Distribution d'estrogènes et de bêtabloquants dans les stations d'épuration des eaux résiduaires et dans l'eau de surface

Virginie Gabet Gabet-Giraud

▶ **To cite this version:**

Virginie Gabet Gabet-Giraud. Distribution d'estrogènes et de bêtabloquants dans les stations d'épuration des eaux résiduaires et dans l'eau de surface. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10275 . tel-00652345

HAL Id: tel-00652345

https://theses.hal.science/tel-00652345

Submitted on 15 Dec 2011

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

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

N° d'ordre 275-2009 Anné e 2009

THESE DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 14 décembre 2009

par

Virginie GABET-GIRAUD

DISTRIBUTION D'ESTROGÈNES ET DE BÊTABLOQUANTS DANS LES STATIONS D'ÉPURATION DES EAUX RÉSIDUAIRES ET DANS LES EAUX DE SURFACE

JURY :
M Bernard Herbreteau, directeur de thèse
Mme Marina Coquery, co-encadrant
Mme Cécile Miège, co-encadrant
M Damià Barceló, rapporteur
M Yves Levi, rapporteur
M Marc Chevreuil, examinateur
Mme Guillermina Hernandez-Raquet, examinateur

Thèse préparée au Laboratoire d'Analyse des Micropolluants Organiques du Cemagref de Lyon

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur L. Collet**
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J-F. Mornex
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur G. Annat
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. Simon
Secrétaire Général	M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. Locher
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Le Professeur F. Gieres
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J. Lieto
Institut Universitaire de Technologie A	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut Universitaire de Technologie B	Directeur : M. le Professeur R. Lamartine
Institut de Science Financière et d'Assurance	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M R. Bernard

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à la réalisation de ce travail de thèse.

Merci à Monsieur Bernard Herbreteau d'avoir accepté de diriger cette thèse même si la distance n'a pas rendu cette tâche toujours facile.

Un grand merci à Madame Marina Coquery et Madame Cécile Miège pour avoir suivi mes travaux au quotidien. Merci Marina pour toutes tes idées et tes conseils qui m'ont permis d'avancer. Merci Cécile d'avoir partagé ton bureau avec moi, de ta bonne humeur et de ton aide au jour le jour. Merci pour toutes vos corrections parfois si déprimantes, mais toujours pertinentes.

Monsieur Damià Barceló, Professeur à l'Institut de Recherches Chimiques et Environnementales de Barcelone, et Monsieur Yves Levi, Professeur au Laboratoire Santé Publique – Environnement de l'Université Paris Sud 11, m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en qualité de rapporteur et je leur adresse mes sincères remerciements.

Merci à Madame Guillermina Hernandez-Raquet, Chargée de Recherches à L'INRA de Narbonne, et Monsieur Marc Chevreuil, Directeur d'Etudes au Laboratoire Hydrologie et Environnement de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, de participer à ce jury.

Un grand merci à Séverine, Corinne, Julie M. et Philippe pour l'analyse des échantillons AMPERES. Merci aussi à Nicolas pour l'analyse des échantillons de boue.

Toute ma reconnaissance va également à Jean-Marc Choubert et Maxime Pomiès, mes deux épurateurs préférés. Merci pour votre disponibilité et pour toutes vos explications qui ont permis de rendre l'épuration un peu moins obscure pour moi.

Je remercie également chaleureusement toutes les autres personnes du Cemagref qui ont contribué à rendre ces 3 années si agréables. Merci à toutes mes copines du coin café qui ont permis de rendre ces pauses toujours agréables, souvent très drôles et parfois plus longues que prévu… Lili, Ghislaine, Séverine, Julie I. et Hélène. Sans oublier Boubette et Loïc, les 2 représentants de la gent masculine. Merci Annie de nous avoir souvent fait partager ce don que tu as pour la pâtisserie. Dans le désordre, merci aux autres membres du labo micropol Céline, Christelle, Romain et Fatima et du labo métaux Josiane et Eloïse. Merci aussi à Bernardo, pour le broyage des échantillons de boue (et les discussions sur les dernières performances de l'OL).

Enfin, je remercie ma famille pour son soutien et son affection. En particulier, mes parents pour m'avoir permis d'arriver jusqu'ici et ma grand-mère qui m'a permis de manger sainement tous les jours. Merci Damien pour avoir partagé mon stress, pour ton soutien, ta patience et ton optimisme.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS **7**

LISTE DES FIGURES **11**

LISTE DES TABLEAUX **13**

INTRODUCTION GÉNÉRALE **15**

1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **19**

1.1. Les molécules étudiées *19*

1.1.1 Les hormones 19

1.1.1.a. Le système endocrinien : définition et fonctionnement 19

1.1.1.b. Les hormones estrogéniques : production, rôle et utilisation 21

1.1.1.c. Structures et propriétés physico-chimiques des hormones estrogéniques 22

1.1.2 Les bêtabloquants 23

1.1.2.a. Définition et mode d'action 23

1.1.2.b. Structures et propriétés physico-chimiques des bêtabloquants 23

1.2. Transfert vers le milieu *26*

1.2.1 Données de consommation 26

1.2.2 Excrétion des molécules 27

1.2.2.a. Quantités d'estrogènes naturellement excrétées par les humains 27

1.2.2.b. Données d'excrétion des bêtabloquants par les humains 28

1.3. Occurrence, devenir et toxicité des estrogènes et des bêtabloquants *30*

1.3.1 Concentrations 30

1.3.1.a. Concentrations dans la phase dissoute des eaux usées 30

Les estrogènes 30

Les bêtabloquants 31

1.3.1.b. Teneurs dans les matières en suspension d'eaux usées et dans les boues de stations d'épuration 33

Les estrogènes 33

Les bêtabloquants 34

1.3.1.c Efficacité d'élimination des estrogènes et des bêtabloquants par les stations d'épuration 35

Traitement primaire 35

Traitement secondaire 36

Traitement tertiaire 37

1.3.1.d. Concentrations dans les milieux aquatiques récepteurs 38

Les estrogènes 38

Les bêtabloquants 42

1.3.2 La dégradation des molécules dans l'environnement 44

1.3.2.a. La dégradation des estrogènes 44

1.3.2.b. La dégradation des bêtabloquants 45

1.3.3 Ecotoxicité 46

1.4 Méthodes d'analyse pour les estrogènes et les bêtabloquants dans les matrices environnementales *48*

1.4.1 Méthodes analytiques pour les estrogènes dans les matrices environnementales 48
1.4.2 Méthodes analytiques pour les bêtabloquants dans les matrices environnementales 73
1.4.2.a Méthodes d'extraction 73
Phase dissoute 73
Phase solide 75
1.4.2.b Méthodes de purification 75
1.4.2.c Techniques analytiques 76
1.4.2.d Effets matrice 80
1.4.2.e Stabilité 81
1.4.2.f Validation de méthode 82

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES 87

2.1. Choix des sites d'étude 87
2.1.1 Stations d'épuration des eaux résiduaires 87
2.1.1.a. Filières retenues 87
2.1.1.b. Critères de choix des STEP à étudier 88
2.1.1.c. Stations étudiées 89
2.1.2 Milieux naturels 92
2.2. Prélèvement et échantillonnage 95
2.2.1 Etude des stations d'épuration des eaux résiduaires 95
2.2.2 Etude de l'impact des stations d'épuration sur le milieu récepteur 97
2.3. Méthodes d'analyse 99
2.3.1 Matériels et consommable 99
2.3.2 Assurance qualité 100
2.3.2.a Prélèvement 100
2.3.2.b Préparation d'échantillons 100
2.3.2.c L'analyse 101
2.3.3 Analyse des hormones estrogéniques 101
2.3.3.a Analyse des hormones estrogéniques dans la phase dissoute 101
Préparation de l'échantillon avant extraction 102
Extraction et purification 102
Analyse par LC-MS/MS 102
2.3.3.b Analyse des hormones estrogéniques dans les boues et les matières en suspension 103
Préparation de l'échantillon avant extraction 104
Extraction et purification 104
Analyse par LC-MS/MS 104
2.3.4 Analyse des bêtabloquants 105
2.3.4.a Analyse des bêtabloquants dans la phase dissoute 105
Préparation de l'échantillon avant extraction 105
Extraction 105
Analyse par LC-MS/MS 106
2.3.4.b Analyse des bêtabloquants dans les boues et les matières en suspension 107
Préparation de l'échantillon avant extraction 107
Extraction et purification 107
Analyse par LC-MS/MS 108
2.4. Exploitation des données 109
2.4.1 Evaluation des limites de quantification et de détection affinées 109
2.4.2 Evaluation des rendements d'élimination de la phase dissoute 109

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION 111

3.1. Développement et validation de nouvelles méthodes d'analyses *111*
3.1.1 L'analyse des estrogènes dans les boues 111
3.1.2 L'analyse des bêtabloquants dans les boues 137
3.2. Résultats dans les stations d'épuration *139*
3.2.1 Résultats obtenus dans la phase dissoute de 14 STEP 139
3.2.2 Etat des lieux des concentrations mesurées dans les boues de STEP 179
3.2.2.a. Qualité des données 179
3.2.2.b. Concentrations mesurées dans les boues primaires 180
3.2.2.c. Concentrations mesurées dans les boues biologiques 181
3.2.2.d. Concentrations mesurées dans les boues tertiaires 183
3.2.2.e. Concentrations mesurées dans les boues mixtes 184
3.2.2.f. Concentrations mesurées dans les boues déshydratées 184
3.2.2.g. Concentrations mesurées dans les boues traitées 185
3.2.2.h. Calcul des coefficients de sorption 187
3.2.2.i. Conclusion 188
3.2.3 Bilan matière global sur 2 installations de type boue activée faible charge 190
3.2.3.a. Concentrations totales des estrogènes et des bêtabloquants dans la colonne d'eau (fractions dissoute et particulaire) 192
3.2.3.b. Concentrations d'estrogènes et de bêtabloquants mesurées dans les boues 194
3.2.3.c. Abattements mesurés dans les STEP 196
3.2.3.d. Biodégradation dans le réacteur d'un procédé boues activées aération prolongée 199
3.2.3.e. Conclusion 202
3.3. Impact des stations d'épuration sur le milieu récepteur *203*
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 241
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 247
ANNEXE 1 : 257
POINTS DE PRELEVEMENTS DES STEP ETUDIEES 257
ANNEXE 2 : 259
CARACTERISTIQUES DES BOUES ETUDIEES 259
ANNEXE 3 : 261
TABLEAUX RECAPITULATIFS DES RESULTATS 261
ANNEXE 4 : 263
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 263

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE	Acébutolol
ASE®	Accelerated Solvent Extraction (extraction sous fortes température et pression)
ATE	Aténolol
ATE-D7	Aténolol-D7
BA	Boue Activée
BAm	Boue Activée moyenne charge
BET	Bétaxolol
BF	Biofiltre
BIS	Bisoprolol
DAD	Diode Array Detector (détecteur à barette de diodes)
Déc. I	Décanteur primaire
E1	Estrone
E1D4	Estrone-D4
E1-3G	Estrone-3-glucuronide
E1-3S	Estrone-3-sulfate
αE2	17α-estradiol
βE2	17β-estradiol
E2D2	17β-estradiol-D2
E2-3G	Estradiol-3-glucuronide
E2-3S	Estradiol-3-sulfate
E2-17G	Estradiol-17-glucuronide
E2-17S	Estradiol-17-sulfate
E2-3G-17S	Estradiol-3-glucuronide-17-sulfate
E2-3S-17G	Estradiol-3-sulfate-17-glucuronide
E2-3,17-G	Estradiol-3,17-diglucuronide
E2-3,17-S	Estradiol-3,17-disulfate
E3	Estriol
E3D2	Estriol-D2
E3-3G	Estriol-3-glucuronide
E3-16G	Estriol-16-glucuronide

E3-17G	Estriol-17-glucuronide
E3-3S-17G	Estriol-3-sulfate-17-glucuronide
E3-3,17-S	Estriol-3,17-disulphate
EE2	17α-ethynylestradiol
EE2D4	17α-ethynylestradiol-D4
EE2-3G	17α-ethynylestradiol-3-glucuronide
EE2-3S	17α-ethynylestradiol-3-sulfate
ESI	Electrospray Ionization (ionisation par électrospray)
GC	Gas Chromatography (chromatographie en phase gazeuse)
GC-MS(/MS)	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométride de masse (en tandem)
GPC	Gel Permeation Chromatography (chromatographie à perméation de gel)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (chromatographie liquide à haute performance)
Kow	Octanol/water partition coefficient (coefficient de partition octanol/eau)
LC	Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide)
LC-MS(/MS)	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (en tandem)
LD	Limite de Détection
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration (la plus faible concentration entraînant un effet)
LQ	Limite de Quantification
MES	Matières En Suspension
MET	Métoprolol
MET-D7	Métoprolol-D7
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry (spectrométrie de masse)
MS-MS	Spectrométrie de masse en tandem
NA	Non Applicable
NAD	Nadolol
NC	Non Communiqué
NOEC	Non Observed Effect Concentration (concentration n'entraînant pas d'effet)
OXP	Oxprénolol
PROP	Propranolol
PROP-D7	Propranolol-D7
QTRAP	Analyseur hybride quadripôle-trappe d'ions

RET	Retour En Tête
S/N	Rapport signal/bruit de fond
SOT	Sotalol
SPE	Solid Phase Extraction (extraction sur phase solide)
STEP	Station d'épuration
TIM	Timolol
TOF	Time Of Flight (analyseur à temps de vol)
UPLC®	Ultra Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide à haute résolution, sensibilité et vitesse)
UV	Ultraviolet
YES	Yeast Estrogen Screen (test biologique de l'effet perturbateur endocrinien)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma des différentes voies de contamination des eaux de surface par les médicaments (d'après Heberer, 2002) *16*
Figure 2 : Schéma simplifié du système endocrinien chez l'homme *20*
Figure 3 : Structure du noyau estrane *22*
Figure 4 : Répartition géographique des 21 STEP étudiées *89*
Figure 5 : Sites de prélèvement retenus pour l'analyse des milieux naturels *93*
Figure 6 : Représentation schématique des points de prélèvement des filières eau et boue de station d'épuration (d'après Choubert et al., 2009) *96*
Figure 7 : Les différentes étapes de l'échantillonnage de la filière eau d'une STEP *96*
A : le préleveur automatique réfrigéré ; B : les 24 échantillons prélevés durant 24 h ; C : la reconstitution d'un échantillon moyen 24 h asservis au débit *96*
Figure 8 : Schéma des sites prélevés dans le cadre de l'étude de l'impact des stations d'épuration sur le milieu récepteur (distance des sites au rejet de la station (Ardières et Saône) ou à la confluence (Bourbre)) *98*
Figure 9 : Rendements moyens (%) ± écart-type obtenus sur un échantillon de boue pour les différentes étapes de la méthode d'analyse (n = 3) *113*
Figure 10 : Etude de la spécificité de la méthode d'analyse des estrogènes dans les boues ; comparaison des concentrations d'ajout mesurées avec les concentrations de dopage sur 8 échantillons de boue différents (6 échantillons pour EE2) *115*
Figure 11 : Abattement global (%) des estrogènes et des bêtabloquants pour les 14 STEP étudiées (boîte à moustaches: valeurs minimum et maximum (o), médiane (-), moyenne (*), 1er et 3ème quartile); n : nombre de données quantifiées. *142*
Figure 12 : Concentrations en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans 4 boues primaires en ng/g de poids sec (représentation par boîte à moustaches : valeurs minimum et maximum (o), médiane (-), moyenne (*), premier et troisième quartile); n : nombre de données quantifiées. *181*
Figure 13 : Concentrations en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans 8 boues biologiques en ng/g de poids sec (représentation par boîte à moustaches : valeurs minimum et maximum (o), médiane (-), moyenne (*), premier et troisième quartile); n : nombre de données quantifiées..... *183*
Figure 14 : Concentrations en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans 5 boues déshydratées en ng/g de poids sec (représentation par boîte à moustaches : valeurs minimum et maximum (o), médiane (-), moyenne (*), premier et troisième quartile); n : nombre de données quantifiées. *185*
Figure 15 : Concentrations en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans 10 boues traitées en ng/g de poids sec (représentation par boîte à moustaches : valeurs minimum et maximum (o), médiane (-), moyenne (*), premier et troisième quartile); n : nombre de données quantifiées. *186*
Figure 16 : Schéma des stations d'épuration SE1 et CA2 (d'après Pomies, 2008) *191*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Structures et propriétés physico-chimiques des estrogènes étudiés *22*
Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques des bêtabloquants étudiés *25*
Tableau 3 : Données de consommation en France en 2004 pour les hormones estrogéniques et les bêtabloquants et doses journalières recommandées (Besse et Garric, 2007b) *26*
Tableau 4 : Exemples d'estrogènes conjugués *27*
Tableau 5 : Excrétion journalière moyenne d'estrogènes libres et conjugués (µg) dans l'urine *28*
Tableau 6 : Excrétion des bêtabloquants et métabolites associés *29*
Tableau 7 : Concentrations en estrogènes dans les influents et effluents de STEP de type boue activée d'après Miege et al., 2009b *31*
Tableau 8 : Concentrations en bêtabloquants dans les influents et effluents de STEP de type boue activée d'après Miege et al., 2009b *32*
Tableau 9 : Teneurs en estrogènes (min – max) mesurées dans les boues et MES des eaux usées en ng/g de poids sec *34*
Tableau 10 : Rendements d'élimination (%) obtenus pour les estrogènes en fonction des procédés épuratoires employés (à partir de la base de données utilisée pour l'article Miege et al (2009)) *37*
Tableau 11 : Concentrations en estrogènes libres et conjugués mesurées dans les phases dissoutes d'eaux de surface de différents pays *41*
Tableau 12 : Concentrations en bêtabloquants mesurées dans la phase dissoute d'eaux de rivières de différents pays d'Europe *42*
Tableau 13 : Méthodes analytiques pour l'analyse des bêtabloquants dans les eaux (phase dissoute) *77*
Tableau 14 : Méthodes analytiques pour l'analyse des bêtabloquants les boues de station d'épuration *79*
Tableau 15 : Paramètres de validation de méthode pour les eaux (phase dissoute) *84*
Tableau 16 : Récapitulatif des filières d'épuration des eaux et des boues retenues *88*
Tableau 17 a : Caractéristiques des 14 STEP étudiées dans leur globalité (filières eau et boue) *90*
Tableau 17 b : Caractéristiques des STEP étudiées spécifiquement pour leur filière boue *91*
Tableau 18 : Caractéristiques des 3 stations d'épuration étudiées dans le cadre de l'étude d'impact sur les milieux naturels *94*
Tableau 19 : Transition MRM utilisées pour la quantification et la confirmation des estrogènes *103*
Tableau 20 : Concentration en bêtabloquants des solutions de dopage utilisées pour chaque matrice *106*
Tableau 21 : Transition d'ionisation utilisées pour la quantification et la confirmation des bêtabloquants *107*
Tableau 22 : Rendements de récupération moyens (%) et CV (%) obtenus pour l'analyse de 10 bêtabloquants dans un échantillon de boue dopés à 2 niveaux de dopage différents (n = 5) *137*
Tableau 23 : Teneurs en estrogènes et en bêtabloquants en ng/g de poids sec mesurées dans les échantillons de boues tertiaire *184*
Tableau 24 : Teneurs en estrogènes et en bêtabloquants en ng/g de poids sec mesurées dans les échantillons de boues mixtes *184*
Tableau 25 : Coefficients de distribution boue/eau (Kd en L/kg) calculés pour les estrogènes et les bêtabloquants dans les boues primaires, les boues biologiques de type boue activée et les boues tertiaires *188*

Tableau 26 : Concentrations totales (dissous + particulaire) en hormones et en bêtabloquants dans les échantillons de la filière eau et le retour en tête (RET) et partition dissous/total (%) des molécules pour les stations SE1 et CA2 ..... *193*
Tableau 27 : Teneurs en hormones et en bêtabloquants mesurées dans les échantillons de boue en ng/g de matière sèche *195*
Tableau 28 : Flux d'estrogènes et de bêtabloquants (phases dissoutes et particulaires) transitant dans la STEP en mg/j *197*
Tableau 29 : Abattements (%) du traitement biologique (filière eau) et de la station globale (filières eau + boue) calculés pour les hormones estrogéniques et les bêtabloquants en tenant compte des phases dissoutes et particulaires *198*
Tableau 30 : Comparaison des abattements de la station (filières eau + boue) (%) obtenus pour les estrogènes et les bêtabloquants avec et sans prise en compte des MES *199*
Tableau 31 : Quantité d'estrogènes et de bêtabloquants (mg) transitant dans le bassin d'aération pendant un âge de boue (18 jours pour SE1 et 16 jours pour CA2) et taux de dégradation de ces molécules dans le bassin d'aération (%) *201*
Tableau 32 : Concentrations moyennes (min-max) d'estrogènes et de bêtabloquants mesurées dans les échantillons prélevés dans les 3 sites étudiés (en ng/L) *205*
Tableau 33 : Ratio d'augmentation des concentrations en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans les rivières entre l'amont et l'aval du rejet de station d'épuration et atténuation entre les concentrations mesurées en aval du rejet. *207*

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La présence de médicaments dans l'environnement en général, et dans les milieux aquatiques en particulier, est aujourd'hui avérée. La communauté scientifique s'intéresse de près à cette problématique. En effet, ces molécules conçues pour produire un effet biologique à très faible dose peuvent avoir un effet néfaste sur l'environnement. Les problèmes posés par la présence de ces composés dans l'environnement sont de plusieurs ordres : ils se dégradent plus ou moins bien, ils ont un effet toxique à court ou long terme et à plus ou moins forte concentration, ils se dispersent dans l'environnement et certains peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire.

Aujourd'hui, près de 3000 produits pharmaceutiques à usage humain différents sont utilisés couramment en Europe. Ces molécules subissent souvent des transformations dans le corps humain et sont rejetées sous forme initiale, mais aussi sous forme de métabolites (formes conjuguées plus solubles par exemple). Parmi les différents produits pharmaceutiques, les hormones font figure de cas particulier. En effet, ces molécules sont consommées mais sont également excrétées naturellement en quantités significatives. Ce mélange de médicaments, de métabolites et d'hormones naturelles rejoint les réseaux d'assainissement par le biais des urines et des fèces. Les stations d'épuration représentent ainsi le principal vecteur d'hormones et de médicaments vers le milieu aquatique (Ternes et Joss, 2006). Cependant d'autres sources de contamination existent et contribuent à la pollution des eaux de surface (figure 1) : rejet des industries pharmaceutique, lixiviats de décharge, ruissellement de sols, etc. Par exemple, il a été montré que le recours dans les élevages intensifs à l'utilisation d'hormones stéroïdes afin de modifier le cycle oestral ou de traiter les divers troubles de la reproduction peut représenter une part importante du taux de l'ensemble des rejets (Refsdal, 2000) : des concentrations en estrogènes pouvant atteindre 4 µg/L ont par exemple été mesurées dans des effluents de ferme (Sarmah *et al.*, 2006).

Les stations d'épuration (STEP) représentent la principale porte d'entrée de ces micropolluants dans l'environnement aquatique. Beaucoup de ces composés sont polaires et persistants. Ils ne sont que partiellement (voire dans certains cas pas du tout) éliminés par les STEP qui ne sont pas conçues ni dimensionnées pour traiter ce genre de pollution (Ternes et Joss, 2006). En effet, si les STEP doivent satisfaire à un certain nombre de critères généraux (la demande chimique en oxygène, la demande biochimique en oxygène, le pH et les matières en suspension totales), aucune réglementation ne régit les concentrations de médicaments rejetées. Par ailleurs, les

composés les moins polaires vont s'adsorber sur les matières en suspension et les boues qui sont produites à plusieurs stades du processus d'assainissement des eaux usées. Ces boues peuvent ensuite être traitées de différentes manières : incinération, mise en décharge ou épandage agricole. En France, l'épandage agricole a été privilégié du fait de son triple intérêt économique, agronomique et environnemental. Cependant, cette pratique n'est pas sans danger pour l'environnement dans la mesure où les boues peuvent concentrer les micropolluants les plus hydrophobes qui pourront ensuite, après épandage, contaminer le sol et aussi par conséquent infiltrer les eaux souterraines.

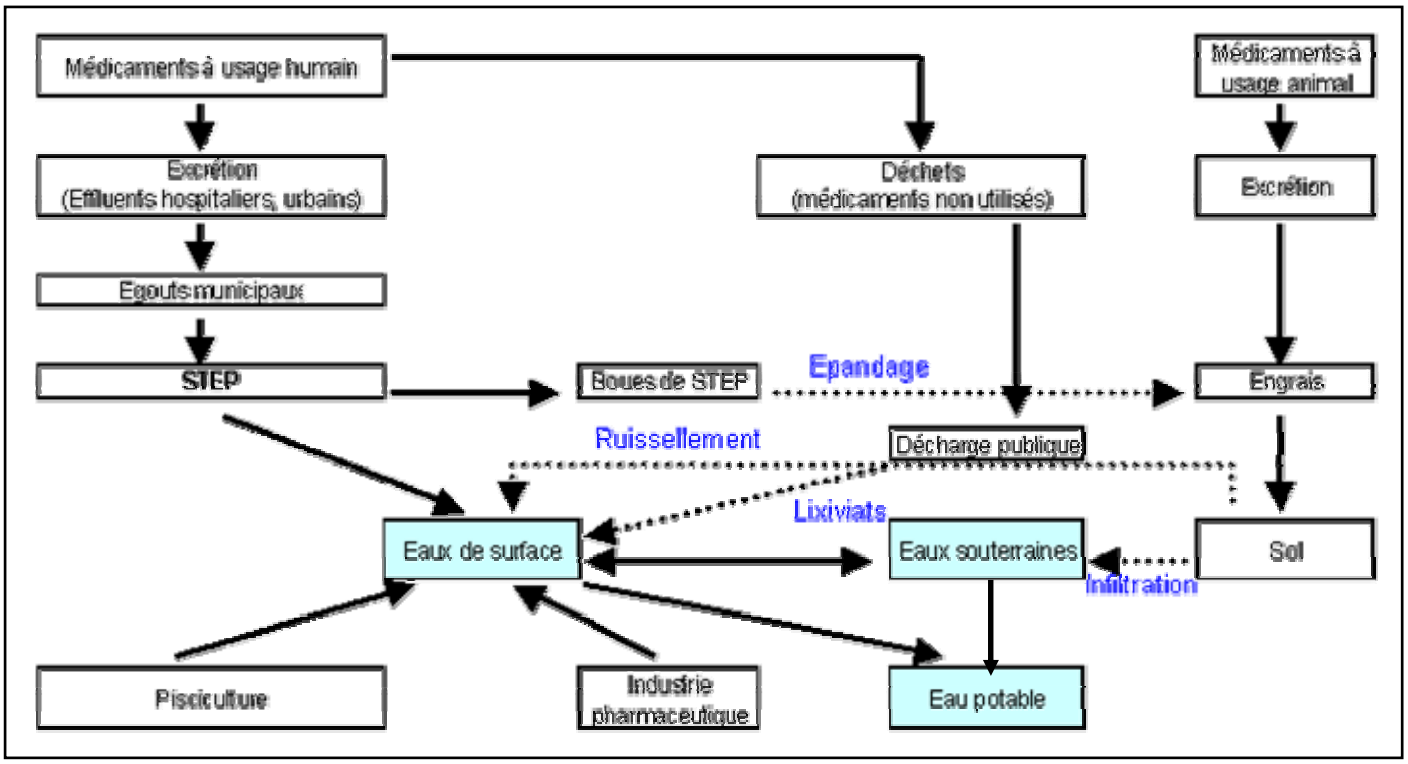


Figure 1 : Schéma des différentes voies de contamination des eaux de surface par les médicaments (d'après Heberer, 2002)

En Europe, la prise de conscience des risques environnementaux s'est traduite par la mise en place d'une politique communautaire pour la gestion et la protection des eaux par grand bassin hydrographique : la Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE (DCE) (EU, 2000). La DCE fixe des objectifs ambitieux et donne la priorité à la protection de l'environnement, en demandant de veiller à la non-dégradation de la qualité des eaux et d'atteindre d'ici 2015 un « bon état » général, tant pour les eaux souterraines que pour les eaux superficielles, y compris les eaux côtières. Le « bon état » inclut la qualité écologique (abondance et diversité des espèces présentes dans le milieu) et l'état chimique d'une masse d'eau (concentrations en contaminants dans le milieu). Elle impose aussi la réduction des émissions de 33 substances appelées « prioritaires » dans le milieu naturel à l'horizon 2015. Sur ces 33 substances, les émissions de 13 d'entre elles (« dangereuses prioritaires ») doivent

être supprimées à l'horizon 2015 et les émissions de 20 d'entre elles doivent être réduites. Parmi ces substances prioritaires, on retrouve des métaux, des pesticides et des hydrocarbures, (Directive fille 2008/105/CE du 16 décembre 2008 ; (UE, 2008). Par ailleurs, des substances dites émergentes ont été identifiées par la communauté scientifique à partir de l'examen de données écotoxicologiques et d'occurrence dans l'environnement. Il s'agit notamment de substances chimiques telles que les hormones, les nouveaux pesticides, les composés pharmaceutiques, les produits de beauté ou tout autre nouveau composé pour lequel les connaissances actuelles sont insuffisantes pour évaluer le risque de sa présence dans l'environnement.

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est focalisé sur l'étude de deux familles de molécules émergentes : les hormones estrogéniques et les bêtabloquants. Les objectifs de ce travail sont de plusieurs ordres.

De façon générale, il s'agit de contribuer à l'amélioration des connaissances sur les paramètres explicatifs des concentrations et de la spéciation des substances émergentes sélectionnées dans les eaux usées, les boues de station d'épuration et les milieux aquatiques récepteurs. Cette partie du travail s'inscrit dans le cadre du Projet AMPERES[1] dont les objectifs étaient d'évaluer la composition en micropolluants des eaux usées et traitées et de quantifier l'efficacité d'élimination de différentes filières d'épuration vis-à-vis de ces contaminants. Au terme de ce projet, une vue globale des potentiels d'élimination des micropolluants par les installations conventionnelles et par des ouvrages plus innovants sera obtenue.

Le premier objectif consistait donc à développer des méthodes analytiques performantes permettant de quantifier les molécules cibles dans des matrices environnementales complexes telles que les matières en suspension et les boues de stations d'épuration. En effet, le manque de données concernant la présence de ces molécules émergentes est lié, en particulier pour l'analyse des boues de stations d'épuration, au manque de méthodes analytiques adaptées. La présence de ces composés à l'état de trace dans des matrices très complexes représente, en effet, un réel challenge analytique dans la mesure où cela requiert l'utilisation de méthodes très sensibles tout en nécessitant une maîtrise des effets matrice.

Le second objectif de cette thèse était d'étudier l'occurrence des estrogènes et des bêtabloquants dans les stations d'épuration. Il s'agissait de plus d'évaluer les efficacités d'élimination de ces substances en fonction des procédés épuratoires utilisés. En effet, dans la mesure où le stations d'épuration représentent la principale voie d'accès de ces molécules vers

[1] AMPERES : « Analyse de Micropolluants Prioritaires et Emergents dans les Rejets et les Eaux superficielles », projet ANR PRECODD 2005

l'environnement, il est important de déterminer le comportement de nos substances dans ces stations et d'évaluer l'efficacité d'élimination des différents procédés épuratoires vis-à-vis de ces substances.

Enfin, le dernier objectif de mon travail consistait à évaluer l'impact des rejets de stations d'épuration sur le milieu aquatique. En effet, les stations d'épuration rejettent en permanence leurs effluents dans le milieu aquatique et ces rejets peuvent avoir un impact très néfaste sur l'écosystème aquatique. L'objectif ici était donc de mettre en œuvre une approche chimique basée sur des mesures locales de concentrations des substances choisies dans les effluents de stations d'épuration et dans quelques milieux récepteurs ciblés.

Ce document s'articule autour de 3 parties.

Une étude bibliographique (Partie 1) expose tout d'abord les principales caractéristiques des molécules étudiées. De plus, l'état de l'art des connaissances sur ces molécules est présenté en suivant le cycle de ces substances depuis leur production/consommation, leur traitement par les stations d'épuration, jusqu'à leur comportement dans le milieu aquatique. Cette revue bibliographique s'attache également à étudier les différentes méthodes d'analyse permettant d'étudier les estrogènes et les bêtabloquants dans les matrices environnementales (eaux usées, eaux de surface, matières en suspension et boues de station d'épuration).

La Partie 2 explicite le choix des sites d'étude sélectionnés et récapitule les différentes méthodes utilisées pour le prélèvement et l'analyse. Des informations concernant l'exploitation des données obtenues sont également regroupées dans cette partie.

Enfin, la dernière partie (Partie 3) expose les résultats obtenus. Un premier chapitre est consacré au développement et à la validation d'une nouvelle méthode analytique permettant le dosage d'estrogènes dans les boues de station d'épuration. Un second chapitre présente en détail les résultats obtenus dans les stations d'épuration. Les efficacités d'élimination des molécules ciblées sont tout d'abord évaluées à partir des concentrations mesurées dans les phases dissoutes. Les résultats obtenus dans les boues de station d'épuration sont ensuite présentés. Enfin, un bilan massique prenant en compte les différents compartiments (phase dissoute, matières en suspension et boues) est dressé sur 2 stations d'épuration. Pour finir, un dernier chapitre est consacré à l'impact des effluents de stations d'épuration sur le milieu récepteur.

1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les molécules étudiées

Le choix des molécules étudiées a été réalisé selon plusieurs critères. Dans un premier temps, les données de consommation de produits pharmaceutiques pour le territoire français ont été examinées. Il en est ressorti que les 100 produits pharmaceutiques les plus consommés en France représentent plus de 50 % du marché total des médicaments (AFFSAPS, 2003). Parmi ces molécules, on trouve notamment des antibiotiques, des antidépresseurs, des analgésiques, des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des bêtabloquants. La toxicité des molécules ainsi que les impacts de ces molécules déjà observés dans des études antérieures ont ensuite été étudiés. Parmi ces familles de composés potentiellement dangereux de par leur mécanisme d'action, mais pas nécessairement par les quantités consommées, on compte notamment les hormones et les produits anticancéreux. Enfin, les données de concentration des molécules dans le milieu aquatique disponibles ont été prises en compte. Il est alors apparu que les hormones, les analgésiques, les anti-inflammatoires et les antibiotiques sont les molécules les plus étudiées et que d'autres familles de molécules comme les bêtabloquants sont très peu analysées (Miege *et al.*, 2009b).

Compte tenu de ces différentes observations, le choix s'est porté sur deux familles de molécules : d'une part, les hormones estrogéniques en raison de leur toxicité importante (effet perturbateur endocrinien) (Fent *et al.*, 2006) et d'autre part, les bêtabloquants qui font partie des médicaments les plus consommés en France (Besse et Garric, 2007a) mais dont la littérature scientifique fait peu d'état.

1.1.1 Les hormones

1.1.1.a. Le système endocrinien : définition et fonctionnement

Le système endocrinien, ou système hormonal (figure 2), constitue un des trois importants systèmes de coordination et de régulation chez les mammifères. Il est composé par les glandes endocrines : les gonades –ovaires chez la femme et testicules chez l'homme-, le placenta, le pancréas, les glandes thyroïde, parathyroïde et surrénales, l'hypophyse, l'épiphyse et l'hypothalamus.

Les glandes endocrines sécrètent des hormones qui sont des messagers chimiques véhiculés par le sang, et qui agissent à distance de leur site de production par fixation sur des récepteurs spécifiques.

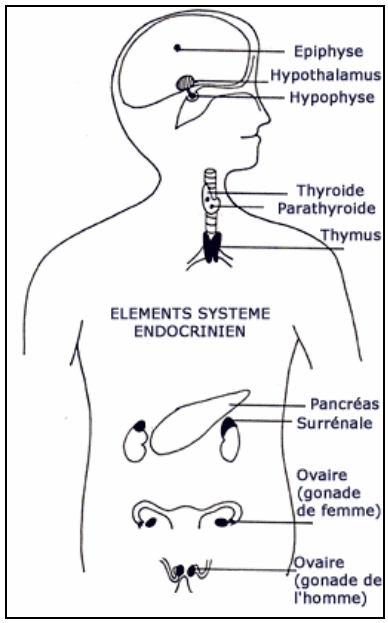


Figure 2 : Schéma simplifié du système endocrinien chez l'homme

Les hormones produites sont ensuite libérées dans le sang (à des concentrations de l'ordre du ng ou pg/mL) sous forme libre ou liées à des protéines de transport et diffusées dans l'ensemble de l'organisme à travers le système vasculaire. Tout comme le système nerveux, les hormones ont un rôle de communication, mais contrairement aux signaux transmis par le système nerveux ceux véhiculés par les hormones sont plutôt lents, continus et diffus. La régulation du système hormonal se fait par l'intermédiaire de rétrocontrôle positif en cas de sécrétion de l'hormone et négatif en cas de diminution de sécrétion de l'hormone.

Par l'intermédiaire des hormones, l'organe émetteur agit donc à distance sur l'ensemble des organes cibles dont les récepteurs sont activés au contact des hormones spécifiques. En modulant le fonctionnement des organes et des tissus cibles, les hormones assurent la régulation de nombreuses fonctions essentielles de l'organisme comme le contrôle de la production énergétique, la croissance, le développement et la reproduction. Les glandes mammaires, les os, les muscles, le système nerveux et les organes de reproduction mâle et femelle font, entre autres, partie des organes et tissus sous contrôle endocrinien.

1.1.1.b. Les hormones estrogéniques : production, rôle et utilisation

Les estrogènes (ou œstrogènes) constituent, avec les androgènes et les progestagènes, la classe des hormones stéroïdiennes qui sont synthétisées à partir d'un précurseur commun, le cholestérol. Ils sont produits en premier lieu par les ovaires et le placenta. Certains estrogènes sont également produits en petite quantité par d'autres tissus tels le foie, la surrénale, les seins et le tissu adipeux. Ces sources secondaires d'estrogènes sont particulièrement importantes chez les femmes lors de post-ménopause. Les estrogènes sont ensuite transportés dans le plasma majoritairement liés à des protéines plasmatiques.

Il existe quatre estrogènes qui sont produits naturellement par l'organisme : l'estrone (E1), le 17α-estradiol (αE2), le 17β-estradiol (βE2) et l'estriol (E3). La fonction des estrogènes, à l'état naturel, est d'être une hormone sexuelle femelle primaire mais ils sont aussi sécrétés par l'homme. Les estrogènes jouent un rôle dans la reproduction, mais ils sont également impliqués dans le développement du système nerveux central ou la formation des os.

Molécules endogènes (c'est à dire naturellement synthétisées par l'organisme), les estrogènes peuvent aussi être administrés à titre thérapeutique en médecine humaine et vétérinaire. En effet, les estrogènes (et en particulier l'estradiol) sont utilisés pour traiter les absences ou insuffisances de sécrétion ovarienne à l'adolescence et à l'âge adulte, et pour tenter de réduire les conséquences du déclin physiologique de leur sécrétion à la ménopause et après la ménopause. L'estriol, dont le pouvoir estrogénique est plus faible que celui de l'estradiol, est utilisé pour sa spécificité d'action vaginale.

Parmi les estrogènes administrés à titre thérapeutique, on trouve aussi des molécules artificielles qui ne sont pas identiques aux hormones naturelles et qui sont spécialement conçues pour agir sur le système endocrinien. On retrouve par exemple ce type de molécules dans les contraceptifs, les traitements hormonaux de substitution et dans certains additifs alimentaires pour animaux. L'éthynilestradiol, le mestranol, le dienestrol sont des exemples d'estrogènes de synthèse. L'éthynilestradiol est l'estrogène artificiel le plus couramment utilisé. Il peut être utilisé pour traiter une déficience estrogénique, mais il est surtout l'estrogène de synthèse associé aux progestatifs dans la plupart des contraceptifs oraux.

1.1.1.c. Structures et propriétés physico-chimiques des hormones estrogéniques

D'un point de vue structurel, les estrogènes sont des dérivés du noyau estrane (figure 3) qui présentent une aromaticité du cycle A et une fonction hydroxyle sur ce même cycle.

