	0,10	0,40	0,33	0,31	0,21	0,96	7,75	1630	2,5.10 ¹²	0,71	102	nd	nd	nd	nd
Narbonne	1,48	2,72	1,32	0,05	0,37	0,14	0,12	0,08	1,13	8,35	1290	1,6.10 ⁹	0,79	176	0,93	0,63	0,91	0,38
LGC_BAME(2)	1,42	2,26	1,34	0,01	0,40	0,09	0,32	0,13	1,02	7,85	1520	8,5.10 ¹¹	0,85	10	0,54	0,42	0,77	0,32
Nailloux	1,49	2,44	1,32	0,03	0,37	0,29	0,21	0,13	1,05	7,5	730	5,3.10 ⁹	0,75	133	0,92	0,69	0,91	0,32

ρ_{tot} : densité totale ; ρ_{min} : densité minérale ; ρ_{org} : densité organique ; CT : carbone total ; DCO : demande chimique en oxygène ; σ : conductivité ; R. α : résistance spécifique ; MV : matières volatiles ; d_[4,3] : diamètre volumique [4,3] ; convex. : indice de convexité ; circ. : indice de circularité ; solid. : indice de solidité ; elong. : indice d'élongation ; nd : non déterminé

Paramètres	Caractéristiques de la phase aqueuse																							
	Sucres (mg _{eq glucose} /mg _{CT})				Protéines (mg _{BSA} /mg _{CT})				DCO (mg _{O2} /mg _{CT})				Substances Humiques (mg _{eq AH} /mg _{CT})				IC (mg _{IC} /mg _{CT})				NPOC (mg _{NPOC} /mg _{CT})			
Seuil de filtration	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa
LGC_BAMI(2)	0,88	0,48	0,74	0,99	0,43	0,29	0,29	0,19	1,43	1,06	0,75	0,80	0,63	0,37	0,41	0,30	0,51	0,55	0,57	0,63	0,49	0,45	0,43	0,37
Ginestous (2)	0,04	0,03	0	0,02	0,25	0,24	0,17	0,11	0,60	0,45	0,23	0,24	0,32	0,29	0,22	0,15	0,74	0,73	0,74	0,79	0,26	0,27	0,26	0,21
Muret	0,10	0,03	0,02	0	0,62	0,33	0,14	0,10	1,44	1,05	0,33	0,22	0,39	0,40	0,21	0,15	0,80	0,70	0,88	0,91	0,21	0,30	0,12	0,09
Narbonne	0,01	0,01	0,01	0	0,22	0,17	0,18	0,13	0,65	0,60	0,51	0,64	0,29	0,29	0,28	0,23	0,76	0,77	0,77	0,77	0,24	0,24	0,23	0,23
LGC_BAME(2)	0,15	0,10	0,02	0,02	0,36	0,25	0,22	0,10	1,20	0,81	0,38	0,08	0,26	0,25	0,22	0,09	0,72	0,75	0,84	0,89	0,28	0,28	0,16	0,11
Nailloux	0	0,02	0,01	0	0,18	0,17	0,12	0,09	0,66	0,65	0,60	0,66	0,26	0,29	0,25	0,17	0,75	0,73	0,74	0,75	0,25	0,25	0,26	0,25

IC : carbone inorganique ; NPOC : carbone organique non purgeable

III.3.6.2) Recherche de corrélations « boue/polluant/sorption »

III.3.6.2.a) Précisions sur les objectifs du « modèle »

L'objectif initial de cette recherche de corrélations consistait à mettre en lien les caractéristiques des boues et des polluants avec celles du système triphasique pour la sorption : K_{part} devait être mis en lien avec les caractéristiques de la phase solide, et K_{DCM} avec celles de la phase aqueuse. **L'application du système triphasique n'ayant pas été concluante, cet objectif n'est donc pas réalisable.**

Nous avons précédemment observé que les caractéristiques des phases aqueuses des boues étaient très proches, à l'exception de la boue de Muret. Cette boue ne peut toutefois pas être intégrée pour les raisons précédemment données. Ainsi, nous disposons d'échantillons très peu variables et en nombre très limité. De plus et même si cela constitue une hypothèse, les paramètres de sorption (K_{Distrib} , n de Freundlich...) peuvent difficilement être envisagés comme des caractéristiques de la sorption en phase aqueuse, ou être dérivés en paramètres de signification proche et adaptés à cette phase. **L'idée de corrélations entre caractéristiques de la phase aqueuse, des polluants et de la sorption est donc abandonnée.**

Nous tenterons de rechercher des corrélations évidentes⁴ par ACP entre (i) caractéristiques physico-chimiques de la phase solide et caractéristiques de la sorption (K_{Distrib} à 1 $\mu\text{g/L}$ et n) pour IFO et CP, et (ii) paramètres physico-chimiques de la phase solide de manière à proposer une mesure qui pourrait représenter un ensemble de corrélations et être conservée (selon des critères pratiques par exemple), dans l'idée de réduire les manipulations de caractérisation.

III.3.6.2.b) Corrélations « boue/polluant/sorption » pour la phase solide

Les corrélations ont été tracées pour IFO et CP sous forme de cercles de rayon unité et sont données sur la [Figure III-26](#). Les contributions des axes à l'explication de la variance totale des nuages de points sont également renseignées. Dans les plans de projection choisis (axe 1 et axe 2), il apparaît que les variances totales d'IFO et CP sont caractérisées par des niveaux de représentation de 71 et 78 %, et sont donc bien représentées.

Pour IFO, on remarque que les paramètres de sorption sont près du centre du cercle (coordonnées 0 ; 0) et sont donc mal représentés dans le plan sélectionné. Pour améliorer leur qualité de représentation, il aurait été possible de projeter les données sur un autre plan, ce qui aurait eu pour conséquence de diminuer dramatiquement la représentation des autres variables. Il n'existe donc pas de corrélations intéressantes à exploiter.

Pour CP, les paramètres de sorption bénéficient d'une meilleure représentation dans le plan choisi. Parmi les corrélations évidentes on note :

- (i) le paramètre de n de Freundlich est fortement corrélé avec les indices de granulométrie et notamment circularité, convexité et solidité. Les corrélations sont comprises entre 0,88 et 0,95. Ces corrélations pourraient avoir un sens physique dans le sens où l'intensité de la sorption et les caractéristiques des particules pourraient être liées. D'après le sens des corrélations, les particules les plus sphériques, les plus régulières et les plus cohésives pourraient être caractérisées par les intensités de sorption de CP les plus fortes. Des considérations sur l'arrangement des molécules (d'eau, de polluant...?) autour et en fonction des caractéristiques des particules

⁴ Des corrélations et anticorrélations évidentes sont respectivement marquées par des coefficients égaux ou proches de 1 et - 1.

pourraient être explorées. Par ailleurs, l'anticorrélation nette entre n et la résistance spécifique (-0,86) a une signification peu établie. Rappelons cependant que le risque d'obtenir de possibles « fausses » corrélations est d'autant plus grand que le nombre de données exploitées est faible (Badertscher et Pretsch, 2006) ;

- (ii) le paramètre K_{Distrib} présente une corrélation intéressante avec la DCO (0,83), ce qui rejoindrait l'idée largement répandue d'une dépendance des capacités de sorption à la matière organique (Schwarzenbach *et al.*, 2004 ; Tulp *et al.*, 2009) ;
- (iii) les paramètres K_{Distrib} et n n'ont pas de corrélation franche ($\sim -0,25$). Ils représenteraient donc des caractéristiques bien différentes de la sorption.

Outre ces considérations sur les paramètres de sorption, on remarque que les teneurs en MV, CT, protéines et substances humiques sont fortement corrélées ($> 0,85$). Ces corrélations sont logiques puisque les protéines et les substances humiques sont des molécules organiques (à base de nombreux atomes de carbone). Les matières organiques sont caractérisées par des densités nettement plus faibles que pour les matières minérales (facteur 2) : l'anticorrélation avec la densité totale (-0,85) est possible. La corrélation entre les indices de granulométrie et la densité minérale ($> 0,8$) semble confirmer le rôle central de la matière minérale dans la structuration des floes de boue. L'anticorrélation avec la résistance spécifique (-0,9) indiquerait que les structures les plus désorganisées (lâches, irrégulières, ramifiées...) seraient celles avec les propriétés colmatantes les plus élevées. Dans un objectif de caractérisation rapide de boues, une de ces mesures pourrait donc donner des indications intéressantes sur l'évolution des autres paramètres. Le choix de la mesure « représentante » doit être décidé au cas par cas (temps, disponibilité de matériel, coût...).

Les quelques corrélations extraites de cette analyse ont probablement un sens et une généralité très limités puisque (i) peu de données ont été injectées dans l'ACP (5 boues x 20 paramètres) et (ii) K_{Distrib} n'est pas constant suivant la concentration d'équilibre. De plus, les différences de K_{Distrib} entre les boues sont apparues très relatives, malgré la recherche de matrices de nature supposée variée à travers la diversification des procédés échantillonnés. Pour ces polluants, ces observations nous amènent à penser que (i) le paramètre de sorption K_{Distrib} peut manquer de finesse dans un objectif de modélisation de la sorption. Cette hypothèse peut donc remettre en cause son utilisation et plus généralement, l'utilisation d'isothermes pour sa caractérisation. Par ailleurs, il est important de rappeler que les isothermes (Langmuir, Freundlich...) sont héritées de théories et d'observations pour les équilibres solide-gaz (à haute concentration en soluté) et peuvent ici ne pas être adéquats (équilibre solide-liquide à très faible concentration en soluté). Ainsi, la recherche d'autres outils de caractérisation de la sorption pourrait être envisagée ; (ii) les mesures physico-chimiques effectuées étaient peut-être encore trop globales pour expliquer ou être corrélées avec les faibles différences de K_{Distrib} , et nécessiterait la mise en place de méthodes de dosage plus spécifiques. Enfin, ces résultats soulèvent de grandes interrogations quand à la pertinence d'une modélisation globale de la sorption de molécules polaires neutres sur les boues. Il est sans doute important de comprendre d'abord la nature des interactions de sorption avec la boue, avant de reconsidérer toute tentative de modélisation.

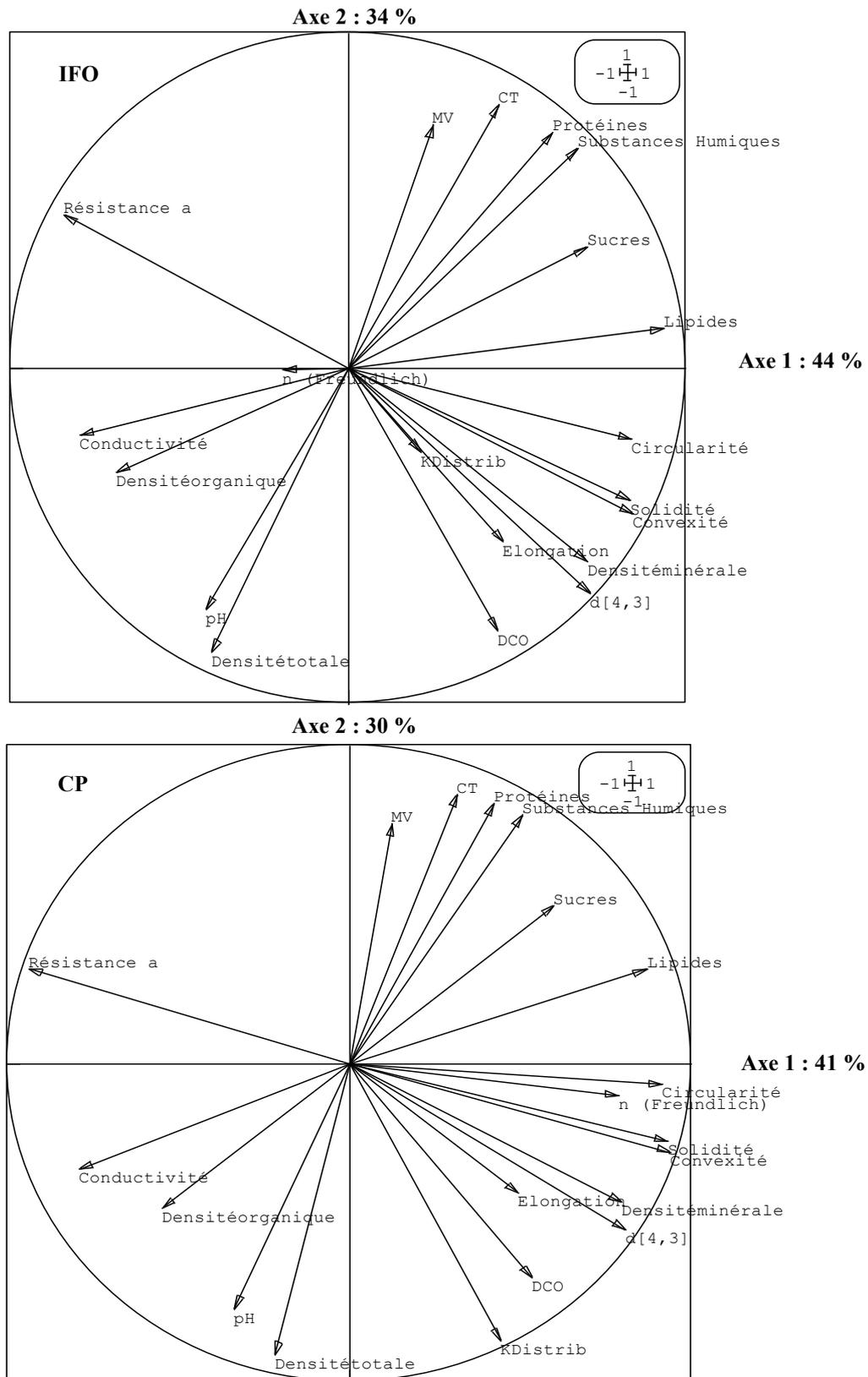


Figure III-26 : Cercles des corrélations obtenues pour IFO et CP entre caractéristiques physico-chimiques du culot et de la sorption

III.4) Conclusion du chapitre

A travers ce chapitre, une procédure originale de préparation de boues a été proposée en vue d'une estimation satisfaisante des cinétiques et tendances de sorption. TAM a démontré une sorption instantanée et possiblement très forte sur la boue, n'autorisant pas une caractérisation précise. IFO et CP ont démontré une sorption en quelques heures, indépendamment du type de boue, mais avec des cinétiques différentes et probablement influencées par un effet de concentration en polluants au voisinage du solide.

L'étude des isothermes de sorption d'IFO et CP sur les boues a conduit à une modélisation de type Freundlich. L'adéquation de ce modèle à nos échantillons implique une dépendance de K_{Distrib} aux concentrations d'équilibre, et rend l'utilisation de l'isotherme linéaire *a priori* caduque. Par ailleurs, les paramètres estimés ont révélé des comportements différents entre IFO et CP et parfois entre les boues, mais toujours caractérisés par des aptitudes de sorption très relatives. Des réserves ont toutefois été émises quant à la qualité de prédiction aux concentrations rencontrées en STEP. Considérer la sorption comme un mécanisme de poids dans l'élimination de ces molécules en STEP reste tout de même peu probable.

La mise en évidence d'un effet de la matière colloïdale sur la distribution des polluants n'a pu être possible et invite à développer des méthodes de détermination davantage directes. Enfin, un lien entre caractéristiques physico-chimiques de la boue et de la sorption n'a pu être clairement distingué, et soulève des questions quant aux caractéristiques à suivre dans de prochaines expériences. Le paramètre K_{Distrib} constitue un estimateur rapide et intéressant de la distribution, mais semble difficile d'utilisation dans une tentative de modélisation de la sorption de micropolluants polaires et neutres sur les boues.

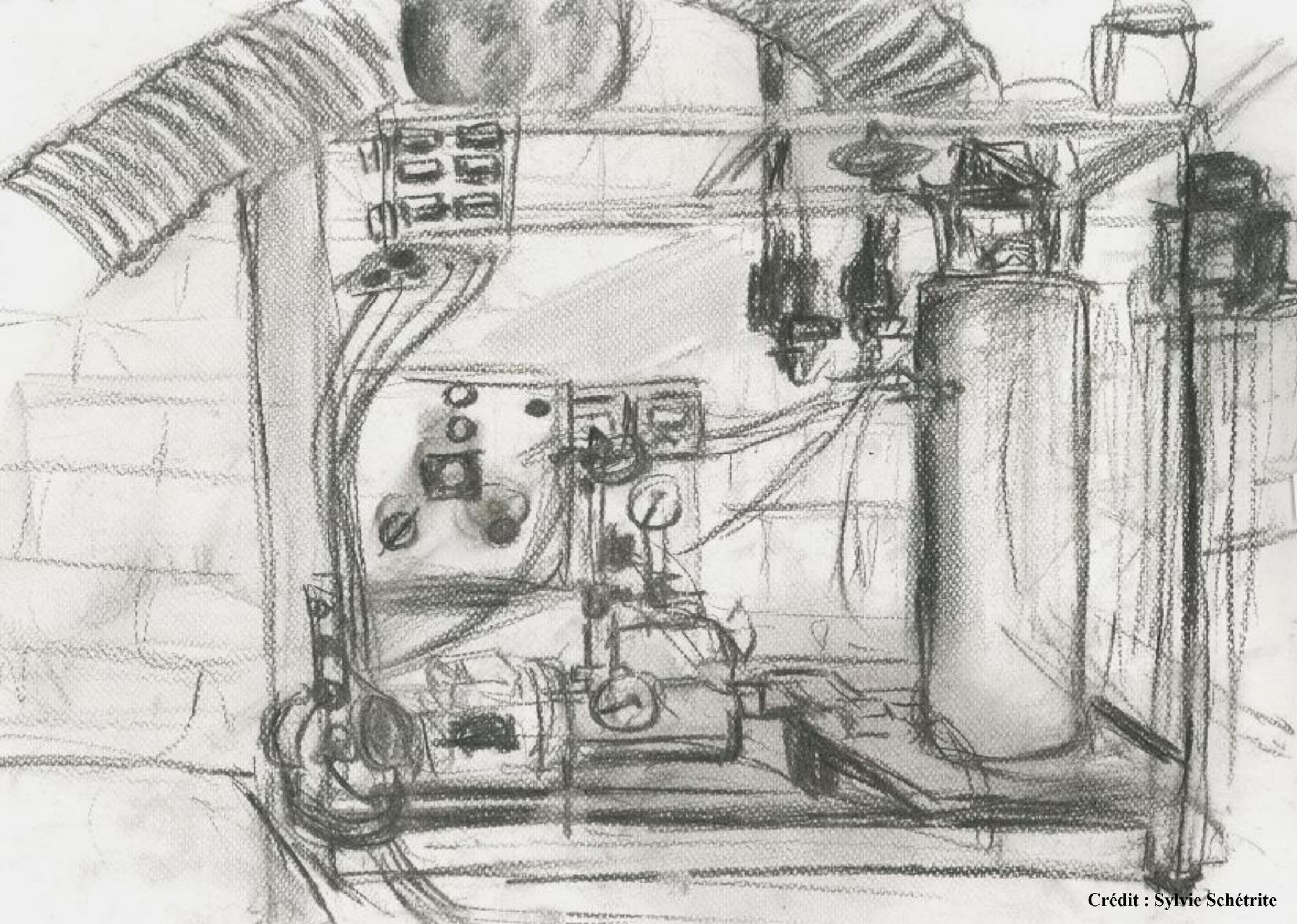
En réponse à la question posée dans le titre du chapitre il n'est donc, pour le moment, pas possible d'obtenir un modèle prédictif satisfaisant pour de tels objectifs. La portée des conclusions est cependant modérée par le nombre réduit d'analytes et par leurs caractéristiques physico-chimiques proches, et invite à reproduire les expériences pour d'autres polluants et boues en tenant compte des propositions méthodologiques formulées tout au long du chapitre. Tous ces propos seront complétés par des réflexions dans le chapitre conclusions et perspectives en fin de manuscrit.

Chapitre IV.

Identification et caractérisation des processus d'élimination de molécules anticancéreuses en traitement d'effluents contaminés : application au fonctionnement d'un bioréacteur à membrane

Le chapitre précédent a mis en évidence des comportements de sorption très différents entre les molécules cibles IFO et CP, mais avec des quantités sorbées très modérées à des concentrations voisines du $\mu\text{g/L}$ et ce, quelle que soit la nature de la boue. L'objectif principal de ce chapitre est de comprendre les mécanismes à l'origine du taux d'élimination de 80 % du CP, observé par Luis Delgado lors de son travail de thèse portant notamment sur l'élimination de cette molécule par un procédé du type bioréacteur à membrane. Les recherches développées dans ce chapitre impliquent la caractérisation des phénomènes de sorption et de biodégradation, de même que les interactions avec la matière colloïdale des boues.

Comme pour les deux chapitres précédents, ce quatrième chapitre est décomposé entre (i) une revue bibliographique qui permet de situer le bioréacteur à membrane dans la palette des procédés d'épuration et ses avantages possibles dans l'élimination de molécules traces pharmaceutiques, (ii) un descriptif des expériences réalisées à travers les matériels et méthodes développés, (iii) une discussion autour des résultats de caractérisation d'interactions entre la biomasse et les molécules cibles au sein du procédé étudié.



IV.1) Revue bibliographique

IV.1.1) Introduction et structuration de la partie

Le chapitre I a mis évidence les limites actuelles du procédé à boues activées dans l'élimination de molécules anticancéreuses. Cette observation n'est cependant pas propre à ce type de polluants et peut être généralisée. Des études récentes sur le procédé de bioréacteur à membrane tendent à démontrer un plus grand intérêt dans la réduction de ces pollutions (Sipma *et al.*, 2010). La plupart des études traitant de l'élimination des produits pharmaceutiques lors du traitement d'eaux contaminées ont appliqué une approche boîte noire, consistant à observer (ici doser) uniquement les entrées et les sorties en polluants organiques aux bornes des systèmes. Or, il est à présent nécessaire d'évoluer vers une approche boîte blanche, consistant à explorer « l'intérieur » du procédé afin de révéler la nature des interactions à l'origine de l'élimination. L'évaluation des mécanismes est une étape préliminaire indispensable dans la compréhension précise du fonctionnement des procédés et la proposition de stratégies opératoires pour améliorer si possible leurs performances. La synthèse bibliographique proposée s'intéresse à la technologie du bioréacteur à membrane, son positionnement global dans le paysage de l'épuration des eaux usées puis dans le traitement des molécules traces pharmaceutiques. Enfin, une brève description du mécanisme de biodégradation de molécules organiques dans les boues complète ce travail de synthèse. Les technologies de boues activées et de bioréacteurs à membrane seront régulièrement comparées.

IV.1.2) Autour de la technologie du bioréacteur à membrane

Pour pallier la fragilité de l'étape de clarification utilisée dans les procédés conventionnels à boues activées (BA), l'idée d'une rétention des constituants par une barrière infranchissable a vu le jour il y a une cinquantaine d'années. Basés sur le couplage entre oxydation biologique de la pollution et séparation physique par une membrane de micro- ou d'ultrafiltration, les bioréacteurs à membranes (BAM) permettent d'obtenir une eau épurée de très grande qualité, que ce soit en composition chimique ou microbiologique.

IV.1.2.1) Configurations existantes

IV.1.2.1.a) Le bioréacteur à membrane externe

Le premier bioréacteur à membrane a vu le jour vers la fin des années 1960 et fut développé simultanément par Dorr-Oliver et Rhône-Poulenc (Grélot, 2009). Les premiers modèles étaient basés sur la configuration dite à boucle externe (BAME), où le système de filtration est placé hors du bioréacteur (Figure IV-1).

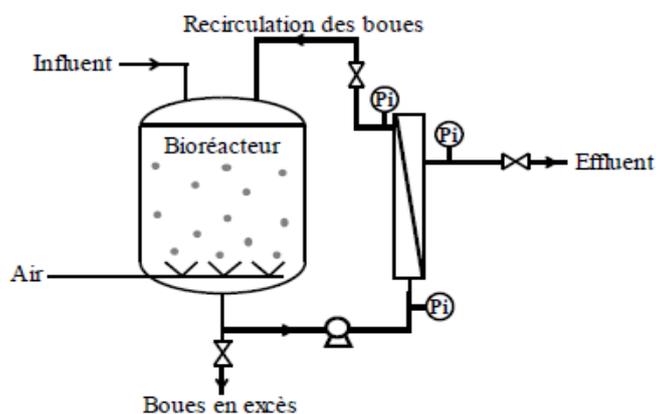


Figure IV-1 : Bioréacteur à membrane en configuration externe

La filtration mise en œuvre est de type tangential. Dans ces conditions, les pressions appliquées sont fortes (1 à 4 bar) et les vitesses de circulation élevées (2 à 5 m/s) (Xing *et al.*, 2001). L'application de telles vitesses permet (i) de générer des contraintes de cisaillement qui vont limiter le développement du colmatage de la membrane (Wisniewski *et al.*, 2000) et (ii) de produire un volume important de perméat pouvant atteindre 120 L/h/m² (Xing *et al.*, 2001). Les membranes utilisées sont généralement de type tubulaire céramique. Leur avantage réside dans leur très bonne résistance aux lavages chimiques agressifs (pH 2 à 13) et aux fortes températures (jusqu'à 80 °C) (Villain, 2012). Néanmoins, leur développement a été fortement modéré d'une part en raison d'une consommation énergétique élevée (0,7 – 50 kW/m³; Gander *et al.*, 2000; Le-Clech *et al.*, 2006) supérieure à celle des BA (0,3 kWh/m³; Yamamoto *et al.*, 1989) et d'autre part en raison du coût élevé des membranes et leur perte rapide de perméabilité (Braak, 2012). Leur présence dans le parc épuratoire des eaux usées est donc limitée.

IV.1.2.1.b) Le bioréacteur à membrane interne et configuration dérivée

Une seconde génération de bioréacteurs à membrane est apparue au milieu des années 1980 (Yamamoto *et al.*, 1989) pour rendre l'utilisation de cette technologie plus accessible et diminuer sensiblement les coûts de fonctionnement. Sous cette nouvelle configuration, les membranes sont directement intégrées au réacteur biologique (BAMI) (Figure IV-2 (a)).

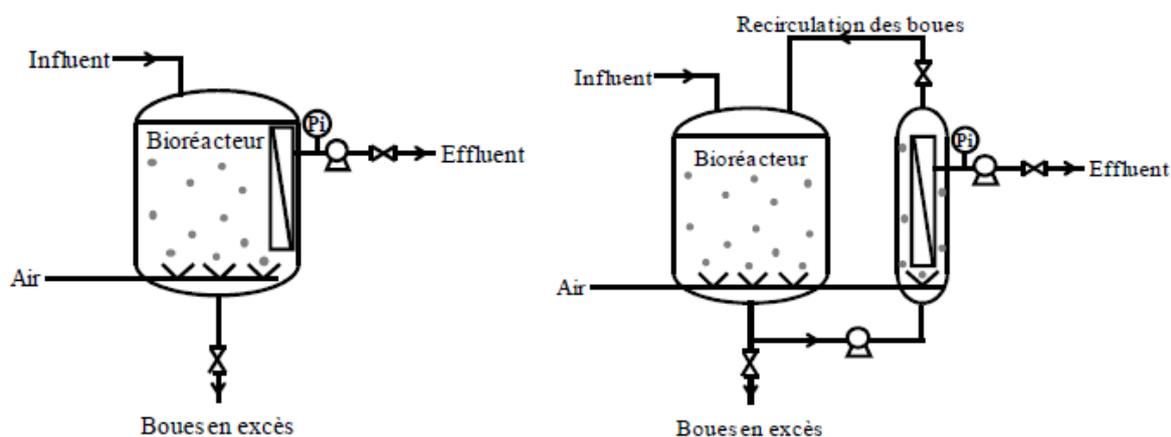


Figure IV-2 : Bioréacteur à membrane en configuration interne (a) et semi-externe (b)

La filtration mise en œuvre est de type frontal. Contrairement au BAME, l'eau épurée est « aspirée » et le travail se fait en dépression, avec des pressions transmembranaires (PTM) dépassant rarement les 0,5 bar (Braak, 2012). Les flux de perméat sont alors nettement plus faibles que la configuration précédente et compris entre 5 et 20 L/h/m² (Ueda et Hata, 1999). Les modules filtrants utilisés sont principalement des fibres creuses ou des membranes planes organiques. L'aération fournie dans le bioréacteur permet de lutter contre le colmatage en créant une agitation à proximité des membranes (Villain, 2012). De plus, l'énergie nécessaire au fonctionnement d'un BAMI est bien moindre par rapport à celle d'un BAME (< 1 kW/m³; Le-Clech *et al.*, 2006). Ainsi et malgré des flux de perméat modérés, cette configuration a permis l'essor du marché des BAM, notamment grâce aux faibles besoins énergétiques et aux prix très relatifs des membranes organiques par rapport aux céramiques (facteur 3 à 5 pour une même surface membranaire).

Plus récemment, une variante du BAMI est en train de se développer : le BAM externalisé (BAMIE) ou BAM semi-externe. Braak (2012) précise que le terme de BAM en filtration semi-frontale est également employé. Sous cette nouvelle configuration, les membranes sont immergées dans un carter extérieur dans lequel circule la liqueur mixte (Figure IV-2 (b)). Cette disposition a l'avantage (i) de découpler l'aération nécessaire aux bactéries et celle nécessaire au décolmatage des

membranes (puissances différentes requises...) et (ii) de faciliter les opérations de maintenance. Les flux de perméat sont identiques à ceux obtenus pour les BAM.

IV.1.2.2) Quel est l'intérêt d'utiliser les bioréacteurs à membrane ?

On se propose de justifier l'intérêt des bioréacteurs à membranes pour le traitement des eaux usées à travers une liste d'avantages **non exhaustive**.

Qualité de l'effluent

La qualité de l'eau traitée dans un BAM est mieux contrôlée que dans les BA. En effet, la rétention complète des MES ainsi que de certains virus et bactéries est assurée par les membranes de micro- et surtout d'ultrafiltration. L'effluent possède une qualité microbiologique satisfaisante et limite ainsi l'utilisation d'oxydants habituellement employés en traitement de désinfection (ozone, chlore...), sauf ceux nécessaires à la rémanence. De plus, les variations de charge dans l'eau d'entrée sont beaucoup mieux assimilées dans les BAM et permettent de conserver un effluent d'une qualité chimique très satisfaisante (Johir *et al.*, 2012).

Concentration de la biomasse

Les BAM peuvent fonctionner avec des concentrations en MES de l'ordre de 8 à 18 $\text{g}_{\text{part}}/\text{L}$ et fréquemment au-delà de 10 $\text{g}_{\text{part}}/\text{L}$ (Drews, 2010). Dans les BA, la concentration excède très difficilement 3 $\text{g}_{\text{part}}/\text{L}$. Ainsi, les BAM permettent soit (i) de travailler à charge massique plus faible si le volume du bioréacteur est le même, (ii) de gagner en compacité (temps de séjour hydraulique plus faible) si l'on travaille à même charge massique que dans un BA.

Temps de séjour des boues

Dans un BAM, le temps de séjour des boues peut être contrôlé indépendamment du temps de séjour hydraulique, ce qui n'est pas le cas pour les BA. En effet, la séparation solide dans un BA se fait par décantation et nécessite le développement de floccs jusqu'à une taille suffisante (environ 50 à 100 μm) pour que le phénomène physique puisse avoir lieu. Un temps de séjour hydraulique suffisamment long est donc nécessaire au bon fonctionnement du BA. Dans un BAM, les particules retenues sont celles dont la taille et la nature correspondent à la sélectivité de la membrane. Il est alors possible de trouver des temps de séjour de boues de plus de 20 jours (Massé, 2004).

Rétention et développement de bactéries à croissance lente

Les bactéries nitrifiantes, qui oxydent les ions ammonium NH_4^+ en ions nitrites NO_2^- puis nitrates NO_3^- , sont caractérisées par une vitesse de croissance assez lente et des coefficients de rendements faibles (Gao *et al.*, 2004). La rétention totale des MES permet leur développement dans des niveaux adéquats. En conséquence, l'activité de nitrification est bien plus importante dans les BAM ($2,3 \text{ g}_{\text{N-NH}_4^+} \cdot \text{kg}_{\text{MES}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) que dans les BA ($0,95 \text{ g}_{\text{N-NH}_4^+} \cdot \text{kg}_{\text{MES}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Les performances des BAM dans le traitement de l'azote sont donc meilleures.

Production de boues

La production de boues en excès dans un BAM fonctionnant en faible charge ($0,1 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$) est plus faible que pour un BA. Les productions sont respectivement de 0,2 à 0,4 $\text{kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{kg}_{\text{DCOéliminée}}^{-1}$ contre 0,3 à 0,6 $\text{kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{kg}_{\text{DCOéliminée}}^{-1}$. En travaillant à un temps de séjour des boues infini, certains auteurs ont minimisé cette production à 0,12 $\text{kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{kg}_{\text{DCOéliminée}}^{-1}$ (Pollice *et al.*, 2004 ; Sun *et al.*, 2007). Le traitement des boues constitue un poste de dépenses relativement important dans le fonctionnement d'une station (25 à 60 % des coûts d'exploitation ; Horan, 1989) et toute réduction est un effort notable vers une démarche éco-responsable.

IV.1.2.3) Marché actuel et évolution possible

L'évolution du marché européen jusqu'en 2005 a été étudiée par [Lesjean et Huisjes \(2008\)](#). De ce travail, il apparaît que depuis 2002 le secteur connaît un développement important en Europe, avec plus de 20 nouvelles installations municipales chaque année et plus de 50 pour le traitement d'eaux industrielles. D'après [Frost et Sullivan \(2005\)](#), ce marché s'élevait à environ 60 millions d'euros par an en 2005. Les installations industrielles sont cependant de plus petites tailles, avec des capacités moyennes de 180 m³/j contre 2500 m³/j pour les installations municipales. Ainsi, [Braak \(2012\)](#) précise qu'en calculant les parts de marché par rapport aux surfaces membranaires installées, le secteur municipal représente près de 75 % du marché sur la période 2003 - 2005. Une étude de [Kraume et Drews \(2010\)](#) complète les tendances renseignées en donnant un taux de croissance pour le secteur municipal européen de près de 45 nouvelles installations entre 2006 et 2008. Cette croissance est notamment due aux avancées techniques (configuration immergée, matériau des membranes plus résistant...) qui ont permis de rendre le procédé viable pour des stations municipales de grande taille. Par ailleurs, [Zheng et al. \(2010\)](#) ajoutent que la croissance annuelle du marché des BAM en Chine est de quasiment 100 %. Le marché des BAM s'est donc considérablement développé ces dernières années et devrait poursuivre sa progression. Quelques raisons peuvent être citées :

- (i) le besoin de stations de traitement compactes ([Judd, 2008](#)) et l'amélioration des systèmes de traitement, souvent sous-dimensionnés ;
- (ii) la raréfaction des ressources en eau. Le niveau de stress hydrique augmente continuellement et pourrait sensiblement s'accroître d'ici 2020 ([Judd, 2010](#)) ;
- (iii) l'apparition de normes de rejets plus sévères et aussi bien en traitement d'effluents industriels que municipaux ([Atkinson, 2006](#)) ;
- (iv) le développement de projet en réutilisation d'eaux usées traitées (REUT) qui nécessitent très souvent une eau de grande qualité ([Boutin et al., 2009](#)) et ce, indépendamment de l'application envisagée.

Malgré de grands avantages dans le traitement des eaux, il serait peu prudent de considérer les BAM comme la panacée et de répandre l'idée suivant laquelle ils vont définitivement se substituer aux BA à plus ou moins long terme. En effet, un document de [Lesjean et al. \(2011\)](#) clarifie la position du procédé dans le marché de l'épuration. Il y est notamment précisé que les BAM ne traitent « que » les eaux usées de 2 millions de personnes en Europe, soit 0,5 % de la population. De nombreux facteurs tendent à limiter l'expansion du procédé, notamment :

- (i) les besoins énergétiques plus élevés que ceux des BA (environ + 0,2 kW/m³) et donc des coûts opératoires plus élevés. [Braak \(2012\)](#) ajoute que ce facteur énergétique risque de devenir un désavantage non négligeable compte tenu de l'augmentation du coût de l'énergie et de la nécessité de diminuer les émissions de gaz à effet de serre (GES) ;
- (ii) le risque opératoire élevé. Des dommages irréversibles peuvent être causés au procédé du fait du caractère non prévisible du colmatage. Un travail de maintenance est indispensable et nécessite du personnel qualifié pour le nettoyage et le remplacement des membranes.

Ces verrous sont toutefois activement étudiés, comme l'atteste l'augmentation continue du nombre de publications traitant de ces sujets ([Braak, 2012](#)). La progression des connaissances sur les conditions optimales de décolmatage (vitesse de l'air, caractéristiques des bulles...) et d'aération de la biomasse (fréquence d'injections...) permettra certainement de réduire à la fois les besoins énergétiques et d'opérations de maintenance, contribuant à populariser le procédé.

IV.1.3) Quelle est la contribution des procédés biologiques dans l'élimination des produits pharmaceutiques ?

D'une manière générale, les mécanismes d'élimination présentés dans le chapitre I s'appliquent aussi bien aux BA qu'aux BAM. On rappelle que ces mécanismes sont la sorption et la biodégradation pour les molécules pharmaceutiques. Bien qu'il ait déjà été démontré que les membranes de micro- ou d'ultrafiltration utilisées dans les bioréacteurs pouvaient retenir en partie des composés de type stéroïde (Snyder *et al.*, 2007), la rétention physique par la membrane ne peut être envisagée comme un mécanisme d'intérêt dans ce procédé, les molécules pharmaceutiques ayant des poids moléculaires (100 – 300 kDa) nettement inférieurs aux seuils limitrophes des membranes (Joss *et al.*, 2005). Cette remarque pourrait toutefois être prochainement reconsidérée en raison de l'apparition récente de bioréacteurs avec des membranes de nanofiltration (Zaviska *et al.*, 2013).

IV.1.3.1) Avantages potentiels des BAM sur les BA

L'opération à âge de boues élevé favorise le développement des bactéries à croissance lente et l'adaptation possible des populations bactériennes aux différents produits pharmaceutiques. Clara *et al.* (2005) ajoutent que cette condition opératoire favorise la diversification du consortium de microorganismes, augmentant dans le même temps la capacité physiologique des boues à traiter cette pollution : ce fut notamment le cas dans l'étude de Suarez *et al.* (2010) où l'ibuprofène et le diclofénac ont pu être en partie éliminés grâce au développement de bactéries spécifiques.

Le travail à des concentrations élevées en biomasse permet l'intensification des processus biologiques et peut favoriser les interactions entre les différents microorganismes, de même que l'échange d'information génétique (De Wever *et al.*, 2007). De cette forte concentration en biomasse découle une quantité de substrat disponible très réduite pour chaque microorganisme. Ainsi, une minéralisation de la matière plus complète est attendue, avec possibilité d'utiliser les micropolluants comme substrats (Weiss et Reemtsma, 2008). Par ailleurs, Cicek *et al.* (1999) précisent que les BAM sont souvent caractérisés par une biomasse plus viable que celle des BA, notamment en raison de floes plus petits. D'après Cirja (2007), cette caractéristique pourrait favoriser un contact plus direct entre les polluants et les bactéries et la production d'enzymes spécifiques.

IV.1.3.2) Réalité sur l'élimination de produits pharmaceutiques

Les rendements d'élimination renseignés dans cette partie sont tirés d'une courte review réalisée par Sipma *et al.* (2010) et complétée par une synthèse plus détaillée produite par Verlicchi *et al.* (2012). Le travail de Verlicchi recense les **rendements d'élimination observés sur 264 installations, comprenant 242 BA échelle réelle, 2 BA échelle pilote et 20 BAM échelle pilote**. Toutes sont installées sur site. Pour les molécules ciblées, les observations s'appuient sur un travail récent de Zhang *et al.* (2013) et complété par quelques références supplémentaires.

IV.1.3.2.a) Observations pour les produits pharmaceutiques en général

Un échantillon du travail de synthèse de Verlicchi *et al.* (2012) est renseigné dans le **Tableau IV-1**. Les molécules présentées ont été sélectionnées en favorisant celles dont le nombre de références était suffisamment important pour pouvoir extraire une tendance. Ainsi, 4 analgésiques/anti-inflammatoires, 6 antibiotiques, 2 bêtabloquants, 2 régulateurs lipidiques, 1 anti-convulsant, 2 produits hormonaux et 1 antiseptique ont été retenus. Leurs concentrations avoisinent le µg/L et sont davantage détaillées dans la publication.

Tableau IV-1 : Quelques rendements d'élimination de produits pharmaceutiques en BA et BAM d'après l'étude de Verlicchi *et al.*, 2012

Molécule	Classe thérapeutique	Rendement moyen (%) (min/max) ^a		Nombre de références ^a	
		BA	BAM	BA	BAM
Diclofénac	Analgésiques	29 (-111/80)	60 (-8/90)	> 20	10
Ibuprofène	-	87 (-13/99)	98 (86/99)	> 20	?
Kétoprofène	Anti	56 (7/99)	70 (42/99)	> 20	10
Naproxène	inflammatoires	73 (35/97)	91 (71/99)	> 20	10 ?
Clarithromycine		40 (0/83)	70 (42/93)	7	4
Erythromicine		26 (-84/76)	61 (26/97)	11	9
Ofloxacine	Antibiotiques	60 (13/98)	94 (92/96)	13	3
Roxythromycine		32 (-80/61)	57 (34/76)	11	6
Sulfamethoxazole		52 (5/99)	54 (1/99)	> 20	9
Triméthoprime		40 (-106/86)	61 (30/99)	> 20	8
Atenolol	Bêtabloquants	38 (5/86)	71 (66/78)	12	3
Metoprolol		24 (5/82)	44 (29/59)	10	3
Bézafibrate	Régulateurs	61 (9/99)	90 (77/97)	> 20	?
Gemfibrozil	lipidiques	54 (5/85)	66 (32/99)	12	4
Carbamazépine	Anticonvulsant	18 (-122/78)	15 (-13/96)	> 20	?
Estrone	Hormones	76 (12/99)	96 (82/99)	11	5
EE2		78 (60/94)	60 (25/83)	10	6
Triclosan	Antiseptique	76 (47/98)	99	13	1

min : valeur minimale ; max : valeur maximale

^a obtenus d'après une lecture graphique et peuvent donc être peu précis

Ce tableau montre que les rendements d'élimination entre classes thérapeutiques sont très différents, ce qui peut certainement être relié aux structures physico-chimiques très diverses de ces produits. On remarque également qu'au sein d'une même famille de médicaments, les rendements peuvent parfois être très inégaux, ce qui ne permet pas de généraliser les comportements d'élimination par classe thérapeutique. A l'exception d'EE2 et de la carbamazépine, ces résultats montrent que les rendements d'élimination dans les BAM sont substantiellement plus élevés que dans les BA. Ce propos mérite toutefois d'être nuancé. En effet, il apparaît que les composés pharmaceutiques qui étaient déjà bien éliminés dans les BA (*e.g.* ibuprofène, naproxène, estrone) le sont tout autant dans les BAM et les améliorations ne sont pas très significatives. Le cas de la carbamazépine est intéressant car aucun de deux procédés ne s'est avéré efficace dans son élimination et que des valeurs de rendement négatives ont été observées. Ces rendements peuvent être expliqués soit (i) par la déconjugaison de métabolites dans le bioréacteur avec retour sous la forme mère, (ii) par la précision des moyens analytiques lorsque les concentrations sont proches des limites de méthodes. Par ailleurs, on note que les rendements en BAM sont bien moins variables que ceux observés en BA, ce qui peut être expliqué par (i) une plus grande robustesse du procédé à travers la production d'une eau de qualité chimique constante, en dépit des variations de composition dans l'eau d'entrée, (ii) un nombre d'études beaucoup plus limitées que pour les BA, (iii) les études sur des unités pilote dont les caractéristiques opératoires sont plus facilement contrôlables que sur les installations réelles (effet d'échelle). Dans l'ensemble, on retiendra que les BAM paraissent capables d'éliminer plus efficacement les molécules pharmaceutiques que les BA, mais que cette élimination n'en demeure pas moins partielle. Rappelons que tous ces rendements ne sont que des valeurs d'élimination apparente puisqu'elles ne tiennent pas compte des métabolites générés. Les différences de rendements d'élimination entre les deux procédés pourraient en fin de compte être davantage modérées.

IV.1.3.2.b) Observations pour les molécules ciblées

Le [Tableau IV-2](#) renseigne les rendements d'élimination pour les molécules anticancéreuses ciblées lors du traitement par BA et BAM. Ces rendements représentent pratiquement l'intégralité des bilans d'élimination identifiés dans la littérature, toutes molécules anticancéreuses comprises. Les concentrations aux bornes des stations sont renseignées dans les [Tableaux I-2](#) et [I-3](#) (Chap. I).

Tableau IV-2 : Rendements d'élimination des molécules ciblées dans les BA et les BAM

Molécule	Procédé (TSH ; AB)	Echelle – Site	Rdt (%)	Référence
CP	BA (? ; ?)	Réelle – Sur site	0	Buerge et al., 2006
	UF – BAME (48 h ; 50 j)	Pilote – Laboratoire*	80	Delgado, 2009
	UF – BAMl (41 h ; 30 j)	Pilote – Sur site ^a	< 20	Kovalova et al., 2012
	NF – BAME (15,4 h ; 40 j)	Pilote – Laboratoire**	80 ^b	Zaviska et al., 2013
IFO	BA (? ; ?)	Réelle – Sur site	0	Kümmerer et al., 1997
	BA (? ; ?)	Réelle – Sur site	0	Buerge et al., 2006
5-FU	UF – BAME (24 h ; ?)	Pilote – Sur site ^a	~ 100	Mahnik et al., 2007
TAM	BA (12,5 h ; 2.4 j)	Réelle – Sur site	< 0	Roberts et Thomas, 2006
	BA (? ; ?)	Réelle – Sur site	30	Zhou et al., 2009

TSH : temps de séjour hydraulique, AB : âge de boues ; Rdt : rendement ; ? : non renseigné

UF : ultrafiltration ; NF : nanofiltration ; * [CP] = 5 µg/L ; ** [CP] = 100 µg/L

^a traitement d'effluents hospitaliers

^b résultat peu explicite, avec possiblement 60 % attribuable à la rétention membranaire

A l'exception du résultat de [Zhou et al. \(2009\)](#), l'élimination par BA est inexistante. Par ailleurs, le rendement de 30 % observé pour TAM est associé à une incertitude importante en raison d'une détection dans des niveaux proches des limites analytiques (< 1 ng/L) et est donc peu convaincant. Bien qu'une élimination soit observée, les rendements calculés pour les pilotes de BAM sont contrastés et ne permettent pas ici d'extraire de tendance. Il est donc nécessaire que d'autres études soient réalisées afin de confirmer l'intérêt de cette technologie dans le traitement de cette pollution.

IV.1.3.3) Quels paramètres favoriseraient l'élimination ?

Comme précisé par [Tadkaew et al. \(2011\)](#), il est particulièrement difficile d'essayer de corrélérer les caractéristiques des molécules pharmaceutiques avec les rendements d'élimination, tant les conditions opératoires sont diverses et peuvent y contribuer significativement. Une courte liste de paramètres régulièrement cités peut être proposée.

Le temps de séjour des boues

Le temps de séjour des boues est l'argument qui revient le plus fréquemment ([Verlicchi et al., 2012](#)). Pour des âges de boues grands, la diversification de la biomasse est rendue possible et le potentiel de biodégradation peut ainsi être plus important. Cette caractéristique expliquerait principalement pourquoi les BAM sont plus efficaces que les BA dans le traitement de molécules pharmaceutiques ([Radjenovic et al., 2009](#)). [Clara et al. \(2004\)](#) ont toutefois démontré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans l'élimination de produits pharmaceutiques lorsque les BA et les BAM étaient opérés à même âge de boue, accentuant le poids de l'explication précédente. De plus, [Onesios et al. \(2009\)](#) précisent qu'au-delà d'un âge de boues de 25 – 30 jours, l'effet sur le rendement d'élimination n'est *a priori* plus significatif. Ce propos a été relayé par [Cirja \(2007\)](#) et plus spécifiquement par [Delgado \(2009\)](#) pour l'élimination du CP dans un BAME où les rendements étaient identiques pour des âges de boues de 50 et 70 jours. [Weiss et Reemtsma \(2008\)](#) rajoutent que des âges de boues trop élevées peuvent être préjudiciables aux rendements si l'élimination est réalisée par biodégradation via des interactions cométaboliques (définition donnée dans la partie IV.1.4).

Le temps de séjour hydraulique

Alors que des auteurs comme (De Wever *et al.*, 2007 ; Vieno *et al.*, 2007) n'ont pas observé de corrélation évidente entre le temps de séjour hydraulique et les rendements d'élimination, Gros *et al.* (2010) ont pu identifier que les molécules présentant une bonne biodégradabilité et une aptitude de sorption faible étaient influencées par ce paramètre : plus le temps de séjour est long et meilleure est l'élimination. Cette conclusion est cependant limitée et ne s'applique pas au cas de l'ibuprofène, caractérisé par une bonne biodégradabilité et une aptitude de sorption faible indépendamment des conditions opératoires. Weiss et Reemtsma (2008) précisent qu'un temps de séjour hydraulique minimum de 7 heures pourrait être suffisant dans les BAM.

Le potentiel hydrogène pH

L'alcalinité ou l'acidité des eaux usées peut influencer l'élimination des molécules pharmaceutiques en modifiant la physiologie des microorganismes, l'activité des enzymes extracellulaires et la solubilité des molécules présentes (Cirja, 2007). Par exemple, Tadkaew *et al.* (2010) ont observé que l'élimination de composés ionisables (*e.g* ibuprofène...) dans un BAMI était particulièrement influencée par le pH. En effet, en pH acide (5), ces molécules existent sous leur version non ionisée et sont donc plus susceptibles de se sorber sur la boue. Rappelons toutefois que les variations de pH en traitement d'ERU sont plutôt restreintes (6,5 à 8). Une étude plus approfondie est cependant nécessaire pour les espèces portant plusieurs fonctions ionisables comme certains antibiotiques (*e.g* ciprofloxacine, tétracycline...).

La température

Suivant l'équation d'Arrhenius, une augmentation de température de 10 °C multiplierait par 2 l'activité microbienne, accélérant sensiblement les vitesses de biodégradation. Rappelons qu'en parallèle la désorption est favorisée. Vieno *et al.* (2005) ont observé que l'élimination de molécules pharmaceutiques était plus importante en été qu'en hiver et probablement par une intensification des processus épuratoires. Cirja (2007) ajoute que la température influence la structure de la communauté bactérienne et donc son potentiel d'élimination des polluants. Dans un travail récent, Hai *et al.* (2011) ont étudié l'effet de la température (amplitude : 10 à 45 °C, pas de 10 °C) sur l'élimination de produits pharmaceutiques par un pilote de BAMI (échelle laboratoire). Pour les molécules les plus hydrophobes (*e.g* estrone, triclosan...), il n'y a pas eu d'effet significatif sur les rendements entre 10 et 35 °C, alors que les molécules plus hydrophiles (*e.g* ibuprofène, naproxène...) ont été graduellement mieux éliminées. La température de 45 °C a entraîné une baisse très importante des rendements d'élimination pour la quasi-intégralité des micropolluants, de même qu'une dérive dans le fonctionnement du procédé (augmentation de la PTM, baisse de rendement sur l'azote total...). Il paraît toutefois important d'ajouter que le BAM utilisé a fonctionné continuellement en condition aérobie, avec possible accumulation de nitrates dans le bioréacteur. Il est possible que l'effet observé ait pu être amplifié par des concentrations élevées en nitrates, dont l'action perturbatrice a déjà été suggérée dans la littérature (Clouzot, 2009).

IV.1.3.4) A propos de la toxicité des produits pharmaceutiques sur les boues

L'ensemble de ces études ne s'intéressent qu'à l'élimination globale des produits pharmaceutiques sans observer les possibles modifications induites sur la boue activée. Par exemple, Delgado (2009) rapporte que la présence du CP et de ses métabolites entraîne (i) une respiration endogène accrue et (ii) une diminution de la production de boue lors du traitement par BAME. Aubenneau *et al.* (2010) observent la même réponse sur la respiration endogène suite à l'introduction continue de carbamazépine (400 ng/L) dans un BAMI. On peut donc penser que la présence de molécules pharmaceutiques induit un stress chez les bactéries, qui se traduit ici par une augmentation des

besoins de maintenance. [Delgado \(2009\)](#) a également observé une production plus importante d'EPS en présence de molécules anticancéreuses, probablement comme une réponse de protection. L'action protectrice des EPS face à l'introduction de composés toxiques a déjà été fortement suggérée par [Henriques et Love \(2007\)](#). Par ailleurs, [Aubenneau et al. \(2010\)](#) ont observé une diminution de la respiration exogène pouvant être due à (i) des modifications possibles dans les voies métaboliques de dégradation des substrats ou (ii) une réduction de la fraction active de la biomasse. Toutefois et fort heureusement, l'excellente efficacité des procédés vis-à-vis de paramètres globaux tels que la DCO ou l'azote n'a pas été impactée par ces produits dans chacune de ces études. Dans de prochains travaux, il pourrait donc être intéressant de caractériser plus régulièrement l'effet de tels composés sur les boues activées, surtout si l'élimination de micropolluants organiques est amenée à devenir un objectif davantage déterminant dans l'optimisation ou le dimensionnement des procédés de traitement.

IV.1.4) Biodégradation de molécules organiques traces

IV.1.4.1) Généralités et positionnement de la synthèse bibliographique

La biodégradation des polluants dans les compartiments environnementaux (boues, sols, sédiments...) est le processus le plus important dans la transformation des composés organiques. Qu'elle prenne lieu en condition aérobie, anoxie ou anaérobie, et sur une échelle de temps plus ou moins longue, la biodégradation induit des modifications structurales des polluants et peut varier de leur transformation partielle (métabolites) jusqu'à leur minéralisation complète (CO₂).

Les mécanismes à l'origine de la biodégradation de molécules organiques traces sont encore peu connus et traduisent la complexité du phénomène. En considérant la biodégradation de molécules organiques au sens large, on peut identifier deux paradigmes : (i) la molécule peut servir de source de carbone et d'énergie au maintien et à la croissance des microorganismes, (ii) la molécule n'entraîne pas de gain d'énergie, la présence d'un autre substrat est alors indispensable pour initier les réactions biologiques. Dans ce second cas, on parle d'interactions cométaboliques. Nous verrons par la suite que chacun de ces paradigmes est caractérisé par un ensemble de formalismes plus ou moins justifiés, notamment pour des applications à la matrice boue.

La diversité des approches de biodégradation de molécules (traces) dans la littérature est telle que le travail bibliographique proposé ne peut prétendre être un état des lieux détaillé de l'ensemble des dispositifs expérimentaux ou des modèles mathématiques développés pour l'étude du phénomène dans la matrice boue. Que ce soit d'un point de vue expérimental ou calculatoire, seuls quelques concepts généraux, qui sont par ailleurs les plus souvent appliqués, seront ici présentés. Une récente review de [Pomiès et al. \(2013\)](#) sur la modélisation de la biodégradation de molécules traces en STEP constitue d'ores et déjà une base de travail intéressante et mérite d'être complétée.

IV.1.4.2) Caractérisation de la biodégradation : procédures expérimentales

IV.1.4.2.a) Essais à haute concentration en polluant (> 10 – 100 mg/L)

Appliqués ou dérivés depuis les instructions formulées pour la réalisation des tests normalisés OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), de nombreux travaux de recherche ont étudié la réponse de biodégradation suite à une injection de polluant dans des concentrations de plusieurs dizaines voire centaines de mg/L. Ces essais sont réalisés en réacteur batch (1 L), en présence ou non d'autres substrats, et sur des périodes rarement inférieures à 10 jours. Pour les molécules anticancéreuses ciblées, la quasi-intégralité des études identifiées dans la littérature sont issues de tels essais ([Tableau IV-3](#)).

Essentiellement appliquées avant les années 2000, les méthodologies développées dans ces essais tendent à se raréfier. En effet, l'extrapolation des résultats de ces tests à la réalité du traitement des eaux est douteuse, d'une part parce que les concentrations dans ces essais sont très largement au-dessus des concentrations mesurées dans les ERU (jusqu'à 6 décades et plus), et d'autre part parce qu'une (forte) toxicité pourrait avoir lieu et conduire à l'obtention de résultats peu reproductibles ou parfois contradictoires. L'excellente biodégradation du 5-FU dans le test de [Kiffmeyer et al. \(1998\)](#) et l'absence totale de biodégradation dans le test de [Kümmerer et Al-Ahmad \(1997\)](#) soulèvent ce type d'interrogations ([Tableau IV-3](#)). De plus, l'estimation de la biodégradation a souvent été réalisée par des mesures indirectes (mesure de la DCO, du CO₂ dégagé...) qui peuvent manquer de précision. Les résultats ne sont jamais renseignés sous forme de constantes cinétiques qui pourraient être davantage applicables à d'autres conditions opératoires. Il existe encore un grand nombre de raisons pour justifier le manque d'adéquation de tels essais dans l'objectif d'évaluer la biodégradation lors du traitement des eaux. Toutefois, le travail à forte concentration pourrait éventuellement être avantageux pour accélérer l'acclimatation des bactéries ([Li et al., 2010](#)) ou pour traduire certaines conditions de traitement (*i.e* effluents industriels) mais demeurent très spécifiques.

Tableau IV-3 : Taux d'élimination des molécules ciblées pour des essais de biodégradation à haute concentration (> mg/L)

Molécule	Concentration Temps d'étude	Taux de biodégradation	Commentaire(s)	Référence
IFO	160 mg/L 28 jours	0 %	Même observation à 5 mg/L ^a et 4 mg/L ^b	Kümmerer et al., 1997
	160 mg/L 28 jours	Très faiblement biodégradable	-	Steger-Hartmann et al., 1997
CP	375 et 750 mg/L 10 jours	< 5 %	-	Kiffmeyer et al., 1998
	150 mg/L 14 jours	< 5 %	Avec un cocktail d'anticancéreux	Kiffmeyer et al., 1998
	5, 10 et 20 mg/L 10 jours	Jusqu'à 100 %	Taux dépendant de la concentration	Kiffmeyer et al., 1998
5-FU	3 mg/L 14 jours	~ 100 %	Avec un cocktail d'anticancéreux	Kiffmeyer et al., 1998
	9 mg/L 40 jours	0 %	-	Kümmerer et Al-Ahmad, 1997
	850 mg/L	2 %	Testé avec des antibiotiques ^c	Kümmerer et Al-Ahmad, 1997

^a testé avec un effluent de sortie de service d'oncologie

^b testé avec un effluent urbain dopé en IFO

^c présence supposée

IV.1.4.2.b) Essais à basse concentration en polluant (< 10 – 100 µg/L)

La conduite de tels essais est davantage pertinente dans l'obtention d'une réponse de biodégradation possiblement extrapolable à la réalité du traitement des eaux usées. En effet, les concentrations de travail, qu'elles soient apportées par dopage ou naturellement présentes dans la matrice sans ajout, sont en accord avec les niveaux de concentrations rencontrés dans les eaux usées. La majorité des études relevées dans la littérature sont conduites en réacteur fermé ([Joss et al., 2006](#) ; [Majewsky et al., 2011](#) ; [Almeida et al., 2013](#)) sur un volume excédant rarement 10 L. Des expériences en réacteur semi-fermé ([Yang et al., 2012](#)) ou en continu ([Stasinakis et al., 2010](#)) sont également possibles mais plus difficiles à contrôler. Dans toutes les études rencontrées, les auteurs ajoutent un substrat (carboné, azoté...) facilement dégradable pour les bactéries, qu'il soit apporté par des solutions synthétiques ([Majewsky et al., 2011](#)) ou par de l'eau résiduaire dans le meilleur des cas ([Buerge et al., 2006](#) ; [Joss et al., 2006](#)). Les réponses de biodégradation obtenues ne sont donc, *a*

priori, que des exemples de cométabolisme. La majorité de ces études ont appliqué des conditions aérobies lors des essais, à l'exception de [Suarez et al. \(2010\)](#) et [Xue et al. \(2010\)](#) qui ont également réalisé des études en phase anoxie et ont mis en évidence des différences de cinétiques parfois importantes. Les cinétiques relevées ont systématiquement été plus élevées en condition aérobie. L'acquisition de réponses de biodégradation sous ces deux conditions est nécessaire car elle correspond davantage à la réalité du traitement par boues activées. L'obtention de réponses de biodégradation en aération séquentielle serait aussi très utile (cas des bassins combinés). Enfin, les expériences sont rarement conduites pour une durée supérieure à 48 h qui est un temps de contact usuel en traitement d'ERU. Quelques études ont été identifiées pour les molécules ciblées et sont renseignées dans le [Tableau IV-4](#). IFO et CP n'ont pas montré d'aptitude à la biodégradation pour une concentration de 100 ng/L, même en présence de co-substrat. Ce résultat, couplé aux conclusions de sorption du chapitre III, permet de confirmer le peu d'élimination constatée lors du traitement par boues activées (chapitre I). D'après les observations de l'étude de [Yu et al. \(2006\)](#), la cinétique de biodégradation du 5-FU pourrait dépendre du niveau de concentration : plus la concentration serait élevée et plus la cinétique serait lente. Cette hypothèse est à confirmer.

