

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

ÉVALUATION DU POUVOIR DE RÉTENTION DE DIFFÉRENTES MATRICES
ENVIRONNEMENTALES POUR DES CONTAMINANTS ÉMERGENTS PAR
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE COUPLÉE À
LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR
SARAH-EVE GÉLINAS

DÉCEMBRE 2019

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

« Tout est possible à qui rêve, ose, travaille
et n'abandonne jamais »

Xavier Dolan

REMERCIEMENTS

À André et Nadia; merci de m'avoir donné ma première chance, d'avoir vu en moi le potentiel nécessaire à la réalisation de ce projet et surtout merci d'avoir honoré vos engagements jusqu'à la fin malgré les embûches rencontrées.

À Simon Barnabé et son étudiante Marguerite; un immense merci pour votre collaboration dans ce projet et spécialement pour votre temps, vos judicieux conseils et l'accès à vos montages de culture d'algues.

À Northern Watertek et Mitacs Accélération; merci pour le financement durant ce projet de maîtrise.

À Jocelyn, Jean-Philippe, Francis, Amy et Vickie, les meilleurs techniciens du monde; merci pour votre temps précieux que vous donnez sans jamais compter. Sachez que l'UQTR est chanceuse de vous avoir et que nous, les étudiants, sommes encore plus privilégiés de vous compter comme fidèles alliés dans notre parcours académique.

À ma famille et amis; merci d'être là. Jour après jour, dans les beaux comme dans les moins beaux moments. Votre présence et votre soutien sont essentielles et inestimables à mes yeux.

À toi, ma petite Mamie que j'ai perdue au cours de cette maîtrise; d'où que tu sois, je veux que tu saches que je ne serais pas en train d'écrire ces remerciements si ce n'était pas de toi. De toi, ton amour inconditionnel, ton soutien sans limite et ta confiance en moi depuis le jour 1. Je t'en serai éternellement reconnaissante.

À ma fille Léa née pendant cette dernière étape marquant la fin de ma scolarité; merci d'être arrivée au bon moment et d'avoir été le baume que j'avais besoin. Merci de me pousser à devenir la meilleure version de moi-même chaque jour. N'oublie jamais que les rêves les plus fous peuvent devenir réalité en y consacrant travail, rigueur et efforts. Les seules limites qui existent réellement sont celles que l'on s'impose nous-même.

À Laurence, ma conjointe et la femme de ma vie; merci d'être mon bras droit depuis toutes ces années et de nous avoir jamais abandonnées dans ce tourbillon quotidien qui peut parfois être étourdissant. Merci d'avoir cru en moi lorsque je n'y croyais plus moi-même. Aucune de mes réussites n'aurait de sens sans toi avec qui les partager.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xii
RÉSUMÉ	xiii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I VOLET THÉORIQUE.....	3
1.1 La pollution environnementale.....	3
1.1.1 Contaminants émergents et produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPCPS).....	6
1.2 Présence et devenir des PPCPs.....	7
1.2.1 Bioaccumulation chez les organismes aquatiques	9
1.2.2 Écotoxicité dans les milieux aquatiques	11
1.3 Sélection des contaminants émergents et des produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPCPS).....	15
1.4 Types de traitements des eaux usées	18
1.4.1 Prétraitements	18
1.4.2 Traitements primaires	19
1.4.3 Traitements secondaires.....	19
1.4.4 Traitements tertiaires (avancés).....	21
1.5 Traitement par bioremédiation	23
1.5.1 Modes d'épuration des algues et organismes aquatiques	24
1.5.2 Valorisation de la biomasse	25
1.6 Stratégies analytiques pour le suivi et dosage des PPCPs.....	26

1.6.1	Extraction sur phase solide (SPE).....	27
1.6.2	Extraction liquide-liquide	30
1.6.3	Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS).....	33
1.6.4	Principes et modes d'analyse de la HPLC-MS/MS	34
1.7	Les objectifs du projet	39
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		41
2.1	Matériaux et réactifs	41
2.1.1	Drogues illicites et PPCPs	41
2.1.2	Matériaux et produits chimiques.....	41
2.2	Production des lixiviats	42
2.3	Expositions des microalgues et des organismes aquatiques.....	43
2.3.1	<i>Chlorella sp</i>	43
2.3.2	<i>Daphnia magna</i>	45
2.4	Descriptions des procédures d'extraction.....	46
2.4.1	Lixiviats	46
2.4.2	Terreaux avec herbacées, microalgues et tissus biologiques.....	47
2.5	Paramètres instrumentaux.....	48
2.5.1	Chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	48
2.5.2	Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	50
2.5.3	Courbes d'étalonnage	54
CHAPITRE III RÉSULTATS ET DISCUSSION		56
3.1	Optimisation des signaux HPLC-MS/MS	56
3.1.1	HPLC – Phases mobiles.....	56
3.1.2	HPLC – Proportions des phases mobiles, débit et temps d'analyse ..	58
3.1.3	MS/MS – Fragments (« Daughters »).....	59
3.1.4	MS/MS – Énergie de collision, voltage au cône et voltage au capillaire.....	62
3.1.5	SPE – Solution de reconstitution des extraits	66

3.1.6	SPE – Solutions de lavage et d’élution.....	70
3.1.7	SPE – Optimisation du pH.....	73
3.2	Paramètres de validation.....	74
3.2.1	Eaux de lixiviat	74
3.2.2	Terreaux avec herbacées.....	81
3.2.3	<i>Chlorella sp.</i>	84
3.2.4	<i>Daphnia magna</i>	86
3.3	Devenir des PPCPs dans des terreaux avec herbacées	91
3.4	Évaluation de la performance de phycoremédiation des algues <i>Chlorella sp.</i>	93
3.5	Bioaccumulation par l’organisme aquatique <i>Daphnia magna</i>	97
	CONCLUSION	100
	BIBLIOGRAPHIE	104

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Voies d'introduction des substances pharmaceutiques dans l'environnement	5
1.2	Principales voies d'introduction des PPCPs dans l'environnement.....	8
1.3	Structure chimique des produits pharmaceutiques et de soins personnels sélectionnés	16
1.4	Structure chimique de l'adsorbant – Cartouches échangeuses fortes de cations « Strong cation exchange ».....	28
1.5	Processus de l'extraction sur phase solide	29
1.6	Phase stationnaire d'une colonne chromatographique Luna Omega Polar C18.....	35
2.1	Chromatogramme des PPCPs (1 de 2) – Méthode analytique HPLC développée pour la quantification dans les eaux de lixiviat, terreaux avec herbacées et microalgues.....	52
2.2	Chromatogramme des PPCPs (2 de 2) – Méthode analytique HPLC développée pour la quantification dans les eaux de lixiviat, terreaux avec herbacées et microalgues.....	53
2.3	Chromatogramme des drogues illicites – Méthode analytique HPLC développée pour la quantification dans les daphnies	54
3.1	Balayage d'ions fragments « Daughters scan » de la méthamphétamine – Fragments de quantification et de confirmation à 91 m/z et 119 m/z respectivement.....	60
3.2	Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » de la méthamphétamine – Fragments de quantification et de confirmation à 91 m/z et 119 m/z respectivement.....	61

3.3	Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » du fentanyl – Optimisation de l'énergie de collision	63
3.4	Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » du fentanyl – Optimisation du voltage au cône.....	65
3.5	Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » de la méthamphétamine – Optimisation du voltage au capillaire	65
3.6	Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » du norfentanyl – Optimisation de la solution de reconstitution des extraits provenant de tissus de <i>Daphnia magna</i>	68
3.7	Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » du fentanyl – Optimisation de la solution de reconstitution des extraits provenant de tissus de <i>Daphnia magna</i>	69
3.8	Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » de la carbamazépine – Optimisation de la solution de reconstitution des extraits provenant d'eaux de lixiviat, de terreaux et de microalgues.....	70
3.9	Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » du norfentanyl – Optimisation des solutions d'élution SPE	73
3.10	Courbes d'étalonnage des PPCPs dans les eaux de lixiviat	75
3.11	Courbes d'étalonnage des PCPPs dans les algues <i>Chlorella sp.</i>	85
3.12	Courbes d'étalonnage des drogues illicites dans <i>Daphnia magna</i>	87
3.13	Courbe de croissance des algues <i>Chlorella sp.</i> en fonction du temps	94
3.14	Spectre de masse du métabolite 4-hydroxyméthamphétamine	99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Données chimiques des contaminants émergents sélectionnés dans le cadre du projet de maîtrise	17
1.2 Taille des pores dans les procédés d'épuration membranaires	23
2.1 Paramètres instrumentaux utilisés au HPLC – Eaux de lixiviat, terreaux avec herbacées et microalgues	49
2.2 Paramètres instrumentaux utilisés au HPLC – Daphnies.....	50
2.3 Paramètres instrumentaux utilisés au spectromètre de masse en tandem MS/MS – Eaux de lixiviat, terreaux avec herbacées et microalgues	51
2.4 Paramètres instrumentaux utilisés au spectromètre de masse en tandem MS/MS – Daphnies	52
3.1 Optimisation des phases mobiles – Combinaisons testées.....	57
3.2 Optimisation des solutions de reconstitution des extraits – Combinaisons testées	66
3.3 Optimisation des solutions de lavage – Combinaisons testées	71
3.4 Optimisation des solutions d'élution – Combinaisons testées	72
3.5 Optimisation du pH des échantillons – Combinaisons testées.....	74
3.6 Taux de récupération des PPCPs – Eaux de lixiviat	76
3.7 Effets de matrice des PPCPs – Eaux de lixiviat	78
3.8 Limites de détection et de quantification des PPCPs – Eaux de lixiviat.....	79
3.9 Exactitude et précision de la méthode analytique – Eaux de lixiviat.....	80

3.10	Taux de récupération des PPCPs – Terreaux avec herbacées	82
3.11	Effets de matrice des PPCPs – Terreaux avec herbacées.....	84
3.12	Exactitude et précision de la méthode analytique – <i>Chlorella sp.</i>	86
3.13	Taux de récupération des drogues illicites – <i>Daphnia magna</i>	88
3.14	Effets de matrice des drogues illicites – <i>Daphnia magna</i>	89
3.15	Limites de détection et de quantification des drogues illicites – <i>Daphnia magna</i>	90
3.16	Exactitude et précision de la méthode analytique – <i>Daphnia magna</i>	91
3.17	Concentrations en PPCPs détectées dans les eaux de lixiviat au printemps 2017 et 2018	92
3.18	Concentrations en PPCPs détectées dans les échantillons <i>Chlorella sp.</i>	96
3.19	Taux de dégradation des PPCPs après 10 jours dans le milieu de culture ..	97
3.20	Concentrations en drogues illicites détectées dans les tissus de <i>Daphnia magna</i>	98

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

CAR	Carbamazépine
COC	Cocaïne
ELAPS	Engineered Land Application System
FEN	Fentanyl
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HPLC-MS/MS	Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem
IMI	Imidaclopride
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification
MDA	3,4-méthylènedioxyamphétamine
MDMA	3,4-méthylènedioxy-N-méthylamphétamine (MDMA, ecstasy)
MET	Méthamphétamine
MF	Microfiltration
NF	Nanofiltration
NOR	Norfentanyl
OI	Osmose inverse
PPCP(s)	Produit(s) pharmaceutique(s) et de soins personnels
SPE	Extraction sur phase solide
TMX	Thiaméthoxame
UF	Ultrafiltration
UQTR	Université du Québec à Trois-Rivières
VEN	Venlafaxine

RÉSUMÉ

À ce jour, la présence de produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPCPs) dans les effluents municipaux est bien documentée. Comme les stations d'épuration conventionnelles possèdent des technologies limitées pour l'enlèvement de ces substances, ces dernières sont déversées quotidiennement dans l'environnement aquatique où elles menacent les écosystèmes. Par conséquent, de nouveaux procédés efficaces et davantage écologiques sont souhaitables pour épurer les eaux usées. Ce projet de recherche visait donc à évaluer par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) le pouvoir d'épuration de deux matrices environnementales envers divers contaminants PPCPs sélectionnés.

Dans un premier temps, de nombreux efforts ont été déployés pour le développement de nouvelles méthodes analytiques performantes permettant à la fois l'extraction sélective et efficace des composés ciblés, mais également leur détection sensible et spécifique dans des matrices environnementales complexes. Afin d'obtenir des résultats optimaux, de nombreux paramètres ont été optimisés tant au niveau des protocoles d'extraction que ceux au HPLC-MS/MS. Dans le but de vérifier l'efficacité de ces nouvelles méthodes analytiques, des tests de validations ont été complétés avec chaque matrice environnementale étudiée. Ces tests ont permis la validation des paramètres analytiques cruciaux suivants : la linéarité, le taux de récupération, les effets de matrice, les limites de détection et de quantification, l'exactitude et la précision.

Parmi les matrices environnementales investiguées, le lixiviat d'un sol utilisé comme support dans un procédé de phytoremédiation ELAPS (Engineered Land Application System) fut analysé pour déterminer la rétention ou non de produits pharmaceutiques, de drogues illicites et de pesticides de la famille des néonicotinoïdes. Ensuite, une étude préliminaire a été réalisée sous conditions contrôlées pour évaluer le pouvoir d'épuration des microalgues *Chorella sp.* envers des substances émergentes sélectionnées. Finalement, une étude complémentaire de bioaccumulation a été complétée à partir de tests *in vivo* avec de petits crustacés *Daphnia magna* pour vérifier leur potentiel de captation pour certaines drogues illicites.

Au terme de ces travaux, des analyses de lixiviat issues d'épandages de solutions synthétiques de PPCPs ont démontré l'existence d'un possible risque de toxicité

lié à la percolation de certains contaminants dans le sol. Des concentrations non négligeables entre 0,0117 mg/L et 0,02313 mg/L ont été détectées dans les extraits analysés. Les expositions de *Chlorella sp.* aux PPCPs ont révélé quant à elles un potentiel de phycoremédiation plutôt limité avec les conditions expérimentales testées : de faibles taux d'enlèvement avoisinant les 2 % ont été obtenus pour les substances venlafaxine, carbamazépine, fentanyl et norfentanyl. Enfin, la bioaccumulation de méthamphétamine dans les tissus biologiques de daphnies a pu être confirmée grâce à la détection et la caractérisation d'un nouveau métabolite (c.-à-d. 4-hydroxyméthamphétamine) initialement absent dans la solution d'exposition. Par conséquent, cette intéressante découverte ouvre la porte à de possibles applications en chimie environnementale forensique où des organismes aquatiques comme les daphnies pourraient être utilisés comme « témoins silencieux » pour capter des substances ciblées lors d'une investigation en milieu aquatique. À titre d'exemple, des déversements volontaires de contaminants par des industries délinquantes pourraient être confirmés suivant une exposition avec organismes aquatiques. De même, la détection de drogues illicites, intermédiaires de synthèse et/ou métabolites caractéristiques de ces molécules absorbées par des organismes aquatiques pourrait contribuer à l'avancement d'enquêtes visant le démantèlement de laboratoires clandestins.

Mots clés : Produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPCPs), contaminants émergents, phycoremédiation, bioaccumulation, chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS), chimie environnementale forensique.

INTRODUCTION

À ce jour, plusieurs études rapportent la présence de produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPCPs) dans les effluents municipaux. Étant donné les taux d'enlèvement limités de ces substances par les stations d'épuration conventionnelles, ces dernières retrouvées à différentes concentrations dans les effluents sont déversées quotidiennement dans l'environnement aquatique où elles menacent les écosystèmes aquatiques avec de possibles effets toxiques chroniques. Désormais, les municipalités doivent se doter de procédés plus performants et écologiques pour réduire la charge en contaminants dans les eaux usées.

Un des objectifs de ce présent projet en chimie environnementale consistera à développer de nouvelles méthodes analytiques performantes permettant à la fois l'extraction sélective et efficace de composés ciblés, mais également leur détection sensible et spécifique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) dans des matrices environnementales complexes liquides (c.-à-d. effluents synthétiques et lixiviats) et solides (c.-à-d. terreaux avec herbacées, microalgues et crustacés). Lors du développement analytique, de nombreuses optimisations devront être réalisées tant au niveau des protocoles d'extraction que ceux au HPLC-MS/MS. Entre autres, les solutions de reconstitution des extraits, les solutions de lavage et d'élution et le pH devront être optimisés pour les protocoles SPE développés. L'optimisation de ces paramètres aura comme principal but d'obtenir les meilleurs taux de récupération possible pour les PPCPs présents à l'état de trace dans les échantillons analysés. En ce qui concerne les optimisations des méthodes au HPLC-MS/MS, elles devront être complétées afin d'obtenir une bonne séparation

chromatographique des substances à l'étude tout en générant des signaux pouvant servir à la quantification et en conservant une bonne productivité analytique (c.-à.d un temps d'analyse court). Les paramètres suivants devront être optimisés au HPLC-MS/MS : la composition des phases mobiles utilisées, leur proportion, le débit, le temps d'analyse, les fragments de quantification et de confirmation, l'énergie de collision, le voltage au cône et le voltage au capillaire. Beaucoup d'efforts devront également être investis tout au long de ce projet de maîtrise afin de démontrer l'efficacité des nouveaux protocoles analytiques développés en laboratoire, soit en complétant des tests de validation avec chaque matrice étudiée. Des paramètres analytiques tels que la linéarité, le taux de récupération, les effets de matrice, les limites de détection et de quantification, l'exactitude et la précision devront être évalués.

Les nouvelles méthodes analytiques optimisées et validées pourront jouer un rôle capital dans l'évaluation du pouvoir d'épuration de deux matrices environnementales envers des contaminants émergents. Précisément, des expositions à des solutions diluées d'effluent synthétique composées de produits pharmaceutiques, de drogues illicites et certains pesticides néonicotinoïdes seront réalisées sur un sol travaillé ELAPS et des microalgues *Chlorella sp.* Une étude complémentaire pourra également être complétée à partir de tests *in vivo* avec de petits crustacés *Daphnia magna* pour vérifier la présence de bioaccumulation pour certaines drogues illicites sélectionnées et une possible écotoxicité.

Les deux premiers chapitres de ce mémoire présentent les fondements théoriques et pratiques nécessaires à la compréhension du présent projet de maîtrise. Le troisième chapitre comporte les résultats obtenus au cours de ce projet et la discussion de ces derniers. Finalement, une conclusion clôt le mémoire en élaborant les points marquants retenus au terme de cette étude ainsi que des perspectives de recherche intéressantes pour de futurs travaux.

CHAPITRE I

VOLET THÉORIQUE

1.1 La pollution environnementale

Au cours des dernières décennies, le Canada ainsi que plusieurs autres pays du monde ont connu une industrialisation majeure menant à une utilisation grandissante de l'eau [1]. Cette augmentation non négligeable de la population, jumelée à une activité industrielle croissante ont causé la complexification des effluents acheminés vers les stations d'épuration [1]. Bien que les stations d'épuration soient en majeure partie responsables des contaminants retrouvés dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les boues et les sédiments [1], le réel enjeu proviennent des sources émettrices de ces polluants, c'est-à-dire à l'endroit où ces derniers sont produits.

Dans les faits, il existe plusieurs sources différentes de pollution. Il y a d'abord la pollution naturelle comme celles dues au volcanisme, aux feux ou même aux suintements des gisements pétroliers situés près de la surface des sols [2]. Mise à part la pollution naturelle, la pollution la plus préoccupante à ce jour demeure sans contredit celle produite par l'homme [3]. Ainsi, l'intervention humaine contribue à l'émission de quatre sources de pollution : industrielle, agricole, urbaine et domestique.

La pollution industrielle est en partie associée à diverses activités notamment les usines à gaz, les garages automobiles, les imprimeries, les stations-service et les sites chimiques et pharmaceutiques [2, 3]. Malgré certaines précautions prises au cours des dernières années, les normes et règlements entourant la pollution industrielle n'étaient pas aussi stricts que ceux en vigueur aujourd'hui, donnant lieu à des pratiques non souhaitables et à de la pollution des sols.

Dans un milieu agricole, les pesticides font également partie des importantes sources émettrices de pollution. En 2016, les ventes totales de pesticides au Québec s'élevaient à plus de 4000 tonnes d'ingrédients actifs, dont près de 82 % de ces ventes étaient destinées au secteur agricole [4]. La pollution rurale est principalement causée par l'épandage d'engrais chimique et aux pesticides minéraux et organiques utilisés pour éliminer les organismes nuisibles aux récoltes [2]. La contamination des sols par le domaine agricole se fait en amont, mais aussi en aval via les déchets solides générés par le bétail (ex. les excréta tels les purins et les fumiers) [2].

En ce qui a trait aux pollutions urbaines et domestiques, ces dernières sont occasionnées par une multitude d'activités anthropomorphiques engendrant une contamination de l'atmosphère urbaine et des milieux aquatiques avoisinants [3]. D'abord, les ordures ménagères produites par les ménages participent à la contamination de l'environnement étant donné qu'elles nécessitent d'être traitées par incinération ou, dans d'autres cas, sont enclines à polluer les sols par le compost par exemple [2]. Il y a également les stations d'épuration conventionnelles qui sont limitées pour le traitement des substances émergentes, ce qui cause inévitablement de la pollution. En effet, suivant les traitements actuellement utilisés pour traiter les eaux usées, les stations d'épuration démontrent un taux d'enlèvement limité envers plusieurs contaminants qui se retrouvent par la suite dans les eaux usées. La résultante étant le déversement quotidien de cesdites substances dans les eaux réceptrices [5-9]. Parmi les substances rencontrées figurent les résidus pharmaceutiques qui, une fois

consommés et excrétés par l'humain, se retrouvent dans les écosystèmes par différentes voies d'accès [2]. Les composés pharmaceutiques non consommés et jetés directement dans les ordures contaminent quant à eux l'environnement aquatique par phénomène de lessivage et percolation [2]. Dans une moindre mesure, les médicaments périmés sont parfois jetés dans les toilettes. La figure 1.1 illustre les différentes voies d'introduction des substances pharmaceutiques dans l'environnement [2].

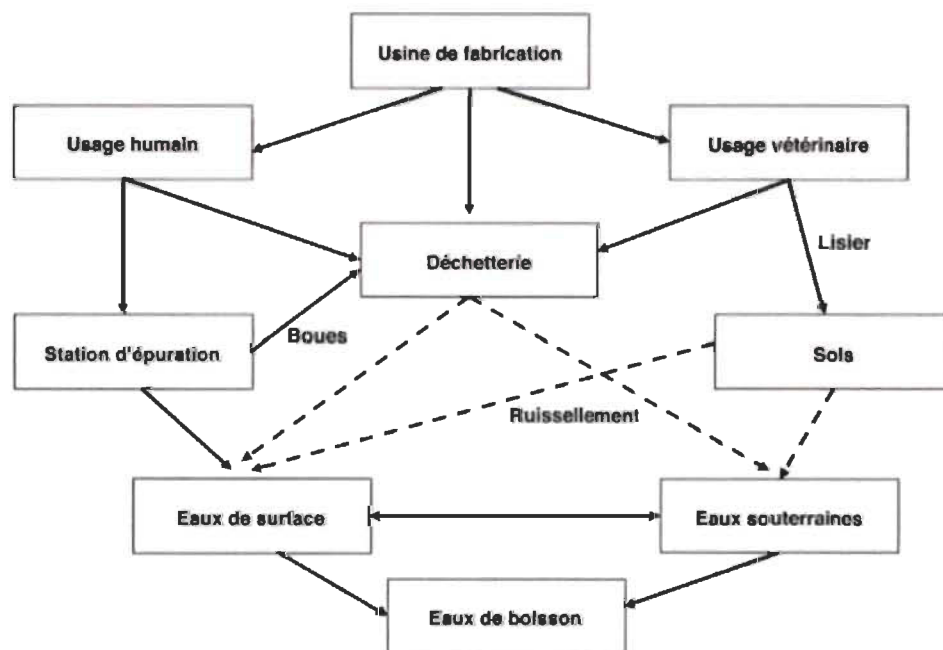


Figure 1.1 Voies d'introduction des substances pharmaceutiques dans l'environnement (Tirée de Togolo, 2006).

Ainsi, les résidus de médicaments et de drogues illicites font partie des substances se retrouvant désormais dans les eaux usées à des concentrations assez élevées. Selon la littérature, il existe trois voies de pénétration de ces composés dans l'environnement : une mineure associée aux pertes de procédés de fabrications industrielles [2], une provenant des rejets de substances dans les toilettes ou ordures [2] et finalement une plus importante issue d'une consommation humaine ou animale [2]. Pour cette dernière voie d'entrée, l'humain absorbe d'abord la substance

avant sa distribution dans le corps vers les organes cibles, puis un métabolisme intervient créant ainsi des métabolites plus ou moins nocifs que la molécule mère initiale. Le reste de la molécule mère et ses métabolites sont excrétés via l'urine et les fèces dans les toilettes et gagnent les eaux usées via les collecteurs [10]. Comme les produits pharmaceutiques, les drogues illicites et les produits dopants ne font pas exception et sont également peu ou pas éliminés lors du traitement des eaux usées par les stations d'épuration, contaminant ainsi les milieux aquatiques environnants [5-9]. Les produits cosmétiques sont également de bons candidats pour polluer l'environnement. En fait, ce sont les additifs à l'intérieur de ceux-ci pour les rendre plus attrayants pour les consommateurs qui sont extrêmement nuisibles pour la santé et qui présentent des dangers environnementaux non négligeables [2]. Parmi ces additifs, notons par exemple les parabènes qui ont comme fonction la conservation des produits auxquels ils sont ajoutés, mais qui sont également reconnus pour être des perturbateurs endocriniens. Le cyclopentasiloxane, une substance ajoutée dans les produits de soins personnels pour émollier la peau, fait également partie de la longue liste d'additifs toxiques en causant une toxicité importante sur le système reproducteur.

1.1.1 Contaminants émergents et produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPCPS)

Le présent projet de maîtrise se concentre sur les contaminants émergents, précisément les produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPCPs). Ces contaminants sont considérés comme émergents en raison de leur abondance et de leur persistance dans l'environnement depuis le début des années 1990, mais aussi, et surtout par le manque d'informations disponibles quant aux risques environnementaux qu'ils peuvent causer [11, 12]. Ils correspondent à une vaste gamme de substances que nous utilisons régulièrement. Parmi ces substances, figurent les produits de soins personnels utilisés au quotidien pour améliorer la vie des gens comme des crèmes hydratantes, des shampoings, des agents nettoyants ou des cosmétiques, qui sont ajoutés aux eaux

usées suivant une douche, un bain ou une autre pratique hygiénique [5, 13-15]. Les drogues illicites et leurs métabolites, ainsi que les médicaments à usage humain ou animal ayant été prescrits ou en vente libre font également partie de la grande classe de PPCPs. Ces derniers sont majoritairement évacués par les toilettes suite à leur métabolisation dans le corps et leur excrétion [13, 16]. Ces substances partiellement éliminées sont elles aussi introduites dans l'environnement terrestre et aquatique via les déversements des stations d'épuration possédant des procédés d'épuration plus ou moins efficaces [5-9, 17].

1.2 Présence et devenir des PPCPs

Bien que le niveau de connaissance entourant les conséquences d'une exposition aux PPCPs soit encore peu approfondi, les différentes voies d'introduction de ces substances nocives sur l'environnement terrestre et aquatique sont bien documentées [18]. La figure 1.2 illustre les possibles chemins que prennent les PPCPs pour atteindre les milieux terrestres et aquatiques.

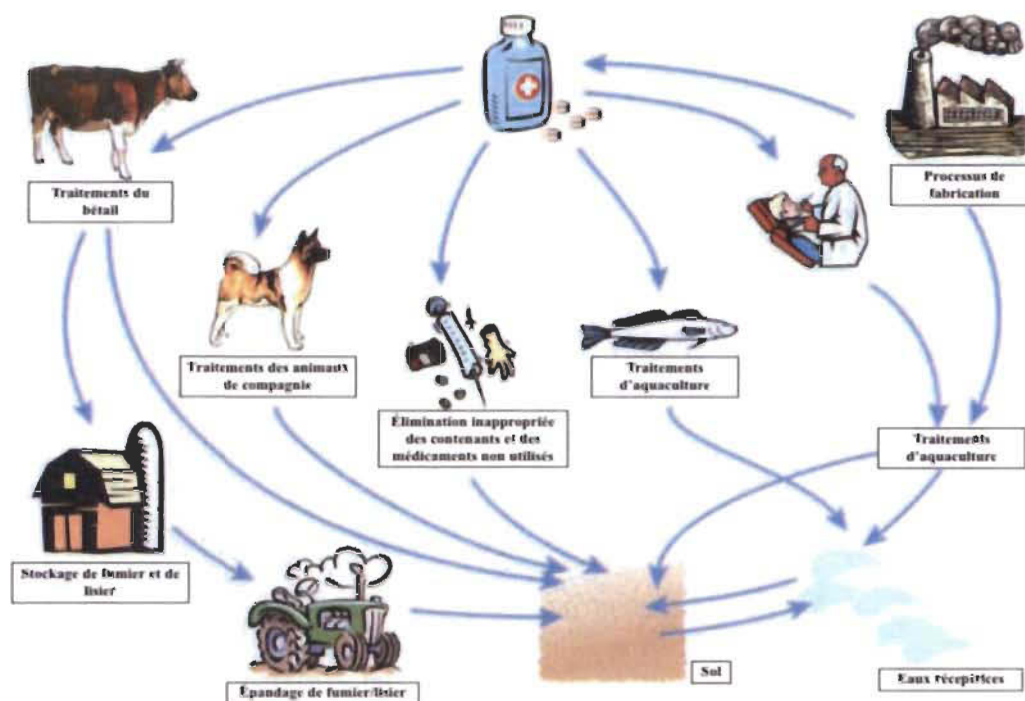


Figure 1.2 Principales voies d'introduction des PPCPs dans l'environnement (Adaptée de Boxall *et al.*, 2012 [18]).