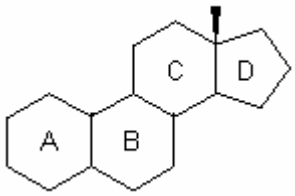
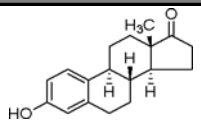
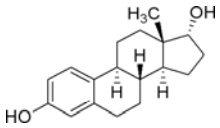
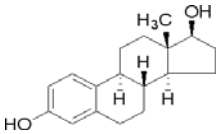
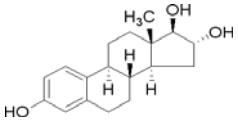
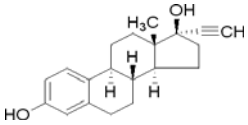


Figure 3 : Structure du noyau estrane

Les structures ainsi que les propriétés physico-chimiques des estrogènes étudiés sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Structures et propriétés physico-chimiques des estrogènes étudiés

	Produit	Formule brute	n°CAS	Masse molaire (g/mol)	Formule développée	log Kow	pKa	Solubilité dans l'eau (mg/L)
Estrogènes naturels	Estrone (E1)	$C_{18}H_{22}O_2$	53-16-7	270,4		3,1-4,0	10,3-10,8	0,8-12,4
	17α-Estradiol (αE2)	$C_{18}H_{24}O_2$	57-91-0	272,4		3,1-4,0	10,5-10,7	3,9-13,3
	17β-Estradiol (βE2)	$C_{18}H_{24}O_2$	50-28-2	272,4		3,1-4,0	10,5-10,7	3,9-13,3
	Estriol (E3)	$C_{18}H_{24}O_3$	50-27-1	288,4		2,6-2,8	10,4	3,2-13,3
Estrogène de synthèse	17α-Ethinylestradiol (EE2)	$C_{20}H_{24}O_2$	57-63-6	296,4		3,7-4,1	10,2	4,8

La fonction phénol confère aux estrogènes un caractère acide, avec des constantes d'acidité (pKa) de l'ordre de 10. Dans le milieu aquatique, à des pH avoisinant 7, ils sont donc sous forme neutre (non chargée). Le logarithme de leur coefficient de partage octanol/eau (log Kow) est compris

entre 2,6 et 4,1 ; ces composés sont donc moyennement hydrophiles et donc potentiellement bioaccumulables. De plus, bien que la solubilité de ces molécules dans l'eau soit inférieure à 13,3 mg/L, elle est bien supérieure aux concentrations environnementales de ces composés et ne sont donc pas un facteur limitant la diffusion de ces molécules.

1.1.2 Les bêtabloquants

1.1.2.a. Définition et mode d'action

Les bêtabloquants sont des molécules exogènes. Ce sont des médicaments utilisés pour traiter l'hypertension, la tachycardie, l'insuffisance cardiaque chronique, la migraine et le glaucome. Ils permettent notamment de ralentir le rythme cardiaque, diminuer la pression artérielle et la pression intra-oculaire. Ce type de médicament doit être pris à vie de manière quotidienne.

Ils agissent en prenant la place des catécholamines (des composés organiques synthétisés à partir de la tyrosine et jouant le rôle d'hormone ou de neurotransmetteur) sur les récepteurs bêta adrénergiques situés sur le cœur, les artères et les bronches mais ne provoquent pas de réaction de la part du récepteur (ou des réactions moins fortes que la catécholamine). Certains bêtabloquants empêchent même l'apparition des catécholamines, ce qui, indirectement, s'oppose à leur action.

Il existe deux types de récepteurs bêta : les récepteurs bêta 1 situés principalement au niveau cardiaque (mais aussi au niveau des reins et de l'œil), et les récepteurs bêta 2 prédominants au niveau vasculaire et bronchique. Il est alors possible de distinguer les bêtabloquants selon le type de récepteur sur lequel ils se fixent : les bêtabloquants se fixant de manière spécifique sur les récepteurs bêta 1 sont cardiosélectifs ; ceux se fixant indifféremment sur les récepteurs bêta 1 et bêta 2 sont non cardiosélectifs.

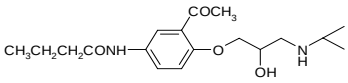
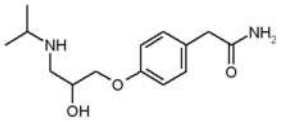
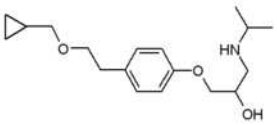
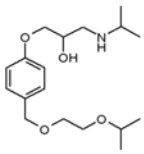
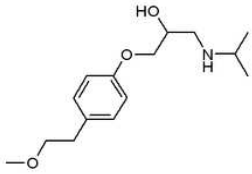
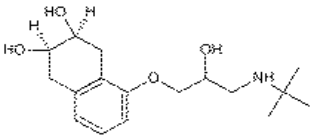
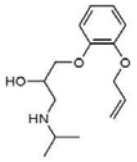
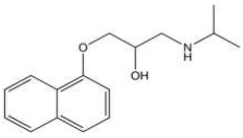
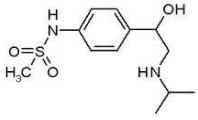
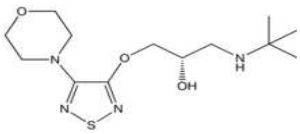
1.1.2.b. Structures et propriétés physico-chimiques des bêtabloquants

Les bêtabloquants sont constitués d'une structure aminoéthanol et de plusieurs groupes hydroxy. Tous les bêtabloquants possèdent un carbone asymétrique. Il s'agit donc de molécules chirales, mais c'est le composé lévogyre qui possède la propriété bêtabloquante. En raison du nombre élevé de groupes fonctionnels présents dans leur structure, les bêtabloquants ont une polarité relativement élevée.

Les structures et les propriétés physico-chimiques des 10 bêtabloquants étudiés sont rassemblées dans le tableau 2.

Les bêtabloquants sont des bases faibles avec des constantes d'acidité supérieures à 9. Dans l'eau, à des pH avoisinant 7, ils sont donc protonnés et chargés positivement. La constante de partage octanol/eau (Kow) n'est par conséquent pas le meilleur descripteur des propriétés physico-chimiques de ces composés.

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques des bêtabloquants étudiés

Produit	Formule Brute	n°CAS	Masse molaire (g/mol)	Formule développée	pKa	log Kow	Solubilité dans l'eau (mg/L)
acébutolol	C18H28N2O4	37517-30-9	336,43		9,13 [a]	1,42 [a]	259 [b]
aténolol	C14H22N2O3	29122-68-7	266,34		9,17 [a] 9,6 [b]	-0,026 [a] 0,16* ; 0,46 [b]	13300 [b]
betaxolol	C18H29NO3	63659-18-7	307,43		9,4 [b]	3,265 [b]	451 [b]
bisoprolol	C18H31NO4	66722-44-9	325,44		9,16 [a]	1,84 [a] 1,69 [b]	2240 [b]
métoprolol	C15H25NO3	37350-58-6	267,36		9,18 [a]	1,69 [a]	4780 [c]
nadolol	C17H27NO4	42200-33-9	309,40		9,17 [a] 9,67 [b]	1,17 [a] 0,71 [b]	83300 [b]
oxprénolol	C15H23NO3	6452-71-7	265,35		9,13 [a]	1,83 [a]	420 [c]
propranolol	C16H21NO2	525-66-6	259,34		9,15 [a] 9,49 [b]	2,60 [a] 3,48* ; 3,03 ; 3,585 [b]	70 [b]
sotalol	C12H20N2O3S	3930-20-9	272,36		9,19 [a] 9,55 [b]	0,37 [a] 0,24 [b]	137000 [b]
timolol	C13H24N4O3S	26839-75-8	316,42		8,86 [a] 9,21 [b]	1,75 [a] 1,761 [b]	2740 [b]

[a] (Detroyer *et al.*, 2001) valeurs expérimentales
[b] (Hernando *et al.*, 2007)
[c] Donnée calculée par le logiciel ACD/Labs v 8.14
* valeurs expérimentales

1.2. Transfert vers le milieu

Au cours de ce travail, 2 familles de molécules ont été étudiées. Comme expliqué précédemment, ces molécules sont soit synthétisées naturellement par l'organisme (c'est le cas des 4 estrogènes naturels) soit ingérées (estrogènes de synthèse et bêtabloquants). Dans tous les cas, ces substances seront excrétées par l'organisme sous formes plus ou moins métabolisées et rejoindront le milieu aquatique par l'intermédiaire des réseaux d'assainissement. Dans cette partie, sont présentées les données de consommation de ces substances en France ainsi que les quantités et les formes sous lesquelles ces molécules sont excrétées.

1.2.1 Données de consommation

Le tableau 3 présente les données de consommation française en 2004 des différents estrogènes et bêtabloquants étudiés, ainsi que les doses journalières recommandées. Ces données ont été obtenues à partir des données fournies par l'AFSSA (Besse et Garric, 2007a).

Tableau 3 : Données de consommation en France en 2004 pour les hormones estrogéniques et les bêtabloquants et doses journalières recommandées (Besse et Garric, 2007b)

Molécules	Quantité totale (kg)	Dose journalière recommandée (mg)
Estrone (E1)	0,03	1
17β-Estradiol (βE2)	165	2
Estriol (E3)	7	2
17α-Ethynylestradiol EE2	40	0,025
Acébutolol	NC	400 – 800 *
Aténolol	18337	100 *
Bétaxolol	NC	20 *
Bisoprolol	2112	10 – 20 *
Métoprolol	8786	50 *
Nadolol	938	80 – 300 *
Oxprénolol	377	80 – 480 *
Propranolol	12487	40 – 100 *
Sotalol	NC	40 – 640 *
Timolol	NC	40 - 60 *

NC : non communiqué
* www.biam2.org

Ainsi, l'estrogène le plus consommé en France est βE2. Concernant l'EE2, le tonnage relativement faible est à mettre en regard avec la faible dose journalière recommandée (25µg/jour). EE2 n'étant pas une hormone endogène, il est plus facile de relier les concentrations retrouvées dans le milieu aquatique avec ces données de consommation.

Contrairement aux estrogènes, les bêtabloquants ne sont pas des molécules endogènes. Ils ne sont donc pas produits par l'organisme et il est plus facile de relier les concentrations retrouvées avec les données de consommation disponibles. Les données de consommations ne sont pas renseignées pour tous les bêtabloquants dans le tableau 3. Il apparaît que l'aténolol, le propranolol et dans une moindre mesure le métoprolol présentent d'importants tonnages annuels (> 8 tonnes) contrairement au nadolol et à l'oxprénolol (< 1 tonne).

1.2.2 Excrétion des molécules

1.2.2.a. Quantités d'estrogènes naturellement excrétées par les humains

Les estrogènes sont sécrétés aussi bien par l'homme que par la femme, et ce, durant toute leur vie. L'organisme humain est capable de métaboliser facilement et d'excréter rapidement ces molécules. Elles ne s'accumulent donc pas dans les tissus comme c'est le cas pour les substances anthropiques. Les estrogènes sont dégradés au niveau du foie où ils sont convertis en conjugués plus solubles par sulfatation ou glucuronidation avant d'être excrétés dans l'urine ou la bile. Le tableau 4 présente des exemples de formes conjuguées que l'on peut retrouver dans les urines et dans la bile.

Tableau 4 : Exemples d'estrogènes conjugués

Estrogène (abréviation)	Exemples de formes conjuguées (abréviation)
Estrone (E1)	estrone-3-sulfate (E1-3S) estrone-3-glucuronide (E1-3G)
Estradiol (αE2 et βE2)	estradiol-3-sulfate (E2-3S) estradiol-3-glucuronide (E2-3G) estradiol-17-sulfate (E2-17S) estradiol-17-glucuronide (E2-17G) estradiol-3-sulfate-17-glucuronide (E2-3S-17G) estradiol-3-glucuronide-17-sulfate (E2-3G-17S) estradiol-3,17-disulfate (E2-3,17-S) estradiol-3,17-diglucuronide (E2-3,17-G)
Estriol (E3)	estriol-3-glucuronide (E3-3G) estriol-16-glucuronide (E3-16G) estriol-17-glucuronide (E3-17G) estriol-3,17-disulphate (E3-3,17-S) estriol-3-sulfate-17-glucuronide (E3-3S-17G)
17α-Ethynylestradiol (EE2)	ethynylestradiol-3-glucuronide (EE2-3G) ethynylestradiol-3-sulfate (EE2-3S)

Le tableau 5 présente les quantités d'estrogènes libres et conjugués excrétées naturellement par les femmes (à différentes périodes de leur vie) et par les hommes. Il apparaît tout d'abord que la quantité d'estrogènes produite par une femme varie fortement en fonction de la période de sa vie :

âge de reproduction, enceinte, ménopause. La grossesse est associée à des taux d'estrogènes extrêmement élevés et particulièrement pour E3 (sous forme libre et conjuguée). On observe également que les quantités d'estrogènes produites par les hommes sont moindres par rapport aux quantités produites par les femmes en âge de reproduction.

Tableau 5 : Excrétion journalière moyenne d'estrogènes libres et conjugués (µg) dans l'urine

	Femmes			Hommes
	En âge de reproduction	Ménopausée	Enceinte	
E1 [a]	21 (11-31)	1,3 (0,3-2,4)	1400 (930-1600)	5,4 (3,0-8,2)
βE2 [a]	8 (6-14)	0,3 (0-1,4)	520 (380-630)	1,5 (0-6,3)
E3 [a]	29 (8-65)	3,9 (2,2-7,5)	29000 (22000-35000)	3,5 (0,8-11,0)
E1-3G [b]	16 ± 8	9,5 ± 6,1	490*	NC
E1-3S [b]	5,4 ± 1,9	3,2 ± 1,7	450*	NC
E2-3G [b]	5,5 ± 3,5	4,2 ± 4,0	104*	NC
E2-17G [b]	2,5 ± 1,4	1,5 ± 1,0	90*	NC
E2-3S [b]	3,5 ± 3,2	1,3 ± 0,9	64*	NC
E3-3G [b]	10 ± 5	3,6 ± 2,3	2025*	NC
E3-16G [b]	7,2 ± 5,4	2,1 ± 1,2	3300*	NC
E3-3S [b]	3,7 ± 1,7	0,6 ± 0,3	1170*	NC

[a] valeur moyenne (min-max) d'après (Ternes et Joss, 2006)
[b] valeur moyenne ± écart-type ; femmes en âge de reproduction, n = 50 ; femmes ménopausées, n = 22 ; d'après (D'Ascenzo *et al.*, 2003)
* les valeurs présentées pour la femme enceinte sont des moyennes de 3 prélèvements réalisés sur 3 jours
NC : non communiqué

1.2.2.b. Données d'excrétion des bêtabloquants par les humains

Une fois ingérés, les bêtabloquants sont plus ou moins bien assimilés, puis ils sont excrétés sous forme inchangée ou métabolisée. Le tableau 6 présente le pourcentage de molécules excrétées sous forme inchangée ainsi que les métabolites connus de ces composés. Ce tableau 6 met en évidence des comportements variés pour les différents bêtabloquants. Ainsi par exemple, moins de 10 % du propranolol ingéré est excrété sous forme inchangée, contre plus de 70% pour le sotalol. Les données recueillies dans la littérature montrent que plusieurs bêtabloquants forment des métabolites qui ont été identifiés dans le cas de l'acébutolol, du métoprolol, du propranolol et du timolol. Au contraire, aucune preuve de métabolisation n'a été apportée pour le sotalol.

Tableau 6 : Excrétion des bêtabloquants et métabolites associés

Produit	Forme inchangée	Métabolites	Source
Acébutolol	10 - 17% (administration orale) 30 – 40% (administration intraveineuse) 39%	diacétolol acétolol	(Hernando *et al.*, 2007) (Vieno *et al.*, 2006)
Aténolol	40 – 50% (administration orale) 90% 50% de la dose orale est éliminée dans l'urine (90% sous forme inchangée)	*Pas de donnée*	(Hernando *et al.*, 2007) (Vieno *et al.*, 2006) (Maurer *et al.*, 2007)
Bétaxolol	*Pas de donnée*	*Pas de donnée*	
Bisoprolol	*Pas de donnée*	*Pas de donnée*	
Métoprolol	5 - 10% (administration orale) 3-10%	3 métabolites principaux (85% excrétion) formés par : déamination oxydante O-déalkylation suivie par une oxydation hydroxylation aliphatique	(Hernando *et al.*, 2007) (Vieno *et al.*, 2006)
Nadolol	24,6% (élimination dans l'urine)	*Pas de donnée*	(Hernando *et al.*, 2007)
Oxprénolol	*Pas de donnée*	*Pas de donnée*	
Propranolol	1 - 4% (administration orale et intraveineuse) <10%	8 métabolites la plupart des métabolites sont excrétés via l'urine : conjugués du propranolol (20-30%) 4-hydroxypropranolol (20-30%)	(Hernando *et al.*, 2007) (Maurer *et al.*, 2007)
Sotalol	>75% >75% >70% (via l'urine)	 pas de preuve de métabolisation	(Hernando *et al.*, 2007) (Vieno *et al.*, 2006) (Maurer *et al.*, 2007)
Timolol	20%	métabolites inactifs formés par rupture du cycle	(Hernando *et al.*, 2007)

1.3. Occurrence, devenir et toxicité des estrogènes et des bêtabloquants

Les estrogènes et les bêtabloquants qui sont consommés ou produits par l'organisme, sont excrétés et transitent par les stations d'épuration avant de rejoindre le milieu aquatique. Cette partie présente une revue bibliographique des concentrations d'estrogènes et de bêtabloquants mesurées en entrée et en sortie de stations d'épuration ; l'efficacité des traitements épuratoires vis-à-vis de l'élimination de ces molécules est aussi présentée. Les concentrations d'estrogènes et de bêtabloquants mesurées dans le milieu aquatique ainsi que les données concernant la dégradation de ces molécules sont également détaillées. Enfin, les conséquences de la présence de ces molécules dans l'environnement sont présentées.

1.3.1 Concentrations

1.3.1.a. Concentrations dans la phase dissoute des eaux usées

Une étude exhaustive a été réalisée en compilant 115 articles de recherche et 2 rapports français durant une période allant de janvier 1997 à juin 2006 pour les études internationales et de 1997 à février 2007 pour les études françaises (Miege *et al.*, 2009b). Les résultats présentés sont issus d'échantillons moyens 24h (asservis au débit), ce qui représente la seule façon d'obtenir des données représentatives des eaux usées de la STEP. Seules les données obtenues dans des STEP réelles ont été retenues (pas de pilotes ou d'expérimentation en réacteur).

Les données collectées couvrent les concentrations retrouvées dans les influents et les effluents de STEP de type boue activée, éventuellement associée à un décanteur primaire, un traitement de l'azote et/ou du phosphore, ou un traitement tertiaire. Seules les données individuelles, ou les valeurs moyennes dont le nombre de données utilisées est précisé ont été exploitées.

Les estrogènes

De nombreuses données étaient exploitables pour les hormones qui sont souvent recherchées dans les eaux usées, en raison de leur potentiel perturbateur endocrinien (tableau 7). En effet, pour les influents, plus de 100 résultats de mesure ont été exploités pour E1 et βE2, 70 pour EE2 et 36 pour αE2 et E3. Pour les effluents, E1 et βE2 restent les hormones les plus recherchées (avec respectivement 79 et 63 données), suivent E3 et EE2 pour lesquelles 33 données sont disponibles et enfin αE2 pour laquelle 9 résultats de concentration ont été répertoriés.

Dans les influents, les hormones sont quantifiées dans tous les échantillons, sauf l'hormone de synthèse EE2 qui est quantifiée dans 91 % des échantillons. Les concentrations moyennes calculées varient entre 4,2 (pour EE2) et 115 ng/L (pour E3). Les concentrations les plus faibles (0,4 ng/L) sont mesurées pour EE2, alors que les concentrations peuvent atteindre 660 ng/L pour E3. Dans les influents, c'est donc E3 qu'on retrouve en plus forte concentration, devant E1 et βE2 (respectivement 115, 67 et 22 ng/L en moyenne). Les concentrations moyennes sont inférieures à 10 ng/L pour αE2 et EE2.

Dans les effluents, aucune hormone n'est quantifiée systématiquement. Alors que E1 et E3 sont quantifiées dans plus de 90 % des échantillons, αE2, βE2 et EE2 sont quantifiées dans 59 à 74 % des échantillons. Les concentrations moyennes varient entre 0,8 et 20,9 ng/L pour αE2 et E1, respectivement. Les concentrations les plus faibles (0,1 ng/L) sont mesurées pour αE2 alors que les concentrations peuvent atteindre 275 ng/L pour E3. Dans les effluents, c'est E1 qu'on retrouve en plus forte concentration, devant E3 et βE2 (respectivement 20,9 ; 13,1 et 2,8 ng/L en moyenne). Les concentrations moyennes des hormones αE2 et EE2 sont inférieures à 1 ng/L.

Que ce soit pour les influents ou les effluents, des coefficients de variation importants (compris entre 58 et 365 %, tableau 7) sont observés. Bien que ces valeurs paraissent élevées, elles mettent en évidence, compte tenu de la quantité de paramètres différents (pays étudiés, type de traitement, méthodes analytiques), des concentrations du même ordre de grandeur.

Tableau 7 : Concentrations en estrogènes dans les influents et effluents de STEP de type boue activée d'après Miege et al., 2009b

	Concentration dans les influents (ng/L)						Fréquence de quantification dans les influents (%)	Concentration dans les effluents (ng/L)						Fréquence de quantification dans les effluents (%)
	moyenne	CV (%)	médiane	min	max	n		moyenne	CV (%)	médiane	min	max	n	
E1	67,2	95	60,0	2,4	67,0	109	100	20,9	121	10,0	0,6	95,0	79	93
αE2	7,4	58	6,3	1,5	17,2	36	100	0,8	110	0,6	0,1	3,1	9	64
βE2	22,2	78	18,6	2,5	125	108	100	2,8	165	1,5	0,3	30,0	63	74
E3	115	112	69,5	14,6	660	36	100	13,1	365	1,4	0,4	275	33	92
EE2	4,2	237	1,9	0,4	70,0	70	91	0,9	120	0,5	0,2	5,0	33	59

Les bêtabloquants

Dans la littérature scientifique, les bêtabloquants sont beaucoup moins étudiés que les hormones estrogéniques. En effet, sur les 10 molécules étudiées, seules 4 ressortent de cette étude (tableau 8) : ATE, BIS, MET et PROP. Pour les influents, 4 données sont utilisables pour PROP alors que seulement 1 donnée est disponible pour ATE et MET. Pour BIS, aucune donnée n'est exploitable. En ce qui concerne les effluents, on retrouve plus de résultats de mesures : 18 données pour ATE et BIS, 24 pour PROP et 37 pour MET.

Dans les influents, ATE, MET et PROP sont quantifiés dans tous les échantillons. Les concentrations varient entre 30 ng/L (pour ATE) et 160 ng/L pour MET.

Dans les effluents, les bêtabloquants sont quantifiés dans presque tous les échantillons (100 % sauf 97 % pour MET). Les concentrations moyennes varient entre 154 ng/L (pour ATE) et 709 ng/L (pour BIS). Les concentrations les plus faibles (10,0 ng/L) sont mesurées pour ATE, MET et PROP alors que des concentrations peuvent atteindre 1430 ng/L pour BIS. Dans les effluents, c'est BIS qu'on retrouve en plus forte concentration, devant MET, PROP et ATE (respectivement 709, 338, 341 et 154 ng/L en moyenne).

Tableau 8 : Concentrations en bêtabloquants dans les influents et effluents de STEP de type boue activée d'après Miege et al., 2009b

	Concentration dans les influents (ng/L)						Fréquence de quantification dans les influents (%)	Concentration dans les effluents (ng/L)						Fréquence de quantification dans les effluents (%)
	moyenne	CV (%)	médiane	min	max	n		moyenne	CV (%)	médiane	min	max	n	
ATE	30,0					1	100	154	44	150	10,0	380	18	100
BIS	/	/	/	/	/	/	/	709	68	637	303	1430	18	100
MET	160					1	100	338	55	373	10,0	688	37	97
PROP	74,7	41	65,0	50,0	119	4	100	341	54	381	10,0	615	24	100

/ pas de données individuelles rapportées

Afin de collecter des données représentatives des concentrations des autres bêtabloquants dans la phase dissoute des eaux usées, une recherche bibliographique complémentaire a été menée. Ainsi, les concentrations en ACE et SOT dans les influents (échantillons moyen 24h) sont respectivement comprises entre 390 et 510 ng/L (n = 3), et entre 640 et 830 ng/L (n = 3) (Vieno *et al.*, 2006). Dans les effluents de STEP (échantillons moyen 24h), ACE a été quantifié entre 80 et 230 ng/L (n = 10, n >LQ = 9), SOT entre 160 et 300 ng/L (n = 3) et OXP entre 20 et 50 ng/L (n = 7, n > LQ = 5) (Andreozzi *et al.*, 2003; Vieno *et al.*, 2006). Une autre étude menée en France rapporte des concentrations en OXP et BET (n = 24) inférieures à la limite de détection (estimée à 15 ng/L pour les 2 molécules) (Miege *et al.*, 2006).

1.3.1.b. Teneurs dans les matières en suspension d'eaux usées et dans les boues de stations d'épuration

Les estrogènes

Très peu d'études s'intéressent aux teneurs d'estrogènes retrouvées dans la phase solide des eaux usées (boue, ou matières en suspension –MES-) en raison du manque de protocoles analytiques adaptés.

Les estrogènes sont rarement mesurés dans les MES (Labadie et Budzinski, 2005a; Herry-Leroy *et al.*, 2006; Noppe *et al.*, 2007). En effet, pour ce type de matrice, en plus du problème lié au protocole analytique s'ajoute celui de la quantité de matière disponible. Seules E1 et βE2 ont été quantifiées dans les MES et la concentration maximale retrouvée est inférieure à 0,2 ng/L pour les effluents de STEP (Labadie et Budzinski, 2005a; Herry-Leroy *et al.*, 2006; Noppe *et al.*, 2007). Dans les MES d'influents, E1 est systématiquement quantifiée (n = 5) et sa concentration peut atteindre 10,9 ng/L (Herry-Leroy *et al.*, 2006). Ces résultats mettent en évidence que la majorité des estrogènes mesurés dans les eaux usées se concentrent dans la phase dissoute. En effet, dans les effluents de STEP, Labadie *et al.* (2005) ont quantifié E1 dans la phase dissoute entre 17,2 et 71 ng/L ; cette molécule étant non quantifiée dans les MES issues de ces échantillons.

Les teneurs dans les boues de STEP sont très variables (tableau 9). E1 est mesurée à des teneurs variant entre < 2 et 54,3 ng/g, la plus forte valeur étant retrouvée pour une boue déshydratée. De même, la teneur de βE2 varie entre < 2 et 49 ng/g. L'hormone de synthèse EE2 est souvent non quantifiée. Lorsque cette hormone est détectée, sa teneur n'excède généralement pas 3 ng/g ; cependant 18 ng/g ont été mesurés dans une boue en excès (Muller *et al.*, 2008). Une seule étude fait référence à l'analyse de E3 dans les boues de STEP mais la teneur s'avère être inférieure à la LQ (Muller *et al.*, 2008). Enfin, seulement un auteur a analysé αE2 à une teneur maximale de 10,2 ng/g (Janex-Habibi *et al.*, 2009).

Tableau 9 : Teneurs en estrogènes (min – max) mesurées dans les boues et MES des eaux usées en ng/g de poids sec

	Teneur en ng/g					n	Références
	E1 (n >LQ)	αE2 (n > LQ)	βE2 (n > LQ)	E3 (n > LQ)	EE2 (n > LQ)		
MES (influent)	3,0 – 10,9 ng/L (5)	/	0,5 – 3,1 ng/L (3)	/	< 0,8 ng/L (0)	5	(Herry-Leroy *et al.*, 2006)
MES (effluent)	< LD (0)	/	< LD (0)	< LD (0)	< LD (0)	3	(Labadie et Budzinski, 2005a)
	LD estimée entre 0,4 et 1,9 ng/g						
	0,2 ng/L (1)	/	< 0,2 ng/L (0)	/	< 0,4 ng/L (0)	5	(Herry-Leroy *et al.*, 2006)
Boue activée	37 (1)	/	5 – 17 (2)	/	4 (1)	2	(Ternes *et al.*, 2002)
	< 2 (0)	/	2,1 (1)	/	2,4 (1)	2	(Joss *et al.*, 2004)
	11,8*	/	0,31*	/	0,42*	4	(Braga *et al.*, 2005)
	3,7 – 6,5 (4)	/	2,6 – 10,9 (4)	/	< 1 (0)	4	(Herry-Leroy *et al.*, 2006)
Boue déshydratée	2 – 8	/	1 – 10	< 1	1 – 16	NC	(Muller *et al.*, 2008)
	14,3*	/	0,57*	/	0,61*	4	(Braga *et al.*, 2005)
	54,3 (1)	/	26,9 (1)	/	3,5 (1)	1	(Herry-Leroy *et al.*, 2006)
Boue digérée	16 (1)	/	9 – 49 (2)	/	2 – 17 (2)	2	(Ternes *et al.*, 2002)
	22,8 – 27,8 (2)	/	4,9 – 5,4 (2)	/	< 1,5 (0)	2	(Andersen *et al.*, 2003)
Boue primaire	7,6 – 20,0 (3)	/	7,9 – 20,9 (3)	/	< 1 (0)	3	(Herry-Leroy *et al.*, 2006)
Boue en excès	3 – 8	/	1,5 – 5	< 1	1 – 18	NC	(Muller *et al.*, 2008)
	7 (1)	/	1,7 (1)	/	3 (1)	1	(Andersen *et al.*, 2003)
Boue biofiltre	8,0 (1)	/	10,4 (1)	/	< 1 (0)	1	(Herry-Leroy *et al.*, 2006)
Boue traitée	2,5 (1)	/	4,5 (1)	/	< 1 (0)	1	(Herry-Leroy *et al.*, 2006)
	1,4 – 107,2 *809 pour le compost* (18)	< 1 – 10,2 (NC)	< 1 – 18,2 (NC)	/	< 1 – 2,1 (NC)	18	(Janex-Habibi *et al.*, 2009)

n : nombre d'échantillons analysés
/ : non analysé
* teneurs moyennes
LD : limite de détection
NC : non communiqué

Les bêtabloquants

Les données sur les concentrations de bêtabloquants dans les matrices solides sont très rares en raison du manque de méthodes analytiques adaptées et du caractère relativement hydrophile de ces molécules. Cependant, il est important de connaître la répartition des bêtabloquants dans les différents compartiments afin de mieux cerner leur comportement dans les STEP. Le seul article trouvé dans ce domaine (Radjenovic *et al.*, 2009a) présente des teneurs mesurées dans différents types de boues (primaires, secondaires (type boue activée ou bioréacteur à membrane) et traitées) prélevées chaque semaine durant 7 semaines. Les bêtabloquants ciblés dans cette étude étaient ATE, PROP, MET et SOT. Seuls ATE et PROP ont été quantifiés dans les boues analysées (LQ estimée à environ 1 ng/g pour SOT et à 12,7 ng/g, 7,8 ng/g et 6,2 ng/g pour MET dans la boue traitée, les boues primaires ou secondaires, et les boues issues du bioréacteur à membrane, respectivement). Pour ATE, les teneurs mesurées entre 7,0 ng/g (± 0,9 %) dans les boues traitées et 84,4 ng/g (± 40 %) dans les boues primaires. Dans les boues secondaires, cette molécule est quantifiée à 62,6 ng/g (± 86 %). Dans les boues issues du bioréacteur à membrane, ATE n'est pas quantifié (LQ = 5,6 ng/g). Concernant PROP, les résultats sont proches quelque soit le type de matrice avec en plus, des

coefficients de variation relativement faibles (compris entre 9,9 et 17,8 %). Cette molécule est quantifiée dans les 35 boues analysées à des teneurs comprises entre 26,2 ng/g (± 11 %) pour la boue traitée et 47,4 ng/g (± 17 %) pour la boue secondaire.

Aucune étude faisant référence a l'analyse de bêtabloquants dans les MES d'eaux usées n'a été retrouvée.

1.3.1.c Efficacité d'élimination des estrogènes et des bêtabloquants par les stations d'épuration

Les estrogènes et les bêtabloquants ont déjà été quantifiés en entrée et en sortie de station d'épuration. Cette observation soulève la question de l'élimination de ces molécules par les traitements épuratoires. En effet, ces molécules étant quantifiées en sortie de station d'épuration, il semble que leur élimination ne soit pas totale. Cette partie s'attache donc à présenter les efficacités d'élimination observées pour chaque type de traitement épuratoire (traitements primaire, secondaire et tertiaire) vis-à-vis des molécules d'intérêt. Dans la majorité des études, seule la phase dissoute est analysée ; ces rendements d'élimination ne prennent donc généralement pas en compte la quantité de molécules adsorbées sur la phase solide.

Traitement primaire

Le traitement primaire intervient après l'étape de prétraitement qui consiste à éliminer les éléments solides ou particulaires les plus grossiers (dégrillage, dessablage, dégraissage). Il consiste à séparer par décantation les particules de la phase dissoute. Les particules se déposent au fond d'un décanteur pour former les boues primaires qui sont ensuite récupérées au moyen d'un système de raclage. Le traitement primaire peut être couplé à un traitement physico-chimique qui permet d'agglomérer les particules par adjonction d'agents coagulants et floculants (sels de fer ou d'alumine, chaux...). Les amas de particules ainsi formés, ou "flocs", peuvent être séparés de l'eau par décantation ou par flottation.

Le traitement primaire élimine 50 à 55% des matières en suspension et réduit d'environ 30% la demande biochimique en oxygène (DBO) et la demande chimique en oxygène (DCO).

Différentes études menées sur des stations d'épuration ou sur des pilotes, ont montré l'absence d'impact du traitement primaire sur l'élimination des estrogènes (formes libres et conjuguées) que ce soit dans les phases dissoutes ou particulaires (Andersen *et al.*, 2003; Esperanza *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2008). Cependant, certains auteurs ont noté un impact du traitement primaire sur certains estrogènes (E1, βE2 et EE2). Ainsi, Müller *et al* (2008) ont noté une légère diminution de la concentration de E1 libre dans la phase dissoute lors du traitement primaire (de 80-

81 à 64-69 ng/L en moyenne). De plus, Esperanza *et al* (2007) ont montré une diminution de l'ordre de 50% des concentrations de E1 dans la phase particulaire (22 à 10, et 9 à 5 ng/L) entre l'entrée et la sortie du traitement primaire. Par ailleurs, une étude menée sur E1 et βE2 dans la phase dissoute a montré un abattement de 20% pour βE2 mais une augmentation de 40% de la concentration en E1 lors du traitement primaire (Carballa *et al.*, 2004). Les auteurs expliquent cette formation de E1 par la déconjugaison qui peut se produire lors du traitement et par l'oxydation de βE2 en E1. En revanche, pour EE2, Esperanza *et al* (2007) ont observé une légère augmentation (facteur 1,5 à 2,5) des concentrations dans les MES lors du traitement primaire. Enfin, l'étude d'un traitement primaire couplé à un traitement physico-chimique (ajout de $FeCl_3$) a mis en évidence l'absence quasi totale d'élimination des estrogènes (abattement de 7% pour E1 et de 0% pour βE2) (Braga *et al.*, 2005).

Pour les bêtabloquants, l'impact du traitement primaire n'a pas, à notre connaissance, été étudié. Cependant, une étude a été menée sur l'influence du traitement primaire sur l'élimination des produits pharmaceutiques et d'hygiène (Carballa *et al.*, 2005). Cette étude a montré que les muscs et le diclofénac sont éliminés de 50 à 70% par le traitement primaire, alors que les autres produits pharmaceutiques étudiés (des tranquillisants, des anti-épileptiques et des anti-inflammatoires) étaient éliminés à moins de 25% par ce traitement. Dans cette même étude, Carballa *et al* (2005) ont montré que la carbamazépine et l'ibuprofène, des médicaments aux log Kow du même ordre que ceux des bêtabloquants (log Kow entre 2.3 à 4.5), ne sont pas affectés par l'addition de coagulant lors du traitement primaire.

Traitement secondaire

Le traitement secondaire, ou biologique, fait appel aux micro-organismes naturellement présents dans le milieu pour dégrader la pollution. Ce traitement est indispensable pour minimiser les polluants dissous, essentiellement les matières organiques, des eaux usées. On distingue les procédés biologiques à cultures libres (boues activées, bioréacteur à membranes) où les bactéries sont en contact permanent avec les matières polluantes, des procédés biologiques à cultures fixées (biofiltres, lits bactériens, disques biologiques, filtres plantés) où les bactéries se développent sur un support (biofilm). A l'issu du traitement secondaire, des boues biologiques issues de la dégradation des matières organiques sont récupérées, généralement par clarification (décantation).

Les procédés de type boue activée sont les procédés les mieux documentés. Dans sa revue bibliographique, Miege *et al* (2009) met en évidence l'efficacité d'élimination des hormones par les procédés de type boue activée avec des valeurs moyennes d'abattement de la phase dissoute supérieurs à 80% pour αE2, E3 et βE2 (n = 6, 36 et 52, respectivement) et compris entre 60 et 80% pour EE2 et E1 (n = 46 et 59, respectivement). Pour les bêtabloquants, l'efficacité des boues activées

est variable d'une molécule à l'autre : alors que plus de 90% du propranolol est apparemment éliminé (n = 1), moins de 20% de l'aténolol et du métoprolol sont abattus (n = 29 et 30, respectivement).

Dans cet article (Miege *et al.*, 2009b), l'efficacité des procédés de type boue activée faible charge (traitement de l'azote) est comparée à l'efficacité des procédés à cultures fixées, des bioréacteurs à membrane et des lagunes. Si l'on examine la base de données utilisée pour réaliser cet article, il apparaît que pour tous les estrogènes, sauf EE2, les abattements obtenus avec le procédé boue activée sont légèrement inférieurs à ceux obtenus avec les autres procédés étudiés (tableau 10). Cependant, les différences observées pour ces molécules entre les performances des différents procédés ne sont pas très importantes : les rendements varient entre 71 et 95% pour E1, entre 79 et 94% pour αE2, entre 88 et 97% pour βE2 et entre 94 et 100% pour E3. Au contraire, pour EE2 les meilleurs abattements sont obtenus avec la boue activée : 69% d'élimination contre 14, 27 et 55% avec respectivement la lagune, les cultures fixées et le bioréacteur à membrane. En ce qui concerne les bêtabloquants, les rendements d'élimination ont seulement pu être collectés pour des procédés de type boue activée. Miege et al (2009) met en évidence pour d'autres produits pharmaceutiques étudiés (antibiotiques et analgésiques) que les boues activées faible charge sont généralement les procédés les moins performants parmi les différents traitements biologiques utilisés.

Tableau 10 : Rendements d'élimination (%) obtenus pour les estrogènes en fonction des procédés épuratoires employés (à partir de la base de données utilisée pour l'article Miege et al (2009))

	Rendements d'élimination (%)							
	Boue activée	n	Procédés à culture fixée	n	Bioréacteur à membranes	n	Lagune	n
E1	71	51	92	4	75	3	95	2
αE2	79	6	94	2	/	/	92	2
βE2	88	44	97	3	95	3	94	2
E3	94	35	/	/	100	3	/	/
EE2	69	43	27	3	55	6	14	2

/ : pas de données
n = nombre de données

Traitement tertiaire

Les filières de traitement de l'eau peuvent comporter, après le traitement secondaire, une ultime étape de traitement appelée traitement tertiaire. Un traitement tertiaire peut notamment être mis en place pour éliminer les substances fertilisantes (phosphates et nitrates) ou les germes pathogènes (traitement par le chlore ou l'ozone). Le traitement tertiaire peut mettre en oeuvre des procédés biologiques, chimique ou physico-chimique.