Tableau IV-4 : Taux d'élimination des molécules ciblées pour des essais de biodégradation à basse concentration (< 50 µg/L)

Molécule	Concentration Temps d'étude	Taux de biodégradation	Commentaire(s)	Référence
IFO	~ 100 ng/l 24 heures	Pas de biodégradation	Mélangé avec un effluent primaire	Buerge et al., 2006
CP	~ 100 ng/l 24 heures	Pas de biodégradation	Mélangé avec un effluent primaire	Buerge et al., 2006
5-FU	1, 10 et 50 µg/l 50 jours	50 % à 1 µg/l 30 % à 50 µg/l	Temps de latence avant biodégradation	Yu et al., 2006
	5 µg/l 24 heures	Biodégradation supposée	Dégagement de CO ₂ capturé dans une cartouche de chaux sodée	Mahnik et al., 2007

IV.1.4.3) Concepts mathématiques

Suivant le paradigme dans lequel la biodégradation des polluants organiques traces est considérée, différents concepts mathématiques sont appliqués. Lorsque le polluant trace est considéré comme un substrat autorisant la croissance du micro-organisme, le modèle cinétique de type Monod constitue souvent un modèle de premier choix (équation IV-1 du [Tableau IV-5](#)).

A l'origine, ce modèle a été établi sur une monoculture d'*Escherichia coli* et en présence d'un substrat facilement biodégradable. Depuis, de nombreuses variantes ont été proposées pour tenir davantage compte de la diversité des conditions opératoires. On peut par exemple citer le modèle de Monod faisant intervenir une limitation par la présence d'oxygène ([Lindblom et al., 2009](#)), le modèle cinétique de Haldane faisant intervenir un terme lié à l'inhibition de la biodégradation par la concentration en polluant ([Marrot et al., 2006](#)), le modèle de MacKinney – Eckenfelder pour des polycultures (purement empirique)... La plupart de ces modèles impliquent toutefois le calage de nombreux paramètres, parfois strictement spécifiques du test pratiqué ([Almeida et al., 2013](#)).

Lorsque la biodégradation du polluant organique trace est considérée comme le résultat d'interactions cométaboliques, le modèle de [Criddle \(1993\)](#) peut alors être employé (équations IV-2 et IV-3 du [Tableau IV-5](#)). Ce modèle a notamment été appliqué avec succès par [Barret \(2009\)](#) et [Delgado-Mirquez et al. \(2011\)](#) pour modéliser la dégradation de HAP en contexte de digestion anaérobie. Il existe également d'autres variantes à ce modèle, faisant par exemple intervenir des termes liés à l'inhibition induite par la présence de co-substrats ([Ely et al., 1995](#)). Dans l'ensemble,

très peu d'études de biodégradation ont utilisé ces modèles. Pour les molécules pharmaceutiques et à notre connaissance, seuls [Plosz et al. \(2010\)](#) ont utilisé un modèle similaire pour décrire la biodégradation d'antibiotiques. Les connaissances en matière de biodégradation de produits pharmaceutiques, même générales, sont partielles et n'encouragent peut-être pas encore l'utilisation de ces modèles très poussés, mais n'en diminuent pas pour autant leur intérêt pour les études à venir.

Les modèles de « base » (Monod et Criddle) ont été établis pour des cultures biologiques pures. La plupart des modèles dérivés et appliqués aux boues activées ont conservé cette caractéristique. Or, dans les boues activées comme dans la plupart des systèmes environnementaux, il est rare d'être confronté à des systèmes qui font intervenir une souche pure. Il est alors possible d'utiliser des modèles moins spécifiques.

De nombreux auteurs ont observé que la biodégradation de la plupart des polluants traces dans les boues avait l'allure d'une exponentielle décroissante et pouvait donc être modélisée à l'aide d'un modèle du (pseudo) premier ordre ([Cowan et al., 1993](#) ; [Monteith et al., 1995](#) ; [Artola-Garicano et al., 2003](#) ; [Joss et al., 2006](#)). L'équation correspondante au pseudo premier ordre est donnée par l'équation IV-4 du [Tableau IV-5](#). Ce modèle de biodégradation implique très peu de paramètres à déterminer et s'affranchit de l'ensemble des conditions opératoires appliquées. Il est de loin le plus appliqué dans les études de biodégradation, probablement en raison de sa simplicité apparente. Basées sur les résultats obtenus pour 35 produits pharmaceutiques, [Joss et al. \(2006\)](#) proposent différentes classes d'élimination par biodégradation (avec co-substrat) suivant la valeur de k_{biol} et allant de peu biodégradé (< 20 %) pour $k_{\text{biol}} < 0,1 \text{ L/g}_{\text{MVS.j}}$ jusqu'à efficacement biodégradé (> 90 %) pour $k_{\text{biol}} > 10 \text{ L/g}_{\text{MVS.j}}$. [Pomiès et al. \(2013\)](#) recensent les k_{biol} dans les boues de près de 50 produits pharmaceutiques. Pour peu de molécules où plusieurs données étaient disponibles, certains k_{biol} pouvaient parfois être très différents (e.g entre 0,08 et 4,2 $\text{L/g}_{\text{MVS.j}}$ pour le naproxène), ce qui en fin de compte ne permet pas de généraliser les comportements de biodégradation, ni d'utiliser les intervalles proposés par [Joss et al. \(2006\)](#) comme une référence.

De nos lectures, il est apparu qu'il pourrait exister presque autant de modèles de biodégradation de polluants traces que de travaux publiés, rendant les comparaisons particulièrement difficiles. En effet, les auteurs ont souvent adapté ces équations aux besoins de leurs essais. Tous les modèles rencontrés paraissent cependant valables et il n'est pour le moment pas possible de dire si un modèle est plus approprié que les autres et pourrait servir de référence. Il est aussi probable que la biodégradation de polluants traces ne puisse être résumée à un seul et unique modèle pour toutes les molécules. **Le choix du modèle est donc influencé par la réponse que l'on souhaite en tirer.** Ainsi et pour rester dans une approche très globale de la biodégradation, le modèle cinétique du (pseudo) premier ordre constitue une approche simplifiée satisfaisante, à la fois expérimentalement et mathématiquement accessible, et d'interprétation relativement aisée.

Pour l'ensemble de ces modèles, il est important d'attirer l'attention sur la fraction de micropolluant qui rentrerait en compte dans le processus de biodégradation. Ces équations ne font ici apparaître que la concentration en phase aqueuse, pensée par de nombreux auteurs comme la seule disponible pour la biodégradation ([Joss et al., 2006](#) ; [Chong, 2009](#) ; [Plosz et al., 2010](#) ; [Almeida et al., 2013](#)). Ce terme disponible renvoie à la notion de biodisponibilité de polluants qui sera davantage expliquée dans la partie Résultats et Discussion de ce chapitre. Parallèlement, d'autres auteurs considèrent que seule la fraction solide rentre en considération dans la biodégradation ([Urase et Kikuta, 2005](#)), ou que les fractions aqueuses et solides sont impliquées, avec des vitesses de dégradation équivalentes ([Peev et al., 2004](#)) ou variables ([Byrns, 2001](#)) dans les deux phases. Les choix ne sont pas toujours justifiés. De plus, il n'est pour le moment pas possible de définir clairement le(s) compartiment(s) disponible(s) pour la biodégradation, ni si ce(s) compartiment(s) est (sont) le(s) même(s) pour toutes les molécules. Cette étape nécessitera probablement la mise en place de procédures expérimentales délicates et l'accumulation de nombreuses données.

Tableau IV-5 : Concepts mathématiques pour la modélisation de la biodégradation
(les paramètres sont explicités quand ils sont nouveaux)

Modèle de biodégradation	Equation(s) associée(s)	Définition des paramètres
Monod	$\frac{dC_{aqueuse}^{micropolluant}}{dt} = \frac{-1}{Y_{micropolluant}} \cdot \mu_{micropolluant}^{max\ imum} \cdot \frac{C_{aqueuse}^{micropolluant}}{K_{micropolluant} + C_{aqueuse}^{micropolluant}} \cdot MVS$	<p>$Y_{micropolluant}$: taux de bioconversion en utilisant le micropolluant comme substrat (g_{MVS}/μg)</p> <p>$\mu_{micropolluant}^{max\ imum}$: taux maximal de croissance en utilisant le micropolluant comme substrat (h⁻¹)</p> <p>$K_{micropolluant}$: constante de demi-saturation pour le micropolluant (μg/L) (<i>i.e</i> affinité de l'enzyme dégradante pour le substrat)</p>
Criddle	$\frac{dC_{aqueuse}^{micropolluant}}{dt} = (T_{micropolluant}^{substrat} \cdot R_{substrat} + \mu_{micropolluant}^{max\ imum} \cdot MVS) \left(\frac{C_{aqueuse}^{micropolluant}}{K_{micropolluant} + C_{aqueuse}^{micropolluant}} \right)$	$T_{micropolluant}^{substrat}$: taux de bioconversion du micropolluant avec un autre substrat impliqué dans le cométabolisme (μg/g _{substrat})
	$R_{substrat} = \mu_{substrat}^{max\ imum} \cdot \frac{C_{aqueuse}^{substrat}}{K_{substrat} + C_{aqueuse}^{substrat}}$	$R_{substrat}$ est dérivé du modèle de Monod traduisant la dégradation d'un substrat facilement biodégradable (g _{substrat} /L.h)
Pseudo-premier ordre	$\frac{dC_{aqueuse}^{micropolluant}}{dt} = -k_{biol} \cdot C_{aqueuse}^{micropolluant} \cdot MVS$	k_{biol} : constante de biodégradation (L/g _{MVS} .j)

IV.1.4.4) Quels paramètres peuvent influencer la biodégradation ?

De manière très générale, une liste de quelques facteurs pouvant affecter la biodégradation de polluants organiques traces peut être proposée. Cette liste peut venir compléter la description des paramètres opératoires présentés dans la partie IV.1.3.3.

Le niveau de concentration en polluant

Outre l'inhibition possible par l'application de concentrations élevées (> mg/L ?) peu réalistes, *De Wever et al. (2007)* supposent également l'existence d'un seuil minimal en-dessous duquel la biodégradation ne serait pas possible et reste à explorer. *Onesios et al. (2009)* se posent également la question de savoir si les micropolluants sont susceptibles de servir de substrats primaires ou secondaires et si oui, à partir de quelles concentrations.

La présence d'autres molécules

Le terme « autres molécules » regroupe soit des composés facilement assimilables, soit d'autres polluants organiques traces. Des conclusions de la littérature, il paraît évident que la présence d'un substrat directement assimilable facilite la biodégradation des polluants traces et que la plupart des auteurs ajoutent ce(s) co-substrat(s). **Il est toutefois étonnant de constater que presque aucune étude ne tient compte des flux de co-substrats dégradés.** La portée de ces conclusions mérite donc d'être approfondie. Dans leur étude sur la biodégradation du 5-FU, *Kümmerer et Al-Ahmad (1997)* ont suggéré que la biodégradation pouvait être limitée par une synergie entre molécules (toxicité) et oriente vers l'hypothèse d'un effet cocktail sur les cinétiques de biodégradation. Par ailleurs, cette remarque soulève des questions quant à la prise en compte des métabolites générés lors de la transformation des composés parents, actuellement exclus des modèles.

La structure chimique des composés

D'après *Kümmerer et Al-Ahmad (1997)*, les composés avec des groupements dérivés des sucres seraient plutôt bien biodégradés, contrairement à ceux portant des dérivés fluorés. Sur un ensemble de plusieurs centaines de résultats de tests de biodégradabilité, *Tunkel et al. (2000)* observent que les composés de type esters, nitriles ou alcools aromatiques possèdent des groupements fonctionnels augmentant leur biodégradabilité, contrairement aux composés portant des amines aromatiques ou des groupements nitro, azo et iodurés (*Figure IV-3*).

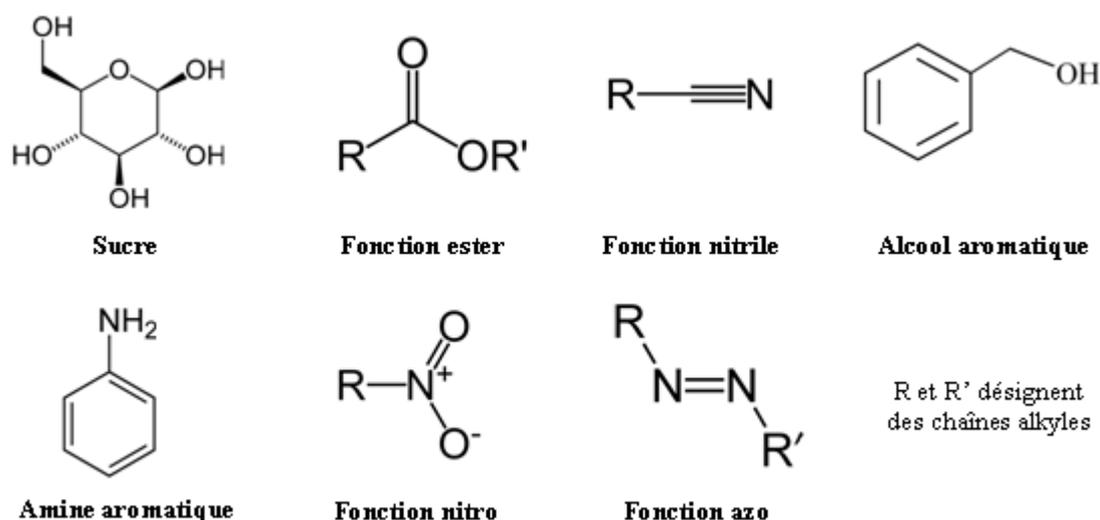


Figure IV-3 : Représentation des fonctions facilement biodégradables (haut) et peu biodégradables (bas) d'après la synthèse réalisée par *Tunkel et al. (2000)*

Jones *et al.* (2005) ajoutent que les composés les plus « longs et branchés » sont souvent plus persistants. Par ailleurs, une étude très récente de Ribeiro *et al.* (2013) met en évidence que la biodégradation de composés chiraux par un inoculum de boues activées peut être énantiosélective⁵. Pour deux bêtabloquants, l'alprenolol et le propranolol, ils ont observé que l'énantiomère (S) était mieux dégradé que l'énantiomère (R). Les raisons ne sont pas clairement élucidées. Il apparaît ainsi que le devenir de formes énantiomères devrait davantage être considéré et notamment lors de la mise au point de méthodes analytiques.

La composition de l'inoculum

Batt *et al.* (2006) ont observé que l'antibiotique triméthoprime était biologiquement mieux dégradé par un inoculum de boues activées contre celui d'une boue nitrifiante (facteur 3 dans l'élimination). A l'inverse, Khunjar *et al.* (2011) et Fernandez-Fontaina *et al.* (2012) ont observé qu'en favorisant les conditions de nitrification, la biodégradation de cette même molécule était sensiblement améliorée. Une enzyme, l'ammonium monooxygénase (AMO), est probablement à l'origine de ces interactions cométaboliques et a déjà été mise en avant dans d'autres études traitant de la biodégradation d'EE2 par exemple (Forrez *et al.*, 2011). Il a par ailleurs été observé une relation linéaire très intéressante entre k_{biol} et la vitesse spécifique de nitrification (Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012). Cette observation suggère la nécessité d'identifier les populations (actives) impliquées dans le mécanisme de biodégradation, autre que par la mesure de MVS utilisée dans les modèles précédents. Cette étape constitue toutefois un véritable défi expérimental suivant le degré d'identification recherché.

⁵ Sont dites énantiomères deux espèces chimiques qui sont l'image l'une de l'autre dans un miroir et qui ne sont pas superposables.

IV.1.5) Récapitulatif et définition des objectifs

A travers cette première partie, nous avons mis en évidence les nombreux avantages que possède la technologie de BAM dans le traitement des eaux usées, notamment vis-à-vis de la pollution pharmaceutique. Cependant, il est très important de rappeler que même si l'élimination est significativement plus intéressante que pour les BA, elle n'en demeure pas moins partielle et nécessite de comprendre clairement les interactions engagées afin de les intensifier si possible, et d'accroître l'efficacité du traitement. L'objectif principal de ce chapitre consiste à **caractériser le plus rigoureusement possible la part jouée par chacun des mécanismes dans l'élimination d'un cocktail de molécules anticancéreuses par pilote de BAM**. Un focus sera ensuite établi sur :

- (i) la **sorption dans les boues**, en étudiant notamment la nature physique et/ou chimique des interactions, de même que la possibilité de sorption de ces molécules à partir de matrices déjà très contaminées ;
- (ii) la **biodégradation**, en étudiant la réponse acquise en absence de substrats (rarement effectué) et en présence de substrats facilement assimilables. On rappelle que le modèle de biodégradation retenu est du type pseudo-premier ordre ;
- (iii) les interactions avec **la matière colloïdale et dissoute** des boues, sous différentes conditions opératoires pour apprécier l'évolution des interactions et compléter les observations faites sur le pilote. Par ailleurs, la matière colloïdale et dissoute sera caractérisée grâce à l'utilisation d'une technique innovante : la fluorescence tridimensionnelle.

IV.2) Matériels et méthodes

IV.2.1) Pilote de BAME : description et suivi

La [Figure IV-4](#) donne une représentation complète du pilote utilisé. Il est composé d'un réacteur contenant la biomasse qui va oxyder la pollution des eaux, et d'un système membranaire qui va permettre la séparation entre l'eau interstitielle et les amas de bactéries afin d'obtenir un effluent limpide. La mise en œuvre du procédé avait pour buts : (i) de produire des boues biologiques et de caractériser les interactions de sorption (chapitre III), (ii) d'explorer les mécanismes d'élimination ou de non élimination de médicaments anticancéreux afin de soutenir les résultats de la thèse de Luis Delgado (2009). **Le suivi exhaustif du procédé et de son comportement (caractérisation du colmatage, évolution des propriétés de la liqueur mixte...) face à l'introduction de polluants ne constituait pas ici le cœur du travail de recherche engagé.**

IV.2.1.1) Fonctionnement hydraulique

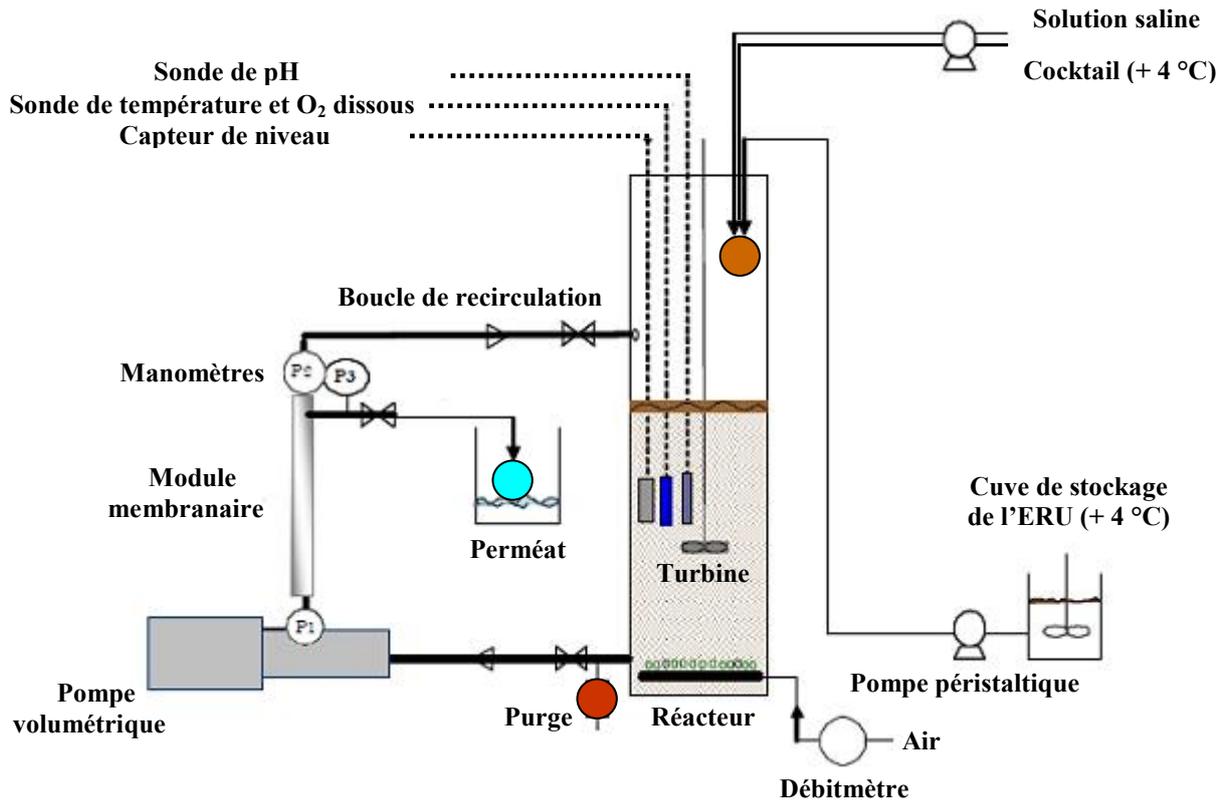
Le pilote de bioréacteur à membrane utilisé est en configuration externe. Le volume moyen du bioréacteur en inox est de 20 L. L'alimentation du pilote est réalisée par un jeu de 3 entrées ([Figure IV-4](#)), dont l'une est asservie par le niveau dans le réacteur. L'alimentation en ERU, qui représente plus de 95 % du volume quotidien apporté, est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique Masterflex qui se déclenche lorsque la hauteur dans le bioréacteur atteint un seuil bas. L'alimentation se fait tant que la hauteur dans le bioréacteur n'atteint pas un seuil haut. Ces deux seuils ont été fixés au préalable. Les deux autres alimentations sont réalisées en continu à l'aide d'une petite pompe péristaltique Minipulse, et représentent moins de 5 % du volume quotidien apporté. Les caractéristiques de l'alimentation sont précisées dans la partie IV.2.1.2.b.

L'agitation du milieu biologique est assurée par une turbine Rushton, fonctionnant à une vitesse de 200 tours/min pour favoriser les conditions de brassage et améliorer la qualité des mesures de pH, de température (T°) et d'oxygène dissous (O_2). L'aération est permise par une membrane en silicone percée et disposée au fond du bioréacteur. La fourniture d'oxygène aux bactéries est réalisée par le déclenchement d'une électrovanne, contrôlée par une minuterie de façade analogique TMR 48 (Crouzet). Les cycles « aération/non aération » ont été fixés à « 3 minutes/30 minutes », pour une pression d'air délivré en entrée de l'ordre de 2,5 bar : la présence quotidienne d'oxygène est d'environ 9-10 heures. Le comportement de la biomasse est suivi grâce à des sondes de pH, T° et O_2 de la marque Mettler Toledo. Ces sondes sont réétalonnées une fois par mois. L'évolution de ces paramètres est enregistrée sur ordinateur par le logiciel DasyLab 9.0[®], avec une fréquence d'une acquisition toutes les 10 secondes. Le suivi en temps réel de ces paramètres (ainsi que de la hauteur d'eau dans le pilote et de la pression transmembranaire) permet d'intervenir rapidement en cas de déviation trop importante par rapport à un profil « normal », souvent synonyme d'un problème dans le fonctionnement du procédé.

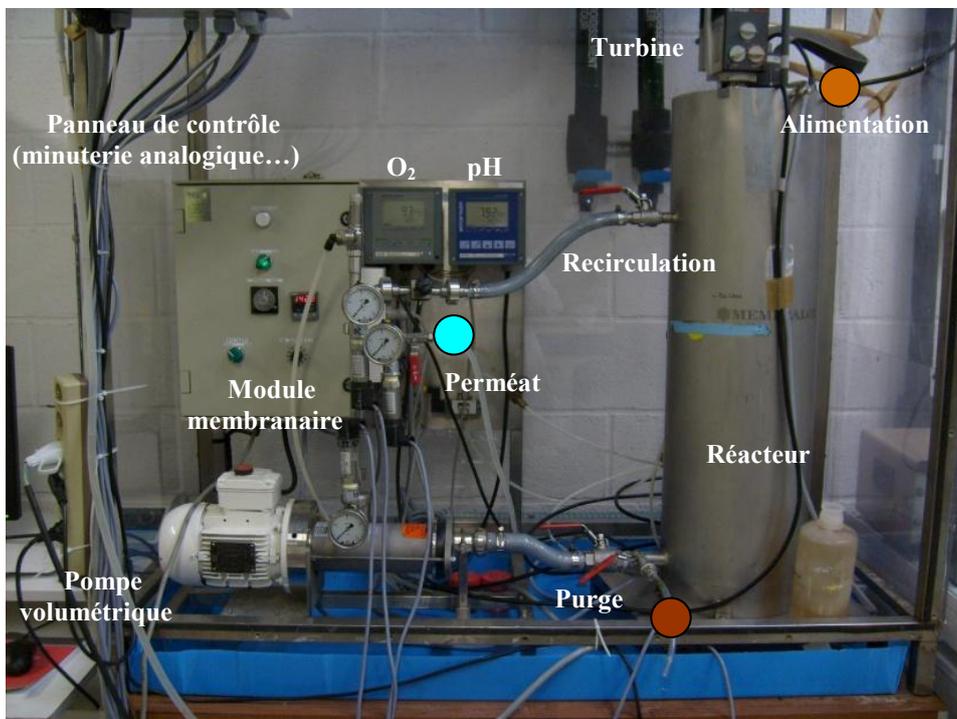
Le temps de séjour hydraulique (TSH) correspond à la durée de contact moyenne entre l'eau à traiter et la biomasse dans le bioréacteur. Il est donné par la relation :

$$TSH = \frac{Volume_{réacteur}}{Débit_{filtration}} \quad \text{Eq. (IV-5)}$$

où TSH s'exprime en j, $Volume_{réacteur}$ le volume du réacteur en L, $Débit_{filtration}$ le débit de filtration membranaire en L/j. Le débit de filtration a été fixé à 13,3 L/j et maintenu le plus constant possible tout au long de la campagne, ce qui équivaut ici à un TSH de 1,5 j soit 36 heures.



(a) Synoptique du pilote de BAME (inspiré de Delgado, 2009)



(b) Correspondance avec l'installation réelle

Prélèvements : ● Eau d'alimentation ● Soutirage des boues ● Effluent

Figure IV-4 : Représentation du pilote de BAME et des points de prélèvement

IV.2.1.2) Fonctionnement biologique

IV.2.1.2.a) Boue d'ensemencement

Le réacteur estensemencé avec de la boue activée de la STEP de Ginestous. L'usine traite quotidiennement près de 125 000 m³ d'eaux usées, très majoritairement d'origine domestique. Le nombre d'équivalent-habitants (EH) est de l'ordre de 800 000. L'élimination de la pollution est assurée par deux unités biologiques de type boues activées (400 000 et 150 000 EH) et une unité de traitement physico-chimique (250 000 EH). Les effluents de chacune des unités sont combinés puis traités par biofiltration pour éliminer la pollution azotée avant rejet (Breton *et al.*, 2010).

La boue a été prélevée dans un des bassins biologiques de l'unité de traitement à 400 000 EH : elle est de type moyenne charge, avec un âge de boues faible (quelques jours) et peu concentrée (~ 2 g_{MES}/L). D'après une mesure de MVS, elle est organique à près de 91 %.

IV.2.1.2.b) Caractéristiques de l'eau d'alimentation

L'eau alimentant le pilote de BAME est un mélange d'eau usée réelle et d'une solution saline synthétique, destiné à reproduire les caractéristiques de l'eau utilisée par Delgado (2009). En phase de contamination, un cocktail de molécules anticancéreuses est également ajouté.

Caractéristiques de l'ERU

L'ERU est prélevée en aval du dessableur-dégraisseur de la STEP de Ginestous. Elle est prélevée deux fois par semaine à jour et heure fixes, tamisée à 200 µm, puis stockée dans une cuve d'alimentation (200 L) à 4 °C, jamais plus de 4 jours. Au-delà, près d'un tiers de la DCO est consommée, ce qui ne permet plus d'assurer une composition plutôt constante de l'eau d'alimentation. Quelques caractéristiques de l'ERU sont données dans le Tableau IV-6.

Tableau IV-6 : Quelques caractéristiques de l'ERU de Ginestous

Paramètre	Nature de l'eau	Valeur (n > 10)
DCO totale	Brute	758 ± 189 mg/L
Azote total	Filtrée à 1,2 µm	65 ± 8 mg/L
Phosphore total	Filtrée à 1,2 µm	10 ± 2 mg/L
MES	Brute	390 ± 48 mg/L
MVS	Brute	357 ± 46 mg/L
DCM	Filtrée à 1,2 µm	459 ± 32 mg/L
pH	Brute	7,6 ± 0,3

Caractéristiques de la solution saline synthétique

La solution saline synthétique est composée d'un mélange de substrats facilement assimilables, destinés à augmenter la charge en carbone DCO, azote N et phosphore P. La DCO est complétée par un mélange de glucose C₆H₁₂O₆ et d'acétate de sodium NaCH₃COO, l'azote par du chlorure d'ammonium NH₄Cl, le phosphore par du dihydrogénophosphate de potassium KH₂PO₄. L'azote est donc apporté sous forme NH₄⁺, le phosphore sous forme PO₄³⁻. La solution est préparée tous les 4 à 5 jours. Les concentrations visées sont données dans le Tableau IV-7.

Tableau IV-7 : Caractéristiques de la solution saline synthétique

Sel	Paramètre	Concentration visée
C ₆ H ₁₂ O ₆	DCO totale	22,6 g _{DCO} /L
NaCH ₃ COO	DCO totale	22,6 g _{DCO} /L
NH ₄ Cl	Azote total	2,75 g _N /L
KH ₂ PO ₄	Phosphore total	0,6 g _P /L

Caractéristiques du cocktail de médicaments

La solution médicamenteuse est un mélange des molécules anticancéreuses IFO, CP et TAM. Elle est préparée par dopage d'un volume connu d'eau ultrapure (> 1 L) avec les solutions méthanoliques des standards à 1 g/L décrites dans le chapitre II. La préparation est renouvelée tous les 3 à 4 jours. Pendant l'alimentation, elle est maintenue à 4 °C, à l'abri de la lumière. Les concentrations ciblées dans cette solution sont consignées dans le [Tableau IV-8](#).

Tableau IV-8 : Caractéristiques de la solution de dopage en médicaments

Molécule	Concentration visée
IFO	220 µg/L
CP	220 µg/L
TAM	45 µg/L

Caractéristiques attendues de l'eau d'alimentation

L'eau d'alimentation est un jeu de 2 voire 3 entrées suivant la phase de traitement considérée. Le volume du bioréacteur étant maintenu constant, le débit d'alimentation $Q_{\text{alimentation}}$ est égal au débit de filtration $Q_{\text{filtration}}$ soit 13,3 L/j. Les débits des 3 entrées sont liés par la relation :

$$Q_{\text{filtration}} = Q_{\text{alimentation}} = Q_{\text{ERU}} + Q_{\text{solution_saline}} + Q_{\text{cocktail}} \quad \text{Eq. (IV-6)}$$

où Q_{ERU} est le débit d'ERU (L/j), $Q_{\text{solution_saline}}$ le débit de la solution saline synthétique (L/j), Q_{cocktail} le débit du cocktail de médicaments (L/j). Tous ces débits ont été évalués deux fois par semaine, par pesée et chronométrage suivant la relation :

$$Q = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot \rho} \quad \text{Eq. (IV-7)}$$

où Δm représente la différence de masse accumulée entre le début et la fin de l'essai (en g), Δt le temps chronométré entre le début et la fin de l'essai (en j), ρ la masse volumique (en g/L). Les caractéristiques attendues de l'eau d'alimentation sont présentées dans le [Tableau IV-9](#).

Tableau IV-9 : Caractéristiques attendues de l'eau d'alimentation

Paramètre	Valeur attendue
Q_{ERU}	13 ^a – 12,7 ^b L/j
$Q_{\text{solution saline}}$	0,3 L/j
Q_{cocktail}	0 ^a – 0,3 ^b L/j
[DCO totale]	1750 mg/L
[Azote total]	125 mg/L
[Phosphore total]	25 mg/L
[IFO]	5 ^b µg/L
[CP]	5 ^b µg/L
[TAM]	1 ^b µg/L

a : première phase (sans contamination)

b : seconde phase (contamination avec le cocktail)

Ces valeurs moyennes sont valables pour les deux phases. L'effet de dilution entraîné par le cocktail de médicaments a été considéré négligeable (< 2,5 %). Par ailleurs, l'apport de DCO sous forme de MeOH, résultant du dopage de l'eau du robinet avec les solutions de standards, permet de limiter encore plus cet effet sur la DCO. On rappelle que le MeOH est facilement biodégradable. L'alimentation présente aussi un rapport DCO/N/P égal à 100/7/1,5 et supérieur au rapport 100/5/1 requis pour un fonctionnement satisfaisant de l'épuration biologique.

IV.2.1.2.c) Caractéristiques de la boue du pilote

L'âge de la boue du pilote (AB) a été fixé à 20 jours. Il est défini comme le temps de rétention solide dans le bioréacteur soit :

$$AB = \frac{\text{Volume}_{\text{réacteur}}}{\text{Purge}_{\text{quotidienne}}} \quad \text{Eq. (IV-8)}$$

où AB s'exprime en j, $\text{Volume}_{\text{réacteur}}$ le volume du bioréacteur en L, $\text{Purge}_{\text{quotidienne}}$ le volume de boue retiré quotidiennement en L/j.

Pour un volume de réacteur de 20 L, la purge quotidienne est fixée à 1 L. Les lundis et vendredis, cette purge est réalisée le matin et le soir pour compenser l'absence de purges pendant les week-ends. De plus, lorsque des expériences ont nécessité des soutirages supérieurs à la purge, les quantités ont été déduites sur les purges suivantes pour limiter la déstabilisation du système.

IV.2.1.3) Système membranaire

La filtration de la liqueur mixte est réalisée par une membrane disposée dans un carter en inox à l'extérieur du bioréacteur, d'où son appellation de BAME. Les caractéristiques de la membrane sont données dans le [Tableau IV-10](#). La recirculation de la liqueur mixte est assurée par une pompe volumétrique rotative (pompe à rotor excentré PCM-Moineau COMPACT, modèle 1200 C4), fixée à un débit d'environ 700 L/h : le volume du bioréacteur est donc recirculé en deux minutes. Le mode de filtration appliqué est la filtration tangentielle. Sous l'effet d'une différence de pression, la filtration se réalise depuis l'intérieur de la membrane vers l'extérieur. Le filtrat (*i.e* perméat) est directement connecté au réseau d'évacuation des eaux. La vitesse tangentielle le long de la membrane est réglée à une vitesse de 4 m/s par la pompe de recirculation. Une vanne pointeau placée en sortie de carter membranaire permet d'ajuster la pression à l'intérieur de la membrane et de maintenir le flux de perméat constant à mesure que le colmatage augmente. Pour information, la pression est suivie à l'aide d'un ensemble de 3 manomètres ([Figure IV-5](#)) et enregistrée sous *DasyLab 9.0*[®]. Après nettoyage chimique avant utilisation, la perméabilité des membranes a été évaluée à environ 1000 L/(h.m².bar) à 20 °C. Les procédures de nettoyage et d'estimation de perméabilité sont données sur l'[Annexe L](#).

Tableau IV-10 : Caractéristiques des membranes utilisées

Définition	Caractéristique
Matériau	Céramique
Module	Tubulaire
Surface filtrante	0,0055 m ²
Seuil de coupure	0,2 μm
Fournisseur	Pall Exekia
Longueur de la membrane	25 cm
Diamètre interne/externe	7 mm/10 mm
Date de première utilisation	2006



IV.2.1.4) Suivi du process

IV.2.1.4.a) Déroulement expérimental

La campagne s'est déroulée sur une période de 155 jours, en deux séquences de 76 et 79 jours. La première séquence a été réalisée sans addition du cocktail médicamenteux. Pendant cette période, les bactéries ont pu s'adapter aux seules conditions de fonctionnement du procédé (hydrodynamique, alimentation...). Cette durée de 76 jours correspond à près de 3 fois l'âge de boue, qui est une durée satisfaisante pour obtenir des boues caractéristiques du fonctionnement du procédé ([Delgado](#),

2009). La seconde séquence a été réalisée avec addition continue du cocktail médicamenteux sur les boues de la première séquence et ce, pendant 77 jours. Cette durée a permis aux bactéries de s'acclimater à la présence des polluants et d'accroître éventuellement leur capacité d'élimination. Le comportement du pilote a également été suivi 2 jours après arrêt du dopage.

Pendant ces deux séquences, des analyses hebdomadaires ont été effectuées pour contrôler les performances du procédé et apprécier son bon fonctionnement. Ces analyses ont porté sur des paramètres globaux tels que la DCO, l'azote total, les MES/MVS et la DCM. Pendant la phase de contamination, les concentrations en micropolluants ont été suivies. D'autres manipulations ont été réalisées au cours de ces campagnes et seront détaillées dans les prochains paragraphes.

IV.2.1.4.b) Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués en fin de phase anoxie, peu avant la reprise de l'aération. Les lignes eau et boue ont été échantillonnées (Figure IV-5). Suivant la nature de l'analyse, les échantillons ont été utilisés bruts, filtrés à 1,2 µm pour les échantillons aqueux, ou centrifugés puis filtrés pour les échantillons de boue. On rappelle que les conditions de centrifugation et filtration sont disponibles dans les parties II.2.3.2 et II.2.3.3 du chapitre II. Les prélèvements ont été analysés directement pour les mesures autres que micropolluants, et analysés en accord avec les conditions de conservation du chapitre II pour les micropolluants. Le Tableau IV-11 reprend les différents prélèvements et analyses effectués.

Tableau IV-11 : Bilan des analyses effectuées sur l'intégralité de la campagne

Analyse	Première séquence (sans polluant)				Seconde séquence (avec polluant)			
	ERU	Alim.	Boue	Perméat	ERU	Alim.	Boue	Perméat
DCO	-	X (B)	-	X (B)	-	X (B)	-	X (B)
Azote Total	-	X (F)	-	X (F)	-	X (F)	-	X (F)
MES	X (B)	-	X (B)	-	X (B)	-	X (B)	-
MVS	X (B)	-	X (B)	-	X (B)	-	X (B)	-
DCM	X (F)	X (F)	X (F)	X (F)	X (F)	X (F)	X (F)	X (F)
Micropolluant	-	-	-	-	-	X (F)	Φ _{aq.} (F) Φ _{sol.} (C)	X (F)

X : analyse effectuée ; B : brut ; F : filtré à 1,2 µm ; C : centrifugé ; Φ_{aq.} : phase aqueuse ; Φ_{sol.} : phase solide

IV.2.1.4.c) Techniques analytiques

Mesure de la DCO

La mesure de la DCO nécessite une prise d'essai de 2 mL. La DCO correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder chimiquement les substances réductrices contenues dans la solution. L'oxydant utilisé est du bichromate de potassium (K₂Cr₂O₇). L'oxydation est réalisée en milieu acide pendant 2 heures à 150 °C, en présence d'un catalyseur au sulfate d'argent (AgSO₄), et de sulfate mercurique (HgSO₄) qui élimine les interférences dues aux ions chlorures. Des tubes commerciaux (0 – 1500 mg_{O₂}/L pour l'eau d'alimentation ; 0 – 150 mg_{O₂}/L pour le perméat) de la marque Hanna Instruments ont été utilisés. Le résultat obtenu est exprimé en mg_{O₂}/L. L'erreur de mesure a été évaluée sur 5 échantillons et est de l'ordre de 11 %.

Mesure de l'azote total N_{Total}

La mesure de l'azote total nécessite une prise d'essai de 0,5 mL. Pendant 30 minutes à 105 °C, une digestion alcaline de persulfate (S₂O₈) convertit toutes les formes d'azote en nitrates. Le metabisulfite de sodium (Na₂S₂O₅) est ajouté après digestion pour éliminer les interférences dues aux oxydes d'halogène. Le nitrate réagit alors avec de l'acide chromotrope (C₁₀H₈O₈S₂)

dans des conditions fortement acides pour former un complexe jaune avec un maximum d'absorbance à 410 nm. La méthode utilisée est « Method 100 Test 'N Tube Vials Programmes HACH, 395 N, Total HR TNT ». Le résultat obtenu est exprimé en mg_N/L . L'erreur de mesure a été évaluée pour 5 échantillons et est de l'ordre de 5 %.

Mesure des matières en suspension (MES) et volatiles en suspension (MVS)

Un échantillon de volume connu (V) est filtré sous vide sur un filtre Whatman GF/C (1,2 μm) de masse connue (m_0). Le filtre est placé dans une étuve à 105 °C pendant 24 heures pour évaporer l'eau. Après stockage au dessiccateur pendant une heure, le filtre est à nouveau pesé (m_1). Ce même filtre est ensuite disposé dans un four à calciner pendant 2 heures à 525 °C, puis à nouveau pesé (m_2). La comparaison des différentes pesées permet d'accéder aux concentrations en matières en suspension (MES) et volatiles en suspension (MVS) suivant les équations :

$$\text{MES (g/L)} = \frac{m_1(\text{g}) - m_0(\text{g})}{V(\text{mL})} \cdot 1000 \quad \text{Eq. (IV-9)}$$

$$\text{MVS (g/L)} = \frac{m_2(\text{g}) - m_0(\text{g})}{V(\text{mL})} \cdot 1000 \quad \text{Eq. (IV-10)}$$

L'erreur commise est d'environ 4 % pour les deux mesures.

Mesure de la matière colloïdale et dissoute (DCM)

Un volume V de 50 mL de phase aqueuse filtrée est transféré dans un erlenmeyer vide, de masse connue (m_A). L'erlenmeyer est ensuite placé à l'étuve, à 105 °C, pendant 48 heures, afin d'évaporer l'eau. Après stockage au dessiccateur pendant une heure, l'erlenmeyer est à nouveau pesé (m_B). La concentration en DCM de l'échantillon est alors donnée par l'équation :

$$\text{DCM (g/L)} = \frac{m_B(\text{g}) - m_A(\text{g})}{V(\text{mL})} \cdot 1000 \quad \text{Eq. (IV-11)}$$

L'erreur de mesure a été évaluée : elle est de l'ordre de 5 %.

Suivi des concentrations en micropolluants

Les protocoles de détermination des quantités de molécules anticancéreuses contenues dans les matrices aqueuses et solides sont entièrement détaillés dans le chapitre II de ce manuscrit.

IV.2.2) Caractérisation des interactions de sorption

IV.2.2.1) Caractérisation de la nature de la sorption

L'identification de la nature physique ou chimique de la sorption a été réalisée suivant une approche thermodynamique. La méthodologie développée consiste en la détermination d'isothermes de sorption et en l'extraction de coefficients de distribution pour plusieurs températures. En accord avec les variations de température observées sur le pilote, 4 valeurs ont été retenues : 26, 29, 32 et 35 °C. Les expériences ont été menées sur la seule boue obtenue en fin de 1^{ère} séquence (sans polluant). Le protocole mis en œuvre est largement inspiré de celui détaillé dans la partie III.2.3.3. pour la détermination des isothermes de sorption. Brièvement, plusieurs aliquotes de 100 mL de boue ont été contaminées par injection de quantités croissantes d'une mixture d'IFO, de CP et de TAM. Les concentrations visées sur quatre niveaux en IFO et CP étaient de 1 ; 2,5 ; 4 et 5,5 $\mu\text{g/L}$, celles de TAM étaient sensiblement équivalentes. Les flacons ont été agités pendant 4 heures à 150

rpm dans une enceinte thermorégulée de type agitateur-incubateur Infors Minitron de chez Grosseron (Saint Herblain, France). Les stratégies de séparation des phases et de dosage des polluants ont été détaillées (partie II.2.3.). Pour la température de 35 °C, l'expérience a été doublée pour le niveau de dopage à 4 µg/L. La Figure IV-5 récapitule le déroulement de cette étude.

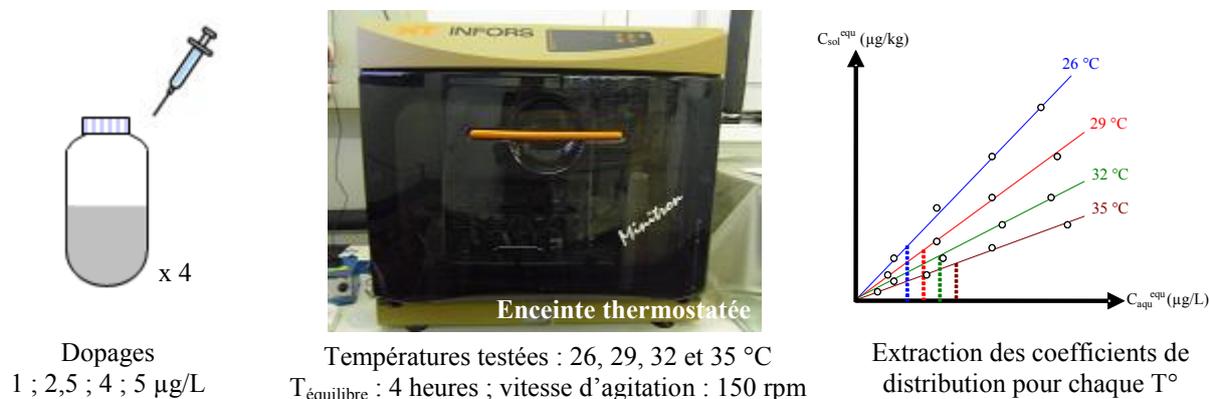


Figure IV-5 : Organisation de l'étude thermodynamique de la sorption

IV.2.2.2) Etude de sorption sur boues contaminées

Une expérience de sorption sur la boue obtenue en fin de séquence de contamination a été réalisée. Pour ce faire, un lot de flacons contenant 100 mL de boue chacun a été dopé avec des quantités croissantes d'une mixture d'IFO, de CP et de TAM. Les échantillons étant contaminés, des quantités limitées ont été apportées. Les concentrations additionnelles étaient comprises entre 0,7 et 20 µg/L suivant le flacon (niveaux : 0,7 ; 1,8 ; 3,5 ; 7 ; 14 ; 20 µg/L). Les flacons ont été agités à 150 rpm, pendant 4 heures, à une température de 23 ± 2 °C. Les niveaux à 3,5 et 14 µg/L ont été réalisés en doublon. La phase aqueuse a été systématiquement dosée et la phase solide des niveaux à 0,7 ; 3,5 et 14 µg/L (avec les doublons) également. Le niveau de contamination initial dans chacune des phases a aussi été évalué. La Figure IV-6 reprend le déroulement de l'expérience.

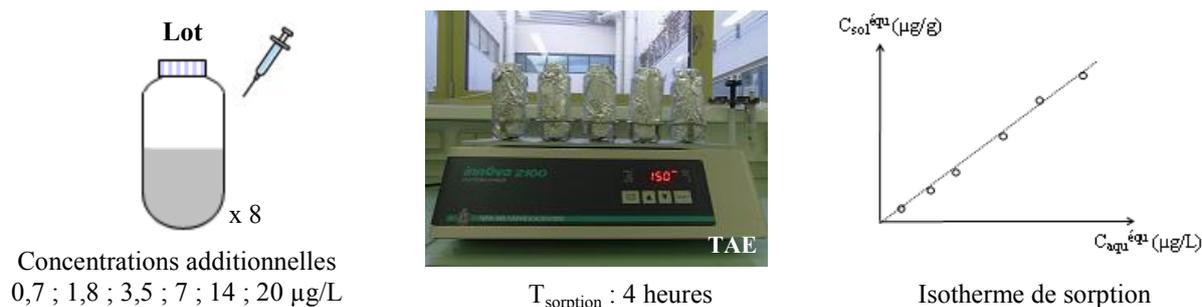


Figure IV-6 : Principe des essais de sorption sur la boue contaminée

IV.2.3) Caractérisation de la biodégradation

Les expériences de biodégradation ont été menées sur la boue obtenue en fin de séquence de contamination. Il a été supposé que les bactéries étaient acclimatées aux molécules anticancéreuses, ce qui permettra de justifier certaines stratégies expérimentales.

IV.2.3.1) Réponse à une injection « pulse » sans co-substrat

La capacité des bactéries acclimatées à dégrader les polluants sans co-substrat a été évaluée dans des petits réacteurs (capacité 2,2 L) opérés en mode batch. L'expérience a pu être réalisée deux fois grâce à deux réacteurs fonctionnant en parallèle. La [Figure IV-7](#) est un synoptique décrivant l'installation mise au point pour réaliser l'étude.

Chaque réacteur est rempli avec 500 mL de boues directement extraites du pilote. Ensuite, chaque réacteur est complété avec 1500 mL de surnageant de boue décantée et filtré à 1,2 μm sur filtre GF/C. Cette procédure présente des avantages à différents niveaux qui sont :

- (i) pilote de BAME : un faible volume de boues brutes a été utilisé et la boue décantée a été réintroduite dans le pilote, ce qui finalement permet de limiter la perte de MES et la déstabilisation du procédé ;
- (ii) petit réacteur batch : l'utilisation du surnageant de boue comme diluant permet de conserver les propriétés de la matière colloïdale et dissoute, contrairement aux études utilisant de l'eau du robinet ou du perméat (ou effluent) dans le meilleur des cas ;
- (iii) la dilution permet de ralentir les cinétiques de biodégradation et d'augmenter sensiblement la résolution dans le cas où la biodégradation serait rapide, hypothèse posée en début de partie et orientée d'après les résultats de la thèse de [Delgado \(2009\)](#).

Les réacteurs utilisés sont du type double enveloppe. La température de ces réacteurs est contrôlée par circulation d'eau du robinet passant dans l'enveloppe externe. La température de l'eau du robinet est réglée dans un bac en inox de marque Julabo, thermostaté à 23 °C. La boue est laissée deux heures dans ces conditions pour équilibrage. Parallèlement, des phases aérobie et anoxie sont appliquées pour épuiser les substrats résiduels. Les boues sont continuellement agitées à une vitesse correspondant à une graduation 100 (unité non précisée) pour maintenir l'homogénéité de la suspension. Les expériences ont été menées en condition aérobie, avec une teneur en oxygène de 2 mg/L (seuil bas) à 4 mg/L (seuil haut) et mesurée par une sonde Mettler Toledo 4100^e. La fourniture en oxygène est conditionnée par l'ouverture d'une électrovanne qui s'enclenche lorsque le seuil bas est atteint, et s'arrête lorsque le seuil haut est atteint. Le suivi de la consommation en oxygène (respirométrie) sur ordinateur est permis grâce au logiciel DasyLab 9.0[®].

Avant injection du cocktail de médicaments, les concentrations initiales en polluants dans les phases aqueuse et solide des boues sont déterminées, de même que les MES, les MVS et la DCM. L'injection d'un mélange d'IFO, de CP et de TAM marque le début de l'expérience (T_0). Les concentrations additionnelles attendues sont de l'ordre de 2 $\mu\text{g/L}$ en IFO et CP (1 $\mu\text{g/L}$ en TAM) dans le réacteur. Aux temps $T_{2\text{heures}}$, $T_{4\text{heures}}$, $T_{6\text{heures}}$ et $T_{10\text{heures}}$ après le dopage, 200 mL de boues sont prélevés avec une seringue (60 mL) et transférés dans un flacon à centrifuger pour séparer immédiatement les phases. Le traitement des flacons a été opéré comme décrit dans le chapitre II (partie II.2.3). Les deux phases ont été analysées pour estimer la quantité éliminée par biodégradation. Les variations de volume dues aux prélèvements dans le réacteur ont été prises en compte dans les calculs. Par ailleurs, les MES, MVS et la DCM ont été déterminées en fin de test ($T_{10\text{heures}}$) pour contrôler leur évolution. La procédure développée permet d'accéder aux cinétiques de biodégradation des polluants lorsque les boues sont aérées et en condition endogène.

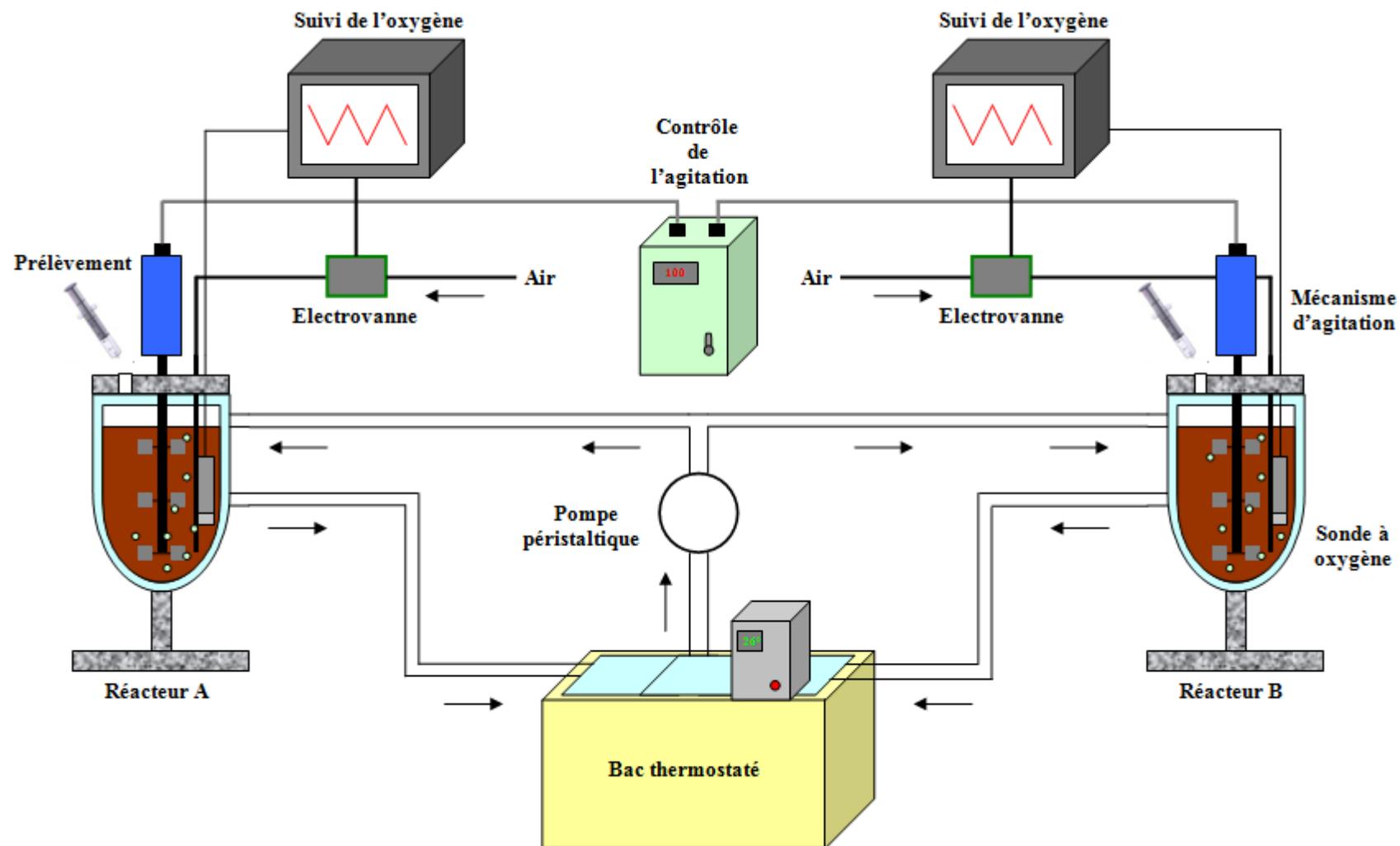


Figure IV-7 : Synoptique des essais de biodégradation pour deux réacteurs fonctionnant en parallèle

IV.2.3.2) Réponse à une injection « pulse » avec co-substrat

La cinétique de biodégradation des polluants en présence de co-substrat (facilement assimilable) a été suivie dans le pilote. L'idée d'un dopage de co-substrat dans les petits réacteurs a été abandonnée, compte-tenu de la difficulté de reproduire les conditions d'alimentation du pilote sans modifier soit le volume des réacteurs, soit la composition du substrat, et pouvant entraîner l'acquisition d'une réponse peu représentative.

L'expérience a été menée 3 jours après arrêt du dopage en médicaments, de manière à lessiver en partie la pollution médicamenteuse du pilote. Avant le dopage, l'ERU, la boue et le perméat ont été échantillonnés pour évaluer les niveaux de contamination avant essai. Le débit de perméat ainsi que les MES, MVS et la DCM ont également été évalués. L'injection d'un mélange d'IFO, de CP et de TAM directement dans le pilote marque le début de l'expérience (T_0). Les concentrations additionnelles attendues sont de l'ordre de 2 $\mu\text{g/L}$ en CP et IFO (1 $\mu\text{g/L}$ en TAM). Aux temps $T_{2\text{heures}}$, $T_{4\text{heures}}$, $T_{6\text{heures}}$ et $T_{10\text{heures}}$ après le dopage, 200 mL de boues sont prélevés depuis la purge et transférés dans un flacon à centrifuger pour séparer immédiatement les phases. Le traitement des flacons a été opéré comme décrit dans le chapitre II (partie II.2.3). En milieu ($T_{6\text{heures}}$) et fin de test ($T_{10\text{heures}}$), le perméat est échantillonné et analysé de manière à estimer le flux de pollution sortant du pilote sur la période du test. Les MES, MVS, DCM et débit de perméat ont également été réévalués. Le bilan entre les différents flux de médicaments (perméat, pilote...) permet d'accéder à la quantité éliminée par biodégradation d'une part, et aux cinétiques de biodégradation dans les conditions de fonctionnement du procédé d'autre part.