Même si la présence des PPCPs dans l'environnement est maintenant mieux connue, il appert que les effets de leur exposition ainsi que leurs conséquences sur la vie aquatique demeurent peu compris et expliqués par la communauté scientifique. Ce n'est que depuis une vingtaine d'années que des méthodes analytiques suffisamment sensibles et spécifiques permettent l'identification et la quantification des PPCPs présents dans les cours d'eau [19]. Selon des travaux de recherche rapportés en chimie environnementale, la présence des PPCPs dans les effluents des stations de traitement des eaux usées s'étend du $\mu\text{g/L}$ jusqu'aux faibles ng/L [20]. Les concentrations de PPCPs dépassent rarement 100 ng/L dans les eaux de surface [20, 21]. Cependant, quelques PPCPs ont été détectés à de faibles concentrations relevant du ng/L dans les eaux souterraines [20, 22, 23], les océans [20, 24] et même dans l'eau potable [20, 25]. Des concentrations similaires ont aussi été retrouvées dans le corps humain. À titre d'exemple, des concentrations de l'ordre de ng/g de substances

utilisées pour faire des parfums ont été retrouvées dans le lait maternel [26, 27] et dans les tissus adipeux de personnes [28, 29]. Le triclosan, un composé ayant des propriétés biocides, a été aussi retrouvé à des concentrations de ng/mL dans l'urine [30, 31] et ng/g dans les tissus adipeux, le foie et le cerveau [29, 32]. Des parabènes qui sont des composés ayant la capacité d'activer les récepteurs oestrogéniques et d'avoir un effet sur la fertilité et le développement de tumeurs ont été trouvés aux mêmes concentrations que le triclosan dans l'urine [30], les tissus adipeux des seins [33] et dans le lait maternel [26, 29].

Comme les stations d'épuration des eaux usées ne sont pas en mesure d'éliminer complètement les PPCPs, une introduction continue et quotidienne dans les différents cours d'eau contamine inévitablement les eaux de surface et celles souterraines, mais aussi les sédiments. Ces substances ont également le pouvoir d'engendrer le même type d'exposition et d'effets néfastes sur les humains et les organismes aquatiques que les polluants persistants [34]. En effet, la population humaine demeure susceptible vis-à-vis ces substances qui finissent tôt ou tard par réintégrer la chaîne alimentaire via des organismes aquatiques contaminés ou simplement par l'eau potable [35]. Toujours en ce qui a trait au devenir des PPCPs dans l'environnement, il ne va pas sans dire que l'épandage d'engrais chimique et de pesticides sur les terres agricoles a aussi un impact non négligeable sur la faune et la flore aquatique suivant des épisodes de pluie.

1.2.1 Bioaccumulation chez les organismes aquatiques

Avant de se bioaccumuler, une substance doit d'abord être absorbée par un organisme. La majorité des PPCPs sont des molécules non polaires et liposolubles, ce qui les rend aptes à traverser les membranes biologiques par diffusion simple [20] et de se retrouver dans la circulation sanguine. Une fois la circulation sanguine atteinte, le toxique se distribue par un processus dynamique vers les différents organes et tissus cibles de

l'organisme. La distribution d'une substance dans les organes ou les tissus est influencée par les propriétés physico-chimiques de cette dernière. Un paramètre couramment utilisé en chimie environnementale pour désigner l'affinité d'une substance pour une phase hydrophobe est le coefficient de partition octanol-eau ($\log K_{ow}$). Une substance dite non polaire et lipophile possédant une valeur de coefficient octanol-eau élevée ($\log K_{ow} > 3$) a tendance à s'accumuler davantage dans les tissus adipeux et organes d'organismes vivants [36]. À l'inverse, une substance polaire hydrosoluble avec un $\log K_{ow}$ inférieur à 3 éprouve plus de difficulté à traverser les membranes cellulaires demeurant ainsi majoritairement dans le sang. Le volume de distribution apparent (V_D) est un des termes de pharmacocinétique fréquemment utilisés en toxicologie qui permet de déterminer si une substance se distribue de manière importante dans les tissus ou les organes ou si elle est plus portée à demeurer dans la circulation sanguine. L'équation suivante permet de calculer le V_D [37] :

$$V_D = \frac{\text{Dose}_{IV}(t)}{C_0}$$

où V_D = volume de distribution apparent (L/kg); $\text{Dose}_{IV}(t)$ = quantité d'une substance injectée de manière intraveineuse dans le corps temps t après l'exposition (mg/kg); C_0 = concentration initiale détectée dans le plasma (mg/L/kg).

Selon Nichols *et al.* (2009) [37], une substance qui possède un V_D équivalent entre 70 % à 90 % du volume d'eau total du corps peut se distribuer dans les tissus et les organes. La bioaccumulation chez un organisme vivant se produit lorsque la concentration de substances présentes à l'intérieur d'un organisme est supérieure à celle retrouvée dans le milieu environnant [38, 39]. Ce phénomène dépend également de l'affinité chimique des substances pour l'eau ou pour les lipides constituant les tissus ainsi que l'affinité pour les protéines du sang [37]. Étant majoritairement non polaires et liposolubles, certains PPCPs ont le pouvoir de s'accumuler dans les tissus

d'organismes aquatiques avec le temps et causer des effets toxiques suite à une exposition chronique [3, 40-42]. L'accumulation des PPCPs peut également se produire avec un phénomène biologique appelé biomagnification. Ce processus signifie que les substances accumulées dans un organisme se transfèrent via la chaîne trophique suivant l'ingestion de cet organisme contaminé par une autre espèce [35, 38].

Il n'y a pas que les PPCPs à proprement dits qui sont susceptibles de se bioaccumuler dans les organismes aquatiques. Une fois qu'ils sont distribués dans l'organisme, les substances subissent des biotransformations de phases I et II généralement par le foie à l'aide d'enzymes spécifiques. Les biotransformations de phase I impliquent des réactions chimiques telles que l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse et sont majoritairement réalisées par des cytochromes P450 et des monooxygénases [43]. Quant à elles, les biotransformations de phase II correspondent à des réactions chimiques incluant des groupements fonctionnels (p. ex. une glutathion) et sont facilitées par des enzymes de transfert (p. ex. une glutathion transférase) [43]. De ces biotransformations, il en résulte la création de nouveaux composés souvent davantage hydrosolubles que la molécule initiale favorisant ainsi leur élimination par les voies naturelles telles que les fèces et l'urine. Ces nouveaux composés, appelés métabolites, peuvent parfois être biologiquement plus actifs que la molécule mère et ils peuvent également s'accumuler dans les tissus en causant eux aussi des effets toxiques [18, 20]. Par exemple, une substance comme la caféine qui est considérée comme assez inoffensive à l'origine se biotransforme suite à son absorption en plusieurs métabolites plus toxiques qui, eux, peuvent causer des dommages oxydatifs dans les tissus de certains organismes aquatiques [16].

1.2.2 Écotoxicité dans les milieux aquatiques

Malgré le manque d'informations sur le risque réel des PPCPs, la communauté scientifique arrive tout de même à un commun accord; ces contaminants émergents

méritent une attention particulière due à leurs possibles effets toxiques dans les milieux aquatiques [44, 45].

A priori, il faut comprendre que les PPCPs sont conçus et utilisés pour répondre à des besoins humains particuliers. La plupart des PPCPs sont des substances biologiquement actives développées pour interagir avec des récepteurs spécifiques dans le corps humain afin de procurer un effet thérapeutique. Lorsque les PPCPs sont intégrés dans l'environnement, ces substances « bio-récalcitrantes » interagissent avec des organismes vivants non ciblés et bouleversent les écosystèmes [46]. Dans les prochains paragraphes sont présentés des exemples concrets permettant de mieux comprendre l'écotoxicité des PPCPs dans l'environnement aquatique.

Rapporté dans la littérature, l'anti-inflammatoire diclofénac est maintenant détecté dans les matrices aquatiques. Ce dernier a tendance à se bioaccumuler dans les poissons [47, 48] et les invertébrés [49], et à produire des effets nocifs sur des organismes aquatiques non ciblés [46]. Par exemple, la bioaccumulation du diclofénac se produit plus de 2700 fois dans le foie des truites arc-en-ciel. Il cause des effets toxiques tels que des altérations histopathologiques dans les reins et les branchies [50]. Chez les algues, certains de ses métabolites peuvent causer une toxicité encore plus importante rendant ce composé davantage préoccupant [46, 51].

Le gemfibrozil, un médicament de la classe des fibrates, se bioaccumule quant à lui dans le sang chez la carpe dans une proportion de 400 fois les concentrations retrouvées dans l'environnement, il réduit également le niveau de testostérone de 50 % menaçant ainsi la reproduction et les futures générations [19].

La fluoxétine quant à elle est reconnue comme antidépresseur de la génération des inhibiteurs de recapture de la sérotonine chez l'humain, a le pouvoir de réduire le nombre d'œufs produits et l'expression de l'aromatase, un complexe enzymatique

microsomial chez les poissons-zèbres [19]. Corcoran *et al.* (2010) [20] ont eux aussi mis en lumière l'écotoxicité de cet antidépresseur en exposant des bars rayés (*Morone saxatilis*) à des concentrations variant entre 23.2-100.9 µg/L pendant six jours. Ils ont dès lors observé une diminution dans leur habilité à capturer des proies telles que la tête de boule *Pimephales promelas* [20]. Également, l'exposition de ces têtes-de-boule à la fluoxétine a provoqué une diminution dans leur alimentation [20]. Une autre étude avance que les concentrations de fluoxétine détectées dans les effluents d'eaux usées causent des anomalies dans le développement des médakas (*Oryzias latipes*), une autre espèce de poisson [20, 52]. Parmi les alcaloïdes, la morphine qui est couramment utilisée comme analgésique peut entraîner une diminution de la phagocytose chez la moule d'eau douce du Saint-Laurent (*Elliptio complanata*) [53].

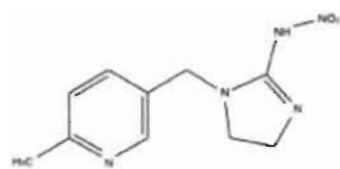
Parmi les autres effets observés chez les organismes aquatiques, mentionnons les travaux de Aravindakshan *et al.* [54] qui ont démontré que la présence d'oestrogènes dans le fleuve Saint-Laurent a des impacts sur le système reproducteur des mâles de Queue à tache noire (*Notropis hudsonius*). Berryman [13] et Blaise *et al.* [55] ont aussi prouvé que des poissons et des moules d'eau douce se féminisaient en présence de ces substances. Une autre étude menée au Canada a également démontré que des moules bleues ayant été exposées à des effluents d'eaux usées avaient subi une toxicité sur leur système immunitaire et sur leur résistance aux maladies [19]. À d'autres niveaux, certains PPCPs peuvent mener à la résistance aux antibiotiques. Il a été montré que c'était le cas chez certains microorganismes comme le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) lorsqu'ils étaient exposés à ce genre de substances [7, 56]. Le danger avec cette résistance aux antibiotiques provient du fait que ces pathogènes considérés inoffensifs initialement (ex. bactéries, protozoaires ou algues toxiques) deviennent dorénavant résistants aux traitements d'antibiotiques. De ce fait, la susceptibilité aux maladies autant chez les organismes aquatiques que chez les êtres humains s'accroît et des infections mineures peuvent devenir incurables avec

le temps [20, 57]. Finalement, les perturbateurs endocriens dont le rôle est d'altérer les fonctions du système endocrinien en imitant et/ou en posant des actions antagonistes sur des hormones endogènes, posent également des problèmes dans l'environnement aquatique. Ainsi, toute action exercée par ces substances sur le système endocrinien peut avoir des effets désastreux sur les organismes, leur progéniture ou des sous-populations entières comme par exemple affecter leur santé, influencer le taux de reproduction et même la survie de populations entières [57].

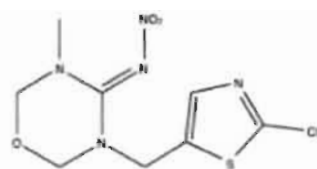
Selon plusieurs études dans la littérature, il semblerait que les concentrations auxquelles on retrouve la majorité des PPCPs ne soient pas assez élevées pour provoquer, de manière individuelle, une toxicité aiguë chez les organismes aquatiques [13, 16, 35, 46]. Pour que ce soit le cas, il faudrait que les concentrations environnementales décelées soient 100 à 1000 fois plus élevées [35]. Toutefois, ces composés sont retrouvés dans des matrices environnementales complexes où un cocktail de xénobiotiques génère au même moment des effets additifs, synergiques ou antagonistes dans ces milieux [4, 20, 35, 40, 57]. À titre d'exemple, il a été montré que le diclofénac et l'ibuprofène, qui sont deux substances anti-inflammatoires, ont des effets toxiques additifs chez les daphnies lorsqu'elles sont absorbées ensemble [58]. Ce sont ces types de mélanges qui peuvent causer une importante toxicité dans l'environnement aquatique et c'est de ces derniers que s'inquiètent la plupart des chercheurs en écotoxicologie [13]. Il faut également ajouter le caractère chronique, c'est-à-dire une exposition continuelle des organismes aquatiques aux PPCPs sur une longue période de temps. Ce facteur ne simplifie pas l'évaluation de la toxicité et augmente considérablement le risque d'effets toxiques pouvant se manifester [16, 35, 46]. Toutefois, rappelons que le risque latent n'est pas seulement présent pour l'écosystème aquatique, mais également pour les humains qui sont inévitablement surexposés à ces contaminants d'une manière ou d'une autre.

1.3 Sélection des contaminants émergents et des produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPCPs)

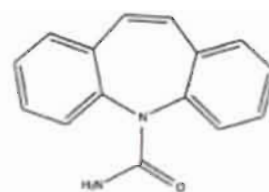
Dans le cadre de ce projet de maîtrise, plusieurs PPCPs ont été sélectionnés pour le développement des nouvelles méthodes analytiques par HPLC-MS/MS. Différents critères ont été appliqués afin de restreindre notre sélection de molécules à l'étude. En plus de produire de possibles effets toxiques sur la faune aquatique, les différentes substances ont été choisies à cause de leur abondance et leur persistance dans l'environnement. Une attention particulière a également été accordée à la variété des propriétés physico-chimiques des composés de façon à vérifier l'efficacité des procédés étudiés. Nous avons également le souci d'intégrer des substances provenant de diverses classes thérapeutiques dans le but de représenter le plus fidèlement possible la multitude de PPCPs consommé par la population et retrouvé dans les eaux usées. Finalement, quelques métabolites ont été ajoutés à la liste de contaminants émergents choisis pour tenter de comprendre le processus de dégradation de certains bioprocédés envers des molécules mères sélectionnées. La figure 1.3 présente les PPCPs étudiés dans le cadre de ce projet de maîtrise. Sont résumées dans le tableau 1.1 les classes thérapeutiques des PPCPs sélectionnés, ainsi que certaines de leurs propriétés physico-chimiques.



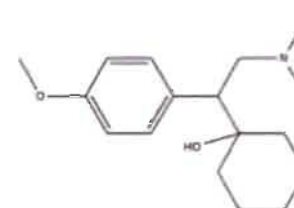
Imidaclopride



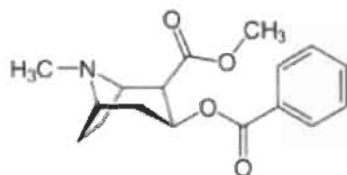
Thiaméthoxame



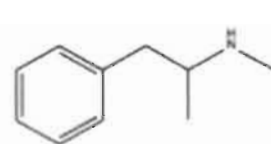
Carbamazépine



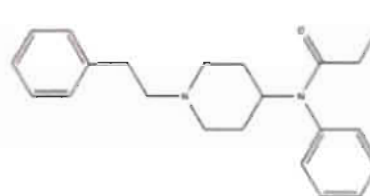
Venlafaxine



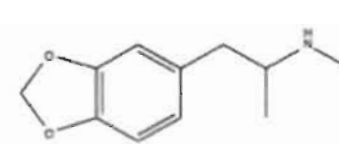
Cocaïne



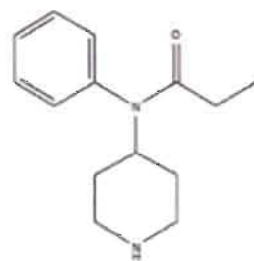
Méthamphétamine



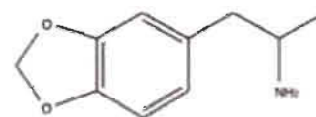
Fentanyl



**Ecstasy
(MDMA)**



Norfentanyl



**3,4-méthylènedioxyamphétamine
(MDA)**

Figure 1.3 Structure chimique des produits pharmaceutiques et de soins personnels sélectionnés.

Tableau 1.1

Données chimiques des contaminants émergents sélectionnés
dans le cadre du projet de maîtrise

Nom du PPCP	Classification	Propriété acido-basique		pKa / logK _{ow}
		Neutre	Basique	
IMI	Pesticide			11,12 ^a / 0,57 à 20°C ^b
TMX	Pesticide			n.d / -0,13 ^c
CAR	Antiépileptique			13,90 ^d / 2,45 ^d
COC	Drogue illicite (analgésique local)			8,61 à 15°C ^e / 2.30 ^e
FEN	Drogue illicite (analgésique opioïde)			8,40 ^e / 2,93 ^e
MET	Drogue illicite (stimulant du SNC)			9,87 à 25°C ^e / 2,07 ^e
MDMA	Drogue illicite (stimulant du SNC)			9,90 ^{d,f} / 1,68 ^g
NOR	Drogue illicite (métabolite)			10,10 ^h / 2,01 ^h
MDA	Drogue illicite (métabolite)			9,67 ^g / 1,38 ^g
VEN	Antidépresseur			9,40 ⁱ / 2,69-2,80 ^{j,k}

^a Mandal *et al.* (2017)^b Hayasaka *et al.* (2012)^c Santé Canada (2016)^d PubChem ([<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>])^e The Merck Index (2006)^f Navarro *et al.* (2001)^g Desrosiers *et al.* (2013)^h Woldegiorgis *et al.* (2006)ⁱ Bévalot *et al.* (2014)^j DrugBank (2019)^k Minguez *et al.* (2014)

1.4 Types de traitements des eaux usées

Quatre grandes classes de procédés englobent le traitement des eaux usées : soit les prétraitements, les procédés primaires physico-chimiques, les secondaires biologiques et les tertiaires avancés [59]. Ces nombreuses méthodes de désinfection visent à éliminer le plus efficacement les macropolluants et les micropolluants présents dans les eaux usées lors de leur arrivée dans les stations d'épuration. Les traitements de l'eau potable, quant à eux, sont de type avancé. Ils sont plus agressifs avec l'utilisation de noir de charbon, d'ultraviolets et l'ozonolyse dans le but d'obtenir une eau potable rencontrant des critères sévères. La principale difficulté rencontrée dans les stations d'épuration avec les PPCPs considérés comme micropolluants réside dans le fait qu'ils sont présents en très faibles concentrations dans les eaux usées ($\mu\text{g/L}$ et/ou ng/L) et qu'ils sont relativement polaires. Contrairement à l'azote ou les composés phosphorés qui sont reconnus comme macropolluants classiques, les PPCPs ne réagissent pas tous de la même façon lors des traitements en raison de leurs propriétés physicochimiques différentes. De ce fait, aucun traitement spécifique n'est présentement conçu pour retirer entièrement tous ces contaminants émergents dans les eaux usées.

1.4.1 Prétraitements

Les prétraitements ont pour but de retirer les débris pouvant nuire aux traitements ultérieurs. Ils consistent entre autres à éliminer les objets grossiers encombrants par dégrillage, les graisses et/ou les huiles par l'usage d'un dégraisseur, ainsi que les sables et les matières pouvant être décantées par dessablage [59]. Une fois ces prétraitements effectués, les eaux usées peuvent ensuite être envoyées vers un traitement primaire physico-chimique ou directement vers un traitement secondaire.

1.4.2 Traitements primaires

Les procédés primaires physico-chimiques interviennent à la deuxième étape du traitement des eaux usées. Ils impliquent l'enlèvement d'une fraction des polluants solides en suspension par sédimentation et la réduction de la demande biochimique en oxygène (DBO) [60]. Parmi ces traitements physico-chimiques figure la méthode de coagulation-floculation où un agent coagulant est ajouté à l'eau usée pour amorcer la formation de floccs par précipitation. Cette dernière permet le regroupement des particules et des colloïdes en floculation rendant ainsi possible leur décantation [59]. Au terme de ces traitements primaires, il y a la formation de boues primaires organiques acheminées vers un traitement menant à l'étape de la filière secondaire.

Les traitements primaires peuvent diminuer la demande biochimique en oxygène jusqu'à 30 % et les matières en suspension jusqu'à 60 % [59, 60]. Cependant, il a été démontré que la filière primaire n'est pas adaptée pour éliminer les PPCPs. Une faible élimination, soit des rendements inférieurs à 30 % pour les substances pharmaceutiques, a été observée suite aux procédés primaires [61].

1.4.3 Traitements secondaires

Le principal objectif des traitements secondaires est de diminuer significativement la teneur en matières organiques (carbone, azote et phosphore) des eaux usées. Pour ce faire, les municipalités ont recours à des procédés biologiques par biomasse en suspension (boues activées) ou biomasse fixée (biofiltration, lit bactérien) qui reposent essentiellement sur la capacité auto-épuratrice de microorganismes [59].

Quelle que soit la technologie utilisée pour l'épuration par biomasse, le principe reste le même. Une biomasse principalement hétérotrophe et pour la plupart du temps aérobie se charge d'éliminer la matière organique dissoute dans les eaux usées en la

consommant ou en la piégeant dans le biofilm [59]. Il y a ensuite la formation de floccs en suspension dans l'eau dans le cas de la technique des boues activées. En ce qui a trait au processus par biofiltration ou lit bactérien, il se produit alors une dégradation des contaminants organiques par la biomasse fixée.

Le principe sur lequel repose l'élimination des contaminants organiques dans la filière secondaire ne s'applique pas à tous les PPCPs. Pour être éliminé par ces procédés, il faut que les PPCPs adhèrent à la biomasse, ce qui n'est pas toujours le cas en raison de la physicochimie de chaque substance. Un paramètre peut renseigner quant à la sorption qu'auront les substances avec la biomasse lors des processus du traitement des eaux usées. Ce paramètre se nomme le coefficient de distribution solide-eau K_d (L/kg) [62, 63]. Le rapport décrivant le K_d est défini comme étant le ratio entre la concentration X du PPCPs dans la boue activée (g/kg) et la concentration S de ce même contaminant dans la phase aqueuse à l'équilibre (g/L) [64].

$$K_d = \frac{X}{S}$$

À titre d'exemple, une substance non ionique (pH neutre) comme la carbamazépine qui possède un K_d relativement faible a tendance à ne pas être (ou très peu) adsorbée ou absorbée sur la biomasse à des valeurs de pH neutres [63]. Une adsorption électrostatique est possible lorsqu'il y a interaction entre des groupes fonctionnels positifs portés par une substance et les charges négatives à la surface des microorganismes [63]. Un phénomène d'absorption hydrophobique peut aussi se produire lorsque les groupements aliphatiques et/ou aromatiques d'une substance créent des interactions van der Waals et π - π avec la partie lipophile de la membrane des cellules des microorganismes et/ou avec la fraction lipidique de la boue activée [63]. Comme la carbamazépine est un composé neutre qui ne porte aucun groupement fonctionnel positif et qui est peu lipophile, celle-ci a tendance à ne pas se lier sur la boue activée (ou très peu) et à demeurer dans l'eau lors des traitements, c'est pourquoi

elle possède un faible K_d [10, 65-68]. Aussi, la faible valeur de K_d de la carbamazépine et son aromaticité reflète bien avec sa stabilité et sa présence dans l'environnement, comme rapporté maintes et maintes fois dans la littérature. Selon une étude menée par Ternes (1998), le taux d'élimination de la carbamazépine dans les stations d'épuration s'élève à seulement 7 %, ceci démontrant le caractère extrêmement persistant et le potentiel toxique de cette substance dans l'environnement [69]. Même s'ils détiennent un meilleur rendement que les traitements primaires, il a été mis en évidence que les traitements biologiques permettent une élimination limitée pour certaines substances pharmaceutiques [61].

1.4.4 Traitements tertiaires (avancés)

Les procédés tertiaires ou avancés font appel à des technologies sophistiquées qui permettent de compléter les traitements rapportés dans les sous-sections précédentes. Ils ont comme objectif d'éliminer les contaminants ou les polluants spécifiques, voire récalcitrants, afin d'obtenir une eau présentant une qualité supérieure avant son rejet dans l'effluent. Ce genre de traitement est utilisé majoritairement pour la production d'eau potable.

Les traitements tertiaires avancés sont principalement des procédés qui désinfectent les eaux usées. Il n'est pas rare que les traitements tertiaires soient utilisés pour retirer le phosphore ou l'azote dans l'eau, puisque ces deux composés causent l'eutrophisation dans l'environnement aquatique [60]. Les germes pathogènes peuvent également être éliminés par des techniques classiques comme la chloration, l'ozonation ou l'irradiation par rayonnement ultraviolet (UV) [59]. Ces procédés ne sont toutefois pas sans danger. Malgré le manque de connaissances sur les risques réels encourus avec ce type de traitements, la communauté scientifique met de l'avant le fait que des procédés comme l'oxydation au chlore ou l'ozonation génèrent des sous-produits de dégradation qui peuvent être extrêmement toxiques pour la santé humaine et les écosystèmes

aquatiques [59, 70, 71]. La chloration et l'ozonation sont des techniques coûteuses, puisque la première impose des étapes de traitements supplémentaires pour éliminer l'odeur et le goût du chlore dans l'eau et la deuxième nécessite une quantité importante d'ozone vu sa durée de vie limitée [59]. L'irradiation par UV semble être la méthode la plus favorisée et surtout la moins onéreuse des trois. Il a été montré qu'elle permet d'éliminer entre 50 % et 80 % des contaminants ciblés [72]. Par contre, l'un de ses inconvénients est que la quantité d'UV nécessaire pour atteindre ce rendement est cent fois plus élevée que dans une méthode de désinfection habituelle [71].

Un autre procédé tertiaire est celui qui utilise le charbon activé. Il permet l'élimination d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et de molécules organiques résistantes à la filière secondaire comme les pesticides ou les métaux lourds [59, 73]. Contrairement à la chloration ou l'ozonation, cette technique possède l'avantage de ne pas requérir d'agents chimiques. Le charbon actif en poudre ou en grains permet aux molécules organiques de pénétrer à l'intérieur des pores et de s'y fixer [74]. Le charbon activé biologique peut aussi être utilisé. La majeure différence avec les deux autres formes mentionnées est qu'au niveau des parois du charbon actif se trouvent des microorganismes qui consomment les matières organiques biodégradables s'y étant accumulées. Malgré qu'il puisse être prometteur, ce procédé est coûteux puisque les filtres à charbon actif doivent être remplacés périodiquement. En effet, même si ces filtres peuvent être régénérés par diverses méthodes, il reste que le charbon actif perd de 5 à 10 % d'efficacité lorsque cette technique est utilisée [73].

À ce jour, les procédés membranaires tels que l'osmose inverse (OI), la microfiltration (MF), la nanofiltration (NF) et l'ultrafiltration (UF) figurent parmi les techniques d'assainissement des eaux usées les plus efficaces. Dans le tableau 1.2 sont rapportées les différentes tailles de membrane selon le type de filtration utilisée.

Tableau 1.2
Taille des pores dans les procédés d'épuration membranaires

Propriété des membranes	OI	MF	NF	UF
Taille des pores	n.d	0.1 à 10 μm	1 nm	1 à 100 nm

Adapté de Djouber [75].

Pour l'OI, une membrane asymétrique est installée et employée pour filtrer l'eau de manière à capter la majorité des sels présents dans cette dernière [76]. En ce qui a trait à la MF, les membranes laissent passer la majorité des espèces dissoutes, mais arrêtent les particules solides grâce aux pores de petite taille (entre 0,1 et 10 microns) [76]. Les membranes de NF, quant à elles, permettent l'élimination d'ions multivalents et de solutés organiques de dimensions supérieures à celle du nanomètre (environ 300 g/mole) [76]. Les membranes d'UF comportent des pores plus grands, ce qui fait qu'elles retiennent seulement les macromolécules et quelques virus [76]. Plusieurs mécanismes peuvent entrer en jeu lorsqu'il est question de filtration membranaire. Par exemple, il peut s'agir de perméation comme dans le cas d'OI ou l'exclusion de taille dans la NF et l'UF [75, 77].