Peu d'auteurs se sont intéressés à l'efficacité d'élimination des produits pharmaceutiques par les traitements tertiaires. Cependant, les efficacités des traitements tertiaires de type traitement chimique (ajout de $FeCl_3$) ou filtration sur sable ont été prouvées sur E1: respectivement 37 et 93% d'élimination ont été mesurés pour ces étapes (Zorita *et al.*, 2009). Une autre étude (Nakada *et al.*, 2007) a mis en évidence une faible élimination de E1 (rendement d'élimination de 23% bien inférieur aux 93% observés par Zorita *et al* (2009)). Par ailleurs, Nakada *et al* (2007) ont montré une légère efficacité de l'ozonation sur l'élimination de E1 (rendement d'élimination de l'ordre de 30%). Pour βE2 et E3, qui sont déjà presque totalement éliminés par le traitement secondaire (abattement supérieur à 80%), il est difficile de juger de l'efficacité de la filtration sur sable et de l'ozonation (Nakada *et al.*, 2007). Pour les bêtabloquants, aucune étude évaluant l'efficacité d'un traitement tertiaire n'a été trouvée. L'efficacité de l'ozonation sur l'élimination de différents produits pharmaceutiques (antiseptiques, anti-inflammatoires, antibiotiques) a été mise en évidence par Nakada *et al* (2007), alors que la filtration sur sable semble être inefficace pour éliminer ces composés de nature plutôt hydrophile. Par ailleurs, l'absence d'efficacité d'élimination par un traitement chimique (ajout de $FeCl_3$) a été observée sur 8 produits pharmaceutiques (ibuprofen, naproxen, diclofénac, carbamazépine, diazépam, galaxolide, tonalide et celestolide) (Serrano *et al.*, 2009).

1.3.1.d. Concentrations dans les milieux aquatiques récepteurs

Les estrogènes

Dans le monde, diverses études ont montré la présence d'estrogènes et de bêtabloquants dans les eaux de surface (rivières, lacs, etc.). La majorité des études présentées ici visent à éctudier l'occurrence des estrogènes dans le milieu aquatique sans pour autant étudier spécifiquement l'impact des STEP sur ces milieux. Cependant, tous les sites étudiés recoivent des effluents de STEP et/ou traversent des zones très urbanisées. Le tableau 11 présente les gammes de concentrations d'estrogènes sous formes libres et conjuguées retrouvées dans les phases dissoutes de rivières et de lacs de différents pays.

Dans un premier temps, on remarque que les concentrations d'estrogènes dans les eaux de surface sont assez faibles : on dépasse rarement 10 ng/L, et on est généralement en dessous des limites de quantification. Cependant, ces molécules agissent à très faibles doses et leur présence dans le milieu peut avoir des effets sur l'écosystème même à des concentrations de 1 ng/L (Hansen *et al.*, 1998).

C'est E1 qui est la plus fréquemment quantifiée dans les eaux de surface et aux plus fortes concentrations. La concentration d'E1 mesurée dans le milieu aquatique peut atteindre 47 ng/L en Italie (Vigano *et al.*, 2006) et 65 ng/L en Chine (Peng *et al.*, 2008). Cependant, l'étude réalisée en Chine a été menée sur une rivière très polluée car impactée par de nombreux rejets de STEP, même si les sites de prélèvements ne se situaient pas à proximité de ces rejets ; aucun détail permettant d'expliquer cette concentration élevée n'est donné pour l'étude menée en Italie. Dans la plupart des pays, la concentration maximale d'E1 ne dépasse cependant pas 10 ng/L.

L'αE2 est la molécule la moins souvent étudiée. Lorsqu'elle est quantifiée dans le milieu, sa concentration maximale n'excède pas 3 ng/L.

Plusieurs études ont aussi mesuré βE2 dans le milieu naturel. On n'observe pas de différence significative en fonction des pays étudiés, et globalement, lorsque βE2 est quantifiée, sa concentration n'excède pas 4 ng/L. Les concentrations les plus élevées ont été retrouvées aux Pays-Bas (5,5 ng/L, n=113), en Allemagne (3,6 ng/L, n=31), en République Tchèque (3,8 ng/L, n=23) et en Italie (4 ng/L, n=3).

Concernant E3, les concentrations mesurées en Italie sont supérieures à celles de Chine, de France et de République Tchèque. En effet, alors que E3 n'est pas quantifiée en France et qu'elle l'est à un niveau très faible en Chine (1 ng/L) et en République Tchèque (1,7 ng/L), on la retrouve dans tous les échantillons prélevés en Italie et à des concentrations pouvant atteindre 50 ng/L ; cependant, comme aucun détail n'est mentionné sur le site échantillonné, on ne peut expliquer cette concentration qui semble très élevée (plus proche des concentrations généralement mesurées dans les eaux usées que dans les eaux de surface). Cette molécule est quantifiée dans un seul des 28 échantillons prélevés en Espagne à une concentration de 11,6 ng/L.

EE2 est rarement quantifiée dans les eaux de surface, ce qui correspond aux résultats observés dans les effluents de STEP (EE2 est l'estrogène le moins souvent quantifié dans les effluents ; sa concentration médiane étant de 0,5 ng/L). Sur les 13 publications étudiées ici, tous pays confondus, EE2 est quantifiée dans moins de 14 % des échantillons. Cette molécule n'a jamais été quantifiée en France ni en Espagne. La concentration maximale a été retrouvée en Allemagne (5,1 ng/L), cependant, la concentration moyenne (n = 31, n>LQ = 15) obtenue sur cette même étude est de 0,8 ng/L (Kuch et Ballschmiter, 2001). Cependant, l'étude menée en Allemagne a été réalisée sur des rivières recevant des effluents de STEP et certains échantillons ont été collectés 1km en aval du rejet de STEP.

Enfin, quelques rares auteurs ont analysé des molécules conjuguées. Ainsi, E1-3S a été analysée dans des eaux de surface provenant d'Espagne et du Japon à des concentrations allant jusqu'à 7 ng/L. Une étude s'intéresse également à E2-3S dont la concentration n'excède pas 0,8 ng/L

dans les eaux de surface du Japon. Par ailleurs, E2-17G qui a été analysé dans 6 échantillons d'eau en Espagne n'a jamais été détecté.

Globalement, en terme de fréquence de quantification, c'est E1 qui est le plus souvent quantifiée (dans 50 % des échantillons). On trouve ensuite, βE2, EE2, αE2 et E3, qui sont quantifiées respectivement dans 18, 14, 13 et 8 % des échantillons. Ces résultats coïncident avec ceux observés dans les eaux traitées ; en effet, dans les effluents de STEP, E1 était également l'estrogène le plus quantifié (en terme de fréquence et de niveau de concentration) et αE2, βE2 et EE2 étaient quantifiés dans 59 à 74 % des échantillons. Au contraire, alors que E3 était quantifié dans la majorité des effluents (92 % d'entre eux), cette molécule est rarement quantifiée dans les eaux de surface. Concernant les molécules conjuguées, alors que les conjugués sulfate (E1-3S et E2-3S) sont quantifiés dans plus de 75 % des échantillons le conjugué glucuronide E2-17G n'est jamais détecté (n = 25 échantillons analysés). De plus, les auteurs ayant analysé les estrogènes avant et après une étude de déconjugaison n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les concentrations en hormones libres et totales (Labadie et Budzinski, 2005; Belfroid *et al.*, 1999).

Comme observé pour les eaux usées, compte tenu des difficiltés analytiques rencontrées, peu d'études présentent des concentrations d'estrogènes dans les MES d'eau de surface. Seuls 2 auteurs ont analysés les estrogènes dans ces matrices (Labadie et Budzinski, 2005a; Herry-Leroy *et al.*, 2006; Noppe *et al.*, 2007). Sur les 18 échantillons analysés, Labadie *et al.* (2005) n'ont jamais détecté les molécules recherchées (E1, βE2, E3 et EE2 ; LD estimées entre 0,4 et 1,9 ng/g). En revanche, Noppe *et al.* (2007) ont quantifiés E1 et βE2 dans respectivement 6 et 2 des 56 échantillons analysés (αE2 et EE2 n'ont jamais été quantifiées ; LQ estimée à 0,2 ng/g); les teneurs mesurées en E1 et βE2 n'excèdent jamais 1 ng/g.

Tableau 11 : Concentrations en estrogènes libres et conjugués mesurées dans les phases dissoutes d'eaux de surface de différents pays

Molécules	Pays	Concentrations en ng/L		Nombre de mesures (n)	n > LQ	Référence
		Min.	Max.			
E1	Allemagne	0,1	4,1	31	29	(Kuch et Ballschmiter, 2001)
	Chine	8	65	12	11	(Peng *et al.*, 2008)
	Espagne	0,75	22	28	11	(Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004; Farre *et al.*, 2006; Kuster *et al.*, 2008)
	France	0,3	0,3	8	1	(Labadie et Budzinski, 2005b; Vulliet *et al.*, 2008)
	Italie	4	47	3	3	(Vigano *et al.*, 2006)
	Japon	0,2	6,6	8	8	(Isobe *et al.*, 2003)
	Pays-Bas	0,3	7,2	113	52	(Belfroid *et al.*, 1999; Vethaak *et al.*, 2005)
	République Tchèque	7,4	7,4	23	1	(Morteani *et al.*, 2006)
	Etats-Unis	< 0,3	< 0,3	4	0	(Boyd *et al.*, 2003)
αE2	Allemagne	0,15	2,0	31	8	(Kuch et Ballschmiter, 2001)
	Chine	1	2	12	7	(Peng *et al.*, 2008)
	France	< 0,03	< 0,03	2	0	(Vulliet *et al.*, 2008)
	Pays-Bas	0,2	3,0	113	6	(Belfroid *et al.*, 1999; Vethaak *et al.*, 2005)
βE2	Allemagne	0,15	3,6	31	14	(Kuch et Ballschmiter, 2001)
	Chine	1	2	12	5	(Peng *et al.*, 2008)
	Espagne	< 0,5	< 2,5	28	0	(Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004; Farre *et al.*, 2006; Kuster *et al.*, 2008)
	France	< 0,5	< 1,0	8	0	(Labadie et Budzinski, 2005b; Vulliet *et al.*, 2008)
	Italie	1	4	3	3	(Vigano *et al.*, 2006)
	Japon	0,8	1	8	3	(Isobe *et al.*, 2003)
	Pays-Bas	0,3	5,5	113	8	(Belfroid *et al.*, 1999; Vethaak *et al.*, 2005)
	République Tchèque	1,3	3,8	23	8	(Morteani *et al.*, 2006)
	Etats-Unis	< 0,1	< 0,1	4	0	(Boyd *et al.*, 2003)
E3	Chine	1	1	12	1	(Peng *et al.*, 2008)
	Espagne	11,6	11,6	28	1	(Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004; Farre *et al.*, 2006; Kuster *et al.*, 2008)
	France	< 1,0	< 2,2	6	0	(Labadie et Budzinski, 2005b)
	Italie	4	50	3	3	(Vigano *et al.*, 2006)
	République Tchèque	1,7	1,7	23	1	(Morteani *et al.*, 2006)
EE2	Allemagne	0,10	5,1	31	15	(Kuch et Ballschmiter, 2001)
	Chine	1	1	12	1	(Peng *et al.*, 2008)
	Espagne	< 0,62	< 3,22	28	0	(Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004; Farre *et al.*, 2006; Kuster *et al.*, 2008)
	France	< 1,0	< 1,8	8	0	(Labadie et Budzinski, 2005b; Vulliet *et al.*, 2008)
	Italie	2	2	3	1	(Vigano *et al.*, 2006)
	Pays-Bas	0,3	4,3	113	5	(Belfroid *et al.*, 1999; Vethaak *et al.*, 2005)
	République Tchèque	1,4	4,6	23	8	(Morteani *et al.*, 2006)
E1-3S	Espagne	0,44	7	25	17	(Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004; Kuster *et al.*, 2008)
	Japon	0,3	0,9	8	8	(Isobe *et al.*, 2003)
E2-3S	Japon	0,2	0,8	8	6	(Isobe *et al.*, 2003)
E2-17G	Espagne	< 0,50	< 2,24	25	0	(Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004; Kuster *et al.*, 2008)

Les bêtabloquants

Le tableau 12 présente les concentrations des 10 bêtabloquants étudiés retrouvées dans les eaux de surface de différents pays d'Europe. Sur les 10 bêtabloquants étudiés, seul l'oxprénolol n'est jamais mesuré.

Tableau 12 : Concentrations en bêtabloquants mesurées dans la phase dissoute d'eaux de rivières de différents pays d'Europe

Molécules	Pays	Concentrations en ng/L		Nombre de mesures (n)	n > LQ	Référence
		Min.	Max.			
Acébutolol	Finlande	< 0,8	8	5	4	(Vieno *et al.*, 2006)
Aténolol	Espagne	< 9	250	10	NC	(Gros *et al.*, 2006)
	Finlande	< 11,8	25	5	3	(Vieno *et al.*, 2006)
	France	12	36	2	2	(Paffoni *et al.*, 2006)
	Italie	3,44	242	8	8	(Calamari *et al.*, 2003)
	Pologne	< 1	22	2	1	(Kasprzyk-Hordem *et al.*, 2007)
	Royaume Uni	< 1	60	4	3	(Kasprzyk-Hordem *et al.*, 2007)
Bétaxolol	Allemagne	< 10	28	45	1	(Ternes, 1998)
Bisoprolol	Allemagne	< 10	2900	45	19	(Ternes, 1998)
	France	< 10	< 10	2	0	(Paffoni *et al.*, 2006)
Métoprolol	Allemagne	<10	2200	45	38	(Ternes, 1998)
	Espagne	< 3	< 3	10	0	(Gros *et al.*, 2006)
	Finlande	< 3,8	116	5	4	(Vieno *et al.*, 2006)
	France	< 10	10	2	1	(Paffoni *et al.*, 2006)
	Norvège	< 1	224	25	24	(Wiegel *et al.*, 2004)
	Pologne	51	155	2	2	(Kasprzyk-Hordem *et al.*, 2007)
	Royaume Uni	< 0,5	8	4	3	(Kasprzyk-Hordem *et al.*, 2007)
Nadolol	Allemagne	< 10	< 10	45	0	(Ternes, 1998)
Oxprénolol						
Propranolol	Allemagne	< 10	590	45	26	(Ternes, 1998)
	Espagne	< 2	< 2	10	0	(Gros *et al.*, 2006)
	France	< 10	12	2	1	(Paffoni *et al.*, 2006)
	Pologne	< 0,5	< 0,5	2	0	(Kasprzyk-Hordem *et al.*, 2007)
	Royaume Uni	< 0,5	37	6	4	(Hilton et Thomas, 2003; Kasprzyk-Hordem *et al.*, 2007)
Sotalol	Espagne	< 18	70	10	NC	(Gros *et al.*, 2006)
	Finlande	< 3,9	52	5	4	(Vieno *et al.*, 2006)
	France	19	63	2	2	(Paffoni *et al.*, 2006)
Timolol	Allemagne	< 10	10	45	1	(Ternes, 1998)

NC : non communiqué

D'un point de vue général, les concentrations dans les eaux de surface sont très variables d'un pays et d'une molécule à l'autre. Cependant, ces études sont menées sur des sites variés et avec des objectifs différents. Ainsi, certains auteurs s'intéressent à l'occurrence des bêtabloquants sur une rivière (Wiegel *et al.*, 2004), d'autres étudient l'impact des STEP sur le milieu récepteur (Vieno *et al.*, 2006), d'autres étudient l'impact des STEP sur la qualité de la ressource en eau (Paffoni *et al.*, 2006), enfin certains mettent en application leur méthode analytique sur des matrices environnementales sans donner de détails sur les sites de prélèvement (Gros *et al.*, 2006).

On peut noter par exemple que le bisoprolol qui n'est jamais quantifié en France (n = 2) peut atteindre 2900 ng/L en Allemagne. Cependant, la concentration médiane du bisoprolol en Allemagne est inférieure à la LD estimée à 10 ng/L (Ternes, 1998), ce qui correspond aux résultats de l'étude menée en France. Par ailleurs, le métoprolol dont la concentration est toujours inférieure à 3 ng/L dans les échantillons provenant d'Espagne (n = 10) est quantifié dans les 2 échantillons polonais (entre 51 et 155 ng/L). Il est donc difficile d'extraire de ce tableau des concentrations moyennes, tant les plages de concentrations sont étendues : < 0,8 – 8 ng/L pour l'acébutolol, < 1 – 250 ng/L pour l'aténolol, < 10 – 28 ng/L pour le bétaxolol, < 10 – 2900 ng /L pour le bisoprolol, < 0,5 – 2200 ng/L pour le métoprolol, < 0,5 – 590 ng/L pour le propranolol, < 3.9 – 70 ng/L pour le sotalol.

Les concentrations maximales sont souvent retrouvées dans les rivières allemandes : 2900 ng/L pour le bisoprolol, 2200 ng/L pour le métoprolol et 590 ng/L pour le propranolol. Néanmoins, si l'on observe les valeurs médianes obtenues pour les 45 échantillons allemands (Ternes, 1998), on se retrouve dans les mêmes gammes de concentrations que pour les autres pays : < LD pour le bisoprolol, 45 ng/L pour le métoprolol et 12 ng/L pour le propranolol.

On peut tenter de mettre en relation ces résultats avec les données de consommation des bêtabloquants dans les différents pays. Le métoprolol par exemple qui est environ 10 fois plus consommé en Allemagne qu'en France (81907 t/a en Allemagne contre 8786 t/a en France, (Sadezky *et al.*, 2007)) est quantifié dans 38 des 45 échantillons analysés en Allemagne et dans seulement 1 des 2 échantillons analysés en France. Par ailleurs, le bisoprolol qui est 1,5 fois plus consommé en Allemagne qu'en France (3010 t/a contre 2113 t/a, (Sadezky *et al.*, 2007)) est quantifié dans 19 des 45 échantillons analysés en Allemagne et n'est jamais quantifié en France. Cependant, dans cette comparaison, il faut tenir compte de la différence entre les populations françaises et allemandes (l'Allemagne étant environ 1,3 fois plus peuplée que la France). Finalement, étant donné le peu de données de consommation disponibles et la diversité des sites étudiés (qui sont souvent peu ou mal décrits), il est difficile de tirer des conclusions fiables de cette comparaison.

Globalement, en terme de fréquence de quantification, ce sont l'acébutolol, l'aténolol et le sotalol qui sont le plus souvent quantifiés (dans plus de 80 % des échantillons) devant le métoprolol, le propranolol et le bisoprolol (quantifiés dans respectivement 77, 48 et 40 % des échantillons). Enfin, le timolol, le bétaxolol et le nadolol sont quantifiés dans moins de 2 % des échantillons analysés.

1.3.2 La dégradation des molécules dans l'environnement

1.3.2.a. La dégradation des estrogènes

Les humains excrètent les estrogènes qu'ils produisent ou qu'ils ingèrent principalement sous forme conjuguée glucuronide et/ou sulfate. Ces conjugués sont principalement inactifs tel quels, mais doivent être appréhendés comme des réservoirs d'hormones actives dans la mesure où ils peuvent, sous l'action de bactéries présentes dans l'environnement, se transformer en estrogènes libres et donc actifs. L'hypothèse de la déconjugaison de E1-3S pour libérer E1 lors d'un procédé de type boue activée a par exemple été évoquée pour expliquer de plus faibles rendement d'élimination de E1 dans des stations d'épuration (Baronti *et al.*, 2000). De plus, la formation de βE2 à partir E2-17G et E2-3G a été observée lors d'expérimentations réalisées en mode aérobie avec un procédé de type boue activée (Ternes *et al.*, 1999).

Une fois les hormones déconjuguées (libérées de leur groupement glucuronide ou sulfate), de nouveaux procédés de dégradation peuvent avoir lieu que ce soit lors des procédés épuratoires ou dans le milieu naturel.

La biotransformation de βE2 en E1 (avec une interconversion réversible observée sous certaines conditions) a été montrée en condition anaérobie (Czajka et Londry, 2006) et aérobie (avec un procédé type boue activée) (Ternes *et al.*, 1999).

Par ailleurs, la dégradation de E1 en αE2 sous condition de réduction des nitrates a été observée (Czajka et Londry, 2006).

Concernant EE2, des comportements différents ont été observés. Des études ont mis en évidence la stabilité de EE2 (même sur une longue période de 3 ans) en condition anaérobie (Czajka et Londry, 2006) et aérobie (procédé de type boue activée) (Ternes *et al.*, 1999). Au contraire, d'autres études rapportent la biodégradation de EE2. En effet, la dégradation totale de EE2 en 6 jours (la capacité de dégradation étant maximum au bout de 2 jours) a été observée lors d'essais en laboratoire avec un procédé de type boue activée nitrifiante mais les métabolites formés, des composés hydrophiles, n'ont pas pu être identifiés (Vader *et al.*, 2000). Par ailleurs, une étude (Ren *et al.*, 2007) a mis en évidence la capacité d'une bactérie (isolée de la boue activée) à dégrader 87% de EE2. La première étape de cette dégradation est l'oxydation de EE2 en E1.

D'autre part, en mode aérobie avec un procédé type boue activée il a été montré qu'en moins de 24h, une petite quantité de EE2 est libérée par la dégradation du mestranol (un autre estrogène de synthèse) correspondant à 7 % de la quantité initiale de mestranol (Ternes *et al.*, 1999).

Concernant le cycle de ces molécules dans les rivières, des tests réalisés pour l'eau et les sédiments à 20°C dans 3 rivières différentes ont défini des demie-vies de 2-3 jours pour E1 et βE2, et 4-6 jours pour EE2 (Williams *et al.*, 1999). Les microorganismes présents dans des échantillons d'eau de rivière ont permis de transformer βE2 en E1 avec des demie-vies de 0 ,2-9 jours à une température de 20°C ; E1 a ensuite été dégradée à une vitesse similaire (Jurgens *et al.*, 2002). Dans ces conditions, EE2 est plus résistante que βE2 à la biodégradation, mais les deux molécules sont susceptibles d'être photodégradées avec des demie-vies de l'ordre de 10 jours dans des conditions idéales (Jurgens *et al.*, 2002). Ces résultats contribuent à expliquer pourquoi E1 est plus quantifiée dans les eaux de surface que βE2.

1.3.2.b. La dégradation des bêtabloquants

Il a été montré que ATE, MET, PROP et SOT sont biodégradables dans les STEP (Maurer *et al.*, 2007). Cependant, cette biodégradation est lente (environ 6 à 24h pour diminuer la concentration initiale de moitié) et cela explique pourquoi une quantité non négligeable de bêtabloquants est détectée dans les effluents.

Une étude récente s'attache à étudier la photodégradation des bêtabloquants dans des matrices environnementales (Piram *et al.*, 2008b). La dégradation des molécules a été étudiée sous lumière UV (125 W, 250-600 nm) à 2 niveaux de concentrations différents (0,01 et 10 mg/L) et dans de l'eau pure et dans un effluent. Dans ces conditions, l'instabilité des bêtabloquants étudiés (ACE, ATE, BIS, MET, NAD, PROP, SOT et TIM) a été mise en évidence et seul ATE était stable durant 50h. Les demie-vies estimées dans cette étude sont les suivantes : moins de 6h pour PROP, SOT et TIM ; entre 20 et 54h pour MET et NAD ; entre 10 et 28h pour ACE ; et enfin, entre 15 et 70h pour BIS. Par ailleurs, la photodégradation de 3 bêtabloquants (ATE, MET et PROP) à des concentrations variant entre 0,0003 et 10 mg/L a été étudiée avec une lampe xenon (1,1 kW, 290-800 nm) dans de l'eau déionisée à 20-26°C. Les demie-vies mesurées ont été extrapolées afin de mettre en évidence l'influence de la latitude et de la saison (liée à l'intensité lumineuse) sur les demie-vies des molécules (Liu et Williams, 2007). Les demie-vies extrapolées pour l'Europe centrale et les Etats-Unis varient : de 28 à 95 jours en été et de 190 à 449 jours en hiver pour MET ; de 15 à 35 jours en été et de 104 à 166 jours en hiver pour ATE ; de 0,6 à 1,9 jours en été et de 3,9 à 12 jours en hiver pour PROP.

Pour conclure, ATE, MET, PROP et SOT sont biodégradables dans les STEP, même si cette biodégradation est très lente. Certains bêtabloquants (PROP, SOT et TIM) semblent être très sensibles à la photodégradation alors que d'autre comme ATE ont montré leur stabilité durant 50h.

Quoiqu'il en soit, la photostabilité des bêtabloquants est très dépendante de la matrice testée et est plus importante dans les effluents de STEP que dans l'eau pure (Piram *et al.*, 2008b).

1.3.3 Ecotoxicité

Les hormones estrogéniques sont des molécules capables d'agir à très faibles doses. Leur présence dans les milieux aquatiques, même à l'état de trace, peut induire une réponse chez les organismes possédant des récepteurs estrogéniques et par conséquent fortement perturber l'écosystème. Des études menées sur des poissons ont montré que des concentrations de l'ordre de 1 ng/L de βE2 peuvent induire des effets perturbateur endocriniens (Hansen *et al.*, 1998) et notamment impacter la production de spermatozoïdes chez ces espèces (Adeoya-Osiguwa *et al.*, 2003). De même, la capacité de EE2 à modifier la fécondité de poissons et de mollusques a été montrée dès 1 ng/L (Larsson *et al.*, 1999; Jobling *et al.*, 2003; Gutjahr-Gobell *et al.*, 2006). Le potentiel estrogénique des différentes hormones étudiées a également été évalué par le test YES (Yeast Estrogen Screen). Il en est ressorti que si l'on considère le potentiel estrogénique de βE2 à 1, celui de EE2 vaut 0,5, celui de E1 0,3, celui de αE2 0,05 et enfin celui de E3 0,002 (Tanaka *et al.*, 2001). En d'autres termes, βE2 et EE2 sont les estrogènes possédant le plus fort effet perturbateur endocrinien et donc les plus toxiques vis à vis de l'écosystème, devant E1, αE2 et enfin E3.

Assez peu d'études s'intéressent à la présence de bêtabloquants dans les milieux aquatiques, et encore moins aux effets de la présence de ces composés sur les organismes vivants. Néanmoins, depuis que la présence de récepteurs bêta dans les tissus de poissons a été montrée (Haider et Baqri, 2000), la question de l'impact des bêtabloquants sur ces organismes est légitimement posée. Une étude menée sur des invertébrés a démontré que la croissance de *Oryzias Latipes* était affectée à partir d'une concentration en propranolol de 0,5 mg/L (Huggett *et al.*, 2002). Cette même étude s'est attachée à déterminer la concentration n'entraînant pas d'effet (NOEC) et la plus faible concentration entraînant un effet (LOEC) sur la reproduction de *Hyalella Azteca* : pour le propranolol, NOEC et LOEC sont respectivement 0,001 et 0,1 mg/L. Les concentrations mesurées dans les milieux aquatiques sont généralement largement inférieures à ces valeurs, mais il ne faut néanmoins pas oublier l'existence de « l'effet cocktail » lié à la présence de plusieurs bêtabloquants dans le milieu (Fraysse et Garric, 2005).

Afin d'évaluer les risques liés à l'apport d'estrogènes et de bêtabloquants par les STEP dans les eaux de surface, un quotient de risque PEC/PNEC peut être calculé : PEC correspondant à la concentration environnementale prédite et PNEC correspondant à la concentration environnementale prédite ne générant pas d'effets néfastes pour l'écosystème. De manière classique, les PNEC sont

obtenues à partir de données d'écotoxicologie observées en laboratoire. Une valeur du quotient de risque supérieure à 1 indique que la substance étudiée est potentiellement dangereuse pour le milieu considéré. Pour les molécules ciblées dans cette étude (estrogènes et bêtabloquants), peu de données de PNEC sont présentées dans la littérature. Un auteur a estimé des PNEC sur des invertébrés (*Daphnia magna*), des algues (*Desmodesmus subspicatus*) et des plantes aquatiques (*Lemna minor*) pour ATE, MET et PROP en divisant par 1000 la CE_{50} (concentration pour laquelle on observe, après un temps d'étude fixé, un effet sur 50% des individus testés); les résultats obtenus sont les suivants : 0,73 µg/L pour PROP, 7,9 µg/L pour ATE et 310 µg/L pour MET (Cleuvers, 2005) . Une autre étude présente une PNEC de 10 ng/L pour PROP à partir d'effets chroniques observés sur les poissons (*Ceriodaphnia dubia*) (Ferrari *et al.*, 2004). Aucune valeur de PNEC n'a été trouvée pour NAD, mais des tests de toxicité réalisés sur des invertébrés ont montrés que l'exposition à des concentrations élevées de NAD (100 mg/L) n'affectaient pas l'espèce étudiée (Huggett *et al.*, 2002). Pour les estrogènes, une étude recommande d'utiliser 0,35 ng/L comme valeur de PNEC pour EE2 (Caldwell *et al.*, 2008) ; cette étude est basée sur les concentrations n'entraînant pas d'effet sur la reproduction observées dans 39 articles. Par ailleurs, une étude propose, pour l'ensemble des estrogènes, une PNEC de 5 ng/L (Stuer-Lauridsen et al, 2000).

1.4 Méthodes d'analyse pour les estrogènes et les bêtabloquants dans les matrices environnementales

1.4.1 Méthodes analytiques pour les estrogènes dans les matrices environnementales

Une étude bibliographique a été menée dans l'objectif de présenter un état de l'art des techniques utilisées pour l'identification et la quantification des estrogènes dans les matrices environnementales (eaux, sédiments et boues). Les protocoles analytiques employés pour la quantification des estrogènes conjugués sont également discutés ici. Cette revue bibliographique met l'accent sur les performances et la validation des méthodes développées. Ce travail a fait l'objet d'un article publié en 2007 dans la revue ***Trends in Analytical Chemistry*** *(Volume 26, n°11).*

Depuis quelques années, de nombreuses études scientifiques s'intéressent à la présence d'estrogènes dans l'environnement. Un état de l'art des méthodes analytiques utilisées pour mesurer ces composés dans les matrices environnementales (eaux, sédiments, matières en suspension et boues de STEP) est réalisé ici. Cette étude bibliographique couvre de manière exhaustive les articles publiés entre 1999 et 2007 présentant des méthodes analytiques pour l'identification et la quantification d'estrogènes. Seuls les articles incluant à la fois une description complète du protocole analytiques et une validation de méthode satisfaisante ont été retenus.

Après filtration, les échantillons d'eau sont extraits sur phase solide (SPE) soit sur disques, soit sur cartouches. Les cartouches Oasis® HLB sont les plus couramment utilisées (Vanderford *et al.*, 2003; Benijts *et al.*, 2004; Hernando *et al.*, 2004a; Lagana *et al.*, 2004; Beck *et al.*, 2005; Labadie et Budzinski, 2005a; Trenholm *et al.*, 2006; Salvador *et al.*, 2007) et les rendements obtenus pour cette étapes sont généralement situés entre 75 et 100 %. L'utilisation de cartouches StrataX® (Vulliet *et al.*, 2007), de disques en silice greffée C18 (Mouatassim-Souali *et al.*, 2003; Noppe *et al.*, 2005) ou styrène-divinylbenzène (de Alda et Barcelo, 2001) est également rapportée. Enfin, un article rapporte l'utilisation de micro extraction en phase solide (Carpinteiro *et al.*, 2004) et un autre celle d'extraction par support sur barreau aimanté (Almeida et Nogueira, 2006).

Pour les matrices solides (sédiments et boues de STEP) une étape de lyophilisation ou de séchage est généralement réalisée avant l'extraction. Pour cette étape d'extraction, plusieurs techniques analytiques peuvent être utilisées : extraction assistée par ultrasons (Petrovic *et al.*, 2001;

Ternes *et al.*, 2002; Isobe *et al.*, 2006; Hajkova *et al.*, 2007), extraction micro-ondes (Labadie et Budzinski, 2005a), extraction sous fortes pression et température (ASE®) (Noppe *et al.*, 2007) ou enfin extraction par Soxhlet (Petrovic *et al.*, 2001). Cette dernière technique qui demande beaucoup de temps et de solvant est cependant de moins en moins utilisée. Pour toutes ces extractions le méthanol, pur ou en mélange, est le plus utilisé. Etant donné la complexité de ces matrices, les rendements associés à l'extraction des boues et sédiments sont généralement moins bons que ceux obtenus pour les eaux : dans les articles étudiés, ils s'échelonnent entre 60 et 130 %. Très peu d'études s'intéressent à l'analyse des matières en suspension (Labadie et Budzinski, 2005a; Noppe *et al.*, 2007). Les MES collectées par centrifugation ou par filtration sont extraites par micro-ondes ou par ASE® et les rendements associés sont satisfaisants (compris entre 87 et 127 %).

Suite à l'extraction, une étape de purification peut être nécessaire. Pour l'analyse des eaux usées qui contiennent beaucoup de matières organiques, cette étape est souvent présente. La plupart du temps elle est réalisée sur cartouche de silice, mais l'utilisation combinée de différentes phases a également été rapportée : cartouches silice / NH_2 (Noppe *et al.*, 2005), cartouches C18 / NH_2 (Belfroid *et al.*, 1999) ou cartouches HLB / NH_2 (Labadie et Budzinski, 2005a).

Pour les boues et les sédiments, une étape de purification préliminaire à l'analyse est indispensable. Généralement cette purification est réalisée par chromatographie à perméation de gel (GPC) suivi d'une SPE sur gel de silice. La GPC permet d'éliminer les interférents avec une masse moléculaire élevée et différentes colonnes peuvent être utilisées (Ternes *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2004; Isobe *et al.*, 2006). Pour la purification des extraits de sédiments, la chromatographie préparative est utilisée (Ternes *et al.*, 2002; Noppe *et al.*, 2007). L'addition de cuivre avant ou pendant le procédé de purification permet d'éliminer les composés soufrés qui peuvent ensuite causer des interférences lors de l'étape d'analyse.

Parmi les différentes techniques analytiques utilisées pour l'analyse des estrogènes, on retrouve principalement la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS). Cependant, l'analyse en phase gazeuse nécessite une dérivation de la molécule pour la rendre plus volatile.

La chromatographie en phase liquide est réalisée en phase inverse avec généralement une ionisation par électrospray en mode négatif. Quelques études utilisent néanmoins des ionisations par électrospray ou chimiques à pression atmosphérique en mode positif (Vanderford *et al.*, 2003; Salvador *et al.*, 2007; Vulliet *et al.*, 2007). Par ailleurs, bien la MS/MS soit la méthode de détection la plus utilisée, un auteur utilise un détecteur à barrettes de diodes (DAD)(Almeida et Nogueira,

2006). Les limites de détection (LD) obtenues avec ce mode de détection sont bien supérieures (de l'ordre du µg/L) à celles obtenues par MS/MS (de l'ordre du ng/L ou moins, en fonction de la matrice et de l'analyte). Pour les matrices solides, l'analyse par LC est plus utilisée que la GC. Cependant, l'évaluation des effets matrices est essentielle, en particulier lorsque les analyses sont réalisées par LC-MS/MS. En effet, la présence d'impuretés peut affecter l'ionisation, co-éluer avec les analytes et générer de la suppression de signal ou des faux positifs. L'utilisation d'isotopes deutérés peut permettre de maîtriser ces problèmes d'effet matrice. Cependant, dans des extraits de sédiments, des suppressions de signal différentes ont été observées pour βE2 et E2D4 (Gomes *et al.*, 2004).

Pour les estrogènes, l'analyse peut également être réalisée par chromatographie en phase gazeuse mais nécessite dans ce cas une étape de dérivation visant à augmenter la volatilité des composés. Cependant une étude récente permet d'analyser 5 estrogènes dans des extraits de sédiment par GC-MS sans étape de dérivation (Hajkova *et al.*, 2007). Pour les analyses par GC-MS, l'ionisation est généralement réalisée par impact électronique. Pour les matrices liquides, les LD obtenues par GC-MS et par GC-MS/MS sont généralement inférieures à 1 ng/L. Pour les matrices solides, les LD sont comprises entre 1 et 5 ng/g, alors que les limites de quantification (LQ) obtenues par GC-MS/MS sont inférieures à 0,5 ng/g pour les sédiments et entre 2 et 4 ng/g pour les boues.

Encore peu d'auteurs prennent en compte les formes conjuguées (glucuronides et sulfates) des estrogènes (Belfroid *et al.*, 1999; Isobe *et al.*, 2003; Mouatassim-Souali *et al.*, 2003; Labadie et Budzinski, 2005a; Isobe *et al.*, 2006). Pour étudier ces composés, une méthode d'hydrolyse enzymatique est mise en place. Cela consiste en l'action d'une enzyme, la β-glucuronidase, à température fixée et pendant un temps donné. Pour s'assurer du clivage complet des conjugués sulfate, une étape de solvolyse peut également être ajoutée (Labadie et Budzinski, 2005a).

Pour s'assurer de la validité d'une méthode analytique, plusieurs paramètres doivent être testés.

L'étude de la linéarité permet dans un premier temps de délimiter le domaine de concentrations dans lequel il est correct de travailler. Cette étude peut être réalisée par injections d'étalons à différentes concentrations (Baronti *et al.*, 2000), mais il est préférable de tester la linéarité avec des matrices réelles ou des extraits dopés (Hernando *et al.*, 2004b; Vulliet *et al.*, 2007). La linéarité est généralement vérifiée entre la LQ et 200-500 ng/L pour les eaux usées, entre la LQ et 5-50 ng/L pour les eaux de surface et entre la LQ et 200 ng/g pour les boues et les sédiments.

La sensibilité de la méthode analytique, à savoir la détermination des LD et LQ peut être évaluée selon plusieurs méthodes : à partir de l'analyse répétée d'un blanc (norme ISO/TR 13530 : 1997) ou par la plus petite concentration avec un rapport signal / bruit de 3 pour la LD ou de 10 pour

la LQ. Certains auteurs (Ternes *et al.*, 2002; Vanderford *et al.*, 2003; Noppe *et al.*, 2007) déterminent la sensibilité à partir de la droite d'étalonnage (le premier ou le second point de la gamme). Les LD dans les eaux usées sont généralement de l'ordre de 1 ng/L, sachant que la sensibilité est meilleure dans les effluents que dans les influents. Pour les solides, les LD sont de l'ordre de 0,2 – 5 ng/g.

Les rendements sont généralement évalués, mais pas nécessairement pour chaque matrice et à différents niveaux de concentration représentatifs (Benijts *et al.*, 2004). Ces rendements sont influencés à la fois par les pertes d'analytes qui peuvent se produire lors de la préparation de l'échantillon et par les effets matrices. Pour les matrices liquides, ces rendements peuvent être évalués par dopage et sont généralement situés entre 80 et 100 %. Pour les matrices solides, le dopage n'est pas une méthode idéale dans la mesure où la solution de dopage ne se lie pas à la matrice de la même manière. Cependant, c'est la méthode utilisée par les auteurs (Ternes *et al.*, 2002; Noppe *et al.*, 2007). Pour les solides, les rendements sont compris entre 60 et 120 %.

La sélectivité (ou spécificité) permet de déterminer la capacité de la méthode à procurer une réponse exacte en présence d'interférents. Cette étude est rarement réalisée par les auteurs. Pour les eaux, la sélectivité est par exemple testée en vérifiant que les réponses obtenues avec différents types de matrices dopées à un même niveau de concentration sont similaires (Vanderford *et al.*, 2003; Benijts *et al.*, 2004; Salvador *et al.*, 2007).

Enfin, la précision de la méthode qui regroupe les notions de répétabilité et de reproductibilité est documentée. La répétabilité peut être estimée en analysant plusieurs réplicats d'un même échantillon. Cependant, il ne faut pas se satisfaire de faire un réplicat d'analyse, mais bien préparer des extraits différents (Carpinteiro *et al.*, 2004; Salvador *et al.*, 2007; Vulliet *et al.*, 2007). Concernant la reproductibilité, elle est estimée par exemple en analysant un même échantillon sur différents jours (Benijts *et al.*, 2004; Almeida et Nogueira, 2006).

L'exactitude est la conformité entre la valeur mesurée et la valeur vraie. Dans l'analyse des estrogènes dans les matrices environnementales, il n'existe pas de matériaux certifiés et vérifier de l'exactitude de la méthode est donc difficile. La participation à des essais inter-laboratoire peut permettre d'évaluer cette exactitude.