IV.2.4) Compréhension des interactions avec la matière colloïdale

Pour compléter l'étude des interactions dans le pilote, la distribution des polluants en fonction de la taille des matières colloïdales a été étudiée. Les expériences ont été réalisées sur la boue juste avant ajout du cocktail (boue « saine ») puis sur la boue en fin de séquence de contamination (boue contaminée) pour apprécier une éventuelle modification de la distribution. De plus, différentes conditions de test ont été appliquées et sont données sur la [Figure IV-8](#). Ces essais sont :

- (i) une image de la boue et de la distribution au moment du prélèvement (T_0), sans dopage supplémentaire en polluants ;
- (ii) une image de la boue et de la distribution après dopage et agitation pendant 4 heures en conditions anoxiques ($T_{4\text{hanoxie}}$). Cette condition s'apparente à la méthodologie développée lors des essais de sorption et permet ainsi d'apprécier les interactions lors de cet équilibre ;
- (iii) une image de la boue et de la distribution après dopage et agitation pendant 4 heures en conditions aérobies ($T_{4\text{haérobie}}$). Par comparaison avec le test précédent, cette condition permet de connaître l'influence de l'oxygène sur l'équilibre de sorption et la distribution des colloïdes et des polluants ;
- (iv) une image de la boue et de la distribution après dopage et agitation pendant 48 heures (boue de la première séquence, $T_{48\text{haérobie}}$) ou 24 heures (boue de la deuxième séquence, $T_{24\text{haérobie}}$) en conditions aérobies. La durée de ces essais permet de favoriser la mise en place d'une éventuelle biodégradation (sans co-substrat) et d'accéder à la distribution des polluants sous ces conditions. Le temps de contact de 24 heures a été fixé suivant l'hypothèse d'une biodégradation rapide du polluant. De plus, cette durée est plus longue que celle appliquée lors des essais de biodégradation (10 heures) pour des critères purement organisationnels⁶.

⁶ L'ultrafractionnement doit être pris en charge immédiatement. Le fractionnement entier de près de 2 L de boue peut durer entre 6 et 10 heures.

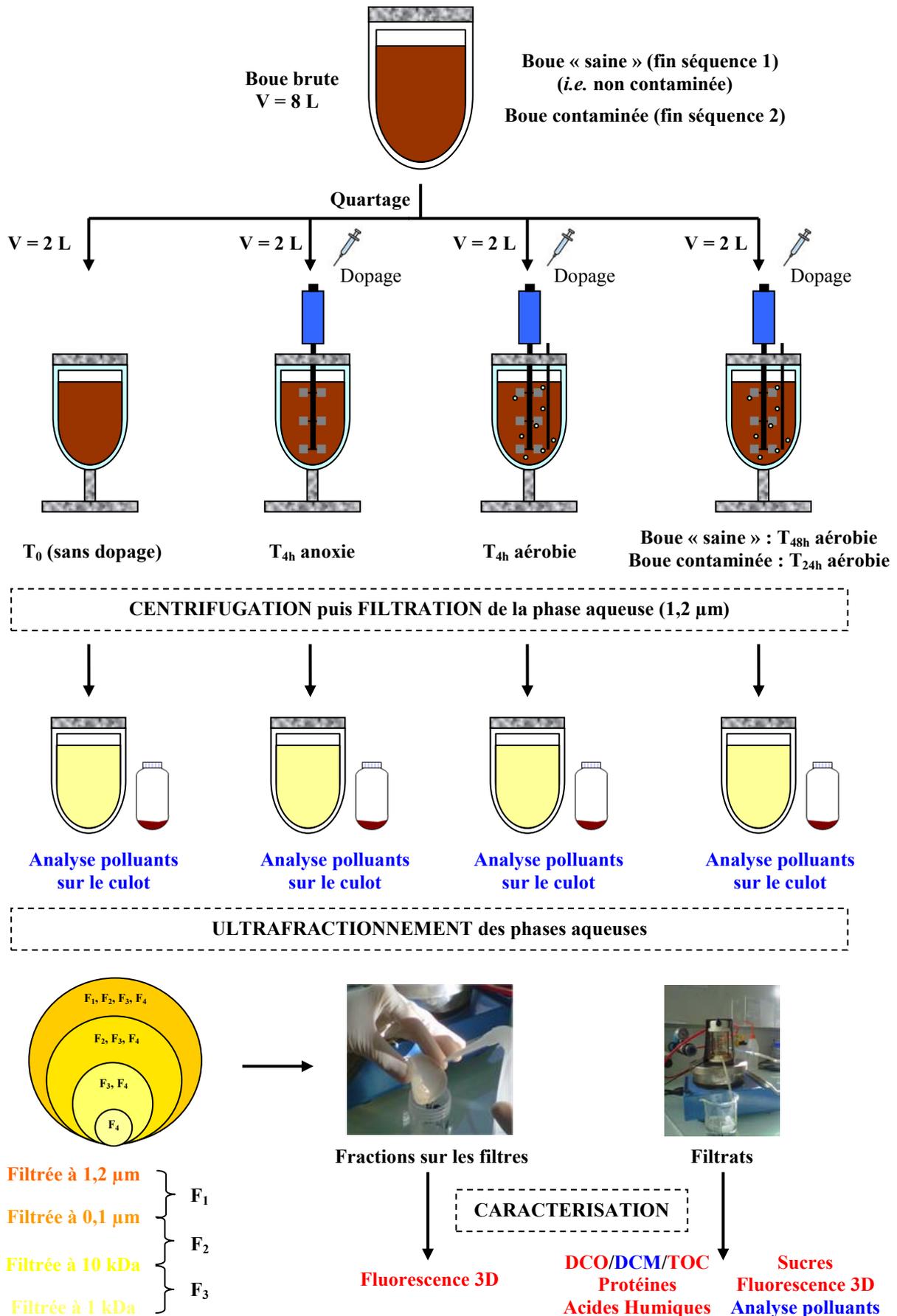


Figure IV-8 : Synoptique des manipulations d'ultrafractionnement et de caractérisation

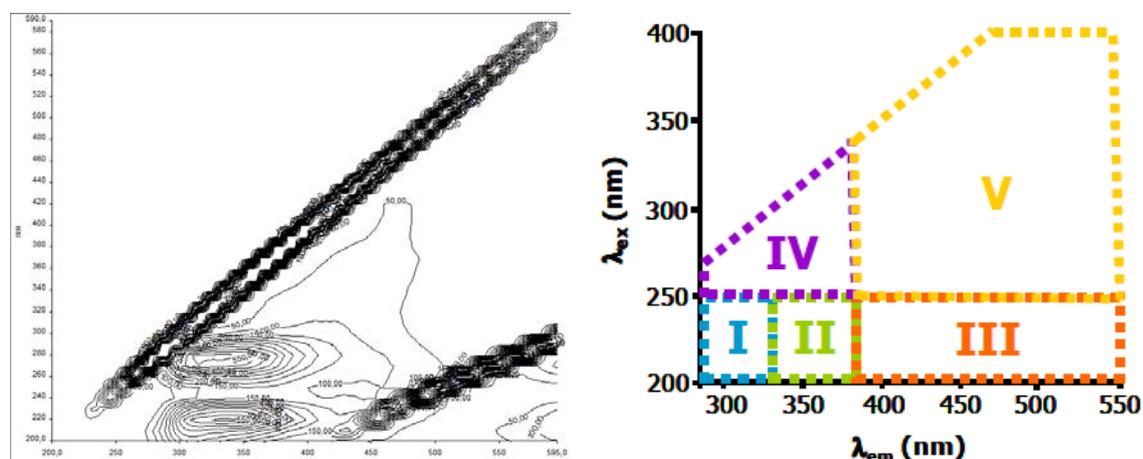
Avant chaque essai, les concentrations initiales en polluants dans les phases aqueuse et solide des boues sont déterminées, de même que les MES, les MVS et la DCM. Les réacteurs utilisés sont identiques à ceux décrits lors des essais de biodégradation. Brièvement, la température des essais a été fixée à 23 °C. Chaque réacteur a été agité à une vitesse de 100. Pour les réacteurs fonctionnant en condition aérobie, la concentration en O₂ a été maintenue entre 2 et 4 mg/L grâce au déclenchement d'une électrovane. Les dopages ont été effectués de manière à atteindre une concentration additionnelle de 5 µg/L en IFO et CP (1 µg/L en TAM) dans chacun des réacteurs. Après chaque essai, les phases ont été séparées. La phase solide a été congelée pour analyse des polluants sorbés. La phase aqueuse a été immédiatement prise en charge et fractionnée suivant la procédure décrite dans la partie III.2.6.1.e du chapitre 3. Quatre seuils limitrophes ont donc été appliqués : 1,2 µm, 0,1 µm, 10 kDa et 1 kDa. Lors de chaque filtration, le contenu des filtres a été soigneusement récupéré avec un volume (connu) d'eau ultrapure pour permettre une analyse qualitative par fluorescence tridimensionnelle. Ainsi, la nature des molécules fluorescentes des fractions F₁ (0,1 – 1,2 µm), F₂ (10 kDa – 0,1 µm), F₃ (1 – 10 kDa)⁷ a pu être déterminée. Les filtrats ont été caractérisés suivant différentes analyses physicochimiques (DCO, DCM, TOC, Protéines, Acides Humiques, Sucres), ainsi que par une analyse quantitative des concentrations en polluants et une analyse qualitative par fluorescence tridimensionnelle. Toutes ces manipulations ont été réalisées au LGC avec l'appui d'Abigail Pereira, ingénieure d'études recrutée sur le projet ANR BioMedBoue. A l'exception des analyses sur les polluants et la DCM de chaque fraction qui ont été immédiatement prises en charge au LGC, l'intégralité des manipulations de caractérisation a été rapidement réalisée par Abigail Pereira au LBE, sur des échantillons maintenus à 4 °C entre leur récupération et leur analyse.

⁷ On rappelle que F₄ est la fraction la plus ultrafiltrée (< 1 kDa)

IV.2.5) Caractérisation fonctionnelle par fluorescence tridimensionnelle F3D

La matière organique est une mixture hétérogène composée de substances organiques aromatiques et aliphatiques, contenant notamment des groupements fonctionnels sulfurés ou azotés. Une partie de cette matière est fluorescente, et comprend des protéines et des acides organiques, issus de la dégradation de matières végétales, animales ou contenues dans les eaux usées (Cea Barcia, 2012). La fluorescence repose sur des propriétés optiques particulières de ces espèces. La fluorescence a lieu quand un électron d'une molécule passe dans un état excité suite à l'absorption d'énergie (e.g un photon), puis cette énergie est émise sous forme de lumière lorsque l'électron se « désexcite » et retourne à son état initial fondamental. Les longueurs d'onde d'absorption (excitation) et d'émission sont spécifiques de chaque molécule. Les composés aromatiques possèdent notamment une bonne fluorescence due aux électrons non appariés contenus dans leur cycle (Hudson *et al.*, 2007). Les progrès réalisés en analyse par F3D permettent à présent de caractériser aussi bien des échantillons liquides que solides.

Les spectres de fluorescence ont été acquis à l'aide d'un spectrofluorimètre LS 55 (Perkin Elmer) par analyse d'1 mL d'échantillon disposé dans une cuve en quartz d'1 cm d'épaisseur, permettant de s'assurer que l'intégralité du volume réagit (Pereira, 2012). Une lampe au xénon assure un rayonnement pulsé (20 kW pour 8 μ S) entre 200 et 600 nm, avec un pas de 20 nm. L'émission de fluorescence a été récupérée sur un monochromateur disposé à 90° du rayon d'excitation. L'enregistrement est effectué entre 200 et 600 nm, avec un pas de 0,5 nm. De manière à obtenir des spectres avec une intensité exploitable, des dilutions ont parfois été réalisées. Le traitement du signal a été effectué à l'aide du logiciel FL Winlab 4.00.02 (Perkin Elmer) et permet d'obtenir un spectre 3D en noir et blanc comme celui présenté sur la Figure IV-9, et se lit à la manière d'une carte topographique : plus les lignes de niveaux seront resserrées et plus le massif sera haut. La zone d'intérêt du spectre est comprise entre les deux rayonnements parasites $\lambda_{em} = \lambda_{ex}$ et $\lambda_{em} = 2 * \lambda_{ex}$. Un exemple possible d'interprétation des massifs est également fourni.



Les longueurs d'onde d'émission λ_{em} sont représentées en abscisse

Les longueurs d'onde d'excitation λ_{ex} sont représentées en ordonnée

Groupe I et II : protéines aromatiques (groupe I : Tyrosine-like ; groupe II : Tryptophane-like) ;

Groupe III : acides fulviques-like* ;

Groupe IV : sous-produits protéiques de l'activité microbienne-like ; Groupe V : acides humiques-like*

* Le terme like définit les espèces réellement correspondantes ou apparentées à la structure décrite

Figure IV-9 : Représentation d'un spectre (g.) et de son interprétation possible (dr.)
(extrait de Barret, 2009, inspiré de Chen *et al.*, 2003)

IV.3) Résultats et Discussion

IV.3.1) Fonctionnement du procédé sur l'intégralité de la campagne

IV.3.1.1) Evolution du débit de perméat

La Figure IV-10 présente l'évolution du débit de perméat sur l'intégralité de la campagne. On rappelle que les débits de perméat et d'alimentation sont équivalents. Le débit de perméat visé est matérialisé par le trait horizontal gris et fin. L'introduction du cocktail de médicaments dans l'eau d'alimentation est matérialisée par le trait vertical bleu et épais.

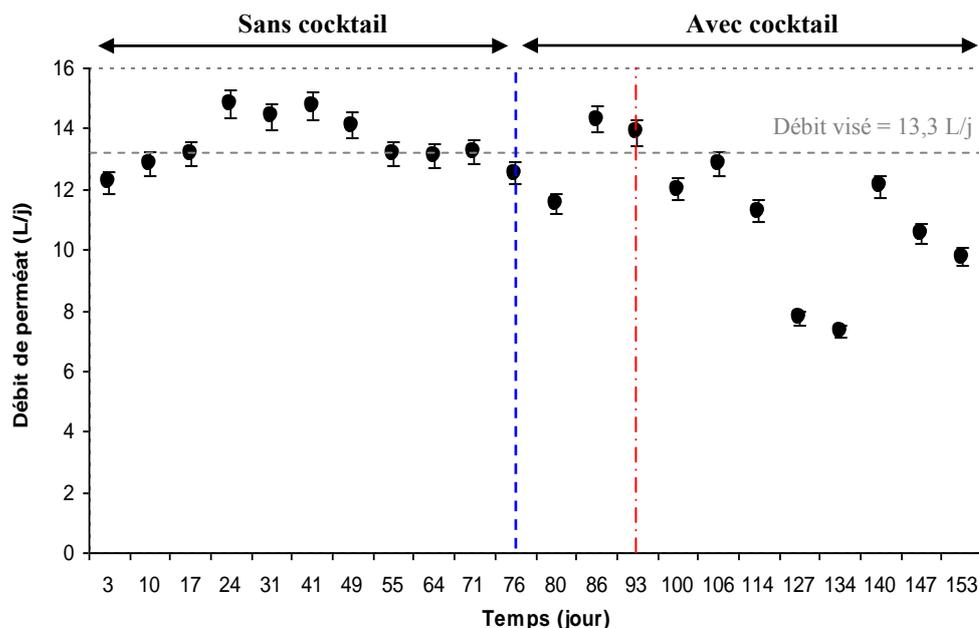


Figure IV-10 : Evolution du débit de perméat dans le pilote durant la campagne

Lors de la séquence sans addition du cocktail médicamenteux, on constate que les débits de perméat mesurés ($\bar{Q} = 13,5 \pm 0,8$ L/j d'où $\overline{TSH} = 35,5 \pm 2,3$ h) sont plutôt en accord avec le débit visé, ce qui a permis d'assurer des conditions d'alimentation relativement constantes sur cette période. Le profil de débit est nettement plus variable lors de l'addition du cocktail médicamenteux, avec des débits souvent inférieurs au débit visé. Le débit le plus faible est atteint au jour 134 : $Q = 7,4$ L/j d'où $TSH = 65$ h. Pour expliquer ces variations, il est nécessaire de préciser qu'au jour 93 (trait vertical rouge et fin), une modification importante dans la composition de l'eau usée ($MES = 1000$ mg/L ; $DCO = 1700$ mg/L vs $\overline{MES} = 400$ mg/L ; $\overline{DCO} = 800$ mg/L) a déstabilisé le système et a rendu le procédé difficile à contrôler. Une des conséquences majeures a été une augmentation très rapide de la PTM jusqu'à la valeur limite de 4 bar, où une détérioration de la membrane devient possible. Par la suite, 4 changements de membrane ont été effectués mais n'ont pas permis de retrouver le débit visé, même pour une PTM de 4 bar. Ainsi, l'introduction de cette eau a certainement influencé les caractéristiques de la liqueur mixte (e.g son pouvoir colmatant) et ce, sur le reste de la séquence. On rappelle que l'eau usée a été renouvelée au bout de 4 jours, ce qui permettrait d'expliquer pourquoi l'effet a été aussi prolongé. L'introduction du cocktail de médicaments a également pu accentuer et participer à la persistance de cet effet. Afin de tenir compte de cet événement dans l'évaluation des performances épuratoires du procédé, nous avons donc effectué des bilans « entrée-sortie » sur les flux moyens journaliers plutôt que sur les concentrations et ce, entre chaque prélèvement (tous les 6 à 7 jours). Les flux moyens journaliers ont été déterminés d'après une relation de la forme (équation IV-12) :

$$\Phi_j^{j+n} = \frac{C_j + C_{j+n}}{2} \cdot \frac{Q_j + Q_{j+n}}{2} \quad \text{Eq. (IV-12)}$$

où Φ_j^{j+n} désigne le flux moyen journalier sur la période j à $j+n$ (en g/j), C_j et C_{j+n} les concentrations aux temps j et $j+n$ (en g/L), Q_j et Q_{j+n} les débits aux temps j et $j+n$ (en L/j), n un entier naturel > 1 .

Dans les prochaines présentations de graphes, (i) la séparation entre les deux séquences et (ii) le moment de l'introduction de l'eau usée singulière seront matérialisés par les mêmes traits que ceux proposés sur la figure précédente (Figure IV-10).

IV.3.1.2) Evolution des MES et MVS dans le pilote

La Figure IV-11 présente l'évolution des MES et MVS des boues du pilote sur l'intégralité de la campagne. Le ratio MVS/MES est également renseigné. Le même profil est fourni en annexe pour suivre les variations sur l'ERU (Annexe M).

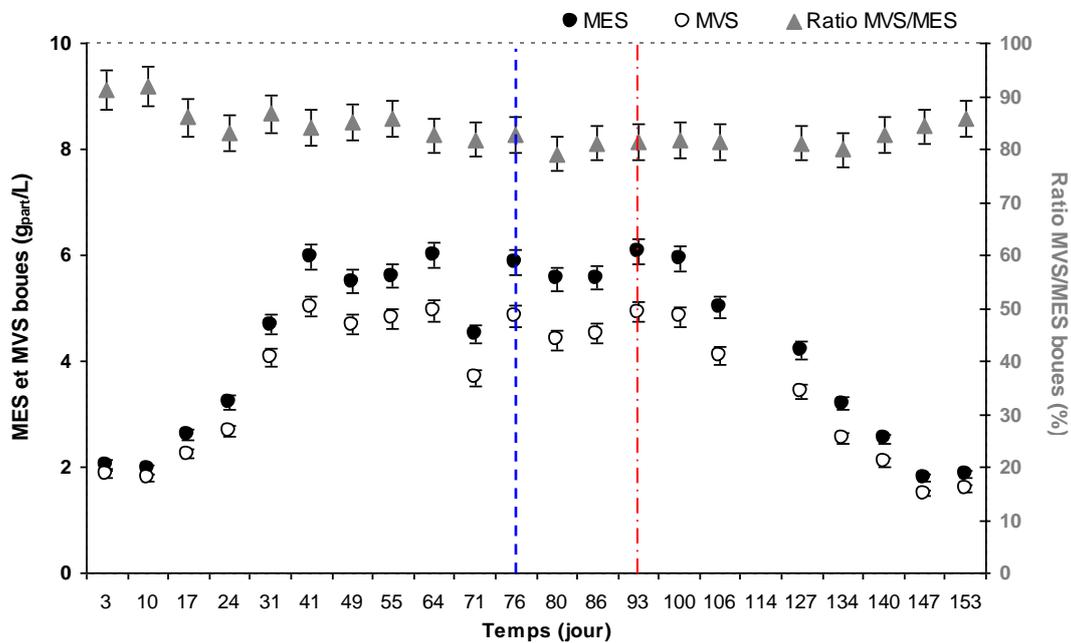


Figure IV-11 : Evolution des MES, MVS et du ratio MVS/MES dans le pilote

Avant l'introduction du cocktail, l'augmentation rapide de la concentration en MES (de 2 à 6 g_{part}/L) traduit une phase de croissance exponentielle des microorganismes entre la période j_3 à j_{41} , suivie par une phase de croissance ralentie où la concentration évolue peu. Ce comportement peut être dû à une disponibilité réduite de substrat par unité de biomasse active (charge massique $\sim 0,25 g_{DCO}/g_{MVS}\cdot j$). La production de boues semble donc être stable à partir de 2 fois l'âge de boues, qui est une durée déjà observée par Delgado (2009) sur le même pilote. On peut donc penser que le système est stabilisé et que la boue obtenue est effectivement caractéristique du fonctionnement du procédé. En parallèle, on remarque une augmentation de la minéralisation de la boue, avec un ratio MVS/MES évoluant de 91 à 81 %. Cette évolution est cohérente avec les conditions de charge et l'âge de boues appliqués. La brusque diminution au jour 71 est expliquée par l'utilisation d'un volume important de boues pour des essais de sorption et d'ultrafractionnement. La perturbation a toutefois été sans effet notable. Suite à l'introduction d'eau usée singulière à j_{93} , la concentration en MES a progressivement diminué pour se stabiliser à 2 g_{part}/L à partir de j_{147} . Les raisons de cette chute peuvent être multiples : (i) un taux de décès important de la biomasse, (ii) des pertes de boues par la soupape de sécurité du système membranaire, (iii) l'utilisation de volumes importants pour les

essais sur les boues (sorption...). Le 3^{ème} argument est celui qui justifie le mieux cette allure. Il n'est pas possible d'identifier clairement l'impact du cocktail de médicaments ou de l'apport d'eau usée singulière sur la production ou la perte de boues. Delgado (2009) précise toutefois que l'introduction du cocktail n'a pas eu d'effet sur les concentrations en MES lors de ses essais. Par ailleurs, on remarque une légère augmentation de l'organicité de la boue en fin de campagne, qui peut être due à une réduction de l'activité bactérienne en raison des faibles concentrations en MVS. Le profil des MES après ajout du cocktail ne nous permet pas de savoir si le système était en régime permanent.

IV.3.1.3) Performances épuratoires sur les paramètres globaux

IV.3.1.3.a) Elimination de la demande chimique en oxygène DCO

L'évolution des flux de DCO et du rendement d'élimination est présentée sur la Figure IV-12. Le détail des concentrations mesurées en DCO en entrée et sortie du système est disponible en annexe (Annexe N). La sortie du système est seulement considérée par le perméat (purges négligées).

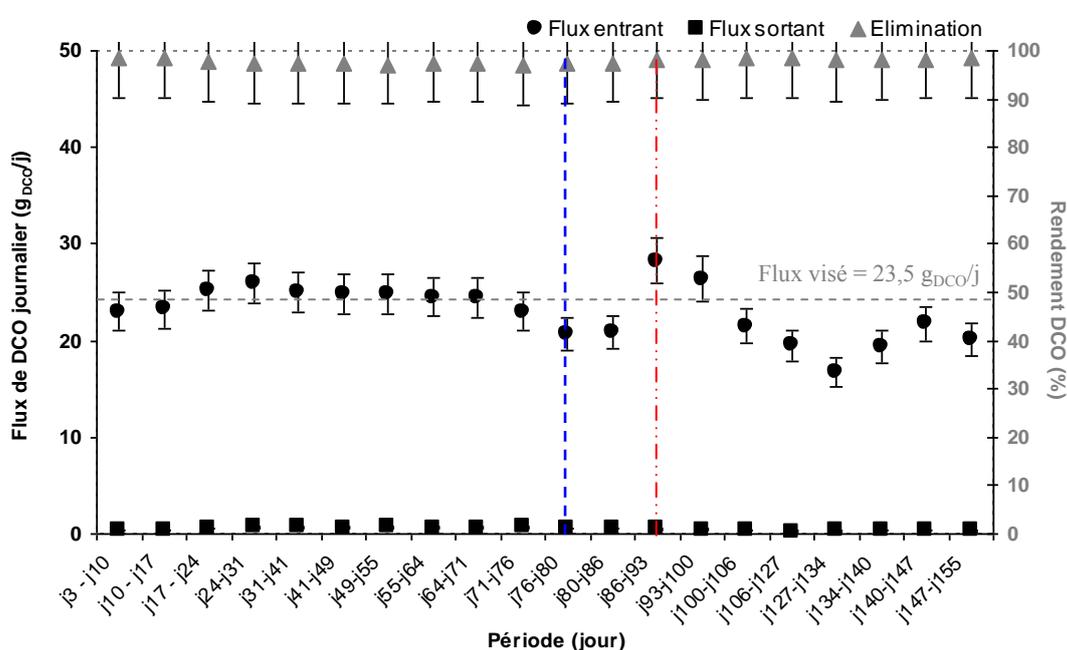


Figure IV-12 : Evolution des flux et de l'élimination de la DCO durant la campagne

Le flux journalier de DCO en entrée est relativement constant avant l'introduction du cocktail, puis légèrement plus faible sur le reste de la campagne. Cette diminution est attribuable à un débit de la solution saline synthétique environ 1,2 fois plus faible que celui attendu et difficile à ajuster. On note également un pic de charge sur la période j86 – j93, du à une DCO dans l'ERU environ 2 fois plus élevée que les valeurs typiquement mesurées (*i.e* 800 mg d'O₂/L) (Annexe M). Malgré ces variations de composition dans l'eau d'entrée, on note que le flux journalier en sortie de procédé est toujours très faible. Sur toute la campagne, le rendement d'élimination moyen est d'environ 98 %. Ce résultat confirme que le BAME est capable de produire une eau de qualité chimique satisfaisante sur ce paramètre. Par ailleurs, les valeurs de DCO mesurées en sortie ont été systématiquement inférieures à 125 mg d'O₂/L qui est la limite admissible pour les rejets de station. Il est intéressant de noter que malgré les différences de charge appliquée, les difficultés de gestion du débit de filtration ou encore l'introduction de toxiques, l'efficacité sur la DCO reste toujours très bonne et pourrait traduire la robustesse du procédé. Nous ne sommes toutefois pas en mesure de dire si la robustesse est ici expliquée par l'épuration biologique et/ou la rétention membranaire. L'évolution des charges volumiques C_v et massiques C_m est donnée pour information en annexe (Annexe N).

IV.3.1.3.b) Elimination de l'azote total N_{Total}

L'évolution des flux en azote total et du rendement d'élimination est présentée sur la [Figure IV-13](#). Le détail des concentrations mesurées en azote total en entrée (ERU et eau d'alimentation) et sortie du système est disponible en annexe ([Annexe N](#)). La sortie du système correspond au perméat.

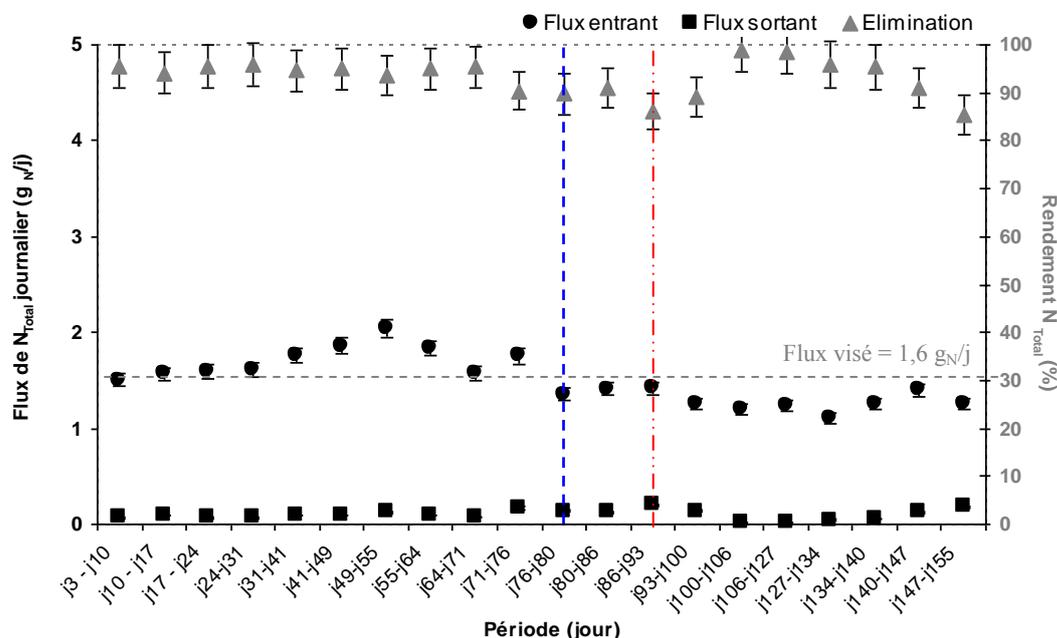


Figure IV-13 : Evolution des flux et de l'élimination de l'azote total durant la campagne

Le profil observé pour l'azote total suit les mêmes tendances que pour la DCO, à l'exception seule que l'ajout d'eau usée singulière n'a pas entraîné de pic de charge. Au regard des concentrations en MES, MVS, DCO et azote total de l'ERU ([Annexe M](#)), cet apport était donc très particulière, plutôt minéral et carboné, et n'avait donc pas un profil d'eau résiduaire domestique. Quoiqu'il en soit, on remarque que l'élimination de l'azote est satisfaisante sur toute la campagne et en moyenne égale à 90 %. Les quelques baisses observées sont probablement attribuables aux purges qui ont eu pour effet de diminuer la quantité de bactéries autotrophes dans le réacteur, souvent très peu représentées dans les boues activées et pourtant indispensables au processus d'élimination de l'azote (*i.e.* nitrification). L'effet de l'ajout de toxiques n'apparaît pas ici significatif et rejoint les conclusions de l'étude de [Delgado \(2009\)](#). Dans ce cas précis, le procédé pourrait tirer sa robustesse de sa concentration en biomasse et de son âge de boues élevés, ce dernier point permettant le développement de bactéries à croissance lente telles que les autotrophes ([Gao et al., 2004](#)). L'évolution des charges volumiques C_v et massiques C_m est donnée en annexe ([Annexe N](#)).

IV.3.1.3.c) Performance épuratoire sur les matières colloïdales et dissoutes DCM

L'évolution des flux en DCM et du rendement d'élimination est présentée sur la [Figure IV-14 \(a\)](#). Les concentrations en DCM mesurées dans l'ERU, l'eau d'alimentation, les boues et le perméat sont renseignées sur la [Figure IV-14 \(b\)](#). On rappelle que l'eau d'alimentation est composée d'ERU et d'une solution saline synthétique.

Sur la [Figure IV-14 \(a\)](#), on remarque que le rendement sur la DCM est variable et très modéré (30 à 55 %), et présente une allure cyclique. Comme le flux de DCM en sortie de procédé est plutôt constant ($\Phi = 11 \pm 1 \text{ g}_{DCM}/j$), l'allure cyclique est attribuable à l'entrée du système. A partir du profil des concentrations de la [Figure IV-14 \(b\)](#), on retrouve cette même allure pour l'eau d'alimentation. Sachant que la DCM mesurée dans l'ERU est constante et voisine de $400 \text{ mg}_{DCM}/L$,

la solution saline synthétique est donc responsable de ce comportement. Il est intéressant de constater que les concentrations en DCM dans la boue et le perméat sont sensiblement équivalentes (Figure IV-14 (b)). Seule la séparation physique par la membrane distingue ces deux matrices. Ainsi, on peut affirmer que (i) la membrane retient peu la matière colloïdale présente dans les boues et (ii) cette matière est principalement composée de molécules de petite taille et inférieures à 0,2 μm (seuil de coupure de la membrane). Nous ne possédons toutefois aucune indication sur l'évolution de la spéciation de la DCM aux différentes bornes du système, ce qui pourrait faire l'objet d'un travail plus détaillé. On peut émettre l'hypothèse que la DCM du perméat est très majoritairement sous forme dissoute en raison d'une conductivité élevée (1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$) provenant de la solution synthétique. On note par ailleurs la valeur maximale de 600 $\text{mg}_{\text{DCM}}/\text{L}$ pour l'ERU lors de l'addition de l'eau usée singulière.

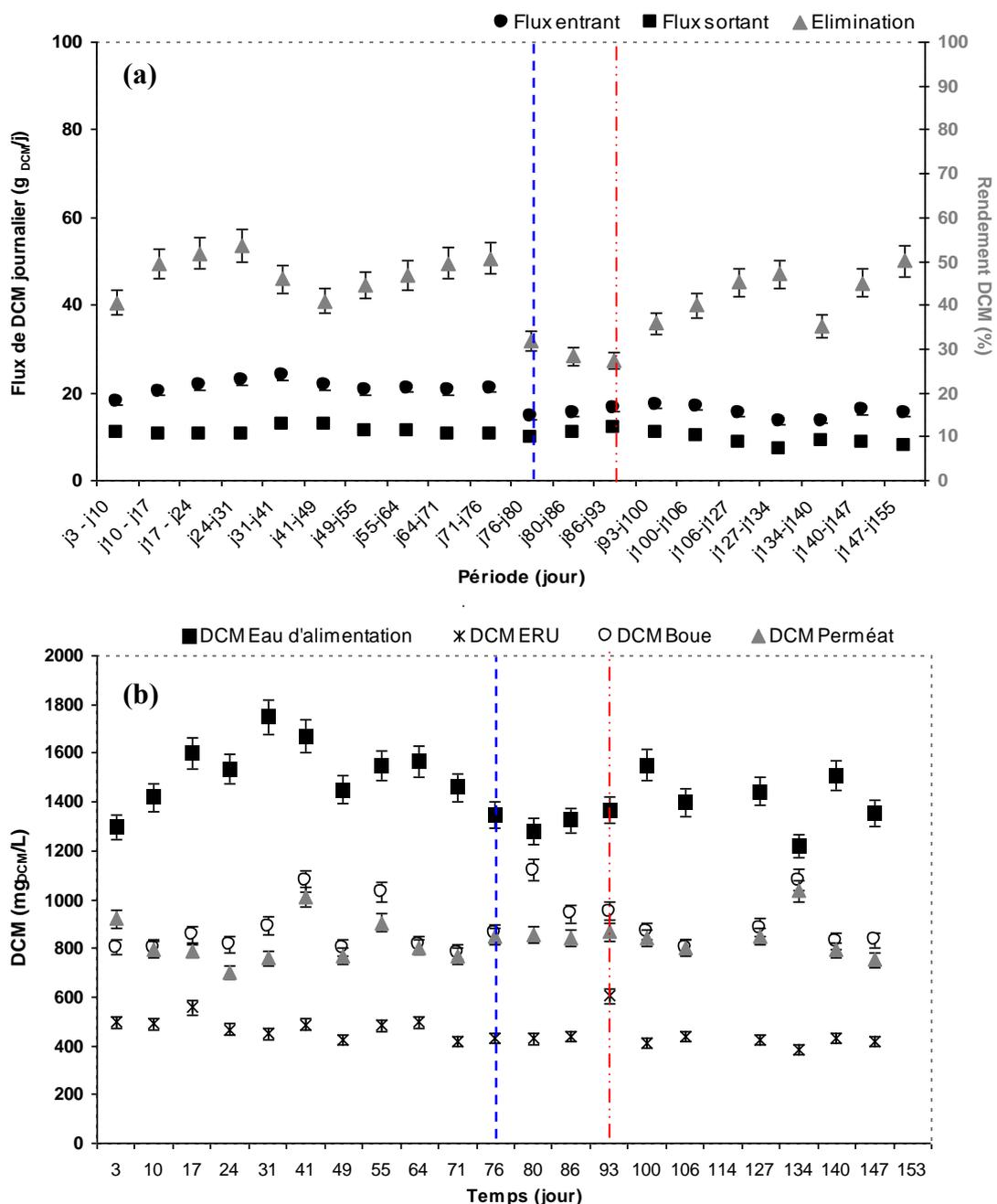


Figure IV-14 : Evolution des flux et de l'élimination de la DCM (a), et des concentrations en DCM dans les différentes matrices du pilote (b) durant la campagne

IV.3.1.4) Bilan sur le devenir des molécules anticancéreuses

L'élimination d'un cocktail contenant IFO, CP et TAM a donc été étudiée sur une période de 77 jours. Pour déterminer la contribution de chaque processus sur l'élimination d'IFO et de CP, un bilan matière sur les quantités (en μg) a donc été réalisé et s'écrit comme suit pour une période comprise entre t_j et t_{j+n} (n est un entier relatif > 1) :

<p>(E1) Quantité apportée dans l'alimentation entre t_j et t_{j+n}</p> <p>+ (E2) Quantité présente dans le pilote à t_j</p> <p>=</p> <p>+ (S1) Quantité sortante dans le perméat entre t_j et t_{j+n}</p> <p>+ (S2) Quantité sortante dans la purge entre t_j et t_{j+n}</p> <p>+ (NE1) Quantité sorbée sur la boue dans le pilote à t_{j+n}</p> <p>+ (NE2) Quantité présente dans la phase aqueuse dans le pilote à t_{j+n}</p> <p>+ (NE3) Quantité retenue par la membrane à t_{j+n}</p> <p>+ (ENB) Quantité perdue par pertes abiotiques entre t_j et t_{j+n}</p> <p>+ (EB) Quantité éliminée par biodégradation entre t_j et t_{j+n}</p>	<p>}</p> <p>}</p> <p>}</p> <p>}</p> <p>}</p> <p>}</p>	<p>Quantité entrante E</p> <p>Quantité sortante S</p> <p>Quantité non éliminée NE</p> <p>Quantité éliminée par voie non biologique ENB</p> <p>Quantité éliminée par voie biologique EB</p>
--	---	--

D'après les résultats de la thèse de Delgado (2009), la quantité retenue par la membrane peut être considérée comme négligeable. Des essais en boucle fermée avec de l'eau du robinet dopée en molécules anticancéreuses ($C = 5 \mu\text{g/L}$) ont montré des pertes abiotiques de 7 % pour CP et 5 % pour IFO dans le pilote en 48 h. Ces pertes ont été considérées constantes sur toute la campagne. L'apport de molécules ciblées par l'ERU est négligeable. Les équations sont :

$$(E1) = \frac{(C_j^{\text{cocktail}} + C_{j+n}^{\text{cocktail}})}{2} \cdot \frac{(Q_j^{\text{cocktail}} + Q_{j+n}^{\text{cocktail}})}{2} \cdot (t_{j+n} - t_j) \quad (\text{Eq. IV-13})$$

$$(E2) = (C_j^{\text{solide}} \cdot MES_j + C_j^{\text{aqueuse}}) \cdot V_{\text{pilote}} \quad (\text{Eq. IV-14})$$

$$(S1) = \frac{(C_j^{\text{perméat}} + C_{j+n}^{\text{perméat}})}{2} \cdot \frac{(Q_j^{\text{perméat}} + Q_{j+n}^{\text{perméat}})}{2} \cdot (t_{j+n} - t_j) \quad (\text{Eq. IV-15})$$

$$(S2) = \left(\frac{C_j^{\text{solide}} + C_{j+n}^{\text{solide}}}{2} \cdot \frac{MES_j + MES_{j+n}}{2} + \frac{C_j^{\text{aqueuse}} + C_{j+n}^{\text{aqueuse}}}{2} \right) \cdot V_{\text{purge}} \cdot (t_{j+n} - t_j) \quad (\text{Eq. IV-16})$$

$$(NE1) = C_{j+n}^{\text{solide}} \cdot MES_{j+n} \cdot V_{\text{pilote}} \quad (\text{Eq. IV-17})$$

$$(NE2) = C_{j+n}^{\text{aqueuse}} \cdot V_{\text{pilote}} \quad (\text{Eq. IV-18})$$

$$(ENB) = a \cdot (E1 + E2) \quad (\text{Eq. IV-19})$$

EB est déduit à partir du bilan matière. Par ailleurs et pour accéder à k_{biol} , on suppose que :

$$(EB) = k_{\text{biol}} \cdot \left(\frac{MVS_j + MVS_{j+n}}{2} \right) \cdot \left(\frac{C_j^{\text{aqueuse}} + C_{j+n}^{\text{aqueuse}}}{2} \right) \cdot V_{\text{pilote}} \cdot (t_{j+n} - t_j) \quad (\text{Eq. IV-20})$$

où $C_j^{cocktail}$ et $C_{j+n}^{cocktail}$ désignent la concentration dans le cocktail aux temps t_j et t_{j+n} (en $\mu\text{g/L}$)

$Q_j^{cocktail}$ et $Q_{j+n}^{cocktail}$ désignent le débit de la pompe délivrant le cocktail aux temps t_j et t_{j+n} (en L/j)

$C_j^{perméat}$ et $C_{j+n}^{perméat}$ désignent la concentration dans le perméat aux temps t_j et t_{j+n} (en $\mu\text{g/L}$)

$Q_j^{perméat}$ et $Q_{j+n}^{perméat}$ désignent le débit de perméat aux temps t_j et t_{j+n} (en L/j)

$C_j^{aqueuse}$ et $C_{j+n}^{aqueuse}$ désignent la concentration en phase aqueuse des boues aux temps t_j et t_{j+n} (en $\mu\text{g/L}$)

C_j^{solide} et C_{j+n}^{solide} désignent la concentration en phase solide des boues aux temps t_j et t_{j+n} (en $\mu\text{g/g}_{MES}$)

V_{pilote} et V_{purge} désignent le volume du pilote (20 L) et le volume quotidien de la purge (1 L/j)

MES_j et MES_{j+n} désignent les concentrations en MES aux temps t_j et t_{j+n} (en g_{MES}/L)

MVS_j et MVS_{j+n} désignent les concentrations en MVS aux temps t_j et t_{j+n} (en g_{MVS}/L)

a désigne la fraction éliminée par perte abiotique (entre 0 et 1)

k_{biol} désigne la constante cinétique de biodégradation (en $\text{L/g}_{MVS.j}$)

Des problèmes expérimentaux sur IFO ne nous ont pas permis d'effectuer des bilans matière cohérents (e.g quantité biodégradée > 100 %) et le profil des mécanismes d'élimination ne sera pas présenté. Nous discuterons donc uniquement la distribution observée pour CP.

Caractérisation du devenir du CP dans le pilote

La Figure IV-15 présente l'évolution de la distribution du CP suivant les différents flux du BAME au cours de la campagne de contamination. Les concentrations en CP aux bornes du système sont données sur l'Annexe O. Un exemple de calcul est détaillé sur l'Annexe P.

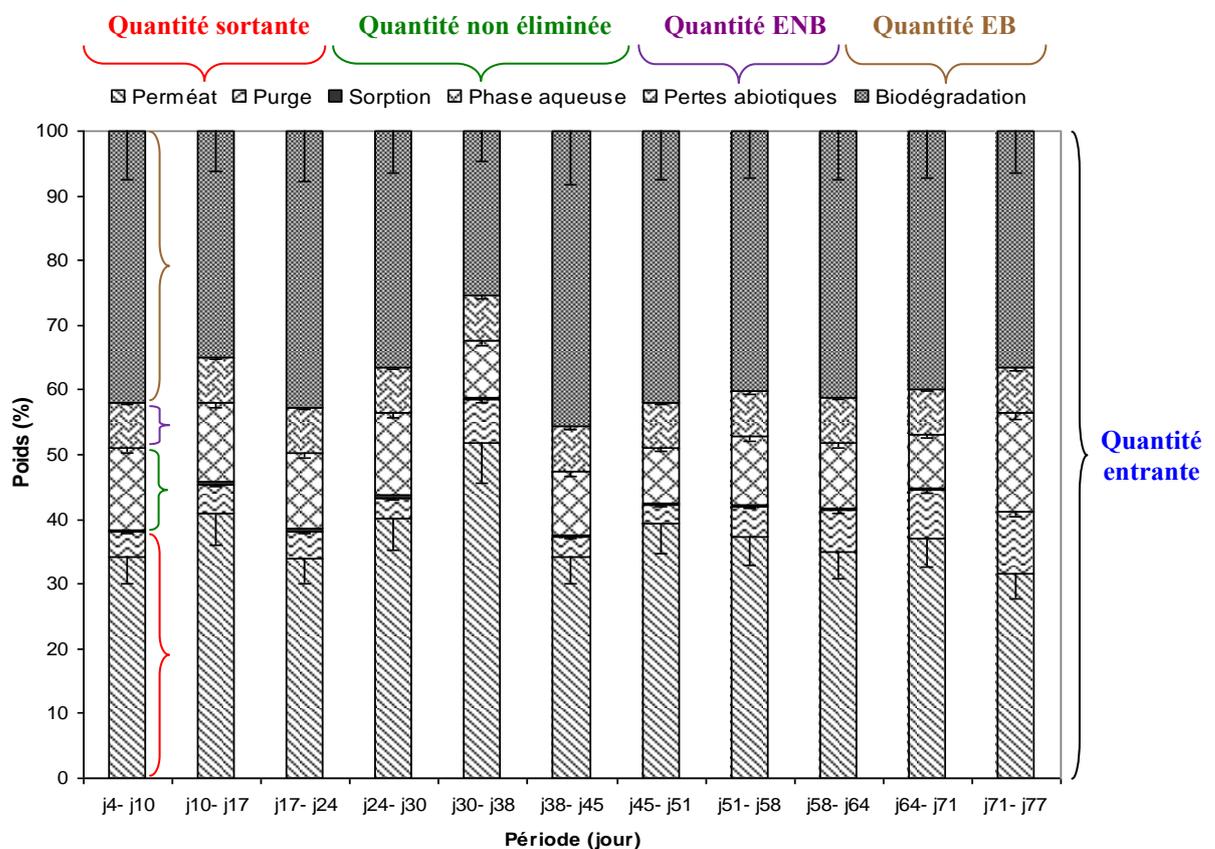


Figure IV-15 : Evolution de la distribution de CP entre les différents flux du BAME au cours de la campagne de contamination

Ce profil indique qu'en moyenne, $38 \pm 6 \%$ de la quantité de CP « entrante » se retrouve dans le perméat. En considérant une approche boîte noire, un taux d'élimination apparent de près 60 % est donc observé sur toute la campagne. Ce premier résultat permet de dire que (i) le BAME participe à la réduction des flux de CP contrairement aux BA et (ii) ce taux d'élimination est un peu plus faible que celui observé par Delgado (2009) sur le même pilote (Tableau IV-2). Il est important de préciser que les conditions appliquées entre ces deux travaux ne sont pas rigoureusement les mêmes (inoculum de départ, nature du substrat, âge de boues...) et peuvent expliquer ces différences. Ce résultat caractérise néanmoins la difficulté d'obtenir des taux d'élimination reproductibles dans le BAME et ce, indépendamment des conditions opératoires appliquées. L'approche boîte blanche permet de voir que parmi ces 60 % d'élimination, $5 \pm 2 \%$ sont attribuables à la purge, $11 \pm 2 \%$ à la quantité restante en phase aqueuse dans le pilote et $7 \pm 1 \%$ supposés attribuables aux pertes abiotiques. **Les deux mécanismes que sont la sorption et la biodégradation se partagent donc $39 \pm 5 \%$ de l'élimination totale.** Il apparaît que la sorption du CP sur la boue est négligeable dans le pilote ($0,2 \pm 0,1 \%$), ce qui est cohérent avec les tendances trouvées dans le chapitre III. Ainsi, la **biodégradation du CP compte pour $39 \pm 5 \%$** de l'élimination de cette molécule. Ce résultat est en accord avec les hypothèses de Delgado (2009) qui avait également suggéré que la biodégradation était le principal mécanisme à l'origine de l'élimination. Malgré les difficultés de gestion précédemment évoquées, il est intéressant de noter que le profil évolue peu et peut traduire dans un sens la robustesse du BAME. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que (i) l'élimination n'en demeure pas moins partielle et (ii) le degré de biodégradation n'est pas connu et ne permet pas de savoir si le BAME est en fin de compte efficace dans l'élimination de cette molécule. Les prochaines parties seront à présent orientées sur les interactions de sorption, de biodégradation et avec la matière colloïdale et dissoute pour approfondir ces observations.

IV.3.2) Caractérisation des interactions de sorption

IV.3.2.1) Détail sur les comportements de sorption dans le pilote

L'évolution de la distribution d'IFO et CP dans la boue du pilote est présentée sur la Figure IV-16. Les résultats au-delà du jour 58 ne sont pas disponibles pour IFO en raison d'un problème lors de l'extraction depuis la phase aqueuse des boues. Les températures des prélèvements sont également renseignées mais ne sont que des valeurs ponctuelles : l'amplitude sur une journée est d'environ 5 °C. L'arrêt de la campagne micropolluant est caractérisé par le trait vertical vert et épais.

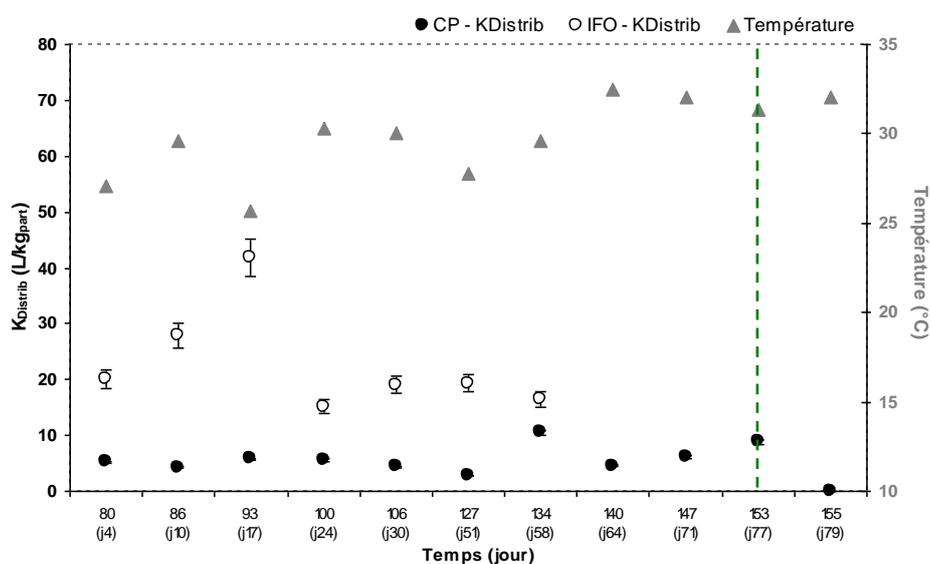


Figure IV-16 : Evolution des $K_{Distrib}$ pour IFO et CP dans la boue du pilote

Bien que nous ayons conscience de l'influence de la température sur les équilibres, les faibles variations observées ne justifient pas ici la nécessité de ramener les $K_{Distrib}$ à une température de référence. Sur l'ensemble de la campagne de contamination, les $K_{Distrib}$ d'IFO et CP ont donc peu évolué, ce qui peut signifier que (i) les caractéristiques physico-chimiques de la matrice ont elles aussi peu évolué ou (ii) les modifications éventuelles n'ont pas influencé de manière significative les comportements de sorption. Ce résultat pourrait compléter les conclusions du chapitre III où il n'a pas été possible de lier sorption et caractéristiques des boues. IFO présente néanmoins des $K_{Distrib}$ légèrement plus élevés que pour CP, mais il est évident que la sorption sur les boues reste un mécanisme très minoritaire. De plus, il est intéressant d'observer le comportement de CP après arrêt du dopage. Il n'a pas été possible de calculer de $K_{Distrib}$. L'évolution des concentrations dans la boue (Figure IV-17) montre que deux jours après arrêt du dopage, la concentration de CP en phase aqueuse a grandement diminué (lessivage) et qu'on ne le quantifie plus dans la phase solide. Ainsi, il apparaît que CP est très largement désorbé et confirme le peu d'affinité pour le solide. La désorption est ici effectuée au maximum en 48 heures.

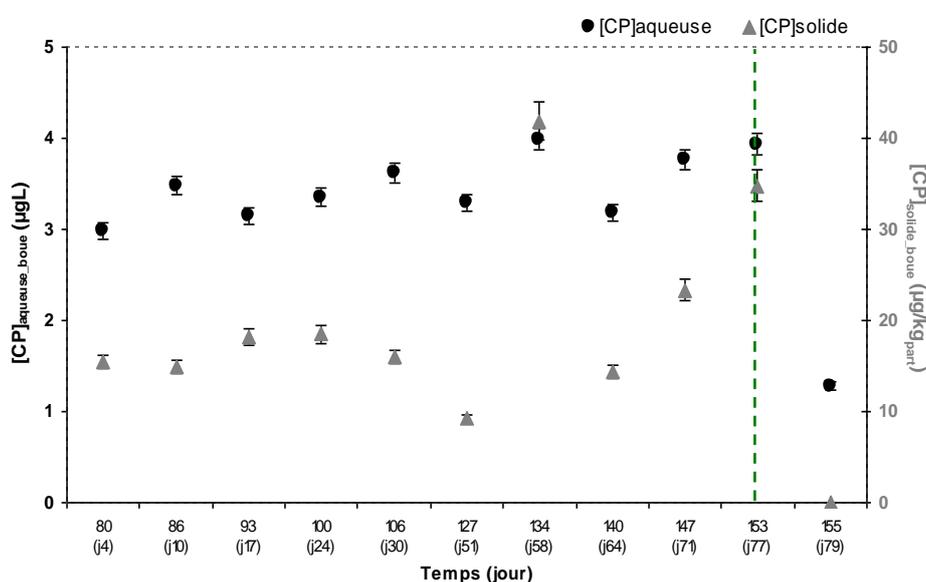


Figure IV-17 : Evolution des concentrations en CP dans les deux phases de boues

IV.3.2.2) Etude thermodynamique : physisorption ou chimisorption

IV.3.2.2.a) Vérification des bilans matière

Les quantités présentes entre l'instant initial q_0 et en fin d'expérience q_f ont été comparées suivant l'équation III-32 de la partie III.3.4.1 (chapitre III). Le Tableau IV-12 renseigne les bilans obtenus pour les deux molécules et à différentes températures.

Tableau IV-12 : Vérification du bouclage du bilan matière pour la sorption d'IFO et CP sur la boue de BAME non contaminée à différentes températures

Niveau Boue	Bilan matière (%) – Ifosfamide					Bilan matière (%) – Cyclophosphamide				
	1	2	3	4	Moy ± σ	1	2	3	4	Moy ± σ
BAME_26 °C	-	88	84	85	86 ± 2	-	73	69	72	71 ± 2
BAME_29 °C	-	93	-	95	94 ± 1	-	12	-	17	15 ± 4
BAME_32 °C	-	92	-	95	94 ± 2	-	4	-	11	8 ± 5
BAME_35 °C	-	94	107	91	97 ± 9	-	3	4	8	5 ± 3

- : phase solide non dosée ; Moy ± σ : moyenne ± écart-type

Ces résultats montrent que les taux de recouvrement pour IFO sont bons et dans l'ensemble supérieurs à 90 %, alors que ceux pour CP diminuent graduellement et sont parfois médiocres. Ce comportement pourrait être dû à (i) un problème de stabilité de la molécule au fur et à mesure de l'augmentation de la température ou (ii) un problème analytique lors des étapes d'extraction et/ou d'analyse. La première raison semble peu convaincante puisque la température de dégradation du CP est de 90 °C (Annexe A). Comme nous avons démontré que CP se sorbait très peu sur la phase solide des boues, un problème analytique lors de la prise en charge de la phase aqueuse est sans doute la meilleure explication. Par conséquent, les résultats obtenus pour CP ne seront pas exploités. Pour cette molécule, l'expérience doit être reconduite.

IV.3.2.2.b) Identification de la nature de la sorption d'IFO sur les boues

Stratégie de détermination des coefficients de distribution

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que réaliser le tracé des isothermes à partir de la seule mesure en phase aqueuse n'était pas pertinent, même avec un bilan bouclé à plus de 90 %. Or, nous ne disposons que de 2 voire 3 mesures sur la phase solide, pour 4 niveaux de concentration. Avec si peu de points, le tracé d'isotherme a été abandonné. Connaissant les concentrations exactes dans les phases aqueuse et solide pour certains niveaux, il a été décidé de calculer le $K_{Distrib}$ pour ces niveaux et d'en extraire un $K_{Distrib}$ moyen par température. Les coefficients de distribution sont indiqués dans le Tableau IV-13.

Tableau IV-13 : Coefficients de distribution calculés pour certains niveaux de dopage et à différentes concentrations – cas d'IFO pour la boue de BAME

Niveau	Coefficients de distribution (L/kg _{part}) – Ifosfamide				$K_{Distrib}$ moyen (L/kg _{part})
	1	2	3	4	
Niveau visé	1 µg/L	2,5 µg/L	4 µg/L	5,5 µg/L	
Niveau dopé	0,29 µg/L	0,73 µg/L	1,16 µg/L	1,60 µg/L	
BAME_26 °C	-	58	56	55	56 ± 2
BAME_29 °C	-	52	-	57	54 ± 3
BAME_32 °C	-	51	-	52	52 ± 1
BAME_35 °C	-	50	47 ± 2	51	49 ± 2

Ces quelques résultats montrent que le $K_{Distrib}$ moyen est peu variable à une température donnée. Ainsi, on peut supposer que nous étions dans la région linéaire (apparente) de l'isotherme. Cette hypothèse est confortée par l'intervalle restreint des concentrations étudiées. On peut donc penser que les mesures aux autres niveaux de dopage n'auraient pas apporté d'information supplémentaire. Par ailleurs, le $K_{Distrib}$ moyen décroît au fur et à mesure que la température augmente, ce qui est cohérent avec les comportements décrits dans la littérature (Zhao *et al.*, 2008 ; Feng *et al.*, 2010). Même si les variations sont faibles, la tendance est validée par une ANOVA (p-value = 0,02 ; les $K_{Distrib}$ sont significativement différents). Elle peut donc être exploitée.

Calcul des variations d'enthalpie et d'entropie lors de la sorption d'IFO

A partir des différentes valeurs de $K_{Distrib}$ obtenues pour les 4 températures, il est possible d'accéder aux variations d'enthalpie et d'entropie. Ces différents paramètres sont liés par la relation suivante (équation IV-21) :

$$\ln K_{Distrib} = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Eq. (IV-21)}$$

où $\ln K_{Distrib}$ est le logarithme népérien de $K_{Distrib}$ (en L/kg_{part}), R la constante des gaz parfaits (8,314 J/mol.K), T la température (en K), ΔH la variation d'enthalpie (en J/mol) et ΔS la variation

d'entropie (en J/mol.K). Ainsi, en traçant $\ln K_{\text{Distrib}}$ en fonction de $(1/T)$, on obtient une droite de pente $(-\Delta H/R)$ et d'ordonnée à l'origine $(\Delta S/R)$, et permet de déterminer facilement les valeurs de ΔH et ΔS . La Figure IV-18 représente l'évolution de $\ln K_{\text{Distrib}}$ pour IFO en fonction de $(1/T)$.