1.5 Traitement par bioremédiation

La bioremédiation consiste à dégrader les contaminants organiques environnementaux présents dans les eaux usées, les eaux souterraines, l'air et les sols en des formes moins toxiques en utilisant des organismes vivants tels que des plantes (phytoremédiation), des algues (phycoremédiation) ou des champignons (mycoremédiation) [78]. Il s'agit d'une technologie émergente qui propose une alternative intéressante aux méthodes de désinfection traditionnelles actuellement utilisées pour les eaux usées, les eaux

souterraines, les sédiments et les boues contaminées. La bioremédiation possède plusieurs avantages dont le fait d'être moins onéreuse à opérer que les techniques habituelles et plus écologique due à une utilisation d'activité biologique naturelle. Bien que les procédés de remédiation semblent être prometteurs pour la désinfection des eaux usées, il existe encore très peu d'informations dans la littérature impliquant les procédés avec le sol et les microalgues. Dans le présent projet, nous avons décidé d'opter pour une approche de valorisation de la biomasse afin d'apporter de nouvelles connaissances sur le sujet.

1.5.1 Modes d'épuration des algues et organismes aquatiques

Selon le mode d'épuration employé par les organismes aquatiques, ceux-ci peuvent adsorber les polluants à la surface et/ou les transformer suivant une absorption en des molécules moins actives au moyen de réactions métaboliques qui nécessitent plusieurs enzymes. Les processus de bioremédiation demandent une croissance et une activité microbienne pour parvenir à la dégradation des polluants. De ce fait, il est important de considérer plusieurs paramètres environnementaux pour parvenir à une bioremédiation optimale par exemple la disponibilité des contaminants, le type de sol ou d'environnement, le pH du milieu et la présence d'oxygène et de nutriments [79].

Bien que ces facteurs doivent être pris en compte, les microorganismes possèdent une grande capacité d'adaptation en ce qui a trait aux conditions environnementales extrêmes. Les principaux paramètres affectant la bioremédiation sont la présence d'une source d'énergie et d'une source de carbone. Les microorganismes qui participent à la bioremédiation sont subdivisés en quatre groupes distincts : aérobiques (c.-à-d. ceux qui nécessitent la présence d'oxygène), anaérobiques (c.-à-d. ceux qui ne nécessitent pas la présence d'oxygène), les champignons ligninolytiques (c.-à-d. ceux qui ont la capacité de dégrader des polluants très persistants) et les méthylotrophes (c.-à-d. ceux qui utilisent le méthane comme sources d'énergie et de carbone) [79].

Ces différents microorganismes parviennent à leur manière à rendre inoffensifs les polluants présents dans les sols. Toutefois, pour que leur croissance et leur activité de bioremédiation soient optimales, il faut les stimuler en les mettant en présence de nutriments et d'oxygène. Ces nutriments servent notamment à la création d'enzymes nécessaires par les microbes pour dégrader les contaminants [79]. Les microorganismes doivent donc être alimentés majoritairement en carbone et en proportion décroissante en oxygène (pour certains), en azote, en hydrogène et en phosphore. En plus faibles quantités, il y a également le soufre, le potassium, le sodium, le calcium, le magnésium, le chlorure et le fer qui doivent être ajoutés au milieu pour obtenir une bioremédiation efficace [79].

1.5.2 Valorisation de la biomasse

La biomasse est définie comme l'ensemble de la matière d'origine vivante. Cette dernière peut provenir de plusieurs sources : l'agriculture, la forêt, les milieux marins et aquatiques, les « déchets verts » (c.-à-d. haies, parcs et jardins), les industries et activités humaines ayant traité de la matière d'origine vivante (y compris le bois) et générant des co-produits, des déchets organiques (c.-à-d. boues des stations d'épuration) ou des effluents d'élevage [80].

La biomasse est utilisée depuis toujours comme combustible et comme matériau. Ce n'est que depuis le 20^e siècle qu'un besoin grandissant de développement d'applications de la biomasse comme matière première de la chimie et comme carburant s'est fait sentir. Ce nouvel engouement est attribuable à un désir de vouloir pallier à la hausse du prix de l'essence et aux réserves fossiles pétrolières et gazières qui s'épuisent tranquillement [80]. La valorisation de la biomasse fait référence à l'utilisation de divers procédés pour transformer la biomasse en une nouvelle source d'énergie renouvelable. Par exemple, la biomasse de bois peut être recyclée en biomatériaux. Aussi, différentes huiles (c.-à-d. tournesol, soja, palme) peuvent servir à

la fabrication de biocarburants comme le biodiesel. L'utilisation de la biomasse dans l'industrie chimique est également possible pour produire plusieurs produits tels que des solvants, des liants et des résines. De la chaleur et de l'électricité peuvent être obtenues suite à la transformation de la biomasse. Les possibilités de valorisation de la biomasse sont pratiquement infinies et c'est une des raisons pourquoi elle est considérée autant prometteuse par la communauté scientifique.

Dans ce projet, deux volets de biomasse sont abordés : un premier associé à des échantillons de terreaux avec herbacées exposés à un effluent synthétique de PPCPs afin de tester sa capacité de rétention, puis un second où des microalgues *Chlorella sp.* sont utilisés pour évaluer leur pouvoir d'épuration envers des substances émergentes. Les petits crustacés *Daphnia magna*, quant à eux, sont utilisés pour vérifier la possible écotoxicité des PPCPs sur ces organismes aquatiques suivant des expositions contrôlées en laboratoire. Dans ce dernier cas, cela permet à la fois de vérifier le potentiel de captation de substances par ces organismes aquatiques et également la mise en œuvre d'une nouvelle stratégie permettant l'utilisation de cet organisme aquatique comme « témoins silencieux » dans un contexte de chimie environnementale forensique lors d'investigations sur le terrain pour la capture de polluants réglementés ou des substances illicites en situation de profilage.

1.6 Stratégies analytiques pour le suivi et dosage des PPCPs

Afin de tenter de répondre aux questions environnementales soulevées par ce projet, il s'avère impératif de développer des protocoles analytiques fiables permettant dans un premier temps l'isolement et la purification des PPCPs contenues dans les matrices environnementales complexes analysées. En effet, les instruments de haute technologie requièrent une purification avancée des échantillons à analyser pour assurer d'une part l'obtention de signaux optimaux, mais aussi pour éviter la contamination prématurée

des composantes de ces types de système. Dans ce projet de maîtrise, l'extraction sélective des PPCPs a été rendue possible par l'utilisation d'une technologie avancée de chromatographie communément appelée extraction sur phase solide (SPE).

Une fois les extractions complétées, l'analyse des PPCPs fut assurée grâce à des méthodes analytiques instrumentales sensible et spécifique développées sur un appareil chromatographe liquide (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Ces méthodes ont été développées dans le but de faire le suivi et le dosage des PPCPs présents dans les échantillons de lixiviat, de microalgues *Chlorella sp.* ou de petits crustacés *Daphnia magna* exposés à des effluents synthétiques.

Lors du développement analytique, il a fallu prendre en compte les propriétés physicochimiques des PPCPs pour mieux comprendre et prévoir leur comportement dans les matrices analysées. Cette section aborde donc les différentes stratégies analytiques employées dans le cadre de ces travaux et qui sont aussi directement liées aux propriétés physicochimiques des substances.

1.6.1 Extraction sur phase solide (SPE)

L'extraction sur phase solide est une technique de choix dans le domaine de la chimie analytique en ce qui a trait à la préparation d'échantillons [81]. Elle permet à la fois d'extraire sélectivement un ou plusieurs composés d'intérêt, de purifier l'échantillon en éliminant les substances non désirées et de concentrer les xénobiotiques cibles pour de futures analyses ou dosages. Outre ces avantages mentionnés, la SPE donne également la possibilité de modifier la matrice dans laquelle se trouve l'échantillon afin d'avoir une forme compatible avec les analyses chromatographiques subséquentes.

Avant de se lancer dans la préparation d'échantillons par SPE, il est nécessaire de prendre en compte plusieurs facteurs tels que les propriétés physicochimiques des molécules à extraire et les mécanismes de rétention qui entrent en jeu. Le principe de la SPE repose sur l'équilibre des composés entre une phase liquide, l'échantillon, et une phase stationnaire, l'adsorbant [82]. Il existe une grande variété d'adsorbants commerciaux disponibles qui permettent l'extraction d'une vaste gamme de substances. Dans le cadre du projet, des cartouches de résines échangeuses fortes de cations « Strong cation exchange » (Strata®-XC, Phenomenex, Californie, États-Unis) ont été employées. La figure 1.4 illustre la structure chimique de la résine polymérique présente à l'intérieur des cartouches Strata®-XC [83].

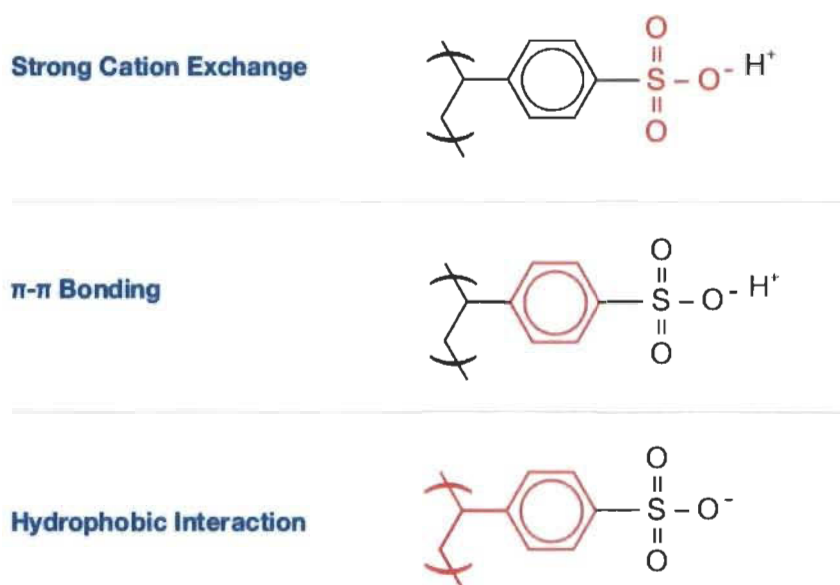


Figure 1.4 Structure chimique de l'adsorbant – Cartouches échangeuses fortes de cations « Strong cation exchange » [84].

Ces cartouches ont été choisies puisqu'elles permettent l'extraction d'un grand nombre de composés aux propriétés variées. Comme le montre la figure 1.4, la résine polymérique comporte une partie hydrophobe et une tête hydrophile polaire échangeuse d'ions. Grâce à ces composantes et à l'ajustement du pH de la matrice

aqueuse, il est possible de retenir et d'extraire les analytes ionisés ou neutres par des liens électrostatiques (forces ioniques) et des liens hydrophobes (interactions π - π et forces de van der Waals).

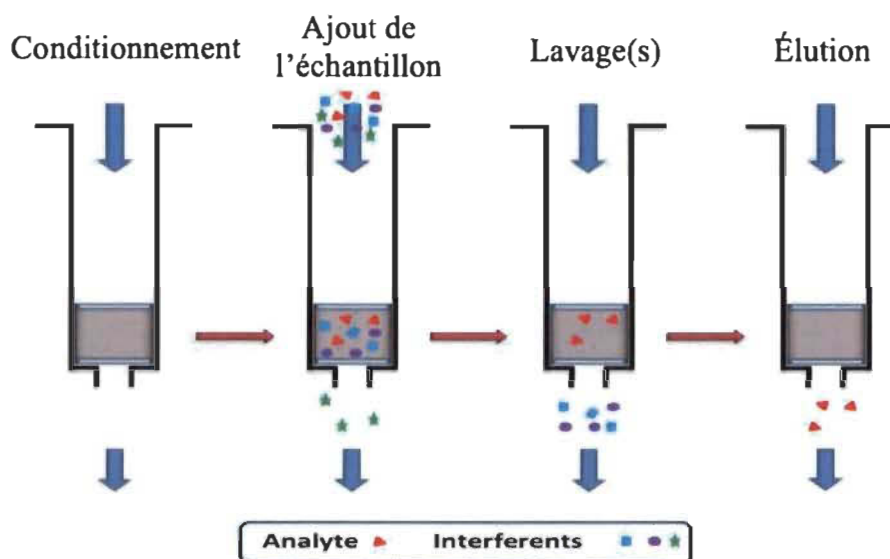


Figure 1.5 Processus de l'extraction sur phase solide [85].

La figure 1.5 représente les quatre étapes du processus d'extraction sur phase solide. La première étape correspond au conditionnement de la cartouche. Il s'agit de remplir cette dernière d'un solvant organique afin de nettoyer la résine de résidus issus de sa fabrication. Un solvant ayant des caractéristiques ioniques et de pH semblables à celles de l'échantillon à extraire est ensuite ajouté sur la cartouche pour conditionner la résine en activant les sites de rétention. Suivant cette première étape de conditionnement, l'échantillon est ajouté sur la cartouche avec un débit modéré (~ 1 -2 goutte(s) / sec) pour permettre une rétention optimale des composés sur la phase stationnaire. La prochaine étape consiste à procéder à un ou plusieurs lavages dans le but de purifier l'échantillon en éliminant le plus d'interférents possibles, mais surtout de réduire de façon considérable les possibles effets de matrice souvent rencontrés lors de l'analyse instrumentale subséquente. À cette étape, il est impératif d'utiliser des solvants de

lavage de faibles forces éluantes pour éviter de provoquer l'élution hâtive des analytes d'intérêt. Finalement, l'élution est la dernière étape de l'extraction sur phase solide. La résorption des composés est complétée par modification de pH et/ou par l'utilisation d'un solvant ayant une force éluante assez élevée qui brise l'équilibre de rétention des analytes avec la résine polymérique. Le choix du solvant d'élution doit être fait judicieusement pour plusieurs raisons. Il est important que seulement les substances d'intérêt aient une forte affinité avec le solvant d'élution de manière à ne pas éluer les composés interférents. Par ailleurs, la facilité d'évaporation du solvant et sa compatibilité avec la technique analytique subséquente doivent aussi être prises en compte. Il est important de garder en tête que le volume de solvant d'élution utilisé va déterminer le facteur de concentration de l'extrait final. Comme les PPCPs sont présents en trace dans l'environnement, utiliser un faible volume pour la désorption des espèces cibles devient avantageux. Ce volume réduit permet l'obtention d'un facteur de concentration plus élevé suivant une SPE. Par conséquent, cela favorise une détection et une analyse ultérieure des analytes à des concentrations beaucoup plus basses. Suivant l'étape d'élution, le tube contenant la solution extraite est souvent placé sur un bloc chauffant sous un faible jet d'azote jusqu'à évaporation complète du solvant. Une reconstitution de l'extrait est ensuite réalisée par l'ajout d'un solvant possédant des caractéristiques physico-chimiques semblables aux phases mobiles utilisées lors de l'analyse instrumentale.

1.6.2 Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide figure parmi les procédés les plus utilisés en chimie analytique pour séparer un ou plusieurs constituants d'un mélange liquide. Comme la SPE, cette technique permet de purifier et concentrer les échantillons avant l'utilisation de méthodes chromatographiques [86].

Plusieurs paramètres entrent en jeu lorsqu'une ELL est réalisée. Le solvant organique utilisé doit être choisi judicieusement en tenant compte de sa solubilité limitée avec la phase aqueuse, sa densité, sa volatilité et sa solubilité avec les solutés à extraire. Les propriétés physico-chimiques des substances à extraire doivent également être connues. Ainsi, on tient compte de la structure chimique de l'analyte, de sa constante d'acidité ou de basicité, ainsi que leur nature et la complexité de la matrice dans laquelle il se trouve.

Le principe de l'ELL est fondé sur la distribution inégale d'un soluté entre deux solvants en fonction de sa solubilité dans chacun d'entre eux [86]. En d'autres mots, une substance à extraire est d'abord dissoute dans un solvant aqueux. Nous ajoutons ensuite une quantité de solvant organique immiscible avec le solvant aqueux, mais dans lequel la substance est très soluble. Il en résulte que la substance se répartit dans les deux phases (organique – aqueuse) dans des proportions définies selon son degré de solubilité avec l'une ou l'autre des phases [86]. Le paramètre fréquemment employé en chimie pour évaluer cette solubilité se nomme le coefficient de partage Octanol / Eau noté P et exprimé sous la forme $\log P$ [86]. Ce coefficient de partage se définit de la manière suivante :

$$\log P = \frac{[S]_{oc}}{[S]_{eau}}$$

Où : $\log P$ = coefficient de partage; $[S]_{oc}$ = concentration de la substance S dans l'octanol à l'équilibre (mol/L); $[S]_{eau}$ = concentration de la substance S dans l'eau à l'équilibre (mol/L).

De par sa nature organique très hydrophobe, l'octanol est le solvant de référence utilisé dans le calcul du coefficient de partage, puisqu'il permet de bien illustrer le contraste d'hydrosolubilité avec l'eau. Pour une substance à extraire, plus la valeur de

$\log P$ est élevée, plus cette dernière est soluble dans l'octanol et donc lipophile. De ce fait, cette substance, initialement contenue dans une phase liquide aqueuse, aura tendance à subir un transfert vers la phase organique hydrophobe lors de l'extraction liquide-liquide. Inversement, plus la valeur de $\log P$ est faible, plus la substance sera soluble dans l'eau, donc hydrophile. Celle-ci aura tendance à rester dans la phase aqueuse lors de l'ELL.

Comme mentionné précédemment, le choix du solvant organique est capital. Il est nécessaire d'avoir un solvant immiscible à l'eau, c'est-à-dire qu'il doit se former deux phases distinctes lors de l'ELL. La connaissance de la densité du solvant organique est également primordiale pour discriminer la phase aqueuse de celle organique. Un solvant organique possédant une densité supérieure (ex. : dichlorométhane = 1,33 g/mL) à celle de l'eau (1 g/mL) fera en sorte que la phase organique va se retrouver sous la phase aqueuse lors de l'ELL. Inversement, un solvant organique ayant une densité inférieure (ex. : acétate d'éthyle = 0,90 g/mL) à celle de l'eau se situera au-dessus de la phase aqueuse. La volatilité du solvant organique employé doit aussi être prise en compte, puisque le solvant utilisé doit pouvoir s'évaporer assez facilement sous une hotte pour éviter un chauffage trop élevé et un temps d'évaporation trop long en laboratoire.

En ce qui concerne le soluté à extraire, sa constante d'acidité et sa forme chimique sous laquelle il se présente dans un milieu acide ou basique doivent être connues : seules les molécules de charge globalement neutre sont extractibles avec des solvants organiques [86]. Il faut donc absolument ajuster le pH avant l'ELL de molécules acides ou basiques.

Un autre paramètre important à considérer pour l'extraction des analytes acides ou basiques est la constante d'acidité (pK_a). Comme le démontre la relation d'Henderson-Hasselbach, pour avoir une prédominance des espèces acide et basique

sous la forme neutre (99 % sous forme moléculaire et 1 % ionisé) lors d'ELL ou avant une SPE, il faut ajuster le pH de sorte à se situer à $(pK_a - 2)$ et $(pK_a + 2)$ respectivement [86].

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

1.6.3 Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS)

En chimie environnementale, la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) fait partie des technologies les plus performantes pour la détection, l'identification et la quantification de composés peu volatils comme les PPCPs présents à l'état de trace [56]. Elle consiste en une technique analytique alliant à la fois les capacités performantes de séparation de la chromatographie liquide à celles de détection spécifique et sensible par spectrométrie de masse en fonction du ratio masse sur charge (m/z) des composés.

Différentes approches méthodologiques peuvent être utilisées en combinaison avec la spectrométrie de masse. Une d'entre elles est la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cependant, la technologie de choix (et celle qui a été utilisée dans ce projet) pour analyser des résidus de PPCPs provenant de matrices environnementales complexes demeure sans contredit la chromatographie liquide (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) [8, 56, 87]. Un des nets avantages que possède la HPLC-MS/MS sur la GC-MS consiste au fait qu'aucune étape de dérivation chimique n'est nécessaire pour rendre plus volatile les analytes. Même si les limites de détection obtenues en HPLC-MS/MS sont généralement un peu plus élevées qu'en GC-MS, la HPLC-MS/MS permet une versatilité remarquable et une préparation plus succincte [88]. La spectrométrie de masse en tandem offre

également une sélectivité et une spécificité indéniables des molécules lorsque ces dernières se retrouvent dans une matrice complexe.

1.6.4 Principes et modes d'analyse de la HPLC-MS/MS

Le procédé d'analyse débute par une séparation des substances par la chromatographie liquide inverse. Cette dernière nécessite une phase mobile liquide et une phase stationnaire sur laquelle se retrouve, dans le cas d'une colonne « Polar C18 », des chaînes alkyles de 18 carbones et une surface de particules polaires. Ce type de composition de la phase stationnaire qui permet de couvrir un large spectre de polarité confère une polyvalence et une sélectivité unique aux colonnes de ce type. En effet, les molécules autant hydrophobes que de polarité moyenne peuvent être analysées avec ce type de phase stationnaire. Les composés hydrophobes sont retenus par les chaînes alkyles composant la phase stationnaire tandis que certaines surfaces non greffées avec des groupements triméthylesilanes (TMS) fournissent une rétention des composés un peu plus polaires (Figure 1.6) [89]. Ce type de chromatographie en phase inverse s'effectue en séparant les substances selon leur polarité. De manière générale, les composés plus polaires ont plus d'affinité avec la phase mobile liquide, ce qui fait en sorte qu'ils éluent plus rapidement alors que les composés moins polaires sont davantage retenus par la phase stationnaire et éluent plus lentement. Pour arriver à une telle séparation, la phase mobile liquide est transmise vers la colonne capillaire avec un débit prédéfini. Un système de pompes s'active dans le but d'utiliser les proportions adéquates de solvants aqueux et organiques nécessaires à l'élution en fonction du temps. Dans la plupart des cas, les analyses chromatographiques débutent avec une proportion relativement élevée de phase mobile aqueuse. Plus l'analyse chemine, plus la teneur en solvant organique augmente afin de procéder à l'élution des composés les moins polaires et les plus hydrophobes. Une fois les composés à analyser séparés selon leur polarité, la spectrométrie de masse entre en jeu.

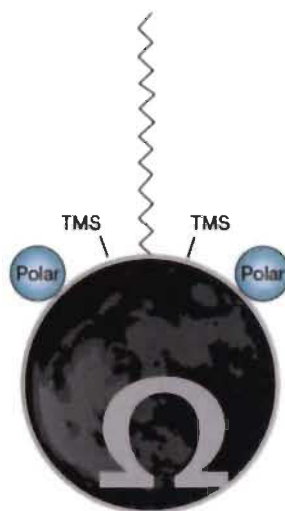


Figure 1.6 Phase stationnaire d'une colonne chromatographique Luna Omega Polar C18 [89].

Le spectromètre de masse est composé de trois parties distinctes; une source, un analyseur et un détecteur. La source constitue l'emplacement dans le spectromètre de masse où des ions gazeux sont produits par nébulisation électrostatique (ESI) à partir de la phase liquide provenant du chromatographe liquide. Le principe de la nébulisation électrostatique consiste à nébuliser en fines gouttelettes par apport d'un gaz le mélange de solvants volatils contenant des composés ionisés provenant de la colonne HPLC [88]. Cette nébulisation électrostatique est possible grâce à l'action conjuguée d'un voltage appliqué (c.-à-d. 3 à 6 kV) à l'extrémité d'un émetteur et le cône d'entrée, ainsi qu'un débit de gaz nébulisant (c.-à-d. azote) [88]. Les fines gouttelettes situées à l'extrémité de l'émetteur sont chargées soit positivement ou négativement selon le mode dans lequel se trouve la source. Une température entre 100 et 250 °C est utilisée à cette partie de l'appareil pour éviter la condensation des molécules à analyser et pour permettre l'évaporation des molécules neutres de solvant contenues dans les gouttelettes [90]. L'évaporation du solvant occasionne une réduction de la taille des gouttelettes et provoque une augmentation de la force

répulsive entre les charges de signes identiques contenues par ces dernières. S'en suivent une désintégration des gouttelettes, puis la formation de microgouttelettes davantage chargées. Lorsque la tension superficielle des microgouttelettes est atteinte (limite de Rayleigh), une explosion coulombique survient et donne lieu à des ions désolvatés chargés en phase gazeuse pouvant être analysés par le spectromètre de masse [88].

L'analyseur de l'appareil utilisé dans ce projet est un quadripôle. Comme son nom l'indique, l'analyseur quadripolaire est constitué de quatre tiges parallèles placées en section circulaire ou hyperbolique [90]. Plus précisément, ces tiges correspondent à deux paires d'électrodes métalliques. L'application d'un voltage positif à une paire d'électrodes et négatif à l'autre paire, ainsi que l'utilisation d'une combinaison de voltage direct (V_{DC}) et alternatif (V_{RF}) de fréquence ω permet l'obtention de rapports DC/RF [88]. Les paires d'électrodes placées dans le plan x-z subissent un voltage direct continu (V_{DC}) positif alors que c'est plutôt un V_{DC} négatif qui est appliqué à celles situées dans le plan y-z. L'utilisation de ces tensions combinées crée des forces électriques attractives et répulsives permettant l'oscillation des ions par mouvement gyroscopique entre les électrodes [90]. Dans le plan x-z, les ions de faibles m/z subissent l'effet du voltage RF qui les empêche de toucher aux électrodes et les ions de hautes masses, quant à eux, sont stabilisés grâce à la grande inertie. Pour que les ions sélectionnés se rendent au détecteur, ils doivent impérativement avoir une trajectoire dite « stable » entre les quatre tiges parallèles [90]. Cette stabilité est obtenue lorsqu'un ion possède le bon rapport DC/RF correspondant à un rapport m/z spécifique défini par les zones de stabilité déterminées théoriquement par les équations mathématiques de Mathieu [91]. Dans le cas contraire, les ions sont déstabilisés et sont filtrés avant même d'atteindre le détecteur.

La dernière partie d'un HPLC-MS/MS est celle du détecteur ou amplificateur de signal de type multiplicateur d'électrons. Ce dernier a pour rôle de détecter les ions

proportionnellement à leur nombre et d'amplifier le courant ionique créé par l'éjection d'électrons des parois conçues sous la forme d'une dynode [90]. Avant d'être transmis, le courant ionique est donc converti en courant électronique. Sa transmission est ensuite effectuée vers un système électronique qui permet l'acquisition, le traitement et le stockage des données.

Un chromatographe liquide couplé à un spectromètre de masse en tandem comme celui utilisé dans ce projet possède deux quadripôles (Q_1 , Q_3) et une cellule de collision avec hexapôle (q_2), tous placés en série. Différents modes d'acquisition peuvent être appliqués selon le type d'analyses à effectuer.

L'analyse en balayage ou « MS-Scan » est le mode analytique utilisé lorsqu'on désire faire un balayage complet, c'est-à-dire obtenir des spectres affichant la masse de tous les ions présents dans la source à un temps donné [90]. Ce type d'analyse nous renseigne quant à la présence ou l'absence d'un analyte, puisque tous les ions produits dans la source sont transmis au détecteur sans être fragmentés.

L'analyse en détection d'ions sélectionnés ou SIM « Single Ion Monitoring » est employé lorsque l'utilisateur ne veut sélectionner et détecter qu'un ou quelques ion(s) seulement [90]. Dans ce cas précis, le spectromètre de masse agit comme un filtre sélectif. L'utilisateur sélectionne des ions caractéristiques à l'étude avec le premier quadripôle Q_1 habituellement. Les spectres de masse obtenus permettent de fournir des mesures qualitatives. Ce mode d'analyse confirme ou infirme la présence réelle d'un analyte selon les ions préalablement sélectionnés tout en offrant une meilleure spécificité de détection qu'en « MS-Scan ».

Le balayage d'ions fragments ou « Daughters scan » correspond à celui avec lequel l'utilisateur sélectionne les masses des molécules mères à l'étude qui seront retenues dans le premier quadripôle (Q_1). Une certaine énergie en kV est appliquée avant la

cellule de collision (q_2) juste après le premier quadripôle Q_1 pour permettre une accélération des molécules précurseurs gazeuses ionisées et des collisions induites lorsqu'elles percutent un gaz inerte (c.-à-d. l'argon) dans la cellule [88]. De cette manière, les ions acquièrent de l'énergie interne par transfert d'énergie cinétique jusqu'à ce qu'ils passent de l'état fondamental à l'état excité. Les ions possédant un excédent d'énergie interne subissent dès lors une dissociation [90]. Le dernier quadripôle Q_3 du HPLC-MS/MS balaie tous les fragments, puis les transmet au détecteur. Ce mode d'analyse est fréquemment utilisé pour renseigner sur le patron de fragmentation des molécules étudiées et pour sélectionner les ions majoritaires et de confirmation selon l'abondance relative des fragments observés. L'ion majoritaire communément désigné « pic de base » sert à la quantification puisqu'il possède la plus grande abondance. L'ion de confirmation est celui qui possède l'abondance la plus élevée après l'ion majoritaire.