Les études menées sur la stabilité des estrogènes ont montré que pour éviter ou limiter au mieux la dégradation des estrogènes, les échantillons d'eau doivent être extraits dès que possible (dans les 48h qui suivent le prélèvement). Les échantillons d'eau doivent être conservés à 4°C à l'abri de la lumière et les échantillons solides doivent être lyophilisés. Pour les échantillons d'eau, la conservation à -18°C sur des cartouches SPE représente également une bonne solution. Dans tous les cas, les tests de stabilité doivent être réalisés sur les hormones libres et conjuguées dans la mesure où la déconjugaison des estrogènes qui peut se produire lors de la conservation peut biaiser les résultats.

Pour conclure, les méthodes d'analyse des estrogènes dans les eaux sont bien documentées, contrairement à l'analyse dans les échantillons solides. L'utilisation du terme « validation de méthode » est souvent abusive. Seuls quelques rares auteurs réalisent une validation complète de leur méthode. Pour la majorité des articles étudiés ici, la linéarité instrumentale est vérifiée avec des étalons, les limites de détection sont estimées dans l'eau distillée (et rarement dans des échantillons réels) et les rendements sont calculés mais pas toujours dans des échantillons réels et à différents niveaux de dopage.

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26, No. 11, 2007 Trends

Analysis of estrogens in environmental matrices

Virginie Gabet, Cécile Miège, Philippe Bados, Marina Coquery

Since the increase in interest in the presence of estrogens in the environment, several publications have been published. This article aims first to review the state-of-the-art analytical methods used to measure these compounds in environmental matrices, and second to scrutinize how these methods and their performances were validated. Our review will cover the methodologies used for quantification of total estrogens (i.e. free and conjugated estrogens) and verification of sample stability. The fundamental point for a good method validation is the use of a real matrix to estimate linearity, precision (including repeatability and reproducibility), specificity and, especially, sensitivity and recovery.
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: AcN, Acetonitrile; APCI, Atmospheric pressure chemical ionization; ASE, Accelerated solvent extraction; CI, Chemical ionization; DAD, Diode-array detector; DCM, Dichloromethane; DES, Diethylstilbestrol; DES-d8, Deuterated diethylstilbestrol; DIE, Dienestrol; DN, D-norgestrel; ECD, Electron-capture detection; EI, Electron impact; E1, Estrone; E2, Estradiol; αE2, 17α-estradiol; βE2, 17β-estradiol; E2-3G, 17β-estradiol-3-glucuronide; E2-3S, 17β-estradiol-3-sulfate; E2-17G, 17β-estradiol-17-glucuronide; E3, Estriol; EE2, Ethynylestradiol; E1-d4, Deuterated estrone; E2-d4, Deuterated 17β-estradiol; EE2-d4, Deuterated ethynylestradiol; ESI, Electrospray ionization; GC, Gas chromatography; GC-MS, Gas chromatography-mass spectrometry; GC-MS^2, Gas chromatography-mass spectrometry (tandem); GPC, Gel-permeation chromatography; GC-Q-MS, Gas chromatography-quadrupole-mass spectrometry; HLB, Hydrophilic-lipophilic balance; HPLC, High-performance liquid chromatography; LC, Liquid chromatography; LC-MS, Liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS^2, Liquid chromatography-mass spectrometry (tandem); LOD, Limit of detection; LOQ, Limit of quantification; MeOH, Methanol; MES, Mestranol; MS, Mass spectrometry; MSTFA, N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; MTBE, Methyl tertiary-butyl ether; NCI, Negative chemical ionization; No, Norethindrone; PA, Polyacrylate; PDMS, Polydimethylsiloxane; Pg, Progesterone; PTFE, Polytetrafluoroethylene; RP-LC, Reversed-phase liquid chromatography; RSD, Relative standard deviation; SBSE, Stir-bar sorptive extraction; SD, Standard deviation; SDB, Styrenedivinylbenzene; S/N, Signal-to-noise ratio; SPE, Solid-phase extraction; SPME, Solid-phase microextraction; STP, Sewage-treatment plant; TOF, Time-of-flight; WTP, Wastewater-treatment plant.

Keywords: Analytical method; Aquatic environment; Conjugated hormone; Estrogen; Validation

Virginie Gabet*, Cécile Miège, Philippe Bados, Marina Coquery
Cemagref - Groupement de Lyon, Lyon, France

*Corresponding author.
E-mail: gabet@lyon.cemagref.fr

1. Introduction

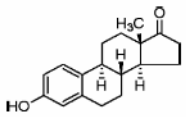
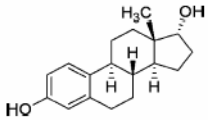
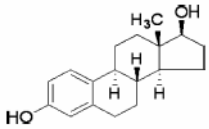
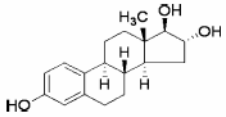
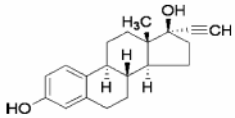
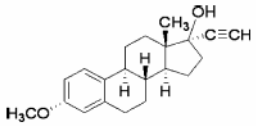
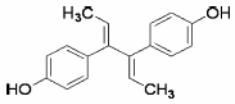
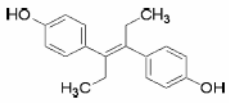
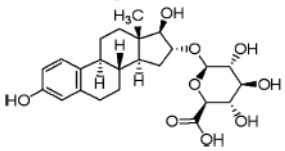
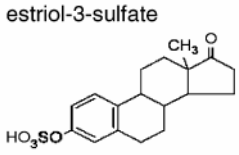
Estrogens are a group of steroid hormones defined by their chemical structure and by their effect in the estrous cycle. They act as endocrine disruptors (i.e. substances that interfere with the endocrine system) and disrupt the physiological functions of hormones. The consequences of the presence of endocrine disruptors in the aquatic environment are still largely unknown, but some negative impacts have been reported (e.g., feminization of fish in large rivers and toxicological effects on wildlife [1,2]). There are therefore substantial scientific efforts in progress to better evaluate the presence of these compounds in the environment and to identify their sources and modes of transfer to aquatic ecosystems. The presence of estrogenic compounds in surface waters has been noted since the early 1980s [3]. Numerous estrogenic compounds, of natural and synthetic origin, are excreted by human bodies and reach the aquatic environment daily via sewage systems. Consequently, domestic wastewaters are recognized as a main source of contamination for these new pollutants.

Many papers have reported the presence of various estrogens in surface waters and wastewaters. By contrast, the presence of estrogens in sediment or sludge has many fewer references than their presence in waters, and only a few papers have reported analytical methods for these solid matrices. Estrogens have moderate to high hydrophobicity, with an octanol-water partition coefficient generally in the range 3–6. As a consequence, sorption to bed sediments could be a cumulative process [4], so it is important to measure sediment and sludge contamination, as they can act as environmental reservoirs from which estrogens can become available.

0165-9936/$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.trac.2007.10.003

Since 2001, five reviews have been devoted to the analysis of endocrine disruptors in the aquatic environment. One focused on the analysis of endocrine-disrupting compounds in sediments [4], two others

Table 1. Chemical structures of estrogens of interest

Estrogen	Abbreviation	Chemical structure	Examples of conjugated forms
		Natural estrogenic compounds	
Estrone	E1		estrone-3-sulfate estrone-3-glucuronide
17α-Estradiol	αE2		estradiol-3-sulfate estrone-3-glucuronide estradiol-17-sulfate estradiol-17-glucuronide
17β-Estradiol	βE2		estradiol-3-sulfate-17-glucuronide estradiol-3-glucuronide-17-sulfate estradiol-3,17-disulfate estradiol-3,17-diglucuronide
Estriol	E3		estriol-3-glucuronide estriol-16-glucuronide estriol-17-glucuronide estriol-3,17-disulphate estriol-3-sulfate-17-glucuronide
		Synthetic estrogenic compounds	
17α-Ethylnylestradiol	EE2		ethynylestradiol-3-glucuronide ethynylestradiol-3-sulfate
Mestranol	MES		
Dienestrol	DIE		
Diethylstilbestrol	DES		
Structure of two conjugated forms:		estriol-16-glucuronide  estriol-3-sulfate 	

described the analysis of endocrine disruptors in aqueous samples [5,6]. The analytical methods for estrogens and progestogens were more particularly studied in wastewaters [7] and solid matrices (sediments and sludge) [8].

The first objective of this article is to review the state-of-the-art techniques currently employed for identification and quantification of estrogens in environmental samples, including waters, sediment and sludge. We will also discuss the analytical protocols used for quantification of conjugated forms, as well as the methodologies described for sample preservation before analysis. We will then review the validation protocols and resulting performances of the latest analytical methods. We will review only papers from the period 1999–2007 that included a well-documented description of analytical method validation.

Table 1 presents the list of the main compounds of interest.

2. Analytical methods

2.1. Sample extraction

2.1.1. Aqueous sample. In most cases, the analysis of estrogens in the dissolved phase is performed after filtration of 500–2000 mL of surface water, and of 100–2000 mL of wastewater (Table 2). Recently, an on-line method has been developed and enabled quantification of three estrogens (E1, βE2 and EE2) in wastewater with less than 1 mL of water [9]. SPE extraction, either on disks or cartridges, is generally used.

Oasis HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balanced copolymer) cartridges are the most commonly used [9–16]. With this kind of sorbent phase, many solvents (e.g., ethyl acetate [14], MeOH [10], MeOH mixed with MTBE 10/90 v/v [12,13], MeOH/acetone 20/80 v/v [11], MeOH/DCM 50/50 v/v [16]) are used for elution. Recoveries of the target compounds are generally in the range 75–100%. As an exception, Beck et al. (2005) [11], working with large volumes of coastal surface water, obtained recoveries of only 10–20%.

The use of StrataX cartridges (polymeric adsorbent) was reported for the simultaneous extraction of estrogens (E1, αE2, βE2, E3 and EE2) and 7 corticosteroids in wastewater [17]. Elution was performed with MeOH. Recoveries above 81% were obtained for all analytes studied. However, these recoveries were obtained with only spiked distilled water.

Disk extractions are usually performed with octadecyl-bonded silica [18,19] or SDB sorbent [20]; even so, this latter phase was unsuitable for quantitative extraction of E3 from water [7]. With octadecyl-bonded silica sorbent, elution is made with acetone and methanol, either individually or in sequential steps. Elution from SDB disks is generally performed several times with methanol.

Carpintero et al. (2004) [21] applied SPME to analyze estrogens (E1, βE2, EE2, DES, MES) in wastewater samples. Different stir-bar coatings were tested (e.g., PDMS, polyacrylate, PDMS-divinylbenzene, carboxen-PDMS and carbowax-divinylbenzene). The highest efficiency was achieved with the polyacrylate fiber at pH 4 (recoveries 79–124%). Addition of sodium chloride showed significant positive influence, except for MES. The kinetic of extraction was very slow, especially for MES and EE2, with equilibrium times above 2 hours.

Another study [22] reported extraction of nine steroid sex hormones (E1, αE2, βE2, EE2, DES, 19-norethisterone, No, Pg and MES) in water and urine matrices by SBSE coated with PDMS. The equilibrium time, ionic strength and back-extraction solvents were the most important parameters affecting quantification of the hormones tested in water matrices. Optimized recoveries were 11–100%, depending on the analyte (Table 3).

2.1.2. Solid sample. Prior to extraction, sediment and sludge samples are in most cases freeze-dried, or could be dried at 30°C for approximately 16 h [23]. An aliquot of 1–5 g of sediments or 0.5 g of sludge is then extracted (Table 4).

Several extraction techniques are used: sonication [4,23–25]; microwave-assisted extraction [10]; ASE [26]; or, Soxhlet extraction [4]. This last technique, which is time consuming and has high solvent consumption, is used less and less.

The extraction step is mostly performed with MeOH (pure or mixed, or followed by acetone extraction). An hexane/acetone mixture 50/50 v/v can also be used [23,27]. It is important to underline that extraction of estrogenic compounds from sediments and sludges is performed with polar solvents that induce coextraction of many interferents and result in heterogeneous extracts. To solve this problem, some authors centrifuged the extract to remove suspended particles before purification [10,23].

To our knowledge, only two publications have referred to the analysis of steroidal hormones in particulate material [10,26].

Labadie et al. [10] analyzed 10 steroidal hormones (E1, βE2, E3, EE2, MES, Pg, DN, No, E2-3S, E2-3G) in river water, effluent water and particulate phase. The glass-fiber filters (pore size 0.7 μm) used for filtration of 3 L samples (equivalent to 15 mg and 150 mg of particulate phase of river water and effluent, respectively) were directly extracted by microwave-assisted extraction with 10 mL of methanol/Milli-Q water (55/45, v/v). The extracts were then centrifuged at 4500 rpm for 5 min. Recoveries of all analytes were above 70% (72–91%) and the LOD was in the range 0.4–1.9 ng/g.

Noppe at al. [26] collected suspended particulate matter using a flow-through centrifuge. The analysis was performed with 5 g of material from the Scheldt Estuary. Extraction was carried out by ASE with acetone/MeOH (50/50, v/v) at 100°C and 2000 psi.

Table 2. Analytical methods for the analysis of estrogens in aqueous samples

Ref.	Matrix	Sampling volume (mL)	Estrogens studied	Sample preparation	Extraction method	Purification	Analytical method	Derivatization	Hydrolysis of conjugated
[9]	Wastewater	<1	E1, βE2, EE2	Filtration (0.45 μm)	SPE-HLB, H_2O/MeOH (50/50, v/v)	–	RP-LC-ESI(+)-MS/MS	–	–
[10]	Effluent and river water	1000	E1, βE2, E3, EE2, MeEE2	Filtration (0.7 μm), acidification (pH 3-5), addition of formaldehyde	SPE-HLB, MeOH	Free steroids: SPE-NH2 conjugated steroids: SPE-HLB + NH_2	GC-EI-MS	MSTFA	Yes
[11]	Surface water	49000	E1, βE2, E3, EE2	Filtration (1 μm)	SPE-HLB, acetone/MeOH (80/20, v/v)	Silica gel	RP-LC-ESI(-)-MS/MS	–	–
[12]	Surface water	1000	E2, EE2	Acidification (pH 2)	SPE-HLB, MeOH/MTBE (10/90, v/v) + MeOH	–	RP-LC-APCI(+)-MS/MS	–	–
[13]	Wastewater	1000	E1, E2, E3, EE2	Acidification (pH 2), filtration (0.7];μm)	SPE-HLB, MeOH + MeOH/MTBE (10/90, v/v)	–	RP-LC-MS/MS	–	–
[14]	Wastewater	100	E1, βE2, EE2	Filtration (0.7 μm), pH adjustment to 8, addition of sodium azide	SPE-HLB, ethylacetate	–	GC-EI-MS or GC-EI-MS/MS	BSTFA	–
[15]	Effluent and river water	500	E1, βE2, E3, EE2, DES	Filtration (0.7 and 0.45 μm), addition MeOH	SPE-HLB, 2-propanol/MTBE (10/90, v/v)	–	RP-LC-ESI(-)-MS/MS	–	–
[16]	Surface and wastewater	100–1000	E1, βE2, E3, EE2	Filtration (1.2 μm)	SPE-HLB, DCM/MeOH (50/50, v/v)	–	RP-LC-ESI(-)-MS/MS	–	–
[17]	Effluent wastewater	200	E1, αE2, βE2, E3, EE2	Filtration (0.45 μm), acidification (pH 3.4)	SPE-StrataX, MeOH	Silica gel	RP-LC-ESI(+)-MS	–	–
[18]	Surface and wastewater	2000	E1, βE2, E3, EE2	Filtration (1.2 μm)	SPE-C18disk, acetone	–	GC-MS	PFPA	Yes
[19]	Surface water	2000	E1, αE2, βE2, EE2	Adjustment of pH to 7	SPE-C18disk, acetone + MeOH	Silica + NH_2 cartridge	GC-EI-MS/MS	MSTFA	–
[20]	Surface and wastewater	1000	E1, αE2, βE2, EE2	Filtration (0.45 and 1.2 μm)	SPE-SDB-XC, MeOH	SPE-C18 + NH_2, HPLC fractionation	GC-MS/MS	Dimethyldi-chlorosilane	Yes

[21]	Wastewater	100	E1, βE2, EE2, DES, MES	Filtration (0.45 μm), acidification (pH 6)	SPME-PA	–	GC-EI-MS or GC-EI-MS/MS	MSTFA	
[22]	Well water	30	E1, αE2, βE2, EE2, DES, MES	–	SBSE-PDMS	–	RP-HPLC-DAD	–	–
[26]	Surface water	2000	E1, αE2, βE2, EE2	Acidification (pH 2)	SPE-C18disk, acetone + MeOH	Si + NH_2 cartridge	GC-EI-MS/MS	MSTFA	–
[28]	Surface and wastewater	100–500	E1, βE2, EE2	Filtration for influent	SPE-C18, MeOH	Silica gel	RP-LC-ESI(-)-MS/MS	–	–
[29]	Drinking, surface and wastewater	1000–5000	E1, αE2, βE2, EE2	Acidification (pH 4), filtration	SPE-Ethinylbenzene-divinylbenzene copolymer LiChrolut EN, acetone and MeOH	–	HRGC-(CH4-NCI)-MS or HRGC-ECD	PFBCl	–
[30]	Effluent wastewater, surface and tank water	1000	E1, βE2, E3, EE2	–	SPE-ENVI-18, acetone	–	GC-MS/MS or RP-LC-ESI(-)-MS	PFPA for GC-MS/MS	–
[32]	Effluent and surface water	1000	E1, αE2, βE2, E3, EE2, E1-3S, E1-3G, E2-3S, E2-3G, E2-17G, E2-3G17S, E2-3S17G, E2-3,17DiS, E3-3S, E3-3G	Filtration (1.2 μm), acidification (pH 3.5–5.0) with acetic acid	SPE-EDS-1, ethyl acetate (free compounds) MeOH 5mM TEA (conjugated compounds)	Free steroids: florisil	RP-LC-ESI(-)-MS/MS	–	–
[34]	Surface and wastewater	150–4000	E1, βE2, E3, EE2	Filtration (1.5 μm), addition of formaldehyde	SPE-Carbograph4, methylene chloride/MeOH (80/20, v/v)	–	RP-LC-ESI(-)-MS/MS	–	–

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26, No. 11, 2007

Table 3. Parameters of method validation for aqueous samples

Ref.	Matrix	Analytes	Sensitivity (ng/L)*	Recovery (%)		Precision (RSD%)		Surrogate standard	Internal standard
			LOD	**Influent, spiking level 10 ng/L, n=5:**		**Influent wastewater, spiking level 10 ng/L, n=5:**			
[9]	Wastewater	E1	0.4	79.7		5.1		E1-d4	
		βE2	0.4	90.8		10.8		E2-d2	
		EE2	0.7	95.3		4.6		EE2-d4	
				Spiking level 50 ng/L:		**Spiking level 50 ng/L, n=3:[g]**			
			LOD in river water	**river water**	**effluent**	**River water**	**STP effluent**		
[10]	Effluent and river water, particulate phase	E1	0.3–1.0	98	108	2	7	E2-d4, EE2-d4, T-d3	
		βE2	0.3–1.0	97	102	4	11		
		E3	0.4–3.0	105	117	5	10		
		EE2	0.7–3.0	74	74	4	7		
		MES +3[a]	0.5–3.0	95	112	15	13		
			LOD	**Coastal surface water, spiking level 4 ng/L, n=5:**		**Coastal surface water, spiking level 4 ng/L, n=5:[h]**			
[11]	Coastal surface water	E1	0.02	10–20%		25–75%		E2-d3	
		βE2	0.3						
		E3	1.0						
		EE2 +5[b]	0.45						
			LOD (2nd lowest calibration point/ concentration factor of the SPE process)	**Deionized water, spiking level 50 ng/L, n=17 (over 3 months)**		**Deionized water, spiking level 50 ng/L, n=17 (over 3 months)**			
[12]	Surface water	E2[c]		92		14		13C2-estradiol	testos-
		EE2		92		11			terone-d3
		+25[d]	1.0						
			LOD (lowest calibration point)	**n = 21**					
[13]	Wastewater	E1	0.534	90		7		[13C2]-E2	
		E2[c]	0.297	92		14			
		E3	0.587	101		9			
		EE2 +54[e]	0.256	92		11			

			LOD in effluent		Effluent, spiking level 50 ng/L, n=4:		Effluent wastewater, spiking level 50 ng/L: 3 injections (same day)		different days		
			GC-MS	GC-MS/MS			GC-MS	GC-MS/MS	GC-MS	GC-MS/MS	
[14]	Influent and effluent wastewater	E1	8.5	7.5	90–99		6.6	9.5	28.0	13	E2-d2
		βE2	17.0	27.5			7.6	10.2	6.0	9	
		EE2	4.0	17.5			5.4	8.5	11.2	10	
		+2[f]									
			Surface water		Surface water,n = 5:			Surface water,n = 5(same day):			
			LOD	LOQ	at 10 ng/L	at 40 ng/L	at 400 ng/L	at 10 ng/L	at 40 ng/L	at 400 ng/L	
[15]	Industrial effluent. wastewater effluent. river water	E1	1.0	4.0	99.5	97.3	98.7	8.9	6.9	4.6	E1-d4 E1-d4
		βE2	1.0	4.0	95.6	97.1	99.2	10.0	7.5	5.6	E2-d2 E2-d2
		E3	2.0	4.0	83.7	87.5	86.5	12.8	8.6	5.3	E2-d2 E2-d2
		EE2	0.5	2.0	89.5	95.5	96.1	7.9	4.1	3.9	EE2-d4 EE2-d4
		DES	1.0	4.0	95.7	95.1	101.7	10.1	9.3	6.7	DES-d8 DES-d8
		+30[i]						Surface water,n = 20(5 replicates on 4 days):			
								at 10ng/L	at 40ng/L	at 400ng/L	
		E1						14.5	8.6	10.5	
		E2						16.0	8.1	6.8	
		E3						18.7	14.6	9.6	
		EE2						13.3	7.7	7.2	
		DES						14.6	7.0	7.2	
			LOD			Spiking level 100 ng/L,n = 5:			Spiking level 100 ng/L,n = 5:		
			river water	effluent	influent	river water	effluent	influent	river water	effluent	influent
[16]	Surface and wastewater	E1	0.1	0.8	1.2	99	89	95	4	5	6 flavone
		βE2	0.2	0.8	1.9	96	95	95	6	4	8
		E3	0.3	0.5	7.0	97	92	91	7	6	1
		EE2	0.4	1.1	1.6	100	96	96	3	8	6
		+8[j]									
				LOD in distilled water			Distilled water, spiking level 200 ng/L,		Distilled water, spiking level		
[17]	Effluent wastewater	E1		0.9			n = 6: 92.7–102.4		200 ng/L,n = 6: 1.4–2.7		
		αE2		2.5							
		βE2		3.1							
		E3		4.3							
		EE2		2.8							
		+7[k]									
			LOD	LOQ	Ultra pure water,n = 3:		Effluent,n = 3:		Ultra pure water,n = 3:[g]		Effluent,n = 3:[g]	
					at 5 ng/L	at 40 ng/L	at 5 ng/L	at 40 ng/L	at 5 ng/L	at 40 ng/L	at 5 ng/L	at 40 ng/L
[18]	Surface and wastewater	E1	0.012	0.04	86	84	89	90	5	6	4	2
		βE2	0.008	0.04	89	94	94	94	1	3	4	3
		E3	0.02	0.08	94	98	97	98	2	2	3	1
		EE2	0.096	0.32	88	89	92	92	2	4	5	4
									Spiking level 10 ng/L,n = 6(2 replicates on 3 days)			
									Repeatability(ICH)		Reproducibility(ICH)	
		E1							2.4		2.8	
		βE2							0.7		1.5	
		E3							5.9		5.9	
		EE2							5.6		5.6	

(continued on next page)

http://www.elsevier.com/locate/trac

Table 3 (*continued*)

Ref.	Matrix	Analytes	Sensitivity (ng/L)*							Recovery (%)		Precision (RSD%)		Surrogate standard	Internal standard
			LOQ(lowest concentration in the calibration curve)							Ultra pure water,spiking level 0.25–5 ng/L:		Ultra pure water,spiking level 0.25–5 ng/L: g			
										with EQ	with E1-d4	with EQ	with E1-d4		
[19]	Surface water	E1	0.25							108	107	19	17	Equilinine (EQ) and E1-d4	ethinyltestosterone
		αE2	0.25							105	107	19	21		
		βE2	0.25							104	103	24	26		
		EE2	0.25							102	103	21	26		
			LOD			Effluent wastewater,spiking level 10 ng/L,n = 6:						Effluent wastewater,spiking level 10 ng/L,n = 6:			
			surface water		effluent										
[20]	Surface and wastewater	E1	0.2–0.3		0.3–1	98						14			PCB103
		αE2	0.1–0.3		0.1–1.2	88						14			
		βE2	0.3–0.6		0.5–2.4	88						9			
		EE2	0.1–0.3		0.3–1.8	96						10			
			LOQ		River water,spiking level 25 ng/L:[o]				n = 4						
									25 ng/L		50 ng/L		500 ng/L		
[21]	Wastewater	E1	1		124				1		5		8		E2-d4
		βE2	0.7		104				8		4		5		
		EE2	3		89				5		9		6		
		DES	0.2		103				10		9		3		
		MES	3		79				12		7		3		
			LOD	LOQ	Spiking level 10 μg/L,n = 3:				Spiking level 10 μg/L,n = 3:						
[22]	Well water	E1	1000	3000	24.6				4.4						
		αE2	1000	3000	16.1				6.3						
		βE2	1000	3000	11.1				4.9						
		EE2	1000	3000	14.8				7.6						
		DES	600	1800	46.5				13.8						
		MES	300	900	100.2				10.4						
		+3[l]							n = 6(within and between-day repeatability): 2.1 –17.1						
			LOQ in water(lowest calibration point)			Blank sample and ultra pure water Spiked range: 0.25–5 ng/L				Blank sample and ultra pure water[g] Spiked range: 0.25–5 ng/L					
[26]	Surface water and suspended matter	E1	0.25			108				19					Equilinine and E1-d4
		αE2	0.25			105				19					
		βE2	0.25			104				24					
		EE2	0.25			102				21					
			LOQ			Spiking level 2 ng/L,n = 4			Spiking level 3–5xvalue,n = 4	Spiking level 2 ng/L,n = 4			Spiking level 3–5*value,n = 4		
			surface water	effluent	influent	drinking water	surface water	effluent	influent	drinking water	surface water	effluent	influent		
[28]	Surface and wastewater	E1	0.1	0.2	1.0	98	96	96	102	9	8	9	6	E1-d4	
		βE2	0.2	0.4	2.0	98	102	103	101	7	4	4	2	E2-d2	
		EE2	0.2	0.4	2.0	105	95	93	107	8	9	7	4	E2-d2	

			LOD			Bidistilled water,spiking level 1–20 ng/L:				
			drinking water	river water	effluent					
[29]	Drinking. surface and wastewater	E1	0.05	0.10	0.10	71–79		9–15	4-n-nonylphenol. binaphthyldiol	
		αE2	0.10	0.15	0.15	56–67				
		βE2	0.10	0.15	0.15	71–79				
		EE2	0.05	0.10	0.10	>70				
		+6[m]								
			LOD in surface water	Spiking level 10 ng/L: Ultra pure water,n = 4:	Surface water,n = 3:	Spiking level 10 ng/L: Ultra pure water,n = 4:	Surface water,n = 3:			
[32]	Effluent and surface water	E1	0.1	101	116	Mar-17	Feb-14	E1-d4		
		αE2	0.2	84	100			E2-d3		
		βE2	0.3	76	92			E1-d4-3S		
		E3	1.5	80	81			E2-d4-3S		
		EE2	0.2	82	90					
		E1-3S	0.1	87	97					
		E1-3G	0.4	88	82					
		E2-3S	0.2	98	99					
		E2-3G	0.5	93	71					
		E2-17G	3.1	82	91					
		E2-3G17S	1.6	75	97					
		E2-3S17G	0.3	76	69					
		E2-3.17DiS	0.7	87	76					
		E3-3S	0.3	94	57					
		E3-3G	2.7	86	92					
			LOQ[n]			Spiking level at least 2xinitial concentration,n = 5:			Spiking level at least 2°initial concentration,n = 5:			
			river water	effluent	influent	river water	effluent	influent	river water	effluent	influent	
[34]	Surface and wastewater	E1	0.008	0.08	0.2	89	88	91	3.1	2.7	2.4	aE2
		βE2	0.02	0.2	0.6	88	86	88	4.7	5.1	3.2	
		E3	0.02	0.2	0.6	90	86	86	4.3	4.8	3.8	
		EE2	0.03	0.3	0.9	87	84	86	4.8	6.2	5.6	
								River water.spiking level 3 ng/L.n = 5(over 1 week):				
								4.8 (E1) – 7.4 (EE2)				

[a]steroidal hormones: progesterone, D-norgestrel, norethindrone.
[b]estrogenic compounds: genistein, bisphenol, 3 xenoestrogens.
[c]isomer not specified.
[d]endocrine disruptors, pharmaceuticals and personal care products: 16 pharmaceuticals, 5 personal care products, 3 steroids, 1 pesticide.
[e]endocrine disruptors and pharmaceuticals: 12 PAHs, 18 pesticides, 7 personal care products, 16 pharmaceuticals, 3 steroids.
[f]endocrine disruptors: bisphenol A, 4-ter-octylphenol.
[g]calculated from standard deviation given in the publication.
[h]estimated from graphics given in the publication.
[i]endocrine disruptors: alkylphenols, diphenoalkanes, paraben, triazines, carbamates.
[j]endocrine disruptors: 3 mycoestrogens, 3 phytoestrogens, 2 alkylphenols.
[k]steroid sex hormones: testosterone, progesterone, cortisone, dehydroepiandrosterone, prednisone, levonorgestrel, norethindrone.
[l]steroid sex hormones: norgestrel, progesterone, 19-norethisterone.
[m]phenolic endocrine disruptors : 4-n-nonylphenol. technical nonylphenol. 4-ter-octylphenol. bisphenol A. binaphthyldiol. bispentafluorobenzylbenzene.
[n]LOQ determined with the ratio S/N equal 9.
[o]recoveries calculated from results presented in the publication.
[*]when not specified, sensitivity is estimated with the ratio S/N (equal 3 for LOD and 5 for LOQ).

Table 4. Analytical methods for the analysis of estrogens in solid samples

Ref.	Matrix	Sampling weight (g)	Estrogens studied	Sample preparation	Extraction method	Purification	Analytical method	Derivatization	Hydrolysis of conjugated
[10]	Particulate phase	0,015–0,150	E1, βE2, E3, EE2, MeEE2	Filtration (0,7 μm), acidification (pH 3-5), addition of formaldehyde	Microwave-assisted solvent extraction (30W,MeOH/H2O 55/45 v/v)	Free steroids: SPE-NH2 conjugated steroids: SPE-HLB + NH2	GC-EI-MS	MSTFA	Yes
[23]	Sediments	3	E1, βE2, EE2, DES, DIE	Dried	Sonication, hexane/acetone (50/50, v/v)	SPE-HLB	GC-EI-MS	–	–
[24]	Sediments	5	E1, βE2, EE2, MES	Freeze-dried	Sonication, MeOH followed by acetone	SPE-C18 + HPLC fractionation	GC-EI-MS/MS	MSTFA	–
	Sludge	0.5	E1, βE2, EE2, MES	Freeze-dried	Sonication, MeOH followed by acetone	GPC + silica cleanup	GC-EI-MS/MS	MSTFA	–
[25]	Sediments	1	E1, αE2, βE2, E3, EE2, E1-S, E1-G, E2-3-G, E2-3-S, E2-17-G, E3-3-S, E3-3G	Freeze-dried	Sonication, AcN/H2O (90/10, v/v)	SPE-EDS-1,	GPC + florisil for free fraction, Polyamide resin for conjugated fraction	RP-LC-ESI(-)-MS/MS	–
[26]	Suspended matter	2	E1, αE2, βE2, EE2	Acidification (pH2)	ASE, acetone/MeOH (50/50, v/v), 100 °C, 2000 psi	HPLC fractionation	GC-EI-MS/MS	MSTFA	–
[27]	Sediments	5	E1, βE2, E3, EE2	Freeze-dried	Rotary shaker, hexane/acetone (50/50, v/v) followed by diethyl ether/hexane (10:1, v/v)	GPC + SPE-C18	RP-LC-ESI(-)-MS or GC/MS	–	–
	Sludge	0.5	E1, βE2, E3, EE2	Freeze-dried		GPC + SPE-C18	RP-LC-ESI(-)-MS or GC/MS	–	–

Recoveries were in the range 87–127% for E1, αE2, βE2, E3 and EE2.

Generally, recoveries for solid matrices are more variable than those for aqueous matrices. They were in the range 60–130% (Table 5).

2.2. Purification

2.2.1. Aqueous matrices. Purification of the extract is less essential for the analysis of estrogens in aqueous matrices than for solid matrices. However, a clean-up step is generally used for analysis of wastewater influents, which are characterized by much higher organic matter content than STP effluent or surface waters.

Purification is mainly performed on silica-gel cartridges and elution is done with a mixture of hexane or cyclohexane/acetone 65/35 [17,28]. The use of a combination of silica and NH_2 cartridges for the analysis of surface water was also reported [19]. In that case, elution was performed with chloroform/acetone 80/20 v/v. Other combinations were also proposed (e.g., successive SPE on C18 and NH_2 cartridges [20], or successive HLB and NH_2 cartridges [10]). This last combination was also used for the analysis of conjugated hormones [10].

Kuch et al. [29] reported the analysis of estrogens in water (surface water, drinking water and wastewater) by GC-ECD and GC-MS without purification. However, they observed that, with GC-ECD, the complexity of environmental matrices generated a background noise with unidentified peaks that interfered with analyte signals. Quantitative analyses proved impossible.

2.2.2. Solid matrices. Purification is required for the analysis of estrogens in sediments and sludge. In most cases, this purification is carried out by GPC, followed by SPE clean-up with silica gel. For example, Ternes et al. (2002) reported purification of sludge based on GPC and silica gel clean-up, followed by GC-MS^2 analysis: recoveries were 80–120% [24]. GPC enabled removal of matrix components with high molecular masses. Different GPC columns could be used: PTFE and elution with acetone/cyclohexane 1/3 v/v [24]; SX-3 and elution with DCM/hexane 1/1 v/v [27]; and, Sephadex LH-20 and elution with DCM/MeOH 1/1 v/v [25].

HPLC fractionation can also be applied for purification of sediment extracts. Different columns are proposed (e.g., Kromasil 100 [24] or ODS [26]), which are both C18 phases. Elution is performed with a mixture of water/MeOH or water/AcN.

The addition of copper prior to extraction or during the clean-up step allows removal of sulphur from sediments, which can cause interferences in GC analysis [5].

For the analysis of six estrogens (E1, βE2, E3, EE2, DES and DIE) in river sediment, Hajkova et al. [23] tested several clean-up methods, including different SPE systems. GPC on Bio-Beads S-X3 and elution with a mixture of cyclohexane and ethyl acetate (1/1 v/v) were tested first, but the target analytes were not separated from the co-extracted matrix analytes. From the three SPE cartridges examined (ENVI-Carb 250 mg, Supelclean LC-18 500mg, Oasis HLB 60 mg) and conditions tested, purification on an Oasis HLB cartridge with elution with acetonitrile/1% ammonium hydroxide mixture (95/5, v/v) was selected.

To conclude on the purification step, it is difficult to compare the performances of the different techniques. Nevertheless, we note that the most widespread, simplest system is SPE, which gives satisfactory recoveries with both sediments and water matrices (Tables 3–5). SPE purification with silica gel, which represents the most common purification technique for analysis of various aqueous matrices by LC-MS^2, leads to good performances: 90–100% recoveries. HPLC fractionation, which is more difficult to implement, is performed with GC-MS^2 analysis only. It is applicable to all kinds of matrices. GPC is used for solid matrices, with analysis either by LC-MS^2 or GC-MS^2, and is generally coupled with SPE.

2.3. Analytical techniques

Among the different analytical techniques used for the analysis of estrogenic compounds, LC-MS^2, GC-MS and GC-MS^2 are the most widespread (Tables 2–4).

2.3.1. Liquid chromatography. LC is performed in reversed phase. ESI in negative mode is generally used. Alternatively, some studies reported use of ESI and APCI in positive mode. Detection is usually performed with MS^2, yet one author reported the use of DAD [22]. The LODs obtained using DAD are higher (μg/L range) than with MS^2 detection (LOD under or in the range of 1 ng/L, depending on matrices and analytes). LC is less used than GC for the analysis of solid matrices (Table 4).

Proper evaluation of the matrix effect is essential, particularly when analyses are performed with LC-MS^2. The presence of impurities coming from the matrix can affect ionization efficiency and, in co-elution with compounds of interest, result in signal suppression or signal enhancement. The purification step can enable elimination of some impurities, so limiting interferences. Use of isotopically labeled (e.g., deuterated compounds) internal standards is generally an efficient way to control matrix effects. Nevertheless, for the analysis of estrogens in sediments by LC-MS, Gomes et al. [27] showed that the signal suppression was different for βE2 and E2d4. Surprisingly, reproducibility was better when they used external standard calibration (SD 0.3–3.6%) rather than an internal standard calibration (SD 7.5–29.5%). We did not find other papers referring to this problem with LC-MS^2.

2.3.2. Gas chromatography. The use of GC implies a derivatization step, which is time-consuming and

Table 5. Parameters of method validation for solid samples

Ref.	Matrix	Analytes	Sensitivity (ng/g)*		Recovery (%)		Precision (RSD %)			Surrogate standard	Internal standard
[10]	Particulate phase		LOD in particulate phase		Spiking level 50 ng/g: River sediment		Spiking level 50 ng/g, n = 3:[8] River sediment				
		E1	0.4–1.9		73		8			E2-d4, EE2-d4, T-d3	
		βE2			73		5				
		E3			87		10				
		EE2			72		8				
		MES +3[a]			91		5				
			LOD in dried sediments		Sediments, spiking level 150 ng/g, n = 6:		Sediments, spiking level 15 ng/g, n = 6:	Sediments, n = 6: at 15 ng/g	at 150 ng/g		
[23]	River sediments	E1	5		120		83	6	5	20,21-13C2-ethynylestradiol	16,16,17-D3-17β-estradiol
		βE2	5		133		127	7	7		
		EE2	5		116		96	5	4		
		DES	1.5		91		75	5	5		
		DIE	1.5		58		60	17	12		
			LOQ in sludge (2nd lowest calibration point)	LOQ in sediments (2nd lowest calibration point)	Spiking level 100 ng/g, n = 6:	Spiking level 4 ng/g, n = 4:	Spiking level 100 ng/g, n = 6:[8]	Spiking level 4 ng/g, n = 4:[8]			
					digested zsludge	activated sludge	sediment	Digested sludge	Activated sludge	Sediment	
[24]	Sludge and sediments	E1	2	0.2	117	119	118	9	3	29	βE2-17β-acetate mirex
		βE2	2	0.2	117	83	110	14	16	14	
		EE2	4	0.4	94	113	105	20	17	27	
		mestranol	2	0.4	121	113	98	14	4	49	
			LOD in freeze-dried sediments		Sediments, spiking level 1 ng/g, n = 5:		Sediments, spiking level 1 ng/g, n = 5:				
[25]	Sediments	E1	0.02		119		10			E1-13C4	
		αE2	0.04		106		5			E2-13C4	
		βE2	0.07		117		7			E3-13C4	
		E3	0.32		69		10			EE2-13C2	
		EE2	0.09		109		10			E1-3-S-d4	
		E1-S	0.03		100		9			E2-3S-d4	
		E1-G	0.1		79		9			E2-17G-13C4	
		E2-3-S	0.03		88		9				
		E2-3-G	0.06		100		16				
		E2-17-G	0.19		85		16				
		E3-3-S	0.05		97		9				
		E3-3-G	0.1		119		19				

			LOQ in sediments(lowest calibration point)	Suspended matter	Suspended matter[8]	
				Spiked range: 0.2–1 ng/g	Spiked range: 0.2–1 ng/g	
[26]	Suspended matter	E1	0.2	124	35	equilinine
		αE2	0.2	110	13	and E1-d4
		βE2	0.2	127	20	
		EE2	0.2	87	30	

[a]steroidal hormones: progesterone, D-norgestrel, norethindrone.
[8]calculated from standard deviation given in the publication.
*when not specified, sensitivity is estimated with the ratio S/N (equal 3 for LOD and 5 for LOQ).

increases the risk of analyte losses. Derivatization is generally performed with MSTFA and aims at increasing volatility of the target compounds.