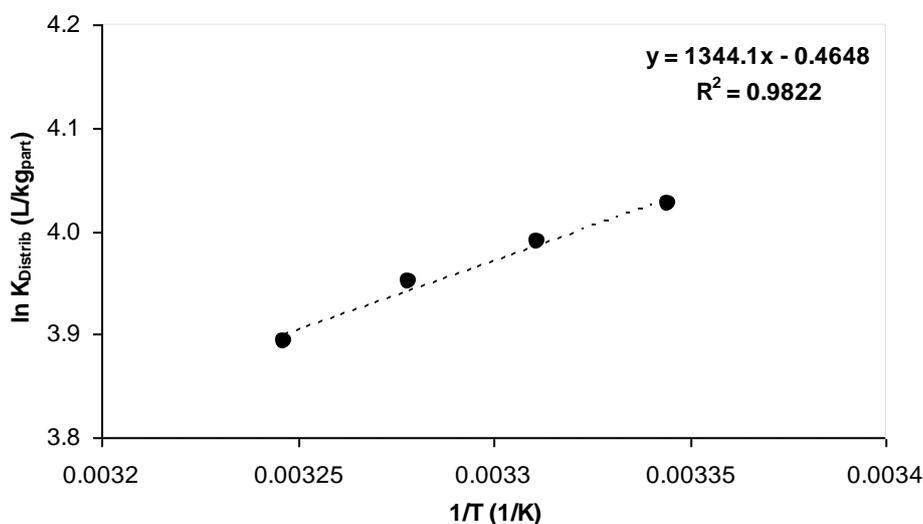


Figure IV-18 : Evolution de $\ln K_{\text{Distrib}}$ en fonction de $1/T$

La relation entre $\ln K_{\text{Distrib}}$ pour IFO et $(1/T)$ est donc bien linéaire ($R^2 > 0,98$) et l'équation de la régression est renseignée sur le graphique. **On en déduit que ΔH vaut environ - 11 kJ/mol et ΔS vaut environ - 4 J/mol.** La sorption d'IFO sur la boue de BAME est donc un **processus exothermique** ($\Delta H < 0$). D'après les considérations thermodynamiques développées dans la partie III.1.4.2) du chapitre III, on peut dire que la sorption d'IFO est de **nature physique** ($5 < \Delta H < 20$ kJ/mol). Il n'est toutefois pas possible de donner de précisions concernant le type de force(s) engagée(s), même si par analogie avec les interactions décrites lors de l'extraction SPE (chapitre II) on pourrait penser qu'elles sont de type Van der Waals. Les variations d'entropie sont très faibles. Sachant que l'entropie est souvent reliée au « désordre moléculaire », on pourrait en déduire que la sorption d'IFO sur la boue génère peu de « désordre », sans préciser si les variations sont dues à un possible réarrangement des molécules autour d'IFO ou autour des sites de sorption. Dans ce contexte, la signification de l'entropie reste donc peu évidente. Par ailleurs, l'énergie libre de Gibbs ΔG a été calculée pour les températures de 26 et 35 °C d'après l'équation III-2 (partie III.1.4.2) et est de l'ordre de - 10 kJ/mol : la réaction de sorption d'IFO est donc **spontanée** ($\Delta G < 0$). La valeur négative est essentiellement expliquée par l'importance de la variation d'enthalpie devant la variation d'entropie. On rappelle que les paramètres thermodynamiques associés à la sorption ne dépendent pas des concentrations (Annamalai et Puri, 2002). Les conclusions trouvées sont donc extrapolables aux conditions dans le pilote. Même si nous ne disposons pas des résultats pour IFO dans le pilote, nous avons observé que la désorption de CP est un phénomène rapide et sans doute entièrement réversible (Figure IV-17). Sachant que la physisorption met en jeu des liaisons faibles et réversibles, on peut donc penser que (i) la sorption de CP est également du type physisorption et (ii) la désorption d'IFO peut aussi être rapide.

IV.3.2.3) Potentiel de sorption et désorption de matrices déjà contaminées

Comme nous disposons des résultats sur la phase solide uniquement pour 3 niveaux de dopage et pour la boue non dopée, la stratégie de calcul des équilibres de distribution est la même que celle développée dans la partie précédente : (i) évaluation des bilans matière et (ii) calculs des $K_{Distrib}$ pour les niveaux dont les deux phases ont été dosées. Les résultats pour IFO ne sont pas renseignés en raison d'un problème analytique non identifié à ce jour. Le [Tableau IV-14](#) indique les résultats des calculs de bilans matière et de $K_{Distrib}$ pour CP sur la boue contaminée.

Tableau IV-14 : Bilans matière et $K_{Distrib}$ pour CP sur la boue de BAME contaminée

Concentration additionnée ($\mu\text{g/L}$)		Bilan matière (%)	Concentration sorbée C_{solide} ($\mu\text{g/kg}_{part}$)	$K_{Distrib}$ (L/kg_{part})
Attendue	Dopée			
0	-	-	72	17
0,7	0,7	90	60	13
1,8	1,7	-	-	-
3,5	3,5	86 ± 1	143 ± 17	24 ± 4
7	7	-	-	-
14	14	88 ± 2	145 ± 18	20 ± 4
20	21	-	-	-

- : non déterminé

Les valeurs de $K_{Distrib}$ calculées ne sont pas significativement différentes ($p\text{-value} = 0,38$) et montrent que (i) l'isotherme linéaire (apparente) serait possible sur la zone étudiée et (ii) la boue contaminée serait capable de sorber du CP puisque la quantité sorbée C_{solide} augmente. Par ailleurs, le $K_{Distrib}$ n'évolue pas entre la boue brute et les échantillons dopés. Ainsi, l'hypothèse suivant laquelle la boue fraîchement produite en STEP est la seule disponible pour la sorption (chapitre III) n'apparaît pas entièrement vraie. Les conséquences sur l'estimation du pourcentage de CP éliminé par sorption en STEP ne sont pas évidentes et doivent être approfondies.

En parallèle, un rapide test de désorption a été mis au point. Six flacons ont d'abord été soumis à la procédure de sorption décrite dans la partie IV.2.2.2. A la fin de la période de sorption, chaque flacon a reçu un volume additionnel de 100 mL d'eau du robinet corrigée en conductivité (avec NaCl 2 M) puis a été agité dans les mêmes conditions opératoires que pour la sorption. A l'issue du test, les phases aqueuse et solide ont été mesurées pour les mêmes niveaux que ceux du [Tableau IV-14](#) de manière à calculer le $K_{Distrib}$. La [Figure IV-19](#) présente le test effectué.

Comme la désorption a probablement été influencée par la forte conductivité de l'eau de dilution, la proximité entre les $K_{Distrib}$ moyen obtenus en sorption ($20 \pm 5 \text{ L/kg}_{part}$) et en désorption ($13 \pm 4 \text{ L/kg}_{part}$) permet seulement d'affirmer que **la désorption est sans doute un processus très rapide, d'une durée comparable à celle de la sorption (quelques heures).**



Figure IV-19 : Principe des essais de désorption sur la boue contaminée

IV.3.3) Caractérisation des réponses de biodégradation

IV.3.3.1) Détail sur les comportements de biodégradation dans le pilote

A partir des estimations des quantités de CP biodégradées et de l'équation IV-20 (partie IV.3.1.4), il a été possible de calculer une vitesse de consommation de micropolluant par unité de bactéries $r_{\text{spécifiqueCP}}$ (en $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{MVS}}\cdot\text{j}$), une vitesse de consommation par unité de volume $r_{\text{volumiqueCP}}$ ($\mu\text{g}/\text{L}\cdot\text{j}$), ainsi qu'une constante cinétique k_{biol} ($\text{L}/\text{g}_{\text{MVS}}\cdot\text{j}$) pour chaque période. La Figure IV-20 présente l'évolution de ces différents paramètres pour CP dans le temps.

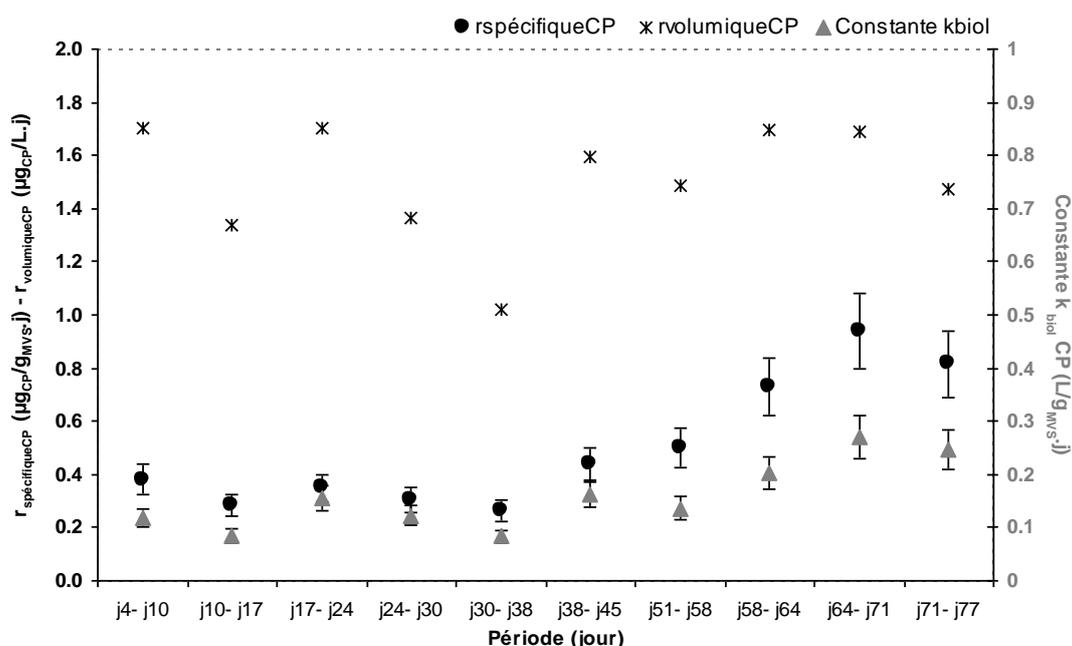


Figure IV-20 : Evolution des vitesses d'élimination de CP dans le pilote

On observe que $r_{\text{volumiqueCP}}$ évolue très peu sur l'intégralité de la campagne ($1,5 \pm 0,2 \mu\text{g}_{\text{CP}}/\text{L}\cdot\text{j}$), ce qui est cohérent avec le pourcentage d'élimination constant attribué à la biodégradation. Il est intéressant de noter que l'on mesure une activité dès la première période, ce qui signifie que la biomasse possédait déjà les enzymes nécessaires à la biodégradation. Cela pourrait notamment être expliqué par une éventuelle acclimatation (i) aux concentrations présentes dans l'eau usée avant dopage (LOD – LOQ) ou (ii) à d'autres micropolluants de structure physico-chimique proche. D'un autre côté, on observe que $r_{\text{spécifiqueCP}}$ évolue graduellement à partir de la période j38-j45 et ce jusqu'à la fin de la campagne. Le fait qu'on ne perde pas le potentiel de biodégradation dans le pilote et que $r_{\text{spécifiqueCP}}$ augmente suggère que les bactéries présentes ont intensifié la biodégradation du CP, ce qui pourrait notamment être expliqué par (i) une augmentation de l'activité de biodégradation en raison de températures en moyenne plus hautes en fin de campagne (Figure IV-16), (ii) une capacité à mieux dégrader la molécule en raison d'une possible acclimatation au-delà de deux fois l'âge de boues (déjà suggéré par Delgado, 2009), (iii) une disponibilité en substrat (micropolluant et/ou autre substrat) plus importante par unité de biomasse. Ce 3^{ème} argument a été exploré en représentant l'évolution de $r_{\text{spécifiqueCP}}$ en fonction des charges massiques en DCO C_{mDCO} et en azote total C_{mN} . Le tracé est disponible sur la Figure IV-21. Il apparaît une relation linéaire ($r^2 \geq 0,90$) entre $r_{\text{spécifiqueCP}}$ et les charges massiques carbonées et azotées. Cette tendance indique qu'il existerait un lien entre les vitesses de dégradation du carbone/de l'azote et de CP. **Ainsi, la biodégradation de CP serait possiblement liée au métabolisme.** Nous ne sommes toutefois pas en mesure d'approfondir ce lien puisque nous ne disposons que de bilans d'élimination en carbone et azote entre l'entrée et la sortie du pilote et que nous ne connaissons pas le rôle de la membrane sur

ces flux. Il n'est donc pas possible d'accéder à la vitesse d'élimination de ces substrats. Par ailleurs, il n'est pas possible de dire si l'élimination est liée au seul métabolisme carboné, azoté ou les deux. De nombreux auteurs (Yi et Harper Jr., 2007 ; Forrez *et al.*, 2011 ; Fernandez-Fontaina *et al.*, 2012) pointent le rôle joué par l'enzyme AMO dans la dégradation simultanée des ammoniums et des micropolluants et reste ici à explorer. Quoi qu'il en soit, il paraîtrait donc intéressant de travailler avec des charges massiques relativement élevées pour favoriser la biodégradation et améliorer l'efficacité du procédé. Toutefois, il ne faudrait pas que celle-ci soit limitée par un ou plusieurs autre(s) mécanisme(s), notamment la nature du substrat ou la biodisponibilité du micropolluant.

En parallèle, la constante cinétique de biodégradation k_{biol} (Figure IV-20) évolue entre 0,08 et 0,27 L/g_{MVS}.j, pour une valeur moyenne de $0,16 \pm 0,06$ L/g_{MVS}.j. Ce résultat rejoint les estimations faites par Delgado (2009) lors de ses essais : 0,11 et 0,18 L/g_{MVS}.j. Malgré les différences expérimentales appliquées entre cette étude et celles de la thèse de Delgado (2009), il est intéressant de constater que l'ordre de grandeur est respecté. Ainsi, **on pourrait considérer que CP est caractérisé par une constante de biodégradation en BAME d'environ 0,1 à 0,3 L/g_{MVS}.j**. D'après la classification réalisée par Joss *et al.* (2006), le CP serait donc un composé peu biodégradé lors du traitement des eaux usées, pourvu que cette constante soit extrapolable à tout procédé et condition opératoire appliquée.

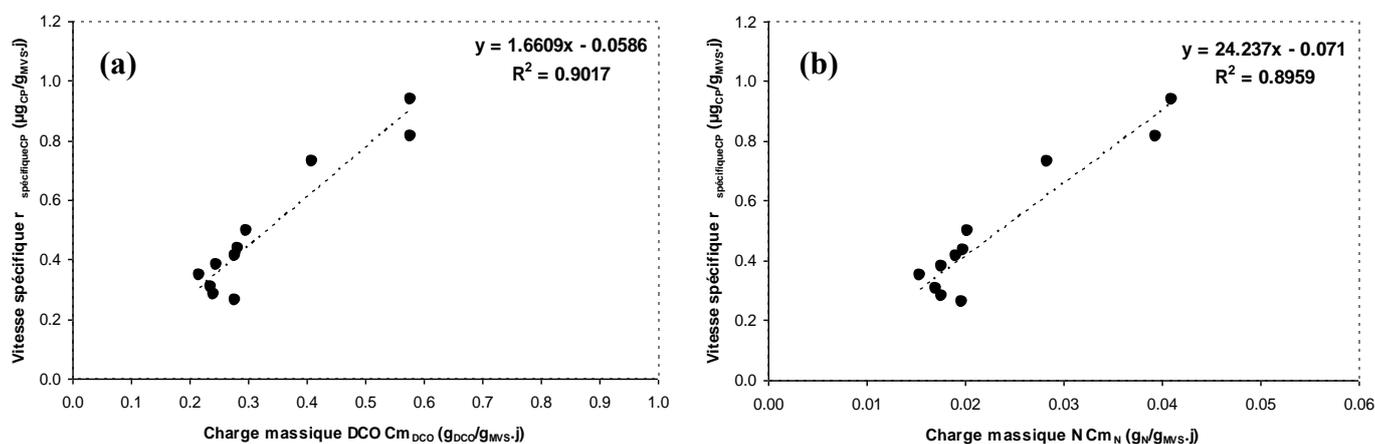


Figure IV-21 : Evolution de la vitesse spécifique de dégradation du CP en fonction de la charge massique en DCO (a) et en azote (b)

IV.3.3.2) Réponse à une injection « pulse » sans co-substrat

La réponse de biodégradation suite à une injection « pulse » sans co-substrat est présentée pour IFO et CP sur la Figure IV-22. Elle renseigne l'évolution dans le temps de la quantité en micropolluant dans le réacteur (Q) par rapport à la quantité initiale mesurée (Q_0), de même que les concentrations en phase aqueuse et solide dans la boue. Que ce soit pour IFO ou CP, on remarque que le rapport Q/Q_0 n'évolue pas dans le temps et signifie que l'activité de biodégradation est négligeable sur l'intervalle étudié. **Ainsi, la biodégradation d'IFO et CP ne semble être possible que par des interactions cométaboliques et ce, même quand la boue est supposée acclimatée au polluant.** Un métabolisme direct ne peut être exclu mais, s'il existe, doit s'opérer à une vitesse très lente et peu intéressante dans le contexte du traitement des eaux usées. En prolongeant le test, cette hypothèse aurait pu être confirmée.

Les profils de concentration montrent que la concentration en phase aqueuse n'évolue pas ou peu, alors que la concentration en phase solide augmente sensiblement entre 0 et 2 h puis reste stable au-delà. La mise en place d'un nouvel équilibre de sorption explique ce comportement. Par ailleurs, il apparaît que l'équilibre est atteint au bout de 2 heures : la cinétique de sorption serait donc plus

rapide que celles observées dans le chapitre III. On se rappelle avoir identifié une cinétique de sorption plus rapide lorsque la molécule était injectée en cocktail plutôt que seule. La présence d'IFO et CP dans la boue contaminée avant essai pourrait ici expliquer ce comportement par un effet de concentration au voisinage du solide. Des $K_{Distrib}$ moyens de 58 et 18 L/kg_{part} ont été calculés pour IFO et CP pour un temps de contact de 4 heures. Ces valeurs sont comparables avec celles mesurées lors des essais de sorption réalisés dans les flacons à centrifuger (CP : [Tableau IV-14](#)). Ainsi, la sorption ne semble pas être impactée par l'échelle étudiée et l'estimation de la distribution de micropolluants dans les boues par des essais à l'échelle paillasse peut être considérée satisfaisante.

Suite à l'injection « pulse », les mesures de respirométrie n'ont pas montré d'augmentation significative de la consommation d'oxygène, ici assimilée à la respiration endogène. Cette réponse peut notamment venir du fait que la biomasse était déjà acclimatée aux polluants et n'a pas eu besoin de dépenser une énergie supplémentaire face à ce nouvel ajout de toxiques (*i.e* besoins de maintenance stables). La respiration exogène n'a pas été étudiée.

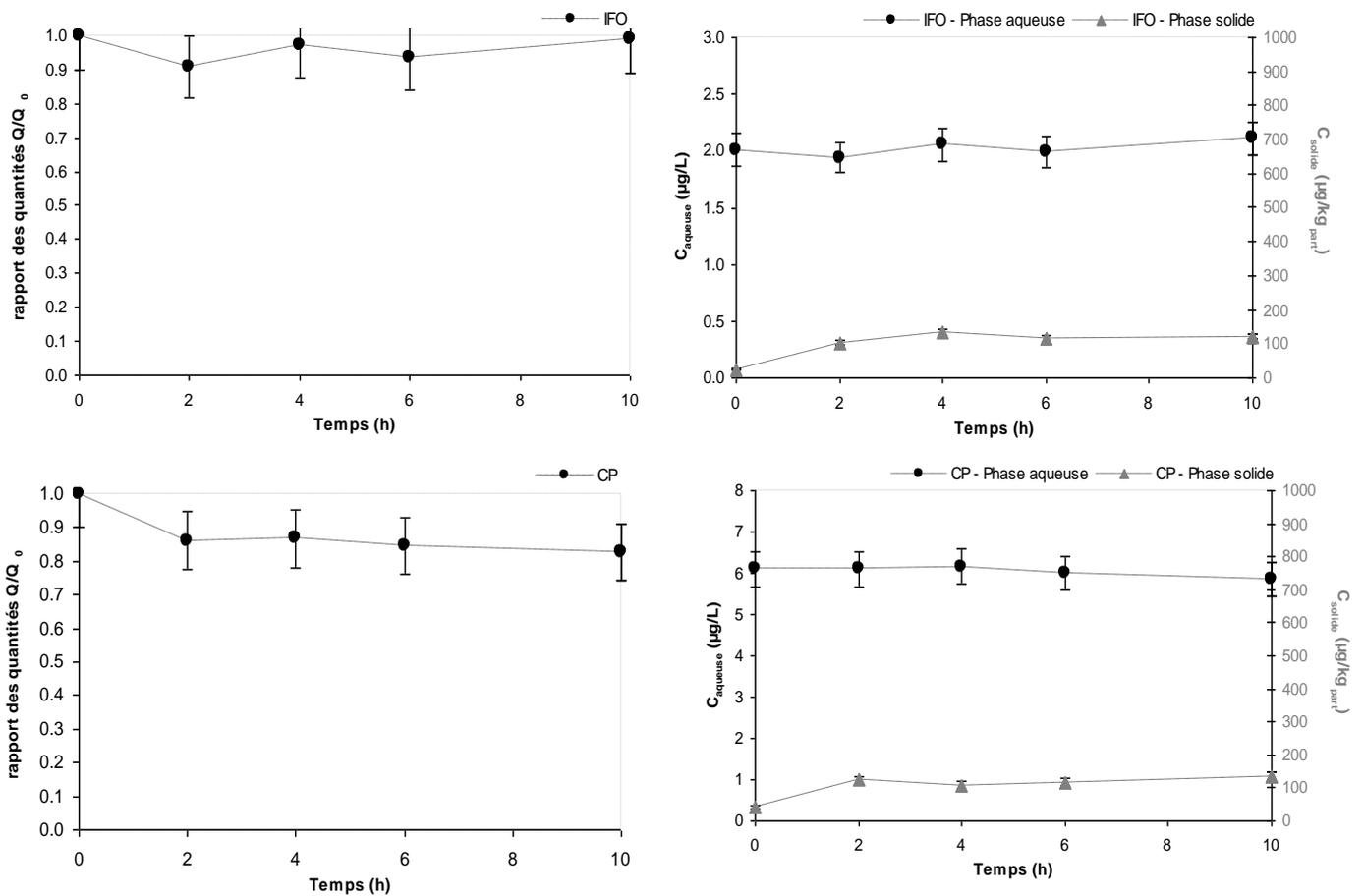


Figure IV-22 : Evolution du rapport des quantités Q/Q_0 (gauche) et des concentrations en phase aqueuse et solide (droite) dans le temps pour IFO et CP en absence de co-substrat

IV.3.3.3) Réponse à une injection « pulse » avec co-substrat

Trois jours après arrêt de la phase de contamination, une injection « pulse » de micropolluants a été réalisée dans le pilote et suivie pendant 10 heures. A partir des mesures de concentrations aux différentes bornes du pilote, il a été possible d'évaluer la quantité éliminée par biodégradation. Le procédé fonctionnant en continu, le système d'équation (bilan matière) donné dans la partie IV.3.1.3 a été utilisé et a permis de déduire $q_{\text{biodég.}}$. L'évolution des bilans est renseignée pour IFO et CP dans le [Tableau IV-15](#). Les quantités indiquées (notées q) sont exprimées en μg .

Tableau IV-15 : Evolution des bilans lors de l'essai de biodégradation dans le pilote

Temps (h)	Ifosfamide – IFO						Cyclophosphamide – CP						
	q_{entrant}	$q_{\text{sorbée}}$	q_{aqueuse}	$q_{\text{abiotique}}$	$q_{\text{perméat}}$	$q_{\text{biodég.}}$	q_{entrant}	$q_{\text{sorbée}}$	q_{aqueuse}	$q_{\text{abiotique}}$	$q_{\text{perméat}}$	$q_{\text{biodég.}}$	
0 – 2	10,6	1,57	8,33	~ 0	0,3	0,4	31,2	1,2	28,4	0,1	0,6	0,9	
2 – 4	9,9	1,30	8,67	~ 0	0,35	- 0,4	29,6	1,2	27,2	0,1	0,7	0,4	
4 – 6	9,9	0,86	9,39	~ 0	0,4	-0,7	28,3	1,4	24,3	0,1	0,8	1,8	
6 – 10	10,6	0,98	8,56	~ 0	0,9	0,2	25,7	0,94	17,2	0,2	1,7	5,66	
						$\Sigma q_{\text{biodégradée}} (\mu\text{g})$						$\Sigma q_{\text{biodégradée}} (\mu\text{g})$	$8,8 \pm 1,2$

q_{entrant} : quantité totale présente en entrée de système (en μg) ; $q_{\text{sorbée}}$: quantité sorbée sur la boue (en μg) ; q_{aqueuse} : quantité présente dans la phase aqueuse (en μg) ; $q_{\text{abiotique}}$: quantité perdue par pertes abiotiques (en μg) ; $q_{\text{perméat}}$: quantité sortante dans le perméat (en μg) ; $q_{\text{biodég.}}$: quantité éliminée par biodégradation (en μg).

Il apparaît qu'IFO n'est absolument pas dégradé sur toute la durée du test, contrairement au CP qui a subi une élimination par biodégradation d'environ $28 \pm 4 \%$ par rapport à la quantité initiale. Une durée de suivi plus longue aurait peut-être permis de caractériser une tendance à la biodégradation pour IFO puisqu'une phase de latence avant dégradation est possible, comme cela a déjà été relayé dans la littérature ([Joss et al., 2006](#)). Alors que ces deux molécules possèdent des structures très proches, les aptitudes de biodégradation ne paraissent pas les mêmes et pourraient éventuellement être expliquées par la position des atomes de chlore ([Annexe A](#)). CP porte deux atomes de chlore en bout des deux chaînes alkyles alors qu'IFO possède un atome de chlore en bout de chaîne alkyle liée au cycle aromatique. La toxicité du chlore pour les bactéries est bien connue. Ainsi, on pourrait penser que la biodégradation d'IFO est plus difficile en raison d'une diminution des possibilités d'attaque au niveau du cycle aromatique. Il est toutefois nécessaire d'insister sur le fait que ce mécanisme est très hypothétique. **Quoi qu'il en soit, il n'est pas possible de donner des éléments de réponse concernant les moyens à mettre en œuvre pour intensifier l'élimination d'IFO.**

La [Figure IV-23](#) caractérise le comportement de biodégradation du CP en fonction du temps. Il y est présenté l'évolution de la quantité cumulée éliminée par biodégradation ($\Sigma q_{\text{biodég.}}$). En partant de l'équation IV-22 et en l'intégrant entre les bornes $t = 0$ et t , on aboutit à l'équation IV-23 qui permet d'accéder à la valeur de k_{biol} sur la durée du test :

$$\frac{dC_{\text{aqueuse}}}{dt} = -k_{\text{biol}} \cdot MVS \cdot C_{\text{aqueuse}} \quad \text{Eq. (IV-22)}$$

On pose $C_{\text{aqueuse}} = C_{\text{aqueuse}}^0 - \frac{1}{V_{\text{pilote}}} \cdot \int_0^t q_{\text{biodég.}}$ qui correspond à la diminution de concentration dans la phase aqueuse uniquement due à la biodégradation dans le pilote. L'intégration de cette équation donne :

$$\ln\left(\frac{C_{\text{aqueuse}}^t}{C_{\text{aqueuse}}^0}\right) = \ln\left(1 - \frac{\Sigma q_{\text{biodég}}^t}{C_{\text{aqueuse}}^0 \cdot V_{\text{pilote}}}\right) = k_{\text{biol}} \cdot MVS \cdot t \quad \text{Eq. (IV-23)}$$

où V_{pilote} représente le volume du pilote, C_0 la concentration dans la phase aqueuse du pilote juste après le dopage ($\mu\text{g/L}$). k_{biol} est extrait à partir de la pente de la régression linéaire (renseignée sur la Figure IV-23).

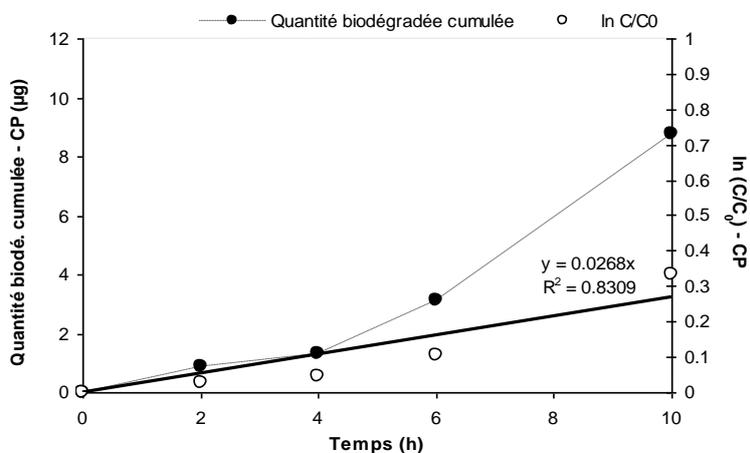


Figure IV-23 : Evolution de la biodégradation pour CP dans le pilote

L'évolution de la fraction cumulée éliminée par biodégradation montre que la biodégradation est progressive et sensiblement plus lente en début qu'en fin de test, ce qui peut être attribué à une courte phase de latence avant consommation. D'après la régression linéaire effectuée, la constante de biodégradation k_{biol} du test est estimée à $0,015 \text{ L/g}_{\text{MVS}}\cdot\text{h}$ soit $0,36 \pm 0,05 \text{ L/g}_{\text{MVS}}\cdot\text{j}$. Cette valeur de k_{biol} est légèrement supérieure à celles calculées dans le pilote mais du même ordre de grandeur. Il est par ailleurs nécessaire de préciser que la température lors de cet essai était d'environ $32 \text{ }^\circ\text{C}$ contre une température moyenne de $29 \text{ }^\circ\text{C}$ dans le pilote. Cette valeur est donc probablement plus faible et cohérente avec les estimations dans le pilote.

Parallèlement à ces essais, les flux de DCO et d'azote éliminés par biodégradation ont été évalués en dosant les concentrations en entrée et dans la phase aqueuse de la boue. Le flux de DCO éliminée par biodégradation était de $18,5 \pm 0,5 \text{ g}_{\text{DCO}}/\text{j}$ et celui de l'azote était de $1,3 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{N}}/\text{j}$: les vitesses spécifiques sont de $0,51 \pm 0,05 \text{ g}_{\text{DCO}}/\text{g}_{\text{MVS}}\cdot\text{j}$ et $0,036 \pm 0,002 \text{ g}_{\text{N}}/\text{g}_{\text{MVS}}\cdot\text{j}$. La vitesse spécifique de biodégradation $r_{\text{spécifique}}$ du CP dans ce test a été évaluée à environ $0,59 \pm 0,08 \mu\text{g}_{\text{CP}}/\text{g}_{\text{MVS}}\cdot\text{j}$. **Le ratio de ces vitesses permet d'obtenir des informations concernant la stœchiométrie de la réaction entre CP et le(s) co-substrat(s). On obtient : $1,2 \pm 0,2 \mu\text{g}_{\text{CP}}/\text{g}_{\text{DCO}}$ et $16,2 \pm 2,7 \mu\text{g}_{\text{CP}}/\text{g}_{\text{N}}$.** En retravaillant les résultats du travail de thèse de [Delgado \(2009\)](#), on retrouve sensiblement ces valeurs ($1,4 \mu\text{g}_{\text{CP}}/\text{g}_{\text{DCO}}$ et $17,5 \mu\text{g}_{\text{CP}}/\text{g}_{\text{N}}$) qui pourraient ainsi servir de référence. La valeur obtenue pour l'azote total est dans l'ordre de grandeur de celles calculées par [Fernandez-Fontaina et al. \(2012\)](#) pour certains produits pharmaceutiques dégradés par une boue activée nitrifiante ($35,4$ à $94,2 \mu\text{g}_{\text{micropolluant}}/\text{g}_{\text{N}}$).

Nous avons voulu vérifier si la stœchiométrie pouvait avoir limité la biodégradation dans le pilote. A l'arrêt de la phase de contamination, la quantité de CP contenue dans le pilote était voisine de $80 \mu\text{g}$ (phases aqueuse et sorbée comprises). En conservant la valeur du flux quotidien de DCO éliminée, une quantité de 55 g de DCO a été éliminée en 3 jours, qui est la durée entre l'arrêt de la phase de contamination et la tenue du test. En considérant la stœchiométrie de la réaction, $63 \pm 9 \mu\text{g}$ de CP aurait dû être éliminé⁸, ce qui revient à dire que le CP aurait dû être quantifié à hauteur de $17 \pm 9 \mu\text{g}$ dans le pilote juste avant le test. Une quantité de près de $18 \mu\text{g}$ de CP dans le pilote a été mesurée. **D'après ce résultat, il semblerait donc que la stœchiométrie de la réaction (*i.e***

⁸ Le même résultat a été trouvé en raisonnement sur les flux biodégradés en azote

cométabolisme) soit le facteur limitant dans la biodégradation. La constante de biodégradation k_{biol} du paragraphe précédent ($0,36 \text{ L/g}_{\text{MVS}} \cdot \text{j}$) a été utilisée pour calculer si la limitation pourrait aussi être due à la cinétique. Sur la même période et en utilisant la relation IV-20⁹, 96 μg de CP auraient du être dégradés : CP n'aurait donc pas du être quantifié. Ainsi, ce résultat confirmerait que la limitation de la biodégradation du CP dans le pilote serait davantage justifiée par des raisons de stœchiométrie et non de cinétique.

On ne peut pas exclure que la stœchiométrie de la réaction puisse elle aussi être limitée par un autre facteur, notamment la fraction biodisponible en polluant. On dit d'un polluant qu'il est biodisponible lorsqu'il peut traverser la membrane cellulaire d'un organisme à un instant t (Semple *et al.*, 2004). Pour de nombreux auteurs et dans le contexte du traitement des eaux usées (quelques jours), cette fraction biodisponible est souvent assimilée à la fraction aqueuse du micropolluant (Artola-Garicano *et al.*, 2003 ; Urase et Kikuta, 2005 ; Joss *et al.*, 2006) puisque la concentration dans cette fraction est la seule à décroître. Nous avons donc décidé de représenter l'évolution des concentrations dans les différentes phases de boue lors du test pour valider ou non cette observation (Figure IV-24). Il apparaît que la concentration en CP en phase solide est plutôt constante alors que la concentration en phase aqueuse diminue progressivement. Ainsi, la fraction biodisponible pourrait être la phase aqueuse et rejoindrait l'hypothèse précédente. On remarque toutefois que la concentration totale (*i.e* concentrations en phases aqueuse et solide additionnées, en $\mu\text{g/L}$) diminue elle aussi et notamment parce que la molécule se sorbe très peu sur la boue et évolue peu sur la durée du test. **Ce comportement nous amène à penser que les deux phases de la boue pourraient être finalement biodisponibles.** Suivant ce raisonnement, on peut se poser des questions concernant les taux de dégradation dans chacune de ces fractions : (i) s'opèrent-ils à la même vitesse ?, (ii) est-ce qu'un de ces taux pourrait être limitant ?, (iii) ces taux sont-ils liés et peuvent-ils donc s'influencer ?, (iv) la biodégradation du CP dans ces fractions impliquent-elles les mêmes microorganismes et les mêmes vitesses ? Ces quelques interrogations découlent de la question posée en début de manuscrit (partie I.3.2) : **les mécanismes de sorption et biodégradation sont-ils liés ?** Il n'est pour le moment pas possible de donner des éléments de réponse. Dans de prochaines expériences, il sera donc nécessaire de faire au moins varier la fraction sorbée en CP sur la boue, de manière à induire des réponses de biodégradation éventuellement différentes. Rappelons que dans le contexte du traitement des eaux usées, il est apparemment très difficile d'obtenir des aptitudes de sorption variées pour CP et ce, malgré la diversité des boues étudiées. La mise en évidence de ce lien passera éventuellement par l'obtention d'une boue dont les caractéristiques physico-chimiques devront certainement être très différentes et malheureusement peu représentatives des boues activées. Par ailleurs et même si nous n'avons pas pu le mettre en évidence, le rôle de la matière colloïdale pourrait aussi être déterminant et devrait être considéré.

Sur la Figure IV-24, l'évolution de la concentration en phase aqueuse (et totale) mérite d'être détaillée. En effet, on remarque que la diminution est progressive et relativement linéaire. Ce comportement est peu rencontré dans les essais de biodégradation où les allures décrites sont plutôt du type exponentielle décroissante. Il est nécessaire de préciser que dans ces tests, le co-substrat est souvent ajouté en début d'essai et non de manière séquentielle comme dans notre cas. Dans ces essais, la charge massique diminue donc progressivement. En supposant que la relation cométabolique (i) soit valable quelle que soit la quantité de substrat et (ii) soit le facteur limitant la biodégradation, il est donc « logique » que la biodégradation du micropolluant soit très rapide au début puis s'atténue progressivement. Par conséquent, la manière d'alimenter le réacteur pourrait avoir une influence sur la biodégradation. Toutefois, le manque de points de cinétique limite l'observation. Il serait donc intéressant de reconduire ce test en comparant l'influence de la procédure d'alimentation en co-substrat (*e.g* spike vs progressif) sur les cinétiques.

⁹ Sur 3 jours, les valeurs moyennes sont : $\text{MVS} = 1,85 \text{ g}_{\text{MVS}}/\text{L}$ et $\text{C}_{\text{aqueuse}} = 2,4 \mu\text{g/L}$

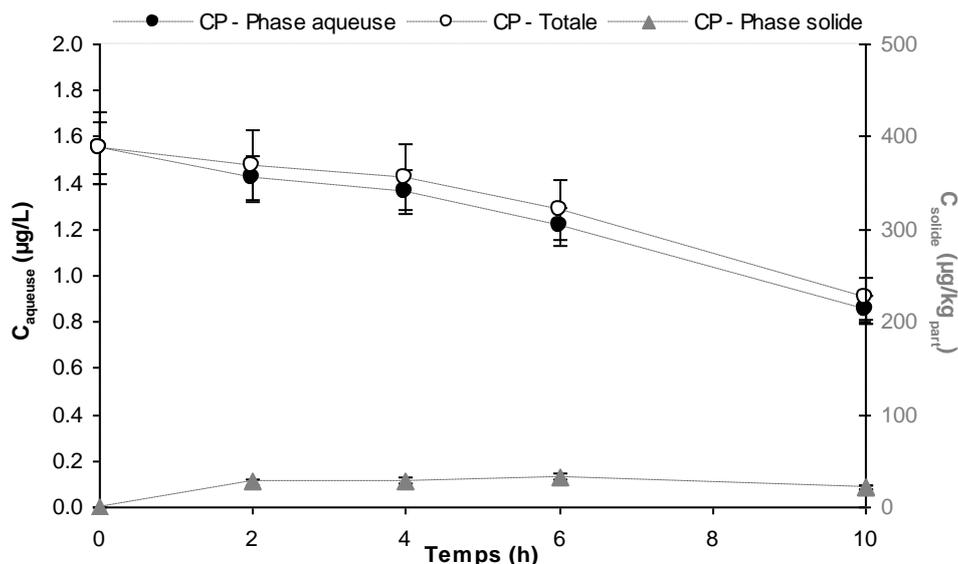


Figure IV-24 : Evolution des concentrations dans les différentes phases de la boue lors de l'essai de biodégradation du CP dans le pilote

IV.3.4) Compréhension des interactions « molécules anticancéreuses/matière colloïdale et dissoute »

IV.3.4.1) Evolution du comportement de sorption suivant les conditions opératoires

Le [Tableau IV-16](#) présente les résultats de sorption obtenus suite à la mesure des concentrations dans la phase solide et la phase aqueuse filtrée à 1,2 µm, pour chaque condition appliquée. On considère qu'à chaque fin de test, la boue est en condition d'équilibre de sorption, ce qui permet d'accéder à $K_{Distrib}$. Les concentrations initiales dans le réacteur C_{essai} et les bilans matière sont renseignés.

Tableau IV-16 : Caractérisation du comportement de sorption d'IFO et CP en fonction des conditions opératoires appliquées

Ifosfamide – IFO										
Condition	LGC BAME boue non contaminée					LGC BAME boue contaminée				
	C_{essai} (µg/L)	BM (%)	$C_{équilibre\ aqueuse}$ (µg/L)	$C_{équilibre\ solide}$ (µg/kg _{part})	$K_{Distrib}$ (L/kg _{part})	C_{essai} (µg/L)	BM (%)	$C_{équilibre\ aqueuse}$ (µg/L)	$C_{équilibre\ solide}$ (µg/kg _{part})	$K_{Distrib}$ (L/kg _{part})
T_0	-	-	-	-	-	-	-	3,52	58	16
T_{4h_ANX}	4,54	110	4,33	123	28	8,77	114	9,24	175	17
T_{4h_AER}	1,41	107	1,13	75	63	4,72	100	4,48	75	16
T_{48h_AER}	1,41	108	1,09	81	75	4,46	102	4,80	75	18
Cyclophosphamide – CP										
Condition	LGC BAME boue non contaminée					LGC BAME boue contaminée				
	C_{essai} (µg/L)	BM (%)	$C_{équilibre\ aqueuse}$ (µg/L)	$C_{équilibre\ solide}$ (µg/kg _{part})	$K_{Distrib}$ (L/kg _{part})	C_{essai} (µg/L)	BM (%)	$C_{équilibre\ aqueuse}$ (µg/L)	$C_{équilibre\ solide}$ (µg/kg _{part})	$K_{Distrib}$ (L/kg _{part})
T_0	-	-	-	-	-	-	-	5,17	21	4
T_{4h_ANX}	6,56	103	6,53	41	6	8,58	98	8,16	54	7
T_{4h_AER}	6,84	109	7,17	52	7	8,41	93	7,56	66	8
T_{24h_AER}	6,56	99	6,18	63	10	6,83	99	6,56	52	8

C_{essai} : concentration dans le réacteur au début de l'essai ; BM : bilan matière
ANX : anoxie ; AER : aérobie

Les bilans matière sont dans l'ensemble très satisfaisants et compris entre 93 et 114 %, et permettent de valider les observations.

Pour apprécier l'influence de la présence d'oxygène sur les équilibres de sorption, on compare les résultats obtenus entre les conditions T_{4h_Anoxie} et $T_{4h_Aérobie}$. Pour le CP et aussi bien dans le cas de la boue non contaminée comme contaminée, les $K_{Distrib}$ sont proches entre les deux conditions opératoires. De plus, les concentrations initiales de chacun de ces essais sont également très proches, ce qui permet de comparer rigoureusement les équilibres. Pour cette molécule, il semblerait que la présence d'oxygène n'affecte pas la distribution du polluant et que l'obtention d'un $K_{Distrib}$ sous une de ces conditions soit suffisante. Insistons cependant sur le fait que ce comportement n'est observé que pour une seule concentration et nécessiterait une confirmation pour d'autres concentrations. Pour IFO, le comportement est moins confirmé. Dans le cas de la boue non contaminée, les $K_{Distrib}$ sont différents (T_{4h_Anoxie} : 28 L/kg_{part} ; $T_{4h_Aérobie}$: 63 L/kg_{part}) et notamment parce que la concentration de départ est différente. Ce résultat rejoint l'idée que la distribution ne suit pas à un comportement linéaire aux concentrations étudiées. De plus, le fait que $K_{Distrib}$ soit plus grand pour $T_{4h_Aérobie}$, alors que la concentration de départ est plus faible que pour T_{4h_Anoxie} , va dans le sens d'une isotherme de Freundlich défavorable ($n > 1$) qui est un comportement que nous avons observé pour cette molécule et cette boue dans le chapitre III (partie III.3.4.2). Dans le cas de la boue contaminée, les $K_{Distrib}$ observés pour IFO sont équivalents, malgré des concentrations initiales différentes. Cette fois-ci, l'isotherme linéaire (apparente) pourrait être considérée valable sur le domaine étudié. D'après ces observations, **il semblerait que la distribution ne soit pas influencée par la présence d'oxygène** mais davantage par la nature de la boue et/ou de son degré de contamination.

La comparaison des temps $T_{4h_Aérobie}$ et $T_{24h\ ou\ 48h_Aérobie}$ montre que les $K_{Distrib}$ évoluent peu et ce quelles que soient la molécule et la condition appliquée. La présence d'oxygène, même prolongée, ne semble pas déterminante dans les équilibres de sorption.

IV.3.4.2) Répartition des micropolluants dans les différentes fractions de la phase aqueuse et lien avec les paramètres physico-chimiques

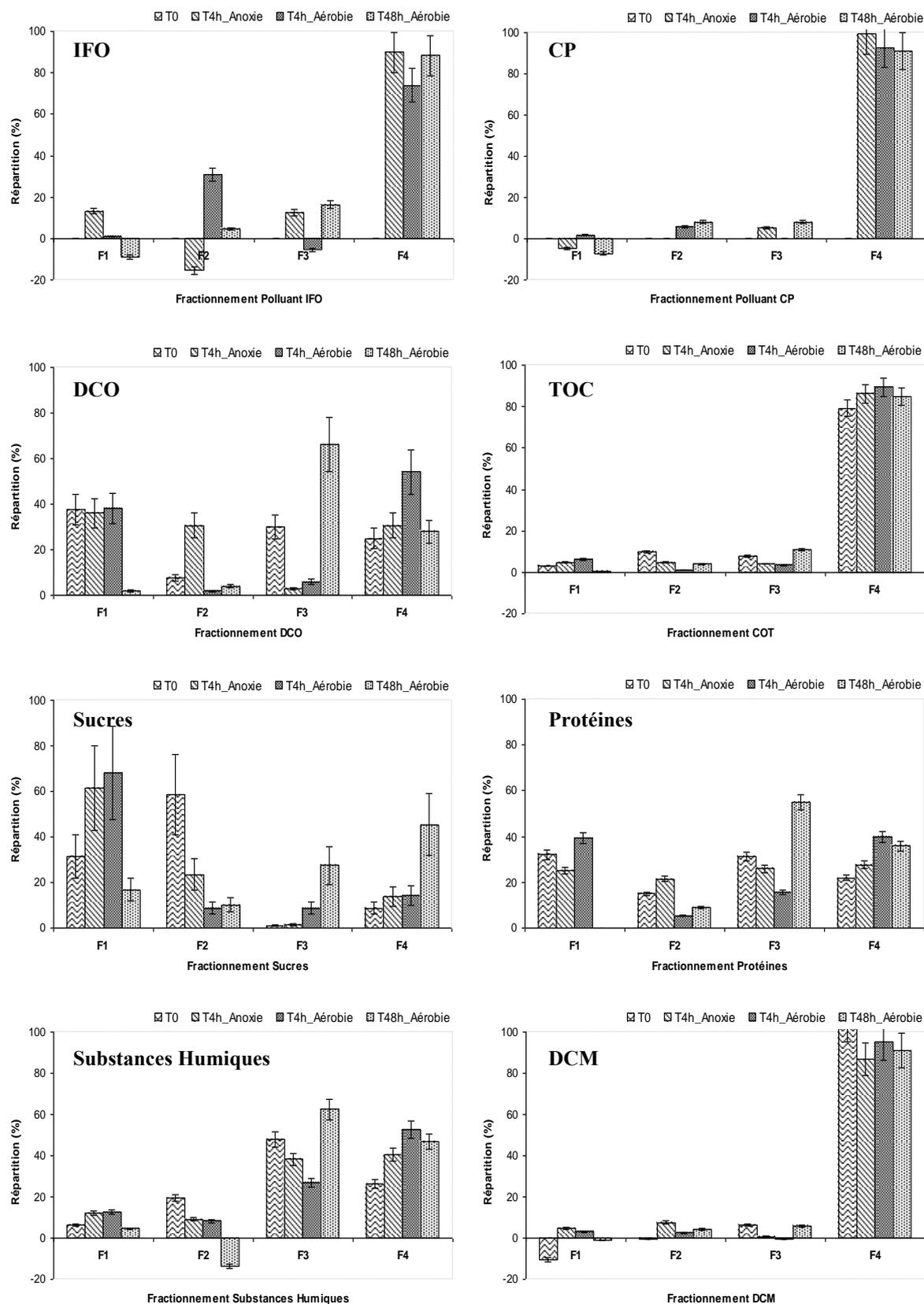
La répartition des micropolluants et des paramètres physico-chimiques suivant les différentes fractions est donnée sur la [Figure IV-25](#) pour la boue non contaminée et sur la [Figure IV-26](#) pour la boue contaminée. La méthodologie de calcul des fractions est expliquée dans le chapitre III (partie III.2.6.1.e). Les concentrations brutes sont disponibles en annexe ([Annexe Q](#)). La réflexion proposée est basée sur une analyse croisée des répartitions pour les deux boues.

D'après ces profils, on constate qu'IFO et CP se retrouvent presque exclusivement dans la fraction la plus ultrafiltrée ($F_4 < 1$ kDa) et ce, quelle que soit le type de boue considéré. De ce comportement, nous pouvons penser que (i) les caractéristiques de la phase aqueuse n'ont pas ou peu évolué sur toute la campagne ou (ii) les modifications ne sont pas assez importantes ou déterminantes pour entraîner un changement dans la spéciation d'IFO et de CP en phase aqueuse. Ce résultat est intéressant car il montre que ces polluants sont capables de passer très facilement la barrière membranaire du pilote (0,2 μ m) et par la même occasion, le rôle limité de la filtration dans les BAM sur ce point. L'utilisation de membranes de nanofiltration (1 nm \sim 1 kDa) comme moyen de rétention pourrait également ne pas être suffisant. Par ailleurs et pour chaque condition testée, la comparaison entre la concentration injectée en début d'essai et la concentration en micropolluant mesurée dans la fraction à 1,2 μ m (toutes deux renseignées sur l'[Annexe Q](#)) montre qu'IFO et CP ne sont pas biodégradés et confirme leur stabilité en absence de co-substrat.

En recherchant d'éventuelles corrélations entre la spéciation des micropolluants et celle des paramètres physico-chimiques, on observe que la présence d'IFO et CP en F_4 est fortement corrélée à celle du TOC et de la DCM. Cette tendance indique que la DCM présente dans le pilote est

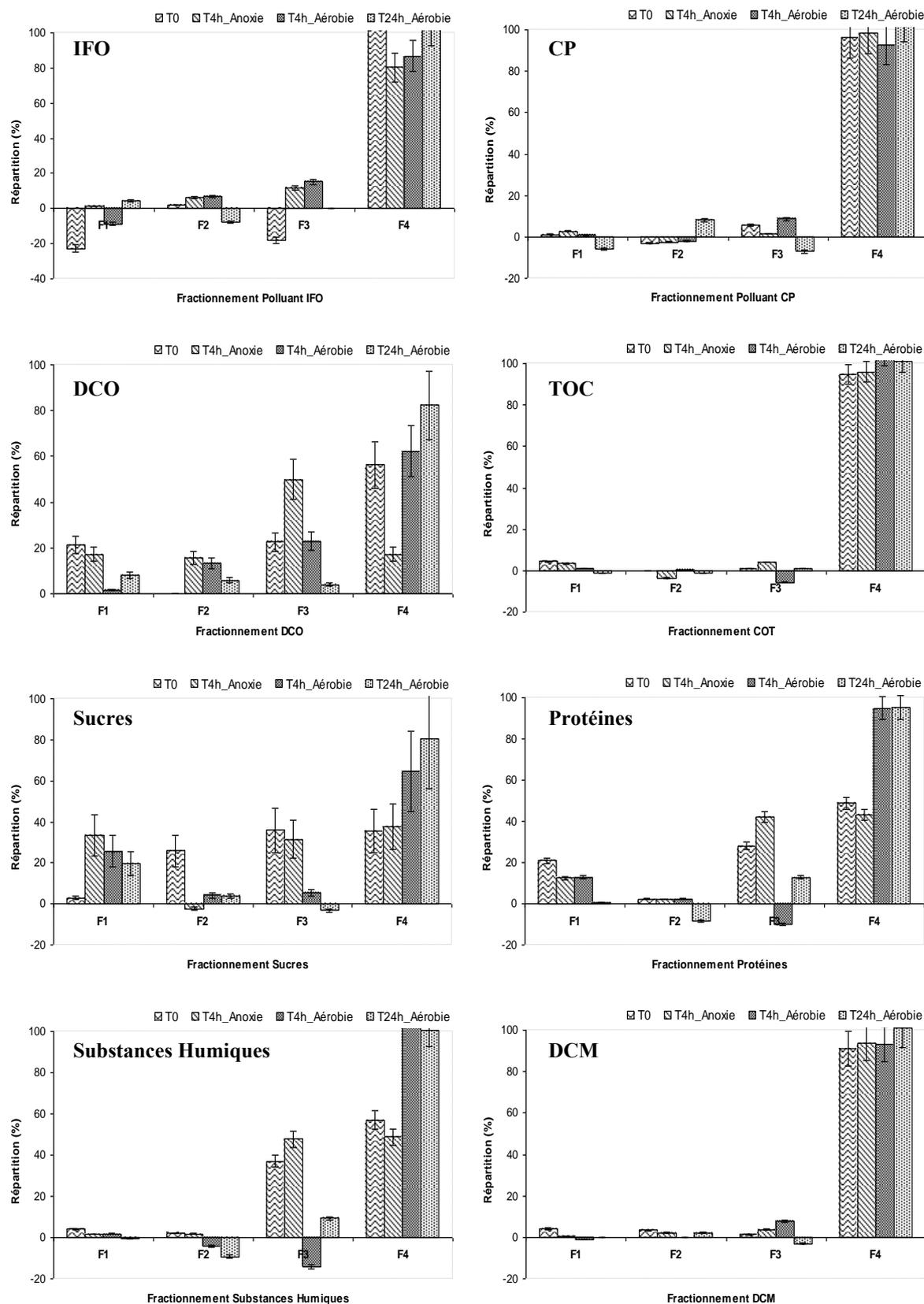
essentiellement dissoute ou de très petite taille, et de nature carbonée et organique. On peut alors se poser des questions concernant un lien entre ces matières et les polluants ciblées, sans pouvoir identifier précisément la nature de cette matière.

Elle pourrait cependant être caractérisée par les profils obtenus pour la DCO, les sucres, les protéines et les substances humiques. Pour la boue non contaminée (Figure IV-25), aucun de ces paramètres ne présentent un profil « purement F_4 », la plupart étant davantage équirépartis (DCO et protéines) ou concentrés sur les fractions de tailles plus importantes (sucres). On note la présence presque exclusive des substances humiques(-like) dans les fractions F_3 et F_4 qui caractérisent des molécules de taille < 10 kDa et < 1 kDa. Pour la boue contaminée (Figure IV-26), la plupart des profils montrent une prédominance des matières de petite taille (< 10 kDa et < 1 kDa). Ce comportement est particulièrement visible lors de l'application de conditions aérobies, pouvant traduire la dégradation de matières de grande taille vers des tailles plus petites, et rendue possible par la présence d'oxygène. Cette hypothèse semble vérifiée par le profil des concentrations (Annexe Q). Quoiqu'il en soit, on ne distingue pas de tendances pures qui pourraient être facilement reliées aux observations faites pour IFO et CP. On ne peut toutefois pas exclure qu'une répartition très faible dans F_4 soit en fait déterminante dans la spéciation d'IFO et CP. Dans l'ensemble, les méthodes de dosage appliquées sont probablement trop globales pour identifier précisément la nature des composés présents dans ces fractions et pouvant entrer en jeu avec la spéciation des molécules ciblées. Pour approfondir les observations, il est donc nécessaire d'avoir recours à des méthodes d'analyse plus fines et plus innovantes, notamment la fluorescence tridimensionnelle.



F₁ : 0,1 – 1,2 μm ; F₂ : 10 kDa – 0,1 μm ; F₃ : 1 – 10 kDa ; F₄ : < 1 kDa

Figure IV-25 : Répartition des polluants et des paramètres physico-chimiques suivant les différentes fractions pour la boue non contaminée



F₁ : 0,1 – 1,2 μm ; F₂ : 10 kDa – 0,1 μm ; F₃ : 1 – 10 kDa ; F₄ : < 1 kDa

Figure IV-26 : Répartition des polluants et des paramètres physico-chimiques suivant les différentes fractions pour la boue contaminée

IV.3.4.3) Exploitation des spectres de fluorescence tridimensionnelle

Les spectres présentés ont été acquis par l'ingénieure recrutée sur le projet BioMedBoue. Comme IFO et CP sont essentiellement retrouvés en phase aqueuse, seuls les spectres de cette fraction sont présentés. Dans les prochaines explications, chaque massif sera caractérisé par le couple ($\lambda_{em}/\lambda_{ex}$) où λ_{em} représente la longueur d'onde d'émission en abscisse (en nm) et λ_{ex} la longueur d'onde d'excitation en ordonnée (en nm).

IV.3.4.3.a) Image de la phase aqueuse de la boue non contaminée et non dopée (T_0)

La [Figure IV-27](#) présente les spectres obtenus pour chacune des fractions ultrafiltrées sur la boue du pilote non contaminée et non dopée en polluant. Ces différents spectres sont liés par « une relation » de la forme :

$$\begin{aligned} \text{Spectre}_{1,2\mu\text{m}} &= \text{Spectre}_{(F_1)} + \text{Spectre}_{(F_2)} + \text{Spectre}_{(F_3)} + \text{Spectre}_{(F_4)} \\ &= \text{Spectre}_{(0,1-1,2\mu\text{m})} + \text{Spectre}_{(10\text{ kDa}-0,1\mu\text{m})} + \text{Spectre}_{(1-10\text{kDa})} + \text{Spectre}_{(<1\text{ kDa})} \end{aligned}$$

Sur le spectre acquis à 1,2 μm , on identifie 3 massifs de tailles très importantes :

- (i) le massif A (340/220) qui correspond à la fluorescence des protéines aromatiques associée à la présence de tryptophane. [Bourven *et al.* \(2012\)](#) précisent que les protéines montrent souvent une fluorescence très importante dans cette région, ce qui se vérifie ici ;
- (ii) le massif B (340/280) qui correspond à la fluorescence des sous-produits protéiques de l'activité microbienne-like. [Villain \(2012\)](#) précise que ces composés contiennent notamment des acides aminés comme le tryptophane ou la tyrosine.
- (iii) le massif C (410/340) qui correspond à la fluorescence des substances humiques-like.

Les spectres F_1 (contenu du filtre « 0,1 à 1,2 μm ») et F_2 (contenu du filtre « 10 kDa – 0,1 μm ») sont uniquement caractérisés par deux massifs : les massifs A et B. On peut donc dire que les protéines aromatiques (associées au tryptophane) et les sous-produits protéiques de l'activité microbienne-like sont des composés de tailles importantes et comprises entre 10 kDa et 1,2 μm . **Il est toutefois important de préciser que cette remarque n'est uniquement valable que pour les composés avec des propriétés fluorescentes.** De plus, on remarque que la fraction F_1 a été diluée au vingtième et la fraction F_2 au dixième ([Figure IV-27](#)). Observant que les intensités de spectres sont équivalentes, on peut ainsi affirmer qu'il existe davantage de protéines aromatiques et de sous-produits protéiques d'une taille comprise entre 0,1 et 1,2 μm , plutôt qu'entre 10 kDa et 0,1 μm . Par comparaison des facteurs de dilution, ce rapport serait proche de 2.

Sur le spectre F_3 (contenu du filtre « 1 à 10 kDa »), on note l'existence de deux massifs dont l'un correspond au massif C. L'autre massif, noté D et au couple (440/270), est à la frontière entre la fluorescence des substances humiques- et fulviques-like. L'apparition de ce massif pourrait être expliquée en raison de sa faible intensité qui a certainement été « masquée » par celle des autres composés fluorescents sur le spectre à 1,2 μm . D'après ce spectre, on peut dire que la boue de BAME non contaminée contiendrait des espèces humiques- et peut-être fulviques-like d'une taille comprise entre 1 et 10 kDa.