Le mode d'acquisition le plus utilisé en HPLC-MS/MS demeure sans contredit la détection de multiples réactions sélectionnées ou « Multiple Reaction Monitoring » noté MRM, puisqu'il allie la sélectivité hors pair d'un spectromètre de masse à l'indéniable spécificité offerte par les analyses en tandem MS/MS. Dans ce mode, la masse de l'ion parent est sélectionnée dans le premier quadripôle (Q_1). Suivant l'application d'un certain voltage pour la cellule de collision (q_2), cet analyte se dissocie en plusieurs fragments suite à des collisions avec un gaz inerte comme l'argon [88]. Une dernière sélection est réalisée dans le troisième quadripôle (Q_3) avec les ions filles produits en fonction de leur ratio m/z . L'utilisation de la MRM au HPLC-MS/MS correspond à un choix judicieux en ce qui a trait à l'analyse quantitative de traces environnementales dans des matrices complexes [88].

1.7 Les objectifs du projet

Comme mentionné dans ce chapitre, les stations d'épuration conventionnelles possèdent un taux d'enlèvement limité des PPCPs dans les eaux usées faisant en sorte que ces contaminants se retrouvent inévitablement dans certaines matrices environnementales et exercent de possibles effets toxiques sur la faune aquatique. Malgré le manque d'informations dans la littérature concernant le réel impact environnemental des PPCPs, un besoin se fait sentir pour développer des procédés plus performants et écologiques pour réduire la charge en contaminants dans les eaux usées.

L'objectif général de ce mémoire de maîtrise visait à développer et optimiser des protocoles d'extraction spécifiques aux molécules sélectionnées (incluant certains métabolites) dans diverses matrices liquides (c.-à-d. effluents synthétiques et lixiviats) et solides (sols, microalgues et organismes aquatiques) par extraction sur phase solide. Une plateforme analytique fiable et robuste a également été développée et optimisée au HPLC-MS/MS permettant de détecter, d'analyser et de quantifier des PPCPs à l'état de trace dans ces matrices environnementales complexes. Dans le but d'obtenir une démarche scientifique rigoureuse, une attention particulière a été accordée à la validation des méthodes analytiques développées pour chacune des matrices analysées. La linéarité, le taux de récupération, les effets de matrice, les limites de détection et de quantification, l'exactitude de même que la précision sont des paramètres analytiques qui ont été évalués.

Les objectifs spécifiques de ce projet consistaient à apporter de nouvelles connaissances scientifiques quant à la persistance et au devenir de contaminants émergents dans deux matrices environnementales complexes. Pour ce faire, les capacités de remédiation de deux matrices environnementales, soit des terreaux avec herbacées et des microalgues *Chlorella sp.* ont été déterminées. Dans le premier cas, des échantillons de lixiviat provenant de mésocosmes ELAPS exposés aux PPCPs

sélectionnés ont été extraits et analysés. Les résultats obtenus ont permis de déterminer si ces contaminants sont retenus par le sol ou s'ils percolent et peuvent causer une toxicité potentielle dans l'environnement. En ce qui a trait à l'espèce algale *Chlorella sp.*, cette dernière a été utilisée pour évaluer son pouvoir d'épuration pour les PPCPs sélectionnés suivant des expositions contrôlées en laboratoire. Finalement, des tests complémentaires de bioaccumulation ont été complétés avec l'organisme aquatique *Daphnia magna* afin de vérifier l'existence d'une possible écotoxicité exercée par les contaminants émergents sur ces crustacés.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériaux et réactifs

2.1.1 Drogues illicites et PPCPs

Le fentanyl, le norfentanyl, la 3,4-méthylènedioxyamphétamine (MDA), la 3,4-méthylènedioxy-N-méthylamphétamine (MDMA communément appelée Ecstasy), la cocaïne et la méthamphétamine ont tous été achetés chez Cerilliant (Round Rock, TX, É.-U.). La carbamazépine, la venlafaxine, le thiaméthoxame et l'imidaclopride ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, É.-U.).

Les solutions stocks de 1 ppm ou 10 ppm de chaque substance ont été préparées dans le méthanol et conservées à 4 °C dans des bouteilles de verres ambrées.

2.1.2 Matériaux et produits chimiques

L'agitateur de type vortex et la centrifugeuse utilisés lors de la préparation d'échantillons proviennent de chez Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada) et Thermo Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada.).

Les cartouches échangeuses fortes de cations « Strong cation exchange » possédant 200 mg de capacité et 6 mL de volume qui sont utilisées pour les SPE proviennent de chez Phenomenex (Torrance, CA, É.-U.). Le système d'évaporation de marque Glas-Col provient de chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, É.-U.).

Le chromatographe en phase liquide est un modèle Alliance Waters 2695 muni d'un injecteur automatique provenant de Waters (Mississauga, ON, Canada). La colonne chromatographique utilisée est de type Luna Omega 3 μm Polar C18 100 Å de dimensions 150 x 4,6 mm et a été achetée chez Phenomenex (Torrance, É.-U.). Le spectromètre de masse en tandem utilisé est un modèle Micromass Quattro LC triple quadrupole provenant également de Waters. L'argon, soit le gaz de collision du HPLC-MS/MS, d'une pureté 99,999 %, provient de chez Praxair (Mississauga, ON, Canada). L'approvisionnement en azote comme gaz de nébulisation dans le spectromètre de masse lors des analyses, est assuré par un générateur d'azote.

Le méthanol et l'acétonitrile de qualité HPLC provenaient de chez Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). L'acétate d'ammonium a été acheté chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, É.-U.). L'hydroxyde d'ammonium, l'acide chlorhydrique et l'acide formique ont été achetés chez Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). La solution saline tamponnée au phosphate (« PBS ») 10X a été achetée chez Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada).

2.2 Production des lixiviats

À l'Université Laval, des terreaux avec herbacées ont été placés dans des cuves en plastique recouvertes d'une toile géotextile. Un volume de 2000 mL d'effluent synthétique était finement vaporisé de jour uniquement et de façon constante sur ces terreaux selon des périodes déterminées (printemps et automne des années 2017

et 2018). L'effluent synthétique contenait tous les PPCPs à l'étude à une concentration de 1 ppm ainsi que des nutriments solubilisés dans l'eau purifiée. Les lixiviats ont été produits par rinçage lent du sol à l'aide d'eau déminéralisée (3 x 3 h de macération avec un volume d'eau équivalent au volume de sol). Les échantillons de lixiviat ont ensuite été prélevés sous les montages et ont été envoyés à l'Université du Québec à Trois-Rivières pour des fins de dosage par HPLC-MS/MS.

2.3 Expositions des microalgues et des organismes aquatiques

Pour la réalisation de ce projet, une collaboration fut conclue avec le professeur Simon Barnabé à l'Université du Québec à Trois-Rivières pour l'accès à tous les équipements nécessaires pour la croissance et les expositions d'algues *Chlorella sp.* aux PPCPs. Également, deux autres partenariats ont été conclus : un premier avec la compagnie Northern Watertek Corporation (NWC), puis un second avec la professeure Nadia Aubin-Horth de l'Université Laval et une chercheuse postdoctorale (Dre Caroline Côté) de son groupe de recherche. L'exposition des organismes aquatiques *Daphnia magna* aux drogues illicites à l'Université Laval était sous la responsabilité de Mme Côté. Également, cette dernière s'occupait de la manutention et de l'expédition des échantillons à l'Université du Québec à Trois-Rivières pour les extractions et les analyses chimiques.

2.3.1 *Chlorella sp.*

Le consortium microalgues-bactéries utilisé était principalement composé de l'espèce *Chlorella sp.* Il a été isolé d'un échantillon prélevé sur le site d'un bassin de stabilisation des eaux usées d'une station de traitement des eaux usées dans le parc industriel de Victoriaville (Québec, Canada).

Pour la préparation de l'inoculum de départ, la biomasse d'algues a été remise en suspension dans une solution aqueuse contenant des éléments nutritifs pour assurer la croissance des microalgues. Ces éléments nutritifs, communément appelés « milieu BBM », correspondent aux macronutriments (A) et aux micronutriments (B) suivants : (A) K_2HPO_4 (100 $\mu\text{L/L}$), $MgSO_4$ (100 $\mu\text{L/L}$), KH_2PO_4 (100 $\mu\text{L/L}$), (B) solution mère de base (10 $\mu\text{L/L}$), solution mère de métaux en trace (1 $\mu\text{L/L}$), solution mère de Bore (1 $\mu\text{L/L}$), solution mère de EDTA (1 $\mu\text{L/L}$) et une solution mère de fer acidifié (1 $\mu\text{L/L}$) [92]. L'inoculum a été conservé dans un erlenmeyer de 500 mL placé sur une plaque agitatrice réglée à 125 tours/min à 25 °C sous un éclairage de 130 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ avec un cycle lumière/noirceur de 12 h / 12 h.

En ce qui a trait aux expositions des microalgues, celles-ci ont été réalisées dans des erlenmeyers de 200 mL en utilisant 10 % de l'inoculum de départ, 2 mL de chaque macronutriment, 0,2 mL de chaque micronutriment et le tout ajusté au trait de jauge avec de l'eau distillée. Ces nouveaux milieux ont été conservés de la même manière que décrite ci-dessus pour l'inoculum. Un débit d'air de 1 L/min était placé en permanence dans les erlenmeyers de manière à permettre une meilleure croissance des microalgues. À des fins de reproductibilité, chaque exposition aux PPCPs a été effectuée avec approximativement la même concentration de départ de 9×10^6 cellules d'algues/mL.

Les PPCPs ont été introduits dans les erlenmeyers en duplicata au jour 0 et à une concentration de 0,5 ppm. La récolte de la biomasse d'algues (50 mL par erlenmeyer) était effectuée au jour 10 pour les analyses et l'évaluation du potentiel de phycoremédiation de *Chlorella sp.*

En se basant sur l'article de Gélinas *et al.* [93], le prétraitement des échantillons de *Chlorella sp.* débutait en ajoutant 50 μL d'acide phosphorique à la biomasse récoltée. Cette étape avait pour but d'abaisser le pH à 2,55 favorisant le bris du lien de

complexation formé entre les PPCPs et l'EDTA présent dans le milieu BBM. Une centrifugation à 4500 rpm pendant 10 minutes était appliquée aux échantillons pour ne conserver que le culot. Ces culots étaient ensuite resuspendus dans 1 mL de solution PBS contenant 0,67 % d'acide trichloroacétique après avoir été préalablement lavés à deux reprises avec de l'eau distillée.

2.3.2 *Daphnia magna*

L'exposition des daphnies a eu lieu à l'Université Laval sous la supervision de la Dre Caroline Côté. Les méthodes d'exposition employées ont été grandement inspirées par les travaux de Silva *et al.* [94].

Les organismes aquatiques *Daphnia magna* ont été obtenus à partir de cultures déjà établies en laboratoire à l'Université Laval. Ils ont été conservés dans des conditions contrôlées de température (20 °C) et d'éclairage (cycle lumière/noirceur de 16 h / 8 h). Les *Daphnia magna* ont été cultivés dans six verres de 100 mL contenant un milieu de culture ainsi que 50 daphnies matures de 2 mg chaque. Les daphnies ont été nourries avec des algues *Raphidocelis subcapitata*.

Des solutions stocks à 1 mg/L de drogues illicites (c.-à-d. FEN, NOR, MET, MDMA, MDA, FEN-d₅, MET-d₈ et MDMA-d₅) ont été préparées dans le méthanol à partir des solutions standards commerciaux. De ces solutions stocks, 100 ng/L des substances ont été ajoutées dans les verres contenant les daphnies. Le milieu a été renouvelé trois fois en cours d'exposition à la même concentration de 100 ng/L. Un blanc contenant seulement l'eau d'élevage a été utilisé à des fins de contrôle pendant les expérimentations. L'exposition des daphnies aux drogues illicites a duré 14 jours au total. Un jeûne a été pratiqué sur les organismes aquatiques 30 h avant l'échantillonnage et l'homogénéisation. Une récolte des daphnies a ensuite été effectuée. Ces dernières ont été rincées à cinq reprises avec de l'eau déminéralisée par

centrifugation délicate (500 rpm pendant une minute). Les échantillons de daphnies exposées ont été conservés à 4 °C et homogénéisés dans une solution tampon à 25 mM Hepes-NaOH contenant 0,1 mM de dithiothréitol, 100 mM de NaCl et 0,1 µg/mL d'aprotinine dans un ratio 1:5 v:v [95] jusqu'à leur extraction et analyse au HPLC-MS/MS.

2.4 Descriptions des procédures d'extraction

2.4.1 Lixiviats

Dans le cas des lixiviats, aucun prétraitement fut nécessaire.

À partir d'échantillons de 1000 mL reçus par la Dr Caroline Côté de l'Université Laval, un volume de 10 mL a été prélevé et transvidé dans un ballon volumétrique de 10,00 mL. Un volume de 200 µL d'une solution à 10 ppm des PPCPs deutérés isotopiques (concentration dans la solution finale : 0,2 ppm) était ajouté à chaque échantillon. Ces standards internes ont permis de rapporter les résultats dans les courbes d'étalonnage en ratios (Surface du signal obtenu de la substance / Surface du signal obtenu du standard interne deutéré de la substance). Ils servaient donc ultimement à normaliser les signaux obtenus lors des injections au HPLC-MS/MS pour les différents rapports m/z sélectionnés des molécules analysées. Les échantillons ont été amenés au trait de jauge à 10,00 mL avec du lixiviat, puis étaient agités au vortex et sont finalement extraits par SPE.

En apportant certaines modifications à la procédure développée par Borova *et al.* [96], les cartouches Strata®-XC ont été préalablement conditionnées avec 6 mL de méthanol et 6 mL d'eau distillée acidifiée avec de l'acide chlorhydrique 1 M (pH 2,5). Les échantillons de 10 mL étaient ensuite ajoutés goutte à goutte sur les cartouches. Des lavages successifs avec 1 mL d'une solution à 2 % v/v d'acide formique et 1 mL

d'une solution à 5 % v/v de méthanol furent exécutés. Ensuite, une élution des PPCPs retenus sur la cartouche a été complétée avec deux portions de 500 μ L de méthanol pour les molécules neutres (TMX, IMI et CAR) et deux portions de 500 μ L d'une solution d'acétonitrile/méthanol/hydroxyde d'ammonium (25:50:10 v/v) pour les molécules ionisées (COC, VEN, MDMA, MDA, FEN, NOR et MET). L'extrait recueilli était évaporé sous jet d'azote en chauffant à 40 °C. Avant l'évaporation complète, 100 μ L d'une solution à 0,025 M d'acide chlorhydrique dans le méthanol était ajouté. Le culot fut ensuite reconstitué avec 300 μ L d'une solution composée d'acétate d'ammonium 10 mM et d'acétonitrile (35:65, v/v).

2.4.2 Terreaux avec herbacées, microalgues et tissus biologiques

Les terreaux avec herbacées, les microalgues et les tissus biologiques ont nécessité un prétraitement avant de pouvoir procéder à l'extraction. D'abord, 1 mL d'échantillon de terreaux, de microalgues ou de tissus biologiques a été prélevé et déposé dans une éprouvette à fond rond. Un volume de 200 μ L était prélevé d'une solution de PPCPs deutérés 1 ppm (concentration dans la solution finale : 0,05 ppm). Ensuite, 2 mL d'une solution tampon pour ultrasons composés d'acide acétique 0,1 M dans méthanol / eau (50:50, v/v) étaient ajoutés [97, 98]. Cette solution était utilisée afin de briser à la fois les cellules présentes et les possibles liens aux protéines dans les matrices (terreaux, microalgues ou tissus biologiques), rendant ainsi accessibles aux analyses les PPCPs contenus dans ceux-ci. La solution utilisée contenant les extraits obtenus par SPE (c.-à-d. 35 % v/v d'acétate d'ammonium 10 mM dans l'acétonitrile pour les terreaux et les microalgues et 50 % v/v de méthanol dans l'eau pour les tissus biologiques) fut reconstituée à 4 mL. Les échantillons ont été mélangés par agitation « vortex » pendant 10 secondes, puis subissent un stage d'ultrasons pendant 10 minutes afin de s'assurer que les cellules résiduelles sont entièrement brisées. Une centrifugeuse fut utilisée à 3500 rpm pendant 5 minutes, ce qui a permis de séparer

les amas de cellules et protéines (se trouvant au fond du culot) des PPCPs situés dans la partie supérieure de l'éprouvette. Le surnageant était ensuite recueilli et prêt pour l'extraction.

Le protocole d'extraction utilisé pour les terreaux, les microalgues et les tissus biologiques était le même que celui décrit à la sous-section 2.4.1, sauf les modifications suivantes. Dans le cas de ces types de matrice, il fut plutôt question d'échantillons ayant un volume final de 4 mL. L'autre changement concernait les extraits provenant de tissus biologiques de daphnies. Pour cette matrice, la reconstitution des extraits a été effectuée dans 1 mL d'une solution à 50 % v/v de méthanol dans l'eau.

2.5 Paramètres instrumentaux

Cette section comporte les paramètres des différents instruments utilisés dans le cadre de ce projet de maîtrise. La sous-section 2.5.3, quant à elle, présente les méthodes d'obtention des régressions linéaires de chaque substance analysée.

2.5.1 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La séparation chromatographique a été rendue possible grâce à un système de chromatographe liquide avec injecteur automatique. Comme mentionné dans la sous-section 2.1.2, une colonne de type C18 a été utilisée pour la séparation.

Eaux de lixiviat, terreaux avec herbacées et microalgues

Les phases mobiles aqueuse et organique employées avec ces types de matrice étaient composées d'une solution d'acétate d'ammonium 10 mM dans l'eau (pH 6,4) et de l'acétonitrile respectivement [99]. Un gradient fut utilisé afin d'augmenter la teneur en

acétonitrile de 65 % à 100 % en 12 minutes. Ce pourcentage d'acétonitrile était maintenu pendant 4 minutes pour finalement revenir aux conditions initiales en 18 minutes. Le volume injecté était de 10 μL et un débit de 0,4 mL/min fut appliqué tout au long de l'injection. Le tableau 2.1 résume les différents paramètres utilisés pour la partie chromatographique.

Tableau 2.1
Paramètres instrumentaux utilisés au HPLC – Eaux de lixiviat, terreaux avec herbacées et microalgues

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	35	65
8	0	100
12	0	100
15	35	65
30	35	65

A : Acétate d'ammonium 10 mM dans l'eau (pH 6,4)

B : 100 % acétonitrile

Daphnies

Les phases mobiles aqueuse et organique utilisées pour cette matrice étaient constituées d'une solution à 0,01 % v/v d'acide formique (pH 3.0) et du méthanol respectivement. Un gradient était appliqué afin de faire passer la proportion en solvant organique de 80 % à 95 % en 7,5 minutes avant de revenir à son état initial de 80 % en 2,5 minutes. L'injection était effectuée avec un volume de 10 μL et un débit de 0,4 mL/min. Le tableau 2.2 résume les paramètres analytiques utilisés au HPLC pour les analyses de tissus de *Daphnia magna*.

Tableau 2.2

Paramètres instrumentaux utilisés au HPLC – Daphnies

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	20	80
7,5	5	95
10	20	80
13	20	80

A : 0,01 % v/v d'acide formique dans l'eau (pH 3.0)

B : 100 % méthanol

2.5.2 Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Le spectromètre de masse utilisé possède une configuration tandem de type triple quadripôle (QqQ) en mode d'ionisation par nébulisation électrostatique (ESI). Le traitement des données se faisait avec le logiciel Masslynx de Waters. Toutes les substances ont été détectées en ionisation positive (ESI+) avec un voltage au capillaire de 1 kV, une température à la source de 120 °C et une température de désolvation de 350 °C. Le temps passé pour l'acquisition de chaque spectre « Dwell time » était de 0,1 seconde. Les analyses étaient effectuées en mode MRM permettant l'identification et la quantification avec la masse de l'ion parent et les masses de deux fragments caractéristiques provenant de cette molécule mère. Le fragment ayant l'intensité la plus élevée servait d'ion de quantification, alors que celui possédant la deuxième plus grande intensité permettait de confirmer la présence de la molécule mère. Les tableaux 2.3 et 2.4 résument les différents paramètres utilisés sur le spectromètre de masse en tandem lors de l'analyse des molécules d'intérêt selon la matrice étudiée. Les figures 2.1 et 2.2 présentent le chromatogramme obtenu avec la méthode développée au HPLC-MS/MS pour la quantification des PPCPs dans les eaux de lixiviat, les terreaux avec herbacées et les microalgues. La figure 2.3 illustre le

chromatogramme obtenu avec la méthode développée au HPLC-MS/MS pour la quantification des drogues illicites dans les daphnies.

Tableau 2.3

Paramètres instrumentaux utilisés au spectromètre de masse en tandem MS/MS –
Eaux de lixiviat, terreaux avec herbacées et microalgues

Nom molécule	T _R (min)	Masse molécule mère (m/z)	Masse fragments (m/z)	Voltage cône (V)	Énergie collision (eV)
COC	21,59	304	<u>82</u> /182	25	35
VEN	26,90	278	<u>58</u> /121	20	20
CAR	5,40	237	<u>194</u> /192	25	20
MDMA	23,52	194	<u>135</u> /79	30	25
MDA	21,01	180	<u>133</u> /163	15	20
NOR	25,17	233	<u>84</u> /150	25	20
FEN	18,77	337	<u>105</u> /132	30	40
MET	24,40	150	<u>91</u> /119	15	20
IMI	4,78	256	<u>209</u> /175	15	15
TMX	4,37	292	<u>211</u> /132	15	10
COC-d ₃	23,08	307	<u>85</u> /185	25	30
VEN-d ₆	27,25	284	<u>64</u> /121	20	20
CAR-d ₁₀	5,34	247	<u>204</u>	25	25
MDMA-d ₅	23,50	199	<u>135</u> /107	20	25
FEN-d ₅	18,75	342	<u>188</u> /105	30	30
MET-d ₈	24,33	158	<u>93</u> /92	20	20
IMI-d ₄	4,71	260	213/ <u>121</u>	25	25
TMX-d ₃	4,35	295	<u>214</u>	15	15

Note : Les fragments de quantification sont soulignés alors que ceux de confirmation ne le sont pas.

Tableau 2.4

Paramètres instrumentaux utilisés au spectromètre de masse
en tandem MS/MS – Daphnies

Nom molécule	T _R (min)	Masse molécule mère (m/z)	Masse fragments (m/z)	Voltage cône (V)	Énergie collision (eV)
MET	3,07	150	<u>91</u> /119	15	20
MET-d ₈	3,07	158	<u>93</u> /92	20	20
FEN	3,14	337	<u>105</u> /188	30	50
FEN-d ₅	3,13	342	<u>105</u> /188	30	25
NOR	3,06	233	<u>84</u> /56	25	20
MDA	3,05	180	<u>105</u> /135	15	25
MDMA	3,05	194	<u>105</u> /133	20	25
MDMA-d ₅	3,04	199	<u>107</u> /165	15	20

Note : Les fragments de quantification sont soulignés alors que ceux de confirmation ne le sont pas.

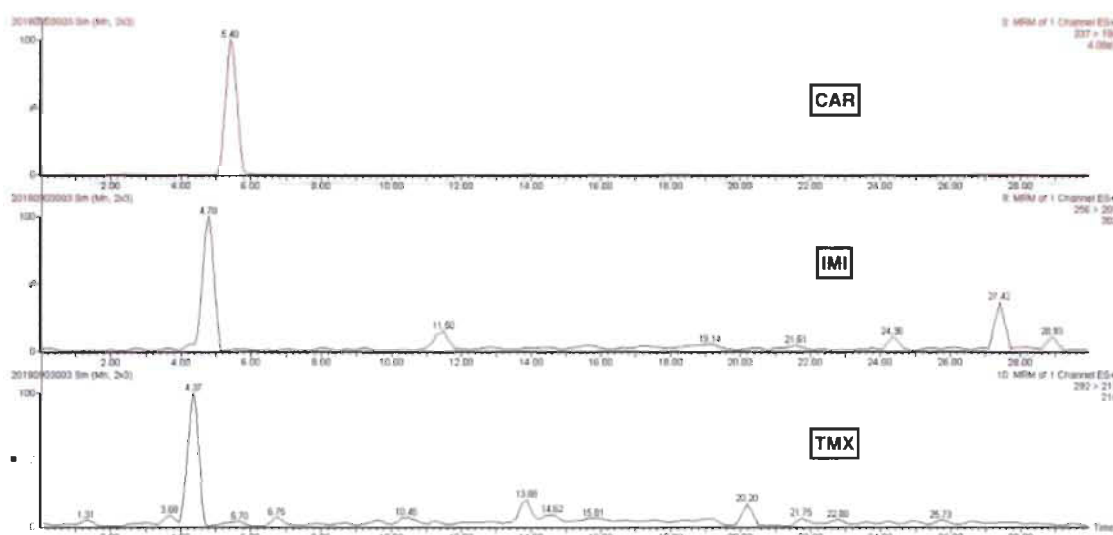


Figure 2.1 Chromatogramme des PPCPs (1 de 2) – Méthode analytique HPLC développée pour la quantification dans les eaux de lixiviat, terreaux avec herbacées et microalgues.

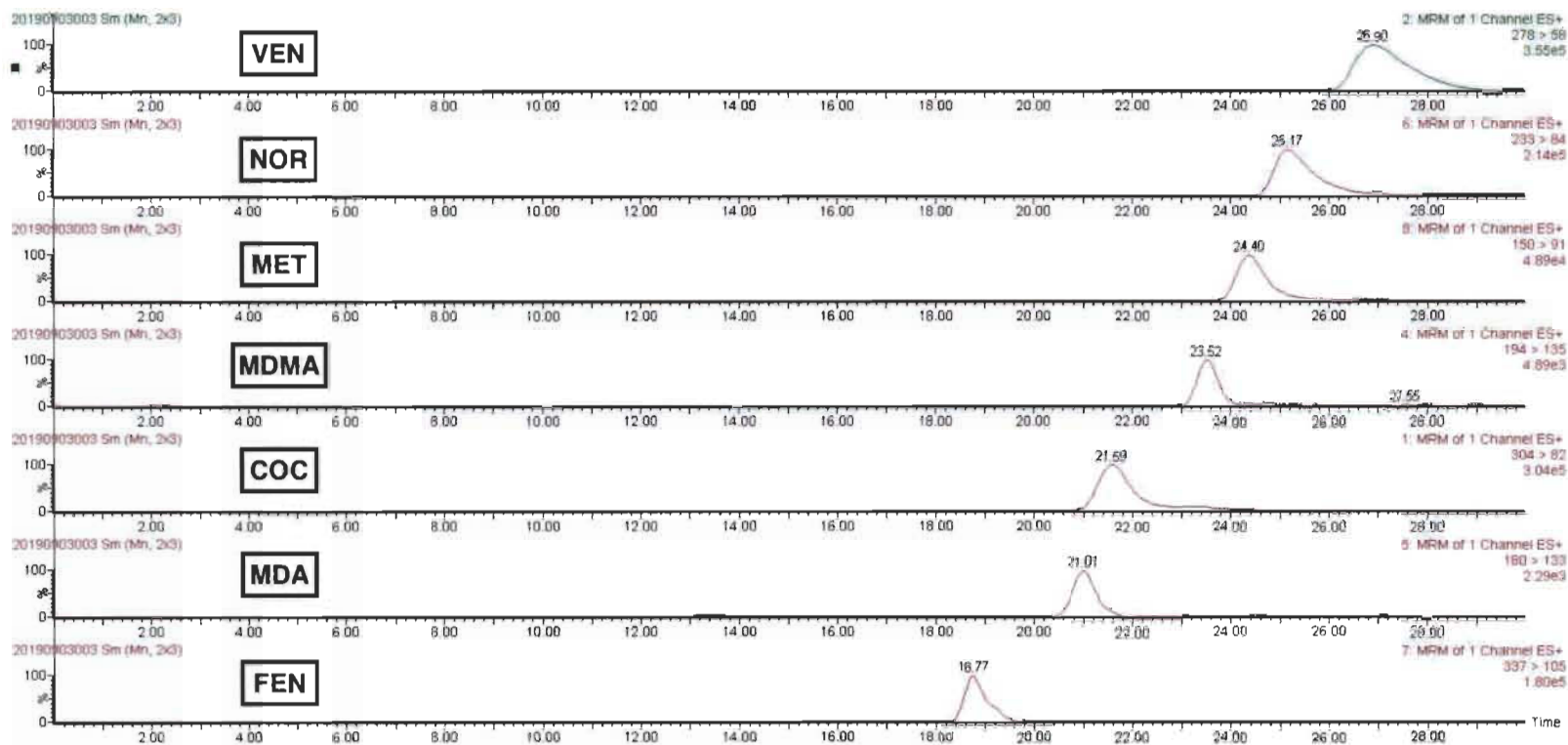


Figure 2.2 Chromatogramme des PPCPs (2 de 2) – Méthode analytique HPLC développée pour la quantification dans les eaux de lixiviat, terreaux avec herbacées et microalgues.