Recently, Hajkova et al. [23] published a new GC-MS method for the analysis of 5 estrogens (E1, βE2, EE2, DES, DIE) in river sediments without derivatization. Considering a high probability of signal suppression, they tested different GC and MS systems: GC-Q-MS; low pressure GC-Q-MS; GC-TOF-MS; and, GCxGC-TOF-MS. This combination of highly sophisticated instrumental methods achieved LODs between 0.4 ng/g (for EE2 with GCxGC-TOF-MS) and 12 ng/g (for βE2 with GC-TOF-MS) in sediments. TOF instruments offer resolving power superior to quadrupole and ion-trap detectors by minimizing matrix interferences and increasing S/N [27].

GC-MS is generally performed with EI. Kuch et al. [29] reported the use of GC-MS with CI using methane as reagent gas. They also used GC-ECD for qualitative confirmation of GC-CI-MS analysis.

For aqueous matrices, LODs obtained by GC-MS and GC-MS^2 are generally under 1 ng/L. However, Hernando et al. [14] reported for their method, without a purification step, an LOD of 4.0–17.0 ng/L by GC-MS with derivatization, and an LOD of 7.5–27.5 ng/L by GC-MS^2 without derivatization.

For solid matrices, the LODs with GC-MS are 1–5 ng/g, while the LOQs obtained by GC-MS^2 are under 0.5 ng/g for sediments and 2–4 ng/g in sludge.

Finally, we can cite Croley et al. [30], who studied MS for the analysis of estrogens in the environment and stated that LC-MS is quick and easy but did not reach the desired LODs (ng/L or ng/g range), GC-MS^2 with ion trap gives low LODs but sample preparation is unreliable (derivatization step with pentafluoropropionic acid), and LC-MS^2 provides good sensitivity and selectivity and seems to be the best analytical method for environmental matrices. Moreover, LC presents many advantages compared to GC (e.g., shorter analyses times, easy on-line coupling with SPE, no need for derivatization and the possibility of simultaneous analyses (in the same run) of both free and conjugated estrogens without an intermediate hydrolysis step).

3. Hydrolysis of conjugated estrogens

Estrogens are excreted by humans in urine in conjugated forms (i.e. with a glucuronide or sulphate group linked to the H in the –OH group of the steroid ring). The conjugated estrogens have low estrogenic potency compared with the parent compounds [7].

During their transfer from WTPs to surface waters, hormones are more or less hydrolyzed in their free form. Atkinson et al. [31] reported the presence of significant proportions of conjugated hormones in wastewaters. Unfortunately, not enough data on conjugated estrogens

are currently available to determine in which proportion these compounds are present in natural waters or wastewaters. Thus, in order to assess accurately the concentrations and fluxes of estrogens in the aquatic environment, it is essential to measure the total quantity of estrogens, including the conjugated fraction. To study the efficiency of hormone hydrolysis, it is necessary to use standard conjugated estrogens, most of which are, although expensive, theoretically commercially available (delivery time depends on demand). Until now, few studies have reported results on the analyses of conjugated estrogens [10,18,20,25,32].

The hydrolysis step can be performed before or after sample extraction. It consists in the action of an enzyme, called β-glucuronidase, at a fixed temperature and duration (37–55°C and 3–12 h, respectively, according to the authors) [10,18,20]. This enzyme can be isolated from bovine liver, *Escherichia coli* or mollusks; yet, only mollusks allow isolation of an enzyme with sulfatase activity in addition to β-glucuronidase activity. For the calculation of hydrolysis recovery (as a percentage), it is necessary to take into account the number of molecules hydrolyzed (and not the concentration of molecules hydrolyzed) because of the difference in molecular mass between free and conjugated estrogenic compounds.

Belfroid et al. [20] tested the efficiency of the β-glucuronidase arylsulfatase enzyme using an overnight reaction time at 37°C. Two replicates of a standard solution of β-estradiol-17-glucuronide were submitted to hydrolysis. The enzymatic reaction was complete, as shown by the calculated hydrolysis recoveries of 105% and 116%. Unfortunately, the nature of the samples used to perform these tests was not specified.

Mouatassim-Souali et al. [18] evaluated another method for the analysis of conjugated βE2 with a hydrolysis step performed for 12 h at 37°C after extraction on C18 disk (the nature of the conjugated molecule was not specified). They verified in Milli-Q water the absence of hydrolysis of conjugated estrogens and of conjugated estrogen losses during the extraction step. The completion of extraction and enzymatic hydrolysis performed with *Helix pomatia* juice (with β-glucuronidase and sulfatase activity) was reported for deionized water (90% recovery), as well as for wastewater (80% recovery).

To ensure complete cleavage of steroid sulfates, Labadie et al. [10] added a solvolysis step (incubation at 45°C for 30 min with trifluoroacetic acid/MeOH/tetrahydrofuran 10/200/800 μL), before enzymatic hydrolysis with β-glucuronidase arylsulfatase from *Helix pomatia*. They observed that extraction recovery of E2-17G was pH-dependent (53% at pH 8.0 and 84% at pH 5.0), which was not the case for E2-3S. The cleavage yield of the procedure (solvolysis followed by enzymatic hydrolysis) obtained with standard solutions was 99% for E2-17G and 88% for E2-3S. Unfortunately, the efficiency of enzymatic hydrolysis without the solvolysis step was not evaluated, so it is not possible reach any conclusion about the usefulness of this additional step.

Isobe et al. [25,32] reported a method for the analysis of conjugated estrogens (estrone-sulfate, estrone-glucuronide, estradiol-3-sulfate, estradiol-3-glucuronide, estradiol-17-glucuronide, estriol-3-sulfate, estriol-3-glucuronide) in sediments and water without hydrolysis. The analysis was carried out by LC-MS^2 after extraction by sonication with acetonitrile/water 9/1 v/v and purification on polyamide resin for sediments, or after extraction by SPE (polymeric phase) for aqueous samples. Recoveries of the method were in the range 57–116% (tested in surface water) and LODs were below 2.7 ng/L for each analyte.

4. Stability of estrogens in environmental matrices and solvent extracts

The European Commission Decision (2002/657/EC) states that stability of the analytes in standard solutions, the matrix and the extract should be tested [33]. Water samples are generally collected in amber glass bottles pre-cleaned with ultra-pure water and organic solvent. They are stored at 4°C upon return to the laboratory, then filtered and extracted generally within 48 h of collection. Preservatives (e.g., formic acid, hydrochloric acid, sulphuric acid, formaldehyde or methanol) can be added to water after filtration to avoid changes in sample composition and bacterial activity (Table 2). Solid samples are generally stored at −18°C, then freeze-dried before extraction (Table 4).

Noppe et al. [19] studied the short-term (4 weeks) stability of estrogens (E1, βE2, αE2, EE2) in ethanol extracts of water (type of water not mentioned) stored in the dark at 4°C. Peak-area ratios of target analytes and internal standards (E1-d_4 and equilinine) were compared using one-way ANOVA. With equilinine or E1-d_4, no significant degradation was observed in the derivatized extracts stored for up to 4 weeks. For the extracts stored before derivatization, a significant decrease in concentration was measured for EE2, αE2 and βE2 when using E1-d_4 as internal standard. According to Noppe et al. [19], the stability of E1-d_4 is affected by storage, unlike the stability of derivatized E1-d_4. The authors recommended analyzing extracts as soon as possible and, in storage, to favor derivatized extracts and to use equilinine as the internal standard.

Benijts et al. [15] assessed the stability of 35 endocrine-disrupting chemicals (e.g., E1, βE2, E3, EE2 and DES) at different stages during sample preparation (matrix not mentioned): after loading on the SPE column (HLB phase); after elution of the SPE column with 2-propanol/MTBE (10/90, v/v); after evaporation; and, finally, after reconstitution in water/AcN (80/20 v/v).

Analyses were performed with LC-ion trap-MS^2 and both short-term stability (samples stored at room temperature and 4°C for 24 h) and long-term stability (samples stored at 4°C for 7 days). They concluded that there were no losses for any of the 35 compounds of interest.

Stability of E1, βE2, E3 and EE2 stored for 60 days at 4°C in river water was studied by Baronti et al. [34]. Different types of storage were tested, including the addition of formaldehyde in the sample containers and the sample storage after extraction on the SPE cartridge (graphitized carbon, black phase). The addition of formaldehyde enabled estrogen stability to be extended, but did not completely block bacterial activity: except for E1, which was found at abnormally large amounts (maybe because of the oxidation of βE2 into E1), a significant loss after 60 days was observed (recovery above 88% after 14 days and below 65% after 60 days). For storage on SPE cartridge, different conditions of temperature (20°C and −18°C) and cartridge washing after sample extraction (with methanol or sterilized water) were tested. The best storage method to avoid estrogen degradation was to keep the cartridges at −18°C after MeOH washing. The reported recoveries after 60 days were: 93% for E1, 89% for βE2, 92% for E3, and 92% for EE2.

Vanderford et al. [12] tested preservation of samples for the trace analysis of 27 compounds including estrogens. Stability was verified in 1 L of surface water spiked with 100 ng/L of the target compounds. Samples were stored for 14 days at 4°C after acidification to pH 2 with concentrated sulphuric acid. While a 15% decrease in E2 concentration and a very negligible decrease in EE2 were observed in unpreserved surface water, a very small decrease in estrogen concentration for all estrogens over 14 days was measured in surface water preserved with sulphuric acid.

The final two references show different results for E2 stability in unpreserved surface water:

- Baronti et al. [34] reported severe losses (data not available) after 7 days storage; and,
- Vanderford et al. [12] showed only 15% losses after 14 days.

The difference is probably linked to the difference of matrices; the degree of degradation due to matrix components can vary, depending on the sample.

In conclusion, to avoid or limit degradation, the samples should be extracted as soon as possible (within 48 h of collection). The aqueous samples must be stored in the dark at 4°C and solid samples should be stored frozen then freeze-dried until extraction. For aqueous sample, storage at −18°C on SPE cartridge (graphitized carbon black) can also be a suitable solution. For conservation and stability studies, total estrogens (free and conjugated) must be analyzed because hydrolysis of conjugated estrogens could bias the results.

5. Validation of the analytical methods

5.1. Linearity of the analytical methods

Validation of linearity involves making a number of measurements of standard solutions over a concentration range greater than the scope of the method by about 20%. If the linear range covers several orders of magnitude, it is recommended to determine linearity separately over two or more separate smaller ranges.

Linearity is not systematically studied, or at least, is not always reported. Some authors reported a linear range without explaining how it was determined [20,32]. Other authors tested linearity by injecting a standard solution of analytes at different concentrations [11,34]. Only few authors made the effort to study linearity with real matrices: Hernando et al. [14] verified linearity of their method (GC-MS or GC-MS^2) by using matrix-matched calibration solutions prepared by spiking SPE extracts of wastewater at six concentration levels, ranging from the LOD to 500 ng/L. They obtained correlation coefficients of 0.997–0.999.

Vulliet et al. [17] constructed seven-point calibration curves at concentrations in the extract in the range 0.01–10 mg/L. Correlation coefficients greater than 0.990 were obtained with LC-MS analysis. Linearity of the overall method was verified both in distilled water and wastewater, at concentrations in the range 1–200 ng/L. In all cases, correlation coefficients reached at least 0.930.

In wastewater matrices, the calibration range is generally verified between the LOQ and 200–500 ng/L.

For surface waters, the linearity range is narrower: from the LOQ to 5–50 ng/L.

For sediments and sludge, linearity is studied between the LOQ and 200 ng/g.

For suspended matter, the range studied is from the LOQ to 2 ng/g.

Concerning linearity, there are no significant differences between LC-MS^2 and GC-MS^2.

Most authors studied only instrumental linearity; if the study of recoveries is done correctly (e.g., real matrix, various spiking levels), it does not seem to be essential to determine linearity for the overall method.

5.2. Sensitivity of the analytical methods: LOD and LOQ

Different methodologies are used to evaluate sensitivity of an overall analytical method [35]. The LOD and the LOQ can be determined by repeated analysis of a blank solution, as recommended by ISO/TR 13530: 1997 [39]. The LOD is calculated as 3 times the standard deviation of the blank signal. The LOQ is usually estimated as 10 times the standard deviation of the blank.

Nevertheless, as reported in Tables 3 and 5, in most studies, the LODs are set as the lowest concentration

with S/N 3 and the LOQ with S/N 10. Data are obtained from consecutive dilutions of spiked samples. Some authors determined sensitivity using the calibration curve. LODs or LOQs are set as the lowest or the second lowest concentrations in the curve [12,24,26].

Furthermore, LODs and LOQs vary significantly with the type of matrix and should be determined with not only spiked distilled water, but also real samples. (e.g., Lagana et al. [16] highlighted a significant difference between STP influent and river water: the LOD was 0.3 ng/L for E3 in river water and 7.0 ng/L in influent STP (Table 3)). However, evaluating sensitivity using real matrices could be difficult in so far as non-contaminated matrices are sometimes not available (e.g., wastewater).

In wastewater, LODs are generally of the order of 1 ng/L. LODs are higher in influent (1–7 ng/L) than in effluent (0.1–2.4 ng/L). In surface waters, LODs are most often under 1 ng/L. For solid matrices, LODs are around 0.2–5 ng/g.

5.3. Recovery of the analytical methods

It is important to assess recoveries for each matrix investigated at different representative concentrations. Method recoveries are influenced by analyte losses occurring during extraction and purification steps and by matrix interferences occurring during analytical detection.

5.3.1. Aqueous samples. For aqueous matrices, recoveries are calculated as the ratio of the response obtained for spiked samples to the one obtained for standard solutions. Most authors tested recoveries with at least one matrix and few used only ultra-pure water (Table 3). However, a minority studied recoveries on each studied matrix and at different spiking levels.

Mouatassim-Souali et al. [18] reported recoveries in treated wastewater slightly higher than in ultra-pure water for E1, βE2, E3 and EE2; for the same molecules, Lagana et al. [16] showed that recoveries were not matrix-dependent (Table 3).

Benijts et al. [15] studied recoveries at low (10 ng/L), medium (40 ng/L) and high (400 ng/L) spiked concentrations in surface waters. They observed no significant difference of efficiency between the three spiking levels. The use of stable isotope-labeled internal surrogates (E2-d_2, E1-d_4, EE2-d_4, DES-d_8) served as an automatic correction for losses of analytes during extraction or sample preparation, as well as for variations in instrument response from injection to injection.

Two authors reported low recoveries:

- Beck et al. [11] obtained recoveries of 10–20% in coastal surface waters by GC-MS; and,
- Almeida et al. [22] measured recoveries of 10–25% (for E1, αE2, βE2 and EE2) by HPLC-DAD.

Other authors reported recoveries of 80–100%, whatever the analytical technique (Table 3).

5.3.2. Solid samples. For solid matrices, spiking is not an ideal method. Indeed, it cannot be ensured that spiked compounds are linked with the matrix as they do naturally. A better solution would comprise spiking the sample and letting it age to allow the sorption processes to occur before carrying out the extraction. There is also a need for method validation with certified matrices, but so far there are no certified reference materials for estrogenic compounds. Moreover, as the sewage treatment process for wastewater could influence recoveries, sludge from each STP should be tested to evaluate recoveries [27].

To evaluate efficiency of estrogen extraction in sludge and sediments, Ternes et al. [24] used radiolabeled ^{14}C-17α-ethynylestradiol. They measured the radioactivity just after the extraction step. They reported extraction recoveries of 85% in sediments and 88% in sludge. Unfortunately, other estrogens are not available as ^{14}C-labelled compounds. In order to follow recoveries over the overall analytical method (extraction, purification and chromatographic analysis), they used both a surrogate standard (17β-estradiol-17β-acetate, spiked before extraction to compensate for losses during sample preparation) and an internal standard (mirex, spiked before chromatographic injection). To ensure sufficient contact with the spiking solution and to obtain homogenous matrices, the samples were stirred intensively and placed at room temperature for 14 h before extraction. For E1, βE2, MES and EE2, Ternes et al. [24] compared recoveries obtained with or without correction by the surrogate standard. Correction was efficient with recoveries of 94–121% (according to the molecule) in digested sludge spiked at 100 ng/g and 83–119% in activated sludge spiked at 100 ng/g. Recoveries were lower without correction: 57–77% in digested sludge and 73–104% in activated sludge. For sediments (spiked at 4 ng/g), recoveries also improved with correction, but less dramatically as they always exceeded 90%.

Noppe et al. [26] tried to estimate recoveries in suspended matter for four estrogens (E1, αE2, βE2 and EE2). A series of spiked blank suspended matter (0.2–1 ng/g) was analyzed. Four compounds were added during the method procedure: equilinine and E1-d4 as surrogate standards prior to extraction; androsterone prior to derivatization; and, ethinyltestosterone as internal standard before injection. Recoveries calculated with a correction for equilinine were 87–127% for the four estrogens. Recovery of equilinine itself was estimated at 74%, but recovery of the other surrogate standard (E1-d4) was not indicated.

In conclusion, it is important to determine recoveries for each matrix studied. This should be performed at different spiking levels, even if recoveries for aqueous matrices are more representative than for solid matrices. Reported recoveries in water samples are generally

80–100%. For solid samples, recoveries are more variable (Table 5): 60–120%, although the number of measurements is still relatively small.

5.4. Selectivity of the analytical methods

Selectivity or specificity relate to the ability of a method to provide an accurate answer in the presence of potential interferents. These two terms are rarely distinguished, although the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) recommends using selectivity to express the extent of interferences [36].

Only a few authors reported studies of selectivity:

- Benijts et al. [15] checked selectivity of their LC-MS^2 method for 35 endocrine disruptors (including estrogens) by analyzing different types of environmental water samples (types of water not specified). They demonstrated that sample origins had no significant influence. Good selectivity was achieved thanks to the clean-up step and the combination of retention time and optimization of MS^2 detection.
- Salvador et al. [9] used spiked distilled water and wastewater (with E1, βE2 and EE2 at 20 ng/L) and compared the measured LC-MS^2 area responses. An absolute matrix effect, defined as the ratio ''[response of the wastewater / response of the distilled water] x 100'', was calculated for each compound (88% for E1; 99% for βE2; and, 102% for EE2), demonstrating that the matrix effect was negligible.
- In a similar way, Vanderford et al. [12] compared the analysis of spiked methanol and spiked surface water and concluded that the analysis of estrogenic compounds by LC-MS^2 in APCI positive mode was not affected by the matrix.

Carpinteiro et al. [21] analyzed estrogens (DES, E1, βE2, MES, EE2) by SPME and GC-MS^2. They investigated matrix effects using different water samples (ultrapure, river and waste waters). Similar responses were obtained with ultrapure and river waters. A moderate decrease of recovery (less than 25%) was noted for the analysis of the most polar estrogenic compounds (E1, βE2 and EE2) in wastewaters. By contrast, for DES and MES, a dramatic decrease of signal intensity was observed, especially for untreated wastewater (more than 75%). The authors explained this effect by the decrease of the partition coefficients between the SPME fiber and the aqueous sample in the presence of a large amount of dissolved organic matter.

5.5. Precision of the analytical methods: repeatability and reproducibility

According to ISO 3534-1 [40], precision is ''the closeness of agreement between independent test results obtained under stipulated conditions''. The two components of precision are repeatability and reproducibility. Repeatability and reproducibility are calculated and reported as SD or RSD. Generally, the variability likely to be observed in an individual laboratory over a period of time is required. This is called intermediate precision or within-laboratory reproducibility. Ideally, repeatability and reproducibility should be tested on all the matrices studied. Precision should be measured over the range of concentrations generally present in real samples, as it usually depends on concentration. Replicates should be tested for the overall method, not only for the chromatographic analysis step.

Generally, precision is studied for several spiking levels, and the number of replicates and matrices are specified. Nevertheless, the exact test conditions are seldom reported, so, in most cases, it is not possible to know if reported precisions referred to reproducibility or repeatability. As reported in Tables 3 and 5, the strategy to test precision of the analytical method can vary considerably from one study to another.

Vulliet et al. [17] tested repeatability of their method, dedicated to the analysis of steroid sex hormones in wastewater, by processing six replicates of distilled water spiked at 200 ng/L. In those conditions, RSDs were 1.4–2.7%. But, it would be important to determine precision on real samples.

Almeida et al. [22] evaluated within-day and between-day precision, as RSDs on six replicates of a spiked water sample: results varied between 2.1% for progesterone and 17.1% for EE2. The experimental conditions of this study were not fully described (i.e. matrix used, spiking level). They estimated precision with three replicates of a water sample (nature not specified) spiked at 10 μg/L: the reported RSDs varied between 4.4% and 13.8%.

Carpinteiro et al. [21] studied repeatability with four replicates of water samples spiked at three concentration levels (25, 50 and 500 ng/L). The RSDs varied between 1% and 12% for the five estrogens studied (E1, βE2, EE2, DES and MES).

Salvador et al. [9] evaluated precision (period covering the test not mentioned) by analyzing five samples of effluent wastewater spiked at 10 ng/L. The RSDs obtained were in the range 4.6–10.8% for three estrogens.

Mouatassim-Souali et al. [18] studied repeatability and reproducibility in Milli-Q and effluent water according to the ICH (International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use) requirements [37,38]. Repeatability was evaluated at 10 ng/L by repeated analysis twice a day for 3 days: the RSDs varied between 0.7% for βE2 and 5.9% for E3. Reproducibility was determined at 10 ng/L and estimated using ANOVA analysis. It varied from 1.5% for βE2 to 5.9% for E3.

Benijts et al. [15] evaluated precision at three concentration levels distributed over the range of the calibration curve (10, 40 and 400 ng/L). An uncontaminated surface water was used as a representative matrix for the validation procedure. Precision was tested by analyzing five replicates per concentration level, on

the same day for repeatability and on four consecutive days for reproducibility. Repeatability varied from 4.1% to 12.8%, and reproducibility from 6.8% to 18.7% for the five estrogens studied (E1, βE2, E3, EE2 and DES). The highest values were obtained for the assays performed at the 10 ng/L spiking level.

Hajkova et al. [23] validated their method aiming at analyzing steroid estrogens in river sediments in accordance with the Commission Decision 2002/657/EC, Part 3, Annex I [33]. Two sets of dry blank sediments, each consisting of six samples, were spiked with the analyte mixture (E1, βE2, E3, EE2, DES, DIE) at two concentration levels (15 ng/g and 150 ng/g). Before extraction, the samples were incubated for 2 h to ensure better adsorption of the analytes on sediments. At the spiking level of 15 ng/g, the RSDs varied from 5% (EE2 and DES) to 17% (DIE). At the spiking level of 150 ng/g, the RSDs were found between 4% (EE2) and 12% (DIE).

Labadie et al. and Ternes et al. also tested precision for sediment (period covering the test not mentioned) [10,24]. They used different spiking levels: 50 ng/g [10] and 4 ng/g [24]. The RSDs obtained were quite different: 5–10% [10] and 14–49% [24].

Ternes et al. [24] also tested precision (period covering the test not mentioned) with spiked digested and activated sludge. They obtained RSDs of 3–20% for a spiking level of 100 ng/g.

Noppe et al. [26] verified the precision of their method with spiked suspended matter; RSDs were 13–35% for a spiking range of 0.2–1 ng/g.

In conclusion, precision of the overall method and not only instrumental precision is generally reported. Real matrices are used and the reported RSDs are usually under 20% for aqueous and solid samples.

5.6. *Accuracy*

Accuracy is the degree of conformity of a measured quantity to its actual (true) value. Evaluation of accuracy is difficult for the analysis of estrogens in environmental matrices, as no certified reference material is currently available.

Method validation and quality controls aim to ensure accuracy and reliability of analytical results. Determination of recovery is one possible means to check accuracy; nevertheless, it should be combined with other quality controls (e.g., use of standards from different suppliers and use of deuterated surrogates), and if possible intra-laboratory and inter-laboratory tests (e.g., at least analysis by different analytical methods).

Several authors affirmed that they had defined accuracy, whereas they simply calculated recoveries by analyzing a matrix spiked with a known amount of analytes [15,17,21].

Mouatassim-Souali et al. [18] calculated recoveries too, but they expressed their results as the relative error between observed and theoretical values, as recommended by the ICH [37,38].

To the authors' knowledge, no publication refers to inter-laboratory tests for the analysis of estrogens in environmental matrices.

6. Conclusion

Analysis of estrogenic compounds in aqueous samples is well documented in the literature, unlike analysis in solid samples (e.g., sediments and sludge). Aqueous samples are mostly analyzed by LC-MS^2 or GC-MS^2, while, for solid samples, GC-MS or GC-MS^2 are generally used. LODs are under 1 ng/L for river waters, in the range of 1 ng/L for wastewaters, and 0.2–5 ng/g for sediments and sludge.

The use of the term ''method validation'' is often abused. Only a few authors completely validated their methods. Indeed, for a majority of the reviewed publications:

- instrumental linearity was studied with standard solutions;
- the LODs were estimated in deionized water, and, more rarely, in real matrices; and,
- recoveries were calculated, but not always in real matrices and at different spiking levels.

Generally, precision was not evaluated over several days and it was often impossible to determine if repeatability or reproducibility was tested.

Specificity was rarely studied, and only few papers referred to the stability of the analytes. With respect to conjugated estrogens, only a few authors took them into account.

For validation to be correct, all tests should be performed on real matrices. Sensitivity needs to be validated not only with spiked distilled water, but also on real samples. Within-day repeatability and between-day repeatability of the overall analytical method need to be studied. Also, the quantity of total estrogens should be estimated. Both free and conjugated estrogens should be analyzed. The use of deuterated surrogate standards and of internal standards is recommended. Ideally, the linearity of the overall method (including extraction, purification and chromatographic analysis) should be tested and specificity should be evaluated with the matrices of interest spiked at different representative concentrations.

References

[1] B. Halling-Sorensen, S.N. Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C.H. Lutzhoft, S.E. Jorgensen, Chemosphere 36 (1998) 357.
[2] M.Y. Gross-Sorokin, S.D. Roast, G.C. Brighty, Environ. Health Perspect. 114 (2006) 147.
[3] M.L. Richardson, J.M. Bowron, J. Pharm. Pharmacol. 37 (1985) 1.

[4] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J.L. de Alda, D. Barcelo, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 637.
[5] R.L. Gomes, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 697.
[6] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J.L. de Alda, D. Barcelo, J. Chromatogr., A 974 (2002) 23.
[7] M.J.L. de Alda, D. Barcelo, Fresenius' J. Anal. Chem. 371 (2001) 437.
[8] M. Kuster, M.J. Lopez, M.J.L. de Alda, D. Barcelo, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 790.
[9] A. Salvador, C. Moretton, A. Piram, R. Faure, J. Chromatogr., A 1145 (2007) 102.
[10] P. Labadie, H. Budzinski, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 5113.
[11] I.C. Beck, R. Bruhn, J. Gandrass, W. Ruck, J. Chromatogr., A 1090 (2005) 98.
[12] B.J. Vanderford, R.A. Pearson, D.J. Rexing, S.A. Snyder, Anal. Chem. 75 (2003) 6265.
[13] R.A. Trenholm, B.J. Vanderford, J.C. Holady, D.J. Rexing, S.A. Snyder, Chemosphere 65 (2006) 1990.
[14] M.D. Hernando, M. Mezcua, M.J. Gomez, O. Malato, A. Aguera, A.R. Fernandez-Alba, J. Chromatogr., A 1047 (2004) 129.
[15] T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, Anal. Chem. 76 (2004) 704.
[16] A. Lagana, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, Anal. Chim. Acta 501 (2004) 79.
[17] E. Vulliet, J.B. Baugros, M.M. Flament-Waton, M.F. Grenier-Loustalot, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 2143.
[18] A. Mouatassim-Souali, S.L. Tamisier-Karolak, D. Perdiz, M. Cargouet, Y. Levi, J. Sep. Sci. 26 (2003) 105.
[19] H. Noppe, K. De Wasch, S. Poelmans, N. Van Hoof, T. Verslycke, C.R. Janssen, H. De Brabander, Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 91.
[20] A.C. Belfroid, A. Van der Horst, A.D. Vethaak, A.J. Schafer, G.B.J. Rijs, J. Wegener, W.P. Cofino, Sci. Total Environ. 225 (1999) 101.
[21] J. Carpinteiro, J.B. Quintana, I. Rodriguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, J. Chromatogr., A 1056 (2004) 179.
[22] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, J. Pharmaceut. Biomed. 41 (2006) 1303.
[23] K. Hajkova, J. Pulkrabova, J. Schurek, J. Hajslova, J. Poustka, M. Napravnikova, V. Kocourek, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 1351.
[24] T.A. Ternes, H. Andersen, D. Gilberg, M. Bonerz, Anal. Chem. 74 (2002) 3498.
[25] T. Isobe, S. Serizawa, T. Horiguchi, Y. Shibata, S. Managaki, H. Takada, M. Morita, H. Shiraishi, Environ. Pollut. 144 (2006) 632.
[26] H. Noppe, T. Verslycke, E. De Wulf, K. Verheyden, E. Monteyne, P. Van Caeter, C.R. Janssen, H.F. De Brabander, Ecotox. Environ. Safe. 66 (2007) 1.
[27] R.L. Gomes, E. Avcioglu, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 737.
[28] S. Zuehlke, U. Duennbier, T. Heberer, J. Sep. Sci. 28 (2005) 52.
[29] H.M. Kuch, K. Ballschmiter, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3201.
[30] T.R. Croley, R.J. Hughes, B.G. Koenig, C.D. Metcalfe, R.E. March, Rapid Commun. Mass Spectrom. 14 (2000) 1087.
[31] S. Atkinson, M.J. Atkinson, A.M. Tarrant, Environ. Health Perspect. 111 (2003) 531.
[32] T. Isobe, H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki, M. Morita, J. Chromatogr., A 984 (2003) 195.
[33] European Commission, Commission Decision (2002/657/EC) Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. J. Eur. Commun. L221 (2002) 8.
[34] C. Baronti, R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Samperi, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 5059.
[35] J. Vial, A. Jardy, Anal. Chem. 71 (1999) 2672.
[36] J. Vessman, R.I. Stefan, J.F. Van Staden, K. Danzer, W. Lindner, D.T. Burns, A. Fajgelj, H. Muller, Pure Appl. Chem. 73 (2001) 1381.
[37] ICH International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use - Guideline Q2B: Validation of analytical procedures: methodology. Adopted on 7 November 1996.
[38] ICH International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use - Guideline Q2A: Validation of analytical procedures: definitions and terminology. Adopted on 27 October 1996.
[39] International Organization for Standardization, ISO/TR 13530:1997, Water quality – Guide to analytical quality control for water analysis, ISO, Geneva, Switzerland, 1997.
[40] International Organization for Standardization, ISO 3534-1, Statistics – Vocabulary and symbols - Part 1: Probability and general statistical terms, ISO, Geneva, Switzerland, 1993.

Virginie Gabet is a doctoral research student at the Water Quality and Pollution Prevention Research Unit at Cemagref Lyon, under the supervision of M. Coquery and C. Miège. She graduated in chemistry from CPE Lyon (Engineering School) and she has a Master's degree in analytical chemistry. She joined the group in 2006. Her research interests focus on analysis, fate and behavior of estrogenic compounds and beta-blockers in WTPs and surface waters.

Cécile Miège has a Ph.D. from the environment and analytical chemistry laboratory of The City of Paris Industrial Physics and Chemistry Higher Educational Institution (ESPCI). She is the head of the organic micropollutants laboratory. Her main expertise is in the field of analytical environmental chemistry, specifically of organic micropollutants. She has experience in extraction, purification and chromatographic techniques to identify and quantify PAHs, PCBs, surfactants and pesticides at trace level in euents, soils and sludge. She is involved in research projects on the use of semi-permeable membrane devices for evaluating the bioavailability of contaminants. Since 2003, she has worked on developing analytical protocols to quantify beta-blockers and hormones in sewage and surface waters.

Philippe Bados is an engineer assistant in the Water Quality and Pollution Prevention Research Unit at Cemagref Lyon. For more than 12 years, he has been giving technical support for development and validation of new analytical procedures. He works at the interface with ecotoxicology, generally in multidisciplinary programs to evaluate occurrence and quantify xenobiotic concentrations in complex environmental matrices. He joined the Water Chemistry Laboratory under the supervision of M. Coquery in 2006.

Marina Coquery has a Ph.D. in marine geochemistry. She is research director and scientific leader of the Water Chemistry Laboratory. She has extensive experience in field sampling and trace-element analysis in the aquatic environment, as well as in the organization of international inter-comparison studies and certification of reference materials. She has organized numerous training courses (metal analysis; quality control and good laboratory practices) and installation of laboratories for international U.N. programmes. She has co-ordinated technical support to the Ministry of the Environment for the national programme of monitoring of toxic substances in wastewaters. She is coordinating research projects on the occurrence and the transfer of priority and emerging pollutants in aquatic systems.

1.4.2 Méthodes analytiques pour les bêtabloquants dans les matrices environnementales

1.4.2.a Méthodes d'extraction

Phase dissoute

Les différentes méthodes utilisées pour analyser les bêtabloquants dans les eaux usées et les eaux de surface sont présentées dans le tableau 13. Parmi les articles étudiés, les bêtabloquants les plus souvent analysés sont ATE, MET et PROP alors que TIM, BET et OXP sont rarement étudiés.

Avant extraction, les échantillons sont tout d'abord filtrés sur filtre en fibre de verre ou sur membrane en nylon (porosité variant généralement entre 0,45 et 1,2 µm). Dans le cas d'échantillons très chargés en matières en suspension, une centrifugation peut être réalisée au préalable. Le volume d'échantillon extrait varie en fonction de la nature de l'échantillon entre 100 et 1000 mL. Une étape de mise à pH est souvent réalisée avec des valeurs de pH variant entre 2 et 10,5 en fonction de la phase utilisée pour l'extraction et des molécules ciblées pour l'analyse.

L'extraction est ensuite réalisée par SPE. Différentes cartouches peuvent être utilisées, mais les phases les plus employées sont des phases polymériques type Oasis® HLB (Wiegel *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2006; Gros *et al.*, 2006; Nikolai *et al.*, 2006; Petrovic *et al.*, 2006; Vieno *et al.*, 2006) ou Oasis® MCX (Stolker *et al.*, 2004b; Castiglioni *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2007; Piram *et al.*, 2008a). Certains auteurs rapportent également l'utilisation de phase polymériques apolaires (Sacher *et al.*, 2001; Hilton et Thomas, 2003; Hernando *et al.*, 2004b; Bendz *et al.*, 2005) et de phases de silice greffée (Hernando *et al.*, 2004b). En ce qui concerne l'élution des composés, elle est généralement réalisée avec du méthanol.

Les rendements de méthode rapportés par les différents auteurs sont très variables : entre 18 et 115 % en fonction de la méthode, de la molécule et de la matrice utilisée pour évaluer ce rendement (tableau 15). Les moins bons rendements sont obtenus avec une extraction sur phase de type silice greffée - C18 et une matrice influent : rendements compris entre 18 et 34 % pour ATE, BET, MET et SOT (Hernando *et al.*, 2004b). Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus pour le même type de matrice avec des extractions sur phase Oasis®

HLB : rendements compris entre 43 et 108 % (Gros *et al.*, 2006; Nikolai *et al.*, 2006; Vieno *et al.*, 2006).

L'effet du pH sur l'efficacité d'extraction des analytes a été testé par plusieurs auteurs (Gomez *et al.*, 2006; Gros *et al.*, 2006; Vieno *et al.*, 2006) travaillant avec des cartouches de type Oasis® HLB. Il a notamment été démontré que les rendements d'extraction de bêtabloquants (ATE et SOT) sur cartouches Oasis® HLB passaient de moins de 10 % à plus de 60 % lorsque le pH augmentait de 4 à 10 (Vieno *et al.*, 2006). De même, en comparant les résultats obtenus avec des pH variant entre 2 et 7, les meilleures performances ont été obtenues à pH 7 (Gomez *et al.*, 2006; Gros *et al.*, 2006). Ces résultats sont liés aux propriétés physico-chimiques des bêtabloquants. En effet, ces molécules ont des pKa de l'ordre de 9 et se trouvent donc sous forme non chargée à pH élevés et sous forme protonnée à pH acides (tableau 2). Avec des phases de type Oasis® HLB, les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus à pH élevé car les molécules se trouvent alors majoritairement sous forme neutre et sont donc mieux retenues.

La plupart des méthodes existantes pour analyser les bêtabloquants sont en fait des méthodes multirésidus visant à analyser simultanément des composés pharmaceutiques de familles différentes avec des propriétés physico-chimiques variées. Ces méthodes ne sont donc pas optimisées pour analyser spécifiquement les bêtabloquants. Pour ces méthodes multirésidus, la phase Oasis® HLB qui permet d'extraire des composés présentant une large gamme de polarité est la plus utilisée. La phase Oasis® MCX, qui associe au mécanisme de balance hydrophile/lipophile un mécanisme d'échange de cations, est plus spécifique que la phase HLB pour les molécules basiques telles que les bêtabloquants. Dans le cas d'une extraction avec une phase de ce type, les échantillons sont souvent acidifiés au préalable afin d'être sûr d'avoir toutes les molécules sous forme protonnée et ainsi d'augmenter l'efficacité de l'extraction.

Quelques rares études rapportent également des extractions en ligne s'appliquant à différentes molécules pharmaceutiques, incluant quelques bêtabloquants (Pitarch *et al.*, 2004; Bones *et al.*, 2006). En particulier, une méthode permet d'analyser certaines molécules pharmaceutiques, dont 2 bêtabloquants, à partir de seulement 25 µL d'échantillon (Pitarch *et al.*, 2004). Dans cette approche, l'échantillon est directement injecté dans le système chromatographique et piégé dans une petite colonne capillaire (1 cm de long) avant de passer dans une colonne LC classique. Les rendements obtenus sont satisfaisants pour le bisoprolol, compris entre 61 et 78 % en fonction de la matrice. En revanche, pour le métoprolol, des rendements très faibles, compris entre 13 et 21 % (quelque soit la matrice testée), sont

obtenus. L'auteur explique ces mauvaises performances par la présence d'effets matrices gênant l'ionisation du métoprolol.

Phase solide

Peu d'études s'intéressent à l'analyse des bêtabloquants dans la phase dissoute, mais encore moins se consacrent à l'analyse de ces molécules dans la phase solide (matières en suspension, boues, sédiments). Seuls 2 articles rapportent l'analyse de bêtabloquants dans les boues de STEP (tableau 14). Un premier présente une méthode permettant d'analyser 31 molécules pharmaceutiques, dont 4 bêtabloquants (Radjenovic *et al.*, 2009a). Les boues liquides sont tout d'abord lyophilisées (les boues les plus liquides sont centrifugées au préalable). L'extraction d'une aliquote de 1 g de boue lyophilisée est réalisée par ASE®. Différents mélanges de solvants ont été testés (méthanol/eau (1/1, 1/2 et 2/1 v/v), acétonitrile/eau (1/1, 1/2 et 2/1 v/v) et méthanol) et le meilleur compromis a été obtenu pour le mélange méthanol/eau 1/2, v/v. La température d'extraction a également été optimisée (75 et 100 °C) et les meilleures performances ont été obtenues à 100°C. Trois cycles d'extraction ont été retenus dans la mesure où PROP et MET étaient retrouvés en proportion non négligeables dans la 3ème fraction. Les rendements associés à cette méthode ont été évalués par dopage d'échantillons de différentes natures. Afin d'optimiser le contact entre la solution de dopage et l'échantillon, la boue dopée est agitée et extraite seulement après 24h de stabilisation. Les rendements obtenus sont tout à fait satisfaisants : entre 47 et 90 % en fonction de la molécule et de la matrice. Une autre étude rapporte l'analyse de métoprolol dans les boues et consiste en une extraction par ASE® à 75°C avec un mélange acétone/eau (3/7, v/v) (Thomas *et al.*, 2007).

1.4.2.b Méthodes de purification

Contrairement à l'analyse des estrogènes, pour les bêtabloquants, une étape de purification est rarement utilisée pour la phase dissoute. Un seul auteur emploie une étape de purification qui consiste en une filtration sur colonne de sulfate de sodium anhydre, cette purification visant principalement à éliminer toute eau résiduelle de l'échantillon (Nikolai *et al.*, 2006).