Sur le spectre F_4 (fraction aqueuse < 1 kDa), on note l'existence de trois massifs de faibles intensités. On retrouverait à nouveau les massifs A et C mais les longueurs d'onde d'émission ne sont pas exactement les mêmes, ce qui pourrait venir (i) de la précision de lecture ou (ii) d'une réalité physique. En effet, [Barret \(2009\)](#) précise que des réarrangements tridimensionnels dans la structure de ces composés pourraient expliquer ces déplacements, les structures plus « lâches »

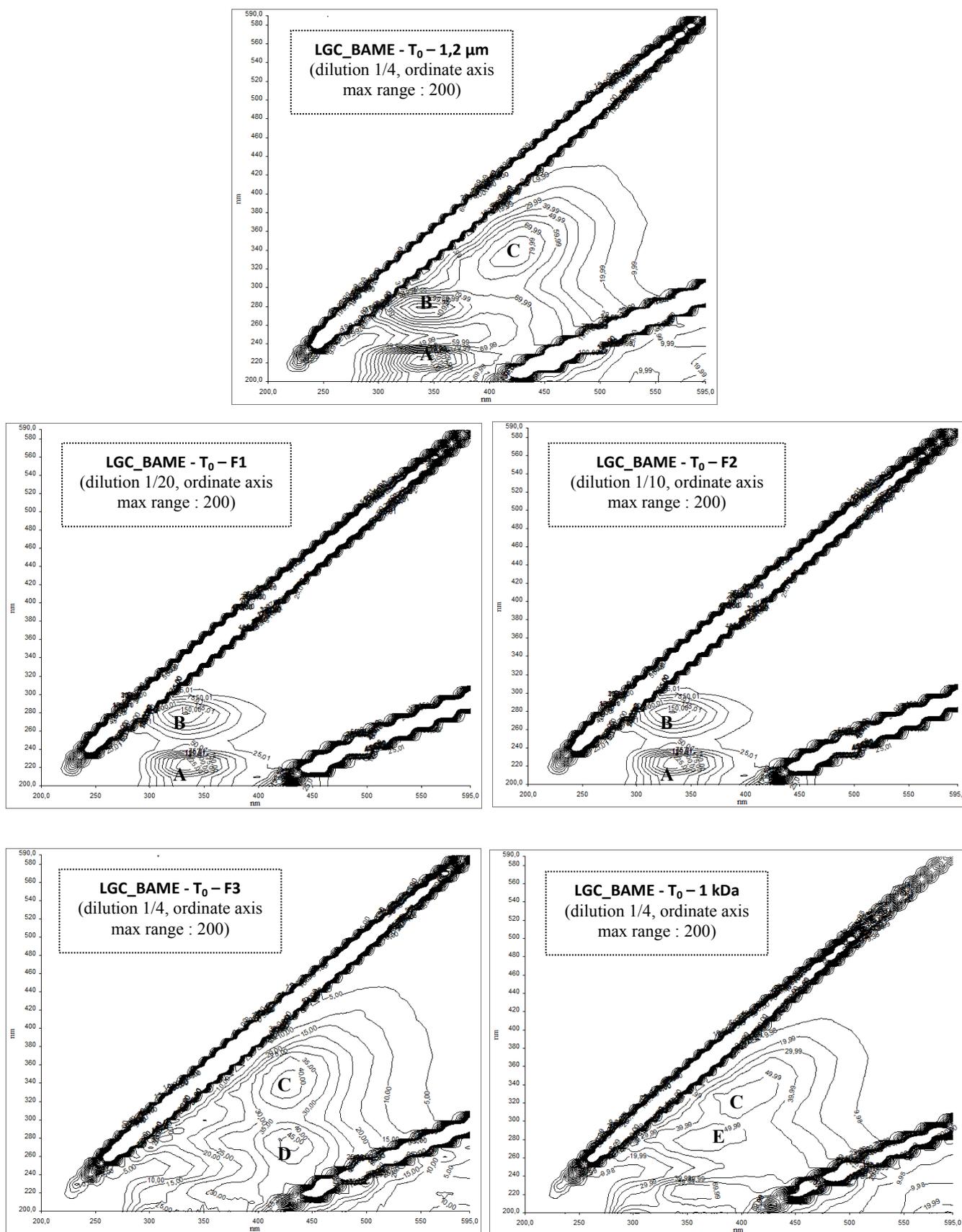
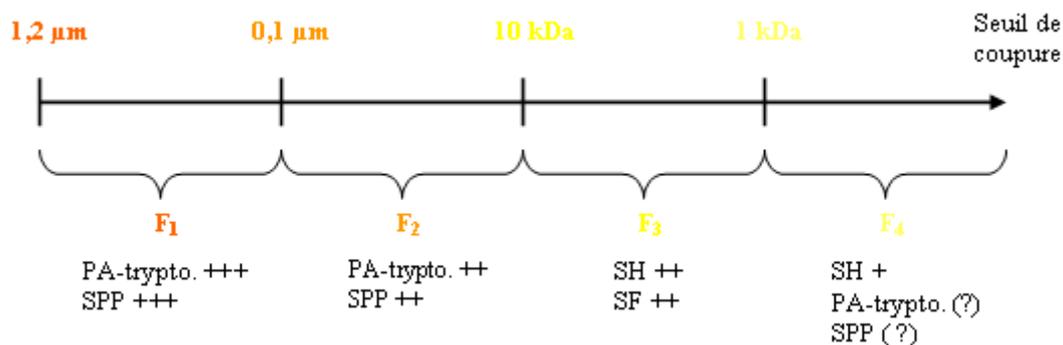


Figure IV-27 : Décomposition du profil d'ultrafractionnement de la phase aqueuse de la boue du pilote non contaminée par fluorescence tridimensionnelle

généralisant des longueurs d'onde d'émission plus courtes. On note l'apparition d'un massif, noté E au couple (370/280), dont la signification est peu évidente car à la frontière entre les sous-produits protéiques et les substances humiques-like. Ce massif est par ailleurs peu défini, ce qui pourrait expliquer l'incertitude sur sa signification. Ainsi, il apparaît que la boue contiendrait des protéines aromatiques et des substances humiques de petite taille.

Grâce à l'acquisition des différents spectres, on note la grande diversité des espèces fluorescentes présentes dans la phase aqueuse de la boue, que ce soit en caractéristique chimique ou en taille. De manière très qualitative, on peut donner la répartition suivante (Figure IV-28) :



PA-trypto. : protéines aromatiques (tryptophane) ; SPP : sous-produits protéiques ;
 SH : substances humiques-like ; SF : substances fulviques-like
 +++ : très présent ; ++ : moyennement présent ; + : peu présent

Figure IV-28 : Répartition qualitative des espèces fluorescentes dans la phase aqueuse de la boue du pilote non contaminée

Cette répartition a été comparée succinctement avec celle issue des dosages des protéines et substances humiques par la méthode de Lowry modifiée. La Figure IV-29 présente la répartition de ces substances suivant les différentes fractions.

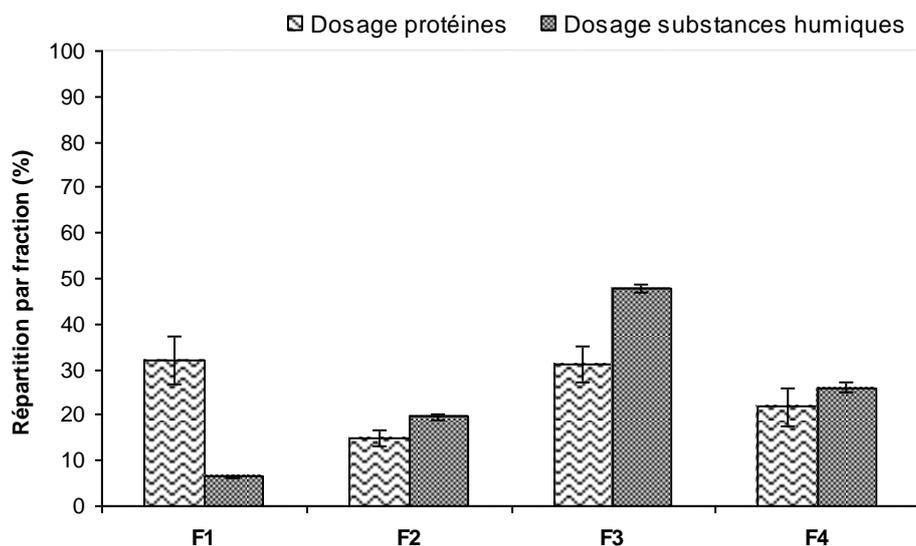


Figure IV-29 : Répartition quantitative des protéines et des substances humiques dans la phase aqueuse de la boue du pilote non contaminée

Les tendances observées entre les approches qualitatives et quantitatives sont plutôt cohérentes pour les substances humiques : on les retrouve principalement dans la fraction F₃ et en partie dans la fraction F₄. Le profil des protéines est plus discutable où on observe une fraction non négligeable

dans F₃, bien qu'elles n'aient pas été identifiées en fluorescence. Toutefois, il est nécessaire de rappeler que toutes les protéines ne sont pas nécessairement fluorescentes et que ces méthodes ne « dosent pas la même chose ». La méthode de Lowry est davantage basée sur la quantité de liaisons peptidiques alors que la mesure par fluorescence est basée sur les liaisons aromatiques (Barret, 2009). Ces deux méthodes ne peuvent pas se substituer l'une à l'autre et doivent être utilisées de manière complémentaire. Il pourrait par ailleurs être intéressant de développer l'aspect (semi-)quantitatif de la méthode par fluorescence pour explorer plus finement le lien entre ces deux méthodes.

IV.3.4.3.b) Comparaison des spectres de la fraction à 1,2 μm pour la boue non contaminée et les différentes conditions opératoires appliquées

Pour apprécier l'influence des différentes conditions opératoires appliquées (*i.e* anoxie, aérobie...), on dispose des spectres de fluorescence sur la fraction à 1,2 μm et ce, pour la boue non contaminée. Les spectres sont présentés sur la Figure IV-30.

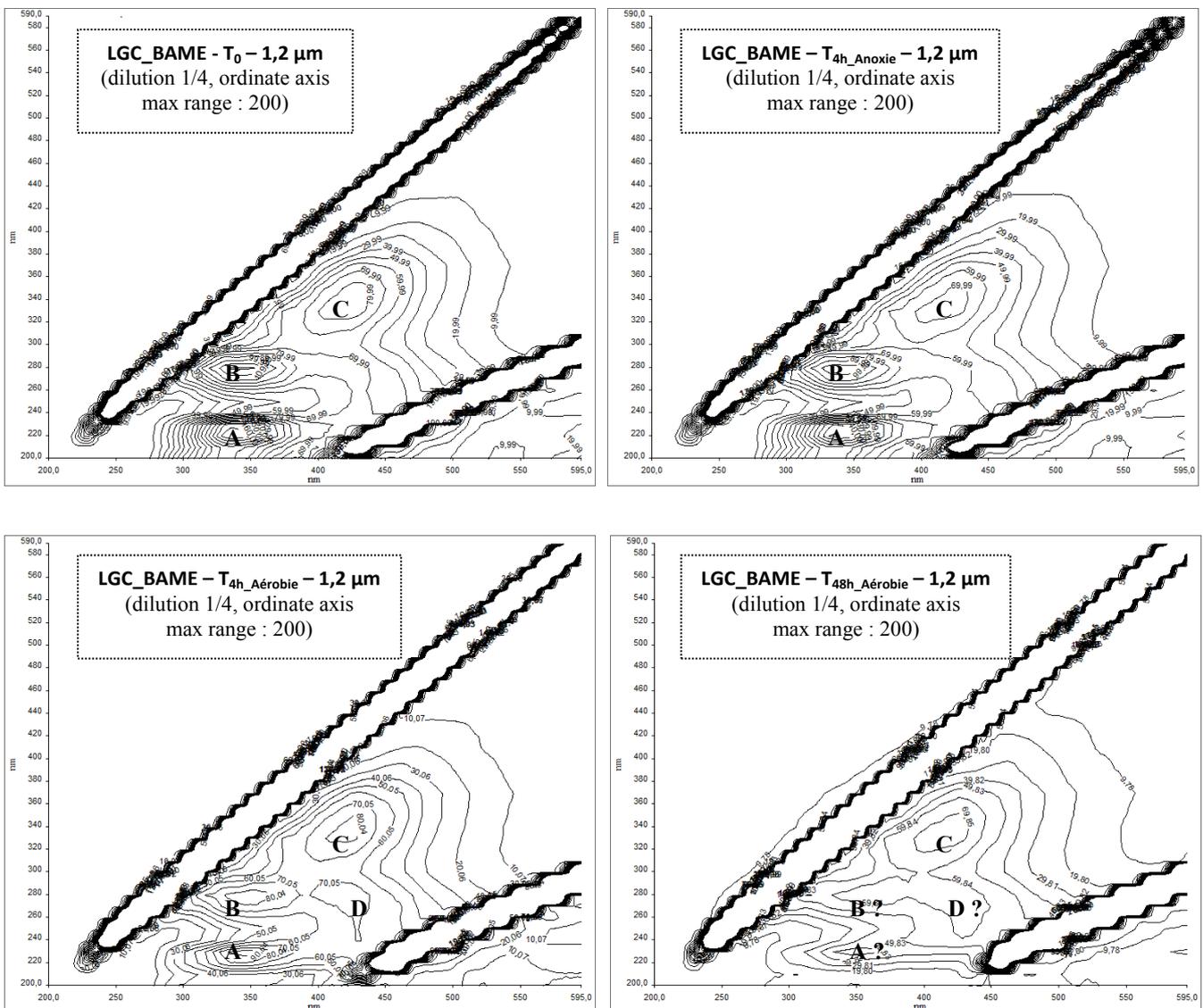


Figure IV-30 : Spectres de fluorescence obtenus sur la fraction à 1,2 μm pour les différentes conditions opératoires testées sur la boue non contaminée

Les spectres obtenus entre les conditions T_0 et T_{4h_Anoxie} sont pratiquement identiques. On retrouve les mêmes massifs [A (340/220) ; B (340/280) ; C (410/340)] d'intensités équivalentes. Ce résultat indique qu'en condition anoxie et sans substrat apporté, (i) l'activité bactérienne doit être minimale et (ii) les propriétés de la phase aqueuse (et peut-être de la boue) n'évoluent pas ou très peu et permettent de valider à nouveau la rigueur du protocole de préparation de la boue et de la sorption proposé dans ce travail de thèse.

Les profils observés en condition aérobie sont davantage contrastés. En effet, on note la disparition progressive des massifs A et B et l'apparition du massif D. Ces tendances ont été provoquées par la présence d'oxygène, probablement à l'origine d'une « activation » des bactéries. Le massif C reste quant à lui d'intensité identique dans le temps et pourrait traduire la présence d'une matière stabilisée, probablement difficile à dégrader.

Pour revenir aux massifs A et B, on constate que la diminution d'intensité est d'autant plus grande que la durée de contact est longue. On peut alors penser que la diminution pourrait être attribuée à (i) la consommation par les bactéries, (ii) au transfert de la phase liquide vers la phase solide, (iii) la transformation de la matière vers des formes qui ne fluorescent pas ou en d'autres endroits du domaine de fluorescence.

En conservant la première hypothèse, on pourrait penser que les protéines aromatiques (associées à la présence de tryptophane) ainsi que les sous-produits protéiques issus de l'activité microbienne-like serviraient de substrats de base au métabolisme de la communauté bactérienne puisqu'il n'y a pas d'autres substrats facilement consommables. D'après la taille de ces molécules identifiée dans la partie précédente, on pourrait penser que la matière colloïdale de grande taille serait donc la plus accessible aux bactéries. Il est intéressant de constater qu'en parallèle, aucune biodégradation n'a été mesurée pour IFO et CP, ce qui pourrait signifier que ces substances (i) sont dégradées de préférence aux micropolluants ou (ii) n'entrent pas dans les processus de biodégradation des molécules ciblées (*i.e* voies de dégradation différentes). Ces possibilités doivent être explorées en présence d'autres substrats. En revenant à la troisième hypothèse, on pourrait penser que l'apparition du massif D est une conséquence directe de la « consommation - transformation » des massifs A et B. Toutefois, la transformation de matières protéiques ou apparentées vers des substances humiques- ou fulviques-like paraît douteuse. De plus, l'intensité du massif D évolue très peu dans le temps et suggère qu'il n'y a pas de lien entre la disparition des massifs A et B et l'apparition du massif D. On peut également suggérer que ce massif provient d'un transfert depuis la phase solide vers la phase aqueuse, sans toutefois donner d'indications sur d'éventuels mécanismes à l'origine de ce transfert.

IV.3.4.3.c) Comparaison des spectres de la fraction à 1,2 μm pour la boue contaminée et les différentes conditions opératoires appliquées

Les spectres acquis sur la fraction à 1,2 μm pour la boue contaminée et les différentes conditions opératoires appliquées sont présentés sur la [Figure IV-31](#). Les profils sont très nettement différents de ceux observés pour la boue non contaminée et suggèrent des modifications importantes de la matière. En effet, par opposition aux spectres de la boue non contaminée, on ne note plus les massifs A et B aux différents temps de contact, pourtant très majoritairement présents lors des tests précédents. Le dosage des protéines par la méthode Lowry modifiée indique pourtant des concentrations équivalentes pour la fraction à 1,2 μm entre la boue contaminée (34 $\text{mg}_{\text{BSA}}/\text{L}$) et la boue non contaminée (33 $\text{mg}_{\text{BSA}}/\text{L}$). Ces résultats nous amènent à penser que la nature des protéines aurait considérablement changé entre les deux séquences. Il est cependant difficile d'attribuer cet éventuel changement suite à l'addition du cocktail de molécules anticancéreuses (réponse d'adaptation des microorganismes ?) ou aux problèmes hydrodynamiques survenus pendant la campagne de contamination. Par ailleurs, le léger massif dans la région de fluorescence des

protéines aromatiques sur le spectre à $T_{4h_Aérobie}$ [noté A' (360/220)] possède une longueur d'onde d'émission légèrement décalée par rapport au massif A précédemment identifié (340/220) et suggère une évolution dans la conformation des protéines. Ce massif pourrait par ailleurs être issu de la phase solide et soulève des questions concernant la composition « fluorescente » du solide, ainsi que sur la possibilité d'un appauvrissement en protéines depuis la phase aqueuse vers le solide. Ces modifications pourraient également traduire une évolution importante dans le métabolisme des microorganismes mais reste au stade d'hypothèse.

Dans le même temps, on note une grande stabilité pour le massif C (peu d'évolution dans le temps) et pour le massif D, à l'exception du spectre à $T_{24h_Aérobie}$ pour ce dernier massif. On peut penser que la disparition pourrait être due à la transformation de certaines matières fulviques, notamment les acides fulviques qui peuvent être convertis en acides humiques. Il est surtout intéressant de constater que le massif D était présent dès le début des essais contrairement à la boue précédente, et confirme bien une évolution des caractéristiques de ces échantillons. Rappelons cependant que cette évolution paraît peu déterminante dans le processus de sorption, les $K_{Distrib}$ étant relativement équivalents entre les différentes boues et conditions.

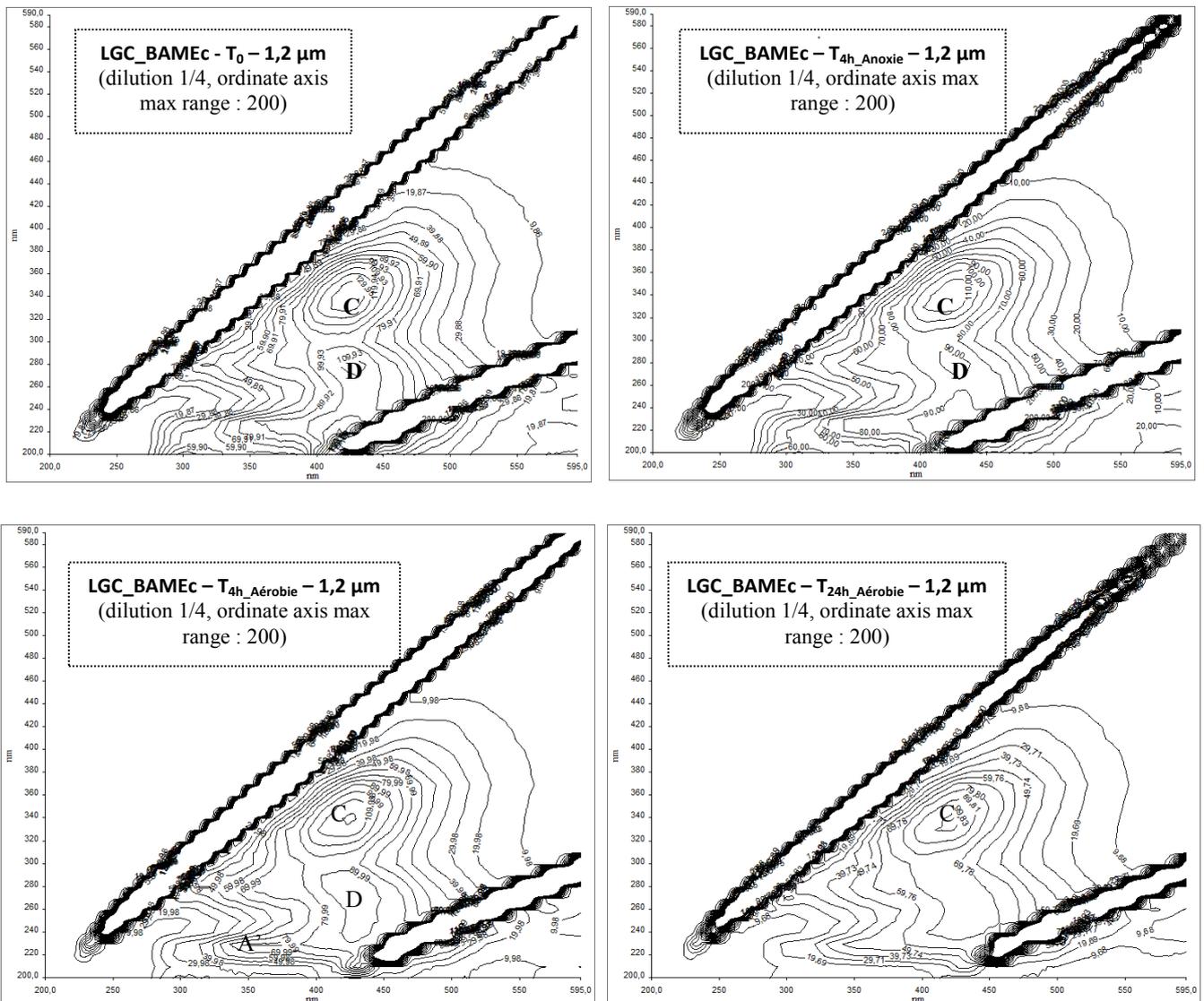


Figure IV-31 : Spectres de fluorescence obtenus sur la fraction à $1,2 \mu\text{m}$ pour les différentes conditions opératoires testées sur la boue contaminée

IV.3.4.3.d) Lien des résultats de fluorescence avec la spéciation des polluants

Nous avons précédemment observé que les micropolluants IFO et CP se retrouvaient presque exclusivement dans la fraction la plus ultrafiltrée F_4 (< 1 kDa). D'après le spectre de fluorescence de cette fraction sur la boue non contaminée (Figure IV-27), nous avons principalement trouvé des substances humiques-like. Rappelons que ces substances sont plutôt stabilisées et qu'on les a systématiquement retrouvées dans les spectres à 1,2 μm , toute condition opératoire confondue. **On suppose alors que ces substances auraient été identifiées dans tous les spectres de F_4 .** Partant de cette hypothèse, on peut alors se poser la question de savoir si la présence d'IFO et CP dans cette fraction est liée à la présence de substances humiques-like de petite taille. Cette question rejoint là aussi les observations de Delgado (2009), qui a mis en évidence les variations couplées de rétention de substances humiques dans le surnageant du BAME avec le caractère toxique de cette phase (test de toxicité), suggérant un lien entre les humiques-like et les molécules « toxiques ». Les substances humiques-like sont des molécules très complexes, stables et pouvant certainement se comporter comme de véritables pièges à polluants, notamment en raison de la grande diversité des fonctions chimiques qu'elles portent (Figure IV-32). Il est alors légitime de penser qu'IFO et CP aurait pu être « piégés » par ces molécules. Si c'est le cas et en raison de la stabilité de ces substances, on pourrait alors penser qu'elles sont un facteur limitant dans la biodisponibilité. Toutefois, il se pourrait également qu'IFO et CP existent (uniquement) sous forme libre dans cette fraction, sans aucun lien avec les substances humiques-like ou plus généralement avec les espèces fluorescentes. Pour identifier si un de ces deux comportements est possible, et en conservant la fluorescence tridimensionnelle comme technique d'analyse, il pourrait être intéressant (i) de produire à nouveau la fraction F_4 à partir d'une boue non contaminée, (ii) d'acquérir son spectre puis de mesurer l'intensité du ou des massifs d'intérêt, (iii) de mettre en contact cette fraction avec IFO et CP puis d'acquérir un nouveau spectre. Si IFO et CP ont une affinité pour les substances humiques-like (par exemple), on devrait pouvoir mesurer une baisse de l'intensité émise par rapport au spectre acquis sur la fraction non contaminée. Toutefois, il faudrait probablement injecter des quantités élevées en IFO et CP pour pouvoir observer le phénomène. Mêmes si ces concentrations ne seraient sans doute pas comparables aux valeurs environnementales, un tel comportement donnerait de précieuses informations dans la compréhension des interactions avec la matière colloïdale et dissoute. Par ailleurs, on ne peut pas exclure qu'IFO et CP soient liées à des matières qui ne fluorescent pas et limiterait alors l'intérêt de la fluorescence tridimensionnelle sur ce point précis. Toutes ces perspectives sont à explorer.

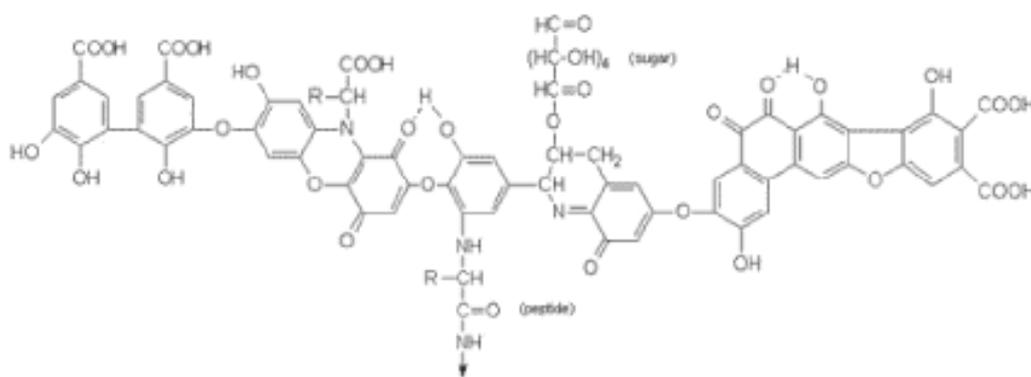


Figure IV-32 : Structure possible d'une substance humique(-like)
(extrait de Delgado, 2009)

IV.4) Conclusion du chapitre

A travers un bilan détaillé des quantités de micropolluants aux bornes d'un pilote de BAME, il a été démontré que l'élimination du CP (~60 %) est plus satisfaisante que lors du traitement par BA (~0 %) mais reste néanmoins partielle. Ce rendement est en partie expliqué par la biodégradation du polluant, comptant pour près de 40 % de l'élimination totale à elle seule. Le mécanisme de sorption n'intervient quasiment pas dans ce bilan (< 0,5 %). Par ailleurs, il a été constaté que les faibles quantités sorbées pouvaient rapidement être remobilisées après lessivage du pilote (< 48 heures), indiquant une sorption *a priori* entièrement réversible. Cette observation est soutenue par l'identification de la nature physique de la sorption sur la boue, caractérisée par des liaisons de faibles énergies et faciles à rompre.

L'étude approfondie du phénomène de biodégradation a révélé qu'un métabolisme direct entre le polluant CP et les microorganismes était peu envisageable, et impliquerait plutôt des interactions cométaboliques. Il a de plus été suggéré que ces mêmes interactions seraient à l'origine d'une limitation de la biodégradation par comparaison avec les constantes cinétiques. Il pourrait donc être intéressant de travailler avec des charges en co-substrat(s) plus élevées afin d'intensifier le processus. Des questions ont également été posées concernant une limitation par la ou les fraction(s) en micropolluant biodisponible(s), de même que sur la manière d'alimenter les bactéries en co-substrat(s), mais restent ici sans réponses claires.

En parallèle, des manipulations d'ultrafractionnement sur la phase aqueuse de boue du pilote ont révélé qu'IFO et CP se retrouvaient presque exclusivement dans la fraction la plus ultrafiltrée, de seuil de coupure < 1 kDa. D'après des mesures par fluorescence tridimensionnelle, leur présence dans cette fraction pourrait être liée à celle des substances humiques-like de petite taille mais reste à confirmer. Quoi qu'il en soit, la présence d'IFO et CP dans cette fraction caractérise l'inefficacité de la membrane d'ultrafiltration (ici 0,2 μm) à retenir ce type de polluants et constitue une limite du procédé de BAM.

Le besoin d'un effluent exempt de molécules anticancéreuses passera probablement par le couplage de cette technologie avec d'autres procédés de traitement, qu'ils soient à base de charbon actif, de systèmes membranaires ou de type oxydatif par exemple (ozone, photocatalyse...).

Conclusion générale et Perspectives

CONCLUSION

La compréhension des mécanismes impliqués dans l'élimination de micropolluants lors de traitements biologiques par boues activées devient impérative afin d'apprécier le fonctionnement des procédés d'épuration et de se positionner comme force de proposition dans les moyens à mettre en œuvre pour améliorer les performances actuelles de ces traitements.

Les recherches développées dans le cadre de ce travail de thèse avaient pour principal objectif d'identifier le poids des mécanismes de sorption et biodégradation dans l'élimination de molécules anticancéreuses par les boues biologiques. Un exemple concret a pu être présenté grâce au suivi de l'élimination d'un cocktail contenant une mixture d'IFO, CP et TAM par un pilote de BAME. Pour cela, il a d'abord été nécessaire de mettre au point une méthode d'analyse de ces molécules dans les phases aqueuse et solide des boues, à des concentrations où le défi analytique prend tout son sens. L'étape suivante a nécessité de développer une méthodologie originale afin d'apprécier avec rigueur le phénomène de sorption dans les boues. Enfin, l'étude précise des mécanismes d'élimination au sein d'un pilote de BAME a été réalisée, où la plupart des efforts de recherche ont été concentrés sur le phénomène de biodégradation. Les principales conclusions issues de ces travaux sont regroupées ci-après selon quatre grands axes.

- (i) Mise au point d'une méthode de dosage de molécules anticancéreuses dans les phases aqueuse et solide des boues
- (ii) Caractérisation du phénomène de sorption dans les boues et proposition de modèle prédictif
- (iii) Elimination d'un cocktail de molécules anticancéreuses par la technologie de BAME
- (iv) Caractérisation du phénomène de biodégradation du CP

Mise au point d'une méthode de dosage de molécules anticancéreuses dans les phases aqueuse et solide des boues

Deux méthodes d'analyse ont été développées dans ce travail de thèse. Une méthode d'analyse par HPLC-UV/MS, transposée par la suite en une méthode par UHPLC-MS/MS, ont permis de réaliser la séparation et la détection de mélanges de molécules anticancéreuses possédant des profils physico-chimiques variés et allant de très polaires (5-FU) à fortement apolaires (TAM). Bien que ces deux méthodes soient en adéquation avec l'objectif d'une quantification de ces molécules à l'état de traces dans les boues, la méthode par UHPLC-MS/MS a donné des performances de séparation et de détection plus attractives.

L'extraction de ces molécules contenues dans la phase aqueuse des boues a été réalisée par une combinaison de cartouches SPE (Oasis MAX et Oasis MCX) permettant la récupération sélective d'espèces acides, neutres et basiques à partir d'un échantillon unique et de faible volume. Les performances de cette méthode ont été scrupuleusement détaillées et ont mis en évidence une capacité intéressante du tandem des cartouches à éliminer les interférents, en partant d'une matrice pourtant très chargée. Cependant, la récupération et la quantification du 5-FU n'a pas été possible et nécessite des recherches complémentaires pour améliorer la polyvalence de la méthode.

L'extraction de ces molécules depuis la phase solide des boues a été réalisée par PLE et optimisée au moyen d'une approche chimiométrique multivariée. Les enseignements de cette approche sont que le ratio de solvant organique (MeOH) est probablement le paramètre le plus déterminant dans la qualité de l'extraction, mais que la synergie entre plusieurs paramètres opératoires pouvait aussi être très influente. Parallèlement, il a été observé que la molécule TAM présentait une affinité pour tout support (« biologique comme non biologique »), ne permettant pas d'assurer une extraction quantitative par cette méthode. Les échantillons obtenus à l'issue de l'extraction PLE ont été purifiés

suivant l'approche tandem SPE développée pour la phase aqueuse. Un travail de validation a été réalisé sur sept boues de provenances et donc natures différentes et a confirmé la polyvalence de la méthode mise au point pour IFO et CP. En dépit de performances analytiques satisfaisantes pour ce type d'échantillon, il est toutefois apparu qu'une limitation existait au niveau de l'effet matrice (*i.e.* présence d'interférents) et implique quelques améliorations afin d'abaisser les limites de méthode.

Quoi qu'il en soit, les approches analytiques développées dans ce travail de thèse peuvent tout à fait servir de base à l'élaboration de méthodes d'analyse de produits anticancéreux contenus dans d'autres matrices environnementales, notamment les effluents de station d'épuration.

Caractérisation du phénomène de sorption dans les boues et proposition de modèle prédictif

Une procédure originale de préparation d'échantillon de boues a été proposée et validée dans l'objectif d'une estimation satisfaisante des cinétiques et des comportements de sorption pour IFO et CP.

L'étude des cinétiques a révélé que les vitesses de sorption de ces molécules étaient différentes et probablement influencées par un effet de concentration en polluants au voisinage du solide (« effet cocktail ») mais ne modifiaient pas la durée au bout de laquelle l'équilibre de sorption est atteint (*i.e.* 4 heures) et ce, indépendamment de la nature de la boue.

L'étude des isothermes de sorption a révélé que l'isotherme de Freundlich était celle qui décrivait le mieux nos données, indiquant par la même occasion que l'utilisation systématique de l'isotherme linéaire est *a priori* peu satisfaisante. La détermination des paramètres de l'isotherme a mis en évidence des comportements de sorption différents entre IFO et CP et parfois entre les boues, mais toujours caractérisés par des aptitudes de sorption faibles. Toutefois, des réserves ont été émises quant à l'utilisation de cette isotherme pour prédire la sorption en station d'épuration, notamment parce que le phénomène n'a pu être étudié pour des concentrations classiquement rencontrées en traitement d'ERU (*i.e.* 1 à 100 ng/L). En parallèle, la mise en évidence de l'influence de la matière colloïdale et dissoute des boues sur les équilibres de sorption n'a pu être possible et nécessite le développement d'une nouvelle méthode de caractérisation.

En dernier point, les travaux de recherches ont démontré qu'un lien entre les paramètres de sorption d'IFO et CP et les caractéristiques physico-chimiques des boues n'était pour le moment pas envisageable. Des questions ont alors été soulevées concernant la pertinence d'utiliser des paramètres « globaux » (aussi bien d'un point de vue sorption que d'un point de vue caractérisation des matrices) pour modéliser de manière « simple » un phénomène qui ne l'est assurément pas. Par ailleurs, des propositions méthodologiques ont été régulièrement effectuées dans l'objectif de compléter les procédures développées dans ce travail.

Élimination d'un cocktail de molécules anticancéreuses par la technologie de BAME

A travers un bilan détaillé des quantités de CP aux bornes d'un pilote de BAME fonctionnant en continu, il a été démontré que la molécule était partiellement éliminée à hauteur de 60 %, dont 40 % étaient attribués au seul mécanisme de biodégradation. La sorption de CP sur les boues est apparue largement négligeable. De plus, les faibles quantités sorbées ont été rapidement remobilisées après lessivage du pilote (< 48 heures), indiquant que la sorption est de surcroît réversible. L'étude thermodynamique du phénomène a indiqué que les interactions de sorption étaient de nature physique, sans pouvoir expliquer plus finement le type de forces engagées.

Parallèlement, des manipulations d'ultrafractionnement sur la phase aqueuse ont mis en évidence que les molécules ciblées IFO et CP se retrouvaient presque exclusivement dans la fraction des matières dissoutes ou de très petite taille (< 1 kDa). D'après une caractérisation de cette fraction par

fluorescence tridimensionnelle, cette présence pourrait être liée à celle de substances humiques-like dont le potentiel de piégeage de micropolluants paraît grand. Quoiqu'il en soit, ce résultat démontre que les membranes de microfiltration ou d'ultrafiltration habituellement rencontrées dans les BAM ne sont pas efficaces dans la rétention de ces molécules.

Caractérisation du phénomène de biodégradation du CP

Par opposition avec l'expérience en réacteur batch classiquement effectuée pour déterminer la biodégradation des micropolluants, le suivi des concentrations aux bornes d'un système fonctionnant en continu a permis de caractériser avec une bonne précision l'élimination du CP par biodégradation, et se rapproche en ce sens du comportement « réel » lors du traitement des eaux. L'étude approfondie du mécanisme de biodégradation a révélé que l'utilisation directe du CP comme substrat était peu envisageable et impliquerait davantage des interactions cométaboliques avec d'autres substrats facilement biodégradables. Dans les conditions de fonctionnement du pilote de BAME, il a été suggéré que ces mêmes interactions seraient à l'origine d'une limitation de la biodégradation, par comparaison avec les constantes cinétiques qui ont été mesurées en parallèle. L'intensification du processus pourrait donc passer par l'application d'une charge en co-substrat plus élevée, mais pourrait également induire des changements de comportement des bactéries. Des questions ont également été posées concernant une limitation par la ou les fractions disponibles pour la biodégradation et nécessite d'explorer de façon concomitante les mécanismes qui gèrent la biodisponibilité, le cométabolisme et les cinétiques de biodégradation pour progresser dans la compréhension du phénomène. Par ailleurs, il est apparu que la manière d'alimenter les bactéries en substrats facilement biodégradables pourrait également influencer la réponse de biodégradation des micropolluants.

De l'ensemble de ces résultats, il est alors possible d'orienter de nouvelles recherches vers des travaux inachevés ou jugés pertinents. Ces propositions sont regroupées en trois grands axes :

- (i) Amélioration des méthodes analytiques
- (ii) Compréhension du phénomène de sorption de micropolluants dans les boues
- (iii) Approfondissement des connaissances et maîtrise de la biodégradation de micropolluants par les boues

PERSPECTIVES

Perspectives d' « Amélioration des méthodes analytiques »

La séparation chromatographique d'un mélange de molécules anticancéreuses s'est avérée délicate en raison du profil très diversifié des substances étudiées, même si la très grande majorité ont en fait des propriétés polaires. Du fait de cette caractéristique, l'approche consistant à séparer ces molécules sur une colonne apolaire (ici C₁₈) peut finalement être peu appropriée. L'utilisation de la chromatographie de partage hydrophile HILIC pour séparer ces molécules pourrait être une solution davantage pertinente et notamment si l'analyse de leurs métabolites, très polaires, est prise en compte. Toutefois, le problème sera cette fois-ci transposé à la séparation des molécules apolaires.

Pour séparer des mélanges de molécules aux propriétés très diverses, il pourrait alors être intéressant d'avoir recours à la chromatographie bidimensionnelle (LC x LC) qui consiste en le couplage de deux séparations chromatographiques de nature différente (e.g. interactions hydrophiles lors de la première séparation puis interactions hydrophobes lors de la seconde). L'étape de détection est tout aussi cruciale pour permettre la quantification de ces molécules à des niveaux de concentration extrêmement bas.

Malgré les performances intéressantes de l'analyseur QqLIT utilisé dans ce travail de thèse, elles sont ici apparues insuffisantes pour permettre la compréhension du mécanisme de sorption aux concentrations rencontrées en station d'épuration. Des techniques d'analyse toujours plus sensibles (Orbitrap ?) sont donc indispensables pour progresser dans cette voie.

L'utilisation de cartouches en tandem développée pour extraire sélectivement des molécules de physico-chimie variées depuis les matrices aqueuses présente un potentiel intéressant pour la récupération d'analytes non ciblées lors de screening. Toutefois, cette méthode a ici présenté une limite pour extraire une molécule très polaire à caractère faiblement acide. On pourrait donc envisager l'utilisation d'adsorbants encore plus spécifiques et par exemple les Molecularly Imprinted Polymer (MIP), qui sont des polymères possédant « une mémoire » de la forme et des groupes fonctionnels d'une molécule modèle.

L'extraction et l'analyse des molécules ciblées depuis les matrices solides a montré que l'effet matrice impactait dramatiquement les performances de la méthode. En dépit des progrès analytiques à venir en matière de détection, il est hautement probable que ce paramètre reste le facteur limitant, même avec l'équipement le plus sophistiqué. Il est donc impératif de mettre en œuvre les moyens nécessaires pour l'identifier voire le réduire. En ce sens, on peut déjà proposer trois stratégies :

- (i) Envisager d'intégrer une étape de purification encore plus sélective et notamment en couplant la purification « on-line » de la méthode par PLE avec l'approche tandem SPE développée dans ce travail de thèse. Il est par ailleurs possible que l'introduction d'une purification « on-line », même la plus élémentaire (addition d'alumine, de Florisil[®] ...), augmente très sensiblement les performances de purification de la méthode SPE ;
- (ii) Retravailler le gradient d'élution lors de l'étape d'analyse. Il pourrait être intéressant d'étudier l'évolution de l'effet matrice en modifiant la composition de la phase mobile et/ou en retravaillant les rampes d'élution, de manière à étaler dans le temps la présence d'interférents. Un compromis entre le temps d'analyse total et la réduction de l'effet matrice devra certainement être trouvé ;
- (iii) Envisager de caractériser la nature de ces interférents afin de proposer des solutions efficaces pour les éliminer. Rappelons que nous avons effectué un travail très détaillé de caractérisation physico-chimique de la phase solide des boues. En étudiant l'importance

de l'effet matrice pour chaque extrait de boue et en couplant ces résultats avec les caractéristiques de la phase solide (par ACP par exemple), on pourrait éventuellement identifier des corrélations intéressantes entre l'effet matrice et certains de ces paramètres. La réponse obtenue ne sera que très globale mais permettra d'ores et déjà de cibler davantage sur une ou plusieurs familles de composés, même s'il faut reconnaître que cela ne sera pas nécessairement suffisant pour identifier très clairement la nature des interférents impliqués dans l'effet matrice des molécules ciblées.

Perspectives « Compréhension du phénomène de sorption de micropolluants dans les boues »

Les résultats de cette thèse ont mis en évidence que les méthodes d'estimation de la sorption de micropolluants polaires abordées jusqu'ici étaient probablement trop globales pour caractériser clairement le phénomène. Au sens de la boue, rappelons que sous le terme sorption se cachent les termes d'adsorption et d'absorption. Il pourrait être intéressant de distinguer ces phénomènes de manière à préciser réellement ce qu'est la sorption dans les boues. Ce travail passera certainement par l'utilisation de techniques de marquage des molécules, de façon à suivre leur répartition dans les différents compartiments de la boue. Par ailleurs, on peut penser que la caractérisation de ces deux phénomènes donnera des informations cruciales dans la compréhension des interactions impliquées dans la sorption. A ce titre, [Khunjar et Love \(2011\)](#) ont démontré le rôle clé des EPS dans la sorption de produits pharmaceutiques et oriente vers une prédominance du phénomène d'adsorption pour ces molécules.

Dans un autre temps, on peut également se poser des questions sur la signification des isothermes lorsque, pour une molécule donnée et entre différentes boues, les tendances de sorption ne sont pas les mêmes. En effet, il est encore difficile d'expliquer pourquoi sur un même intervalle de concentrations, un comportement de sorption linéaire est observé pour une boue et pas une autre. Bien que cela puisse être hasardeux et que les isothermes n'ont jamais été pensées en ce sens, on peut se demander si l'isotherme linéaire ne serait pas caractéristique de certaines interactions « polluant-boue », alors que l'isotherme de Freundlich (non linéaire) serait caractéristique d'autres interactions. La réponse à toutes ces questions nécessitera la mise en œuvre de techniques analytiques très sophistiquées, qui pourraient notamment compter parmi elles la fluorescence tridimensionnelle comme moyen de caractérisation fine des propriétés des matrices.

La présence d'eau dans les culots de boue a soulevé des interrogations sur la quantité de micropolluants qui était strictement sorbée sur le solide. Dans le même temps, nous avons observé que chaque boue génère son propre volume de phase aqueuse après centrifugation, ce qui pose également des interrogations sur la nature de l'eau dosée. Dans la boue, l'eau peut exister sous différents états (libre, lié, vicinal...), chacun étant probablement caractérisé par une physico-chimie très spécifique. Ainsi, on peut se demander s'il n'existerait pas plusieurs équilibres de sorption de micropolluants entre ces différentes « phases », masqués jusqu'ici par la mesure très globale du K_{Distrib} entre la phase solide et la phase aqueuse. Leur identification pourrait faire l'objet d'un travail de recherche conséquent. Même si cette tâche s'annonce d'ores et déjà longue et très complexe, elle serait sans doute très déterminante pour la compréhension précise des mécanismes qui gèrent le phénomène de sorption.

Enfin, nous avons observé que les micropolluants étudiés se sorbaient très peu et on peut se demander s'il n'y aurait pas intérêt à les désorber ou à limiter leur sorption, dans le but de diminuer les niveaux de contamination dans le solide et de réduire les possibilités de dissémination dans l'Environnement lors de l'épandage des boues. Il est toutefois nécessaire de comprendre le ou les compartiments qui « pilotent » la sorption (phase solide, phase aqueuse... ?), de manière à voir s'il est possible d'agir sur la composition d'une de ces phases et donc sur la sorption.

Perspectives « Approfondissement des connaissances et maîtrise de la biodégradation de micropolluants par la boue »

On se rappelle avoir observé que la biodégradation du CP dans le pilote de BAME était probablement limitée par le cométabolisme (*i.e.* stœchiométrie de la réaction entre le micropolluant et un polluant facilement dégradable) et non par les cinétiques. Toutefois, cette conclusion est très dépendante de la concentration en micropolluant dans le système. En effet, en appliquant des concentrations plus basses en CP, nous aurions pu trouver que la limitation venait des cinétiques. En s'affranchissant de toute limitation par la fraction biodisponible en micropolluant (et que cette fraction corresponde à la phase aqueuse), il serait alors possible d'identifier une concentration « seuil » à partir de laquelle la limitation serait induite par l'une ou l'autre de ces composantes. Cette hypothèse peut être traduite sous forme d'équations.

(1) Quantité de micropolluant biodégradée quotidiennement suivant la stœchiométrie de la réaction entre le micropolluant et la DCO :

$$q_{\text{biol}_1} = \text{stoechio}_{\text{micropolluant}}^{\text{DCO}} \cdot [\text{DCO}] \cdot Q_{\text{alimentation}} \quad (\text{en } \mu\text{g/j})$$

où stoechio désigne la quantité de micropolluant éliminée par gramme de DCO ($\mu\text{g/g}_{\text{DCO}}$)
 $[\text{DCO}]$ la concentration en DCO (en $\text{g}_{\text{DCO}}/\text{L}$)
 $Q_{\text{alimentation}}$ le débit d'alimentation quotidien (en L/j)

(2) Quantité de micropolluant biodégradée quotidiennement suivant la cinétique :

$$q_{\text{biol}_2} = k_{\text{biol}} \cdot \text{MVS} \cdot C_{\text{aqueuse}} \cdot V_{\text{réacteur}} \quad (\text{en } \mu\text{g/j})$$

où k_{biol} désigne la constante de biodégradation (en $\text{L/g}_{\text{part}} \cdot \text{j}$)
 MVS la concentration en matières volatile en suspension ($\text{g}_{\text{part}}/\text{L}$)
 C_{aqueuse} la concentration du polluant en phase aqueuse ($\mu\text{g}/\text{L}$)
 $V_{\text{réacteur}}$ le volume du réacteur (en L)

De l'égalité entre q_{biol_1} et q_{biol_2} , il vient :

$$C_{\text{aqueuse}}^{\text{seuil}} = \frac{\text{stoechio}_{\text{micropolluant}}^{\text{DCO}} \cdot [\text{DCO}]}{k_{\text{biol}} \cdot \text{MVS} \cdot \text{TSH}} \quad (\text{en } \mu\text{g}/\text{L})$$

où TSH désigne le temps de séjour hydraulique (en j)

D'après les conditions opératoires dans le pilote en fin de campagne ($\text{stoechio} : 1,2 \mu\text{g}_{\text{CP}}/\text{g}_{\text{DCO}}$; $[\text{DCO}] = 1,8 \text{ g}/\text{L}$; $k_{\text{biol}} = 0,3 \text{ L}/\text{g}_{\text{part}} \cdot \text{j}$; $\text{MVS} = 1,8 \text{ g}_{\text{part}}/\text{L}$ et $\text{TSH} = 2 \text{ j}$), on trouve :

$$C_{\text{aqueuse}}^{\text{seuil}} = \frac{1,2 \cdot 1,8}{0,3 \cdot 1,8 \cdot 2} = 2 \mu\text{g}/\text{L} \text{ en CP}$$

Ainsi, en dessous de $2 \mu\text{g}/\text{L}$ en CP dans le pilote de BAME et les conditions présentées, la limitation est d'ordre cinétique, alors qu'au-delà, la limitation est d'ordre stœchiométrique. Dans notre étude, la concentration en CP avoisinait les $3 \mu\text{g}/\text{L}$ et nous avons identifié une limitation stœchiométrique.

(1) Quand $C_{\text{aqueuse}} < C_{\text{aqueuse}}^{\text{seuil}}$, alors la limitation sera d'ordre cinétique

(2) Quand $C_{\text{aqueuse}} > C_{\text{aqueuse}}^{\text{seuil}}$, alors la limitation sera d'ordre stœchiométrique

On se propose d'extrapoler cette observation à une station d'épuration « standard » : la DCO est d'environ $0,8 \text{ g}_{\text{DCO}}/\text{L}$, les MVS sont à $2,4 \text{ g}_{\text{part}}/\text{L}$ (80 % de $3 \text{ g}_{\text{part}}/\text{L}$), le TSH est de 1 j, on conserve la même stœchiométrie et le même k_{biol} que pour le pilote de BAME. Ainsi, on obtient une concentration seuil d'environ $1,3 \text{ } \mu\text{g}/\text{L}$. **Les concentrations mesurées en molécules anticancéreuses dans les ERU sont à peine de quelques ng/L, il est donc fortement probable que la limitation de la biodégradation, si biodégradation il y a, soit d'ordre cinétique.** Ainsi, pour améliorer l'élimination par biodégradation sur ce point, on pourrait envisager :

- (i) de travailler à une température plus élevée de manière à augmenter la valeur de k_{biol} ;
- (ii) d'augmenter la concentration en MVS, la fraction « active » de la biomasse. Les boues avec des âges faibles sont souvent plus « actives » que des boues d'âges importants ; un compromis serait alors à trouver avec l'adaptation des microorganismes à l'environnement chimique qui est favorisé par un âge de boues élevé.
- (iii) d'appliquer un TSH plus important. Rappelons cependant la forte connexion entre l'âge de boues et le TSH en station d'épuration « standard » (*i.e.* boues activées), réduisant les possibilités d'optimisation.

Dans le cas où la limitation serait stœchiométrique, on peut envisager de travailler avec une charge en substrat facilement dégradable plus élevée, à charge en micropolluant constante. L'augmentation de la charge en substrat facilement dégradable pourrait par exemple être permise par l'aménagement de zones de contact, habituellement destinées à créer localement des pics de charge de manière à éviter le phénomène de moussage.

Une perspective supplémentaire serait de caractériser les populations impliquées dans la biodégradation de ces molécules. Il pourrait d'abord être intéressant de connaître (i) la part réellement active de la biomasse (autre que par les MVS), (ii) la population (active) impliquée dans l'élimination (hétérotrophes et/ou autotrophes), puis (iii) identifier les populations bactériennes. Ces étapes vont nécessiter le développement d'outils de marquage spécifique de ces composés et des populations capables de les dégrader. Pour l'identification des populations, des techniques de biologie moléculaire telles que le pyroséquençage par exemple pourraient être impliquées. Il semble par ailleurs indispensable de caractériser les réseaux métaboliques impliqués dans la dégradation de telles molécules et ce, pour différentes natures de micropolluants et de co-substrats.

Ces quelques perspectives méritent bien évidemment d'être complétées, mais permettent néanmoins d'apprécier à quel point l'élucidation des mécanismes de biodégradation de micropolluants a été dans ce travail, et reste encore avec une superficie importante, un formidable terrain de recherche.

Références bibliographiques

AFNOR XP T 90-210 (1999) Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence: AFNOR.

Ahrer W., Scherwenk E., Buchberger W. (2001) Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 919:69–78.

Al Mardini F. (2008) Etude de l'adsorption du pesticide Bromacil sur du charbon actif en poudre en milieu aqueux : effet compétiteur des matières organiques naturelles. Thèse de doctorat, Université de Poitiers, 245 p.

Allwood M.C., Stanley A., Wright P. (2002) The Cytotoxics Handbook. Radcliffe Publishing, 2002 - 484 pages.

Almeida B., Oehmen A., Marques R., Brito D., Carvalho G., Barreto Crespo M.T. (2013) Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture, *Bioresource Technology*, 133:31-37.

Al-Odaini N.A., Zakaria M.P., Yaziz M.I., Surif S. (2010) Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217:6791-6806.

Andersen H.R., Hansen M., Kjølholt J., Stuer-Lauridsen F., Ternes T., Halling-Sørensen B. (2005) Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere*, 61, 139–146.

Andersen H.R., Wollenberger L., Halling-Sørensen B., Kusk K.O. (2001) Development of copepod nauplii to copepodites-a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environmental and Toxicological Chemistry*, 20:2821-2829.

Annamalai K., Puri I. K. (2002) Advanced Thermodynamics Engineering. CRC Press: Boca Raton, FL, p 491.

ANSM (2011) Ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France : chiffres clés (2010) Rapport d'expertise Afssaps, 27 p. (<http://ansm.sante.fr/>, dernière consultation 18/02/2013)

Anway M. D., Cupp A. S., Uzumcu M., Skinner M. K. (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 308:1466–1469.

Artola-Garicano E., Borkent I., Damen K., Jager T., Vaes W. H. (2003) Sorption kinetics and microbial biodegradation activity of hydrophobic chemicals in sewage sludge: model and measurements based on free concentrations. *Environmental Science & Technology*, 37:116-122.

Ashton, D., Hilton, M. Thomas K. V. (2004) Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*, 333:167-184.

Atkinson S. (2006) Research studies predict strong growth for MBR markets. *Membrane Technology*, 8-10.

Aubenneau M., Tahar A., Casellas C., Wisniewski C. (2010) Membrane bioreactor for pharmaceutically active compounds removal: Effects of carbamazepine on mixed microbial communities implied in the treatment. *Process Biochemistry*, 45:1826-1831.

Badertscher M., Pretsch E. (2006) Bad results from good data. *Trends in Analytical Chemistry*, 25:1131–1138.

- Bancon-Montigny C. (2001)** Optimisation d'une technique analytique couplée (GC-PFPD) pour la spéciation des composés organostanniques: application à leur suivi dans le cycle hydrologique. Thèse de doctorat, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 211 p.
- Barcelo D., Petrovic M. (2005)** Recent advances in LC-MS/MS analysis of emerging contaminants in environmental samples. 10th International Symposium New Achievements in Chromatography, 12-15 October, Opatija, Croatia.
- Barret M. (2009)** Devenir des perturbateurs endocriniens HAPs/NP/PCBs au cours de la digestion anaérobie de boues contaminées : rôle de la biodisponibilité et du cométabolisme. Thèse de doctorat, Université Montpellier II, 241 p.
- Barret M., Patureau D., Latrille E., Carrère H. (2010)** A three-compartment model for micropollutants sorption in sludge : Methodological approach and insights. *Water Research*, 44:616 - 624.
- Barron L., Havel J., Purcell M., Szpak M., Kelleher B., Paull B. (2009)** Predicting sorption of pharmaceuticals and personal care products onto soil and digested sludge using artificial neural networks. *The Royal Society of Chemistry*, 134:663-670.
- Barton S. S. (1987)** The adsorption of methylene blue by active carbon, *Carbon*, 25:343–350.
- Batt A. L., Bruce I. B., Aga D. S. (2006)** Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. *Environmental Pollution*, 142:295-302.
- Bäuerlein P.S., Mansell J.E, ter Laak T.L., de Voogt P. (2012)** Sorption Behavior of Charged and Neutral Polar Organic Compounds on Solid Phase Extraction Materials: Which Functional Group Governs Sorption? *Environmental Science & Technology*, 46:954–961.
- Baugros J-B. (2008)** Recherche et développement dans le domaine des substances chimiques : préparation aux réponses du système REACH. Thèse de doctorat, Université Lyon I, 429 p.
- Baugros J-B., Cren-Olive C., Giroud B., Gauvrit J-Y., Lanteri P., Grenier-Loustalot M-F. (2009)** Optimisation of pressurised liquid extraction by experimental design for quantification of pesticides and alkyl phenols in sludge, suspended materials and atmospheric fallout by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216:4941-4949.
- Bergoc P., Filipič M., Eleršek T. Blažeka Z (2012)** The effects of the selected cytostatics on algae and cyanobacteria. 6th Congress of the Slovenian Genetic Society. (<http://www.cytothreat.eu>)
- Besse J.P., Latour J.F., Garric J. (2012)** Anticancer drugs in surface waters: What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environment International*, 39:73-86.
- Besse J. P., Garric J. (2007)** Médicaments à usage humain: risque d'exposition et effets sur les milieux récepteurs. Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surface continentales. Agence de l'Eau R.M.C.: 241 pages.
- Beulke S., Brown C. D., Dubus I. G., Walker A. (2001)** Characterisation of sorption for the modelling of pesticide fate. In Pesticide behaviour in soils and water. Proceedings of a Symposium organized by the British Crop Protection Council, Brighton, UK, 13-15 November 2001.

Bicchi C., Schilirò T., Pignata C., Fea E., Cordero C., Canale F., Gilli G. (2009) Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. *Science of The Total Environment*, 407:1842-1851.

Bijlsma L., Sancho J.V., Pitarch E., Ibañez M., Hernandez F. (2009) Simultaneous ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of amphetamine and amphetamine-like stimulants, cocaine and its metabolites, and a cannabis metabolite in surface water and urban wastewater. *Journal of Chromatography A*, 1216:3078-3089.

Boddy A.V., Proctor M., Simmonds D., Lind M.J., Idle J.R. (1995) Pharmacokinetics, metabolism and clinical effect of ifosfamide in breast cancer patients. *European Journal of Cancer*, 31:69–76.

Bohnenstengel F., Johnson S., Hofmann U., Eichelbaum M., Kroemer H.K. (1995) Direct gas chromatographic determination of dechloroethylcyclophosphamide following microsomal incubation of cyclophosphamide. *Journal of Chromatography B*, 672:271–276.

Bolster C.H, Hornberger G.M. (2007) On the Use of Linearized Langmuir Equations. *Soil Science Society of America Journal*, 71 (6):1796-1806.