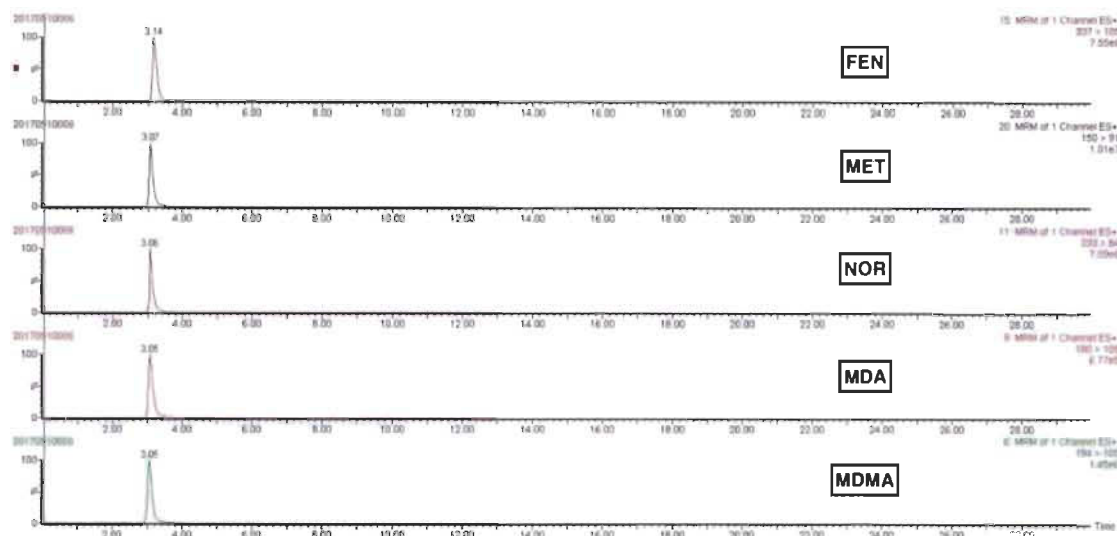


Figure 2.3 Chromatogramme des drogues illicites – Méthode analytique HPLC développée pour la quantification dans les daphnies.

2.5.3 Courbes d'étalonnage

Cette sous-section décrit les stratégies analytiques qui ont été employées pour l'obtention de régressions linéaires des ratios de surface obtenus par HPLC-MS/MS en fonction de la concentration de PPCPs selon trois différentes matrices analysées au cours du présent projet. Toutes les courbes d'étalonnage ont été réalisées de la même manière. Spécifiquement, les concentrations choisies pour la réalisation des courbes d'étalonnage ont été préparées, extraites et analysées par HPLC-MS/MS en triplicata et selon les conditions expérimentales mentionnées aux sections 2.4 et 2.5.

Eaux de lixiviat

Pour définir le domaine de linéarité de cette matrice, des solutions contenant 0, 0.2, 0.4 et 0.6 mg/L d'un mélange des PPCPs à l'étude ont été préparées. Dans ce cas-ci, les courbes d'étalonnage ont été effectuées à l'aide de la méthode par ajouts dosés, soit en ajoutant les différentes concentrations de PPCPs directement dans la matrice

considérée. Cette stratégie a été appliquée afin de reproduire le plus fidèlement possible les conditions expérimentales dans lesquelles les échantillons à quantifier se trouvaient et ainsi, contrecarrer les effets de matrice susceptibles d'être rencontrés.

Chlorella sp.

Le domaine de linéarité de cette matrice a été évalué entre 0 et 0,50 mg/g d'un mélange des PPCPs ciblés. Des solutions à 0, 0.25 et 0.50 mg/g de PPCPs ont été préparées. Comme pour les eaux de lixiviat, la méthode des ajouts dosés a été employée pour l'établissement des courbes d'étalonnage.

Daphnia magna

Le domaine de linéarité pour cette matrice a été défini entre 45 ng/g et 180 ng/g avec des solutions contenant 45, 90, 135 et 180 ng/g d'un mélange des différents PCPPs.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Optimisation des signaux HPLC-MS/MS

La prochaine section traite des divers paramètres analytiques optimisés lors du développement des protocoles d'extraction et des méthodes au HPLC-MS/MS.

3.1.1 HPLC – Phases mobiles

Plusieurs essais ont été effectués avec différentes phases mobiles aqueuses et organiques afin de déterminer lesquelles permettaient une séparation chromatographique satisfaisante et une ionisation adéquate des molécules à l'étude. Les combinaisons de phases mobiles tentées sont présentées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1
Optimisation des phases mobiles – Combinaisons testées

Numéro de la combinaison	Phase mobile aqueuse	Phase mobile organique
1	0,01 % v/v HCOOH (pH 3.0)	MeOH
2	0,1 mM CH ₃ COONH ₄ avec 0,01 % v/v HCOOH (pH 4,9)	MeOH avec 0,1 mM CH ₃ COONH ₄ et 0,01 % v/v HCOOH
3	5 mM CH ₃ COONH ₄ avec 0,02 % v/v CH ₃ COOH (pH 4,6)	MeOH
4	10 mM CH ₃ COONH ₄ (pH 6,4)	MeOH
5	10 mM CH ₃ COONH ₄ (pH 6,4)	ACN
6	10 mM NH ₄ HCO ₃ avec 0,1 % v/v HCOOH (pH 7.8)	ACN/MeOH (1:1)
7	10 mM NH ₄ HCO ₃ avec 0,1 % v/v HCOOH (pH 7.8)	MeOH
8	0,1 % v/v HCOOH (pH 2.8)	MeOH

Les combinaisons 1 à 5 ont été testées avec la matrice des eaux de lixiviat. La dernière est celle qui permettait l'obtention de pics de largeur étroite et davantage sensibles pour la majorité des molécules. En comparaison avec la quatrième combinaison, la cinquième contient de l'acétonitrile comme phase mobile organique. Il n'est pas surprenant que de meilleurs signaux aient été obtenus avec l'acétonitrile, car il s'agit d'un solvant ayant un taux d'évaporation supérieur à celui du méthanol. La nébulisation électrostatique des composés lors des analyses HPLC-MS/MS était donc facilitée avec

l'utilisation de l'acétonitrile. Par conséquent, davantage d'ions étaient formés dans la source et le signal obtenu pour chaque molécule était amélioré. De plus, contrairement au méthanol, l'acétonitrile n'est pas assujéti à un phénomène de compétition entre les protons provenant du solvant et ceux des molécules lors de l'ionisation dans la source. Pour ces raisons, la cinquième combinaison est celle qui a été retenue pour analyser les PPCPs contenus dans les eaux de lixiviat, les terreaux avec herbacées et les microalgues. Les trois dernières combinaisons de phases mobiles ont fait l'objet d'essais avec la matrice *Daphnia magna*. Celle qui a été retenue pour cette matrice est la huitième, car elle présentait de meilleurs signaux au HPLC-MS/MS pour l'ensemble des drogues illicites tant au niveau de l'intensité que de la largeur des pics obtenus. Ces résultats s'expliquent par l'ajout d'une certaine quantité d'acide dans la phase mobile aqueuse qui permettait l'abaissement significatif du pH. Dans notre cas, l'acidification de la phase mobile aqueuse prédisposait les analytes à leur ionisation et à leur détection en mode d'ionisation positive améliorant ainsi le signal.

3.1.2 HPLC – Proportions des phases mobiles, débit et temps d'analyse

Dans ce projet, le but visé lors du développement de méthodes était d'obtenir une bonne séparation chromatographique des composés tout en générant des signaux pouvant servir à la quantification et en conservant une bonne productivité (c.-à-d. un temps d'analyse court). Ainsi, les trois paramètres primordiaux suivants ont été optimisés lors du développement de nos méthodes analytiques par HPLC : les proportions de phases mobiles à utiliser, le débit à appliquer et le temps d'analyse.

Les conditions optimales au HPLC pour les échantillons dans les matrices d'eaux de lixiviat, des terreaux avec herbacées et des microalgues sont présentées dans le tableau 2.1. Une proportion de 65 % de phase mobile organique fut utilisée en début d'analyse. Les extraits à analyser provenant de ces matrices étaient plus enclins à « encrasser » la colonne à long terme. C'est pourquoi une étape à 100 % de solvant

organique a été ajoutée à la méthode entre 8 et 12 minutes. Cette dernière assurait un nettoyage des potentiels résidus organiques qui pouvaient s'accumuler à l'intérieur de la colonne entre chaque analyse. Les conditions initiales furent retrouvées rapidement suivant cette étape et conservées pendant plusieurs minutes à des fins de rééquilibration de la colonne.

Le tableau 2.2 renseigne quant aux conditions optimales déterminées pour les analyses d'échantillons contenant la matrice *Daphnia magna*. Une meilleure séparation des composés fut obtenue en utilisant une forte proportion de solvant organique dès le départ (c.-à-d. 80 % de méthanol). Il a aussi été remarqué que les molécules d'intérêt éluaient toutes avant d'atteindre 100 % de phase mobile organique. Pour cette raison, la proportion maximale de méthanol atteinte lors d'une injection fut fixée à 95 %. Un débit constant de 0,4 mL/min permettait une certaine séparation des composés tout en conservant un temps d'analyse court. Une période de trois minutes à condition isochratique a été placée à la toute fin de l'injection pour permettre la rééquilibration de la colonne avant la prochaine prise d'échantillon.

3.1.3 MS/MS – Fragments (« Daughters »)

Le choix des fragments de quantification et de confirmation a été fait de la même manière pour toutes les matrices à l'étude. Pour ce faire, un balayage d'ions fragments « Daughters scan » entre 50 m/z et 350 m/z en mode d'ionisation positive a été effectué en utilisant la masse de chaque molécule mère. Une énergie de collision de 15 eV et un voltage au cône de 15 V furent utilisés pour toutes les molécules. Les spectres de masse obtenus ont été analysés de manière à conserver la masse de tous les fragments qui présentaient une bonne intensité relative. Cet exercice a été fait pour chaque molécule. Un spectre de masse obtenu pour la méthamphétamine suite à un balayage d'ions fragments est présenté à titre d'exemple à la figure 3.1.

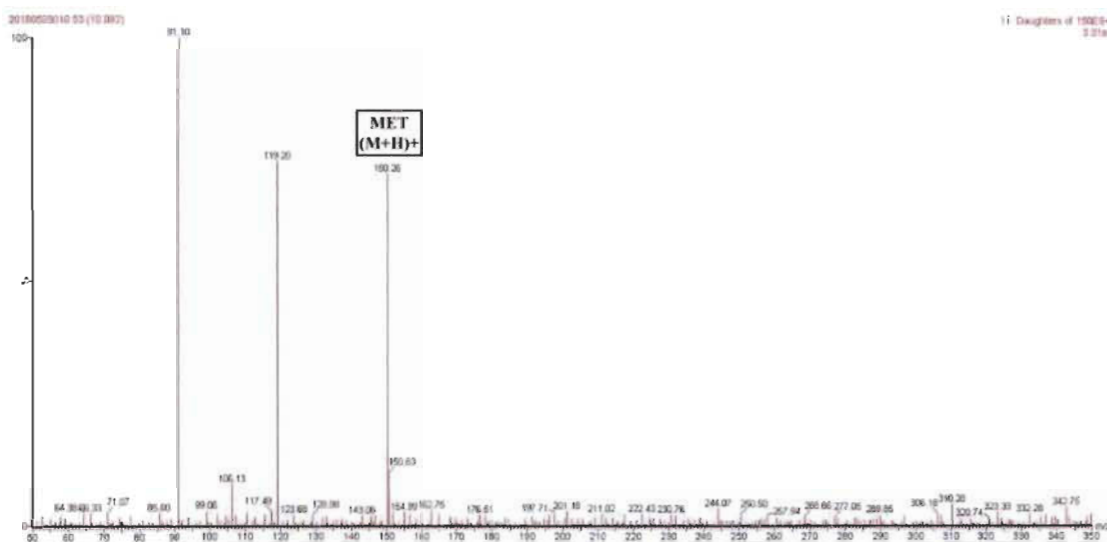


Figure 3.1 Balayage d'ions fragments « Daughters scan » de la méthamphétamine – Fragments de quantification et de confirmation à 91 m/z et 119 m/z respectivement.

Une fois que la masse de tous les fragments potentiels fut déterminée, ces derniers ont été analysés en mode d'analyse MRM. De là, seulement deux fragments par molécule (c.-à-d. un fragment de quantification et un de confirmation) étaient sélectionnés selon l'intensité de leur signal obtenu. Dans le cas de la méthamphétamine par exemple, la masse de huit fragments relativement intenses a été observée en « Daughters scan ». Ceux-ci ont été analysés en mode MRM (Figure 3.2) pour finalement ne retenir que les deux qui présentaient les pics les plus intenses, soit les m/z 91 et 119. Les fragments conservés pour chaque molécule en fonction des matrices utilisées sont présentés dans les tableaux 2.3 et 2.4.

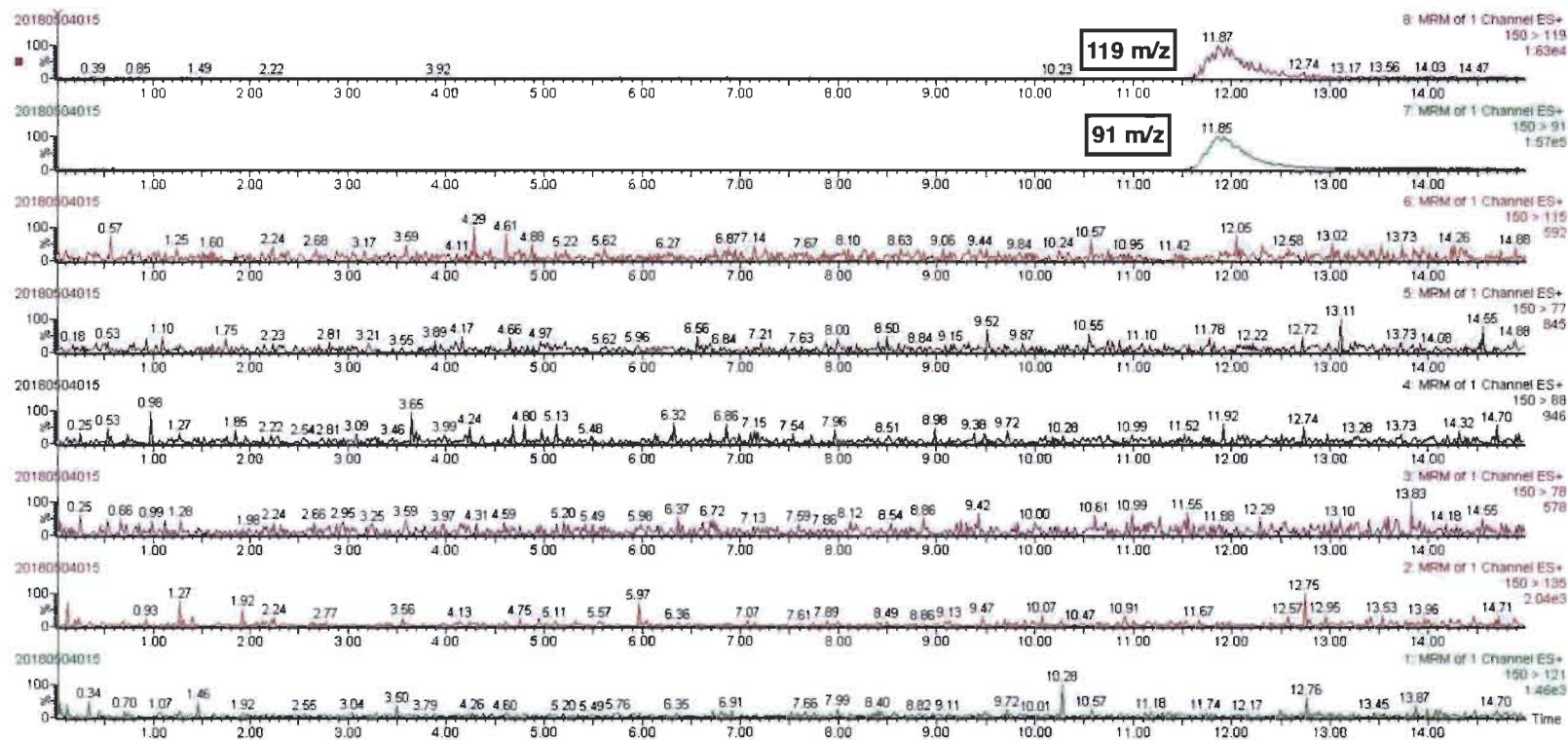


Figure 3.2 Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » de la méthamphétamine – Fragments de quantification et de confirmation à 91 m/z et 119 m/z respectivement.

3.1.4 MS/MS – Énergie de collision, voltage au cône et voltage au capillaire

L'énergie de collision, le voltage au cône et le voltage au capillaire sont des paramètres nécessitant un ajustement précis lors d'analyses au HPLC-MS/MS.

L'énergie de collision est celle qui permet aux molécules d'acquérir l'énergie suffisante pour se fragmenter une fois qu'elles entrent en contact avec un gaz inerte. D'une part, si l'énergie transmise aux molécules est excessive, on assiste à la désintégration complète de l'ion précurseur en fragments plus ou moins caractéristiques. D'autre part, une énergie inférieure à celle requise pour induire une dissociation ne permet pas de soustraire les informations recherchées lors de l'utilisation d'un appareil comme un HPLC-MS/MS. Il est donc primordial de trouver un juste milieu permettant d'observer un patron de fragmentation caractéristique des molécules mères à l'étude.

L'énergie de collision a été optimisée en mode MRM pour chaque molécule en la faisant varier entre 5 et 60 eV par incrément de 5 eV. Un calcul d'aire sous la courbe du signal obtenu était appliqué. L'énergie de collision permettant d'obtenir l'aire la plus élevée pour une molécule fut celle retenue. Par exemple, l'énergie de collision conservée pour l'analyse du fentanyl dans les eaux de lixiviat, les terreaux avec herbacées et les microalgues fut fixée à 40 eV. La figure 3.3 montre les aires sous la courbe obtenues lorsque l'énergie de collision appliquée était de 35 eV, 40 eV et 45 eV. On constate que lorsque l'énergie de collision était inférieure ou supérieure à 40 eV, l'intensité relative du signal démontrait une décroissance pour la transition MRM 337 m/z \rightarrow 105 m/z. Les tableaux 2.3 et 2.4 contiennent les énergies de collisions optimales utilisées pour fragmenter les molécules à l'étude en fonction de la matrice.

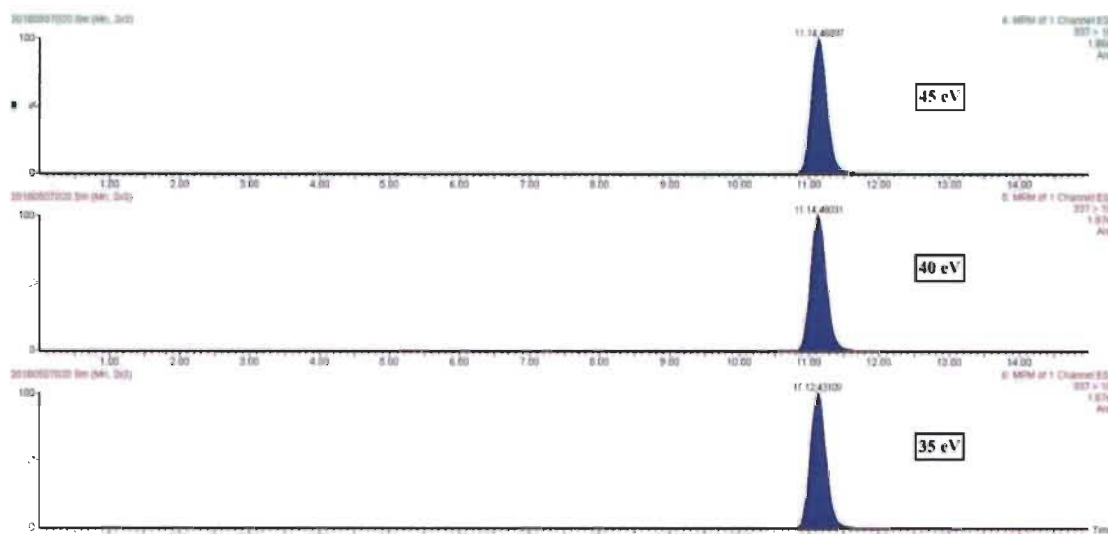


Figure 3.3 Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » du fentanyl – Optimisation de l'énergie de collision.

Les voltages au cône et au capillaire sont des paramètres de haute importance dans le processus de nébulisation électrostatique au HPLC-MS/MS. En appliquant une tension adéquate au cône et au capillaire, une quantité maximale d'ions est formée et un signal optimal est obtenu pour chaque molécule.

Les voltages au cône et au capillaire ont été optimisés pour tous les PPCPs à l'étude. À raison de quelques changements, la même procédure que celle utilisée pour l'énergie de collision a été appliquée pour l'optimisation de ces paramètres. Dans le cas des voltages au cône, la variation se faisait entre 5 V et 40 V, mais toujours par incrément de 5 V. Quant à l'optimisation de la tension au capillaire, elle a été réalisée en la faisant varier entre 0,75 kV et 3 kV par incrément de 0,25 kV.

La figure 3.4 présente un exemple de l'optimisation du voltage au cône effectué avec le fentanyl en utilisant la méthode HPLC développée pour les eaux de lixiviat, les terreaux avec herbacées et les microalgues. Dans cet exemple, des tensions de 25 V, 30 V et 35 V étaient appliquées. Étant donné que le signal obtenu diminuait

considérablement lorsque le voltage au cône était supérieur ou inférieur à 30 V, la valeur qui a été conservée pour le fentanyl est de 30 V.

La figure 3.5 illustre l'optimisation du voltage au capillaire réalisée avec la méthamphétamine en utilisant la méthode HPLC développée pour la matrice *Daphnia magna*. Dans ce cas-ci, l'application d'une tension allant de 0,75 kV jusqu'à 2,00 kV a été effectuée. En comparant les aires sous la courbe, il a été possible de constater que le meilleur signal généré correspondait à celui lorsque 1 kV était appliqué au capillaire. Cette valeur a donc été conservée pour les analyses ultérieures.

Les tableaux 2.3 et 2.4 contiennent les voltages au cône et au capillaire optimaux utilisés pour l'analyse des différents PPCPs en fonction de la matrice.

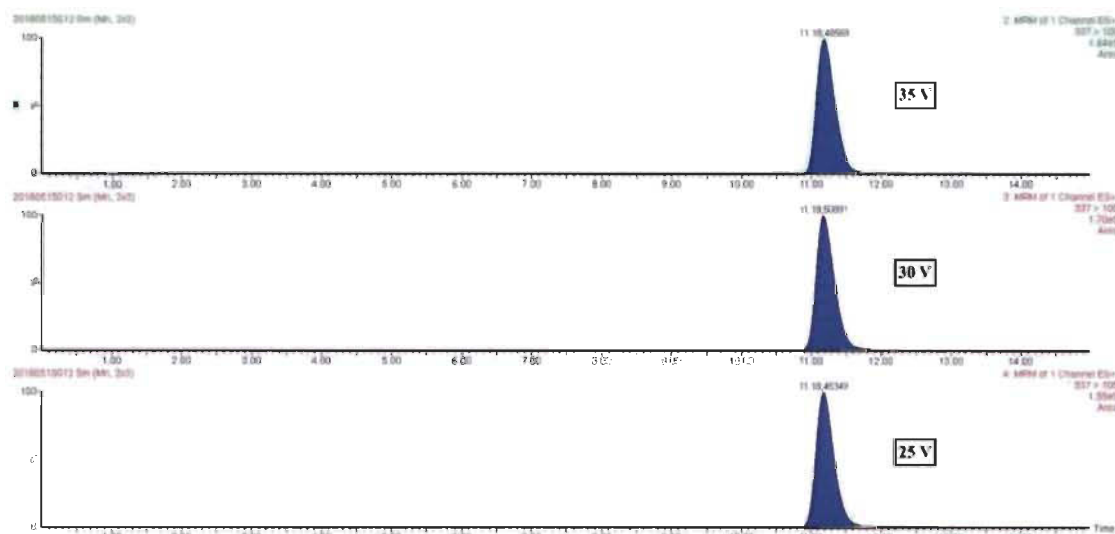


Figure 3.4 Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » du fentanyl – Optimisation du voltage au cône.

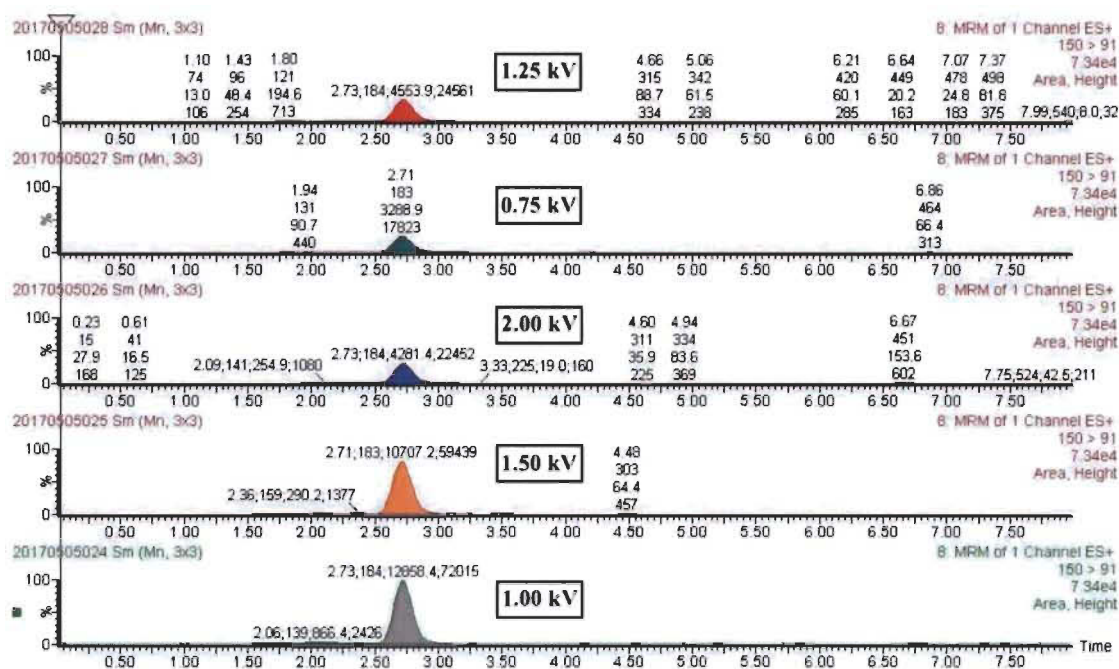


Figure 3.5 Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » de la méthamphétamine – Optimisation du voltage au capillaire.

3.1.5 SPE – Solution de reconstitution des extraits

Les extraits obtenus par extraction sur phase solide nécessitent une reconstitution dans une solution optimale choisie en fonction des propriétés physicochimiques des analytes. Généralement, les solutions de reconstitution possèdent une composition chimique similaire à celle des phases mobiles employées au HPLC-MS/MS afin d'améliorer le processus de nébulisation électrostatique et la solubilisation des composés. Les différentes solutions de reconstitution d'extraits testées figurent dans le tableau 3.2 :

Tableau 3.2

Optimisation des solutions de reconstitution des extraits – Combinaisons testées

Numéro de la combinaison	Solution de reconstitution
1	1 mL MeOH/H ₂ O (5:95)
2	1 mL MeOH/H ₂ O (20:80)
3	1 mL MeOH/H ₂ O (20:80) avec 0,1 % HCOOH
4	1 mL MeOH/H ₂ O (50:50)
5	200 µL d'une solution à 10 mM NH ₄ HCO ₃ dans ACN / H ₂ O (65:35) (pH 6.42)
6	500 µL d'une solution à 10 mM NH ₄ HCO ₃ dans ACN / H ₂ O (65:35) (pH 6.42)
7	300 µL d'une solution à 10 mM NH ₄ HCO ₃ dans ACN / H ₂ O (65:35) (pH 6.42)

Les quatre premières combinaisons de solutions de reconstitution ont fait l'objet d'essais avec la matrice *Daphnia magna*. Celle qui a été retenue est la quatrième puisqu'elle permettait une bonne solubilisation des composés ainsi que l'obtention de signaux intenses et effilés au HPLC-MS/MS pour la majorité des molécules à l'étude. Les figures 3.6 et 3.7 présentent les signaux obtenus pour deux drogues illicites

à 0,1 ppm en fonction des différentes solutions de reconstitution testées suite à des SPE. La figure 3.6 correspond à la transition MRM 233 $m/z \rightarrow$ 84 m/z du norfentanyl. Pour cette molécule, il est possible de voir que les combinaisons 1, 2 et 4 auraient pu être adoptées, car de bons signaux en résultaient. Cependant, la figure 3.7 correspondant à la transition MRM 337 $m/z \rightarrow$ 105 m/z du fentanyl a permis de mettre en évidence un des défis fréquemment rencontrés lors du développement de méthodes analytiques incluant plusieurs molécules chimiques différentes. Dans ces circonstances, il devient impératif de tenir compte des propriétés physicochimiques de l'ensemble des molécules, ce qui implique inévitablement plusieurs ajustements et compromis pour obtenir des signaux satisfaisants pour chacune d'entre elles. Dans ce cas précis, on a remarqué que la seule solution de reconstitution testée qui donnait des pics d'intensité élevée et de largeur étroite pour le fentanyl était celle constituée de 50 % d'eau et 50 % de méthanol (combinaison 4). Pour ces raisons, le choix final pour reconstituer les extraits avec la matrice *Daphnia magna* s'est arrêté sur la combinaison 4, et ce, malgré que les pics les plus intenses étaient obtenus avec la combinaison 2 pour le norfentanyl.