En ce qui concerne l'analyse des bêtabloquants dans les boues, l'extrait obtenu est purifié par SPE sur 2 phases de même type, soit sur cartouche Oasis® HLB (Radjenovic *et al.*, 2009a), soit sur cartouche StrataX® (Thomas *et al.*, 2007) qui sont.

1.4.2.c Techniques analytiques

Que ce soit pour les eaux ou pour les matrices solides, l'analyse par LC-MS/MS est la méthode la plus utilisée pour les produits pharmaceutiques en général et les bêtabloquants en particulier. Etant donnée la faible volatilité des bêtabloquants, la séparation des analytes par chromatographie liquide est la plus adaptée. Une étude récente fait référence à l'utilisation de UPLC® (Ultra-Performance Liquid Chromatography) (Petrovic *et al.*, 2006). Basée sur les mêmes principes que l'HPLC, l'UPLC® permet des améliorations dans plusieurs domaines, à savoir la résolution chromatographique, la vitesse d'analyse et la sensibilité : dans l'étude citée, les 29 composés sont séparés en 10 minutes avec des pics bien résolus. L'ionisation des molécules se fait le plus souvent par électrospray (ESI) en mode positif. La détection par spectrométrie de masse permet d'obtenir une bonne sélectivité et une bonne sensibilité. Pour l'analyse des bêtabloquants, le triple quadripôle est le détecteur le plus utilisé. Il fonctionne généralement en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) et 2 transitions sont scannées, une servant à quantifier et l'autre permettant de confirmer la présence de la molécule. La confirmation se fait généralement en comparant le ratio des 2 transitions dans l'échantillon avec le ratio obtenu dans des étalons.

Quelques auteurs ont publié des résultats obtenus avec d'autres types d'analyseurs. L'analyseur à temps de vol (TOF) est un système très sélectif basé sur le temps que met un ion soumis à une tension pour parcourir une distance donnée. Il permet de déterminer des mesures de masses exactes. Cependant, l'importante résolution de cet appareil est limitée par une sensibilité plus faible que celle obtenue avec un triple quadripôle. Les limites de détection obtenues avec un analyseur TOF varient entre 15 et 100 ng/L pour un influent (Petrovic *et al.*, 2006), alors que pour les mêmes molécules dans le même type de matrice, elles varient entre 29 et 42 ng/L avec un triple quadripôle (Gros *et al.*, 2006).

Le système QTRAP est un analyseur hybride pouvant opérer soit en mode triple quadripôle, soit en mode trappe d'ions. La sensibilité de cet analyseur utilisé en mode triple quadripôle a été évaluée : LD comprises entre 4 et 17 ng/L dans les effluents et entre 17 et 110 ng/L dans les influents (Nikolai *et al.*, 2006).

Tableau 13 : Méthodes analytiques pour l'analyse des bêtabloquants dans les eaux (phase dissoute)

Molécules analysées (Références)	Matrice	Volume	Bêtabloquants étudiés	Préparation d'échantillon	Extraction	Purification	Méthode analytique
Bêtabloquants et bêta2-agonistes (Lee *et al.*, 2007)	influents effluents	250 mL	acébutolol aténolol bisoprolol métoprolol nadolol propranolol sotalol timolol	filtration à 1,2 µm sur filtres en fibre de verre avec une couche de célite et acidification à pH 3 avec HCl	SPE-Oasis® MCX, 8 mL DCM/2-propanol/hydroxyde d'ammonium (78/20/2 v/v/v)	-	LC-ESI(+)-MS/MS
Pharmaceutiques neutres et basiques (Vieno *et al.*, 2006)	influents effluents eaux de surface eaux souterraines	100 mL 250 mL 500 mL 1000 mL	acébutolol aténolol métoprolol sotalol	filtration à 0,45µm et mise à pH 10 avec NaOH	SPE-Oasis® HLB, 4 * 1 mL MeOH	-	LC-ESI(+)-MS/MS
Bêtabloquants et agents régulateurs de lipides (Hernando *et al.*, 2004b)	influents effluents eaux de surface eau du robinet	100 mL	aténolol bétaxolol métoprolol sotalol	filtration à 0,45 µm sur membrane en nylon et mise à pH 10,5	SPE-Isolute®C18, 2 * 3 mL MeOH	-	LC-ESI(+)-MS/MS
Bêtabloquants (Maurer *et al.*, 2007)	effluent primaire effluent secondaire	100 mL 150 mL	aténolol métoprolol propranolol sotalol	filtration à 0,45 µm sur filtres en fibre de verre	SPE-Oasis® MCX, 5 mL MeOH/NH_3 (99/1 v/v)	-	LC-ESI(+)-MS/MS
Pharmaceutiques (Petrovic *et al.*, 2006)	influents effluents eaux de surface	100 mL 200 mL 500 mL	aténolol métoprolol propranolol sotalol	filtration à 0,45 µm sur membrane en nylon	SPE-Oasis® HLB, 2 * 4 mL MeOH	-	UPLC®-ESI(+)-MS/MS
Bêtabloquants et corticostéroïdes (Piram *et al.*, 2008a)	influents effluents	400 mL	acébutolol aténolol bisoprolol métoprolol nadolol propranolol sotalol timolol	filtration à 0,45 µm sur membrane en nylon et acidifié avec 400 µl d'acide formique à 85%	SPE-Oasis® MCX, MeOH/NH_3 (95/5 v/v)	-	LC-TIS(+)-MS/MS

Molécules analysées (Références)	Matrice	Volume	Bêtabloquants étudiés	Préparation d'échantillon	Extraction	Purification	Méthode analytique
Pharmaceutiques (Bendz *et al.*, 2005)	influents effluents eaux de surface	800 à 1000 mL	aténolol métoprolol propranolol	centrifugation et filtration à 1,2 µm sur filtres en fibre de verre	SPE-Isolute C2/ENV+, 2 * 5 mL MeOH avec 2 à 5 % triéthyl amine et 2 * 5 mL MeOH avec 2 à 10 % acide formique	-	LC-ESI(+)-MS/MS
Pharmaceutiques (Gros *et al.*, 2006)	influents effluents eaux de surface	100 mL 200 mL 500 mL	aténolol métoprolol propranolol sotalol	filtration à 0,45 µm sur membrane en nylon	SPE-Oasis® HLB, 2 * 4 mL MeOH	-	LC-ESI(+)-MS/MS
Pharmaceutiques (Hilton et Thomas, 2003)	effluents eaux de surface	1000 mL	propranolol	filtration à 0,45 µm sur filtres en fibre de verre et mise à pH 3 avec HCl	SPE-StrataX, 3 * 2 mL MeOH	-	LC-ESI(+)-MS/MS
Pharmaceutiques (Sacher *et al.*, 2001)	eaux souterraines	1000 mL	aténolol bétaxolol bisoprolol métoprolol propranolol sotalol	mise à pH 7	SPE-PPL Bond Elute, 5 mL MeOH	-	LC-ESI(+)-MS/MS
Pharmaceutiques (Wiegel *et al.*, 2004)	influents effluents eaux de surface eau de mer	1000 mL	métoprolol propranolol	filtration à 1,2 µm sur filtres en fibre de verre et mise à pH 7 avec H_2SO_4	SPE-Oasis® HLB, 14 mL MeOH	-	LC-ESI(+)-MS/MS
Bêtabloquants (Nikolai *et al.*, 2006)	influents effluents	100 mL 500 mL	aténolol métoprolol propranolol	filtration à 0,7 µm sur filtres en fibre de verre	SPE-Oasis® HLB, 6 mL MeOH	filtration sur colonne de $NaSO_4$ anhydre	LC-ESI(+)-MS/MS
Pharmaceutiques (Gomez *et al.*, 2006)	effluents hospitaliers	100 mL	aténolol propranolol	filtration à 0,7 µm sur filtres en fibre de verre et mise à pH 7 avec H_2SO_4	SPE-Oasis® HLB, 2 * 4 mL MeOH	-	LC-ESI(+)-MS/MS
Pharmaceutiques (Castiglioni *et al.*, 2005)	effluents	500 mL	aténolol	filtration à 2,7 µm sur filtres en fibre de verre et mise à pH 2 avec HCl	SPE-Oasis® MCX, 2 mL MeOH, 2 mL MeOH/NH_3 (98/2 v/v), 2 mL MeOH/NaOH (99,8/0,2 v/v)	-	LC-ESI(+)-MS/MS

Molécules analysées (Références)	Matrice	Volume	Bêtabloquants étudiés	Préparation d'échantillon	Extraction	Purification	Méthode analytique
Pharmaceutiques (Stolker *et al.*, 2004b)	effluents eaux de surface	100 mL	bisoprolol métoprolol	filtration et mise à pH 3 avec HCl	SPE-Oasis® MCX, 8 mL MeOH/NH_3 (95/ v/v)	-	LC-ESI(+)-MS/MS
Pharmaceutiques (Bones *et al.*, 2006)	eaux de surface	500 mL	aténolol propranolol	filtration à 0,7 µm sur filtres en fibre de verre et mise à pH 4 avec HCl	SPE en ligne - Chromolith C18, 250 mL eau/acétonitrile (90/10 v/v)	-	LC-ESI(+)-MS
Pharmaceutiques (Pitarch *et al.*, 2004)	eaux de surface eaux souterraines eau potable	25 µL	bisoprolol métoprolol	acidification avec 0,01% acide formique et filtration à 0,2 µm sur des filtres en nylon	SPE en ligne – aqua C18, 30 µL eau/acide formique (99,9/0,1 v/v)	-	LC-ESI(+)-MS/MS

DCM : dichlorométhane
MeOH : méthanol
ESI : électrospray
TIS : TurboIonSpray

Tableau 14 : Méthodes analytiques pour l'analyse des bêtabloquants les boues de station d'épuration

Molécules analysées (Références)	Matrice	Prise d'essai	Bêtabloquants étudiés	Préparation d'échantillon	Extraction	Purification	Méthode analytique
Pharmaceutiques (Radjenovic *et al.*, 2009a)	boue primaire boue activée boue du bioréacteur à membrane boue traitée	1 g	aténolol métoprolol propranolol sotalol	centrifugation des boues liquides et lyophilisation	ASE 100°C, eau/MeOH (2/1 v/v)	SPE-Oasis® HLB	LC-ESI(+)-MS/MS
Pharmaceutiques (Thomas *et al.*, 2007)	boue	5g	métoprolol	boue sèche (pas de précision sur la méthode)	ASE 80°C, acétone/eau (3/7 v/v)	SPE-StrataX®	LC-ESI(+)-MS/MS

1.4.2.d Effets matrice

Dans des échantillons aussi complexes que les eaux usées ou les boues de station d'épuration, la présence d'interférents peut perturber la quantification des composés d'intérêt. En effet, des composés issus de la matrice peuvent co-éluer avec les analytes et ainsi perturber l'ionisation des analytes. Cette perturbation peut se traduire soit par une extinction de signal, soit par une augmentation de signal. Il est donc important d'évaluer ces effets matrices. Pour cela, différentes méthodes peuvent être mises en œuvre.

L'effet matrice peut être appréhendé en comparant les aires obtenues pour un standard et pour un échantillon dopé à la même concentration que ce standard (Gomez *et al.*, 2006; Petrovic *et al.*, 2006; Vieno *et al.*, 2006; Piram *et al.*, 2008a). Avec cette méthode, une légère suppression de signal (inférieure à 10 %) a été observée pour ACE, MET, PROP et SOT dans l'eau de surface (Petrovic *et al.*, 2006; Vieno *et al.*, 2006). Un impact plus important est noté pour les eaux de STEP. Dans les influents, la suppression de signal est variable en fonction des molécules : inférieure à 30 % pour PROP et SOT (Petrovic *et al.*, 2006), supérieure à 40 % pour ACE (Vieno *et al.*, 2006) et supérieure à 50 % pour ATE (Petrovic *et al.*, 2006). Pour MET, des effets matrice différents variant entre moins de 30 % (Petrovic *et al.*, 2006) et plus de 40 % (Vieno *et al.*, 2006) sont observés dans les influents. Dans les effluents, la suppression de signal est évaluée à moins de 20 % pour ATE, MET, PROP et SOT (Petrovic *et al.*, 2006) et respectivement 72 % et moins de 45 % pour ATE et PROP dans les effluents hospitaliers (Gomez *et al.*, 2006).

Il est également possible d'évaluer l'effet matrice en comparant les résultats obtenus sur des extraits non dilués et dilués (Lee *et al.*, 2007) : ce test (dilution par 2, 5 et 10) a permis de mettre en évidence l'absence d'effet matrice pour tous les bêtabloquants ciblés sur les extraits d'eau usée analysés. Cependant, en analysant les extraits avec la fraction de méthanol normalement jetée lors du lavage, une baisse de signal de 50 à 90 % est observée. Cette baisse qui varie lorsque l'échantillon est dilué, permet de mettre en évidence un effet matrice qui est limité, voire annulé, par un lavage efficace lors de l'extraction.

Afin d'évaluer l'importance des effets matrice, il est possible de réaliser une droite d'étalonnage dans la matrice et de la comparer avec celle obtenue avec des étalons (Gros *et al.*, 2006; Radjenovic *et al.*, 2009a). Si les deux droites sont parallèles et superposables, il n'y a pas de suppression de signal. Ainsi, une suppression de signal allant jusqu'à 90 % a ainsi été observée pour ATE analysé dans des influents de STEP (Gros *et al.*, 2006). Dans les boues de STEP, de très forts effets matrice ont été observés pour ATE, MET, PROP et SOT

(Radjenovic *et al.*, 2009a). Dans la boue traitée, des suppressions de signal allant de 0,3 à 74,9 % ont été observées. Pour les boues primaires et secondaires, des suppressions de signal de 34,8 à 41,6 % ont été observées pour tous les bêtabloquants alors qu'une augmentation de signal de 21,3 % est notée pour ATE. Enfin, pour les boues issues d'un bioréacteur à membranes, des suppressions de signal sont observées pour MET et PROP (46,3 et 39,4 % respectivement) et des augmentations de signal sont observées pour ATE et SOT (17,0 et 101,8 %, respectivement).

Enfin, l'effet matrice peut être évalué en observant la perturbation causée par l'injection d'un échantillon simultanément à un étalon (qui est infusé) (Vieno *et al.*, 2006). Pour les eaux souterraines et les eaux de surface, aucune perturbation n'est notée ; par contre, pour les eaux de STEP une suppression de signal est observée graduellement au delà de 10 min.

Pour certains auteurs, l'effet matrice est lié au temps de rétention du composé. Plusieurs auteurs ont rapporté que les composés sortant en début du gradient sont plus affectés ; mais le phénomène a été également observé à la fin du chromatogramme pour les matrices très chargées (Hernando *et al.*, 2004b).

Pour palier ce problème d'effet matrice, l'utilisation de traceur interne peut parfois permettre de corriger ce biais (Gros *et al.*, 2006) ; mais la difficulté consiste à trouver un étalon traceur qui permette de corriger efficacement tous les analytes. La dilution de l'extrait représente également une possibilité pour diminuer les interférences, mais son inconvénient réside dans le fait que cette méthode augmente la limite de quantification.

1.4.2.e Stabilité

Il est parfois difficile d'extraire les échantillons tout de suite après leur prélèvement. Pour cette raison, il est donc important de connaître la stabilité des analytes dans l'échantillon, de manière à garantir la validité des résultats obtenus. Cette stabilité est particulièrement importante à connaître pour des échantillons très chargés en matière organique tels que les eaux usées ou les boues de stations d'épuration. Pourtant, très peu d'auteurs présentent des études de stabilité des composés dans les matrices environnementales.

La stabilité d'échantillons d'effluents de STEP conservés dans le noir à 4°C dans des bouteilles en verre ambré, a été évaluée par Lee *et al.* (2007). Cette étude, réalisée sur des échantillons dopés, a permis de mettre en évidence la stabilité des bêtabloquants (ACE, ATE, MET, NAD, PROP, SOT et TIM) pendant 7 jours (Lee *et al.*, 2007).

1.4.2.f Validation de méthode

Une validation de méthode complète est nécessaire pour s'assurer de la fiabilité de la méthode analytique. Pourtant, peu d'articles présentent une validation de méthode complète (tableau 15).

La linéarité est souvent présentée, mais dans la majorité des cas celle-ci est réalisée uniquement avec des étalons, et non pas avec des matrices réelles (Pitarch *et al.*, 2004; Castiglioni *et al.*, 2005; Vieno *et al.*, 2006; Piram *et al.*, 2008a). Il s'agit donc d'une étude de la linéarité instrumentale et non pas de la linéarité de la méthode globale. Quelques rares auteurs réalisent cependant une réelle étude de linéarité de la méthode (Hernando *et al.*, 2004b; Gomez *et al.*, 2006). Ainsi, la linéarité d'une méthode visant à analyser des produits pharmaceutiques a été évaluée avec des effluents hospitaliers (Gomez *et al.*, 2006). La linéarité a été vérifiée entre 0,1 et 100 µg/L pour ATE et 0,05 et 100 µg/L pour PROP.

La sensibilité de la méthode est également souvent documentée. Le plus souvent, les limites de détection (LD) sont définies par un rapport signal/bruit de fond (S/N) de 3 et les limites de quantification (LQ) par un rapport S/N de 10 (Hernando *et al.*, 2004b; Pitarch *et al.*, 2004; Castiglioni *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2006; Piram *et al.*, 2008a). Quelques fois, seule la limite de détection instrumentale est évaluée (Piram *et al.*, 2008a), mais généralement la sensibilité de la méthode globale est étudiée. La sensibilité est souvent évaluée par dopage d'eau pure (Pitarch *et al.*, 2004) ou d'une matrice réelle (effluent) dans le meilleur des cas (Hernando *et al.*, 2004b; Castiglioni *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2006). Cependant, il peut être difficile de trouver une matrice ne contenant pas les composés recherchés. Dans ces cas là, la sensibilité peut être déterminée à partir de la sensibilité instrumentale et du rendement de l'analyte dans la matrice (Vieno *et al.*, 2006). Une autre méthode pour déterminer la sensibilité consiste à définir la LD comme 3 fois l'écart type du plus bas niveau de dopage (Lee *et al.*, 2007).

Des informations sur les rendements de récupération de la méthode sont en général disponibles. Ces rendements sont souvent estimés pour chaque matrice et à différents niveaux de dopage représentatifs des concentrations généralement retrouvées (Hernando *et al.*, 2004b; Pitarch *et al.*, 2004; Gros *et al.*, 2006; Vieno *et al.*, 2006; Hernando *et al.*, 2007; Radjenovic *et al.*, 2009a).

La précision est rarement étudiée. La plupart des auteurs se contentent d'évaluer des répétabilités ou des reproductibilités instrumentales, c'est-à-dire évaluent le coefficient de variation sur plusieurs injections d'un même échantillon (Castiglioni *et al.*, 2005; Gros *et al.*,

2006; Radjenovic *et al.*, 2009a). Certains auteurs réalisent cependant une réelle étude de la précision de la méthode en évaluant le coefficient de variation des aires des pics chromatographiques sur 10 extractions différentes d'échantillons d'eau (eau de rivière et eau potable) dopée (Bones *et al.*, 2006).

Enfin, les données de sélectivité et d'exactitude sont rarement renseignées.

Tableau 15 : Paramètres de validation de méthode pour les eaux (phase dissoute)

Références	Analyte	Sensibilité (ng/L)	Rendement de méthode (%)		Précision SD (%)		Traceur de méthode	Etalonnage
(Lee *et al.*, 2007)		LD 3 * écart-type au plus bas niveau de dopage	Eau distillée dopée 50 ng/L	Eau distillée dopée 500 ng/L	Eau distillée dopée(n = 6) 50 ng/L	Eau distillée dopée(n = 6) 500 ng/L		
	acébutolol	9	88	95	6	5	-	Externe
	aténolol	6	90	96	4	4		
	bisoprolol	8	91	88	5	6		
	métoprolol	8	85	91	5	5		
	nadolol	9	82	88	6	4		
	propranolol	10	93	91	6	7		
	sotalol	8	90	95	6	7		
	timolol	7	83	89	5	5		

(Vieno *et al.*, 2006)		LQ Calculées à partir de la LQ instrumentale et du rendement de l'analyte dans la matrice				ESout.	ES	Inf.	Eff.	ESout. (n = 3)	ES (n = 3)	Inf. (n = 3)	Eff. (n = 3)		
		EP	ES	Inf.	Eff.	0,1 µg/L	0,1 µg/L	2 µg/L	1 µg/L	0,1 µg/L	0,1 µg/L	2 µg/L	1 µg/L		
	acébutolol	0,4	0,8	6,4	2,1	93	105	64	78	4	6	2	4		
	aténolol	6,5	11,8	49	21	81	90	108	101	3	6	10	4	Alprénolol	Externe
	métoprolol	2,2	3,8	21	9,1	90	104	93	87	3	1	7	3		
	sotalol	1,6	3,9	19	5,2	76	62	66	94	4	8	15	5		

(Hernando *et al.*, 2004b)		LD Calculées à partir de S/N = 3	Eau ultra pure 15 µg/L	Eau du robinet 15 µg/L	ES 15 µg/L	Inf. 15 µg/L	Eff. 15 µg/L			
	aténolol	17	80,3	58,7	48,7	27,5	50,1	-		
	bétaxolol	750	52,0	40,3	42,5	27,5	45,1	-	-	Externe
	métoprolol	550	76,2	55,2	43,1	34,2	42,5	-		
	sotalol	18	89,7	76,2	63,2	18,0	52,3	-		

Références	Analyte	Sensibilité (ng/L)						Rendement de méthode (%)						Précision SD (%)	Traceur de méthode	Etalonnage
(Petrovic *et al.*, 2006)		LD S/N = 3 pour un influent dopé														
	aténolol	50						-						-	-	Interne : ATE-D7
	métoprolol	15						-						-		
	propranolol	100						-						-		
	sotalol	50						-						-		
(Gros *et al.*, 2006)		LD S/N = 3			LQ S/N = 10			ES		Inf.		Eff.				
		ES	Inf.	Eff.	ES	Inf.	Eff.	50 ng/L	10 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	100 ng/L	10 µg/L	réplicats d'analyse chromatographique		
	aténolol	9	42	10	30	141	40	96	87	97	82	96	92			
	métoprolol	3	42	10	12	36	30	103	60	86	104	114	103	RSD : 1 – 12 %	-	Interne : ATE-D7
	propranolol	2	42	7	7	40	20	81	102	70	85	44	85			
	sotalol	18	29	60	60	97	100	115	50	56	43	71	43			
(Hilton et Thomas, 2003)		LD S/N = 10 étalon						100 ng/L						RSD n = 3	[^{13}C]phenacetin	Externe
	propranolol	10						45						5,6		
(Sacher *et al.*, 2001)		LD						Eau du robinet 25 ng/L				ES 25 ng/L				
	aténolol	2,4						86				67		-		
	bétaxolol	3,7						70				45		-		
	bisoprolol	3,3						67				44		-		
	métoprolol	2,2						96				54		-	-	Externe
	propranolol	4,6						84				48		-		
	sotalol	2,3						76				81		-		
(Nikolai *et al.*, 2006)		LD S/N = 3						Inf.				Eff.		Inf. (n = 8)	Eff. (n = 8)	
		Inf.			Eff.			500 ng/L				100 ng/L		500 ng/L	100 ng/L	
	aténolol	110			12			74				67		16	29	
	métoprolol	42			17			104				75		54	39	- Interne : levobunolol
	propranolol	17			4,4			106				87		24	25	

Références	Analytes	Sensibilité (ng/L ou ng/g pour boues)		Rendements de méthode	Précision SD (%)		Traceur de méthode	Etalonnage
(Gomez *et al.*, 2006)		**LD S/N = 3 Eff. hospitaliers**	**LQ S/N = 10 Eff. hospitaliers**	**Effluents hospitaliers 1 µg/L**	**Répétabilité RSD n = 4**	**Reproductibilité RSD n = 4**		
	aténolol	28	78	97,1	1,3	7,8	-	Interne : [^{13}C]phenacetin
	propranolol	8	22	87,5	1,1	9,7		
(Castiglioni *et al.*, 2005)		**LQ S/N = 10 Eff.**			**réplicats d'analyse chromatographique**			
	aténolol	1,07		106	RSD : 1,9 – 7,77 %		Salbutamol-D3	Interne
(Stolker *et al.*, 2004a)		**LQ S/N = 10**		**100 ng/L**	**Répétabilité RSD n = 5**	**Reproductibilité RSD n = 6**		
	bisoprolol	5		87	5	15	-	Externe
	métoprolol	5		97	2	19		
(Pitarch *et al.*, 2004)		**LD S/N = 3**		**EP**	**ESout.**	**ES**		
				50 ng/L	**50 ng/L**	**50 ng/L**	**50 ng/L**	**50 ng/L**				
	bisoprolol	2 - 10		77	78	61	61	69	-		-	Externe
	métoprolol			20	19	21	16	13	-			
(Radjenovic *et al.*, 2009a)		**LQ S/N = 10**		**Boue traitée 200 ng/g**	**Boue primaire 200 ng/g**	**Boue secondaire 200 ng/g**	**HF MBR 200 ng/g**	**FS MBR 200 ng/g**	**réplicats d'analyse chromatographique**			
		Boue traitée	**Boue primaire et secondaire**	**MBR**					**Répétabilité RSD**	**Reproductibilité RSD**		
	aténolol	5,3	4,8	5,6	89,8	78,2	80,1	85,1	79,9	2,3	4,0	diazepam-D5 et phenobarbitol-d3	Interne : atenolol-D7
	métoprolol	1,14	0,96	1,01	70,2	77,8	72,9	60,7	89,2	1,4	1,9		
	propranolol	3,01	1,31	0,84	60,8	51,0	47,4	53,3	69,2	1,4	2,4		
	sotalol	12,7	7,83	6,20	86,9	70,6	60,6	81,0	62,2	3,7	6,2		

SD : écart-type
LD : limite de détection
LQ : limite de quantification
S/N : rapport signal sur bruit de fond
ES : eau de surface
EP : eau potable
ESout. : eau souterraine
Inf. : influent
Eff. : effluent
MBR : bioréacteur à membrane

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Choix des sites d'étude

2.1.1 Stations d'épuration des eaux résiduaires

L'un des objectifs de ce travail de thèse consistait à déterminer les capacités de différents procédés épuratoires des eaux usées à éliminer les hormones estrogéniques et les bêtabloquants. Pour ce faire, 16 stations d'épuration (STEP) mettant en œuvre des procédés épuratoires variés ont été sélectionnées sur plusieurs critères tels que les types de traitements mis en œuvre (ou filière de traitement), le bon fonctionnement de la STEP ou sa situation géographique. Ce travail de choix a été réalisé en collaboration avec les différents acteurs du projet AMPERES (Coquery *et al.*, 2009).

2.1.1.a. Filières retenues

Une liste de 12 filières de traitement des eaux constituée des principaux procédés conventionnels de traitement rencontrés en France a été sélectionnée (tableau 16). Dans cette liste, sont présentes :

- des filières répandues sur le territoire national soit en raison de leur aptitude à l'élimination des paramètres majeurs (pollution carbonée, azotée et phosphorée) avec une maintenance réduite (boue activée faible charge massique le plus souvent sans traitement primaire), soit en raison d'un encombrement au sol réduit (biofiltres). Ce dernier procédé à forte compacité est placé soit en aval de décantation primaire physico-chimique, soit après une boue activée à forte/moyenne charge massique, notamment lors de réhabilitation d'anciennes stations situées en ville par exemple.
- des filières conventionnelles en plein essor au niveau national en raison de leur facilité d'exploitation dans les communes rurales (filtres plantés de roseaux ; bio-disques) fonctionnant seules, ou bien placées en aval de lagunage naturel ou de lit bactérien pour un meilleur respect du niveau de rejet D4 (traitement du carbone et de l'azote).

En plus des 12 filières primaires et secondaires conventionnelles, une liste de 4 filières de traitement des boues a été établie : les procédés de digestion anaérobie, de compostage, de séchage (thermique ou gravitaire sur filtre planté), ou de chaulage.

Tableau 16 : Récapitulatif des filières d'épuration des eaux et des boues retenues

Traitements primaires et secondaires	Traitement des boues
Dégrillage simple	Digestion anaérobie
Prétraitements + décantation primaire	Compostage
Prétraitements + décantation primaire physico-chimique	Séchage
Prétraitements + boue activée et bioréacteur (C + N ± P)	Chaulage
Prétraitements + décantation primaire + boue activée et bioréacteur (C seul)	
Prétraitements + décantation primaire + boue activée et bioréacteur (C + N ± P)	
Prétraitements + décantation primaire ou non + culture fixée (lit bactérien, biodisque)	
Prétraitements + décantation primaire (± réactifs) + biofiltres (1, 2 ou 3 étages)	
Prétraitements + bioréacteur à membranes	
Prétraitements + lagune	
Prétraitements + filtre planté	
Prétraitements + infiltration / percolation	

2.1.1.b. Critères de choix des STEP à étudier

Pour répondre à nos objectifs, des STEP ont été sélectionnées de façon à être représentatives des filières choisies.

La conformité de fonctionnement de la STEP pour la bonne élimination des paramètres globaux (demande chimique en oxygène ou DCO et demande biologique en oxygène ou DBO) a été le premier critère retenu. Au-delà de ce critère, ont été examinées des caractéristiques d'installation incontournables pour garantir le bon échantillonnage comme :

- les dispositions constructives (accès prélèvement, faisabilité de la mesure de débit),
- l'éloignement par rapport au laboratoire de base.

Lors de la recherche des STEP, les critères suivants ont également été examinés :

- charges admises par rapport à la charge nominale[2],
- connaissance de la STEP,
- originalité de la filière de traitement des boues ou présence d'un traitement tertiaire,
- possibilité d'utiliser un des sites pour mener les études concomitantes envisagées (recherche des micropolluants sélectionnés dans le milieu aquatique récepteur en amont et en aval du rejet).

[2] Lors de leur installation, les STEP sont dimensionnées pour traiter une certaine charge polluante, c'est la charge nominale. La charge polluante reçue en pratique par les STEP diffère souvent de la charge nominale. On fait donc la différence entre la charge admise et la charge nominale de la STEP.

L'effort porté sur telle ou telle filière (en nombre de STEP par filière) a également été choisi en fonction des informations de la littérature scientifique. Un effort plus important a par exemple été porté sur les installations par cultures fixées plus rarement documentées dans la bibliographie alors que le nombre d'installations est important au niveau national.

2.1.1.c. Stations étudiées

Sur la période allant de février 2007 à octobre 2008, 16 STEP ont été échantillonnées sur le territoire français (figure 4) : 6 STEP sont situés en région Rhône-Alpes, 5 sont localisées dans le quart sud-est du territoire, 3 sont situées en Ile de France et 2 en région Provence-Alpes-Côte d'Azur. Leurs caractéristiques sont présentées dans les tableaux 17 a et 17 b ci-après.

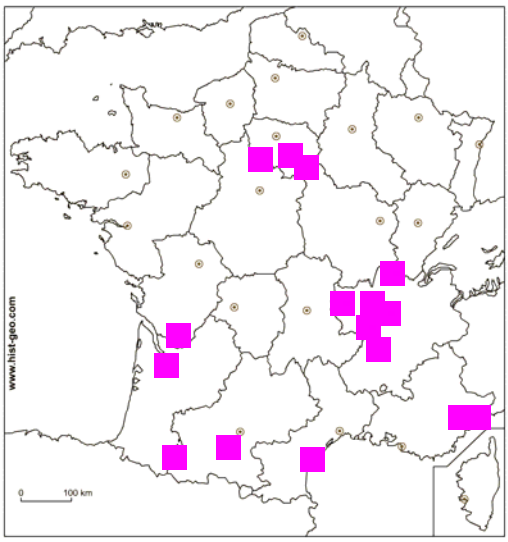


Figure 4 : Répartition géographique des 21 STEP étudiées

Tableau 17 a : Caractéristiques des 14 STEP étudiées dans leur globalité (filières eau et boue)

Code Station	Période d'échantillonnage	Filière eau : traitements I et II	Filière eau : traitement III	Filière boue	Capacité Nominale (EH) (Taux de charge (%))	T (°C)	Q mesuré (m^3/j) (Réseau de collecte)	Milieu Récepteur	C_m (j^{-1}) (SRT (j))	Observations
CA1	2 - 8 fév 07	BA (C + N)	-	Séchage sur lit planté de roseaux	2 900 (60 %)	9	637 (unitaire)	rivière Ardières (sensible)	0.07 (26)	Précipitations sans augmentation de débit. Eaux claires parasites (2/3).
SE1	26 fév - 1 mars 07	BA (C + N + P)	-	DM avec polymère	36 000 (80 %)	15	4 200 (mixte)	ru de Maurepas	0.04 (21)	Fortes pluies (J3), ruissellement STEP vers canal sortie.
CA2	19 - 22 mars 07	BA (C + N)	-	Séchage sur lit planté de roseaux	13 000 (50 %)	13	910 (unitaire)	fleuve Rhône aval de Lyon	0.10 (16)	Précipitation de 7 à 8 h, le 1er jour. Arivée Step vers 10h
SE2	23 - 26 avr 07	Déc. I + BA (C + N ± P)	-	Digestion anaérobie + DM + chaulage	250 000 (60 %)	20	28 000 (mixte)	fleuve Seine amont Paris	0.08 (13)	Digestion Anaérobie non optimale
CA3	21 - 24 mai 07	Déc. I + BAm (C) + BF (N)	-	DM avec polymère	950 000 (100 %)	20	306 900 (unitaire)	fleuve Rhône aval Lyon	0.35 (4)	Mesure effectuée en sortie biofiltre qui admet 15% du débit total. Pas de prélèvement sortie générale station.
SE3	11 - 14 juin 07	BA (C + N ± P)	Décanteur rapide (lit de boue)	DM + séchage thermique	50 000 (80 %)	23	6 100 (séparatif)	ru de Maldroit	0.05 (22)	Flottation de boues importante. Tertiaire saturé
SE4	10 - 12 sept 07	BA (C + N)	-	DM avec polymère	110 000 (50 %)	20	14 500 (mixte)	gave de Pau	0.06 (17)	-
SE5	8 - 11 oct 07	BRM (Zenon, 10 000 m^2)	-	DM avec polymère + chaulage	24 000 40 %)	24	1 500 (unitaire)	ru de Vallon St-Antoine	0.06 (17)	-
SE6	15 - 17 oct 07	Déc. I physico-chimique + BF (C + N)	-	DM avec polymère	26 000 (80 %)	21	3 750 (mixte)	rivière la Bouillide	-	-
CA4	3 - 5 déc 07	DB, FPR	Lagunage naturel		1 000 (100 %)	10	133 (unitaire)	rivière le Lez (via fossé)	-	-
CA5	4 - 6 fév 08	Déc. I physico-chimique + BF (C)	-	DM avec polymère	80 000 (60 %)	11	8 500 (unitaire)	fleuve Rhône aval de Lyon	-	-
CA6	10 - 12 mars 08	FPR (vertical et horizontal)	Filtre horizontal avec portion d'apatite	Boues séparées sur filtre vertical	100 (90 %)	10	17 (mixte)	fleuve Rhône amont de Lyon (via fossé)	-	Faibles précipitations en J2 avec augmentation de débit < 15%
SE9	7 - 9 avr 08	Lit bactérien + FPR	-	Boues séparées sur filtre vertical	1 000 (60 %)	20	135 (séparatif)	estuaire de la Gironde	-	Temps de pluie déclaré (débit admis 65% supérieure à la moyenne annuelle). Nitrification partielle.
CA7	29 sept - 1 oct 08	Décanteur/digesteur + LA naturel + FPR (horizontal)	-		300 (80 %)	20	36 (mixte)	ruisseau de Rodes	-	-

EH : equivalent habitant ; BA : boue activée aération prolongée ; BAm : boue activée moyenne charge ; BF : biofiltre ; BRM : bioréacteur à membranes ; Déc. I : décantation primaire ; DB : disques biologiques ; DM : déshydratation mécanique ; FPR : filtre planté de roseaux ; LA : lagunage ; Q : débit mesuré en entrée de station ; Cm : charge massique ; SRT : âge des boues.

Tableau 17 b : Caractéristiques des STEP étudiées spécifiquement pour leur filière boue

Code Station	Période d'échantillonnage	Filière eau : traitements I et II	Filière eau : traitement III	Filière boue	Capacité Nominale (EH) (Taux de charge (%))	T (°C)	Q mesuré (m^3/j) (Réseau de collecte)	Milieu Récepteur	C_m (j^{-1}) (SRT (j))	Observations
SE7	10 - 12 mars 08	- boues seulement -	-	Compostage	120 000 (65%)	-	-	ru de Malepère	-	-
SE8	7 - 9 avril 08	- boues seulement -	-	Digestion anaérobie + séchage thermique	300 000	-	unitaire	estuaire de la Gironde	-	-

EH : équivalent habitant ; Q : débit mesuré en entrée de station ; Cm : charge massique ; SRT : âge des boues.

Sur les différentes STEP retenues (tableaux 17a et b), 14 (CA1 à 7, SE1 à 6 et SE9) ont été étudiées dans leur globalité (filières eau et boues) et 2 autres (SE7 et 8) ont été choisies pour étudier plus spécifiquement la filière boue.

Pour l'étude de la filière eau, 4 STEP sont équipées d'un traitement primaire de type décanteur primaire associé ou pas à un traitement physico-chimique (ajout de floculant permettant d'améliorer la décantation) et 1 STEP possède un décanteur/digesteur.

Concernant les traitements secondaires (ou traitements biologiques), on distingue les procédés à culture libre et les procédés à culture fixée. Parmi les différentes STEP retenues, 9 mettent en œuvre des procédés à culture libre : 7 boues activées (6 aération prolongée et 1 moyenne charge), 1 bioréacteur à membranes et 1 lagune associée à un filtre planté de roseaux horizontal. Par ailleurs, 5 STEP fonctionnent avec des procédés à culture fixée : 2 biofiltres (l'un traitant seulement le carbone et l'autre traitant le carbone et l'azote), 1 disque biologique associé à un filtre planté de roseaux, 1 filtre planté de roseaux (vertical et horizontal) et 1 lit bactérien associé à un filtre planté de roseaux.

Certaines de ces stations sont également équipées d'un traitement tertiaire. On dénombre 3 STEP dans ce cas : SE3 qui possède un décanteur rapide, CA4 équipée d'une lagune et enfin CA6 qui possède un filtre horizontal avec portion d'apatite.

Pour les STEP étudiées dans leur globalité (filières eau + boue), le traitement des boues consiste généralement en une déshydratation mécanique avec ajout de polymère (parfois associée à un chaulage, un séchage thermique ou une digestion anaérobie), un séchage sur lit planté ou une séparation sur filtre vertical. Les 2 STEP sélectionnées pour l'étude spécifique des filières boues (tableau 17b) mettent quant à elles en œuvre 2 autres procédés : le compostage (SE7) et la digestion anaérobie associée au séchage thermique (SE8).

2.1.2 Milieux naturels

Pour cette partie de l'étude, différentes équipes du Cemagref de spécialités différentes (chimie et écotoxicologie) ont travaillé sur les mêmes sites avec comme objectif l'étude de l'impact des STEP sur le milieu naturel. Pour satisfaire à cet objectif, différentes méthodes et outils ont été utilisés : des études chimiques avec prélèvements classiques ou utilisation d'échantillonneurs intégratifs et des études de toxicité (test sur micororganismes). Le choix

des milieux naturels s'est donc fait en concertation avec le laboratoire d'Ecotoxicologie de l'Unité de Recherche Biologie des Ecosystèmes Aquatiques. Par ailleurs, le taux de dilution des effluents de STEP dans la rivière, la localisation des STEP sur le cours d'eau et la faisabilité de la mise en oeuvre des outils biologiques ont également été pris en compte dans le choix des sites étudiés.

Les sites finalement retenus sont les suivants : Beaujeu sur l'Ardières, Fontaines sur la Saône et Bourgoin Jallieu sur la Bourbre (figure 5).