Bouchoux G., Sablier M. (2005) Spectrométrie de masse - Principe et appareillage. *Techniques de l'ingénieur*, p 2645.

Boulinguez B., Le Cloirec P., Wolbert D. (2008) Revisiting the Determination of Langmuir Parameters. Application to Tetrahydrothiophene Adsorption onto Activated Carbon. *Langmuir*, 24 (13):6420–6424.

Bourven I., Costa G., Guibaud G. (2012) Qualitative characterization of the protein fraction of exopolymeric substances extracted with EDTA from sludge. *Bioresource Technology*, 104:486-496.

Boutin C., Héduit A., Helmer J. M. (2009) Technologies d'épuration en vue d'une réutilisation des eaux usées traitées (REUT). (http://www.onema.fr/IMG/pdf/2009_038.pdf)

Braak E. (2012) Aération pour le décolmatage dans les bioréacteurs à membranes immergées pour le traitement des eaux usées : impact sur le milieu biologique et la filtration. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 236 p.

Bressy A. (2010) Flux de micropolluants dans les eaux de ruissellement urbaines. Effets de différents modes de gestion des eaux pluviales. Thèse de doctorat, Université Paris-Est, 332 p.

Breton A., Sablayrolles C., Montrejaud-Vignoles M., Vignoles C. (2010) Perturbateurs endocriniens dans différents rejets de la ville de Toulouse. Communication écrite, Proceedings JIE Poitiers 2010, 12 p.

Brixham Environmental Laboratory (1991) Tamoxifen citrate: determination of toxicity and biodegradability by modified OECD test guideline 303a.

Brun G.L., Bernier M., Losier R., Doe K., Jackman P., Lee H.B. (2006) Pharmaceutically active compounds in Atlantic Canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic Aquatic Toxicity. *Environmental and Toxicological Chemistry*, 25:2163–2176.

- Buerge I., Buser H.R., Poiger T., Müller M. (2006)** Occurrence and Fate of the Cytostatic Drugs Cyclophosphamide and Ifosfamide in Wastewater and Surface Waters. *Environmental Science and Technology*, 40:7242-7250.
- Burford M.D., Hawthorne S.B., Miller D.J. (1993)** Extraction rates of spiked versus native PAHs from heterogeneous environmental samples using supercritical fluid extraction and sonication in methylene chloride. *Analytical Chemistry*, 65:1497–1505.
- Busetti F., Linge K.L., Heitz A. (2009)** Analysis of pharmaceuticals in indirect potable reuse systems using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216:5807-5818.
- Byrns G. (2001)** The fate of xenobiotic organic compounds in wastewater treatment plants. *Water Research*, 35:2523-2533.
- Cahill J.D., Furlong E.T., Brukhardt M.R., Kolpin D., 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*, 1041:171-180.
- Caminada D., Escher C., Fent K. (2006)** Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: Comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquatic Toxicology*, 79:114–123.
- Candido P., Couturier G., Augustin V., Charvet R., Duguet J-P., Lavison G. (2010)** Quid de la présence de résidus médicamenteux dans les eaux de surface parisiennes ?, Communication écrite, Proceedings JIE Poitiers 2010, 10 p.
- Canty M.N., Hutchinson T.H., Brown R.J., Jones M.B., Jha A.N. (2009)** Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: Differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology*, 94:68–76.
- Carballa M., Fink G., Omil F., Lema J. M., Ternes T. (2008)** Determination of the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. *Water Research*, 42:287-295.
- Carballa M., Omil F., Lema J. M. (2007)** Calculation Methods to Perform Mass Balances of Micropollutants in Sewage Treatment Plants. Application to Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) *Environmental Science and Technology*, 41:884-890.
- Castegnaro M., Hansel S. (2006)** Les médicaments anticancéreux dans les effluents hospitaliers et domestiques. *Environnement, Risques et Santé*, 5:266-270.
- Castiglioni S., Bagnati R., Calamari D., Fanelli R., Zuccato E. (2005)** A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1092:206-215.
- Catastini C., Mullot J. U., Boukari S., Mazellier P., Levi Y., Cervantes P. (2008)** Assessment of antineoplastic drugs in effluents of two hospitals. *European Journal of Water Quality*, 39:171-180.
- Cea-Barcia G.E. (2012)** Identification des mécanismes qui gèrent la disponibilité en vue de l'optimisation de la dégradation des micropolluants organiques au sein d'écosystèmes épuratoires. Thèse de doctorat, Université Montpellier II, 170 p.

Cesen M., Kosjek T., Heath E. (2012) Cytostatics cyclophosphamide and ifosfamide - do they occur in Slovene wastewaters and surface waters?, Postgraduate School Students Conference, 25 mai 2012, Ljubljana, Slovenija (<http://www.cytothreat.eu/>)

Chen W., Westerhoff P., Leenheer J. A., Booksh K. (2003) Fluorescence excitation - Emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology*, 37:5701-5710.

Chikae M., Ikeda R., Hasan Q., Morita Y., Tamiya E. (2004) Effects of tamoxifen, 17 α -ethynylestradiol, flutamide, and methyltestosterone on plasma vitellogenin levels of male and female Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17:29–33.

Choi S.B., Yun Y.-S. (2006) Biosorption of cadmium by various types of dried sludge: An equilibrium study and investigation of mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*, 138:378–383.

Chong N. M. (2009) Modeling the acclimation of activated sludge to a xenobiotic. *Bioresource Technology*, 100:5750-5756.

Cicek N., Franco J. P., Suidan M. T., Urbain V., Manem J. (1999) Characterization and comparison of a membrane bioreactor and a conventional activated-sludge system in the treatment of wastewater containing high-molecular-weight compounds. *Water Environment Research*, 71:64-70.

Cirja M. (2007) Studies on the behaviour of endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor, Doctorat de Borca-Neamt, Roumanie.

Clara M., Kreuzinger N., Strenn B., Gans O., Kroiss H. (2005) The solids retention time— a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research*, 39:97-106.

Clara M., Strenn B., Saracevic E., Kreuzinger N. (2004) Adsorption of bisphenol-A, 17 β -estradiol et 17 α -estradiol to sewage sludge. *Chemosphere*, 56:843-851.

Clouzot L. (2009) Etude du bioréacteur à membrane pour l'élimination de l'hormone synthétique 17 α -ethinylestradiol. Thèse de doctorat, Université Aix-Marseille 3, 234 p.

Coetsier C. (2009) Approche intégrée de la gestion environnementale des produits pharmaceutiques dans des rejets de stations d'épuration urbaines et leur milieu récepteur : occurrence, impact et traitements tertiaires d'élimination. Thèse de doctorat, Université Montpellier II, 293 p.

Coetsier C. M., Spinelli S., Lin L., Roig B., Touraud E. (2009) Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs? *Environment International*, 35:787–792.

Corlett S. A., Chrystyn H. (1996) High-performance liquid chromatographic determination of the enantiomers of cyclophosphamide in serum. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 682:337–342.

Cowan C. E., Larson R. J., Feijtel T. C., Rapaport R. A. (1993) An improved model for predicting the fate of consumer product chemicals in wastewater treatment plants. *Water Research*, 27:561-573.

Criddle C. S. (1993) The kinetics of cometabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 41:1048–1056.

D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R. (2003) Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of the Total Environment*, 302:199–209.

Daughton, C. G. (2006) Pharmaceuticals in the environment: Overview of significance, concerns, and solution. Invited keynote presentation for Pharmaceuticals in the Environment, webinar series organized by the EPA National Regional Science Council's PPCPs, 26 September 2006 (<http://www.epa.gov/esd/bios/daughton/acs-extend.pdf>.)

De Méo M. P., Mérono S., DeBaille A. D., Botta A., Laget M., Guiraud H., Duménil G. (1995) Monitoring exposure of hospital personnel handling cytostatic drugs and contaminated materials. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 66:363-368.

De Wever H., Weiss S., Reemtsma T., Vereecken J., Müller J., Knepper T., Hernando M. D. (2007) Comparison of sulfonated and other micropollutants removal in membrane bioreactor and conventional wastewater treatment. *Water Research*, 41:935-945.

Degrémont (1989) Mémento technique de l'eau. Tome1, Rueil-Malmaison: Degrémont

Sun D., Khor S. L., Hay C. T., Leckie J. O. (2007) Impact of prolonged sludge retention time on the performance of a submerged membrane bioreactor. *Desalination*, 208: 101-112.

Delgadillo-Mirquez L., Lardon L., Steyer J. P., Patureau D. (2011) A new dynamic model for bioavailability and cometabolism of micropollutants during anaerobic digestion. *Water Research*, 45: 4511-4521.

Delgado L. (2009) Bioréacteur à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux : élimination et influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur le procédé. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 284 p.

DellaGreca M., Iesce M.R., Isidori M., Nardelli A., Previtera L. (2007) Phototransformation products of tamoxifen by sunlight in water. Toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms. *Chemosphere*, 67:1933-1939.

Diaz-Cruz M.S., Lopez de Alda M.J., Barcelo D. (2006) Determination of antimicrobials in sludge from infiltration basins at two artificial recharge plants by pressurized liquid extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1130:72-82.

Dionex (2008) ASE 350[®] Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual. Fourni avec l'appareil, 232 p.

Dionisi D., Bertin L., Bornoroni L., Capodicasa S., Papini M. P., Fava F. (2006) Removal of organic xenobiotics in activated sludges under aerobic conditions and anaerobic digestion of the adsorbed species. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81:1496-1505.

Do D.D. (1998) Adsorption analysis equilibria and kinetics, vol. 2. Imperial College Press, pp. 239-240.

Dobor J., Varga M., Yao J., Chen H., Palkó G., Zárny G. (2010) A new sample preparation method for determination of acidic drugs in sewage sludge applying microwave assisted solvent extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 2010:36–41.

Drews A. (2010) Membrane fouling in membrane bioreactors—Characterisation, contradictions, cause and cures. *Journal of membrane science*, 363:1-28.

- Dreywood R. (1946)** Qualitative test for carbohydrates material. *Industrial and Engineering Chemistry and Analytical Edition*, 18, 499
- During R.A., Krahe S., Gath S. (2002)** Sorption Behavior of nonylphenol in terrestrial soils. *Environmental Science and Technology*, 36:4052-4057.
- Eitel A., Scherrer M., Kümmerer K. (2000)** Handling cytostatic drugs. A practical guide, 2th Ed. Kenzingen und Freiburg.
- Ekhart C., Gebretensae A., Rosing H., Rodenhuis S., Beijnen J. H., Huitema A. D. R. (2007)** Simultaneous quantification of cyclophosphamide and its active metabolite 4-hydroxycyclophosphamide in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). *Journal of Chromatography B*, 854:345-349.
- Elovich S.Y., Larinov O.G. (1962)** Theory of adsorption from nonelectrolyte solutions on solid adsorbents. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR*, 11:198-203
- Ely R. L., Hyman M. R., Arp D. J., Guenther R. B., Williamson K. J. (1995)** Cometabolic kinetics model incorporating enzyme inhibition, inactivation and recovery: II. Trichloroethylene degradation experiments. *Biotechnology and bioengineering*, 46:232-245.
- Fatta D., Achilleos A., Nikolaou A., Meriç S. (2007)** Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry*, 26:515–533.
- Feitosa-Felizzola J., Temime B., Chiron S. (2007)** Evaluating on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–ion trap mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of several classes of antibiotics in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1164:95–104.
- Feng Y., Zhang Z., Gao P., Su H., Yu Y., Ren N. (2010)** Adsorption behavior of EE2 (17 α -ethinylestradiol) onto the inactivated sewage sludge: Kinetics, thermodynamics and influence factors. *Journal of Hazardous Materials*, 175:970-976.
- Ferk F., Misík M., Grummt T., Majer B., Fuerhacker M. (2009)** Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward. *Mutation Research*, 672:69-75.
- Fernandez-Fontaina E., Omil F., Lema J. M., Carballa M. (2012)** Influence of nitrifying conditions on the biodegradation and sorption of emerging micropollutants. *Water Research*, 46 :5434–5444.
- Foan L. (2012)** Biosurveillance des retombées atmosphériques à l’aide de bryophytes : Suivi des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) à diverses échelles spatio-temporelles, Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 331 p.
- Fontanals N., Cormack P.A.G., Marce R.M., Borull F. (2010)** Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents: dual-phase materials that improve selectivity and capacity. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29:765–779.
- Forrez I., Boon N., Verstraete W., Carballa M. (2011)** Biodegradation of Micropollutants and Prospects for Water and Wastewater Biotreatment. In: *Comprehensive Biotechnology*, ed. Murray Moo-Young, 6: Environmental Biotechnology and Safety:485–494. 2nd ed.
- Freundlich H. (1926)** *Colloid and Capillary Chemistry*. Methuen, London.
- Frolund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P. H. (1996)** Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, 30:1749-1758.

Frost & Sullivan (2005) Strategic Analysis of the European Membrane Bioreactor Markets (<http://www.frost.com/>, dernière consultation 18/02/2013)

Gabet-Giraud V., Miege C., Herbreteau B., Hernandez-Raquet G., Coquery M. (2010) Development and validation of an analytical method by LCMS/MS for the quantification of estrogens in sewage sludge. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396:1841-1851.

Gander M., Jefferson B., Judd S. (2000) Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment: a review with cost considerations. *Separation and purification Technology*, 18:119-130.

Gao M., Yang M., Li H., Wang Y., Pan F. (2004) Nitrification and sludge characteristics in a submerged membrane bioreactor on synthetic inorganic wastewater. *Desalination*, 170:177-185.

Gao S., Zhang Z.P., Karnes H.T. (2005) Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. *Journal of Chromatography B*, 825:98-110.

Gao J. P., Maguhn, J., Spitzauer, P., Kettrup, A. (1998) Sorption of pesticides in the sediment of the Teufelsweiher pond (Southern Germany). I: Equilibrium assessments, effect of organic carbon content and pH. *Water Research*, 32:1662-1672.

Garcia-Ac A. (2010) Développement de méthodes analytiques pour la détection et la quantification de traces de produits pharmaceutiques dans les eaux du fleuve Saint Laurent, Thèse de Doctorat, Université de Montréal.

Garnier C., Görner T., Lartiges B. S., Abdelouhab S., de Donato P. (2005) Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study. *Water Research*, 39:3044–3054.

Garric J., Ferrari B., (2005) Pharmaceuticals in aquatic ecosystems. Levels of exposure and biological effects: a review. *Revue des Sciences de l'Eau*, 18:307-330.

Garrison A. W., Pope J. D., Allen F. R. (1976) 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, pp. 517–556 Chapter 30.

Gijzen H. J. (2001) Anaerobes, aerobes and phototrophs: A winning team for wastewater management. *Water Science and Technology*, 44:123-132.

Globocan (2008) Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008 (<http://globocan.iarc.fr/>)

Göbel A., Thomsen A., McArdeall C. S., Joss A., Giger W. (2005) Occurrence and Sorption Behavior of Sulfonamides, Macrolides, and Trimethoprim in Activated Sludge Treatment. *Environmental Science and Technology*, 39:3981-3989.

Golet E. M., Xifra I., Siegrist H., Alder A. C., Giger W. (2003) Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environmental Science & Technology*, 37:3243-3249.

Gomez M.J., Malato O., Ferrer I., Agüera A., Fernández-Alba A.R. (2007) Solid-phase extraction followed by liquid chromatography–time-of-flight–mass spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. A pilot monitoring study. *Journal of Environmental Monitoring*, 9:718-729.

Gomez-Canela C., Cortés-Francisco N., Oliva X., Pujol C., Ventura F., Lacorte S., Caixach J. (2012) Occurrence of cyclophosphamide and epirubicin in wastewaters by direct

injection analysis–liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 9:3210-3218.

Gonzalez-Guzman C. (2008) Adsorption de molécules anticancéreuses par des boues activées d'un bioréacteur à membrane. Rapport de Stage Licence Professionnelle «Génie des procédés et environnement», Université Toulouse III.

Grélot A. (2009) Evaluation et comparaison de technologies membranaires innovantes pour les bioréacteurs à membranes. Doctorat de l'Université Montpellier 2.

Grisolia C. K., Cordeiro C. M. T. (2000) Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*, 23:235-239.

Grisolia C.K. (2002) A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research*, 518 :145-150.

Gros M., Petrovic M., 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*, 70:678-690.

Gros M., Petrovic M., Barcelo D. (2009) Tracing Pharmaceutical Residues of Different Therapeutic Classes in Environmental Waters by Using Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Automated Library Searching. *Analytical Chemistry*, 81:898–912.

Gros M., Petrović M., Ginebreda A., Barceló D. (2010) Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment international*, 36:5-26.

Grung M., Kallqvist T., Sakshaug S., Skurtveit S., Thomas K.V. (2008) Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71:328–340.

Haguenoer J.M. (2010) Les résidus de médicaments présentent-ils un risque pour la santé publique? *Santé Publique*, 22:325-342.

Hai F. I., Tessmer K., Nguyen L. N., Kang J., Price W. E., Nghiem L. D. (2011) Removal of micropollutants by membrane bioreactor under temperature variation. *Journal of Membrane Science*, 383:144-151.

Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Liitzhoff H.C. Jorgensen S.E. (1998) Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment-A Review. *Chemosphere*, 36:357-393.

Heggie G.D., Sommadossi, J.-P., Cross D.S., Huster W.J., Diasio R. B. (1987) Clinical Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil and Its Metabolites in Plasma, Urine, and Bile. *Cancer Research*, 47:2203-2206.

Helaleh M.I.H., Al-Omair A., Nisar A., Gevao B. (2005) Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1083:153–160.

Henriques I. D., Love N. G. (2007) The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. *Water Research*, 41:4177-4185.

- Hernandez-Ruiz S., Abrell L., Wickramasekara S., Cheftez B., Chorover J. (2012)** Quantifying PPCP interaction with dissolved organic matter in aqueous solution: Combined use of fluorescence quenching and tandem mass spectrometry, *Water Research*, 46:943-954.
- Hernando M. D., Heath E., Petrovic M. Barcelo D. (2006)** Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. *Analytical and BioAnalytical Chemistry*, 385:985-991.
- Higgins M. J., Novak J. T. (1997)** Characterization of Exocellular Protein and Its Role in Bioflocculation. *Journal of Environmental Engineering*, 123:479-485.
- Hilton, M. J., Thomas, K. V. (2003)** Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1015:129-141.
- Ho Y. S., McKay G. (1999)** Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, 34:451-465.
- Hogenboom A.C., Van Leerdam J.A., De Voogt P. (2009)** Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216:510-519.
- Holbrook R.D., Love N.G., Novak J.T. (2004)** Investigation of Sorption Behavior between Pyrene and Colloidal Organic Carbon from Activated Sludge Processes. *Environmental Science and Technology*, 38:4987-4994.
- Horan N. J. (1989)** Biological wastewater treatment systems: theory and operation. John Wiley & Sons Ltd.
- Hörsing M., Ledin A., Grabic R., Fick J., Tysklind M., la Cour Jansen J., Andersen H.R. (2011)** Determination of sorption of seventy-five pharmaceuticals in sewage sludge. *Water Research*, 45:4470-4482.
- Huang M., Li Y., Gu G. (2008)** The effects of hydraulic retention time and sludge retention time on the fate of di-(2-ethylhexyl) phthalate in a laboratory-scale anaerobic-anoxic-aerobic activated sludge system. *Bioresource Technology*, 99: 8107-8111.
- Hudson N., Baker A., Reynolds D. (2007)** Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters - A review. *River Research and Applications*, 23:631-649.
- Huerta-Fontela M., Galceran M.T., Ventura F. (2010)** Fast liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. *Journal of Chromatography A*, 1217:4212-4222.
- Huerta-Fontela M., Galceran M.T., Ventura F. (2011)** Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research*, 45:1432-1442.
- Huitema A.D.R., Reinders C., Tibben M.M., Rodenhuis S., Beijnen J.H. (2001)** Sensitive gas chromatographic determination of the cyclophosphamide metabolite 2-dechloroethylcyclophosphamide in human plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 757:349-357.
- Hulscher Th. E. M., Cornelissen G. (1996)** Effect of temperature on sorption equilibrium and sorption kinetics of organic micropollutants - a review. *Chemosphere*, 32:609-626.

Hyland K.C., Dickenson E.R.V., Drewes J.E., Higgins C.P. (2012) Sorption of ionized and neutral emerging trace organic compounds onto activated sludge from different wastewater treatment configurations. *Water Research*, 46:1958 – 1968.

IARC (2008) World Cancer Report 2008, Ed. P. Boyle and B. Levin, 512 p. (<http://w2.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/>)

Ifelebuegu A. O., Theophilus S. C., Bateman M. J. (2010) Mechanistic evaluation of the sorption properties of endocrine disrupting chemicals in sewage sludge biomass. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7:617-622.

IMS (2010) (<http://www.imshealth.com>)

INCa (non daté) (<http://www.e-cancer.fr/>)

Ivashechkin P., Corvini P.F.X., Dohmann M. (2004) Behaviour of endocrine disrupting chemicals during the treatment of municipal sewage sludge. *Water Science and Technology*, 50:133-140.

Jacobsen B. N., Nyholm N., Pedersen B. M., Poulsen O., Østfeldt P. (1993) Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: sorption. *Water Research*, 27:1505-1510.

Jelic A., Petrovic M., Barcelo D. (2009) Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Talanta*, 80:363-371.

Jjemba P. K. (2008) Pharma-ecology: the occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products in the Environment. Wiley, Hoboken, NJ, p. 105.

Johir M. A. H., Vigneswaran S., Sathasivan A., Kandasamy J., Chang C. Y. (2012) Effect of organic loading rate on organic matter and foulant characteristics in membrane bio-reactor. *Bioresource Technology*, 113:154–160.

Johnson A. C., Jürgens M. D., Williams R. J., Kümmerer K., Kortenkamp A., Sumpter J. P. (2008) Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology*, 348: 167–175.

Jones O. A. H., Voulvoulis N., Lester J. N. (2005) Human pharmaceuticals in wastewater treatment processes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35:401-427.

Joqueviel C., Martino R., Gilard V., Malet-Martino M., Canal P., Niemeyer U. (1998) Urinary excretion of cyclophosphamide in humans, determined by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Drug Metabolism and Disposition*, 26:418-428.

Jorand F., Zartarian F., Thomas T. (1995) Chemical and structural linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Research*, 29:1639-47.

Joss A., Keller E., Alder A. C., Göbel A., McArdell C. S., Ternes T., Siegrist H. (2005) Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research*, 39:3139-3152.

Joss A., Zabczynski S., Göbel A., Hoffmann B., Löffler D., McArdell C.S., Ternes T.A., Thosen A., Siegrist H. (2006) Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Research*, 40:1686-1696.

Judd S. (2008) The status of membrane bioreactor technology. *Trends in Biotechnology*, 26: 109-116.

- Judd S. (2010)** The MBR book: principles and applications of membrane bioreactors for water and wastewater treatment. Butterworth-Heinemann.
- Kanda R., Griffin P., James. H., Fotherill J. (2003)** Pharmaceutical and personal care products in sewage treatment works. *Journal of Environmental Monitoring*, 5, 823 – 830.
- Katsoyiannis A., Samara C. (2007)** The fate of dissolved organic carbon (DOC) in the wastewater treatment process and its importance in the removal of wastewater contaminants. *Environmental Science and Pollution Research*, 14:284-292.
- Keil F. (2008)** Pharmaceuticals for Human Use: Options of Action for Reducing the Contamination of Waterbodies. *Frankfurt, Germany: ISOE GmbH*, 52 p.
- Kerr K. M., Larson R. J., McAvoy D. C. (2000)** Evaluation of an Inactivation Procedure for Determining the Sorption of Organic Compounds to Activated Sludge. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47:314-322.
- Khunjar W.O., Love. N.G. (2011)** Sorption of carbamazepine, 17 α -ethinylestradiol, iopromide and trimethoprim to biomass involves interactions with exocellular polymeric substances. *Chemosphere*, 82:917-922
- Khunjar W. O., Mackintosh S. A., Skotnicka-Pitak J., Baik S., Aga D. S., Love N. G. (2011)** Elucidating the relative roles of ammonia oxidizing and heterotrophic bacteria during the biotransformation of 17 α -ethinylestradiol and trimethoprim. *Environmental Science & Technology*, 45:3605-3612.
- Kiffmeyer T., Götze H. J., Jursch M., Lüders U. (1998)** Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 361:185-191.
- Kimura K., Hara H., Watanabe Y. (2007)** Elimination of selected acidic pharmaceuticals from municipal wastewater by an activated sledge system and membrane bioreactors. *Environmental Science and Technology*, 41:3708-3714.
- Kisanga E.R., Mellgren G., Lien E.A (2005)** Excretion of Hydroxylated Metabolites of Tamoxifen in Human Bile and Urine. *Anticancer Research*, 25:4487-4492.
- Kosjek T., Heath E. (2011)** Occurrence, fate and determination of cytostotic pharmaceuticals in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 30:1065-1087.
- Kostopoulou M., Nikolaou A. (2008)** Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 27:1023–1035.
- Kovalova L., McArdell C. S., Hollender J. (2009)** Challenge of high polarity and low concentrations in analysis of cytostatics and metabolites in wastewater by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216:1100-1108.
- Kraume M., Drews A. (2010)** Membrane bioreactors in waste water treatment–Status and trends. *Chemical engineering & technology*, 33:1251-1259.
- Kroes R., Galli C., Munro I. (2000)** Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: a practical tool for assessing the need for toxicity testing. *Food and Chemical Toxicology*, 38:255–312.
- Kümmerer K., Al-Ahmad A. (2010)** Estimation of the cancer risk to humans resulting from the presence of cyclophosphamide and ifosfamide in surface water. *Environmental Science and Pollution Research International*, 17:486-496.

Kümmerer K. (2001) Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to others sources – a review. *Chemosphere*, 45: 957-969.

Kümmerer K., Steger-Hartmann T., Meyer M. (1997) Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research*, 31: 2705-2710.

Kümmerer K., Al-Ahmad A. (1997) Biodegradability of the Anti-tumour Agents 5-Fluorouracil, Cytarabine, and Gemcitabine: Impact of the Chemical Structure and Synergistic Toxicity with Hospital Effluent. *Acta Hydrochimica and Hydrobiologica*, 25, 166-172.

Kupper T., de Alencastro L. F., Gatsigazi R., Furrer R., Grandjean D., Tarradellas J. (2008) Concentrations and specific loads of brominated flame retardants in sewage sludge. *Chemosphere*, 71:1173–1180.

Lagergren S. (1898) About the theory of so-called adsorption of soluble substances. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, 24:1-39.

Langford K. H., Thomas K. V. (2009) Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environment International*, 35:766–770.

Langmuir I. (1916) The constitution and fundamental properties of solids and liquids Part 1. Solids. *Journal of American Chemical Society*. 38:2221–2295.

Lapen D.R., Topp E., Metcalfe C.D., Li H., Edwards M., Gottschall N., Bolton P., Curnoe W., Payne M., Beck A. (2008) Pharmaceutical and personal care products in tile drainage following land application of municipal biosolids. *Science of the Total Environment*, 399: 50-65.

Larousse, 2011 (<http://www.larousse.fr/>)

Larssen T.A., Lienert J., Joss A., Siegrist H. (2007) How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Biotechnology*, 113:295–304.

Lau S. L., Stenstrom M. K. (2005) Metals and PAHs adsorbed to street particles. *Water Research*, 39:4083–4092.

Laurent J. (2009) Modifications de la répartition d'espèces métalliques (Cd, Cu) induites par des prétraitements physique (ultrasons), chimique (ozone) et thermique au sein des procédés à boues activées. Thèse de doctorat, Université de Limoges, 296 p.

Laven M., Alsberg T., Yu Y., Adolfsson-Erici M., Sun H. (2009) Serial mixed-mode cation- and anion-exchange solid-phase extraction for separation of basic, neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater and analysis by high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216:49-62.

Lead J. R., Wilkinson K. J. (2006) Aquatic Colloids and Nanoparticles: Current Knowledge and Future Trends. *Environmental Chemistry*, 3:159-171.

Leanos-Castaneda O., Van Der Kraak, G., Lister A., Simá-Alvarez R., Gold-Bouchota G. (2002) *o,p'*-DDT induction of vitellogenesis and its inhibition by tamoxifen in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Marine Environmental Research*, 54:703–707.

Le-Clech P., Chen V., Fane T. A. (2006) Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 284:17-53.

- Lee H. B., Peart T. E., Svoboda M. L., (2007)** Determination of ofloxacin, orfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1139:45-52.
- Lehnberg K., Kovalova L., Kazner C., Wintgens T., Schettgen T., Melin T., Dott W. (2009)** Removal of Selected Organic Micropollutants from WWTP Effluent with Powdered Activated Carbon and Retention by Nanofiltration. *Atmospheric and Biological Environmental Monitoring*, 161.
- Lertpaitoonpan W., Ong SK., Moorman T. B. (2009)** Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. *Chemosphere*, 76:558–564.
- Lesage G. (2009)** Etude de l'élimination de substances aromatiques dangereuses dans un procédé couplant adsorption et biodégradation. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 253 p.
- Lesjean B., Huisjes E. H. (2008)** Survey of the European MBR market: trends and perspectives. *Desalination*, 231:71-81.
- Lesjean B., Tazi-Pain A., Thaire D., Moeslang H., Buisson H. (2011)** Ten persistent myths and the realities of membrane bioreactor technology for municipal applications. *Water science and technology*, 63:32-39.
- Levenberg K. (1944)** A Method for the Solution of Certain Problems in Least Squares. *Quarterly of Applied Mathematics*, 2:164-168
- Li Y., Wang L., Liao L., Sun L., Zheng G., Luan J., Gu G. (2010)** Nitrate-dependent biodegradation of quinoline, isoquinoline, and 2-methylquinoline by acclimated activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 173:151-158.
- Liao B.Q., Allen D.G., Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S. N. (2001)** Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Research*, 35:339-350.
- Liao B.Q., Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S.N. (2006)** Effect of solids retention time on structure and characteristics of sludge flocs in sequencing batch reactors. *Water Research*, 40:2583-2591.
- Ligue Contre le Cancer (2009)** (<http://www.ligue-cancer.net/article/publications/brochures-cancers>)
- Limousin G., Gaudet J.P., Charlet L., Szenknect S., Barthe V., Krimissa M. (2007)** Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*, 22:249-275.
- Lindblom E., Press-Kristensen K., Vanrolleghem, P. A., Mikkelsen P. S., Henze M. (2009)** Dynamic experiments with high bisphenol-A concentrations modelled with an ASM model extended to include a separate XOC degrading microorganism. *Water Research*, 43: 3169-3176.
- Liu X., Zhang J., Yin J., Duan H., Wu Y. (2010)** Analysis of hormone antagonists in clinical and municipal wastewater by isotopic dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396:2977-2985.
- Llewellyn N., Lloyd P., Jurgens M.D., Johnson A.C. (2011)** Determination of cyclophosphamide and ifosfamide in sewage effluent by stable isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218:8519-8528.

- Luque-Garcia J. L., Luque de Castro M. D. (2003)** Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22:41-47.
- Magner J. A., Alsberg T. E., Broman D. (2009)** Bag-SPE—a convenient extraction method for screening of pharmaceutical residues in influent and effluent water from sewage treatment plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395:1481-1489.
- Mahnik S.N., Lenz K., Weiddenbacher N., Mader R.M., Fuerhacker M. (2007)** Fate of 5-fluorouracil, doxorubicin, epirubicin, and daunorubicin in hospital wastewater and their elimination by activated sludge and treatment in a membrane-bio-reactor system. *Chemosphere*, 66:30-37.
- Mahnik S.N., Rizovski B., Fuerhacker M., Mader R. (2004)** Determination of 5-fluorouracil in hospital effluents. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380:31-35.
- Majewsky M., Gallé T., Yargeau V., Fischer K. (2011)** Active heterotrophic biomass and sludge retention time (SRT) as determining factors for biodegradation kinetics of pharmaceuticals in activated sludge. *Bioresource Technology*, 102:7415-7421.
- Marrot B., Barrios-Martinez A., Moulin P., Roche N. (2006)** Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 30:174-183.
- Martinez-Moral M.P., Tena M.T. (2011)** Focused ultrasound solid–liquid extraction and selective pressurised liquid extraction to determine bisphenol A and alkylphenols in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 34:2513–2522.
- Maskaoui K., Zhou J.L. (2010)** Colloids as a sink for certain pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 17:898-907.
- Massé A. (2004)** Bioréacteur à membranes immergées pour le traitement des eaux résiduaires urbaines : spécificités physico-chimiques du milieu biologique et colmatage. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Matsumoto F., Colus I. (2000)** Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetic and Molecular Biology*, 23:489-492.
- Matter-Müller C., Gujer W., Giger W., Strumm W. (1980)** Nonbiological elimination mechanisms in a biological sewage treatment plant. *Programme of Water Technology*, 12:299-314.
- Maurer M., Escher B.I., Rihle P., Schaffner C., Alder A.C. (2007)** Elimination of b-blockers in sewage treatment plants. *Water Research*, 41:1614-1622.
- McArdell C.S., Kovalova L., Siegrist H., Kienle C., Moser R., Schwartz T. (2011)** Input and Elimination of Pharmaceuticals and Disinfectants from Hospital Wastewater. Final Report, Eawag (Dübendorf, Switzerland), 95 pages.
- McClure E. L., Wong C. S. (2007)** Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1169:53–62
- Meesters R. J. W., Schroder H. F. (2002)** Simultaneous Determination of 4-Nonylphenol and Bisphenol A in Sewage Sludge. *Analytical Chemistry*, 74:3566–3574.
- Menet M. C. (2011)** Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2001:41–53.

- Meredith-Williams M., Carter L. J., Fussell R., Raffaelli D., Ashauer R., Boxall A. B. A. (2012)** Uptake and depuration of pharmaceuticals in aquatic invertebrates. *Environmental Pollution*, 165:250–258.
- Metcalf C. D., Miao X. S., Koenig B. G., Struger J. (2003)** Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental and Toxicological Chemistry*, 22:2881-2889.
- Miao X. S., Metcalfe C. D. (2007)** Analysis of neutral and acidic pharmaceuticals by liquid chromatography mass spectrometry (LC–MS, LC–MS/MS). In: Petrovic, M., Barcelo, D. (Eds.), *Analysis, Fate and Removal of Pharmaceuticals in the Water Cycle*. Elsevier, pp. 5–158.
- Miège C., Choubert J. M., Ribeiro L., Eusèbe M., Coquery M. (2009)** Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. *Environmental Pollution*, 157:1721–1726.
- Miège C., Dugay J., Hennion M. C. (2003)** Optimization, validation and comparison of various extraction techniques for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 995:87–97.
- Mitra S., Brukh R. (2003)** Sample preparation: an analytical perspective. In S. Mitra (Ed.), *Sample preparation techniques in analytical chemistry* (pp. 1–36). New York, NY: John Wiley and Sons, Inc.
- Moldovan Z. (2006)** Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere*, 64:1808-1817.
- Monteith H. D., Parker W. J., Bell J. P., Melcer H. (1995)** Modeling the fate of pesticides in municipal wastewater treatment. *Water Environment Research*, 67:964-970.
- Mulot J. U., Boukari S., Delmont A., Karolak S., Levi Y., Mazellier P. (2008)** Stratégie d'évaluation de la contamination d'effluents hospitaliers et urbains par des molécules anticancéreuses. 18^{ème} journée information Eaux, Poitiers, France, 23-25 septembre 2008.
- Mulot J-U. (2009)** Modélisation des flux de médicaments dans les effluents hospitaliers. Thèse de doctorat, Université Paris-Sud 11, 334 p.
- Nakano E., Watanabe L. C., Ohlweiler F. P., Pereira C. A. B., Kawano T. (2003)** Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). *Mutation Research*, 536:145-154.
- Nebot C., Gibb S. W., Boyd K. G. (2007)** Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 598:87-94.
- Nielsen P. H., Thomsen T. R., Nielsen J. L. (2004)** Bacterial composition of activated sludge - importance for floc and sludge properties. *Water Science and Technology*, 49:51-58.
- Nieto A. (2010)** Emerging organic contaminants in sewage sludge. Thèse de doctorat, Universitat Rovira i Virgili, 307 p.
- Nieto A., Borrull F., Marce R.M., Pocurull E. (2009)** Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216:5619-5625.
- Nieto A., Borrull F., Pocurull E., Marcé R.M. (2007)** Pressurized liquid extraction of pharmaceuticals from sewage-sludge. *Journal of Separation Science*, 30: 979–984.

- Nollet H., Roels M., Lutgen P., Van der Meeren P., Verstraete P. (2003)** Removal of PCBs from wastewater using fly ash. *Chemosphere*, 53:655–665.
- Nussbaumer S., Bonnabry P., Veuthey J.L., Fleury-Souverain S. (2011)** Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta*, 85:2265-2289.
- Okuda T., Yamashita N., Tanaka H., Matsukawa H., Tanabe K. (2009)** Development of extraction method of pharmaceuticals and their occurrences found in Japanese wastewater treatment plants. *Environment International*, 35:815-820.
- Oliveira P. (2012)** Caractérisation de suspensions biologiques par morphogranulométrie. Rapport de stage (Laboratoire de Génie Chimique), Université Fédérale de Rio Grande, 62 p.
- Onesios K. M., Yu J. T., Bouwer E. J. (2009)** Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation*, 20:441-466.
- Ort C., Lawrence M. G., Reungoat J., Eaglesham G., Carter S., Keller J. (2010)** Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. *Water Research*, 44:605–615.
- Ottmar K. J., Colosi L. M., Smith J. A. (2012)** Fate and transport of atorvastatin and simvastatin drugs during conventional wastewater treatment. *Chemosphere*, 88:1184–1189.
- Paci A., Rieutord A., Brion F., Prognon P. (2001)** Separation methods for alkylating antineoplastic compounds. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 764:255-287.
- Paffoni C., Welte B., Gousailles M., Montiel A. (2006)** New molecules involved by the european directives: from wastewater to drinking water treatment plants. *European Journal of Water Quality*, 37:21-38
- Pagano G., de Biase A., Deeva IB, Degan P, Doronin Y K., IaccarinoM., Oral R, Trieff NM., Warnau M., Korkina L.G (2001)** The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life Sciences*, 68:1735–1749.
- Pan B., Ning P., Xing B. (2009)** Part V—sorption of pharmaceuticals and personal care products. *Environmental Science and Pollution Research*, 16:106-116.
- Park I. S., Oh H. S., Koo J. G. (2003)** Effect of oral tamoxifen on growth and survival in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco*. *Aquaculture Research*, 34:1471–1474.
- Peev M., Schönerklee M., De Wever H. (2004)** Modelling the degradation of low concentration pollutants in membrane bioreactors. *Water Science and Technology*, 50:209-218.
- Pena A., Paulo M., Silva L. J. G., Seifrtová M., Lino C. M., Solich P. (2010)** Tetracycline antibiotics in hospital and municipal wastewaters: a pilot study in Portugal. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396:929-2936.
- Pereira A. (2012)** Caractérisation et fractionnement de boues de station d'épuration dans le cadre du projet BioMedBoue. Rapport d'avancement, Laboratoire de Biotechnologies de l'Environnement, 38 p.
- Petrovic M., Gros M., Barcelo D. (2006)** Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1124:68-81.

- Plosz B.G., Leknes H., Thomas K.V. (2010)** Impacts of Competitive Inhibition, Parent Compound Formation and Partitioning Behavior on the Removal of Antibiotics in Municipal Wastewater Treatment. *Environmental Science & Technology*, 44:734-742.
- Pollice A., Laera G., Blonda M. (2004)** Biomass growth and activity in a membrane bioreactor with complete sludge retention. *Water Research*, 38:1799-1808.
- Pomati F., Orlandi C., Clerici M., Luciani F., Zuccato E. (2008)** Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicological Sciences*, 102:129–137.
- Pomiès M., Choubert J. M., Wisniewski C., Coquery M. (2013)** Modelling of micropollutant removal in biological wastewater treatments: A review. *Science of the Total Environment*, 443:733-748.
- Quintana J. B., Rodil R., 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*, 1061:19-26.
- Radjenovic J., Petrovic M., Barcelo D. (2009)** Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*, 43:831 – 841.
- Ramesh A., Lee D. J., Hong S. G. (2006)** Soluble microbial products (SMP) and soluble extracellular polymeric substances (EPS) from wastewater sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73:219-225.
- Ren R., Liu D., Li K., Sun, J., Zhang C. (2011)** Adsorption of Quaternary Ammonium Compounds onto Activated Sludge. *Journal of Water Resource and Protection*, 3(2), 105-113.
- Ren Y.-X., Nakano K., Nomura M., Chiba N., Nishimura O. (2007)** A thermodynamic analysis on adsorption of estrogens in activated sludge process. *Water Research*, 41:2341-2348.
- Ribeiro A. R., Afonso C. M., Castro P. M., Tiritan M. E. (2013)** Enantioselective biodegradation of pharmaceuticals, alprenolol and propranolol, by an activated sludge inoculum. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 87:108–114.
- Roberts P. H., Thomas K. V. (2006)** The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*, 356:143-153.
- Rodriguez-Cea A., Ayllon F., Garcia-Vazquez E. (2003)** Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicological and Environmental Safety*, 56:442–448.
- Rouquerol J., Rouquerol F., Sing K. S. (1998)** Absorption by powders and porous solids. Academic press.
- Rowney N. C., Johnson A. C., Williams R. J. (2009)** Cytotoxic drugs in drinking water: a prediction and risk assessment exercise for the Thames catchment in the United Kingdom. *Environmental and Toxicological Chemistry*, 28:2733–2743.
- Ruhoy I.S., Daughton C.G. (2007)** Types and quantities of leftover drugs entering the environment via disposal to sewage - Revealed by coroner records. *Science of the Total Environment*, 388:137–148.

- Ruiz T., Wisniewski C., Kaosol T., Persin F. (2007)** Influence of organic content in dewatering and shrinkage of urban residual sludge under controlled atmospheric drying. *Process Safety and Environmental Protection*, 85:104-110.
- Runnqvist H., Bak S.A., Hansen M., Styrihave B., Halling-Sorensen B., Bjorklund E. (2010)** Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction—Are we developing sound extraction methods? *Journal of Chromatography A*, 1217:2447-2470.
- Sabourin L., Beck A., Duenik P. W., Kleywegt S., Lapen D. R., Li H., Metcalfe C. D., Payne M., Topp E. (2009)** Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of dewatered municipal biosolids to an agricultural field. *Science of the total Environment*, 407:4596–4604.
- Sacher F., Lange F. T., Brauch H. J., Blankenhorn I. (2001)** Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A*, 938:199-210.
- Saggadi H. (2009)** Développement d'une méthode analytique de dosage du cyclophosphamide dans des matrices solides et liquides. Rapport de Master 2 Recherche Génie des Procédés et de l'Environnement, Institut National Polytechnique de Toulouse, 51 p.
- Saleh A., Larsson E., Yamini Y., Jonsson J. A. (2011)** Hollow fiber liquid phase microextraction as a preconcentration and clean-up step after pressurized hot water extraction for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in sewage sludge. *Journal of Chromatography A*, 1218: 1331-1339.
- Santos M. A., Pacheco M. (1995)** Mutagenicity of cyclophosphamide and kraft mill effluent and sediment on the eel *Anguilla anguilla* L. *Science of the Total Environment*, 171:127–130.
- Sauvignet P., Mechouk C. (2010)** Elimination de la matière organique naturelle (MON) utilisant l'ACTIFLO® CARB sur une eau de nappe alluviale de Loire (49). Communication écrite, Proceedings JIE Poitiers, 14 p.
- Schecker J., Al-Ahmad A., Schecker J., Bauer M., Zellmann H., Kümmerer K. (1998)** Elimination des Zytostatikums Ifosfamid während der simulierten Zersetzung von Hausmüll im Labormaßstab. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 10:339-344.
- Schulman L. J., Sargent E. V., Naumann B. D., Faria E. C., Dolan D. G., Wargo J. P., (2002)** A Human Health Risk Assessment of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment. *Human Ecological Risk Assessment*, 8:657-680.
- Schuster A., Hädrich C., Kümmerer K. (2008)** Flows of Active Pharmaceutical Ingredients Originating from Health Care Practices on a Local, Regional, and Nationwide Level in Germany—Is Hospital Effluent Treatment an Effective Approach for Risk Reduction? *Water Air and Soil Pollution*, 457-471.
- Schwarzenbach R. P., Gschwend P. M., Imboden D. (2003)** Environmental Organic Chemistry, 2nd Edition, Wiley Interscience, New Jersey.
- Semple K. T., Doick K. J., Jones K. C., Burauel P., Craven A., Harms H. (2004)** Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science and Technology*, 38:228–231.
- Sheng G. P., Zhang M. L., Yu H. Q. (2008)** Characterization of adsorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sludge. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62:83-90.

- Singh R., Singh A. K., Tripathi M. (2012)** Effect of a non steroidal tamoxifen on the gonad and sex differentiation in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Environmental Biology*, 33:799-803.
- Sipma J., Osuna B., Collado N., Monclús H., Ferrero G., Comas J., Rodriguez-Roda I. (2010)** Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems. *Desalination*, 250:653-659.
- Smyth S. A., Lishman L., Alaei M., Kleywegt S., Svoboda L., Yang J., Lee H., Seto P. (2007)** Sample storage and extraction efficiencies in determination of polycyclic and nitro musks in sewage sludge. *Chemosphere*, 67:267–275.
- Snyder S. A., Adham S., Redding A. M., Cannon F. S., DeCarolis J., Oppenheimer J., Yoon Y. (2007)** Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination*, 202:156-181.
- Sobeck D. C., Higgins M. J. (2002)** Examination of Three Theories for Mechanisms of Cation-Induced Bioflocculation. *Water Research*, 36:527-538.
- Stasinakis A. S., Kordoutis C. I., Tsiouma V. C., Gatidou G., Thomaidis N. S. (2010)** Removal of selected endocrine disruptors in activated sludge systems: Effect of sludge retention time on their sorption and biodegradation. *Bioresource Technology*, 101:2090–2095.
- Steger-Hartmann T., Kümmerer K., Hartmann A. (1997)** Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36:174-179.
- Steger-Hartmann T., Kümmerer K., Schecker J. (1996)** Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two-step solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 726:179-184.
- Stevens-Garmon J., Drewes J.E., Khan S.J., McDonald J.A., Dickenson E.R.V. (2011)** Sorption of emerging trace organic compounds onto wastewater sludge solids. *Water Research*, 45:3417-3426.
- Stolker A. A. M., Niesing W., Hogendoorn E. A., Versteegh J. F. M., Fuchs R., Brinkman U. A. 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*, 378:955-963.
- Straub J. O. (2002)** Environmental risk assessment for new human pharmaceuticals in the European Union according to the draft guideline/discussion paper of January 2001. *Toxicological Letters*, 135:231-237.
- Suarez S., Lema J. M., Omil F. (2010)** Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Research*, 44:3214-3224.
- Summerhayes M. (2003)** The impact of workload changes and staff availability on IV chemotherapy services. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 9:123-128.
- Sun L., Zha J., Spear P. A., Wang Z. (2007)** Tamoxifen effects on the early life stages and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24:23–29.

- Sun K., Jin J., Gao B., Zhang Z., Wang Z., Pan Z., Zhao Y. (2012)** Sorption of 17 α -ethinyl estradiol, bisphenol A and phenanthrene to different size fractions of soil and sediment. *Chemosphere*, 88:577–583.
- Tadkaew N., Hai F. I., McDonald J. A., Khan S. J., Nghiem L. D. (2011)** Removal of trace organics by MBR treatment: The role of molecular properties. *Water Research*, 45:2439-2451.
- Tadkaew N., Sivakumar M., Khan S. J., McDonald J. A., Nghiem L. D. (2010)** Effect of mixed liquor pH on the removal of trace organic contaminants in a membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 101:1494-1500.
- Tan B. L. L., Hawker D. W., Muller J. F., Leusch F. D. L., Tremblay L. A., Chapman H. F. (2007)** Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia *Environment International*, 33:654-66.
- Tarcomnicu I., Van Nuijs A. L. N., Simons W., Bervoets L., Blust R., Jorens P. G., Neels H., Covaci A. (2011)** Simultaneous determination of 15 top-prescribed pharmaceuticals and their metabolites in influent wastewater by reversed-phase liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 83:795-803.
- Tauxe Wursch A. (2005)** Wastewaters: occurrence of pharmaceutical substances and genotoxicity. Thèse de doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, 263 p.
- Ternes T. A., Bonerz M., Herrmann N., Löffler D., Keller E., Lacida B. B. (2005a)** Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC/tandem MS and GC/MS. *Journal of Chromatography A*, 1067:213-223
- Ternes T.A. (1998)** Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and river. *Water Research*, 32:3245-3260.
- Ternes T.A., Herrmann N., Bonerz M., Knacker T., Siegrist H., Joss A. (2004)** A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Research*, 38:4075-4084.
- Ternes T., Joss A., Kreuzinger N., Miksch K., Lema J. M., Gunten U. V., Siegrist H. (2005b)** Removal of pharmaceuticals and personal care products: results of the Poseidon project. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2005:227-243.
- Thomas K. V., Hilton M. J. (2004)** The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 49:436-444.
- Tulp H. G., Fenner K., Schwarzenbach R. P., Goss K. U. (2009)** pH-Dependent Sorption of Acidic Organic Chemicals to Soil Organic Matter. *Environmental Science & Technology*, 43:9189-9195.
- Tunkel J., Howard P. H., Boethling R. S., Stiteler W., Loonen H. (2000)** Predicting ready biodegradability in the Japanese Ministry of International Trade and Industry test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19:2478-2485.
- Ud-Daula A., Pfister G., Schramm K.-W. (2012)** 5-Fluorouracil Accumulation in Green Microalgae and its Biogenetic Transfer into Ciliate Protozoan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88:548-554.
- Ueda T., Hata K. (1999)** Domestic wastewater treatment by a submerged membrane bioreactor with gravitational filtration. *Water Research*, 33:2888-2892.

- Uruse, T., Kikuta T. (2005)** Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Research*, 39: 1289-1300.
- Valcarcel Y., González Alonso S., Rodríguez-Gil J. L., Gil A., Catalá M. (2011)** Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere*, 84:1336–1348.
- Van Kaam R. (2005)** Bioréacteur à membranes immergées pour le traitement d'eaux usées domestiques : influence des conditions de filtration et de l'hydrodynamique sur les performances du procédé, Thèse doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 213 p.
- Vega-Morales T., Sosa-Ferrera Z., Santana-Rodríguez J.J. (2011)** Determination of various estradiol mimicking-compounds in sewage sludge by the combination of microwave-assisted extraction and LC–MS/MS. *Talanta*, 85:1825–1834.
- Verlicchi P., Al Aukidy M., Galletti A., Petrovic M., Barceló D. (2012)** Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 430:109-118.
- Verliefde A., Cornelissen E., Amy G., Van der Bruggen B., Van Dijk H. (2007)** Priority organic micropollutants in water sources in Flanders and the Netherlands and assessment of removal possibilities with nanofiltration. *Environmental Pollution*, 146:281–289.
- Vieno N. M., Tuhkanen T., Kronberg L. (2005)** Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. *Environmental Science & Technology*, 39:8220-8226.
- Vieno N., Tuhkanen T., Kronberg L. (2007)** Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research*, 41:1001-1012.
- Vieno N.M., Tuhkanen T., Kronberg L. (2006)** Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1134: 101-111.
- Villain M. (2012)** Bioréacteurs à membranes pour le traitement d'eaux usées domestiques : influence des conditions environnementales et opératoires sur l'activité des biomasses et le transfert de matière, Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille, 249 p.
- Vinken R., Höllrigl-Rosta A., Schmidt B., Schäffer A., Corvini P. F. (2004)** Bioavailability of a nonylphenol isomer in dependence on the association to dissolved humic substances. *Water Science and Technology*, 50:277-283.
- Wan H. B., Wong M. K. (1996)** Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 754:43–47.
- Wang J., Huang C. P., Allen H. E., Poesponegoro I., Poesponegoro H., Takiyama L. R. (1999)** Effects of Dissolved Organic Matter and pH on Heavy Metal Uptake by Sludge Particulates Exemplified by Copper(II) and Nickel(II): Three-Variable Model. *Water Environment Research*, 71:139-147.
- Wang L., Albasi C., Faucet-Marquis V., Pfohl-Leszkowicz A., Dorandeu C., Marion B., Causserand C. (2009)** Cyclophosphamide removal from water by nanofiltration and reverse osmosis membrane. *Water Research*, 43:4115-4122.
- Wang Y., Mu Y., Zhao Q. B., Yu H. Q. (2006)** Isotherms, kinetics and thermodynamics of dye biosorption by anaerobic sludge. *Separation and Purification Technology*, 50:1-7.

- Webb S., Ternes T., Gibert M., Olejniczak K. (2003)** Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. *Toxicological Letters*, 142:157-167.
- Weber J. Jr, Di Giano F.A. (1996)** *Process dynamics in environmental systems*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 943 Pages.
- Weiss S., Reemtsma T. (2008)** Membrane bioreactors for municipal wastewater treatment—A viable option to reduce the amount of polar pollutants discharged into surface waters?. *Water Research*, 42:3837-3847.
- Weissbrodt D., Kovalova L., Ort C., Pazhepurackel V., Moser R., Hollender J., Siegrist H., Mc Ardell C. (2009)** Mass flows of x-ray contrast media and cytostatics in hospital wastewater. *Environmental Science and Technology*, 43:4810-4817.
- Wick A., Fink G., Joss A., Siegrist H., Ternes T.A. (2009)** Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment. *Water Research*, 43:060–1074.
- Wick A., Marincas O., Moldovan Z., Ternes T.A. (2011)** Sorption of biocides, triazine and phenylurea herbicides, and UV-filters onto secondary sludge. *Water Research*, 45, 3638 - 3652
- Wilén B. M., Nielsen J. P., Keiding K., Nielsen P. H. (2000)** Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18:145–156.
- Williams T. D., Caunter J. E., Lillierap A. D., Hutchinson T. H., Gillings E. G., Duffell S. (2007)** Evaluation of the reproductive effects of tamoxifen citrate in partial and full life-cycle studies using fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26:695–707.
- Winter M. J., Ellis L. C. J., Hutchinson T. H. (2007)** Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 629:89–99.
- Wisniewski C., Grasmick A., Leon Cruz A. (2000)** Critical particle size in membrane bioreactors: Case of a denitrifying bacterial suspension. *Journal of Membrane Science*, 178: 141-150.
- Xie H. (2012)** Occurrence, Ecotoxicology, and Treatment of Anticancer Agents as Water Contaminants. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, S2:002. doi:10.4172/2161-0525.S2-002
- Xing C. H., Qian Y., Wen X. H., Wu W. Z., Sun D. (2001)** Physical and biological characteristics of a tangential-flow MBR for municipal wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 191:31-42.
- Xu K., Harper Jr. W. F., Zhao D. (2008)** 17 α -Ethinylestradiol sorption to activated sludge biomass: Thermodynamic properties and reaction mechanisms. *Water Research*, 42:3146-3152.
- Xue W., Wu C., Xiao K., Huang X., Zhou H., Tsuno H.i, Tanaka H. (2010)** Elimination and fate of selected micro-organic pollutants in a full-scale anaerobic/anoxic/aerobic process combined with membrane bioreactor for municipal wastewater reclamation. *Water Research*, 44:5999-6010.

- Yamamoto K., Hiasa M., Mahmood T., Matsuo T. (1989)** Direct solid-liquid separation using hollow fiber membrane in an activated sludge aeration tank. *Water Science & Technology*, 21:43-54.
- Yamamoto H., Hayashi A., Nakamura Y., Sekizawa J. (2005)** Fate and partitioning of selected pharmaceuticals in aquatic environment. *Environmental Sciences*, 12:347-358.
- Yang S. F., Lin C. F., Lin A. Y., Hong P. K. (2011)** Sorption and biodegradation of sulphonamide antibiotics by activated sludge: experimental assessment using batch data obtained under aerobic conditions. *Water Research*, 45:3389-3397.
- Yang S. F., Lin C. F., Wu C. J., Ng K. K., Lin A., Hong P. K. (2012)** Fate of sulfonamide antibiotics in contact with activated sludge—Sorption and biodegradation. *Water Research*, 46:1301–1308
- Yi T., Harper J. W., Holbrook R., Love, N. (2006)** Role of particle size and ammonium oxidation in removal of 17 α -ethinylestradiol in bioreactors. *Journal of Environmental Engineering*, 132:1527-1529.
- Yi T., Harper Jr W.F. (2007)** The effect of biomass characteristics on the partitioning and sorption hysteresis of 17 α -ethinylestradiol. *Water Research*, 41: 1543-1553.
- Yin J., Shao B., Zhang J., Li K. (2010)** A Preliminary Study on the Occurrence of Cytostatic Drugs in Hospital Effluents in Beijing, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84:39-45.
- Yu J. Y., Bouwer E. J., Coelhan M. (2006)** Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural Water Management*, 86:72-80.
- Załęska-Radziwiłł M., Lebkowska M., Affek K., Zarzeczna A. (2011)** Environmental risk assessment of selected pharmaceuticals present in surface waters in relation to animals. *Archives of Environmental Protection*, 37:31-42.
- Zaviska F., Drogui P., Grasmick A., Azais A., Heran M. (2012)** Nanofiltration membrane bioreactor for removing pharmaceutical compounds. *Journal of Membrane Science*, 429:121-129.
- Zhang J., Chang V. W., Giannis A., Wang J. Y. (2013)** Removal of cytostatic drugs from aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment*, 445:281-298.
- Zhang Z. L., Zhou J. L. (2007)** Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1154:205-213.
- Zhao J., Li Y., Zhang C., Zeng Q., Zhou Q. (2008)** Sorption and degradation of bisphenol A by aerobic activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 155:305-311.
- Zheng X., Zhou Y., Chen S., Zheng H., Zhou C. (2010)** Survey of MBR market: Trends and perspectives in China. *Desalination*, 250:609-612.
- Zhou J. L., Zhang Z. L., Banks E., Grover D., Jiang J. Q. (2009)** Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. *Journal of Hazardous Materials*, 166:655–661.
- Zini S., Modelon H., Catastini C., Teyssandier M., Westerberg E., Ormsby J. N. (2008)** Les rejets hospitaliers. Colloque « résidus de médicaments dans l'eau : des molécules à surveiller ? des risques à évaluer ? », 1er octobre 2008, Paris, France.

Zorita S. (2008) Analytical method development for ultra-trace determination of human pharmaceuticals in aqueous sample – Assessing the performance of an STP. Thèse de doctorat, Université de Lünd (Suède), 80 p.

Zoukova R., Kovalova L., Blaha L., Dott W. (2010) Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites. *Chemosphere*, 81:253–260.

Zoukova R., Odráška P., Doležalová L., Hilscherová K., Maršálek B., Bláha L. (2007) Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26:2208–2214.

Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R. (2000) Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet*, 355:1789-1790.

Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli, R. (2005) Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 122:205-209.

Zuloaga O., Navarro P., Bizkarguenaga E., Iparraguirre A., Vallejo A., Olivares M., Prieto A. (2012) Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Analytica Chimica Acta*, 736:7-29.

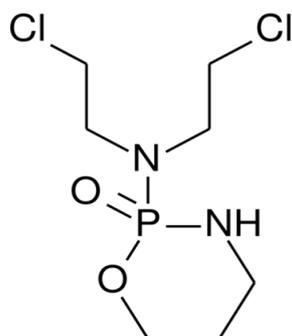
Zurita J.L., Jos A., Cameán A.M., Salguero M., López-Artíguez M., Repetto G. (2007) Ecotoxicological evaluation of sodium fluoroacetate on aquatic organisms and investigation of the effects on two fish cell lines. *Chemosphere*, 67:1–12.