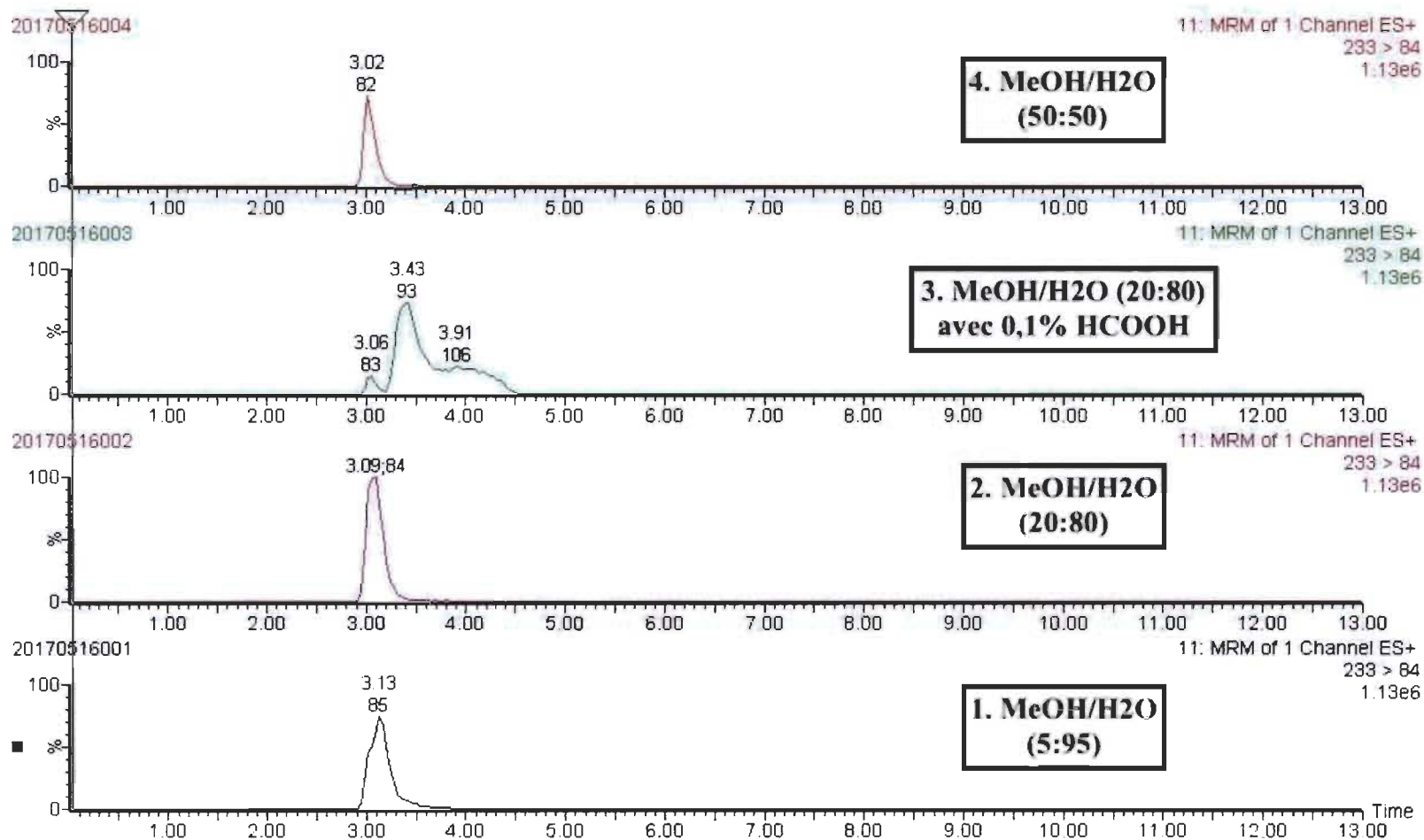


Figure 3.6 Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » du norfentanyl – Optimisation de la solution de reconstitution des extraits provenant de tissus de *Daphnia magna*.

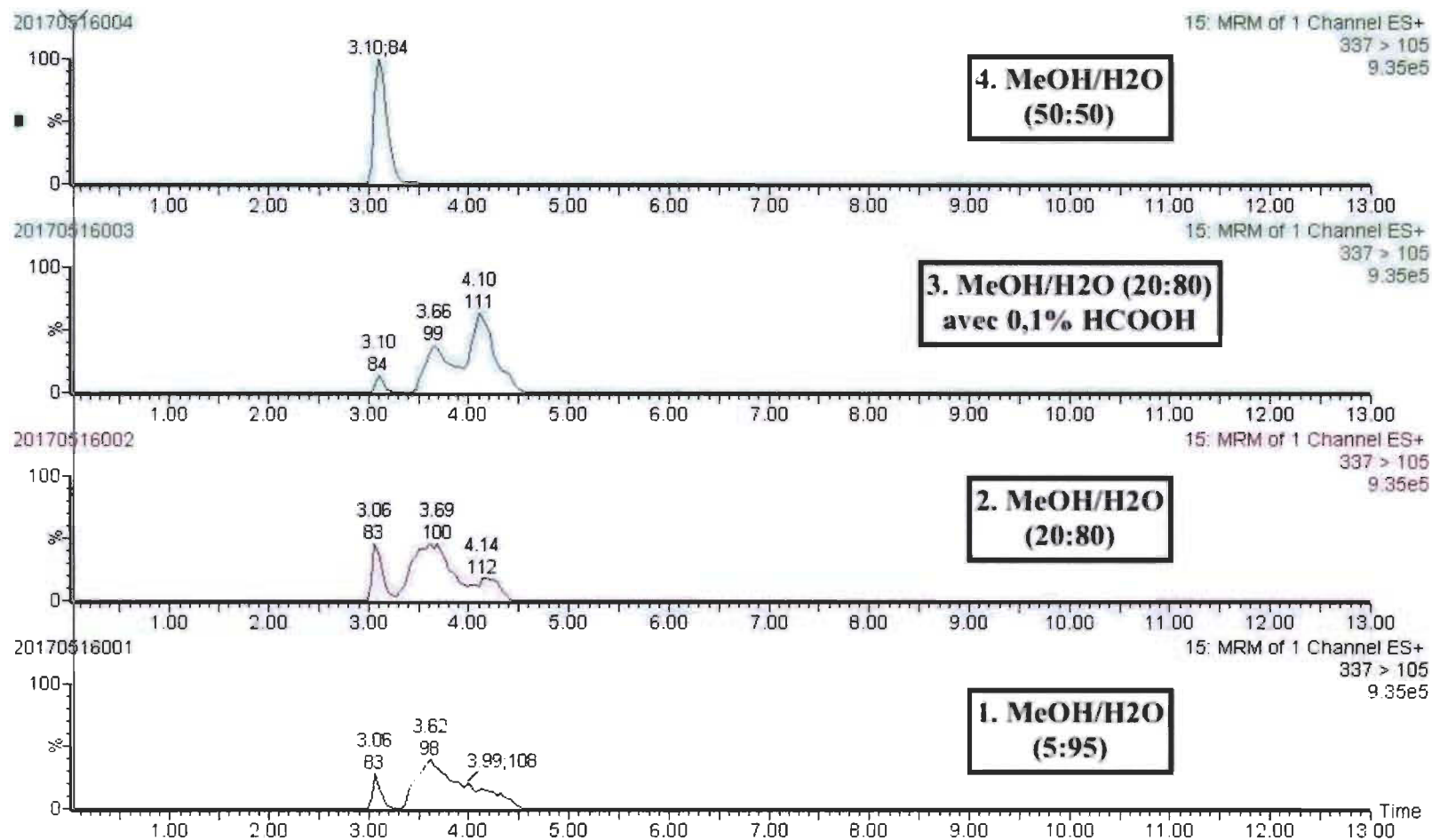


Figure 3.7 Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » du fentanyl – Optimisation de la solution de reconstitution des extraits provenant de tissus de *Daphnia magna*.

Pour les autres types de matrice analysées, les combinaisons 5 à 7 ont été testées. Comme le montre la figure 3.8, le volume optimal pour la reconstitution des extraits provenant d'eaux de lixiviat, de terreaux et de microalgues était 300 μ L d'une solution d'acétate d'ammonium 10 mM et d'acétonitrile (35:65). La combinaison 7 fut donc celle qui a été conservée pour ces matrices.

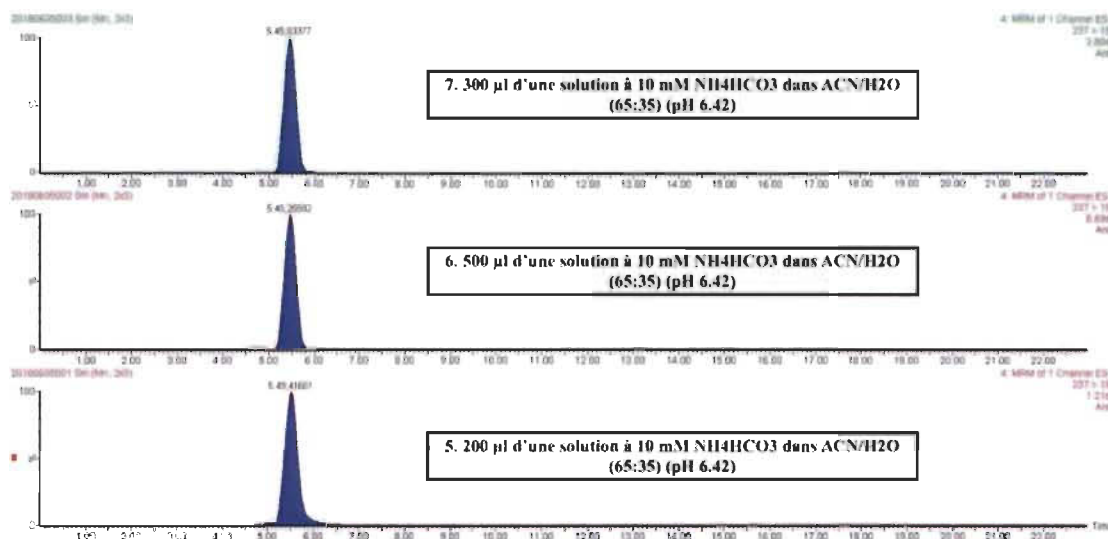


Figure 3.8 Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » de la carbamazépine – Optimisation de la solution de reconstitution des extraits provenant d'eaux de lixiviat, de terreaux et de microalgues.

3.1.6 SPE – Solutions de lavage et d'élution

Différentes solutions de lavage ont fait l'objet d'essais afin de trouver les conditions optimales permettant d'éliminer le plus d'interférents possibles sans désorber prématurément les molécules d'intérêt des cartouches SPE. Les combinaisons testées sont présentées dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3
Optimisation des solutions de lavage – Combinaisons testées

Numéro de la combinaison	Lavage(s) effectué(s)
1	a) 3 mL H ₂ O acidifié (pH 2.5, HCl 1M)
2	a) 1 mL, 2 % v/v HCOOH b) 1 mL, 10 % v/v MeOH
3	a) 1 mL, 2 % v/v HCOOH b) 1 mL, 5 % v/v MeOH

Selon les conditions de sélection déjà mentionnées, la combinaison qui a été retenue pour tous les types de matrices analysées dans le cadre de ce projet est la troisième. Un premier lavage avec une solution acidifiée permettait la rétention des PPCPs neutres et basiques à l'intérieur des cartouches, mais également l'élimination des possibles interférents acides présents dans les échantillons. La proportion de méthanol dans le deuxième lavage a été optimisée à 5 % v/v, puisqu'une concentration supérieure faisait qu'une partie des PPCPs neutres se désorbaient prématurément.

L'optimisation des solutions d'élution a été réalisée en vérifiant l'efficacité des combinaisons figurant dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4
Optimisation des solutions d'élution – Combinaisons testées

Numéro de la combinaison	Solutions d'élution
1	a) 2 x 500 µL MeOH b) 2 x 500 µL 2 % v/v NH ₄ OH dans MeOH
2	a) 2 x 500 µL MeOH b) 2 x 500 µL EtOAc/MeOH/NH ₄ OH (50:50:20)
3	a) 2 x 500 µL MeOH b) 2 x 500 µL ACN/MeOH/NH ₄ OH (25:50:10) c) Ajout de 100 µL de HCl à 0,025 M dans le MeOH avant évaporation complète

En se basant sur les travaux de Vasquez-Roig *et al.* [100], la combinaison 1 de solutions d'élution a été testée. Une désorption inefficace des composés basiques fut obtenue, donnant lieu à de faibles taux de récupération pour plusieurs PPCPs à l'étude.

Afin d'améliorer ces faibles taux de récupération, la combinaison 2 a ensuite été tentée en se référant à un article publié par la compagnie Agilent [101]. Malgré sa grande vitesse d'évaporation, l'acétate d'éthyle contenu dans la solution d'élution restait toujours présent lors des injections des extraits au HPLC-MS/MS. Par conséquent, on assistait au dédoublement des pics pour la plupart des PPCPs et on pouvait même apercevoir une suppression complète des signaux pour certaines molécules.

Finalement, la dernière combinaison fut celle adoptée pour tous les types de matrice analysés. L'ajout de HCl avant l'évaporation complète des extraits permettait de rendre certains PPCPs de nature plus volatils (plus précisément MET, MDA et MDMA) sous

leur forme saline et ainsi augmenter leur taux de récupération respectif [101, 102]. Le remplacement de l'acétate d'éthyle par l'acétonitrile a permis quant à lui l'obtention de pics d'intensité élevée et de largeur étroite pour toutes les molécules à l'étude. La figure 3.9 montre l'optimisation décrite précédemment pour les solutions d'élution utilisées lors des SPE.

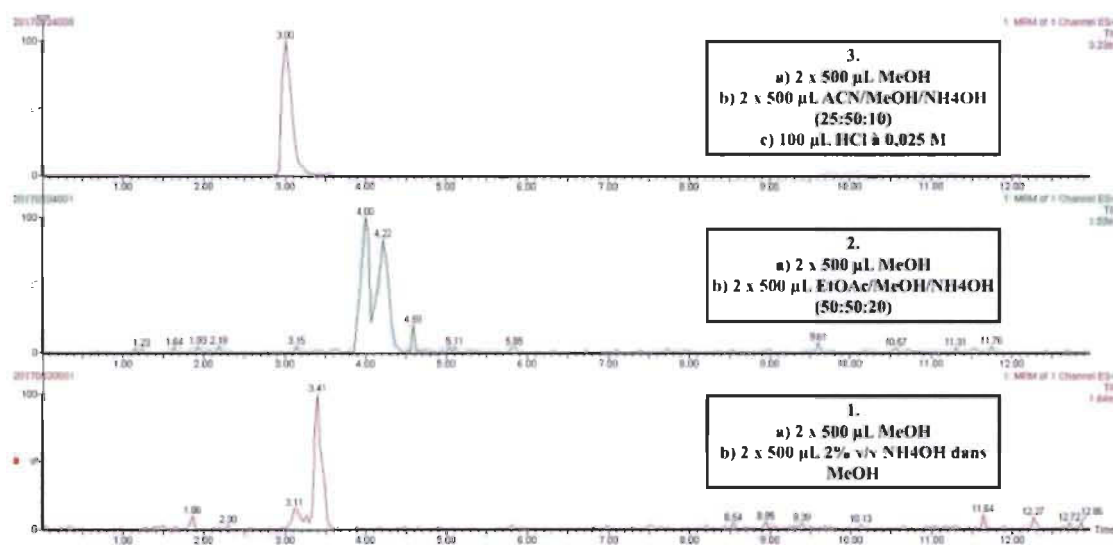


Figure 3.9 Fragmentation par multiples réactions sélectionnées « MRM » du norfentanyl – Optimisation des solutions d'élution SPE.

3.1.7 SPE – Optimisation du pH

L'effet du pH des échantillons sur les signaux obtenus au HPLC-MS/MS a également été étudié. Le tableau 3.5 présente les différents ajustements de pH tentés en fonction des acides utilisés. Les résultats ont finalement démontré que les signaux optimaux étaient obtenus lorsque les échantillons ne subissaient pas d'ajustement de pH (combinaison 5) avant l'extraction sur phase solide, et ce, pour l'ensemble des molécules.

Tableau 3.5
Optimisation du pH des échantillons – Combinaisons testées

Numéro de la combinaison	Acide utilisé/pH obtenu
1	HCl (pH 4)
2	HCl (pH 6)
3	H ₃ PO ₄ (pH 4)
4	H ₃ PO ₄ (pH 6)
5	Aucun

3.2 Paramètres de validation

Afin d'évaluer la performance des protocoles analytiques développés pendant le projet, des tests de validation comportant plusieurs paramètres ont été complétés pour les diverses matrices environnementales rencontrées. Les résultats obtenus pour ces expériences de validation sont résumés dans les sous-sections suivantes.

3.2.1 Eaux de lixiviat

Linéarité

Comme mentionné dans la sous-section 2.5.3, le domaine de linéarité a été défini sur une plage de concentrations allant de 0 à 0,6 mg/L de PPCPs pour cette matrice. Les courbes d'étalonnage obtenues pour les différents PCPPs ciblés sont présentées dans la figure 3.10. Les coefficients de corrélation (R^2) entre 0,9879 et 0,9998 obtenus confirment l'excellente linéarité des régressions. La figure 3.10 permet également d'apprécier la sensibilité de chaque substance en visualisant la pente de chaque régression linéaire. En ce sens, la méthamphétamine possède la pente la plus abrupte avec une valeur de 0,5989 correspondant ainsi au composé le plus sensible.

Inversement, la MDMA se veut le composé le moins sensible pour ce type de matrice avec la plus faible pente d'une valeur de 0,0596.

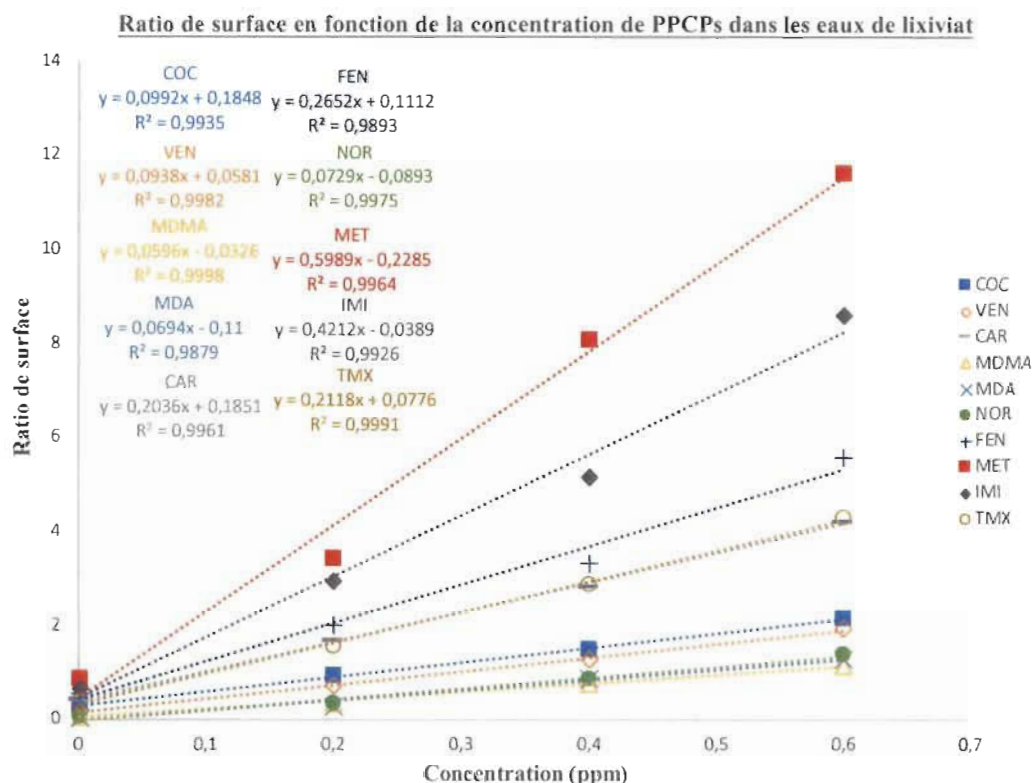


Figure 3.10 Courbes d'étalonnage des PPCPs dans les eaux de lixiviat.

Taux de récupération

Les pourcentages de recouvrement ont été déterminés à l'aide de deux solutions (S_{11} et S_2) faites en triplicata chacune. La préparation et l'extraction de ces solutions a été effectuée comme expliqué dans la sous-section 2.4.1. En ce qui a trait à la solution S_{11} , les PPCPs (concentration dans la solution finale : 0,1 ppm) et les composés deutérés (concentration dans la solution finale : 0,05 ppm) ont été ajoutés directement dans les solutions lors de leur préparation. Les substances contenues dans les solutions S_{11} ont donc subi l'effet de l'extraction sur phase solide. Pour S_2 , ces mêmes substances

ont été ajoutées seulement après l'extraction sur phase solide. De cette manière, il a été possible de calculer des taux de récupération (% TR) pour chaque PPCP suite à la méthode d'extraction sur phase solide :

$$\% \text{ TR} = \frac{\text{Ratio de surface } S_{11} \text{ obtenu}}{\text{Ratio de surface } S_2 \text{ obtenu}} \times 100$$

Le tableau 3.6 présente les taux de récupération obtenus pour chaque PPCP dans les eaux de lixiviat. Les taux de récupération variant entre 92 % et 107 % démontrent l'efficacité du protocole d'extraction sur phase solide développé au cours de ce projet.

Tableau 3.6
Taux de récupération des PPCPs – Eaux de lixiviat

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Taux de récup. n = 3 (%)
COC	304 → 82	92 ± 5
VEN	278 → 58	98 ± 4
CAR	237 → 194	95 ± 5
MDMA	194 → 135	97 ± 4
MDA	180 → 133	98 ± 1
NOR	233 → 84	105 ± 7
FEN	337 → 105	97 ± 1
MET	150 → 91	101 ± 5
IMI	256 → 209	107 ± 5
TMX	292 → 211	104 ± 6

Effets de matrice

Les pourcentages d'effets de matrice ont été obtenus à l'aide de deux solutions (S₁ et S₃) faites en triplicata chacune. Ces solutions ont été préparées comme indiqué dans la sous-section 2.4.1. Ces deux séries de solutions ont été effectuées de la même manière, avec la même concentration de PPCPs (concentration dans la solution finale : 0,1 ppm) et avec la même composition à l'exception du type de matrice utilisé. La matrice pour les solutions S₁ était 1 mL d'eaux de lixiviat alors que celle pour les solutions S₃ était 1 mL d'eau distillée. Suivant les extractions sur phase solide et les analyses au HPLC-MS/MS, l'équation ci-dessous a été appliquée afin de déterminer les effets de matrice (% EM) pour chaque PPCPs :

$$\% \text{ EM} = \frac{\text{Ratio de surface } S_1 \text{ obtenu}}{\text{Ratio de surface } S_3 \text{ obtenu}} \times 100$$

Le tableau 3.7 résume les effets de matrice obtenus pour les différents PPCPs analysés. Une diminution de signal a été observée pour la MDA (-18 %), la méthamphétamine (-8 %) et le thiaméthoxame (-8 %) en présence d'eaux de lixiviat. Cette matrice a eu peu d'impacts sur le signal des molécules suivantes : cocaïne (+1 %), venlafaxine (-1 %), carbamazépine (+1 %), fentanyl (-1 %) et imidaclopride (+4 %). Une augmentation de signal a été obtenue pour la MDMA (9 %) et le norfentanyl (58 %). Face à ces résultats de suppression et de rehaussement non négligeables du signal, nous avons décidé d'opter pour l'utilisation de la méthode des ajouts dosés. Ce choix a été motivé par souci de réduire les effets de matrice et permettre des quantifications fiables et représentatives des échantillons reçus.

Tableau 3.7
Effets de matrice des PPCPs – Eaux de lixiviat

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Effets de matrice n = 3 (%)
COC	304 → 82	101 ± 6
VEN	278 → 58	99 ± 4
CAR	237 → 194	101 ± 4
MDMA	194 → 135	109 ± 7
MDA	180 → 133	82 ± 4
NOR	233 → 84	158 ± 2
FEN	337 → 105	99 ± 7
MET	150 → 91	92 ± 1
IMI	256 → 209	104 ± 5
TMX	292 → 211	92 ± 2

Limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de la méthode ont été estimées à l'aide d'une solution S₄ préparée en triplicata à une concentration de 0,4 ppm (C_{S4}) en PPCPs. Suivant les extractions sur phase solide et les analyses au HPLC-MS/MS, les rapports signal sur bruit (S/N) ont été calculés pour chaque substance. Sachant que les LD et LQ peuvent être estimés à la concentration où le rapport S/N égal à 3 et à 10 respectivement, les règles de trois suivantes ont été appliquées :

$$LD = \frac{3 \times C_{S4}}{S/N \text{ obtenu}}$$

$$LQ = \frac{10 \times C_{S4}}{S/N \text{ obtenu}}$$

Le tableau 3.8 présente les limites de détection et de quantification obtenues pour chaque PPCP.

Tableau 3.8
Limites de détection et de quantification des PPCPs – Eaux de lixiviat

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	LD n = 3 (ppm)	LQ n = 3 (ppm)
COC	304 → 82	0,003	0,010
VEN	278 → 58	0,003	0,009
CAR	237 → 194	0,0006	0,0020
MDMA	194 → 135	0,3	0,9
MDA	180 → 133	0,1	0,6
NOR	233 → 84	0,003	0,008
FEN	337 → 105	0,0004	0,0015
MET	150 → 91	0,10	0,3
IMI	256 → 209	0,011	0,04
TMX	292 → 211	0,004	0,015

Exactitude et précision

L'exactitude et la précision de la méthode ont été vérifiées avec un contrôle qualité préparé en triplicata à une concentration attendue (C_{attendue}) de 0,3 ppm en PPCPs. La concentration calculée ($C_{\text{calculée}}$) a été obtenue grâce aux courbes d'étalonnage de la figure 3.10. L'exactitude, exprimée par l'erreur relative (% ER), a été déterminée pour chaque PPCP suivant l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ ER} = \frac{C_{\text{calculée}} - C_{\text{attendue}}}{C_{\text{attendue}}} \times 100$$

Quant à la précision, elle a été exprimée par un coefficient de variation (% CV) calculée à partir de l'écart-type (s) et de la moyenne (\bar{x}) des trois mesures obtenues pour les contrôles qualité selon l'équation suivante :

$$\% CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Le tableau 3.9 affiche les résultats obtenus pour l'exactitude et la précision de la méthode analytique développée dans les eaux de lixiviat. L'erreur relative inférieure à 8 % et le coefficient de variation inférieur à 9 % pour la majorité des substances indiquent un excellent niveau de fiabilité pour la méthode de quantification des PPCPs dans les eaux de lixiviat.

Tableau 3.9
Exactitude et précision de la méthode analytique – Eaux de lixiviat

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Erreur relative (%)	Précision (% CV)
COC	304 → 82	3	2
VEN	278 → 58	4	2
CAR	237 → 194	6	3
MDMA	194 → 135	7	3
MDA	180 → 133	13	12
NOR	233 → 84	12	7
FEN	337 → 105	8	4
MET	150 → 91	4	2
IMI	256 → 209	4	9
TMX	292 → 211	2	3

3.2.2 Terreaux avec herbacées

Dans cette partie du projet, le devenir des différents PPCPs dans le sol a été évalué en analysant les eaux de lixiviat récoltées suite au phénomène de lessivage de ces substances dans le sol. De ce fait, aucun échantillon de sol exposé aux contaminants n'a été analysé à proprement dit au cours du projet de maîtrise. Toutefois, advenant le cas où les terreaux avec herbacées feraient l'objet de futures études environnementales, nous avons jugé intéressant de valider les paramètres analytiques suivants pour cette matrice.

Taux de récupération

La préparation et l'extraction des solutions S_{11} et S_2 effectuées en triplicata pour évaluer les taux de récupération ont été effectuées comme décrit dans la sous-section 2.4.2. La détermination des taux de récupération a été faite suivant la procédure présentée dans la sous-section 3.2.1.

Les taux de récupération obtenus pour chaque PPCP dans les terreaux avec herbacées sont présentés dans le tableau 3.10. Les résultats variant entre 75 % et 127 % démontrent que la complexité de cette matrice peut engendrer certains effets sur les taux de récupération des PPCPs et donc, qu'ils doivent être tenus en compte lors des analyses dans ce type de matrice.