L'Ardières, rivière de 29,9 km de longueur, est un affluent direct de la Saône située au nord du département du Rhône, dans le Haut-Beaujolais (bassin versant de 220 km²). Lors de l'étude, le débit moyen mesuré à proximité des sites de prélèvement est de 57 710 m^3/j. Ce site est impacté par différentes sources de contamination : culture (viticole entre autres), industrie et station d'épuration. La station d'épuration de Beaujeu, située en zone rurale, traite des effluents domestiques et hospitaliers.

La Saône, rivière de 480 km de longueur, est le principal affluent du Rhône. Cette rivière prend sa source dans le département des Vosges et rejoint le Rhône au niveau de Lyon. Cette rivière est la première rivière de France par la taille de son bassin versant avec 29950 km². Le débit moyen de la rivière mesuré à proximité des sites de prélèvement lors de l'étude est de 283 890 m^3/j. La station d'épuration de Fontaines sur Saône recoit des effluents domestiques et industriels.

La Bourbre, rivière de 72,2 km de longueur, est un affluent du Rhône située dans le département de l'Isère (bassin versant de 703 km²). Le débit moyen de la rivière mesuré à proximité des sites de prélèvement lors de l'étude est de 45 288 850 m^3/j. La station d'épuration de Bourgoin Jallieu traite des effluents domestiques et industriels.

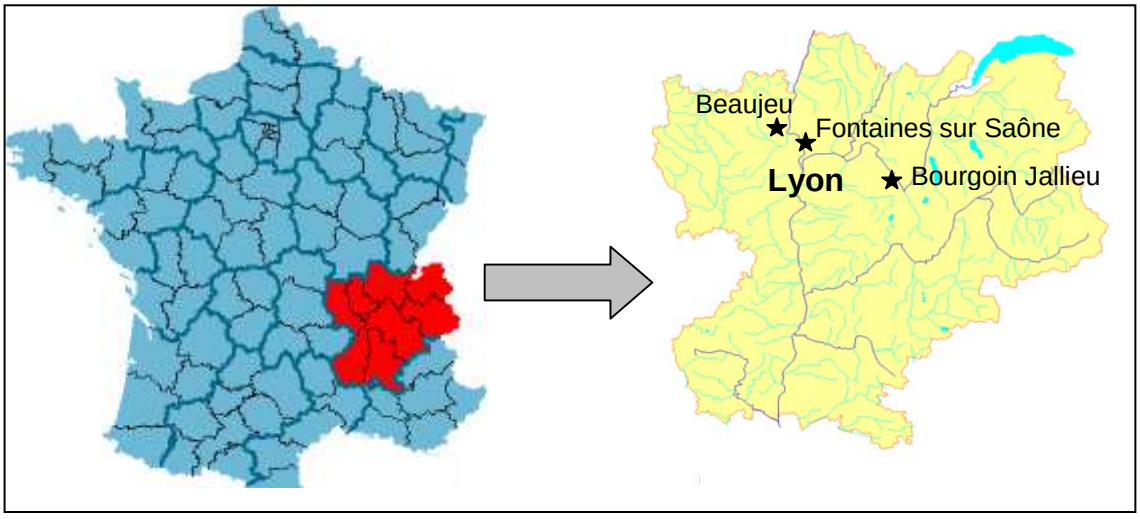


Figure 5 : Sites de prélèvement retenus pour l'analyse des milieux naturels

Les 3 STEP choisies pour cette étude (tableau 18) mettent en œuvre de procédés de type boue activée (aération prolongée ou faible charge) et un biofiltre. Deux de ces STEP sont équipées d'un décanteur primaire. Ces STEP n'ont pas de traitements tertiaire.

Tableau 18 : Caractéristiques des 3 stations d'épuration étudiées dans le cadre de l'étude d'impact sur les milieux naturels

Nom de la station	Période d'échantillonnage	Filières I + II	Capacité nominale (EH)	Q mesuré m^3/j	Milieu récepteur
Beaujeu	10 et 24 juin 08	BA (C + N)	2900	750	rivière Ardières (classée sensible)
Bourgoin Jallieu	2, 9, 16 et 24 sept 08	Déc. I + BAm (C)	78000	17500	rivière Bourbre
Fontaines sur Saône	13 et 16 nov 07	Déc. I + BF (C + N)	30000	6500	rivière Saône

EH : équivalent habitant ; BA : boue activée faible charge ; Déc. I : décanteur primaire ; BAm : boue activée moyenne charge ; BF : biofiltre

2.2. Prélèvement et échantillonnage

Un effort particulier a été porté sur cette étape de prélèvement et d'échantillonnage qui est cruciale pour la représentativité de l'échantillon et donc du résultat obtenu. Les précautions concernant le prélèvement et l'échantillonnage ont été détaillées par (Choubert *et al.*, 2009). Les principales étapes et les précautions spécifiques pour les molécules ciblées sont présentées dans ce chapitre.

Les dates des campagnes d'échantillonnage pour chaque STEP et chaque milieu sont présentées dans les tableaux 17 et 18. Les campagnes ont été menées par temps sec (afin d'éviter toute dilution artificielle de l'échantillon) et en évitant les mois les plus chauds (afin d'avoir des résultats les plus comparables possible).

2.2.1 Etude des stations d'épuration des eaux résiduaires

Pour les échantillons de la filière eau, du matériel de prélèvement spécifique (tuyaux en Téflon, flacons en verre) a été utilisé afin de limiter tout risque de contamination des échantillons lors du prélèvement ou du conditionnement. Tout le matériel utilisé a subi au préalable une procédure de lavage stricte (rinçage à l'eau, lavage avec un détergent puis avec de l'eau acidifiée et rinçage à l'acétone et avec l'échantillon). L'innocuité de la chaîne de prélèvement/conditionnement a été vérifiée régulièrement par la réalisation de « blancs de prélèvements ». En pratique, on vérifie l'absence de pertes par adsorption des molécules par l'analyse d'eau usée avant et après passage dans la chaîne de prélèvement. Dans un deuxième temps, l'absence de contamination des eaux par relargage est vérifiée par analyse d'eau d'Evian avant et après passage dans la chaîne de prélèvement.

Chaque point de prélèvement de la STEP (influent, effluent et éventuellement un ou plusieurs points intermédiaires ; figure 6) est échantillonné pendant deux ou trois jours de semaine consécutifs. Le prélèvement est réalisé à l'aide de préleveurs automatiques réfrigérés à 4°C et des échantillons représentatifs journaliers sont reconstitués (moyen 24h asservis au débit, figure 7). Les influents sont prélevés après l'étape de dégrillage afin de limiter le risque de bouchage du système de prélèvement. Un retour en tête correspondant à l'eau issue de la

filière boue et qui est réinjecté en entrée de filière eau est également collecté (échantillonnage proportionnel au débit). L'ensemble des points de prélèvement est détaillé en annexe 1.

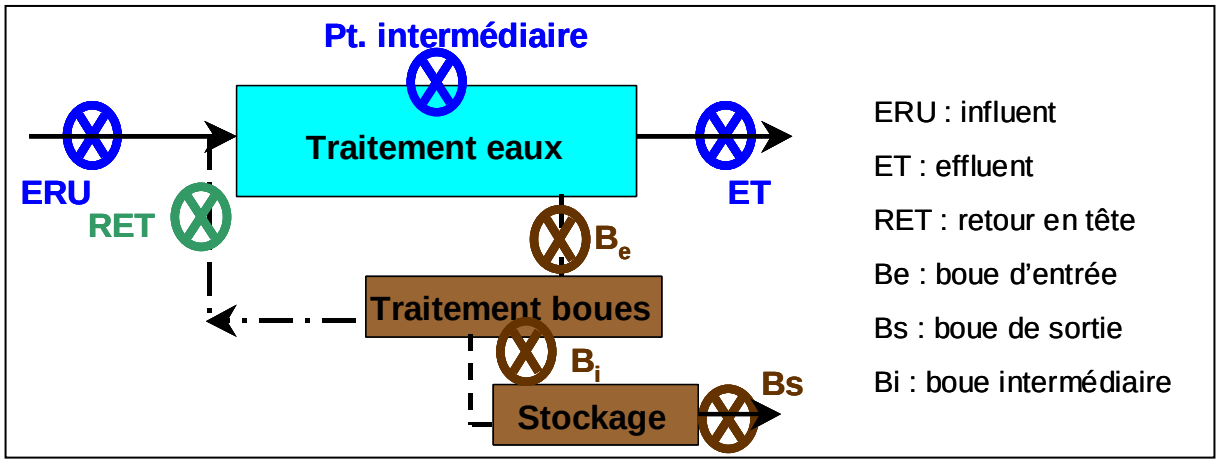


Figure 6 : Représentation schématique des points de prélèvement des filières eau et boue de station d'épuration (d'après Choubert et al., 2009)

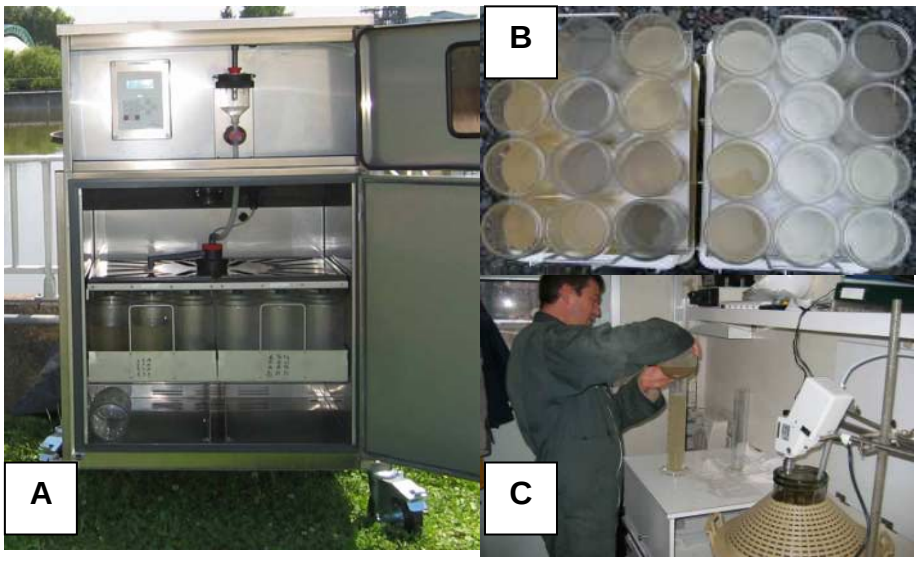


Figure 7 : Les différentes étapes de l'échantillonnage de la filière eau d'une STEP
A : le préleveur automatique réfrigéré ; B : les 24 échantillons prélevés durant 24 h ; C : la reconstitution d'un échantillon moyen 24 h asservis au débit

Pour la filière boue, un échantillonnage est mené en amont et en aval de chaque filière (figure 6) afin de constituer des échantillons représentatifs, c'est-à-dire proportionnels au rythme des cycles de déshydratation ou de traitement. Ces échantillons sont collectés à la main : échantillonnage ponctuel composite, c'est à dire composé de plusieurs prélèvements ponctuels représentatifs. Les échantillons ponctuels collectés sont ensuite mélangés afin d'obtenir un échantillon moyen représentatif.

Pour limiter au mieux tout risque de dégradation, les échantillons sont envoyés au laboratoire dans des glacières (conservation à 4°C) et livrés dans les 24h qui suivent.

2.2.2 Etude de l’impact des stations d’épuration sur le milieu récepteur

Dans le cas de l’étude de l’impact des stations d’épuration sur le milieu récepteur, des échantillons sont prélevés dans la rivière en amont et en aval du rejet. L’effluent de la station est également prélevé.

Les échantillons d’effluents sont collectés par les préleveurs automatiques des STEP. Il s’agit donc d’échantillons moyens 24h asservis au débit. Dans le cas des échantillons d’eau de rivière, des prélèvements ponctuels sont réalisés. Les prélèvements sont réalisés à la main dans le sens du cours de la rivière, à l’aide de bouteilles en verre ambré de 2,5 L. Avant remplissage final des flacons, les bouteilles sont rincées 3 fois avec l’échantillon.

Afin d’étudier l’impact des STEP sur le milieu récepteur, des échantillons d’eau de surface sont prélevés en amont et en aval des rejets de STEP. De plus, afin d’appréhender la variabilité temporelle des concentrations mesurées, des échantillons sont analysés sur 3 ou 4 semaines consécutives.

La figure 8 présente la configuration des sites prélevés dans le cadre de cette étude. Sur le site de l’Ardières, les échantillons sont prélevés en 4 points de la rivière : 2 points en amont de la STEP et 2 points en aval. Pour le site de la Bourbre, 4 points de prélèvements sont également échantillonnés : 1 point sur la Bourbre en amont de la confluence avec le Bion, 1 point sur le Bion en amont de la STEP, 2 points sur la Bourbre en aval de la confluence avec le Bion. Enfin, 2 échantillons sont prélevés sur la Saône : 1 point en amont et 1 point en aval de la STEP.

Les échantillons conservés à 4°C dans des glacières sont acheminés au laboratoire dans les 2h qui suivent le prélèvement.

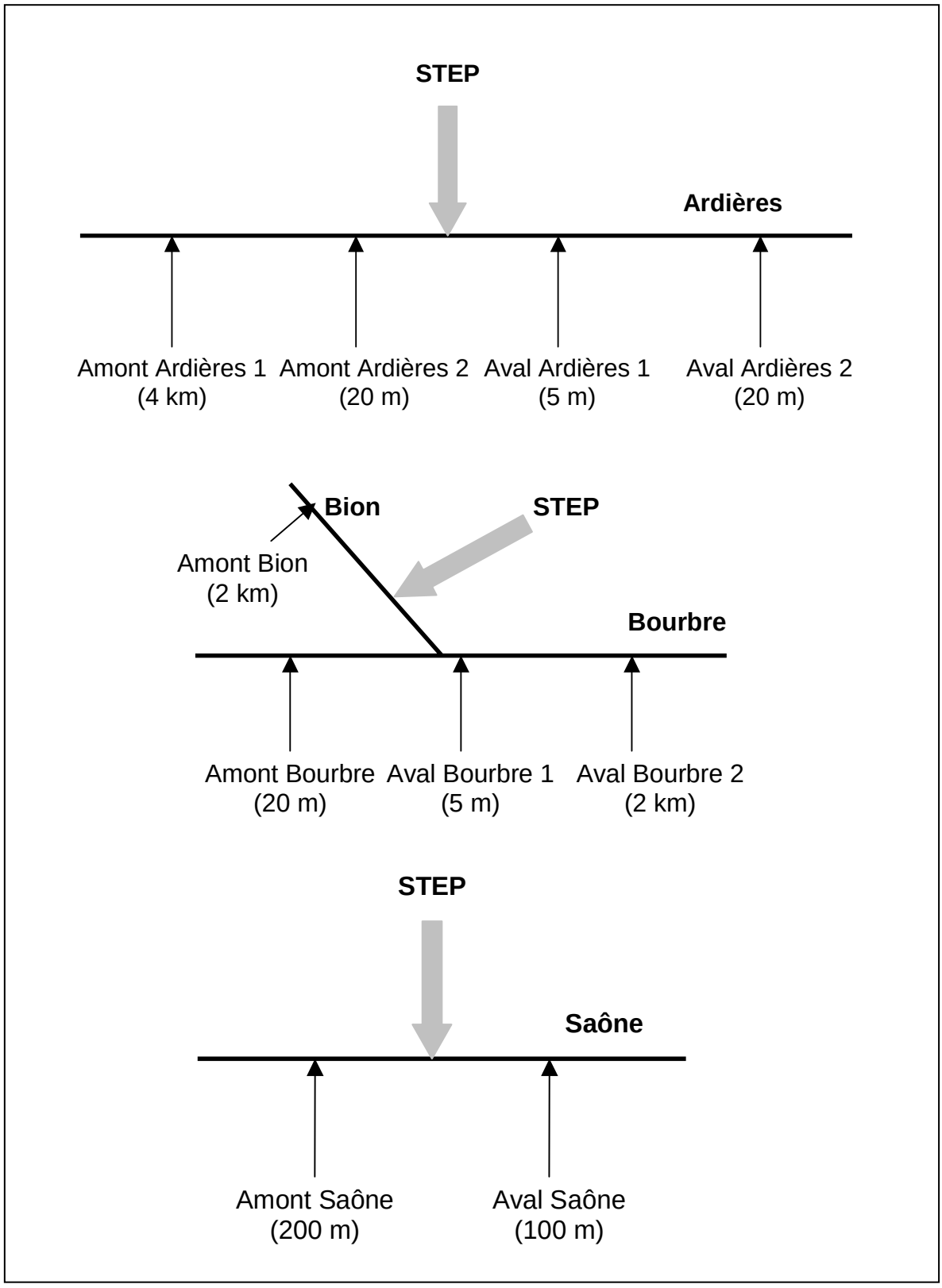


Figure 8 : Schéma des sites prélevés dans le cadre de l'étude de l'impact des stations d'épuration sur le milieu récepteur (distance des sites au rejet de la station (Ardières et Saône) ou à la confluence (Bourbre))

2.3. Méthodes d'analyse

2.3.1 Matériels et consommable

Les hormones deutérées (E1D4, E2D2, E3D2 et EE2D4), les bêtabloquants deutérés (ATE-D7, chlorhydrate de MET-D7 et PROP-D7), les bêtabloquants (chlorhydrate d'acébutolol, aténolol, bêtaxolol, bisoprolol fumarate, métoprolol tartrate, nadolol, oxprénolol, chlorhydrate de propranolol, chlorhydrate de sotalol, timolol hydrogénomaléate) et les étalons internes (E2 acétate et métoprolol Impureté A) proviennent de C.I.L. Cluzeau. L'enzyme β-glucuronidase aryl sulfatase et l'acide acétique (98,9 %) proviennent de Sigma Aldrich. Le méthanol, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane, l'heptane et l'acétone de qualité pour analyse de résidus de pesticides ainsi que l'acétonitrile et l'eau ultrapure de qualité LC-MS sont fournis par SDS. L'acide formique (99 % pour analyse) et l'hydroxyde d'ammonium pour analyse ACS proviennent de Acros Organics. Le formiate d'ammonium pour analyse HPLC est fournit par Fluka. L'eau ultrapure est obtenue avec un système d'eau MilliQ® (Millipore). De l'azote de qualité standard est utilisée pour l'évaporation.

Des filtres en fibre de verre de porosité 0,7 µm (GF/F, Whatman) sont utilisés pour la filtration. Pour la mesure du pH, un pH-mètre LF 330 (WTW) ou des bandelettes pH 0-14 (Merk) sont utilisées. L'hydrolyse enzymatique des hormones conjuguées est réalisée avec et l'incubation se fait dans une étuve (Memmert).

L'extraction SPE est automatisée avec un Zymark Autotrace (Caliper). Des cartouches Oasis® HLB 200 mg, 6 mL et des cartouches Oasis® MCX 60 mg, 3 mL ou 150 mg, 6 mL (Waters) sont utilisées pour l'extraction SPE. La purification des hormones est réalisée sur des cartouches de Florisil 1 g, 6 mL (Sigma Aldrich).

Les solides sont extraits sous fortes pression et température à l'aide d'un ASE® 200 (Dionex). Les extractions sont réalisées dans des cellules de 33 mL (Dionex) contenant à leurs extrémités des filtres en cellulose (Dionex). L'agent dispersant utilisé lors de l'extraction par ASE® est du sable de Fontainebleau (Dionex).

La séparation chromatographique est réalisée avec une chaîne de chromatographie en phase liquide Agilent 1100 (Agilent). Le système est équipé d'une colonne X-bridge C18 end-capped (150 x 2,1 mm, 3,5 µm) munie d'une pré-colonne. La chaîne chromatographique est couplée à un spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôle : API 4000 (Applied Biosystems-MDS).

2.3.2 Assurance qualité

Pour s'assurer de la fiabilité de nos résultats, différents contrôles qualité sont mis en œuvre du prélèvement de l'échantillon à l'étape d'analyse.

2.3.2.a Prélèvement

Le prélèvement des échantillons conditionne la représentativité des résultats et une attention particulière est portée à cette étape. Ainsi, des « blancs préleveurs » sont régulièrement réalisés (7 fois tout au long du projet AMPERES) pour quantifier les contaminations possibles liées à la chaîne d'échantillonnage et de conditionnement. L'absence d'adsorption est testée en analysant de l'eau usée avant et après passage à travers la chaîne de prélèvement. L'absence de relargage de la chaîne de prélèvement est également vérifiée en analysant de l'eau minérale Evian avant et après passage dans la chaîne de prélèvement.

Par ailleurs, dans la mesure où l'on recherche des molécules à l'état de traces, un soin particulier est apporté au nettoyage de la vaisselle. Toute vaisselle servant à l'analyse et au prélèvement est donc rincée à l'eau du robinet, lavée avec du détergent et de l'eau acide et rincée à l'acétone. Le même protocole de nettoyage est appliqué aux préleveurs automatiques.

Enfin, compte tenu des possibilités de dégradation des molécules existantes dans ce type de matrice, l'acheminement des échantillons vers le laboratoire se font en moins de 24h et à 4°C afin de limiter toute altération des échantillons.

2.3.2.b Préparation d'échantillons

La filtration des échantillons est réalisée dès réception au laboratoire. Pour les estrogènes qui sont sujets à la dégradation dans les eaux usées (même conservés à 4°C) dès le premier jour (Miege *et al.*, 2009a), l'extraction est réalisée le jour même de leur arrivée au laboratoire (ou le lendemain pour l'analyse des estrogènes après déconjugaison). La stabilité des bêtabloquants a été testée sur 6 jours à 4°C dans les échantillons filtrés acidifiés ; pour ces composés, l'extraction est réalisée dans les 3 jours qui suivent la réception.

Pour s'assurer de l'absence de contamination des échantillons lors de l'étape de préparation des échantillons, des « blancs méthode » sont mis en œuvre régulièrement (une fois par campagne).

Pour s'affranchir des effets matrice, des traceurs deutérés de méthode sont utilisés. Ces traceurs sont ajoutés à l'échantillon et subissent les étapes de préparation d'échantillon et

d'analyse. Pour les estrogènes, 4 traceurs deutérés sont utilisés et permettent de corriger les 5 estrogènes ciblés ; les résultats obtenus sont donc systématiquement corrigés par le rendement de ces traceurs deutérés. Pour les bêtabloquants, seuls 3 traceurs deutérés sont disponibles et ne permettent malheureusement pas de corriger efficacement les 10 bêtabloquants analysés. Les échantillons sont donc systématiquement dupliqués et dopés avec une solution contenant les 10 bêtabloquants.

2.3.2.c L'analyse

Des solutions standard, préparées indépendamment des solutions standards utilisées pour l'étalonnage, sont régulièrement analysés par LC-MS/MS (toutes les 6 injections) pour vérifier l'absence de dérivation durant l'analyse et la justesse de la droite d'étalonnage. Par ailleurs, des blancs d'analyse sont injectés (toutes les 3 injections) pour éviter tout risque d'effet mémoire.

De plus, afin de vérifier la cohérence des résultats et de limiter au mieux l'effet des interférents, les échantillons sont analysés sans et avec dilution (par 5 et/ou 10).

Enfin, comme recommandé dans la décision de la commission européenne (EC, 2002), 2 transitions d'ionisation sont utilisées pour chaque composé, l'une servant à la quantification et l'autre pour la confirmation.

2.3.3 Analyse des hormones estrogéniques

2.3.3.a Analyse des hormones estrogéniques dans la phase dissoute

Le protocole analytique pour doser 5 hormones estrogéniques (E1, αE2, βE2, E3 et EE2) dans des eaux de stations d'épuration et de rivières a été développé et validé au laboratoire et publié (Miege *et al.*, 2009a). Par ailleurs, cette méthode analytique a été évaluée, pour l'analyse de αE2, βE2 et EE2, sur 2 échantillons d'eau (1 eau souterraine et 1 eau potable) dans le cadre d'un essai inter-laboratoire organisé en juin 2009 par l'AFSSA. Les résultats obtenus mettent en évidence des Zscores compris entre 0,0 et –1,0.

Préparation de l'échantillon avant extraction

L'échantillon d'eau est tout d'abord filtré sur filtres en fibre de verre (GF/F, 0,7 µm) dans les 24 h qui suivent le prélèvement. Le filtrat conservé à 4°C dans une bouteille en verre ambré est extrait dans les 24h qui suivent.

Les hormones sont analysées sous forme libre avant et après une étape de déconjugaison qui permet d'accéder à la concentration totale d'estrogènes présente dans l'échantillon (hormones libres + conjuguées). Cette étape de déconjugaison consiste en une hydrolyse enzymatique par la β-glucuronidase -suc d'*Helix pomatia*- à pH = 5,2 (acidification avec de l'acide formique) pendant 15 heures à 52°C.

Avant extraction, les échantillons sont dopés avec une solution contenant les 4 hormones deutérées (E1D4, E2D2 , E3D2, EE2D4) : à 125 ng/L pour les influents et à 50 ng/L pour les effluents, les RET et les eaux de rivière. Ces deutérés sont utilisés comme traceurs de méthode.

Extraction et purification

Des aliquotes de filtrat sont tout d'abord extraites : 100 mL pour les influents, 250 mL pour les effluents, les RET et les eaux de rivière. L'extraction automatisée est réalisée sur cartouche Oasis® HLB 200 mg. Les cartouches sont conditionnées avec 6 mL de méthanol puis avec 6 mL d'eau milliQ®. L'échantillon est ensuite percolé à 10 mL/min et la cartouche est lavée avec 6 mL d'eau milliQ®. L'élution est réalisée avec 4 mL d'un mélange acétate d'éthyle/méthanol 70/30 v/v. L'extrait est ensuite évaporé à sec sous courant d'azote et repris dans 1 mL d'un mélange dichlorométhane/heptane 50/50 v/v.

L'extrait obtenu est ensuite purifié sur cartouche de florisil (1 g, 6 mL). Les cartouches sont conditionnées avec 2 mL du mélange dichlorométhane/heptane 50/50 v/v puis l'extrait est percolé sur la cartouche. La cartouche est lavée avec 2 mL du mélange dichlorométhane/heptane 50/50 v/v. L'élution est réalisée avec 5 mL du mélange acétone/heptane 75/25 v/v.

Les extraits purifiés obtenus sont évaporés à sec sous courant d'azote et repris dans 200 µL d'une solution de E2 acétate (étalon interne) à 40 µg/L dans l'eau/acétonitrile 60 /40 v/v.

Analyse par LC-MS/MS

L'analyse est réalisée par LC-MS/MS avec étalonnage interne. Le volume injecté est de 10 µL. La séparation des 5 hormones est réalisée grâce à un gradient chromatographique

(0,2 mL/min) mettant en œuvre de l'eau et de l'acétonitrile : 40 % d'acétonitrile de 0 à 2 min, puis 80 % d'acétonitrile à 4,5 min et jusqu'à 15 min. La température de colonne est fixée à 35°C.

L'ionisation est réalisée avec une source électrospray fonctionnant en mode négatif. Le mode d'acquisition choisi est le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Les conditions appliquées à la source sont les suivantes : température de 400°C, tension de spray – 4,5 kV, gaz de collision 6 psi, gaz rideau 25 psi.

En spectrométrie de masse, 2 transitions sont utilisées pour chaque molécule : l'une servant à la quantification et l'autre servant à la confirmation. Les transitions utilisées sont reportées dans le tableau 19.

Tableau 19 : Transition MRM utilisées pour la quantification et la confirmation des estrogènes

Molécule	Transition de quantification (uma)	Transition de confirmation (uma)
E1	268,9 – 145,2	268,9 – 142,9
αE2 et βE2	270,9 – 145,1	270,9 – 182,9
E3	287,1 – 145,2	287,1 – 171,0
EE2	294,4 – 145,1	294,4 - 158,9
E1D4	313,1 – 253,0	313,1 – 144,8
E2D2	273,0 – 147,0	NA
E3D2	273,0 – 185,0	NA
EE2D4	289,3 – 147,0	NA
E2 acétate	299,2 – 147,0	NA

NA : une seule transition est utilisée dans le cas des estrogènes deutérés et de l'étalon interne

Les concentrations obtenues sont systématiquement corrigées par le rendement de récupération obtenu pour les estrogènes deutérés. L'estrogène deutéré E2D2 est utilisé pour corriger les 2 isomères de l'estradiol.

2.3.3.b Analyse des hormones estrogéniques dans les boues et les matières en suspension

Une méthode permettant l'analyse des 5 hormones estrogéniques dans les boues et les matières en suspension a été développée. Les détails concernant le développement, les performances et la validation de la méthode sont présentés dans la partie résultats.

Préparation de l'échantillon avant extraction

Les échantillons de boue les plus liquides sont centrifugés de façon à éliminer le surplus d'eau. Les boues sont ensuite lyophilisées, broyées et homogénéisées.

Pour les matières en suspension (MES), les filtres correspondant à un volume d'eau connu (variant entre 200 et 2500 mL en fonction de l'échantillon) sont conservés à –20°C. Avant extraction, les différents filtres correspondant à un même échantillon sont broyés et homogénéisés.

Extraction et purification

Une aliquote de 0,5 g de boue (pesé exactement) ou les filtres correspondant à un échantillon sont mélangés avec du sable de Fontainebleau. L'échantillon est ensuite dopé avec 25 µL d'une solution contenant les 4 hormones deutérées à 500 µg/L. L'extraction est réalisée par ASE® dans les conditions suivantes : solvant d'extraction, eau/méthanol 80/20 v/v ; température d'extraction, 100°C ; pression, 100 bars ; pré-chauffe, 5 min ; chauffe, 5 min ; phase statique, 5 min ; flush , 100 % du volume de la cellule ; purge, 120 s ; 3 cycles. L'extrait ainsi obtenu est tout d'abord purifié sur cartouche Oasis® HLB 500 mg. Pour cela, les cartouches sont conditionnées avec 5 mL de méthanol puis avec 5 mL d'eau milliQ acidifiée. L'échantillon est ensuite percolé et la cartouche est lavée avec 10 mL d'eau milliQ. Finalement, l'élution est réalisée avec 6 mL d'acétate d'éthyle. L'extrait purifié ainsi obtenu est évaporé à sec et repris dans 1 mL du mélange dichlorométhane/heptane 50/50 v/v. Compte tenu de la complexité de la matrice, une seconde purification est nécessaire. Cette étape est réalisée sur cartouche de florisil 1g. Les cartouches sont conditionnées avec 2 mL du mélange dichlorométhane/heptane 50/50, l'extrait est percolé sur la phase, la phase est lavée avec 2 mL du mélange dichlorométhane/heptane 50/50 et l'élution est réalisée avec 5 mL du mélange acétone/heptane 50/50 v/v.

L'extrait ainsi purifié est évaporé à sec et repris dans 200 µL du mélange eau/acétonitrile 90/10 v/v : 150 µL seront analysés tel quel et le volume de 50 µL restant sera dilué par 5 avant analyse.

Analyse par LC-MS/MS

L'analyse est réalisée par LC-MS/MS avec étalonnage externe. Le volume injecté est de 10 µL. La séparation des 5 estrogènes est réalisée grâce à un gradient chromatographique (0,2 mL/min) mettant en œuvre de l'eau et de l'acétonitrile : 10 % d'acétonitrile de 0 à 4 min,

puis 100 % d'acétonitrile à 37 min et jusqu'à 42 min. La température de colonne est fixée à 30°C.

L'ionisation est réalisée avec une source électrospray fonctionnant en mode négatif. Le mode d'acquisition choisi est le mode MRM. Les conditions appliquées à la source sont les suivantes : température de 400°C, tension d'aiguille -4,5 kV, gaz de collision 6 psi, gaz rideau 25 psi.

En spectrométrie de masse, les transitions utilisées sont les mêmes que celles utilisées pour l'analyse de la phase dissoute (tableau 19).

2.3.4 Analyse des bêtabloquants

2.3.4.a Analyse des bêtabloquants dans la phase dissoute

Le protocole analytique pour doser les 10 bêtabloquants (ACE, ATE, BET, BIS, MET, NAD, OXP, PROP, SOT et TIM) dans des eaux de stations d'épuration et de rivières a été développé et validé au laboratoire. Ce travail fait l'objet d'une publication en cours de rédaction (Miege *et al.*, 2009d). De plus, cette méthode analytique a été évaluée, pour l'analyse de l'aténolol, sur 2 échantillons d'eau (1 eau souterraine et 1 eau potable) dans le cadre d'un essai inter-laboratoire organisé en juin 2009 par l'AFSSA. Les résultats obtenus mettent en évidence des Zscores compris entre –0,1 et –0,5.

Préparation de l'échantillon avant extraction

L'échantillon d'eau est tout d'abord filtré sur filtres en fibre de verre (GF/F, 0,7 µm) dans les 24 h qui suivent le prélèvement. Le filtrat est ensuite acidifié avec 0,1 % d'acide formique v/v. La valeur du pH, qui doit être située entre 3 et 4, est vérifiée avec une bandelette de papier pH. Le filtrat est conservé à 4°C dans une bouteille en verre ambré en attendant l'étape d'extraction qui doit être réalisée sous 6 jours.

Extraction

Pour chaque échantillon, 2 aliquotes de 100 mL sont prélevées. Une aliquote est dopée avec 100 µL d'une solution contenant les 3 bêtabloquants deutérés (ATE-D7, MET-D7 et PROP-D7 à 100 µg/L) : cette aliquote correspond à l'échantillon non dopé. La deuxième aliquote est dopée avec 100 µL de la solution contenant les 3 bêtabloquants deutérés (ATE-

D7, MET-D7 et PROP-D7 à 100 µg/L) puis avec 100 µL d'une solution de dopage dont la concentration varie en fonction du type de matrice (tableau 20) : c'est l'échantillon dopé. Les niveaux de concentration de bêtabloquants dans les solutions de dopage sont déterminés en fonction des concentrations généralement mesurées dans les échantillons d'eaux usées et d'eau de surface ; ainsi, les bêtabloquants généralement mesurés aux plus fortes concentrations seront les plus concentrés dans la solution de dopage. Cet échantillon dopé permettra de calculer un rendement de récupération qui pourra, si nécessaire, corriger la concentration mesurée dans l'échantillon non dopé et ainsi, limiter les effets matrice.

Tableau 20 : Concentration en bêtabloquants des solutions de dopage utilisées pour chaque matrice

Molécule	Solution de dopage pour influents (ng/L)	Solution de dopage pour effluents (ng/L)	Solution de dopage pour eaux de surface (ng/L)
Métoprolol	400	200	25
Nadolol	400	200	25
Bisoprolol	400	200	25
Propanolol	400	500	100
Oxprenolol	100	100	10
Timolol	100	100	10
Bêtaxolol	100	100	10
Acebutolol	2000	200	50
Aténolol	2000	1000	200
Sotalol	2000	1000	200

L'extraction automatisée est réalisée sur cartouche SPE Oasis® MCX 60 mg. Les cartouches sont conditionnées avec 3 mL de méthanol puis avec 3 mL d'eau milliQ® acidifiée (0,2 % d'acide formique, v/v). L'échantillon est ensuite percolé à 10 mL/min et la cartouche est rincée avec 1,2 mL de méthanol acidifié (0,2 % d'acide formique v/v). L'élution est réalisée avec 2,2 mL de méthanol basique (5 % d'hydroxyde d'ammonium, v/v). L'extrait est ensuite évaporé à sec sous courant d'azote et repris dans 500 µL d'une solution de métoprolol Impureté A à 50 µg/L dans l'eau/acétonitrile 85/15 v/v. Compte tenu de la forte variation des concentrations des molécules dans les eaux, l'extrait est injecté non dilué et également dilué par 5 et par 10 avec la solution de métoprolol Impureté A.

Analyse par LC-MS/MS

L'analyse est réalisée par LC-MS/MS avec étalonnage interne. Le volume injecté est de 5 µL. La séparation des 10 bêtabloquants est réalisée grâce à un gradient chromatographique (0,2 mL/min) mettant en œuvre de l'eau tamponnée à 3,8 avec du

formiate d'ammonium et de l'acétonitrile : 15 à 100 % d'acétonitrile de 0 à 8 min, puis 100 % d'acétonitrile jusqu'à 16 min. La température de colonne est fixée à 28°C.

L'ionisation est réalisée avec une source électrospray fonctionnant en mode positif. Le mode d'acquisition choisi est le mode MRM. Les conditions appliquées à la source sont les suivantes : température de 500°C, tension d'aiguille 5,5 kV, gaz de collision 5 psi, gaz rideau 20 psi.

En spectrométrie de masse, 2 transitions sont utilisées pour chaque molécule : l'une servant à la quantification et l'autre servant à la confirmation. Les transitions utilisées sont reportées dans le tableau 21.

Tableau 21 : Transition d'ionisation utilisées pour la quantification et la confirmation des bêtabloquants

Molécule	Transition de quantification (uma)	Transition de confirmation (uma)
Acébutolol	337,2 - 116,2	337,2 - 56,1
Timolol	317,4 - 261,4	317,4 - 188,0
Métoprolol	268,0 - 116,0	268,0 - 98,0
Oxprénolol	266,1 - 225,4	266,1 - 116,0
Bisoprolol	326,1 - 116,1	326,1 - 74,0
Bêtaxolol	308,3 - 116,2	308,3 - 55,0
Propranolol	260,1 - 116,1	260,1 - 183,2
Nadolol	310,3 - 254,1	310,3 - 201,3
Sotalol	273,1 - 255,4	273,1 - 212,8
Aténolol	267,0 - 145,2	267,0 - 189,9
Aténolol – D7	274,0 - 145,1	274,0 - 189,9
Métoprolol– D7	275,1 - 123,2	275,1 - 105,2
Propranolol– D7	266,9 - 189,2	266,9 - 116,3
Métoprolol impureté A	254,2 - 102,2	NA

NA : une seule transition est utilisée dans le cas de l'étalon interne

2.3.4.b Analyse des bêtabloquants dans les boues et les matières en suspension

Préparation de l'échantillon avant extraction

La préparation des échantillons de boue et de MES est réalisée comme décrit pour l'analyse des estrogènes : les boues (centrifugées si besoin) sont lyophilisées, broyées et homogénéisées et les filtres contenant les MES sont broyés.

Extraction et purification

Une aliquote de 0,5 g de boue (pesé exactement) ou les filtres correspondant à un échantillon sont homogénéisés avec du sable de Fontainebleau. L'échantillon est ensuite dopé

avec 150 µL d'une solution contenant les 3 bêtabloquants deutérés à 100 µg/L. Comme pour l'analyse de la phase dissoute, chaque échantillon est dupliqué. Une aliquote permet d'obtenir la concentration présente dans l'échantillon, et la seconde aliquote est dopée avec 150 µL d'une solution contenant les 10 bêtabloquants (ACE et SOT à 50 µg/L et les autres bêtabloquants à 5 µg/L) afin d'obtenir des rendements de récupération représentatifs de chaque molécule. L'extraction est réalisée par ASE® dans les mêmes conditions que pour l'analyse des estrogènes. L'extrait obtenu est acidifié avec 40 µL d'acide formique. La purification est réalisée par SPE sur cartouche Oasis® MCX 150 mg. Les cartouches sont conditionnées avec 3 mL de méthanol puis avec 3 mL d'eau milliQ acidifiée (0,1% d'acide formique, v/v). L'échantillon est ensuite percolé et la cartouche est lavée avec 3 mL d'acétonitrile acidifié (0,2 % d'acide formique, v/v). Finalement, l'élution est réalisée avec 3 mL de méthanol basique (5 % d'hydroxyde d'ammonium, v/v).

L'extrait purifié est évaporé à sec et repris dans 500 µL d'une solution de métoprolol impureté A à 50 µg/L dans l'eau/acétonitrile 99/1 v/v. Comme pour l'analyse de la phase dissoute, l'extrait est injecté non dilué et également dilué par 5 et par 10 avec la solution de métoprolol Impureté A.

Analyse par LC-MS/MS

L'analyse est réalisée par LC-MS/MS avec étalonnage interne. Le volume injecté est de 5 µL. La séparation des 10 bêtabloquants est réalisée grâce à un gradient chromatographique (0,2 mL/min) mettant en œuvre de l'eau tamponnée à 3,8 avec du formiate d'ammonium et de l'acétonitrile : 1 % d'acétonitrile de 0 à 5 min, puis 100 % d'acétonitrile à 21 min et jusqu'à 29 min. La température de colonne est fixée à 28°C.