ANNEXES

Annexe A. Propriétés physico-chimiques des molécules ciblées – Partie I	277
Annexe B. Propriétés physico-chimiques des molécules ciblées – Partie II.....	279
Annexe C. Synthèse des méthodes analytiques pour l’analyse de molécules ciblées dans les matrices environnementales	281
Annexe D. Plan d’expériences – Analyse des résidus pour IFO.....	283
Annexe E. Plan d’expériences – Analyse des résultats pour CP.....	285
Annexe F. Comparaison des rendements des différentes étapes de la procédure pour la phase solide pour IFO et CP.....	289
Annexe G. Considérations sur la solution de dopage pour IFO.....	291
Annexe H. Identification des limites de la modélisation – Système diphasique	293
Annexe I. Représentation des résultats pour le calage du système triphasique sur l’ensemble du domaine étudié pour IFO et CP.....	297
Annexe J. Données brutes sur la caractérisation physico-chimique des différentes fractions des boues étudiées	299
Annexe K. Traduction des données brutes pour la phase aqueuse des boues sous forme de graphes	301
Annexe L. Procédure de nettoyage et de détermination de la perméabilité de la membrane.....	303
Annexe M. Profils des MES/MVS, DCO, Azote total et DCM pour l’ERU sur toute la campagne.....	305
Annexe N. Evolution des concentrations en DCO et Azote total dans l’eau d’alimentation, ainsi que des charges volumiques et massiques associées	307
Annexe O. Récapitulatif des concentrations en CP aux bornes du BAME, des débits et des concentrations en MES et MVS pendant la campagne de contamination.....	309
Annexe P. Exemple de calcul de bilan aux bornes du pilote de bioréacteur à membrane.....	311
Annexe Q. Profils de concentration obtenus pour les paramètres physico-chimiques et micropolluants lors de l’ultrafractionnement de la phase aqueuse.....	315

Annexe A. Propriétés physico-chimiques des molécules ciblées – Partie I

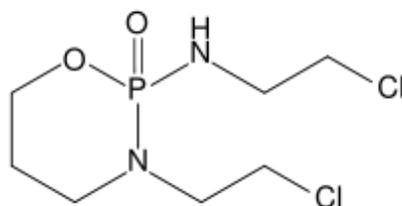
Tableau A-1 : Carte d'identité du cyclophosphamide CP



N° CAS	50 – 18 – 0
Masse molaire moléculaire	261,1 g/mol
pKa ^a	2,8
Température de fusion ^b	49 – 53 °C
Température de dégradation	90 °C
Température d'ébullition ^d	336 °C
Solubilité dans l'eau à 20-25 °C	10 – 50 g/l ^b 40 g/l ^c
Densité ^d	1,479 g/cm ³
Log K _{ow} ^b	0,63
Pression de vapeur à 25 °C ^b	4,45E ⁻⁰⁵ mm Hg
Constante de Henry à 25 °C ^c	1,40E ⁻¹¹ atm.m ³ /mol
Consommation en France ^e (pour l'année 2008)	~300 kg 9 ^{ème} (/90) le plus consommé

a : Laven *et al.* (2009) ; b : Johnson *et al.* (2008)c : <http://sis.nlm.nih.gov> ; d : www.chemicalbook.come : Besse *et al.* (2012)

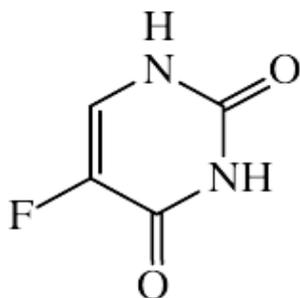
Tableau A-2 : Carte d'identité de l'ifosfamide IFO



N° CAS	3778 – 73 – 2
Masse molaire moléculaire	261,1 g/mol
pKa ^a	1,4 – 3,5
Température de fusion ^a	39 – 41 °C
Température d'ébullition ^b	353 °C
Solubilité dans l'eau à 20-25 °C ^a	3,78 g/L
Densité ^b	1,334 g/cm ³
Log K _{ow} ^a	0,86
Pression de vapeur à 25 °C ^b	8,15E ⁻⁰⁵ mm Hg
Constante de Henry à 25 °C ^b	1,36E ⁻¹¹ atm.m ³ /mol
Consommation en France ^c (pour l'année 2008)	~100 kg 17 ^{ème} (/90) le plus consommé

a : Tauxe Wursch (2005) ; b : <http://www.chemspider.com>c : Besse *et al.* (2012)

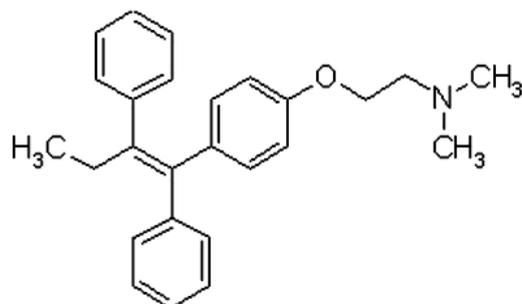
Tableau A-3 : Carte d'identité du 5-fluorouracile 5-FU



N° CAS	51 – 21 – 8
Masse molaire moléculaire	130,1 g/mol
pKa ^c	8,02
Température d'ébullition	190 – 200 °C
Température de fusion ^a	283 °C
Solubilité dans l'eau à 20-25 °C ^a	1- 11 g/l
Log K _{ow} ^a	-0,89
Pression de vapeur à 25 °C ^a	2,68E ⁻⁰⁶ mm Hg
Constante de Henry à 25 °C ^b	1,66E ⁻¹⁰ atm.m ³ /mol
Consommation en France ^d (pour l'année 2008)	~1750 kg 3 ^{ème} (/90) le plus consommé

a : Johnson *et al.* (2008) ; b : <http://chem.sis.nlm.gov>c : Tauxe Würsch (2005) ; d : Besse *et al.* (2012)

Tableau A-4 : Carte d'identité du tamoxifène TAM / citrate de tamoxifène



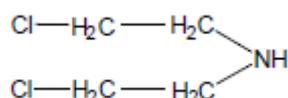
N° CAS	10540 – 29 – 1 / 54965 – 24 – 1
Masse molaire moléculaire	371,5 g.mol ⁻¹ / 563,6 g.mol ⁻¹
pKa ^a	8,85
Température de fusion ^a	97 °C / 140 – 142 °C
Solubilité dans l'eau à 37 °C ^a	0,5 g/l
Log K _{ow} ^a	6,3
Pression de vapeur à 25 °C ^b	3,46E ⁻⁰⁸ mm Hg
Constante de Henry à 25 °C ^b	4,49E ⁻¹⁰ atm.m ³ /mol
Consommation en France ^c (pour l'année 2008)	~300 kg 8 ^{ème} (/90) le plus consommé

a : Tauxe Würsch (2005) ; b : <http://www.chemspider.com>c : Besse *et al.* (2012)

Ces quatre molécules regroupent à elles seules plus de 80 % des publications scientifiques traitant de l'occurrence de produits anticancéreux dans les matrices environnementales. D'après les données de consommation, d'excrétion et d'élimination (en STEP) de ces médicaments, Besse *et al.* (2012) suggèrent fortement de prioriser le suivi des molécules CP, IFO et TAM. A l'exception d'IFO, les autres molécules apparaissent très régulièrement dans les schémas de traitement « habituels » et bénéficient ainsi d'une visibilité scientifique et sociale importante.

Annexe B. Propriétés physico-chimiques des molécules ciblées – Partie II

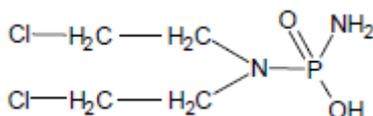
Tableau B-1 : Carte d'identité de la moutarde nor-azotée NOR



N° CAS	55-86-7
Masse molaire moléculaire	142 g/mol
pKa	nc
Température de fusion ^a	202 °C
Température d'ébullition ^a	212 -214 °C
Solubilité dans l'eau à 20-25 °C ^a	62,4 g/L
Densité ^a	1,126 g/cm ³
Log K _{ow} ^a	1,32
Pression de vapeur à 25 °C ^a	0,585 mm Hg
Constante de Henry à 25 °C ^a	3,46E ⁻⁰⁶ atm.m ³ /mol

a : <http://www.chemspider.com> ; nc : non connu

Tableau B-2 : Carte d'identité de la moutarde de phosphoramidate PHO



N° CAS	5776 - 49 - 8
Masse molaire moléculaire	221 g/mol
pKa ^a	nc
Température de fusion ^a	84 °C
Température d'ébullition ^a	355°C
Solubilité dans l'eau à 20-25 °C ^a	34,6 g/L
Densité ^a	1,474 g/cm ³
Log K _{ow} ^a	0
Pression de vapeur à 25 °C ^a	9,96E ⁻⁰⁷ mm Hg
Constante de Henry à 25 °C ^a	3,30E ⁻¹⁴ atm.m ³ /mol

a : <http://www.chemspider.com> ; nc : non connu

Annexe C. Synthèse des méthodes analytiques pour l'analyse de molécules ciblées dans les matrices environnementales

Tableau C-1. Synthèse des méthodes analytiques pour l'analyse de CP dans les matrices environnementales

Molécule	Matrice	Extraction	Rdt (%)	Séparation	Détection	Limites (LOQ)	Référence
	ERH	SPE – C ₁₈	72	GC	MS	LOD : 6 ng/L	Steger-Hartmann <i>et al.</i> , 1996
	ERH	SPE – C ₁₈	72	GC	MS	LOD : 6 ng/L	Steger-Hartmann <i>et al.</i> , 1997
	Effluent, EdS	SPE – XAD-4	nd	HPLC	UV	200 µg/L	Kiffmeyer <i>et al.</i> , 1998
	Effluent	SPE – C ₁₈	57	GC	MS (Q)	250 ng/L	Ternes <i>et al.</i> , 1998
	Effluent	nd	nd	HPLC	MS/MS	0,02 ng/L	Zuccato <i>et al.</i> , 2000
	EdS	SPE – PPL Bond-Elut	71	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	LOD : 10 ng/L	Sacher <i>et al.</i> , 2001
	STEP	SPE – C ₁₈	89 ± 17	HPLC (C ₁₈)	MS (Q)	LOD : 23 ng/L	Kanda <i>et al.</i> , 2003
	Effluent	SPE – SupelClean C ₁₈	60	HPLC	MS	LOD : 500 ng/L	Metcalf <i>et al.</i> , 2003
	Effluent	SPE – Lichrolut EN	107 ± 8	HPLC (C ₈)	MS/MS (QqQ)	1,9 ng/L	Castiglioni <i>et al.</i> , 2005
	Boues	USE; Purif. : C ₁₈	58 – 66	HPLC	MS/MS (QqQ)	20 ng/g	Ternes <i>et al.</i> , 2005
	Effluent, EdS	nd	nd	HPLC	MS/MS	0,02 ng/L	Zuccato <i>et al.</i> , 2005
	Effluent, EdS	SPE – Oasis HLB	82	HPLC (C ₈)	MS (Q)	LOD : 20 ng/L	Brun <i>et al.</i> , 2006
	STEP, EdS	SPE – Bio Beads	74 – 94	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	0,02 – 1 ng/L	Buerge <i>et al.</i> , 2006
	EdS	SPE – Oasis HLB	68 ± 9	GC	MS	LOD : 30 ng/L	Moldovan, 2006
CP	EdS	SPE – PPL Bond-Elut	71	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	LOD : 10 ng/L	Fatta <i>et al.</i> , 2007
	ERU	SPE – Oasis HLB	nd	HPLC	MS/MS (QqQ)	nd	Grung <i>et al.</i> , 2008
	EdS	SPE – PPL Bond-Elut	71	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	LOD : 10 ng/L	Kostopoulou et Nikolaou, 2008
	Effluent	SPE – Strata X	115 ± 16	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	100 ng/L	Busetti <i>et al.</i> , 2009
	Effluent, EdS	SPE – Strata X	148	HPLC (C ₁₂)	MS/MS (QqQ)	5 – 9	Garcia-Ac, 2010
	STEP	SPE – Oasis MCX/MAX	87 ; 92	UPLC (C ₁₈)	MS (QTOF)	12,5 – 30 ng/L	Lavén <i>et al.</i> , 2009
	ERH	SPE – Lichrolut EN	87 ± 16	GC	MS/MS (QqQ)	100 ng/L	Mullot, 2009
	Boues	USE/PLE – Purif. HLB	85/82	UHPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	nd	Okuda <i>et al.</i> , 2009
	Boues	Soxtec	~ 20	HPLC (C ₁₈)	MS (Q)	nd	Saggadi, 2009
	EdS	SPE – Oasis HLB	84 ± 2	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqLIT)	1 ng/L	Martinez-Bueno <i>et al.</i> , 2010
	ERH	SPE – Oasis HLB	> 50	UHPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	2 ng/L	Yin <i>et al.</i> , 2010
	Effluent	SPE – Strata X + Florisil	59 ± 4	UHPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	0,11 – 0,4 ng/L	Llewellyn <i>et al.</i> , 2011
	Effluent, EdS	SPE – Isolute + HLB	99 – 103	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	LOD ~ 150 ng/L	McArdell <i>et al.</i> , 2011
	nd	SPE – Oasis HLB	100 ± 7	GC	MS	nd	Cesen <i>et al.</i> , 2012
	STEP	SPE – Oasis HLB	95 ± 18	HPLC (C ₁₈)	MS (Orbitrap)	LOD : 0,35 ng/L	Gomez-Canela <i>et al.</i> , 2012

Tableau C-2. Synthèse des méthodes analytiques pour l'analyse d'IFO, TAM et 5-FU dans les matrices environnementales

Molécule	Matrice	Extraction	Rdt (%)	Séparation	Détection	Limites (LOQ)	Référence
IFO	ERH	SPE – C ₁₈	99	GC	MS	7 ng/L	Steger-Hartmann <i>et al.</i> , 1996
	ERH	SPE – C ₁₈	99	GC	MS	7 ng/L	Kümmerer <i>et al.</i> , 1997
	Effluent	SPE – C ₁₈	51	GC	MS (Q)	100 ng/L	Ternes <i>et al.</i> , 1998
	EdS	SPE – PPL Bond-Elut	73	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	LOD : 4,2 ng/L	Sacher <i>et al.</i> , 2001
	Boues	USE; Purif. : C ₁₈	53 – 59	HPLC	MS/MS (QqQ)	20 ng/g	Ternes <i>et al.</i> , 2005
	STEP, EdS	SPE – Bio Beads	75 – 102	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	0,02 – 2 ng/L	Buerge <i>et al.</i> , 2006
	Effluent, EdS	SPE – Strata X	94 ± 7	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	9,7 ng/L	Coetsier <i>et al.</i> , 2009
	EdS	SPE – Oasis HLB	81 ± 8	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqLIT)	1 ng/L	Martinez-Bueno <i>et al.</i> , 2010
	ERH	SPE – Lichrolut EN	96 ± 14	GC	MS/MS (QqQ)	100 ng/L	Mullot, 2009
	ERH	SPE – Oasis HLB	> 50	UHPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	2 ng/L	Yin <i>et al.</i> , 2010
	Effluent	SPE – Strata X + Florisil	69 ± 6	UHPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	0,16 – 0,24 ng/L	LLewelyn <i>et al.</i> , 2011
	nd	SPE – Oasis HLB	100 ± 7	GC	MS	nd	Cesen <i>et al.</i> , 2012
5-FU	Effluent, EdS	SPE – Isolute ENV+	nd	HPLC	UV	LOD : 50 µg/L	Kiffmeyer <i>et al.</i> , 1998
	ERH	SPE – Isolute ENV+	88	CE	UV	LOD : 8,6 µg/L	Mahnik <i>et al.</i> , 2004 et 2007
	ERU	SPE – Isolute ENV+	73 ± 4	GC	MS (Q)	90 ng/L	Tauxe Wursch, 2005
	ERH, Effluent	SPE – Strata X	nd	GC	MS (Q)	nd	Yu <i>et al.</i> , 2006
	ERH	SPE – Isolute ENV+	96	GC	MS/MS (QqQ)	40 ng/L	Mullot, 2009
	ERH	SPE – Isolute ENV+	46 ± 7	HPLC (HILIC)	MS/MS (QqQ)	5 ng/L	Kovalova <i>et al.</i> , 2009
TAM	Effluent	SPE – Strata X	42 ± 40	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	LOD : 10 ng/L	Hilton et Thomas, 2003
	Effluent, EdS	SPE – Strata X	42 ± 40	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	10 ng/L	Ashton <i>et al.</i> , 2004
	Effluent, EdS	SPE – Strata X	42 ± 40	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	10 ng/L	Thomas et Hilton, 2004
	ERU	SPE – Strata X	73 ± 4	GC	MS (Q)	4 ng/L	Tauxe Wursch, 2005
	Effluent	SPE – Srata X	42 ± 40	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	10 ng/L	Roberts et Thomas, 2006
	Effluent	SPE – Strata X	19 ± 54	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	0,03 ng/L	Nebot <i>et al.</i> , 2007
	Effluent	SPE – Oasis HLB	52	GC	MS (Q)	nd	Tan <i>et al.</i> , 2007
	ERH, STEP	SPE – Oasis HLB	~ 50	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	~ 0,01 ng/L	Zhang et Zhou, 2007
	Effluent, EdS	SPE – Strata X	71 ± 4	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	14	Coetsier <i>et al.</i> , 2009
	ERU, Effluent	SPE – Oasis HLB	66 ± 1 ; 89 ± 9	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqLIT)	1 – 4 ng/L	Gros <i>et al.</i> , 2009
	ERU, Effluent	SPE – Oasis HLB	110 ± 3	UHPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqLIT)	0,02 ng/L	Huerta-Fontela <i>et al.</i> , 2010
	STEP	SPE – Oasis HLB	~ 50	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	~ 0,01 ng/L	Zhou <i>et al.</i> , 2009
	ERH, STEP	SPE – Oasis HLB	92 ± 18	UHPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqQ)	0,2 ng/L	Liu <i>et al.</i> , 2010
	ERH	SPE – Oasis HLB	65 – 145	HPLC (C ₁₈)	MS/MS (QqLIT)	1 ng/L	Verlicchi <i>et al.</i> , 2012

Annexe D. Plan d'expériences – Analyse des résidus pour IFO

Les méthodes statistiques utilisées pour l'estimation des coefficients sont particulièrement sensibles aux observations (*i.e* ici rendements en IFO) atypiques. Il existe plusieurs outils pour identifier de telles observations : les résidus standardisés et la distance de Cook. Les critères retenus pour éliminer une expérience sont à la fois une observation avec un résidu standardisé hors de l'intervalle $[-2 ; +2]$ et une distance de Cook supérieure à 1. Le détail des formules utilisées est disponible dans le fichier suivant : math.univ-lille1.fr/~jacques/Download/Cours/Modelisation-Cours.pdf

Tableau D-1 : Analyse des résidus des différents rendements pour IFO – Application aux deux modèles obtenus

Expériences	Rendement pour IFO (%)	Premier modèle (avec 32 expériences)		Second modèle (avec 29 expériences)	
		Résidus standardisés	Distance de Cook	Résidus standardisés	Distance de Cook
1	101	-0,85	0,25	-0,86	0,50
2	103	2,17	1,63	-	-
3	167	-0,59	0,12	0,38	0,10
4	92	-0,26	0,02	1,92	2,49
5	114	0,43	0,06	-1,92	2,49
6	111	0,75	0,20	-0,38	0,10
7	102	-2,01	1,40	-	-
8	0	1,02	0,36	0,86	0,50
9	109	1,24	0,53	-0,40	0,07
10	87	1,56	0,84	0,87	0,34
11	65	-1,20	0,50	1,20	0,66
12	141	1,83	1,15	1,89	1,58
13	102	-0,18	0,01	-0,86	0,50
14	194	2,84	2,79	-	-
15	109	0,08	0	0,38	0,10
16	85	0,41	0,06	1,92	2,49
17	97	1,35	0,13	0,81	0,08
18	4	-2,34	0,39	-1,69	0,47
19	105	-1,69	0,20	1,32	0,29
20	117	0,70	0,03	-1,86	0,41
21	103	-0,57	0,02	-1,20	0,26
22	94	-0,42	0,01	1,20	2,87
23	114	0,32	0,01	1,20	2,87
24	105	-1,31	0,12	-1,20	0,26
25	101	-1,98	0,28	-0,02	0
26	117	0,99	0,07	-0,67	0,05
27	119	0,52	0	1,49	0,02
28	112	0,18	0	0,29	0
29	111	0,15	0	0,18	0
30	112	0,17	0	0,26	0
31	106	-0,10	0	-0,67	0
32	103	-0,24	0	-1,15	0,01

En gras sur trame de fond grise, les expériences identifiées comme atypiques en combinant les critères définis pour chacune des méthodes d'analyse des résidus, et qui ont par la suite été éliminées du plan d'expériences.

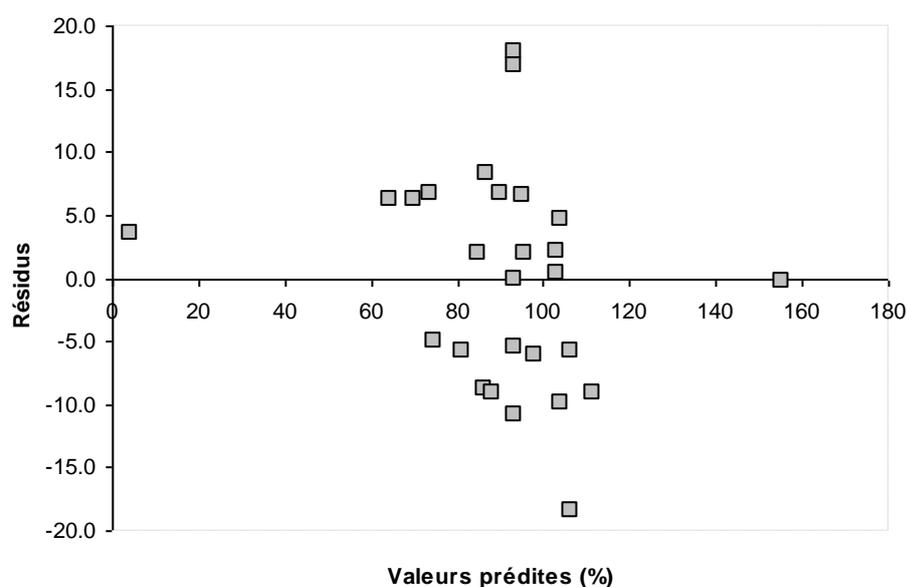
Annexe E. Plan d'expériences – Analyse des résultats pour CP**Tableau E-1 : Analyse des résidus des différents rendements pour CP – Application aux deux modèles obtenus**

Expériences	Rendement en CP (%)	Premier modèle (avec 32 expériences)		Second modèle (avec 30 expériences)	
		Résidus standardisés	Distance de Cook	Résidus standardisés	Distance de Cook
1	97	0,84	0,25	1,63	1,47
2	80	2,36	1,93	-	-
3	301	1,83	1,15	1,35	0,76
4	105	1,31	0,59	0,44	0,08
5	76	0,78	0,21	1,50	1,24
6	98	0,26	0,02	0,46	0,12
7	95	-0,27	0,03	1,83	1,52
8	0	1,25	0,54	0,33	0,04
9	109	1,62	0,91	0,99	0,40
10	103	1,10	0,42	0,08	0,00
11	81	0,57	0,11	1,63	1,47
12	82	2,09	1,50	-	-
13	102	-0,48	0,08	1,45	0,95
14	155	1,04	0,37	-0,04	0,00
15	71	0,50	0,09	1,50	1,24
16	87	-0,01	0,00	0,46	0,12
17	88	-0,46	0,02	-2,07	0,34
18	8	-1,57	0,17	0,51	0,04
19	101	-1,05	0,08	-0,83	0,12
20	103	-0,98	0,07	-1,33	0,30
21	92	-2,20	0,34	-0,86	0,12
22	77	0,17	0,00	-0,98	0,08
23	79	-1,28	0,12	-1,33	0,30
24	76	-0,75	0,04	-0,83	0,12
25	70	-2,13	0,32	-0,71	0,08
26	94	0,10	0,00	-1,10	0,10
27	110	0,89	0,01	1,25	0,01
28	111	0,94	0,01	1,33	0,02
29	93	0,12	0,00	0,00	0,00
30	82	-0,37	0,00	-0,80	0,01
31	88	-0,13	0,00	-0,41	0,00
32	90	-0,04	0,00	-0,26	0,00

En gras sur trame de fond grise, les expériences identifiées comme atypiques en combinant les critères définis pour chacune des méthodes d'analyse des résidus, et qui ont par la suite été éliminées du plan d'expériences.

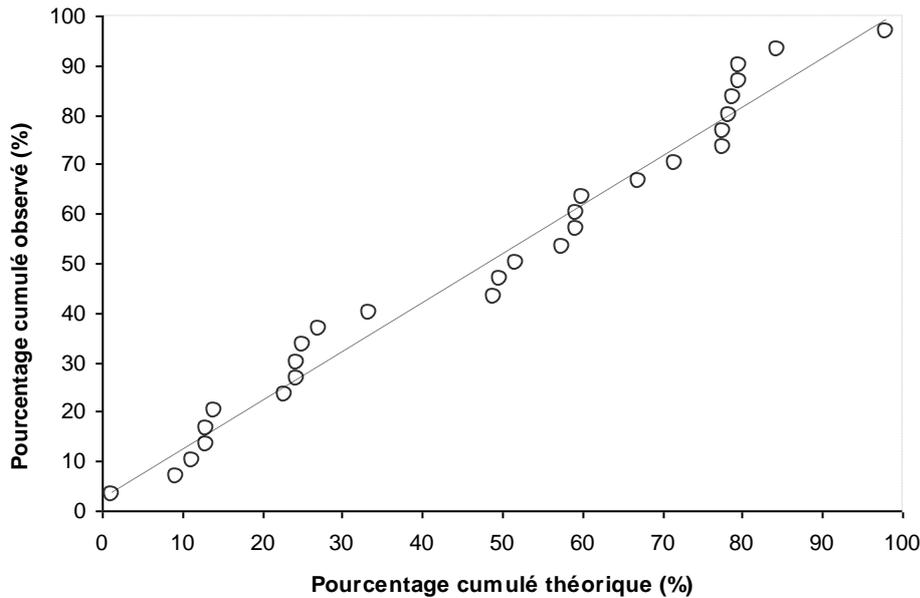
Tableau E-2 : Valeurs des coefficients du modèle et significativité statistique

Variable	Premier modèle (avec 32 expériences)		Second modèle (avec 30 expériences)	
	Valeurs	Significativité	Valeurs	Significativité
Ordonnée	90,4096	-	93,05	-
A	-15,863	Oui	-51,09	Oui
B	0,2309	-	2,756	-
C	-12,5952	Oui	-5,827	-
D	-2,9021	-	-3,51	-
E	-2,3961	-	14,571	-
A*B	-20,3904	Oui	-74,679	Oui
A*C	13,2682	Oui	111,164	Oui
A*D	21,9649	Oui	94,742	Oui
A*E	16,1477	Oui	122,681	Oui
B*C	-22,3554	Oui	-96,304	Oui
B*D	-18,704	Oui	-132,907	Oui
B*E	-4,0908	-	-23,246	-
C*D	22,0866	Oui	81,464	Oui -
C*E	16,4881	Oui	7,861	-
D*E	1,1528	-	-2,271	-
A ²	-6,8291	-	-37,879	Oui
B ²	6,6084	-	15,872	-
C ²	2,3542	-	-1,145	-
D ²	0,573	-	-8,27	-
E ²	1,6771	-	-3,853	-
Qualité du modèle proposé				
R ²	85 %		98 %	
Test du manque d'adéquation	Modèle inadéquat (p = 0,001)		Modèle adéquat (p = 0,22)	



Les résidus sont équirépartis autour de l'axe des abscisses, avec une erreur en moyenne nulle : la variance est bien indépendante de la valeur du rendement en CP.

Figure E-1 : Représentation des résidus en fonction des valeurs prédites



Les résidus suivent l'allure théorique d'une représentation obéissant à une distribution normale : les variations observées sont bien dues à un phénomène aléatoire.

Figure E-2 : Vérification de l'adéquation à une distribution normale

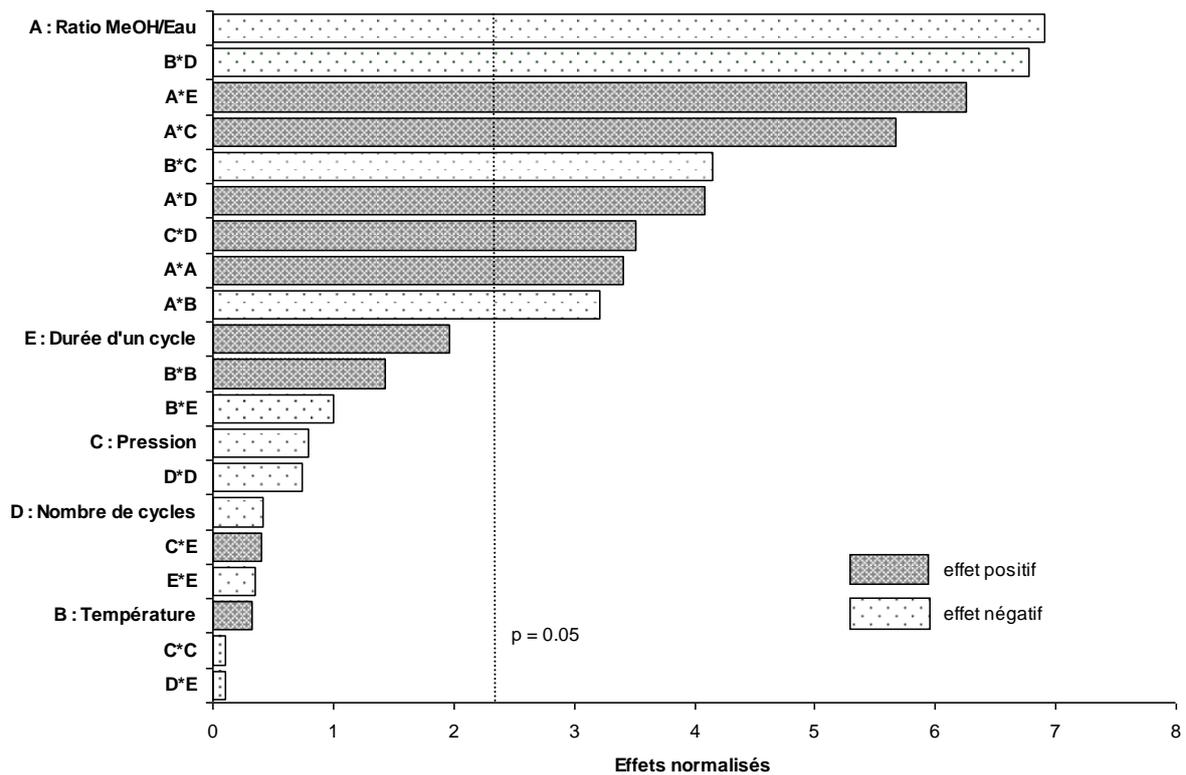


Figure E-3 : Diagramme de Pareto représentant les facteurs les influents lors de l'extraction de CP dans la boue de Brax

Le ratio MeOH/Eau apparaît comme le facteur qui influence probablement le plus la qualité de l'extraction du CP, mais les interactions impliquant ce facteur sont très nombreuses et toutes significatives. Il est donc difficile de statuer clairement sur son effet.

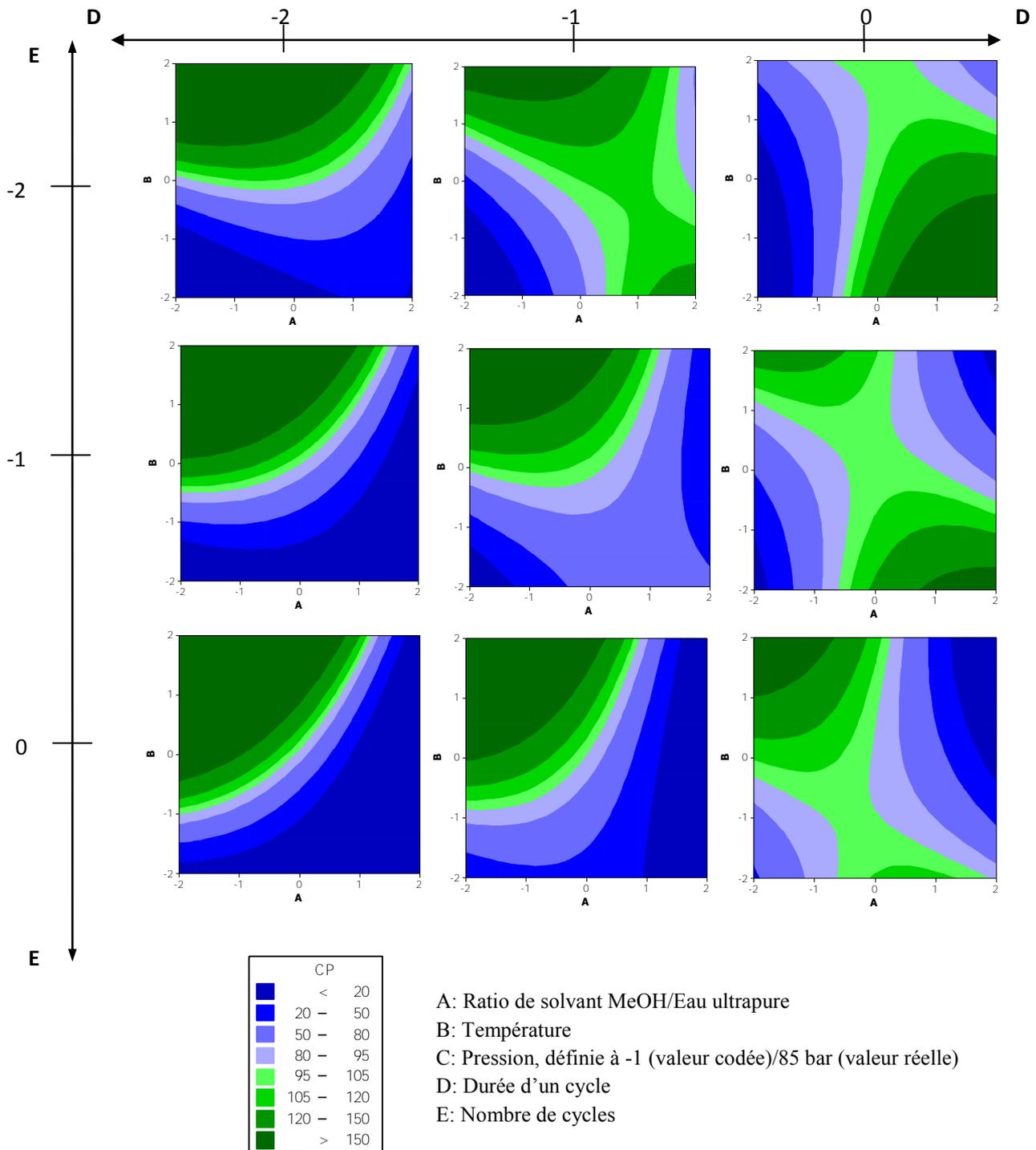


Figure E-4 : Représentation de l'effet du ratio de solvant, de la température, de la durée et du nombre de cycles d'extraction sur le rendement de récupération en CP

Annexe F. Comparaison des rendements des différentes étapes de la procédure pour la phase solide pour IFO et CP

Pour évaluer l'efficacité de chacune des étapes, on rappelle que 3 échantillons de boues (ou extraits correspondants) ont été dopés à des moments précis de la procédure analytique (avant la lyophilisation **(a)**, avant l'extraction **(b)**, avant la première purification **(c)**, avant la seconde purification **(d)**, avant l'analyse **(e)**). Le profil correspondant est donné dans le manuscrit. L'efficacité de chacune des étapes constituant l'analyse a été calculée suivant la relation :

$$\text{Efficacité de l'étape } n = \frac{R_n}{R_{n+1}} \cdot 100$$

où R est le rendement absolu (%) lors du dopage à une étape donnée (i.e. avant lyophilisation...), n une valeur désignant une étape spécifique de la procédure et comprise entre 1 et 4. Ainsi, on a :

(pour $n = 1$) : efficacité des prétraitements (en comparant (a) et (b)) ;

(pour $n = 2$) : efficacité de l'extraction PLE (en comparant (b) et (c)) ;

(pour $n = 3$) : efficacité de la purification Oasis MAX (en comparant (c) et (d)) ;

(pour $n = 4$) : efficacité de la purification Oasis MCX (en comparant (d) et (e))

Les rendements relatifs (corrégés par l'équivalent deutéré) ont donné des valeurs de 100 %, toute molécule, boue ou étape confondue et ne seront donc pas renseignés. La taille des écarts-types est expliquée par la propagation des incertitudes des deux étapes impliquées dans le calcul.

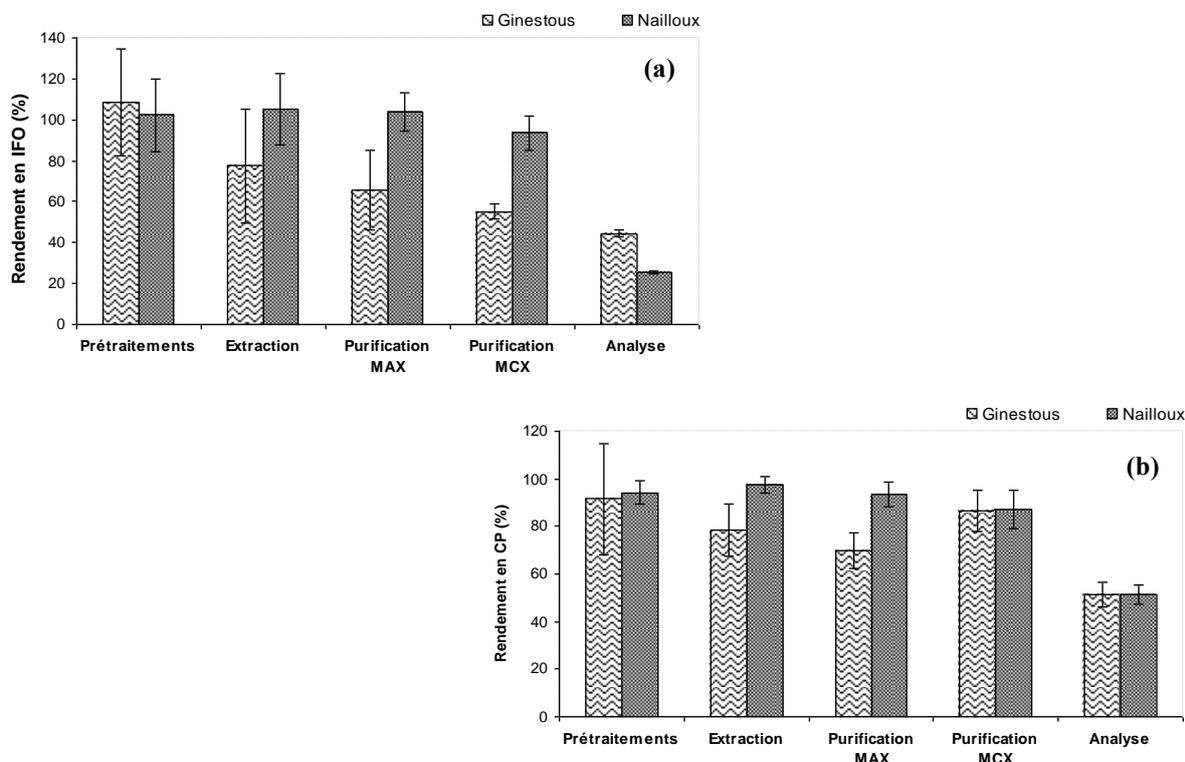


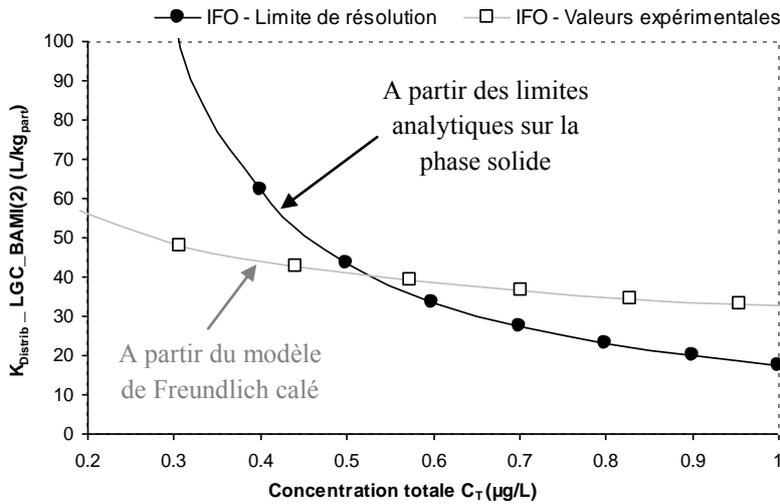
Figure F-1 : Taux de récupération pour IFO (a) et CP (b) pour chacune des étapes constituant la procédure analytique pour la phase solide – Cas des boues de Ginestous et Nailloux

Annexe G. Considérations sur la solution de dopage pour IFO

La stratégie de dopage avec les solutions méthanoliques de médicaments a été rapidement abandonnée après découverte d'une forte activité bactérienne suite à des mesures de respirométrie. Le MeOH commercial est donc considéré comme très facilement biodégradable. D'après l'équation de la réaction entre le MeOH et l'O₂ (qui produit de l'eau et du CO₂), nous avons déduit que la solution commerciale de MeOH contenait environ 1200 g_{DCO}/L. Ainsi, en dopant un volume de 100 mL de boue (essai de sorption) avec 100 µL de cette solution, on atteint une DCO d'environ 1200 mg/L, soit une concentration 1,5 fois plus élevée qu'une DCO d'ERU classique (800 mg/L), ne rendant pas cette stratégie viable pour limiter la biodégradation des micropolluants. Toutefois, la procédure consistant à évaporer à sec un volume connu de cette solution méthanolique et à le resuspendre dans un volume connu d'eau ultrapure entraîne une variabilité importante sur la concentration de la solution de dopage en IFO. On propose alors 3 nouvelles stratégies pour préparer la solution de dopage et assurer des concentrations plus reproductibles :

- (i) Revoir la procédure de dissolution des poudres d'anticancéreux, à partir soit d'autres solvants organiques moins biodégradables, soit de solvants moins organiques. La mixture préparée devra cependant être miscible avec l'eau ;
- (ii) Conserver la préparation de la solution mère (1 g/L) au MeOH puis effectuer des dilutions successives à l'eau ultrapure. Il est important de contrôler que les solubilités aqueuses ne soient pas dépassées. La solution de dopage utilisée pour les essais de sorption à une concentration voisine de 10 mg/L pour chaque molécule. Il serait donc nécessaire d'appliquer une dilution 100 depuis la solution mère. La DCO de cette solution serait de 12 g/L. Ainsi, un dopage de 100 mL de boue avec 100 µL de cette solution conduit à l'obtention d'une DCO de 12 mg/L : l'apport de substrat biodégradable serait donc très limité (mais possible) ;
- (iii) Diminuer les concentrations de travail lors des essais de cinétiques ou de sorption, pour réduire l'apport en matière carbonée. Cette stratégie sera certainement envisageable quand les techniques analytiques utilisées auront des seuils de détection extrêmement bas, permettant de travailler avec les concentrations environnementales (1 – 10 ng/L) en molécules anticancéreuses lors des essais de sorption.

Annexe H. Identification des limites de la modélisation – Système diphasique

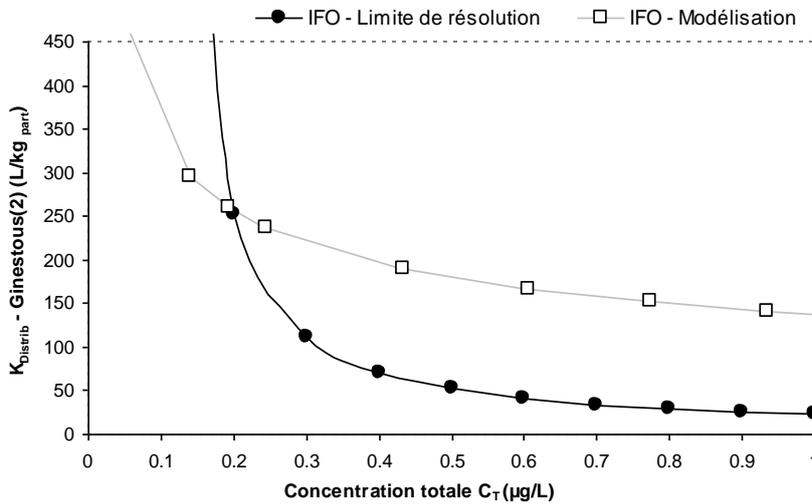


LGC_BAMI(2) – IFO

$C_{T \text{ intersect.}} = 0,531 \text{ } \mu\text{g/L}$

$K_{\text{Distrib intersect.}} = 40 \text{ L/kg}_{\text{part}}$

$C_{\text{aqueuse}} = 0,368 \text{ } \mu\text{g/L}$

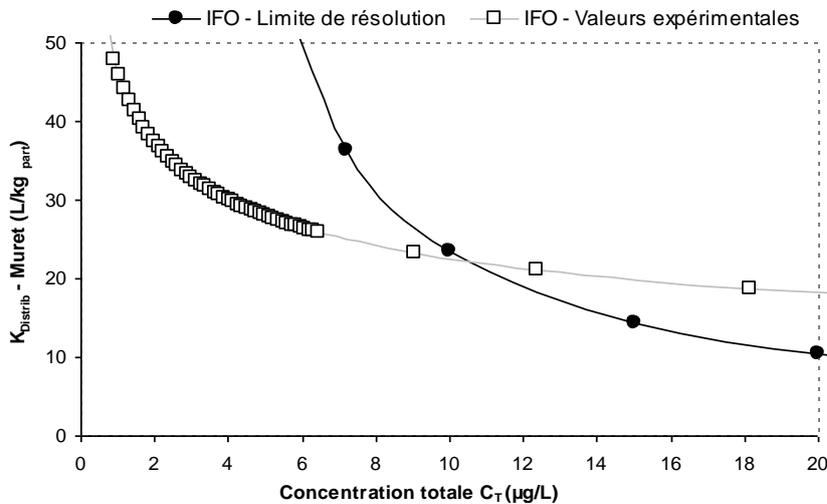


Ginestous(2) – IFO

$C_{T \text{ intersect.}} = 0,198 \text{ } \mu\text{g/L}$

$K_{\text{Distrib intersect.}} = 258 \text{ L/kg}_{\text{part}}$

$C_{\text{aqueuse}} = 0,077 \text{ } \mu\text{g/L}$



Muret – IFO

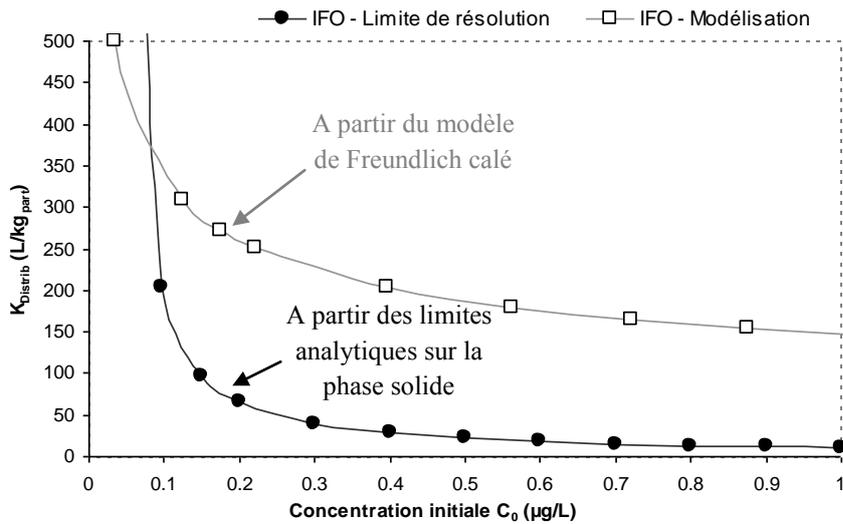
$C_{T \text{ intersect.}} = 10,43 \text{ } \mu\text{g/L}$

$K_{\text{Distrib intersect.}} = 22 \text{ L/kg}_{\text{part}}$

$C_{\text{aqueuse}} = 8,35 \text{ } \mu\text{g/L}$

Figure H-1 : Identification des limites de la modélisation pour IFO – Boues de LGC_BAMI(2), Ginestous (2) et Muret

Annexe H. Représentation des résultats pour le calage du système triphasique sur l'ensemble du domaine étudié pour IFO et CP

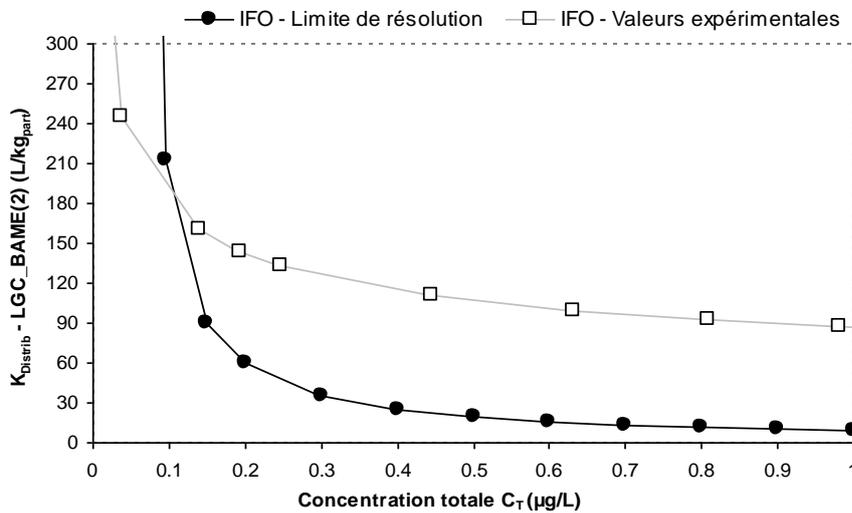


Narbonne – IFO

$$C_{T \text{ intersect.}} = 0,075 \text{ } \mu\text{g/L}$$

$$K_{\text{Distrib intersect.}} = 372 \text{ L/kg}_{\text{part}}$$

$$C_{\text{aqueuse}} = 0,027 \text{ } \mu\text{g/L}$$

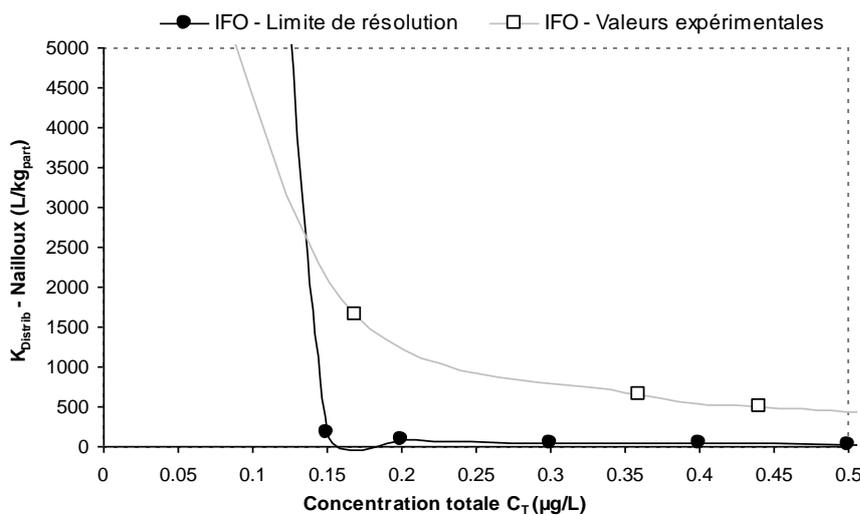


LGC_BAME(2) – IFO

$$C_{T \text{ intersect.}} = 0,109 \text{ } \mu\text{g/L}$$

$$K_{\text{Distrib intersect.}} = 155 \text{ L/kg}_{\text{part}}$$

$$C_{\text{aqueuse}} = 0,057 \text{ } \mu\text{g/L}$$



Nailloux – IFO

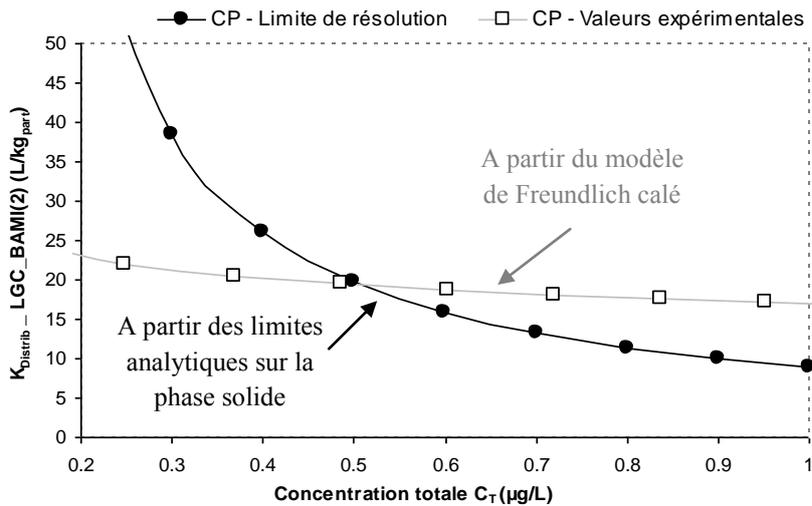
$$C_{T \text{ intersect.}} = 0,099 \text{ } \mu\text{g/L}$$

$$K_{\text{Distrib intersect.}} = 3416 \text{ L/kg}_{\text{part}}$$

$$C_{\text{aqueuse}} = 0,003 \text{ } \mu\text{g/L}$$

Figure H-2 : Identification des limites de la modélisation pour IFO – Boues de Narbonne, LGC_BAME(2) et Nailloux

Annexe H. Représentation des résultats pour le calage du système triphasique sur l'ensemble du domaine étudié pour IFO et CP

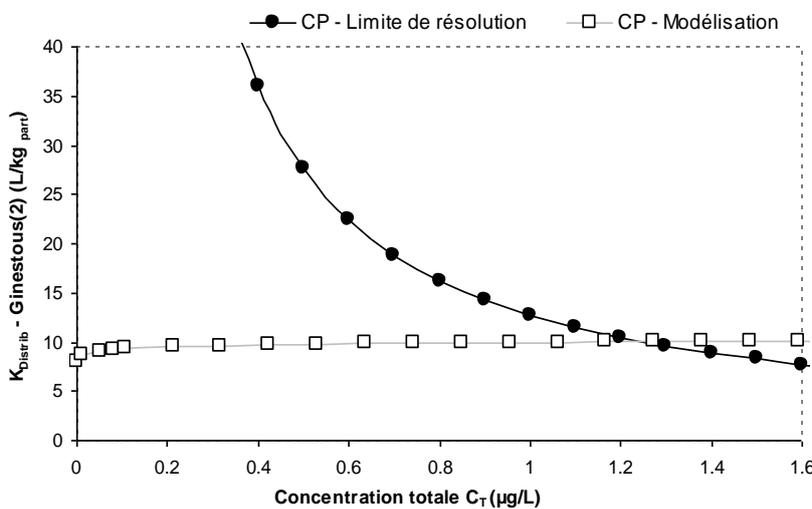


LGC_BAMI(2) – CP

$C_{T \text{ intersect.}} = 0,510 \text{ } \mu\text{g/L}$

$K_{\text{Distrib intersect.}} = 19 \text{ L/kg}_{\text{part}}$

$C_{\text{aqueuse}} = 0,420 \text{ } \mu\text{g/L}$

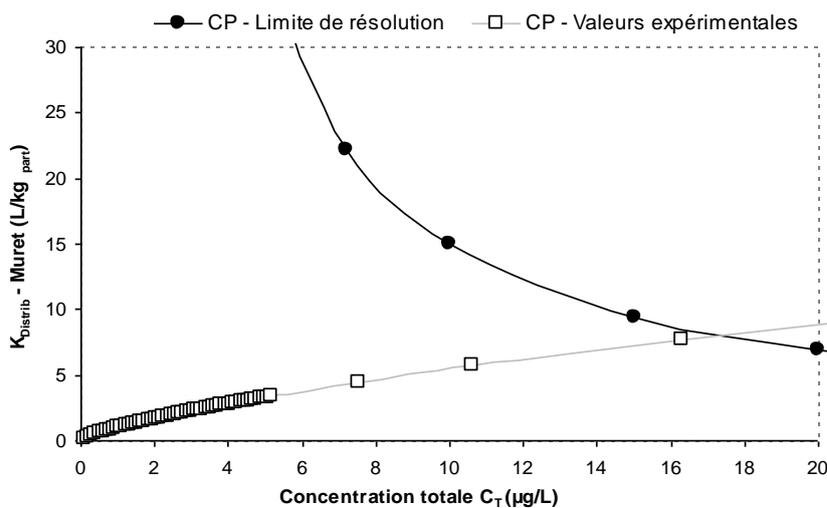


Ginestous(2) – CP

$C_{T \text{ intersect.}} = 1,246 \text{ } \mu\text{g/L}$

$K_{\text{Distrib intersect.}} = 10 \text{ L/kg}_{\text{part}}$

$C_{\text{aqueuse}} = 0,974 \text{ } \mu\text{g/L}$



Muret – CP

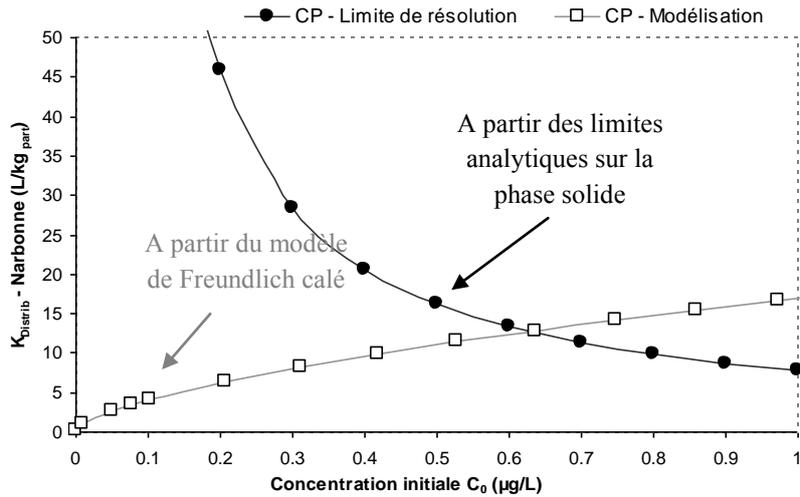
$C_{T \text{ intersect.}} = 17,32 \text{ } \mu\text{g/L}$

$K_{\text{Distrib intersect.}} = 8 \text{ L/kg}_{\text{part}}$

$C_{\text{aqueuse}} = 15,89 \text{ } \mu\text{g/L}$

Figure H-3 : Identification des limites de la modélisation pour CP – Boues de LGC_BAMI(2), Ginestous (2) et Muret

Annexe H. Représentation des résultats pour le calage du système triphasique sur l'ensemble du domaine étudié pour IFO et CP