Tableau 3.10
Taux de récupération des PPCPs – Terreaux avec herbacées

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Taux de récup. n = 3 (%)
COC	304 → 82	105 ± 2
VEN	278 → 58	99 ± 8
CAR	237 → 194	87 ± 3
MDMA	194 → 135	97 ± 4
MDA	180 → 133	127 ± 6
NOR	233 → 84	75 ± 7
FEN	337 → 105	93 ± 3
MET	150 → 91	83 ± 8
IMI	256 → 209	105 ± 10
TMX	292 → 211	82 ± 8

Effets de matrice

La préparation et l'extraction des solutions S₁ et S₃ faites en triplicata pour l'évaluation des effets de matrice ont été effectuées comme indiqué dans la sous-section 2.4.2. Les effets de matrice ont été calculés en suivant la procédure de la sous-section 3.2.1 à raison d'une seule modification. Dans ce cas-ci, les solutions S₁ contenaient 1 mL de terreaux avec herbacées non exposés aux PPCPs et homogénéisés dans une solution tampon HEPES-NaOH.

Le tableau 3.11 résume les effets de matrice obtenus pour chaque PPCP analysé. Il est possible de voir que cette matrice a eu une influence marquée sur les signaux obtenus au HPLC-MS/MS pour la majorité des composés. Plus particulièrement,

une suppression de signal a été observée pour la cocaïne (-27 %), la MDMA (-9 %), le norfentanyl (-26 %) et le thiaméthoxame (-18 %). Une augmentation des signaux a été obtenue pour la carbamazépine (+8 %), la MDA (+94 %) et la méthamphétamine (+20 %). Les autres substances telles que la venlafaxine, le fentanyl et l'imidaclopride n'ont presque pas subi de modifications quant à leurs signaux en présence de la matrice.

Pour tenter de corriger ces importants effets de matrice rencontrés avec l'extraction sur phase solide, des tests ont été complétés en combinant la technique d'extraction liquide-liquide avec la SPE. L'hypothèse de départ était que l'extraction liquide-liquide permettrait dans un premier temps d'extraire les PPCPs neutres (c.-à-d. CAR, IMI et TMX). Dans un deuxième temps, la SPE rendrait possible l'extraction sélective des PPCPs basiques en effectuant des lavages plus agressifs avec 100 % de méthanol. Par conséquent, des interférents présents à l'intérieur de la matrice auraient pu être éliminés et ainsi, les effets de matrice auraient pu être diminués. Finalement, les résultats d'effets de matrice obtenus par combinaison ELL-SPE n'ont pas été améliorés comparativement à ceux obtenus par SPE seule. Le protocole ELL développé nécessitait aussi une certaine quantité de chlorure de sodium pour se départir de la matrice et extraire efficacement les PPCPs neutres. La possibilité d'encrasser le système HPLC-MS/MS à long terme avec le sel utilisé en ELL représentait certainement un enjeu important. De plus, les manipulations supplémentaires pour pratiquer les ELL occasionnaient un certain temps sans obtenir de réelles améliorations quant aux effets de matrice. Pour ces raisons, nous avons finalement décidé d'utiliser le protocole SPE seul tel que présenté dans la sous-section 2.4.2 pour la validation des effets de matrice avec le sol.

Tableau 3.11
Effets de matrice des PPCPs – Terreaux avec herbacées

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Effets de matrice n = 3 (%)
COC	304 → 82	73 ± 5
VEN	278 → 58	98 ± 2
CAR	237 → 194	108 ± 7
MDMA	194 → 135	91 ± 7
MDA	180 → 133	194 ± 13
NOR	233 → 84	74 ± 4
FEN	337 → 105	99 ± 2
MET	150 → 91	120 ± 9
IMI	256 → 209	102 ± 8
TMX	292 → 211	82 ± 7

3.2.3 *Chlorella sp.*

Une validation de méthode exhaustive n'a pas été effectuée complètement pour la matrice *Chlorella sp.*, étant donné que ces microalgues étaient disponibles en quantité limitée. Néanmoins, la linéarité dans la matrice a été validée, ainsi que l'exactitude et la précision.

Linéarité

Le domaine de linéarité défini entre 0 et 0,50 mg/g des différents PPCPs est présenté dans la figure 3.11. Étant donné les coefficients de corrélation supérieurs à 0,9844, il appert que les effets de matrice ont été normalisés par l'utilisation de la méthode des

ajouts dosés. Les pentes des courbes quant à elles ont permis de démontrer que la MDA était le PPCP le plus sensible et inversement, le fentanyl le PPCP le moins sensible dans ce type de matrice.

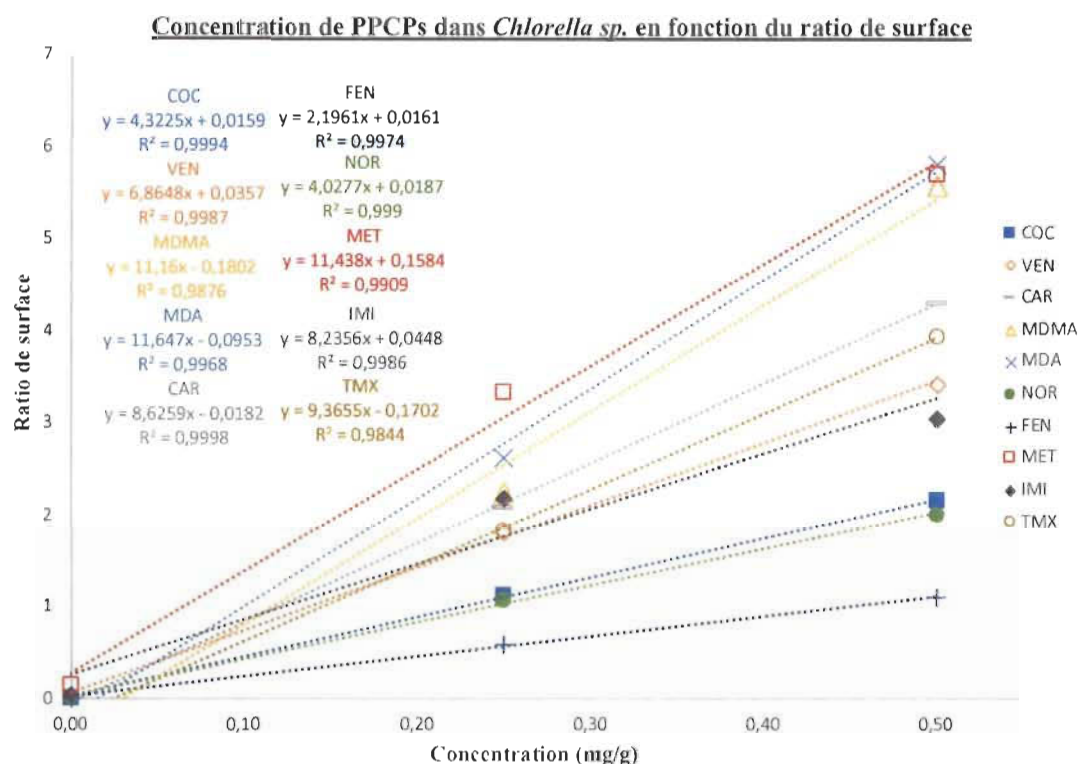


Figure 3.11 Courbes d'étalonnage des PCPPs dans les algues *Chlorella sp.*

Exactitude et précision

L'exactitude de la méthode a été vérifiée avec un contrôle qualité préparé en triplicata à une concentration attendue ($C_{attendue}$) de 0,40 mg/g. La concentration calculée ($C_{calculée}$) a été obtenue grâce aux courbes d'étalonnage de la figure 3.11. L'erreur relative et les coefficients de variation ont été obtenus selon les équations présentées dans la sous-section 3.2.1. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.12. Les erreurs relatives inférieures à 10 % et les coefficients de variation

inférieurs à 8 % obtenus ont démontré à la fois la justesse et la précision de la méthode analytique utilisée pour quantifier les PPCPs dans les microalgues *Chlorella sp.*

Tableau 3.12
Exactitude et précision de la méthode analytique – *Chlorella sp.*

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Erreur relative (%)	Précision (% CV)
COC	304 → 82	10	5
VEN	278 → 58	5	1
CAR	237 → 194	7	3
MDMA	194 → 135	7	1
MDA	180 → 133	9	2
NOR	233 → 84	8	5
FEN	337 → 105	1	8
MET	150 → 91	1	5
IMI	256 → 209	9	2
TMX	292 → 211	8	4

3.2.4 *Daphnia magna*

Linéarité

Comme décrit dans la sous-section 2.5.3, le domaine de linéarité a été évalué sur une étendue de concentration variant de 45 ng/g à 180 ng/g pour cette matrice. La figure 3.12 contient les courbes d'étalonnage obtenues pour la méthamphétamine, le fentanyl, le norfentanyl, l'ecstasy (MDMA) et la MDA. Les coefficients de corrélation (R^2) entre 0,9679 et 0,9940 ont démontré une bonne linéarité de la méthode. La figure 3.12 révèle la grande sensibilité du fentanyl dans ce type de matrice.

Inversement, la plus faible sensibilité parmi toutes les drogues illicites analysées avec ce type de matrice est observée chez la MDA.

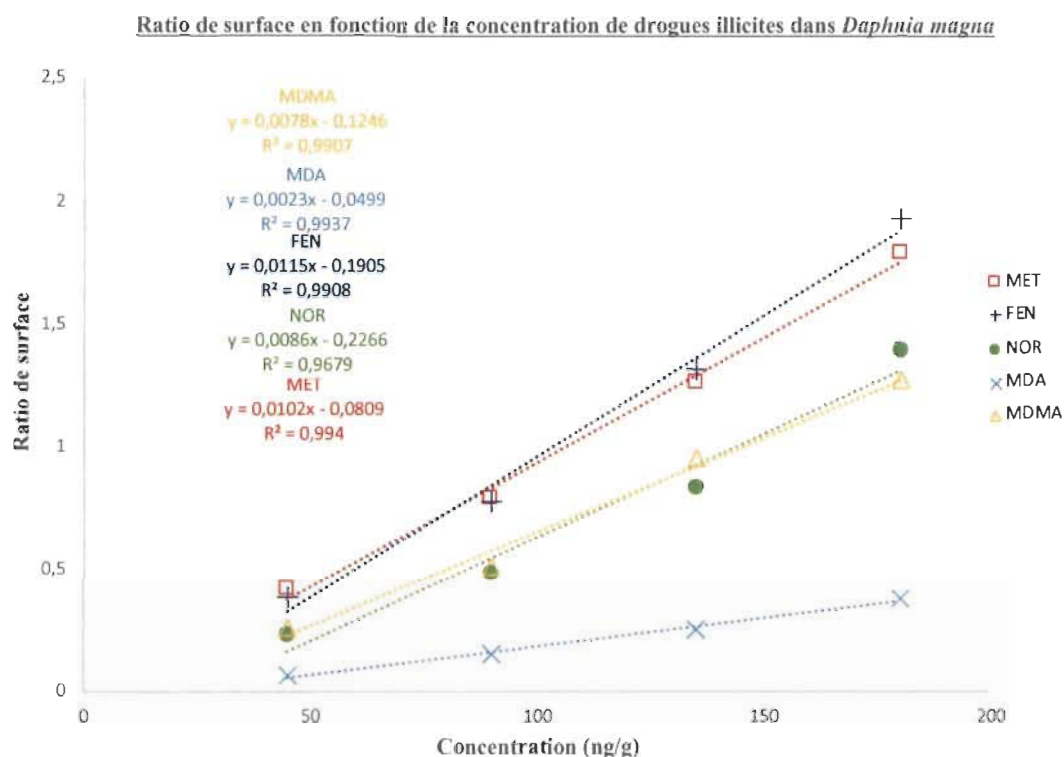


Figure 3.12 Courbes d'étalonnage des drogues illicites dans *Daphnia magna*.

Taux de récupération

La préparation et l'extraction des solutions S₁₁ et S₂ faites en triplicata pour l'évaluation des taux de récupération ont été effectuées comme décrit dans la sous-section 2.4.2. La procédure ayant été utilisée pour déterminer les taux de récupération de chaque drogue illicite dans les tissus biologiques de *Daphnia magna* est celle présentée à la sous-section 3.2.1 à raison d'une seule modification. Dans ce cas, la concentration en drogues illicites dans les solutions finales était de 0,03 ppm.

Comme le montre le tableau 3.13, les taux de recouvrement obtenus variant entre 79 % et 97 % pour la méthamphétamine, le fentanyl et le MDMA sont excellents et démontrent une fois de plus l'efficacité du protocole d'extraction développé pour la matrice *Daphnia magna*. Dans le cas des deux métabolites analysés (c.-à-d. NOR et MDA), les taux de récupération obtenus se sont avérés plus élevés, soit 163 % et 121 % respectivement. Ce phénomène peut être expliqué par un des inconvénients rencontrés lors de l'utilisation d'un instrument HPLC-MS/MS. En effet, les analyses sur ce type d'appareil analytique sont parfois assujetties à la suppression ou au rehaussement du signal dû à la source d'ionisation par électronébulisation [19, 61]. Dans ce cas-ci, nous avons eu recours à l'utilisation d'étalons internes pour normaliser les signaux obtenus et ainsi, atténuer le plus possible les variations produites lors du processus d'ionisation.

Tableau 3.13
Taux de récupération des drogues illicites – *Daphnia magna*

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Taux de récup. n = 3 (%)
MET	150 → 91	79 ± 8
FEN	337 → 105	97 ± 7
NOR	233 → 84	163 ± 79
MDMA	194 → 105	90 ± 16
MDA	180 → 105	121 ± 37

Effets de matrice

La préparation et l'extraction des solutions S₁ et S₃ faites en duplicata chacune pour l'évaluation des effets de matrice ont été effectuées comme décrit dans la sous-section 2.4.2. La procédure ayant été utilisée pour déterminer les effets de matrice

de chaque drogue illicite dans tissus biologiques de *Daphnia magna* est celle présentée à la sous-section 3.2.1 hormis deux modifications. Dans le cas présent, la concentration de drogues illicites dans les solutions finales était de 0,03 ppm et la matrice utilisée pour les solutions S₁ était 1 mL de *Daphnia magna* non exposées aux drogues illicites et homogénéisées dans une solution tampon Hepes-NaOH.

Le tableau 3.14 présente les effets de matrice obtenus pour chaque drogue illicite. Une suppression de signal de 25 % et de 14 % est observable pour les deux métabolites analysés (NOR et MDA respectivement) en présence de la matrice *Daphnia magna*. En ce qui a trait aux autres substances, il s'avère que les daphnies ne causent pas ou très peu d'interférences au niveau du signal obtenu pour la méthamphétamine, le fentanyl et la MDMA lors des analyses par HPLC-MS/MS.

Tableau 3.14
Effets de matrice des drogues illicites – *Daphnia magna*

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Effets de matrice n = 2 (%)
MET	150 → 91	100
FEN	337 → 105	98
NOR	233 → 84	75
MDMA	194 → 105	101
MDA	180 → 105	86

Limites de détection et de quantification

Les limites de détection et de quantification pour cette matrice ont été estimées de la même manière que présentée dans la sous-section 3.2.1, sauf que ces LD et LQ ont été déterminées avec une solution S₄ préparée en triplicata à une concentration de 80 ng/g

en drogues illicites. Les limites de détection et de quantification obtenues pour chaque drogue illicite figurent dans le tableau 3.15.

Tableau 3.15

Limites de détection et de quantification des drogues illicites – *Daphnia magna*

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	LD n = 3 (ng/g)	LQ n = 3 (ng/g)
MET	150 → 91	3	10
FEN	337 → 105	4	13
NOR	233 → 84	3	10
MDMA	194 → 105	6	20
MDA	180 → 105	17	58

Exactitude et précision

L'exactitude de la méthode a été vérifiée avec un contrôle qualité préparé en triplicata à une concentration attendue ($C_{attendue}$) de 50 ng/g en drogues illicites. La concentration calculée ($C_{calculée}$) a été obtenue grâce aux courbes d'étalonnage de la figure 3.12. L'erreur relative et les coefficients de variation pour chaque drogue illicite ont été obtenus selon les équations présentées dans la sous-section 3.2.1.

Comme en témoigne le tableau 3.16, la justesse et la précision de la méthode développée pour quantifier les drogues illicites dans les tissus de daphnies sont assez bonnes avec des erreurs relatives inférieures à 10 % et des coefficients de variation inférieurs à 5 % pour la majorité des substances.

Tableau 3.16

Exactitude et précision de la méthode analytique – *Daphnia magna*

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Erreur relative (%)	Précision (% CV)
MET	150 → 91	10	2
FEN	337 → 105	22	1
NOR	233 → 84	8	2
MDMA	194 → 105	7	5
MDA	180 → 105	10	11

3.3 Devenir des PPCPs dans des terreaux avec herbacées

Notre choix d'évaluer le devenir des PPCPs dans le sol repose sur le fait que les boues usées sont parfois encore utilisées comme engrais d'épandage dans le milieu agricole. Sachant que les contaminants émergents contenus dans ces boues épandues ne sont pas entièrement dégradés, nous voulions déterminer le pouvoir de captation ou de dégradation du sol pour ces possibles substances relâchées. Pour ce faire, le suivi des PPCPs sélectionnés a été assuré en analysant avec les méthodes développées dans ce projet de maîtrise les eaux de ruissellement récoltées suite à l'épandage d'un effluent synthétique sur un sol travaillé lors des saisons printemps (P) et automne (A) 2017 et 2018.

Les concentrations de PPCPs détectées dans les eaux de lixiviat du printemps 2017 et du printemps 2018 sont présentées dans le tableau 3.17. Au printemps 2017, les substances venlafaxine, fentanyl et méthamphétamine ont été détectés et quantifiés dans les eaux de lixiviat du printemps 2017 à des concentrations respectives de 0,018, 0,0117 et 0,013 mg/L. Dans les échantillons du printemps 2018, seule la carbamazépine a été détectée à 0,02313 mg/L. Ces quatre substances retrouvées dans les eaux de

ruissellement indiquent qu'elles possèdent un certain potentiel de lessivage et peuvent percoler dans les sols. Par conséquent, leur mobilité dans cette matrice biologique fait en sorte qu'elles sont susceptibles de contaminer les eaux souterraines et de surface. De manière générale, ces résultats démontrent que la plupart des substances ont été dégradées et/ou prises en charge par certaines composantes du sol. Bien que la compréhension de ce phénomène demeure multifactorielle, l'affinité des composés pour le sol et le pH de ce dernier peuvent faire partie des causes qui expliquent l'absence de ces substances dans les eaux de lixiviat. Chose certaine, de futurs travaux de recherche pourraient apporter davantage de réponses à cette hypothèse avancée.

Tableau 3.17
Concentrations en PPCPs détectées dans les eaux de lixiviat
au printemps 2017 et 2018

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Concentration P-2017 (ppm) (n = 3)	Concentration P-2018 (ppm) (n = 3)
COC	304 → 82	0	0
VEN	278 → 58	0,018 ± 0,001	0
CAR	237 → 194	0	0,02313 ± 0,00005
MDMA	194 → 135	0	0
MDA	180 → 133	0	0
NOR	233 → 84	0	0
FEN	337 → 105	0,0117 ± 0,0003	0
MET	150 → 91	0,013 ± 0,001	0
IMI	256 → 209	0	0
TMX	292 → 211	0	0

Pour ce qui est des lixiviats récoltés en automne, aucun PPCP n'a été détecté autant en 2017 qu'en 2018. Des variations saisonnières similaires ont été observées et rapportées par Li *et al.* dans la littérature [44]. Comme l'expliquent Xu *et al.* dans leur article, les températures plus élevées en automne comparativement au printemps facilitent et augmentent la biodégradation des xénobiotiques dans le sol [44, 103]. Il faut également mentionner que l'activité microbienne est plus importante en automne qu'au printemps, faisant en sorte que les PPCPs pourraient être davantage dégradés [44, 104, 105].

Ces résultats obtenus suivant l'épandage de PPCPs sur un sol travaillé suggèrent que le risque de contamination lié au ruissellement des substances dans le sol est plus élevé au printemps. En effet, selon nos expérimentations, quelques substances réussissent à percoler le sol au printemps et sont susceptibles de contaminer les eaux souterraines et les eaux de surface lors de ruissellements.

3.4 Évaluation de la performance de phycoremédiation des algues *Chlorella sp.*

Comme il a déjà été mentionné dans la sous-section 3.2.3, le but de cette partie du projet de maîtrise consistait à entamer certains travaux préliminaires sur la décontamination des eaux par phycoremédiation à partir d'algues *Chlorella sp.* exposées sous des conditions contrôlées.

Pour ce faire, les algues ont été exposées pendant 10 jours à un effluent synthétique composé de PPCPs avant de subir une extraction et une quantification des substances par HPLC-MS/MS. La durée de l'exposition a été choisie sur la base d'expérimentations qui nous ont permis de suivre la croissance des microalgues. La figure 3.13 illustre la courbe de croissance microalgale obtenue en fonction du temps. Comme on l'observe, *Chlorella sp.* a subi une phase de latence de 0 à 1 jour qui s'explique par une acclimatation aux nouvelles conditions de culture [106].

Ensuite, nous avons assisté à la phase exponentielle où la vitesse de croissance des microalgues fut maximale (du 1^{er} au 8^e jour). Puis, du 8^e au 10^e jour, la phase stationnaire a été atteinte. Cette dernière s'est traduite par la diminution de la vitesse de croissance et par une concentration cellulaire constante [106]. De par ce suivi de croissance, nous avons jugé que 10 jours étaient suffisants pour l'exposition des algues aux différents PPCPs.

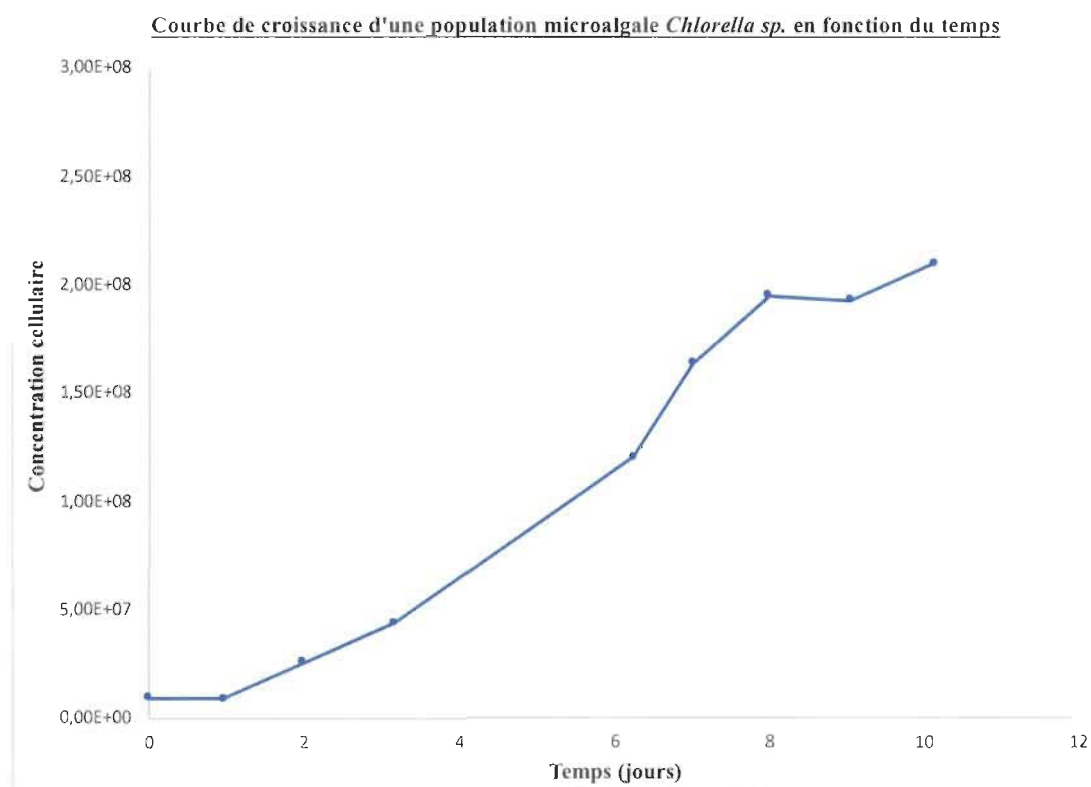


Figure 3.13 Courbe de croissance des algues *Chlorella sp.* en fonction du temps.

Les résultats obtenus suite aux expositions des algues sont présentés dans le tableau 3.18. La venlafaxine, la carbamazépine, le norfentanyl et le fentanyl sont les quatre substances qui ont été détectées dans les échantillons d'algues exposées aux

PPCPs. Malheureusement, 2 % et moins de la dose initiale de PPCPs a été retrouvée dans les extraits d'algues pour ces composés.

Plusieurs facteurs doivent être pris en compte lors d'expérimentations réalisées avec des organismes vivants. Dans notre cas, des précautions avaient été prises préalablement en supposant qu'un phénomène physico-chimique passif tel que l'adsorption extracellulaire pourrait se produire avec les microalgues [107]. Comme mentionné dans la sous-section 2.3.1, le milieu de culture a été retiré des échantillons avant leur extraction et des lavages successifs à l'eau déminéralisée ont été faits. Des tests ont également été menés pour vérifier le taux de dégradation des PPCPs dans le milieu de culture seul. Pour ce faire, les PPCPs ont été ajoutés dans le milieu de culture sans algues en utilisant les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées lors des expositions et pendant la même durée. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.19. Ainsi, certains PPCPs tels que COC, CAR, NOR, FEN et IMI ont subi de la dégradation dans le milieu de culture. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette observation comme l'utilisation de la lumière lors des expositions, une précipitation des substances, une sensibilité de ces dernières à la température ou les propriétés physicochimiques des composés. Quoi qu'il en soit, des expérimentations plus poussées seraient pertinentes pour déterminer les causes exactes de ces pertes de substances dans le temps.

L'interprétation des concentrations détectées dans les échantillons de *Chlorella sp.* demeure relativement complexe si on tient compte de la dégradation des PPCPs dans le milieu de culture. Il faut aussi mentionner qu'aucun autre moyen n'a permis de déterminer s'il s'agissait réellement d'une bioaccumulation dans les algues ou d'une adsorption au niveau de leurs parois. En effet, aucun métabolite de VEN ou de CAR n'a été détecté qui aurait pu prouver leur bioaccumulation dans les microalgues.

Sur la base de ces résultats préliminaires, le pouvoir de phycoremédiation de *Chlorella sp.* pour les substances VEN, CAR, NOR et FEN demeure pour l'instant limité avec moins de 2 % de la dose initiale enlevée. Enfin, des études davantage approfondies incluant l'optimisation des conditions expérimentales seraient intéressantes dans un futur projet de recherche afin de mieux comprendre et évaluer le réel potentiel de phycoremédiation de ces microalgues.

Tableau 3.18
Concentrations en PPCPs détectées dans les échantillons *Chlorella sp.*

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Concentration (mg/g) (n = 4)
COC	304 → 82	0
VEN	278 → 58	0,0039 ± 0,0003
CAR	237 → 194	0,0040 ± 0,0003
MDMA	194 → 135	0
MDA	180 → 133	0
NOR	233 → 84	0,0038 ± 0,0004
FEN	337 → 105	0,0068 ± 0,0003
MET	150 → 91	0
IMI	256 → 209	0
TMX	292 → 211	0

Tableau 3.19
Taux de dégradation des PPCPs après 10 jours dans le milieu de culture

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Taux de dégradation (%)
COC	304 → 82	34
VEN	278 → 58	0
CAR	237 → 194	9
MDMA	194 → 135	0
MDA	180 → 133	0
NOR	233 → 84	2
FEN	337 → 105	11
MET	150 → 91	0
IMI	256 → 209	8
TMX	292 → 211	0

3.5 Bioaccumulation par l'organisme aquatique *Daphnia magna*

Des expérimentations complémentaires ont été menées avec l'organisme modèle *Daphnia magna* dans le but d'étudier la possible bioaccumulation et le devenir de certaines drogues illicites dans les tissus de cet organisme aquatique. Pour ce faire, des expositions contrôlées à des solutions de substances ciblées ont été réalisées. Le tableau 3.20 présente les concentrations détectées suivant ces expositions. Il est possible de voir qu'une bioaccumulation a eu lieu dans les tissus de daphnies pour la plupart des drogues illicites à l'étude, et ce, entre 35 et 59 ng/g. De manière générale, on a observé que la concentration du métabolite principal du fentanyl (c.-à-d. NOR) dans les tissus était moins élevée que celle du fentanyl démontrant une excrétion plus importante du norfentanyl par les daphnies. En ce qui a trait à l'absence de MDA dans

les tissus biologiques, celle-ci pourrait s'expliquer par la polarité un peu plus grande de la molécule comparativement à celle de la molécule mère MDMA. En effet, le groupement méthyle ajouté sur l'atome d'hydrogène de la molécule de MDMA rend cette dernière moins polaire et plus liposoluble que la MDA. Pour cette raison, la MDMA a davantage tendance à se bioaccumuler dans les tissus que son principal métabolite MDA [108].