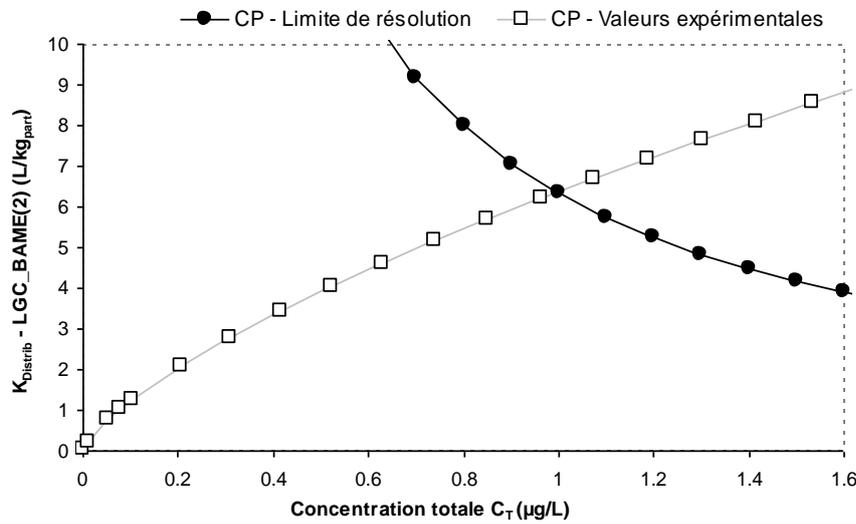


Narbonne – CP

$$C_{T \text{ intersect.}} = 0,627 \mu\text{g/L}$$

$$K_{\text{Distrib intersect.}} = 13 \text{ L/kg}_{\text{part}}$$

$$C_{\text{aqueuse}} = 0,590 \mu\text{g/L}$$

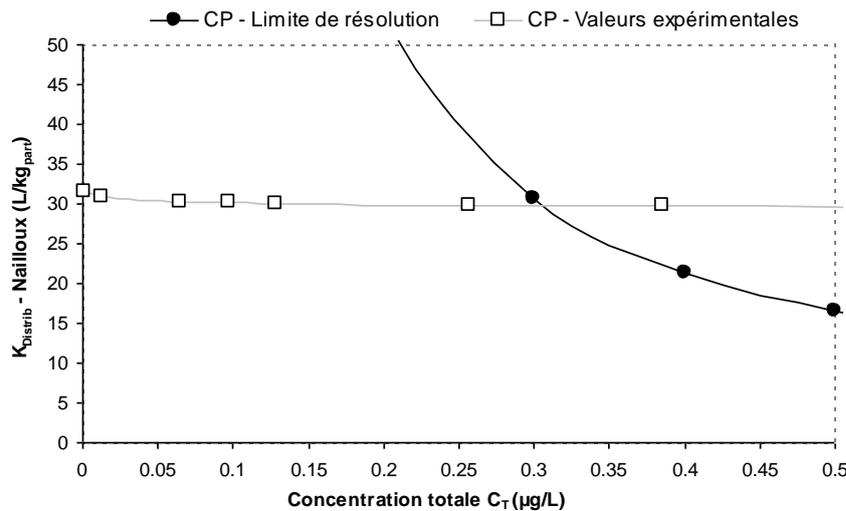


LGC_BAME(2) – CP

$$C_{T \text{ intersect.}} = 0,983 \mu\text{g/L}$$

$$K_{\text{Distrib intersect.}} = 6 \text{ L/kg}_{\text{part}}$$

$$C_{\text{aqueuse}} = 0,947 \mu\text{g/L}$$



Nailloux – CP

$$C_{T \text{ intersect.}} = 0,306 \mu\text{g/L}$$

$$K_{\text{Distrib intersect.}} = 30 \text{ L/kg}_{\text{part}}$$

$$C_{\text{aqueuse}} = 0,238 \mu\text{g/L}$$

Figure H-4 : Identification des limites de la modélisation pour CP – Boues de Narbonne, LGC_BAME(2) et Nailloux

Annexe I. Représentation des résultats pour le calage du système triphasique sur l'ensemble du domaine étudié pour IFO et CP

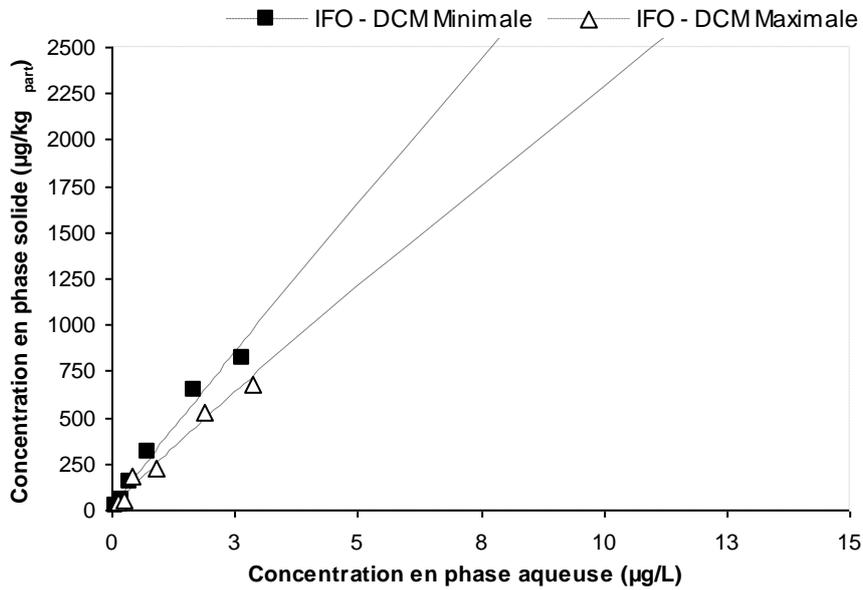


Figure I-1 : Comportement d'IFO sur tout le domaine étudié – système triphasique

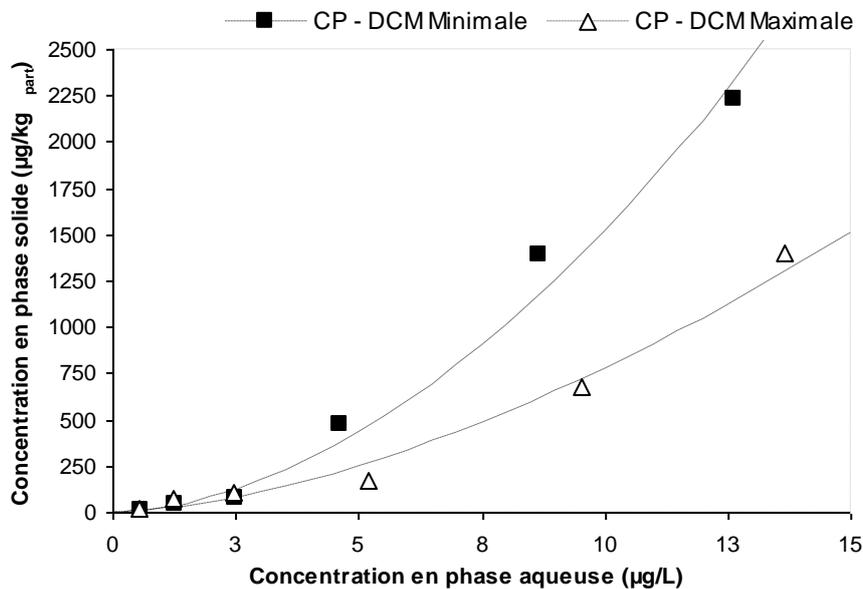


Figure I-2 : Comportement de CP sur tout le domaine étudié – système triphasique

Annexe J. Données brutes sur la caractérisation physico-chimique des différentes fractions des boues étudiées

Tableau J-1: Caractéristiques physico-chimiques des différentes fractions des boues étudiées – Données brutes

Paramètres	Caractéristiques de la phase solide														
	ρ_{tot} (g/cm ³)	ρ_{min} (g/cm ³)	ρ_{org} (g/cm ³)	Lipides (g/g _{Part})	CT (g _{CT} /g _{Part})	DCO (g _{O2} /L)	pH	σ (μ S/cm)	R. α (m/kg)	MV (g _{MV} /g _{Part})	d _[4,3] (μ m)	Convex.	Circ.	Solid.	Elong.
LGC_BAMI(2)	1,43	2,59	1,35	0,04	0,42	9,54	7,45	906	5,1.10 ¹⁰	0,89	88	0,93	0,72	0,92	0,34
Ginestous (2)	1,34	2,56	1,28	0,07	0,44	5,08	7,2	650	4,2.10 ¹⁰	0,91	120	0,92	0,70	0,91	0,35
Muret	1,46	2,48	1,25	0,10	0,40	11	7,75	1630	2,5.10 ¹²	0,71	102	nd	nd	nd	nd
Narbonne	1,48	2,72	1,32	0,05	0,37	6,05	8,35	1290	1,6.10 ⁹	0,79	176	0,93	0,63	0,91	0,38
LGC_BAME(2)	1,42	2,26	1,34	0,01	0,40	6,88	7,85	1520	8,5.10 ¹¹	0,85	10	0,54	0,42	0,77	0,32
Nailloux	1,49	2,44	1,32	0,03	0,37	10,85	7,5	730	5,3.10 ⁹	0,75	133	0,92	0,69	0,91	0,32

ρ_{tot} : densité totale ; ρ_{min} : densité minérale ; ρ_{org} : densité organique ; CT : carbone total ; DCO : demande chimique en oxygène ; σ : conductivité ; R. α : résistance spécifique ; MV : matières volatiles ; d_[4,3] : diamètre volumique [4,3] ; convex. : indice de convexité ; circ. : indice de circularité ; solid. : indice de solidité ; elong. : indice d'élongation ; nd : non déterminé

Paramètres	Caractéristiques de la phase aqueuse																							
	Sucres (mg _{eq_glucose} /L)				Protéines (mg _{BSA} /L)				DCO (mg _{O2} /L)				Substances Humiques (mg _{eq_AH} /L)				IC (mg _{IC} /L)				NPOC (mg _{NPOC} /L)			
Seuil de filtration	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa	1,2 μ m	0,1 μ m	10 kDa	1 kDa
LGC_BAMI(2)	17,7	9,7	14,2	18,3	8,8	5,7	5,5	3,5	28,9	21,2	14,5	14,8	12,8	7,4	7,9	5,6	10,3	11,1	11	11,6	9,9	9	8,2	6,9
Ginestous (2)	1,4	1,1	0,1	0,6	9	8,8	6,4	3,9	21,9	16,6	9	8,7	11,7	10,7	8,6	5,3	27,2	27,1	28,7	28,1	9,6	9,9	9,9	7,6
Muret	19,4	6	3,5	0,6	116	63,4	22,9	14,2	268	203	52	32	72,5	77,3	33,1	22,4	148,2	135,4	140,7	133,1	38,3	57,9	18,8	13,4
Narbonne	0,4	0,4	0,3	0,1	7,3	6	6	4,4	21,4	20,7	17	21,4	9,6	10	9,3	7,7	25,1	26,3	25,8	26	7,9	8,2	7,8	7,7
LGC_BAME(2)	13,3	9,1	1,3	1,2	32,8	22,3	17,4	7,2	110	73	30	5	23,7	22,1	17,5	6,2	66,5	67	67,3	65	25,4	22,1	12,6	8
Nailloux	0,1	0,5	0,3	0,1	5,9	5,1	3,6	2,7	17,8	19,1	17,9	19	8,4	8,6	7,5	4,9	24,1	21,6	22	21,6	8	8	7,8	7,1

On rappelle que IC + NPOC = CT

Annexe K. Traduction des données brutes pour la phase aqueuse des boues sous forme de graphes

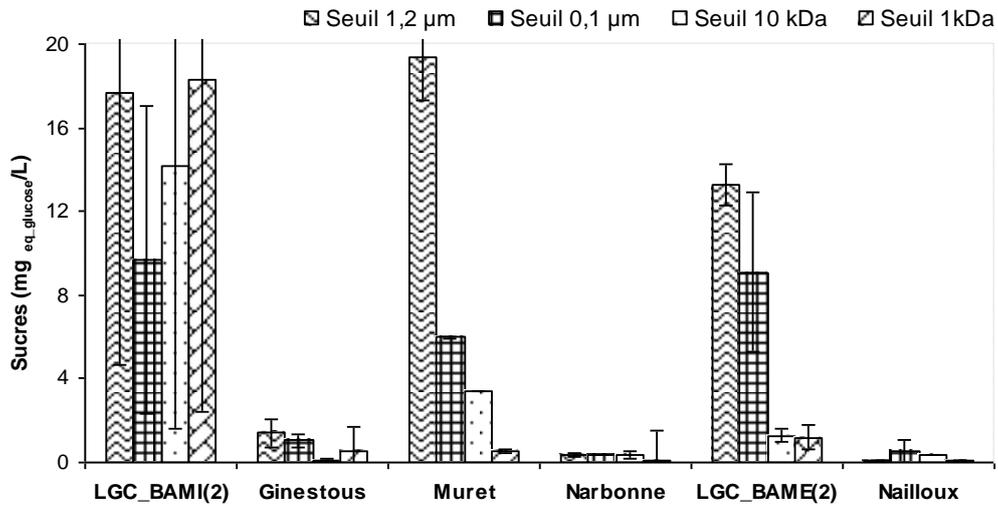


Figure K-1 : Evolution de la teneur en sucres (toute boue et tout seuil de coupure)

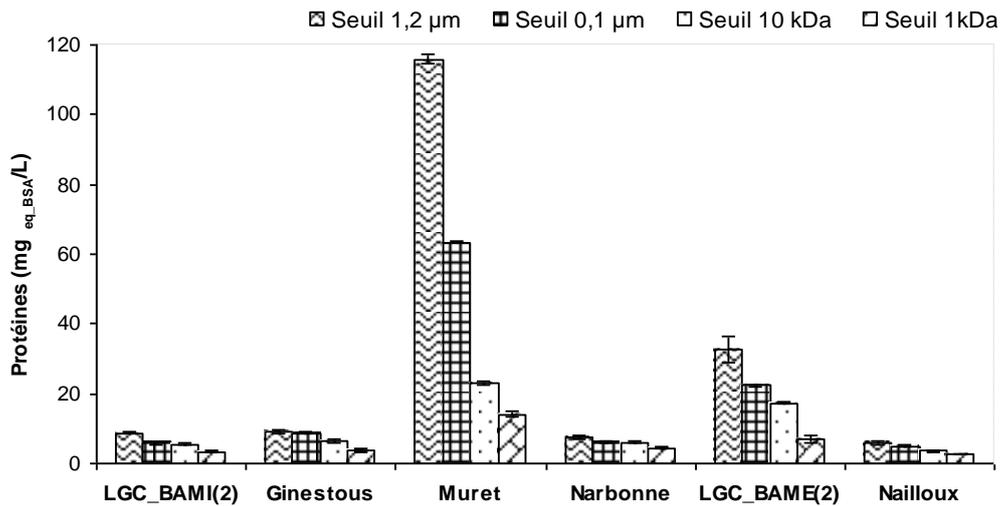


Figure K-2 : Evolution de la teneur en protéines (toute boue et tout seuil de coupure)

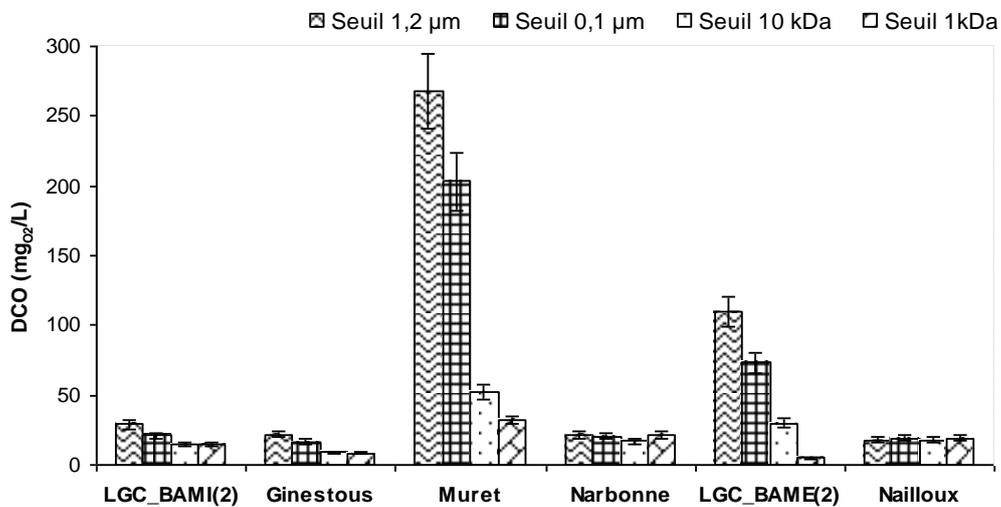


Figure K-3 : Evolution de la teneur en DCO (toute boue et tout seuil de coupure)

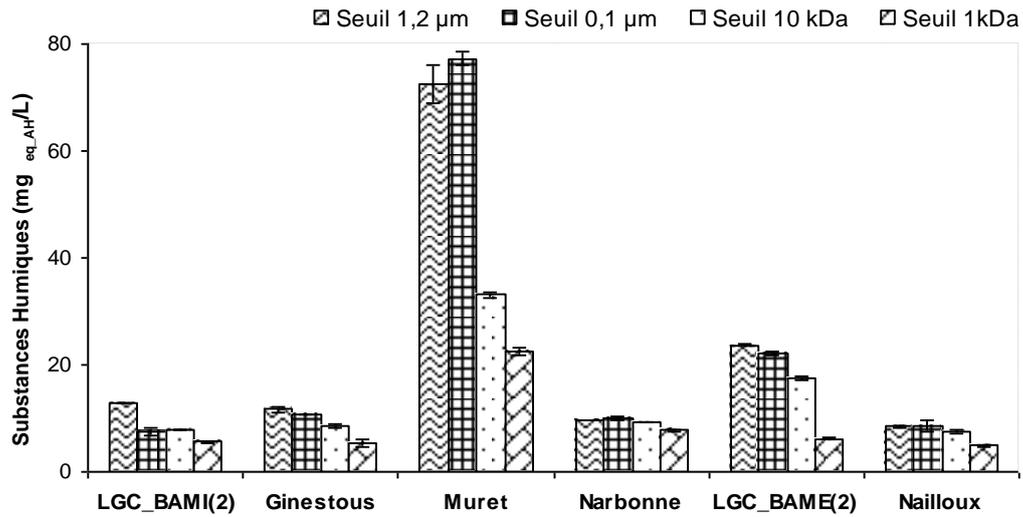


Figure K-4 : Evolution de la teneur en humiques-like (toute boue et tout seuil de coupure)

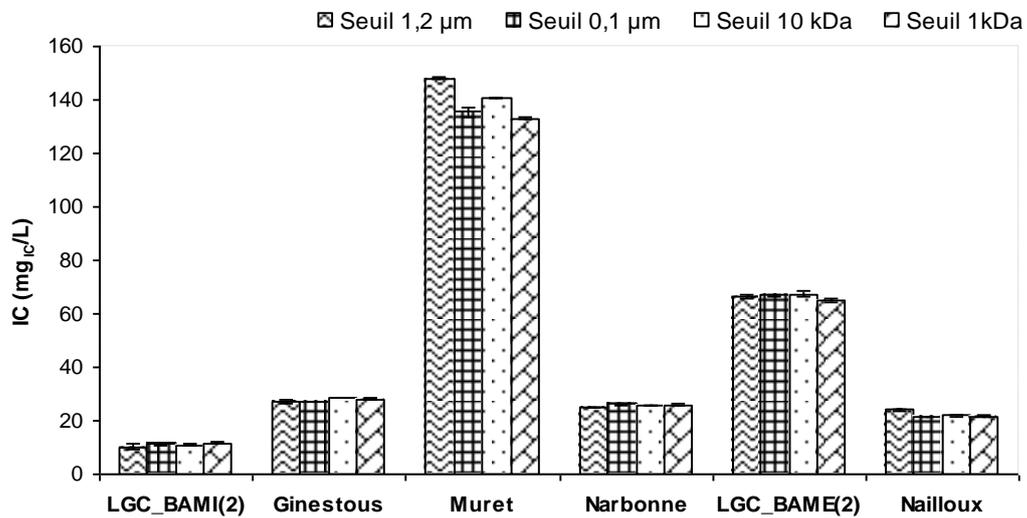


Figure K-5 : Evolution de la teneur en IC (toute boue et tout seuil de coupure)

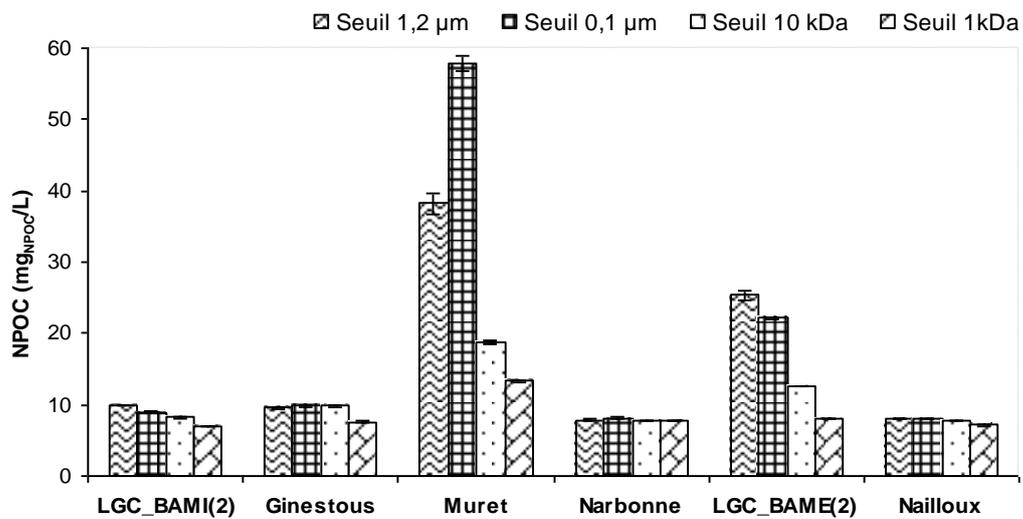


Figure K-6 : Evolution de la teneur en NPOC (toute boue et tout seuil de coupure)

Annexe L. Procédure de nettoyage et de détermination de la perméabilité de la membrane

1. Nettoyage de la membrane

Le nettoyage des membranes est effectué par des solutions de soude (NaOH) et d'acide nitrique (HNO₃). Une solution de NaOH 2% massique et de chlore actif 400 ppm (lavage basique) est préparée. Les membranes sont introduites dans cette solution, puis chauffées graduellement afin d'éviter un choc thermique et de casser les membranes (jusqu'à 50 °C pendant 45 minutes). Les membranes sont ensuite refroidies à température ambiante et soigneusement rincées avec de l'eau distillée. Les membranes sont alors trempées dans une solution de HNO₃ 0,7 % massique (lavage acide) à 50 °C pendant 45 minutes. Elles sont ensuite refroidies à température ambiante et soigneusement rincées à l'eau distillée.

2. Détermination de la perméabilité

La perméabilité de la membrane à l'eau distillée est ensuite mesurée. Le contrôle consiste à mesurer le flux de perméation lors de la filtration d'eau distillée à différentes pressions transmembranaires (PTM). La perméabilité correspond à la valeur de la pente de la droite obtenue en traçant le flux de perméation en fonction des différentes pressions. La perméabilité s'exprime en L/(h.m².bar) à 20 °C (Figure L-1).

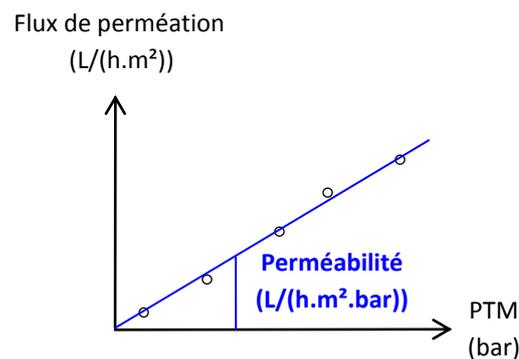


Figure L-1 : Détermination de la perméabilité d'une membrane

Annexe M. Profils des MES/MVS, DCO, Azote total et DCM pour l'ERU sur toute la campagne

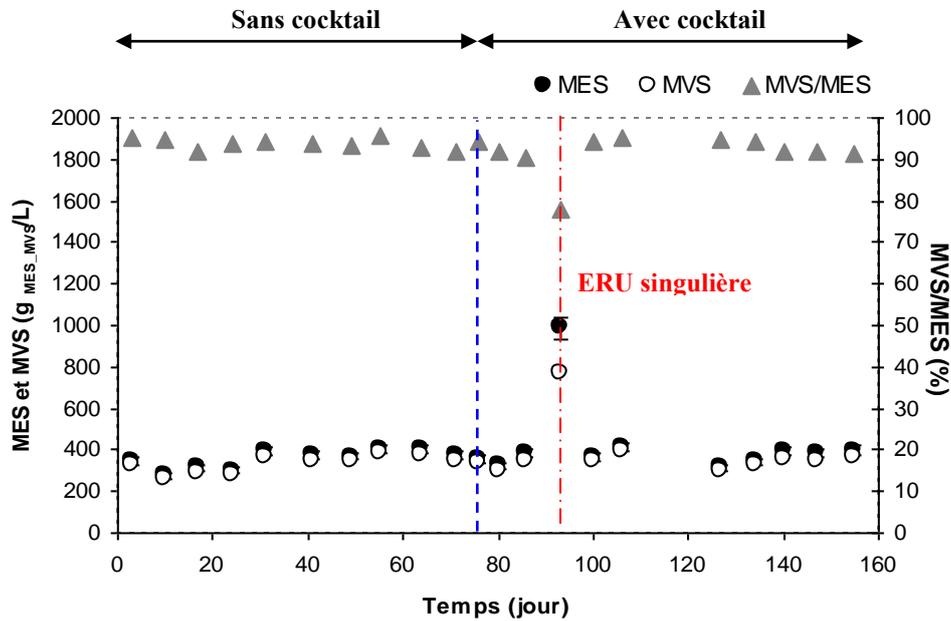


Figure M-1 : Evolution du profil des MES/MVS et du rapport MVS/MES pour l'ERU

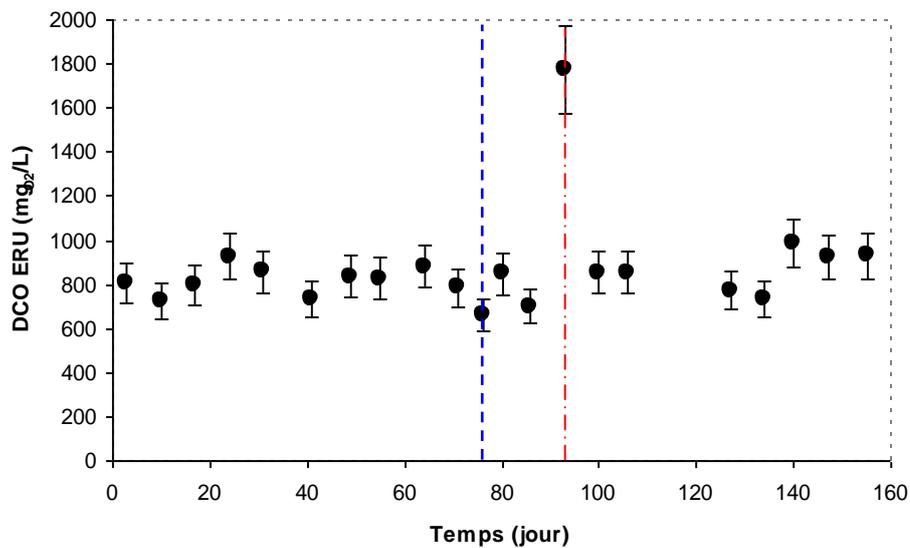


Figure M-2 : Evolution du profil de la DCO pour l'ERU

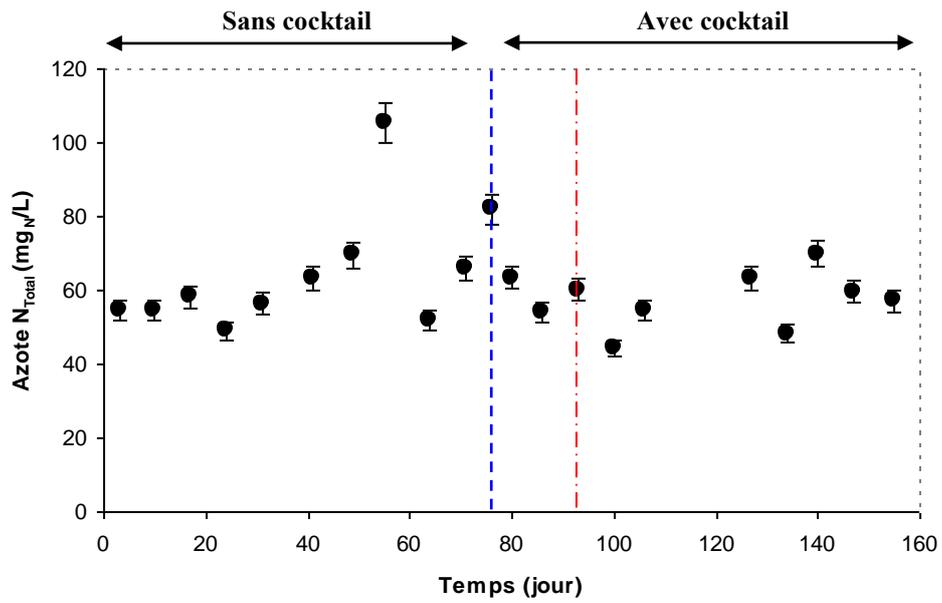


Figure M-3 : Evolution du profil de l'azote total N_{Total} pour l'ERU

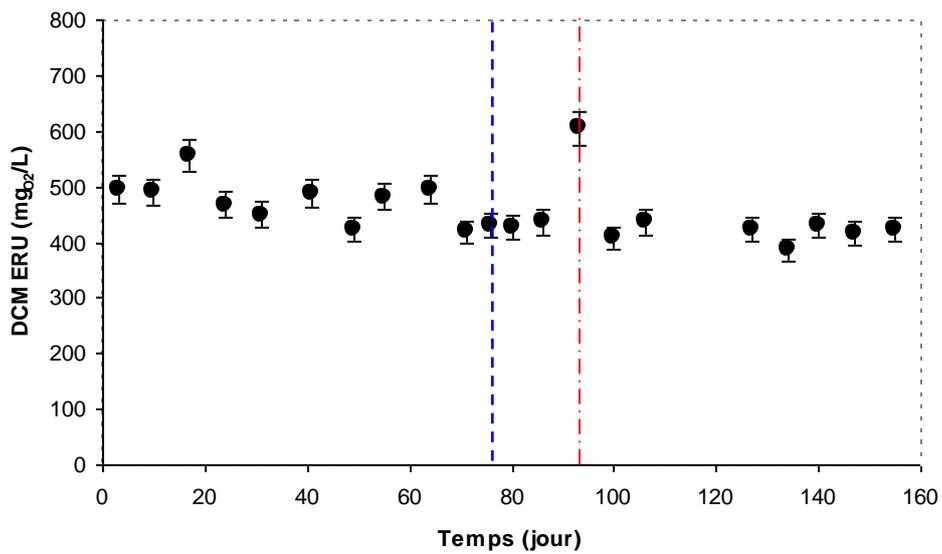


Figure M-4 : Evolution du profil de la DCM pour l'ERU

Annexe N. Evolution des concentrations en DCO et Azote total dans l'eau d'alimentation, ainsi que des charges volumiques et massiques associées

(Les relations permettant de calculer les deux charges sont données sur la prochaine page)

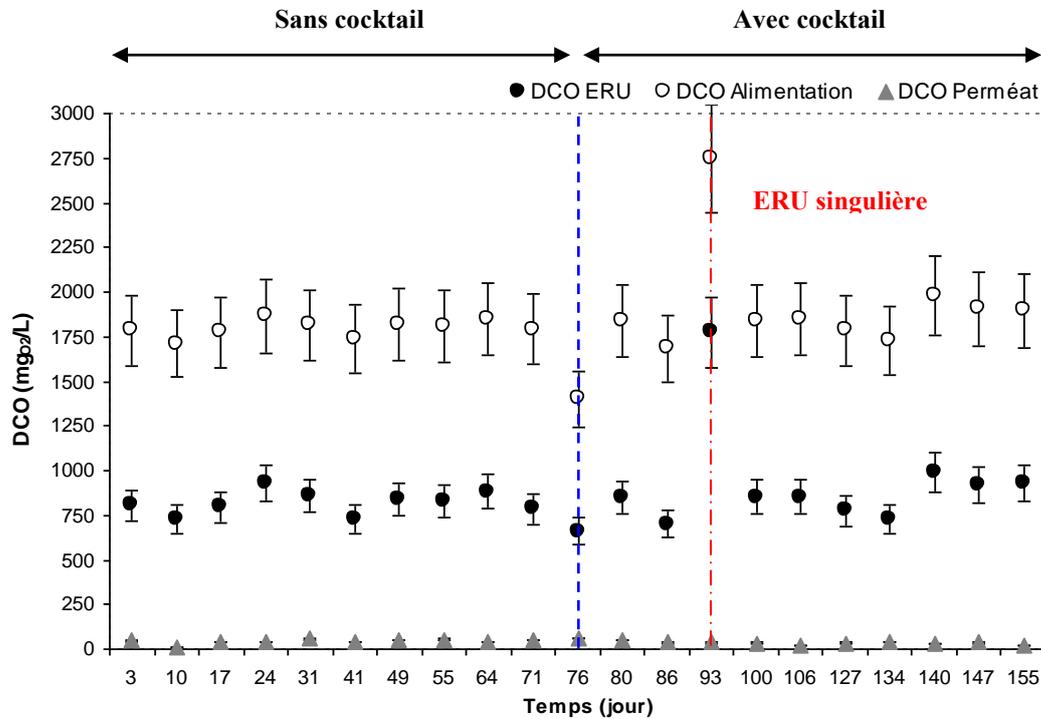


Figure N-1 : Evolution de la concentration en DCO dans l'ERU, l'eau d'alimentation et le perméat sur toute la campagne

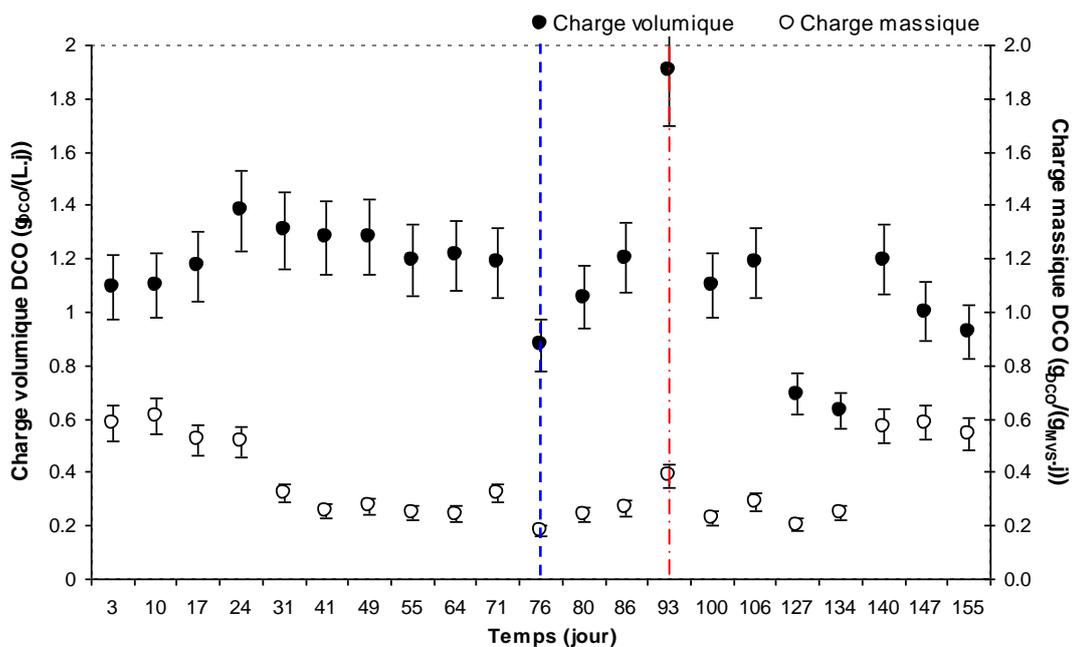


Figure N-2 : Evolution des charges volumique et massique en DCO en entrée du système

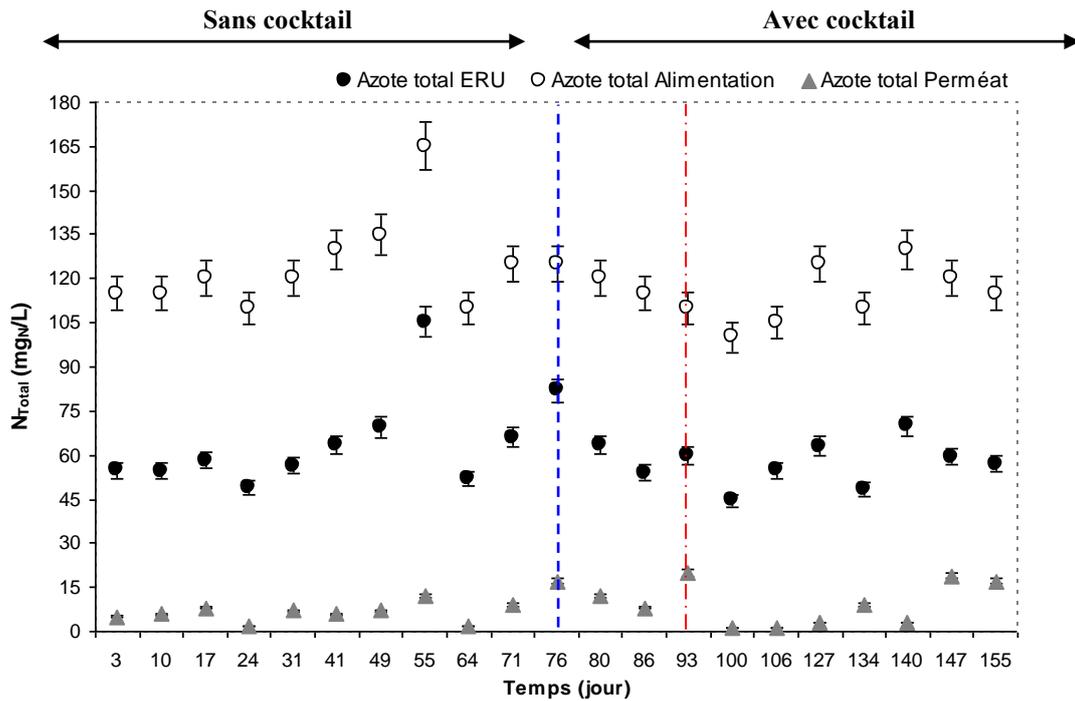


Figure N-3 : Evolution de la concentration en Azote total N_{Total} dans l'ERU, l'eau d'alimentation et le perméat sur toute la campagne

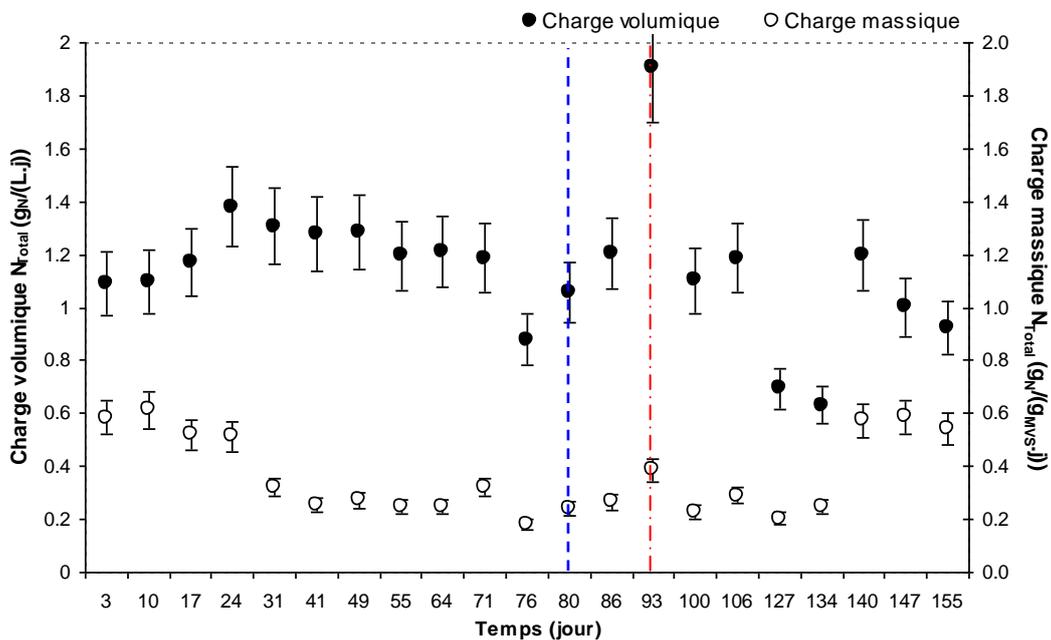


Figure N-4 : Evolution des charges volumique et massique en N_{Total} en entrée du système

$$Charge_volumique = \frac{Q_{alim} \cdot [Param\grave{e}tre]}{V_{pilote}} \quad (g_x/L.j)$$

Q_{alim} : débit d'alimentation (L/j)
 [Paramètre] : concentration du paramètre (g_x/L)

$$Charge_massique = \frac{Q_{alim} \cdot [Param\grave{e}tre]}{V_{pilote} \cdot MVS} \quad (g_x/g_{MVS}.j)$$

V_{pilote} : volume du pilote (L)
 MVS : matières volalites (g_{MVS}/L)

Annexe O. Récapitulatif des concentrations en CP aux bornes du BAME, des débits et des concentrations en MES et MVS pendant la campagne de contamination

Tableau O-1 : Synthèse des concentrations en CP, des débits et des concentrations en boue (MES et MVS) aux bornes du pilote

	$C_j^{cocktail}$	$Q_j^{cocktail}$	C_j^{solide}	$C_j^{aqueuse}$	$C_j^{perméat}$	$Q_j^{perméat}$	MES_j	MVS_j
jour j4	181,5	0,291	15,5	2,98	2,16	11,5	5,54	4,40
jour j7	181,5 ^a – 281,5 ^b	0,312				13		
jour j10	281,5 ^a – 220 ^b	0,313	15	3,48	2,1	14,3	5,57	4,52
jour j14	220 ^a – 216 ^b	0,305				14,6		
jour j17	216 ^a – 228 ^b	0,313	18,1	3,15	2,44	13,9	6,06	4,93
jour j21	228 ^a – 228 ^b	0,303				9,6		
jour j24	228 ^a – 193 ^b	0,315	18,5	3,35	2,2	12	5,92	4,84
jour j28	193 ^a – 226 ^b	0,315				12,2		
jour j30	226 ^a – 233 ^b	0,308	16	3,62	3,68	12,85	5,03	4,09
jour j32	233 ^a – 233 ^b	0,327						
jour 35	233 ^a – 233 ^b	0,309				11,9		
jour j38	233 ^a – 202,5 ^b	0,299	1,3	2,65	2,13	11,3	4,74	3,68
jour j42	202,5 ^a – 202,5 ^b	0,307				11		
jour j45	202,5 ^a – 196 ^b	0,308	3,6	0,69	2,29	10,8	4,46	3,61
jour j51	196 ^a – 215 ^b	0,318	9,3	3,29	3,6	7,8	4,21	3,41
jour j56	215 ^a – 217 ^b	0,318				7,6		
jour j58	217 ^a – 217 ^b	0,320	41,8	3,99	3,53	7,3	3,2	2,56
jour j60	237,5 ^a – 237,5 ^b	0,320						
jour j63	237,5 ^a – 237,5 ^b	0,316				9,4		
jour j64	237,5 ^a – 245 ^b	0,316	14,4	3,18	3,03	12,1	2,53	2,09
jour j71	245 ^a – 231 ^b	0,319	23,3	3,76	2,52	10,5	1,73	1,51
jour j74	231 ^a – 215,5 ^b	0,326				9,9		
jour j77	215,5 ^a – 215,5 ^b	0,326	34,8	3,93	2,6	9,8	1,87	1,6

a et b : désignent le remplacement du cocktail de médicaments ((a) concentration avant remplacement ; (b) concentration après remplacement)

$C_j^{cocktail}$ et $Q_j^{cocktail}$ désignent la concentration ($\mu\text{g/L}$) et le débit (L/j) du cocktail au temps t_j

C_j^{solide} et $C_j^{aqueuse}$ désignent la concentration en phase solide (ng/g) et aqueuse ($\mu\text{g/L}$) de la boue au temps t_j

$C_j^{perméat}$ et $Q_j^{perméat}$ désignent la concentration ($\mu\text{g/L}$) et le débit (L/j) du perméat au temps t_j

MES_j et MVS_j désignent la concentration en MES ($\text{g}_{\text{MES}}/\text{L}$) et MVS ($\text{g}_{\text{MVS}}/\text{L}$) de la boue au temps t_j

Annexe P. Exemple de calcul de bilan aux bornes du pilote de bioréacteur à membrane

Exemple de calcul pour la période j_4 à j_{10}

Tableau O-1 : Synthèse des mesures effectuées sur la période j_4 à j_{10}

	$C_j^{cocktail}$	$Q_j^{cocktail}$	C_j^{solide}	$C_j^{aqueuse}$	$C_j^{perméat}$	$Q_j^{perméat}$	MES_j	MVS_j
jour j_4	181,5	0,291	15,5	2,98	2,16	11,52	5,54	4,40
jour j_7	181,5 ^a – 281,5 ^b	0,312						
jour j_{10}	281,5	0,313	15	3,48	2,1	14,1	5,57	4,52

a et b : désignent le remplacement du cocktail de médicaments ((a) concentration avant remplacement ; (b) concentration après remplacement, effectué le jour 7)

$C_j^{cocktail}$ et $Q_j^{cocktail}$ désignent la concentration ($\mu\text{g/L}$) et le débit (L/j) du cocktail au temps t_j

C_j^{solide} et $C_j^{aqueuse}$ désignent la concentration en phase solide (ng/g) et aqueuse ($\mu\text{g/L}$) de la boue au temps t_j

$C_j^{perméat}$ et $Q_j^{perméat}$ désignent la concentration ($\mu\text{g/L}$) et le débit (L/j) du perméat au temps t_j

MES_j et MVS_j désignent la concentration en MES ($\text{g}_{\text{MES}}/\text{L}$) et MVS ($\text{g}_{\text{MVS}}/\text{L}$) de la boue au temps t_j

En entrée de système

$$(E1)_{j_4-j_7} = \frac{181,5 + 181,5}{2} \cdot \frac{0,291 + 0,312}{2} \cdot (7 - 4) = 164 \mu\text{g}$$

$$(E1)_{j_7-j_{10}} = \frac{281,5 + 281,5}{2} \cdot \frac{0,312 + 0,313}{2} \cdot (10 - 7) = 264 \mu\text{g}$$

$$(E2)_{j_4} = (15,5 \cdot 10^{-3} \cdot 5,54 + 2,98) \cdot 20 = 61 \mu\text{g}$$

$$\sum E_{j_4-j_{10}} = 164 + 264 + 61 = 489 \mu\text{g}$$

En sortie de système

$$(S1)_{j_4-j_{10}} = \frac{2,16 + 2,1}{2} \cdot \frac{11,52 + 14,1}{2} \cdot (10 - 4) = 164 \mu\text{g}$$

$$(S2)_{j_4-j_{10}} = \left(\frac{15,5 + 15}{2} \cdot 10^{-3} \cdot \frac{5,54 + 5,57}{2} + \frac{2,98 + 3,48}{2} \right) \cdot 1 \cdot (10 - 4) = 20 \mu\text{g}$$

$$\sum S_{j_4-j_{10}} = 164 + 20 = 184 \mu\text{g}$$

Non éliminé

$$(NE1)_{j_{10}} = 15 \cdot 10^{-3} \cdot 5,57 \cdot 20 = 2 \mu\text{g}$$

$$(NE2)_{j_{10}} = 3,48 \cdot 20 = 69 \mu\text{g}$$

$$\sum NE_{j_{10}} = 2 + 69 = 71 \mu\text{g}$$

Elimination non biologique

$$(ENB)_{j10} = 0,07 \cdot 489 = 34 \mu\text{g}$$

EB (Elimination par voie biologique) est déduit à partir du bilan matière :

$$(EB)_{j4_j10} = \sum E_{j4_j10} - \sum S_{j4_j10} - \sum NE_{j10} - (ENB)_{j10}$$

$$(EB)_{j4_j10} = 489 - 184 - 71 - 34 = 200 \mu\text{g}$$

$$k_{biol_j4_j10} = \frac{200}{\left(\frac{4,4 + 4,52}{2} \cdot \frac{2,98 + 3,48}{2} \cdot 20 \cdot (10 - 4)\right)} = 0,12 \text{ L}/(\text{gMVS}\cdot\text{j})$$

Pourcentages respectifs

=> Calculés d'après la relation de la forme : $Poids_du_paramètre_X(\%) = \frac{X}{(E1) + (E2)} \cdot 100$

$$(E1) + (E2) = 100 \%$$

$$(S1) = 34 \%$$

$$(S2) = 4 \%$$

$$(NE1) = 0,5 \%$$

$$(NE2) = 14 \%$$

$$(ENB) = 7 \%$$

$$(EB) = 41 \%$$

Rappel des équations

$$\text{Quantité entrante par l'alimentation : } (E1) = \frac{C_j^{\text{cocktail}} + C_{j+n}^{\text{cocktail}}}{2} \cdot \frac{Q_j^{\text{cocktail}} + Q_{j+n}^{\text{cocktail}}}{2} \cdot (t_{j+n} - t_j)$$

$$\text{Quantité présente dans le pilote : } (E2) = (C_j^{\text{solide}} \cdot MES_j + C_j^{\text{aqueuse}}) \cdot V_{\text{pilote}}$$

$$\text{Quantité sortante dans le perméat : } (S1) = \frac{C_j^{\text{perméat}} + C_{j+n}^{\text{perméat}}}{2} \cdot \frac{Q_j^{\text{perméat}} + Q_{j+n}^{\text{perméat}}}{2} \cdot (t_{j+n} - t_j)$$

$$\text{Purges : } (S2) = \left(\frac{C_j^{\text{solide}} + C_{j+n}^{\text{solide}}}{2} \cdot \frac{MES_j + MES_{j+n}}{2} + \frac{C_j^{\text{aqueuse}} + C_{j+n}^{\text{aqueuse}}}{2} \right) \cdot V_{\text{purge}} \cdot (t_{j+n} - t_j)$$

$$\text{Quantité restante dans le pilote – Phase solide des boues : } (NE1) = C_{j+n}^{\text{solide}} \cdot MES_{j+n} \cdot V_{\text{pilote}}$$

$$\text{Quantité restante dans le pilote – Phase aqueuse des boues : } (NE2) = C_{j+n}^{\text{aqueuse}} \cdot V_{\text{pilote}}$$

$$\text{Quantité perdue par pertes abiotiques : } (ENB) = a \cdot (E1 + E2)$$

$$\text{Elimination biologique : } (EB) = k_{biol} \cdot \left(\frac{MVS_j + MVS_{j+n}}{2} \right) \cdot \left(\frac{C_j^{aqueuse} + C_{j+n}^{aqueuse}}{2} \right) \cdot V_{pilote} \cdot (t_{j+n} - t_j)$$

où V_{pilote} est le volume du pilote (20 L), V_{purge} le volume quotidien de la purge (1 L/j), a la fraction éliminée par perte biotique.

Annexe Q. Profils de concentration obtenus pour les paramètres physico-chimiques et micropolluants lors de l'ultrafractionnement de la phase aqueuse

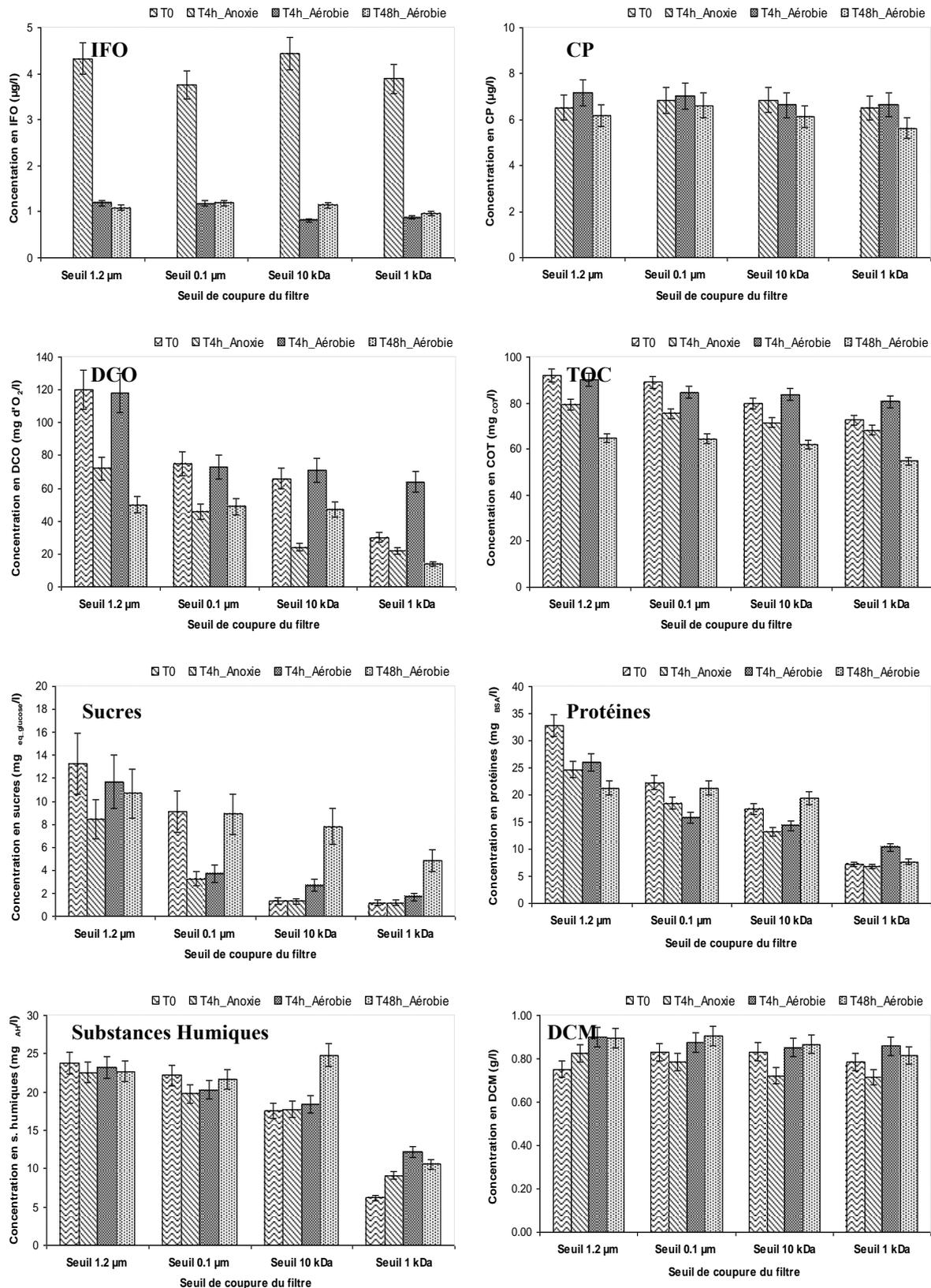


Figure P-1 : Profils de concentrations des différentes fractions – boue non contaminée

Annexe Q. Profils de concentrations obtenu pour les paramètres physico-chimiques et micropolluants lors de l'ultrafractionnement de la phase aqueuse

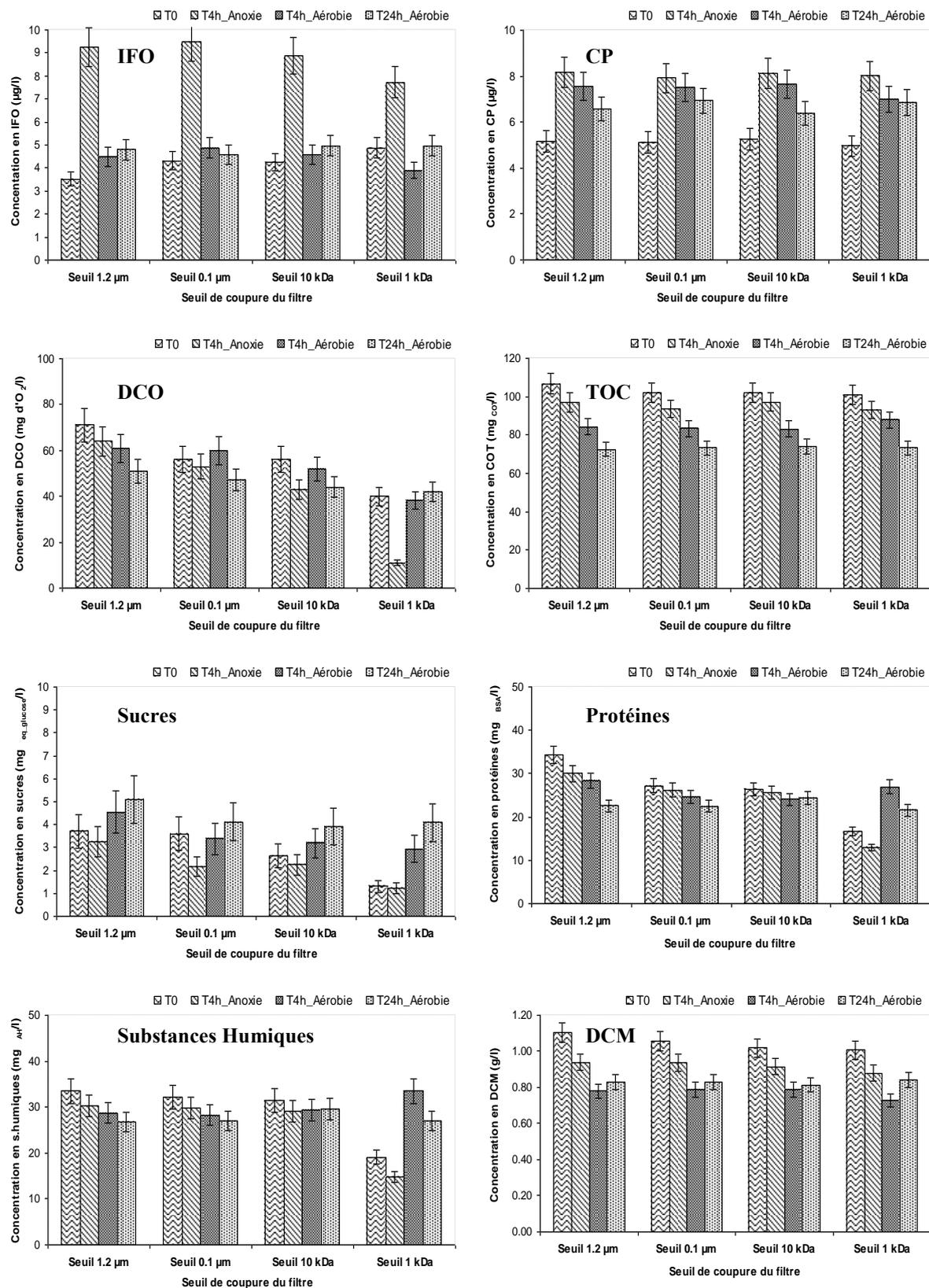


Figure P-2 : Profils de concentrations des différentes fractions – boue contaminée