Tableau 3.20

Concentrations en drogues illicites détectées dans les tissus de *Daphnia magna*

Nom molécule	Transition MRM (m/z)	Concentration (ng/g)
MET	150 → 91	35
FEN	337 → 105	47
NOR	233 → 84	38
MDMA	194 → 105	59
MDA	180 → 105	0

Afin de vérifier si les résultats obtenus correspondaient réellement à une bioaccumulation par les daphnies, un extrait provenant des volumes d'eaux des expositions a été injecté au HPLC-MS/MS en mode « Daughters ». De cette analyse, il a été possible de caractériser le métabolite 4-hydroxyméthamphétamine qui n'était pas présent initialement dans le mélange de drogues illicites utilisé pour les expositions. En d'autres mots, cette détection du métabolite augmente la spécificité des résultats obtenus. Elle permet également de confirmer que les daphnies exposées à la méthamphétamine ont bien bioaccumulé cette substance, mais en ont utilisé une partie pour la biotransformer en 4-hydroxyméthamphétamine. La figure 3.14 présente le spectre de masse qui a permis l'identification de ce métabolite.

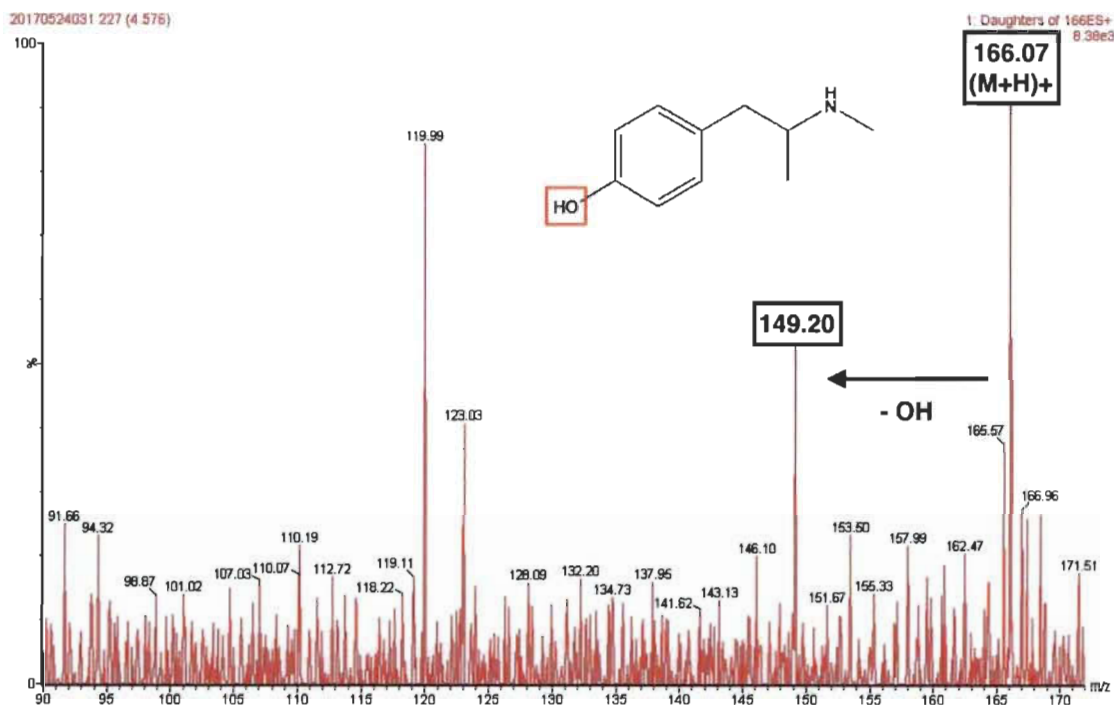


Figure 3.14 Spectre de masse du métabolite 4-hydroxyméthamphétamine.

Ces résultats de bioaccumulation ont permis de confirmer qu'un risque de toxicité de ces contaminants était bien réel et qu'il pourrait s'exercer chaque jour sur les organismes aquatiques exposés. La bioaccumulation observée avec le métabolite norfentanyl a aussi prouvé qu'il y avait possibilité de toxicité encore plus sévère sachant que certains métabolites peuvent exercer des effets davantage toxiques que leurs molécules mères [18, 20]. Ajoutons à cela le caractère chronique d'exposition des organismes aux différents contaminants. Également, le cocktail de substances pouvant être retrouvé dans l'environnement en même temps et qui peut parfois résulter en des effets toxiques additifs et synergiques [4, 20, 35, 40, 57]. Bref, il n'est pas sans dire qu'il pourrait exister des risques importants liés à l'exposition des organismes aux contaminants et qu'une attention particulière devrait être portée au risque de bioaccumulation pour tenter de mieux comprendre cette réalité et prévenir avec des procédés d'épuration plus efficaces envers les PPCPs.

CONCLUSION

À ce jour, plusieurs études rapportent la présence de produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPCPs) dans les effluents municipaux. Puisque les stations d'épuration conventionnelles possèdent un taux d'enlèvement limité de ces substances, ces dernières retrouvées à différentes concentrations dans les effluents sont déversées quotidiennement dans l'environnement aquatique où elles menacent les écosystèmes aquatiques avec de possibles effets toxiques chroniques. Ainsi cette problématique force la communauté scientifique à réfléchir quant au développement de nouveaux procédés plus performants et écologiques pour réduire la charge en contaminants dans les eaux usées.

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous avons pu développer et optimiser avec succès des méthodes analytiques performantes permettant d'extraire sélectivement et efficacement des PPCPs à l'état de trace dans des matrices environnementales complexes liquides (c.-à-d. effluents synthétiques et lixiviats) et solides (c.-à-d. terreaux avec herbacées, microalgues et crustacés). Une plateforme analytique a également été développée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) pour détecter de manière spécifique et sensible les PPCPs dans les matrices mentionnées. Afin d'obtenir les meilleurs résultats escomptés, de nombreuses optimisations ont été réalisées tant au niveau des protocoles SPE que ceux au HPLC-MS/MS. Précisément, les solutions de reconstitution d'extraits, les solutions de lavage et d'élution et le pH ont été optimisés pour les protocoles SPE. L'optimisation au HPLC-MS/MS a été effectuée pour la composition des phases mobiles utilisées, leur proportion, le débit, le temps d'analyse, les fragments de

quantification et de confirmation et les conditions de la source d'ionisation du spectromètre de masse. Des efforts ont été déployés tout au long du projet de maîtrise pour démontrer la performance des nouveaux protocoles analytiques développés, soit en complétant des tests de validation avec chaque matrice étudiée. De plus, des paramètres de validation tels que la linéarité, le taux de récupération, les effets de matrice, les limites de détection et de quantification, l'exactitude et la précision ont été évalués.

À l'aide des méthodes analytiques validées, nous avons pu faire la lumière sur le pouvoir d'épuration de deux matrices environnementales, soit avec un sol travaillé ELAPS et avec l'espèce d'algues *Chlorella sp.* Dans le premier cas, les expositions du sol à un effluent synthétique ont permis la récolte d'eaux de ruissellement aux printemps 2017 et 2018. Ces eaux de lixiviat contenaient entre 0,0117 mg/L et 0,02313 mg/L de certains PPCPs. Selon ces résultats, il a été possible d'affirmer qu'il existait un risque de toxicité lié au ruissellement de ces substances dans le sol. En effet, selon nos expérimentations, il a été démontré que quelques substances réussissaient à percoler dans le sol et étaient susceptibles de contaminer les eaux souterraines et de surface. En ce qui a trait aux lixiviats récoltés en automne 2017 et 2018, aucun PPCP n'a été détecté suggérant qu'une biodégradation des substances pouvait se produire dans le sol lorsque la température extérieure était plus élevée. En ce sens, ces résultats laissent croire que le risque de toxicité concernant les sols serait davantage prononcé au printemps. En ce qui concerne *Chlorella sp.*, des tests ont également été accomplis et ont révélé une dégradation de certains PPCPs dans le milieu de culture rendant l'interprétation des résultats relativement complexe. Cependant, sur la base de nos résultats préliminaires, il s'est avéré que cette espèce de microalgues présentait pour l'instant des capacités limitées de phycoremédiation lors d'une exposition à des PPCPs. En effet, seulement quatre des substances analysées ont été détectées avec des concentrations qui variaient entre 0,0038 mg/g et 0,0068 mg/g, équivalant à moins de 2 % de la dose initiale enlevée.

Finalement, une étude complémentaire a été complétée à partir de tests *in vivo* avec des petits crustacés *Daphnia magna* pour vérifier leur potentiel de captation pour certaines drogues illicites sélectionnées. Entre autres, des concentrations variant entre 35 ng/g et 59 ng/g ont été détectées pour les drogues illicites méthamphétamine, fentanyl, norfentanyl et MDMA dans les tissus de daphnies démontrant un possible risque de toxicité des contaminants sur les organismes aquatiques. L'absence de MDA dans les tissus de daphnies a permis de soulever une hypothèse impliquant une certaine sélectivité par la polarité de la molécule mère MDMA versus celle de MDA. En effet, le groupement méthyle ajouté sur l'atome d'hydrogène de la molécule de MDMA rend cette dernière moins polaire et plus liposoluble que la MDA. Pour cette raison, la MDMA semble avoir davantage tendance à se bioaccumuler dans les tissus que son principal métabolite MDA. Ensuite, la présence du métabolite norfentanyl dans les tissus de daphnies a prouvé qu'une écotoxicité encore plus importante pourrait être possible dans l'environnement, puisque certains métabolites sont davantage toxiques que les molécules mères. Finalement, une confirmation d'absorption et de biotransformation de méthamphétamine par les daphnies a été prouvée par la détection et la caractérisation d'un nouveau métabolite (c.-à-d. 4-hydroxyméthamphétamine) initialement absent de l'effluent synthétique.

En dépit des résultats intéressants obtenus tout au long de ce projet de maîtrise, ces travaux ouvrent la porte à d'autres expériences importantes. Entre autres, le type d'approche employé au cours de cette maîtrise pourrait s'appliquer à d'autres champs d'application notamment en chimie, en écotoxicologie et dans le domaine agricole. Plus particulièrement, des mytilidés comme les mollusques bivalves par exemple, qui sont caractérisés comme une espèce bioaccumulatrice [38], pourraient faire l'objet d'études similaires afin de faire le suivi de substances toxiques dans ces organismes. Des études en écotoxicologie pourraient aussi être menées en parallèle afin de déterminer la nature des effets toxiques exercés et avoir une meilleure compréhension des enjeux environnementaux liés à ces substances. Dans le milieu agricole, les sols

pourraient également être analysés en adoptant ce type d'approche pour faire la biosurveillance des produits épandus sur les terres agricoles.

Dans l'éventualité d'une suite pour ce projet de maîtrise, il serait intéressant de compléter des tests de toxicité avec des daphnies préalablement exposées à d'autres PPCPs. De cette manière, les effets toxiques pourraient être mieux connus et des normes adaptées pourraient être émises pour protéger davantage l'environnement aquatique. Des expérimentations pourraient également être menées en nourrissant un autre organisme aquatique à des daphnies ayant été préalablement exposées à des PPCPs pour vérifier le transfert des contaminants par la chaîne trophique. Finalement, dans un contexte d'investigation en chimie environnementale forensique, les daphnies pourraient aussi être utilisées lors d'enquêtes dans les milieux aquatiques. Précisément, elles pourraient agir comme « témoins silencieux » en bioaccumulant les substances lorsque des déversements illégaux de produits chimiques sont pratiqués par des compagnies dans les cours d'eau. Au niveau des microalgues, des études plus approfondies incluant l'optimisation des conditions expérimentales seraient intéressantes afin de pouvoir évaluer le réel potentiel de phycoremédiation des microalgues.

BIBLIOGRAPHIE

1. Daghrir, R., P. Drogui, and M.A. El Khakani, *Une nouvelle avenue de traitement des polluants organiques persistants*. Vecteur Environnement, 2014. **47**(5): p. 52.
2. Amiard, J.-C., *Les sources de pollution*, in *Les risques chimiques environnementaux : Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes*. 2011, Lavoisier: Paris. p. 79-108.
3. Chen, F., Z. Gong, and B.C. Kelly, *Rapid analysis of pharmaceuticals and personal care products in fish plasma micro-aliquots using liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2015. **1383**: p. 104-111.
4. Ministère de l'Environnement et de la lutte contre les changements climatiques. *Bilan des ventes de pesticides au Québec 2016*. 2016; Available from: <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/pesticides/bilan/index.htm>
5. Marsalek, J., *Pharmaceuticals and personal care products (PPCP) in Canadian urban waters: a management perspective*, in *Dangerous pollutants (xenobiotics) in urban water cycle*. 2008, Springer. p. 117-130.
6. Cunningham, V.L., et al., *Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps*. 2006, ACS Publications.
7. Halling-Sørensen, B., et al., *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review*. Chemosphere, 1998. **36**(2): p. 357-393.
8. Lajeunesse, A., et al., *Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada*. Water research, 2012. **46**(17): p. 5600-5612.

9. Qin, Q., X. Chen, and J. Zhuang, *The fate and impact of pharmaceuticals and personal care products in agricultural soils irrigated with reclaimed water*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2015. **45**(13): p. 1379-1408.
10. Yan, Q., et al., *Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the largest municipal wastewater treatment plant in Southwest China: mass balance analysis and consumption back-calculated model*. Chemosphere, 2014. **99**: p. 160-170.
11. Miege, C., et al., *Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants—conception of a database and first results*. Environmental Pollution, 2009. **157**(5): p. 1721-1726.
12. Arp, H.P.H., *Emerging decontaminants*. 2012, ACS Publications.
13. Berryman, D., *Concentrations de médicaments, d'hormones et de quelques autres contaminants d'intérêt émergent dans le Saint-Laurent et dans trois de ses tributaires*. 2014: Plan d'action Saint-Laurent 2011-2026.
14. Ternes, T.A., A. Joss, and H. Siegrist, *Peer reviewed: scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment*. 2004, ACS Publications.
15. Newbold, K.B., J. Eyles, and M. McKeary, *Chemicals of concern in Ontario—update 2007 emerging contaminant issues*. 2007.
16. Cummins, J. *Des cocktails pharmaceutiques pour tout un chacun à partir de l'eau polluée*. 2013; Available from: <http://www.ec.gc.ca/stl/default.asp?lang=Fr&n=27b606bd-1>
17. Giroux, I., S. Hébert, and D. Berryman, *Qualité de l'eau du Saint-Laurent de 2000 à 2014 : paramètres classiques, pesticides et contaminants émergents*. Le Naturaliste Canadien, 2016. **140**(2): p. 26-34.
18. Boxall, A.B., et al., *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions?* Environmental health perspectives, 2012. **120**(9): p. 1221.

19. Canada Environnement Canada, Institut national de recherche sur les eaux, and S. Kleywegt, *Produits pharmaceutiques et de soins personnels dans l'environnement au Canada : directions de la recherche et des politiques*. 2007, Burlington, Ont.: Environnement Canada.
20. Corcoran, J., M.J. Winter, and C.R. Tyler, *Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish*. Critical reviews in toxicology, 2010. **40**(4): p. 287-304.
21. Trudeau, V.L., et al., *Pharmaceuticals in the environment: Drugged fish?*, in *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. 2005, Elsevier. p. 475-493.
22. Hinkle, S.J., et al., *Organic wastewater compounds, pharmaceuticals, and coliphage in ground water receiving discharge from onsite wastewater treatment systems near La Pine, Oregon: Occurrence and implications for transport*. 2005, U. S. Geological Survey.
23. Domagalski, J., K. Belitz, and E. Furlong. *Occurrence of pharmaceutical and other organic compounds in ground water in ten regions of California, USA*. in *AGU Spring Meeting Abstracts*. 2007.
24. Weigel, S., et al., *Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites*. Chemosphere, 2004. **56**(6): p. 583-592.
25. Watts, C., et al., *Desk based review of current knowledge on pharmaceuticals in drinking water and estimation of potential levels*. Defra Project Code: CSA 7184. 2007, WT02046/DW170/2/213. Watts & Crane, London.
26. Schlumpf, M., et al., *Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: correlation of UV filters with use of cosmetics*. Chemosphere, 2010. **81**(10): p. 1171-1183.
27. Yin, J., et al., *The occurrence of synthetic musks in human breast milk in Sichuan, China*. Chemosphere, 2012. **87**(9): p. 1018-1023.
28. Kannan, K., et al., *Polycyclic musk compounds in higher trophic level aquatic organisms and humans from the United States*. Chemosphere, 2005. **61**(5): p. 693-700.

29. Díaz-Cruz, S. and D. Barceló, *Personal Care Products in the Aquatic Environment*, ed. D. Barceló and A.G. Kostianoy. 2015, Espagne: Springer. 413.
30. Asimakopoulos, A.G., N.S. Thomaidis, and K. Kannan, *Widespread occurrence of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), benzophenone type-UV filters, triclosan, and triclocarban in human urine from Athens, Greece*. *Science of the total environment*, 2014. **470**: p. 1243-1249.
31. Frederiksen, H., et al., *Bisphenol A and other phenols in urine from Danish children and adolescents analyzed by isotope diluted TurboFlow-LC-MS/MS*. *International journal of hygiene and environmental health*, 2013. **216**(6): p. 710-720.
32. Geens, T., H. Neels, and A. Covaci, *Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain*. *Chemosphere*, 2012. **87**(7): p. 796-802.
33. Darbre, P., et al., *Concentrations of parabens in human breast tumours*. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 2004. **24**(1): p. 5-13.
34. Gros, M., M. Petrović, and D. Barceló, *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*, 2006. **70**(4): p. 678-690.
35. La Farre, M., et al., *Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2008. **27**(11): p. 991-1007.
36. Brooks, B.W. and D.B. Huggett, *Human Pharmaceuticals in the Environment: Current and Future Perspectives*. 2012: Springer. 304 p.
37. Nichols, J.W., et al., *Bioaccumulation assessment using predictive approaches*. *Integrated Environmental Assessment and Management: An International Journal*, 2009. **5**(4): p. 577-597.
38. Bachelot, M., *Contamination de moules (Mytilus sp.) en milieu marin par des substances pharmaceutiques et produits de soin, Mussels (Mytilus sp.) contamination in marine environment by pharmaceutical substances and care products*. 2010, Université Montpellier 1.

39. Andral, B., et al., *Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging*. Marine Pollution Bulletin, 2004. **49**(9-10): p. 704-712.
40. Orias, F. and Y. Perrodin, *Pharmaceuticals in hospital wastewater: their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent*. Chemosphere, 2014. **115**: p. 31-39.
41. Guerra, P., et al., *Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes*. Science of the Total Environment, 2014. **473**: p. 235-243.
42. Brausch, J.M. and G.M. Rand, *A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity*. Chemosphere, 2011. **82**(11): p. 1518-1532.
43. Faqi, A.S., *A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development*. 2012: Academic Press.
44. Li, W., et al., *Occurrence and removal of antibiotics in a municipal wastewater reclamation plant in Beijing, China*. Chemosphere, 2013. **92**(4): p. 435-444.
45. Verlicchi, P., et al., *Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment*. Science of the total environment, 2012. **430**: p. 109-118.
46. Acuña, V., et al., *Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example*. Environment international, 2015. **85**: p. 327-333.
47. Lahti, M., et al., *Uptake from water, biotransformation, and biliary excretion of pharmaceuticals by rainbow trout*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2011. **30**(6): p. 1403-1411.
48. Schwaiger, J., et al., *Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout*. Aquatic Toxicology, 2004. **68**(2): p. 141-150.

49. Huerta, B., et al., *Development of an extraction and purification method for the determination of multi-class pharmaceuticals and endocrine disruptors in freshwater invertebrates*. Talanta, 2015. **132**: p. 373-381.
50. Lacey, C., et al., *An LC-MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples*. Talanta, 2008. **75**(4): p. 1089-1097.
51. Schulze, T., et al., *Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis*. Environmental Pollution, 2010. **158**(5): p. 1461-1466.
52. Brooks, B.W., et al., *Aquatic ecotoxicology of fluoxetine*. Toxicology letters, 2003. **142**(3): p. 169-183.
53. Gagné, F., et al., *Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2006. **143**(2): p. 179-186.
54. Aravindakshan, J., et al., *Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*)*. Toxicological sciences, 2004. **78**(1): p. 156-165.
55. Blaise, C., et al., *Experimentally-induced feminisation of freshwater mussels after long-term exposure to a municipal effluent*. Fresenius Environmental Bulletin, 2003. **12**(8): p. 865-870.
56. Tan, E.S.S., et al., *Simultaneous extraction and determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in river water and sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2015. **95**(9): p. 816-832.
57. Jjemba, P.K., *Pharma-ecology the occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products in the environment*. 2008, Hoboken, N.J.: Wiley. Une ressource en ligne (xi, 314 pages).
58. Cleuvers, M., *Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects*. Toxicology letters, 2003. **142**(3): p. 185-194.

59. Renou, S., *Analyse de cycle de vie appliquée aux systèmes de traitement des eaux usées*. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006: p. 258.
60. Malik, O., *Primary vs. secondary: types of wastewater treatment*. Environmental Performance Index. January, 2014. **22**.
61. Soulier, C., et al., *Zoom sur les substances pharmaceutiques: présence, partition, devenir en station d'épuration*. Techniques Sciences Methodes-Genie Urbain Genie Rural, 2011(1): p. 63.
62. Schwarzenbach, R., *General introduction and sorption processes involving organic matter*. Environmental organic chemistry, 2003: p. 275-330.
63. Ternes, T.A., et al., *A rapid method to measure the solid–water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge*. Water research, 2004. **38**(19): p. 4075-4084.
64. Carballa, M., et al., *Determination of the solid–water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge*. Water research, 2008. **42**(1-2): p. 287-295.
65. Jones, O., N. Voulvoulis, and J. Lester, *Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals*. Water research, 2002. **36**(20): p. 5013-5022.
66. Urase, T. and T. Kikuta, *Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process*. Water research, 2005. **39**(7): p. 1289-1300.
67. Carballa, M., F. Omil, and J.M. Lema, *Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage*. Chemosphere, 2008. **72**(8): p. 1118-1123.
68. Jelic, A., et al., *Tracing pharmaceuticals in a municipal plant for integrated wastewater and organic solid waste treatment*. Science of the total environment, 2012. **433**: p. 352-361.
69. Ternes, T.A., *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers I*. Water research, 1998. **32**(11): p. 3245-3260.

70. Von Gunten, U., *Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine*. Water research, 2003. **37**(7): p. 1469-1487.
71. Bolong, N., et al., *A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal*. Desalination, 2009. **239**(1-3): p. 229-246.
72. Adams, C., et al., *Removal of antibiotics from surface and distilled water in conventional water treatment processes*. Journal of environmental engineering, 2002. **128**(3): p. 253-260.
73. Lenntech BV. *Adsorption / charbon actif*. 1998; Available from: <https://www.lenntech.fr/bibliotheque/adsorption/adsorption.htm>
74. O. Cooney, D., *Adsorption Design for Wastewater Treatment*. 1998: CRC Press. 208.
75. Djouder, H., *Efficacité d'un procédé membranaire pour le traitement*. 2011, Université du Québec à Trois-Rivières. p. 92.
76. Memento degremont de SUEZ. *Séparation par membranes*. Available from: <https://www.suezwaterhandbook.fr/eau-et-generalites/processus-elementaires-du-genie-physico-chimique-en-traitement-de-l-eau/separation-par-membranes/generalites>
77. Yoon, Y., et al., *Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products*. Journal of Membrane Science, 2006. **270**(1-2): p. 88-100.
78. Lin, K. and N.F.Y. TAM, *Phytoremediation using constructed mangrove wetlands: Mechanisms and application potential*, in *Handbook of phytoremediation*. 2011, Nova Science Publisher, Inc.
79. Vidali, M., *Bioremediation. an overview*. Pure and Applied Chemistry, 2001. **73**(7): p. 1163-1172.
80. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie. *La valorisation de la biomasse*. 2007; Available from: <https://www.ademe.fr/valorisation-biomasse>

81. Primel, E., S. Caldas, and A. Escarrone, *Multi-residue analytical methods for the determination of pesticides and PPCPs in water by LC-MS/MS: a review*. Central European Journal of Chemistry, 2012. **10**(3): p. 876-899.
82. Humbert, L. *Extraction en phase solide (SPE): théorie et applications*. in *Annales de Toxicologie Analytique*. 2010. EDP Sciences.
83. Phenomenex. *Strata-X-C General Method for the Extraction of Weak Bases (TN-0026)*. Available from:
[https://www.phenomenex.com/ViewDocument?id=strata-x-c+general+method+for+the+extraction+of+weak+bases+\(tn-0026\)](https://www.phenomenex.com/ViewDocument?id=strata-x-c+general+method+for+the+extraction+of+weak+bases+(tn-0026))
84. Phenomenex. *X-C, Strong Cation Mixed Mode Phase Detail*. Available from:
<http://www.phenomenex.com/stratax>
85. Lucci, P., et al. *Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis*. 2011; Available from:
<https://www.intechopen.com>
86. Abe, E., S.G. Delyle, and J.C. Alvarez. *Extraction liquide-liquide: théorie, applications, difficultés*. In *Annales de Toxicologie Analytique*. 2010. EDP Sciences.
87. Lajeunesse, A., C. Gagnon, and S. Sauvé, *Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(14): p. 5325-5333.
88. Garcia Ac, A., *Développement de méthodes analytiques pour la détection et la quantification de traces de produits pharmaceutiques dans les eaux du fleuve Saint Laurent*. 2011.
89. Phenomenex. *Omega Polar C18*. 2019; Available from:
<https://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Luna/Omega%20Polar%20C18?returnURL=/Products/Search/HPLC>
90. Bouchonnet, S. and D. Libong, *Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse*. Actualité chimique, 2004: p. 7-14.

91. Legeron, R., *La spectrométrie de masse appliquée à la quantification absolue des anticorps monoclonaux thérapeutiques en milieu plasmatique pour la réalisation d'études pharmacocinétiques-pharmacodynamiques*. 2015, Bordeaux.
92. Bélanger-Lépine, F., et al., *Cultivation of an algae-bacteria consortium in wastewater from an industrial park: Effect of environmental stress and nutrient deficiency on lipid production*. *Bioresource technology*, 2018. **267**: p. 657-665.
93. Gélinas, M., et al., *Residual corn crop hydrolysate and silage juice as alternative carbon sources in microalgae production*. *Algal research*, 2015. **12**: p. 33-42.
94. Silva, A.R.R., et al., *Multigenerational effects of carbendazim in Daphnia magna*. *Environmental toxicology and chemistry*, 2017. **36**(2): p. 383-394.
95. Gélinas, M., et al., *Energy status and immune system alterations in *Elliptio complanata* after ingestion of cyanobacteria *Anabaena flos-aquae**. *Ecotoxicology*, 2013. **22**(3): p. 457-468.
96. Borova, V.L., et al., *Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2014. **406**(17): p. 4273-4285.
97. Lajeunesse, A., et al., *Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment—Evidence of biological effects*. *Chemosphere*, 2011. **83**(4): p. 564-571.
98. Lajeunesse, A., et al., *Detection and confirmation of saxitoxin analogues in freshwater benthic *Lyngbya wollei* algae collected in the St. Lawrence River (Canada) by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2012. **1219**: p. 93-103.
99. Polagani, S.R., et al., *Simultaneous determination of atorvastatin, metformin and glimepiride in human plasma by LC–MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study*. *Journal of pharmaceutical analysis*, 2013. **3**(1): p. 9-19.
100. Vazquez-Roig, P., et al., *SPE and LC-MS/MS determination of 14 illicit drugs in surface waters from the Natural Park of L'Albufera (València, Spain)*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010. **397**(7): p. 2851-2864.

101. Dioumaeva, I. and J.M. Hughes. *SAMHSA-Compliant LC/MS/MS Analysis of Amphetamines in Urine with Agilent Bond Elut Plexa PCX and Agilent Poroshell 120*. 2013; Available from: <https://www.agilent.com/>
102. Dasgupta, A. and J.L. Sepulveda, *Accurate Results in the Clinical Laboratory: A Guide to Error Detection and Correction*. 2013: Newnes.
103. Xu, B., et al., *Sulfamethoxazole biodegradation and biotransformation in the water-sediment system of a natural river*. *Bioresource technology*, 2011. **102**(14): p. 7069-7076.
104. Castiglioni, S., et al., *Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy*. *Environmental Science & Technology*, 2006. **40**(1): p. 357-363.
105. Vieno, N., T. Tuhkanen, and L. Kronberg, *Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland*. *Water research*, 2007. **41**(5): p. 1001-1012.
106. Clément-Larosière, B., *Etude de la croissance de Chlorella vulgaris en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO₂*. 2012, Châtenay-Malabry, Ecole centrale de Paris.
107. Lei, A., Y. Wong, and N. Tam, *Removal of pyrene by different microalgal species*. *Water Science and Technology*, 2002. **46**(11-12): p. 195-201.
108. Holland, J., *Ecstasy: The complete guide: A comprehensive look at the risks and benefits of MDMA*. 2001: Inner Traditions/Bear & Co.