L'ionisation est réalisée avec une source électrospray fonctionnant en mode positif. Le mode d'acquisition choisi est le mode MRM. Les conditions appliquées à la source sont les suivantes : température de 500°C, tension de spray 5,5 kV, gaz de collision 5 psi, gaz rideau 20 psi.

En spectrométrie de masse, les transitions utilisées sont les mêmes que celles utilisées pour l'analyse de la phase dissoute (tableau 21). Les résultats sont corrigés par les rendements obtenus sur les échantillons dopés lorsque les rendements calculés sont inférieurs à 80 % ou supérieurs à 120 %.

2.4. Exploitation des données

2.4.1 Evaluation des limites de quantification et de détection affinées

La sensibilité (LQ et LD) est un paramètre à tester lors d'une validation de méthode. Compte tenu de la complexité et de la variété des matrices analysées (les influents de STEP peuvent être très différents et présenter des effets matrices très distincts), nous avons souhaité définir pour chaque molécule dans chaque échantillon des LQ et LD affinées plus représentatives des couples échantillon/composé. En effet, les limites de quantifications d'une même molécule peuvent être très différentes d'une campagne à une autre et d'un échantillon de boue ou d'eau à un autre.

Pour ce faire, les règles suivantes ont été adoptées. Un composé est considéré comme non détecté lorsque aucun signal n'est détecté ou lorsque le composé n'est pas confirmé (pas de transition de confirmation, ou pas le bon rapport de transitions confirmation/quantification). Un composé est considéré comme non quantifié lorsqu'il est confirmé (bon rapport de transitions confirmation/quantification) mais que sa concentration mesurée est inférieure à la valeur du premier point de gamme confirmé. A partir de là, la LQ affinée est définie comme la valeur du premier point de gamme confirmé corrigée du rendement de récupération du traceur deutéré et des facteurs de concentration. Arbitrairement, la LD est définie comme un tiers de la LQ. Cette méthode présente l'avantage d'obtenir des LQ et LD qui tiennent compte à la fois de l'échantillon mais aussi de la réponse du matériel de mesure. En effet, l'effet d'un changement de la sensibilité de la LC-MS/MS (qui peut varier par exemple en fonction de l'état d'encrassement de l'appareil) est pris en considération dans ce calcul.

2.4.2 Evaluation des rendements d'élimination de la phase dissoute

Pour chaque substance et chaque STEP, un rendement moyen est calculé. Ce rendement moyen correspond à la moyenne des rendements d'élimination évalués pour chaque jour de prélèvement (réalisés sur 2 ou 3 jours consécutifs).

$$R = \frac{\sum_{i=1}^{n} R_i}{n} \quad \text{avec} \quad R_i = \frac{Ce_i - Cs_i}{Ce_i} \times 100$$

avec R le rendement d'élimination moyen en %

R_i le rendement d'élimination du jour i en %

Ce_i la concentration mesurée le jour i en entrée de STEP en ng/L

Cs_i la concentration mesurée le jour i en sortie de STEP en ng/L

Cependant, le calcul de rendement n'est pas toujours possible. En effet, pour les molécules présentes en entrée de STEP à de faibles concentrations (la notion de faible concentration étant évaluée, compte tenue des limites de quantification, à 10 ng/L) et à des concentrations encore plus faibles en sortie de STEP, le calcul d'un rendement d'élimination n'est pas approprié compte tenu l'importance de l'incertitude analytique à ces niveaux de concentration. Cette incertitude analytique est évaluée à 20-30 % pour les concentrations élevées et peut atteindre 50 voire 100 % pour les concentrations proches des limites de quantification.

Par ailleurs, lorsque la différence entre les concentrations en entrée et en sortie de STEP est de l'ordre de la valeur de l'incertitude analytique, l'interprétation des rendements d'élimination est difficile. Par exemple, dans le cas d'un rendement d'élimination de 20-30 %, il ne sera pas possible de conclure sur l'efficacité d'élimination du procédé.

Lorsque les molécules sont quantifiées (à des concentrations élevées, c'est-à-dire supérieures à 10 ng/L) dans les influents mais non quantifiés dans les effluents, les rendements d'élimination sont calculés avec la valeur de LQ affinée (évaluée pour la molécule dans la matrice spécifique). Cette méthode permet d'estimer le rendement d'élimination minimum de la STEP. Une autre option communément employée consiste à utiliser, dans ces cas là, LQ/2.

Certains rendements négatifs peuvent apparaître lors des calculs. Ils peuvent tout d'abord être liés à l'incertitude analytique et ainsi signifier une absence d'élimination. D'autre part, ils peuvent s'expliquer par la désorption de molécules des boues ou des MES. Enfin, certaines molécules (comme c'est le cas notamment pour E1) peuvent être produites lors du procédé épuratoire par la dégradation d'autres molécules.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Développement et validation de nouvelles méthodes d'analyses

Cette partie, présente les résultats obtenus en terme de développement et de validation de méthode d'analyse. Deux méthodes ont été développées pour analyser les estrogènes d'une part, et les bêtabloquants d'autre part, dans les boues de station d'épuration. Pour les estrogènes, un développement de méthode ainsi qu'une validation assez fine ont été réalisés et sont présentés dans le paragraphe 3.1.1. Pour les bêtabloquants, une méthode a été mise au point en utilisant la méthode d'extraction développée pour l'analyse des estrogènes dans les boues et la purification utilisée pour l'analyse des bêtabloquants dans les eaux. Pour ce protocole, seuls quelques paramètres de validation ont été étudiés (rendements, répétabilité et sensibilité).

3.1.1 L'analyse des estrogènes dans les boues

La première partie de ce travail de thèse a consisté à développer et valider une méthode d'analyse pour quantifier les estrogènes dans les boues de station d'épuration. Les détails concernant la mise au point de la méthode ainsi que les différents paramètres testés lors de la validation de méthode ont fait l'objet d'une publication acceptée en décembre 2009 dans le journal ***Analytical and Bioanalytical Chemistry****.*

Les stations d'épuration sont reconnues comme le principal vecteur de micropolluants, tels que les estrogènes, vers les milieux aquatiques. Aujourd'hui, quelques méthodes existent pour analyser les estrogènes dans les eaux de surface et les eaux usées (Snyder *et al.*, 1999; Komori *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2005; Labadie et Budzinski, 2005b; Filali-Meknassi *et al.*, 2007; Gibson *et al.*, 2007; Koha *et al.*, 2007; Salvador *et al.*, 2007; Vulliet *et al.*, 2007;

Arditsoglou et Voutsa, 2008; Viglino *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). Cependant, peu d'auteurs s'intéressent à l'analyse des estrogènes dans des matrices plus complexes comme les boues et les matières en suspension (Ternes *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2004; Hajkova *et al.*, 2007; Matejicek *et al.*, 2007) ; de plus, les performances et les détails de validation de méthode sont rarement présentés. Pour l'analyse des estrogènes dans les boues, la difficulté consiste à extraire quantitativement les analytes tout en limitant l'extraction des interférents qui peuvent causer d'importants effets matrice. Pour ce type de matrice, la validation de méthode qui assure la fiabilité des résultats est donc primordiale. Une méthode spécifique permettant l'analyse de 5 estrogènes (E1, αE2, βE2, E3 et EE2) dans les boues de station d'épuration a donc été développée et validée.

Dans un premier temps, le solvant d'extraction a été sélectionné sur sa capacité à extraire les composés d'intérêt tout en limitant l'extraction d'interférents. Pour extraire les estrogènes des matrices solides, un solvant relativement polaire doit être utilisé et l'usage de méthanol a été rapporté dans la littérature (Gabet *et al.*, 2007). L'inconvénient de ce solvant est qu'il engendre la co-extraction de nombreux interférents. Afin de limiter ce phénomène, le solvant a été choisi parmi différents mélanges eau/méthanol (80/20, 60/40, 40/60 et 20/80, v/v) et le solvant sélectionné pour l'extraction est le mélange eau/méthanol 80/20 v/v.

La méthode d'extraction a ensuite été étudiée. Pour cela, un même échantillon de boue a été extrait, en parallèle, avec deux méthodes d'extraction : l'extraction assistée par ultrasons et l'extraction sous forte pression et forte température (ASE®). Cette comparaison a mis en évidence la plus grande efficacité de l'ASE® par rapport aux ultrasons : pour E1, 12 ng/g ont été quantifiés avec une extraction par ultrasons et 32 ng/g par ASE® ; de plus, αE2 non quantifiée par ultrasons a été quantifiée à environ 5 ng/g par ASE®. C'est donc la méthode d'extraction par ASE® qui a été choisie.

Suite à l'extraction, une ou plusieurs étapes de purification des extraits sont nécessaires. Ces purifications ont été optimisées à partir de protocoles utilisés pour l'analyse des estrogènes dans les eaux (Miege *et al.*, 2009a) : une première purification mettant en jeu un mécanisme de partage à polarité de phases inversées (support Oasis® HLB) et une seconde purification avec un mécanisme de partage à polarité de phases normales (phase florisil). Pour la purification sur Oasis® HLB, plusieurs mélanges de solvants acétate d'éthyle/méthanol (de 0/100 à 100/0 v/v) ont été testés pour l'élution. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'acétate d'éthyle. Les performances de la purification sur florisil, déjà utilisée pour l'analyse des eaux (Miege *et al.*, 2009a), ont été comparées à celles d'une purification sur Strata® NH_2, utilisée par un autre laboratoire pour l'analyse des hormones dans les eaux (Labadie et

Budzinski, 2005b). Des performances comparables ont été obtenues pour la majorité des analytes, sauf pour E3D2 avec lequel des rendements deux fois supérieurs ont été obtenu quand on utilise le florisil. La purification sur florisil, identique à celle utilisée pour l'analyse des eaux, a donc été conservée pour la purification des boues.

Une fois les différentes étapes de la méthode optimisées, les effets matrice ont été étudiés. Même après optimisation, les rendements obtenus pour les deutérés demeurent faibles (de l'ordre de 20%). Il faut donc mettre en évidence si ces mauvais rendements sont liés à des pertes d'analyte lors de la préparation d'échantillon ou à la présence d'interférents pendant l'étape d'analyse chromatographique (extinction de signal). Pour cela, les rendements des estrogènes deutérés ont été évalués pour chaque étape de la méthode d'analyse sur une boue (figure 9).

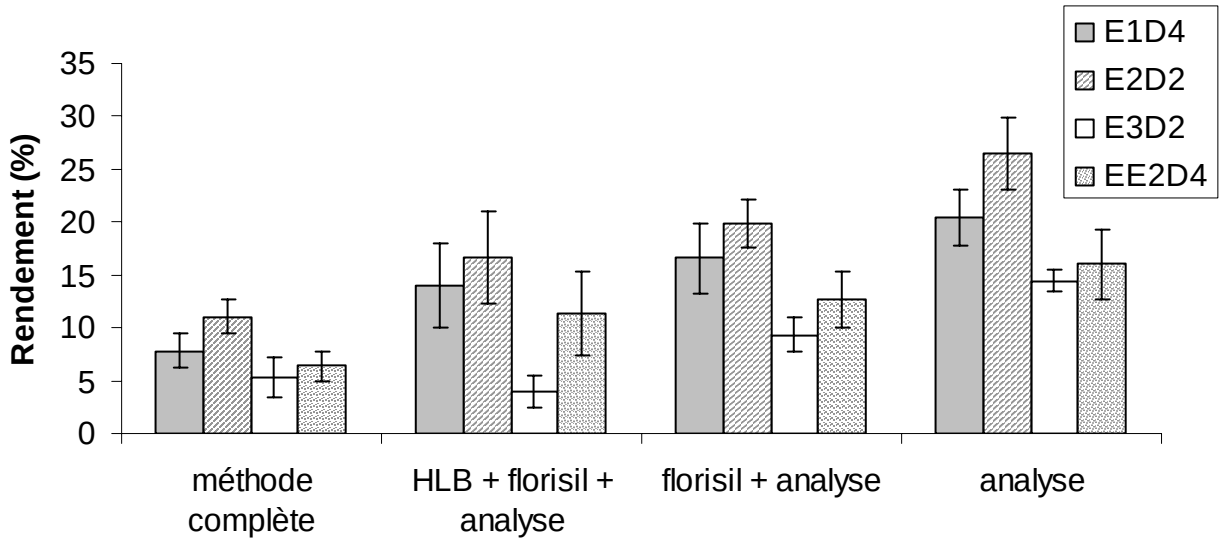


Figure 9 : Rendements moyens (%) ± écart-type obtenus sur un échantillon de boue pour les différentes étapes de la méthode d'analyse (n = 3)

La figure 9 met en évidence que les rendements liés à l'étape d'analyse seule sont légèrement plus élevés que les rendements liés à la méthode complète (facteur 2 environ). Cependant, un fort effet matrice perturbe la quantification par LC-MS/MS et se manifeste par la perte de 75 à 85% du signal. Afin de déterminer si l'effet matrice observé sur cet échantillon de boue est spécifiquement lié à cet échantillon, ou s'il existe quel que soit l'échantillon (plus ou moins prononcé), 3 autres type de boue ont été analysés. Pour ces échantillons, les rendements de la méthode complète ont été comparés aux rendements de l'étape d'analyse. Les résultats obtenus montrent que pour toutes les boues, les effets matrice causent une perte de signal d'au moins 50%. Seul un échantillon, qui correspond à la boue la plus minéralisée (boue chaulée), présente des effets matrice moindres (perte de signal allant

de 20 à 45% en fonction des analytes). En conclusion, des effets matrices variables en fonction de la nature de l'échantillon analysé ont été mis en évidence dans les 4 échantillons de boue testés et se manifestent notamment par des extinctions de signal durant l'analyse chromatographique.

Afin de limiter ces effets matrice, le gradient chromatographique a été optimisé, l'objectif étant de minimiser la coélution d'interférents avec les molécules cibles. Pour cela, nous avons fait varier 2 paramètres : la proportion de solvant organique en début de gradient et la pente du gradient. L'utilisation de plus faibles proportions de solvant organique en début de gradient et la mise en place d'un gradient avec une pente plus faible ont permis d'améliorer les performances de la méthode. Ainsi, pour E1D4 par exemple, les rendements sont passés de 12 à 51%.

Une fois la méthode optimisée, une validation stricte a été réalisée en s'inspirant de la norme XP T 90-210 (AFNOR, 1999).

Dans un premier temps les rendements de récupération ont été évalués à 2 niveaux de dopages (10 ng/g pour toutes les molécules sauf E1 à 20 ng/g ; et 60 ng/g). Pour les 2 niveaux de dopage, des rendements satisfaisants (entre 86 et 126%) sont obtenus.

La répétabilité de la méthode a ensuite été testée d'une part, sur un échantillon de boue dopé à 2 niveaux de dopage (5 réplicats) et d'autre part, sur 12 boues non dopées (3 réplicats)[3]. Dans les 2 cas, une répétabilité satisfaisante a été observée : coefficient de variation compris entre 2 et 27% pour les échantillons dopés, et entre 7 et 15% pour les boues non dopées.

La reproductibilité a été étudiée en comparant les variations obtenues sur les analyses d'un même échantillon réalisées 4 fois entre juillet 2008 et juillet 2009. Une bonne reproductibilité est observée pour E1, βE2 et E3 (CV compris entre 14 et 20%). Pour EE2 qui n'est pas quantifiée dans l'échantillon, la reproductibilité n'a pas pu être étudiée. Pour αE2, une variabilité de 68% est obtenue, mais cette performance médiocre est plus liée à la teneur de cette molécule dans la matrice (proche de la limite de quantification) qu'à la méthode elle-même. Des essais complémentaires sur un échantillon de boue contenant une quantité plus élevée de αE2 sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

[3] Ces 12 échantillons ont été analysés en triplicat dans le cadre d'un essai inter-laboratoires organisé par Guillermina Hernandez de l'INRA de Narbonne. Quatre laboratoires sont impliqués dans cet essai : le laboratoire des Micropolluants Organiques du Cemagref de Lyon, le laboratoire de Physico et Toxico-Chimie de l'environnement de l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux, le laboratoire de l'Institut de recherche sur l'environnement et la chimie de Barcelone et le laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA de Narbonne. Les résultats sont en cours de traitement.

Un soin particulier a été porté à l'étude de la spécificité qui permet d'évaluer la capacité d'une méthode à déterminer exclusivement la grandeur de l'analyte considéré, avec la garantie que le signal mesuré provient seulement de l'analyte. En effet, lors du développement de méthode, l'importance des effets matrice a été mis en évidence et, en ce sens, il est particulièrement important de s'assurer que la méthode procure des résultats fiables quelque soit l'échantillon analysé. Pour cela, 8 échantillons de boue de natures différentes ont été dopés avec les 5 estrogènes à des niveaux de dopages différents (entre 10 et 160 ng/g) (figure 10). Des tests de Student (risque α de 5%) ont été réalisés pour vérifier que les concentrations mesurées ne sont pas statistiquement différentes des concentrations ajoutées. Pour chaque molécule, une droite de régression [concentration mesurée = f (concentration ajoutée)] a été tracée et la spécificité est évaluée en comparant la pente de la droite à 1 et l'ordonnée à l'origine à 0. Pour toutes les molécules sauf EE2, la spécificité est vérifiée jusqu'à 160 ng/g. Pour EE2, la spécificité est validée jusqu'à 100 ng/g seulement.

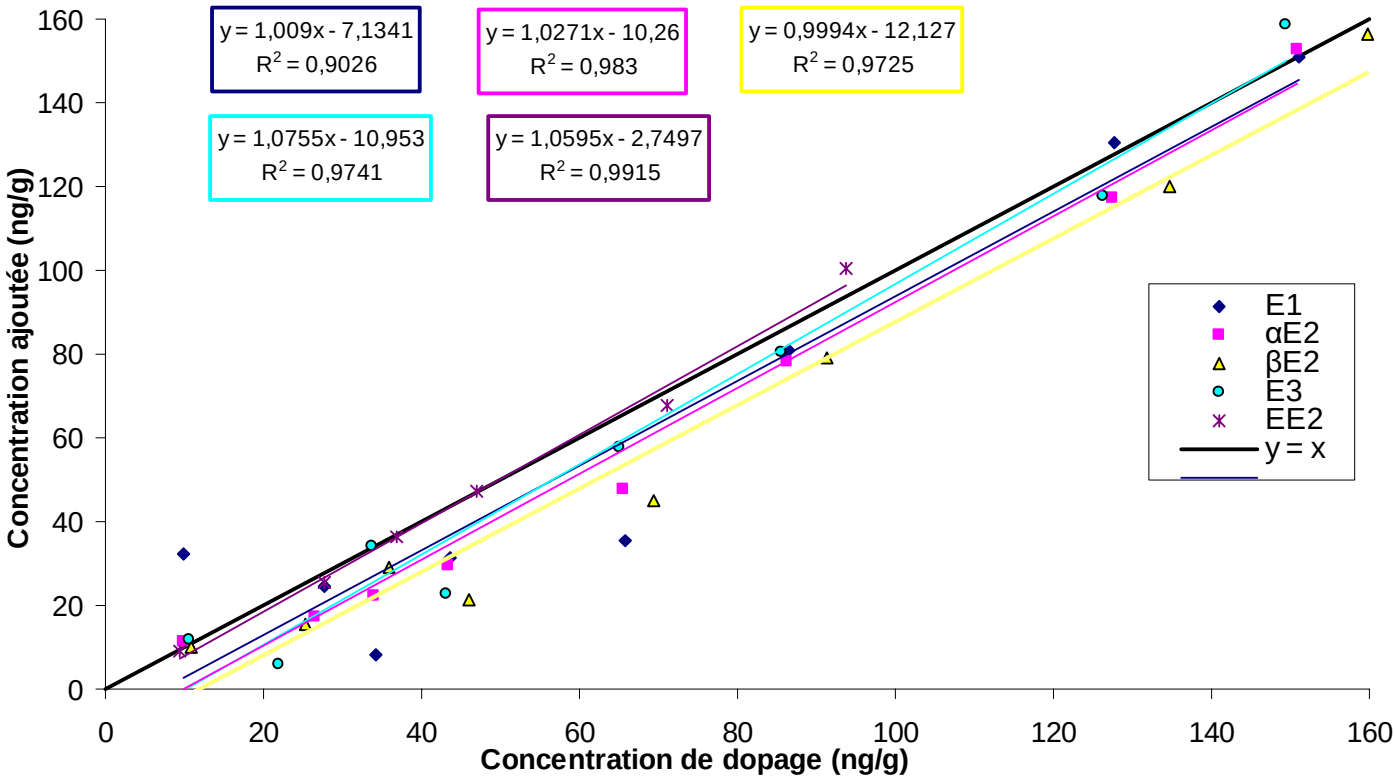


Figure 10 : Etude de la spécificité de la méthode d'analyse des estrogènes dans les boues ; comparaison des concentrations d'ajout mesurées avec les concentrations de dopage sur 8 échantillons de boue différents (6 échantillons pour EE2)

Enfin, la sensibilité de la méthode a été évaluée. Compte tenu des différences observées entre les différents échantillons de boue (effets matrice différents), nous avons décidé de déterminer la sensibilité pour chaque couple échantillon/molécule. Pour cela, la limite de quantification est définie comme le plus bas point confirmé (par le rapport des 2 transitions en spectrométrie de masse) de la gamme étalon corrigé du rendement du deutéré. Cette méthode permet ainsi de tenir compte à la fois de la sensibilité de l'appareillage qui peut varier d'un jour à l'autre (en fonction de l'encrassement de l'appareil par exemple) et de la matrice (utilisation du rendement du composé deutéré). Ainsi, les limites de quantification sont estimées autour de 1 ng/g pour E1, entre 2 et 3 ng/g pour αE2, βE2 et E3 et autour de 5 ng/g pour EE2.

La conservation des estrogènes dans des échantillons de boue lyophilisée conservés à température ambiante dans des flacons en verre ambré a été étudiée sur 7 mois. Sur cette durée, aucune variation significative des teneurs de E1, βE2 et E3 n'est observée (EE2 non quantifiée). Seul αE2 présente une variation de teneur de 68%. Cependant, ce CV élevé s'explique par la faible teneur en αE2 présente dans l'échantillon (4 ng/g en moyenne) et ne remet pas en cause la stabilité de l'échantillon.

Cette méthode développée et validée a été utilisée pour l'analyse des boues dans le cadre du projet AMPERES. Cette méthode a aussi été appliquée avec succès à l'analyse des matières en suspension (MES) d'eaux usées, pour lesquelles la difficulté est moins liée aux effets matrice qu'à la faible prise d'essai disponible.

Development and validation of an analytical method by LC-MSMS for the quantification of estrogens in sewage sludge

VIRGINIE GABET-GIRAUD[1], CÉCILE MIEGE[1], BERNARD HERBRETEAU[2], GUILLERMINA HERNANDEZ-RAQUET[3] AND MARINA COQUERY[1]
[1]Cemagref, UR QELY, 3 bis quai Chauveau, CP 220, F-69336 Lyon, France, marina.coquery@cemagref.fr
[2] Université de Lyon, Lyon 1, UMR5180, CNRS, Laboratoire des Sciences analytiques, 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne, France
[3] INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne, France

Abstract

A sensitive method for the simultaneous analysis of 5 estrogens in sewage sludge was developed. The extraction and purification steps were optimized and the matrix effects were evaluated. The chromatographic gradient was optimized to limit matrix effects and the analysis step was performed by LC-MSMS. The method consists in an ASE® extraction with a solvent mixture water/methanol 80/20 v/v at 100°C followed by 2 consecutive purifications on Oasis HLB® and florisil cartridges. A thorough validation of the developed method was performed. Recoveries determined at 2 different spiking levels ranged between 86 and 126% depending on the molecule. Repeatability was evaluated on five replicates of the same sludge sample spiked at 2 different levels and measuring native estrogens in triplicates of 12 sludge samples. Relative standard deviations obtained range between 2 and 27%. Reproducibility was also studied by analyzing the same sludge on 4 different days: the relative standard deviation ranged between 14 and 20% for E1, βE2 and E3. For αE2, poor reproducibility (68%) was observed but it was linked to the very low quantity of αE2 present in the sludge sample and not to the method performance. The specificity of the method was evaluated on various sludge samples spiked at different spiking levels showing that performances of proposed method were not modified by matrix effects. Finally, sensitivity of the method was evaluated taking into account both instrumental sensitivity and matrices; the estimated limits of quantification were around 1 ng/g for E1, between 2 and 4 ng/g for αE2, βE2 and E3 and around 5 ng/g for EE2.

Key Words: estrogens, LC-MSMS analysis, sewage sludge, matrix effects, wastewater treatment plant, method validation

Abbreviations: E1 (estrone), αE2 (17α-estradiol), βE2 (17β-estradiol), E3 (estriol), EE2 (17β-ethynilestradiol), E1D4 (deuterated estrone), E2D2 (deuterated 17β-estradiol), E3D2 (deuterated estriol), EE2D4 (deuterated 17β-ethynilestradiol), ACN (acetonitrile), ASE®

(accelerated solvent extractor), HPLC (high performance liquid chromatography), LC (liquid chromatography), LC-MS/MS (liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry), RSD (relative standard deviation), SPE (solid phase extraction), SPM (suspended particulate matter), USE (ultrasonic assisted solvent extraction), WWTP (wastewater treatment plant).

Introduction

Natural and synthetic estrogens are excreted by human bodies and reach the aquatic environment daily via sewage systems. Municipal wastewater treatment plants (WWTP) are recognised as the main pathway of contamination for these emerging micropollutants. Some papers have reported analytical methods for the determination of estrogens in surface waters and wastewaters [1-12], but few focused on the analysis of these molecules in more complex matrices such as sediment, suspended particulate matter (SPM) or sewage sludge [13-17] and often present only few details on the method validation and performances. Hence, data on estrogens concentration in solid matrices are scarce. Nevertheless, with a medium to high hydrophobicity (log octanol-water partition coefficient of 2-4), estrogens might be concentrated in sewage sludge that can act as environmental reservoirs from which estrogens can become available. In fact, estrogens have seldom been quantified in SPM, sewage sludge or sediments [15-17].

Solid matrices such as sludge or sediments are very complex and rich in organic matter so the analysis of organic molecules raises several problems. The challenge of the sample preparation step consists in extracting quantitatively the analytes while limiting the coextraction of interferents. Nevertheless, interferents are always extracted to some extent, so one or even more clean-up steps are generally used [18]. Thus, sample preparation is crucial because the presence of interferents may cause matrix effects (signal enhancement or extinction) and perturb the quantification. Moreover, sludge samples contain much more organic matter than sediments or suspended particulate matter (SPM) of river samples and as a consequence different matrix effects will be expected for these different solid matrices. For this reason, analytical methods developed for natural waters SPM or sediments can not be directly transposed for sludge and a specific method should be developed for this matrix.

To overcome these matrix effects and to ensure the validity of the results, it is necessary to perform a comprehensive method validation and especially to test the specificity of the method [18]. Specificity relates to the ability of a method to provide an accurate answer in the presence of potential interferents. In fact, matrix effects are by definition highly variable from

one sludge sample to another and it is crucial to ensure that reliable results will be obtained whatever the matrix. Some methods for the analysis of estrogens in sludge samples have already been published, but, to our knowledge, only one presents details on their performances and validation results (study of recoveries and sensitivity) [16]. Even for the analysis of estrogens in wastewater, few authors present a study of specificity [11, 19-21] and to our knowledge, it has never been tested for sludge samples.

We present in this paper an analytical method developed to identify and quantify simultaneously 5 estrogens (estrone E1, 17α-estradiol αE2, 17β-estradiol βE2, estriol E3 and 17β-ethynilestradiol EE2) in sewage sludge. The different parameters tested to optimize this method are detailed; for each analytical protocol step, the impact of matrix effects were assessed and as far as possible limited. Moreover, a comprehensive method validation, including specificity study, was performed using various sludge samples to prove the validity of the results for a wide range of sludge types.

Experimental section

Chemicals and materials

The HPLC system consisted on an Agilent 1100 (Agilent, Massy, France) coupled with an API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems-MDS Sciex, Courtaboeuf, France). Purifications on Oasis® HLB cartridges were performed with a Zymark Autotrace workstation (Caliper Life Science, Roissy Charles de Gaulle, France). A Dionex ASE® 200 (Accelerated Solvent Extractor Dionex, Voisins Le Bretonneux, France) equipped with 33 mL extraction cells was used to perform extraction. Fontainebleau sand used as dispersant and cellulose filters were purchased from Dionex (Voisins Le Bretonneux, France).

Glass fiber filters (GF/F, 0.7 µm pore size) were obtained from Whatman (Versailles, France). Oasis® HLB cartridges, 500 mg, 6 mL (Waters, Guyancourt, France), Supelclean LC Florisil® cartridges, 1 g, 6 mL (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and Strata® NH_2 cartridges, 500 mg, 6 mL (Phenomenex, Le Pecq, France) were used for clean-up. We used Xbridge Waters C18 endcaped column (150 mm x 2.1 mm x 3.5 µm) and guard column for chromatographic separation (Waters, Guyancourt, France).

Acetone, ethyl acetate, heptane, methanol and methylene chloride of pesticide analysis grade, acetonitrile and ultrapure water (used for mobile phase) of HPLC grade were obtained

from SDS (Val-De-Reuil, France). Ultrapure water was obtained from a MilliQ water system (Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Gazeous nitrogen of standard quality was used for evaporation (Air Liquide, Pierre Bénite, France). Deuterated hormones (powder) (estrone-D4 [E1-D4], 17βestradiol-D2 [E2-D2], 17αethynylestradiol-D4 [EE2-D4] and estriol-D2 [E3-D2])) were obtained from C.I.L. Cluzeau (Sainte-Foy-La-Grande, France).

Sampling of sewage sludge

Sludge samples were collected from several municipal WWTP in France. Liquid sludge was centrifuged, then freeze dried; solid sludge was directly freeze dried. Samples were further crushed and homogenized. 0.5 g of dried sludge was prepared for each extraction and following analysis.

One dehydrated sludge sample (sludge A) prepared in large quantity was used for the initial method development in order to obtain comparable results. For the study of matrix effects and specificity, 8 different sludge samples were used: limed stabilized sludge (B), settled sludge (C), centrifuged sludge (D), primary sludge (E), biological sludge from WWTP using at medium-load activated sludge process (F), pond sludge (G), thermal dried sludge (H) and mixed sludge (I). These sludge samples present a wide range of organic matter content (mixed liquor volatile suspended solid, MLVSS): 79, 24, 66, 76, 74, 80, 11, 58 and 75%, respectively. Repeatability was assessed with 12 sludge (MLVSS): 2 primary sludge (60 and 65%), one sludge from a fixed bed process (75%), 3 secondary sludge samples from WWTP using at high- and low-load activated sludge process (38, 77 and 78%), 2 mixed sludge (69 and 75%), 2 digested sludge (47 and 52%) and 2 dehydrated sludge (27 and 76%).

Development of the extraction step

First, the nature of the extraction solvent was optimized by testing the extraction efficiency of native contaminants and by considering the co-extracted interferents. Then, ultrasonic assisted solvent extraction (USE) and extraction by solvent under controlled pressure and temperature (ASE®) performances were compared.

Selection of the extraction solvent

The use of methanol was reported in the literature to extract estrogens from solid matrices [18], but this solvent can co-extract many interferents, which may disturb LC-MS/MS analysis. To limit these co-extracted interferents, the use of a water/methanol mixture as extraction solvent was tested. In order to determine the optimum proportions of the solvent mixture, 2 experiments were performed initially by USE (for 30 min, with 100 mL of solvent) on 0.5 g of sludge A: firstly, to evaluate the efficiency of sludge extraction (by spiking the samples with 4 deuterated estrogens before extraction); secondly, to evaluate the presence of co-extracted interferents (by spiking diluted extract with 5 native estrogens and 4 deuterated estrogens just before analysis). The following proportions of water/methanol mixture were tested: 80/20 v/v, 60/40 v/v, 40/60 v/v and 20/80 v/v. The USE extracts obtained were filtered on glass fiber filters and spiked with a solution containing the 4 deuterated estrogens. The dissolved phases were then purified successively on Oasis® HLB and on florisil cartridges. Each USE extract was separated in 3 aliquots: one was analyzed directly, one was diluted by 5, and one was diluted by 5 and spiked with a solution containing the 5 native estrogens and the 4 deuterated ones. The spiking concentrations in the final extracts were:

- 31 µg/L for the 4 deuterated estrogens in the non diluted extracts
- 6 µg/L for the 4 deuterated estrogens in the 5 times diluted extracts
- 46 µg/L for the 4 deuterated estrogens and 40 µg/L for the 5 native estrogens in the 5 times diluted spiked extracts.

All the extracts were analyzed by LC-MS/MS. Results were corrected with deuterated estrogens recoveries; for each mixture, triplicate extractions and analysis were performed.

Selection of the extraction method

To define the most appropriate extraction method, concentrations of native estrogens measured in sludge A extracted by USE (100 mL of extraction solvent, 30 min) or by ASE® (at 100°C, 100 bars) were compared. For ASE® extractions, samples were homogenized with Fontainebleau sand (inert material) and packed into 33 mL cells containing 2 filters at the bottom to avoid clogging; 3 replicates were performed for each extraction method. The extraction stages were preheat, 5 min; heat, 5 min; static solvent extraction, 5 min; flush, 100% of the volume; purge, 2 min; 3 static cycles. Both USE and ASE® extractions were performed with the solvent mixture water/methanol 80/20 v/v. Extracts were then purified as

mentioned above and analyzed by LC-MS/MS. The results were corrected with recoveries of deuterated surrogates.

Development of the purification steps

The purification steps were optimized starting from a protocol already validated for wastewater samples [22]. It consists of two purification steps: the first step is based on a reversed-phase system (Oasis® HLB) and the second on a normal phase system (florisil).

Optimization of the purification on Oasis HLB® cartridge

For the first purification step, a higher quantity of HLB phase was used than for wastewaters, insofar as sludge extracts contain more interferents. To select the most appropriate elution mixture, different proportion and volume of ethyl acetate/methanol were tested. First, several HLB cartridges were conditioned with 5 mL of methanol followed by 5 mL of MilliQ water. Then, a mixture of water/methanol 80/20 v/v was spiked with a solution containing the 5 estrogens and 4 deuterated surrogates, then percolated on the cartridges. After drying under nitrogen stream, each cartridge was eluted with 3 fractions of 3 mL of a mixture of ethyl acetate/methanol. Different elution mixtures of ethyl acetate/methanol ranging from 100/0 v/v to 0/100 v/v were tested. Each fraction was then analyzed by LC-MS/MS. In order to evaluate the behaviour of co-extracted interferents, additional tests were also performed with sludge A extracts; in that case, 4 elution mixtures were tested: ethyl acetate/methanol 100/0, 90/10, 50/50 and 10/90 v/v. The sludge extracts were further purified on florisil cartridge and analyzed by LC-MS/MS.

Purification on florisil cartridge

After the first purification (on Oasis® HLB), extracts were evaporated to dryness under nitrogen and dissolved in 1 mL of the mixture methyle chloride/heptane 50/50 v/v. As described elsewhere [22], the florisil purification was performed with 1 mL of extracts followed by an elution using 5 mL of a mixture acetone/heptane 75/25 v/v. The performances of this purification were compared to those obtained by a purification on Strata® NH_2 used by another laboratory [12]. For the purification on Strata® NH_2, HLB extracts were evaporated to dryness and dissolved in 2 mL of the mixture ethyl acetate/methanol 80/20 v/v. The sludge A extracts obtained by ASE® (water/methanol 80/20 v/v, 100°C, 100 bars) were first purified by SPE on Oasis® HLB, then either on florisil or on Strata® NH_2. Extracts prepared in triplicates were analyzed by LC-MS/MS.

As an alternative, considering that the multiplication of purification steps is time consuming, we tried to replace the purification on florisil cartridge by a purification during the extraction process. A layer of florisil was added at the bottom of the ASE® extraction cell. Then, the extraction cell was filled with sludge A as described earlier. The extract was purified on Oasis HLB® and analyzed by LC-MS/MS. The use of alumina layer was also tested in the same way. Both tests were performed in triplicates.

Liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

The analysis step was adapted from an existing method [22] and only the chromatographic gradient was optimized. Briefly, the injected volume was 10 µL and a gradient with LC-grade water and acetonitrile (flow-rate, 0.2 mL/min) was applied for the separation of the 5 estrogens. The column temperature was set at 35°C. Ionization was performed with an electrospray source in a negative mode and the acquisition was achieved in multiple reaction monitoring (MRM) mode (ion-source temperature, 400°C; ion-spray voltage, -4.5 kV; collision gas, 6 psi; curtain gas, 25 psi).

The MS/MS conditions included the use of two ionization conditions for each compound (except the deuterated estrogens), one for the quantification and one for the identity confirmation. Final concentrations were calculated using recoveries obtained for the deuterated surrogates.

Limitation of matrix effects by optimization of the chromatographic gradient

To limit matrix effects, we modified the chromatographic gradient of the LC-MS/MS process. Dilution of the extracts could be a solution too, but it would lead to higher limits of quantification, which is not favored.

In order to reduce the matrix effects, the chromatographic step was improved to minimize coelution and improve the separation of analytes. We tested 5 different gradients: from 40 to 100% acetonitrile (ACN). Two linear gradients with different slopes (10 and 20 min gradient) and 3 multi-step gradients with isocratic step at 80 or 70% ACN were tested.

Validation of the analytical method

In order to evaluate the reliability of the developed method, a thorough method validation was performed. The method validation was inspired from the French standard NF XP T 90-210 [23].

First, method recoveries were evaluated at 2 different spiking levels. Sludge A was spiked before extraction at two spiking levels with a solution containing the 5 native estrogens and 4 deuterated ones (n = 5). Considering the quantity of native estrogens present in sludge, the low spiking level was set at 10 ng/g for all molecules, except E1 for which it was set at 20 ng/g. The high spiking level was set at 60 ng/g for all molecules. The sludge was analyzed spiked and non-spiked; recoveries were calculated by subtracting native estrogens concentrations to total estrogens concentrations measured in spiked sample.

To determine the repeatability of the method, 5 replicates of spiked samples (sludge A) were analyzed and RSD (relative standard deviation) were calculated. Samples were spiked at 2 spiking levels as described earlier. The repeatability of the method was also studied on non-spiked sludge. Twelve sludge samples of various origins were analyzed in triplicates within the context of an inter-laboratory comparison study organized by G. Hernandez-Raquet. For both repeatability (on spiked and non-spiked samples), the whole method repeatability was tested (from extraction to analysis) and not only for the analytical step.

Reproducibility of the whole method was also tested by analyzing sludge A in January, March, June and July 2009 (n = 1 at each date).

Then, the specificity of the method was performed with 8 different sludge of different nature (sludge A, B, D, E, F, G, H and I). Each sludge was spiked with the 5 estrogens at one specific spiking level (n = 1) and analyzed spiked and non-spiked. The selected spiking levels covered the range of analyzed concentrations (from 10 to 160 ng/g). For each sample, native estrogens concentrations were subtracted from concentrations of spiked sample. Student statistical tests with risk α of 5% were performed to verify that measured concentrations were not statistically different from added concentrations. For each molecule the regression curve [measured concentration = f (spiked concentration)] were plotted and the specificity was tested by comparing the slope coefficient to 1 and the origin ordinate to 0 [23].

Finally, the sensitivity of the method was estimated. As sludge are complex matrices and can present very different matrix effects from one sample to another, we decided to evaluate limits of quantification (LOQ) and limits of detection (LOD) for each molecule in each sample. Moreover, instrumental sensitivity which can vary from one batch to another

(depending for example of the clogging of the mass spectrometer) should also be considered to determine method sensitivity. Thus, the LOQ was calculated by correcting the value of the first confirmed calibration point (by the ratio of confirmation and quantification ionization transitions) by the recovery of deuterated estrogen in the sample. The LOD was defined as LOQ/3 [22]. So, the defined sensibility of the method included not only the matrix but also the instrumental sensitivity.

Results and discussion

Extraction step

Selection of the extraction solvent

The concentrations of native estrogens measured in sludge A by USE with different proportion of methanol in the extraction solvent are presented in Figure 1. The average concentration of extracted E1 increases slightly (from 13 ng/g to 19 ng/g) from 20 to 40% of methanol in the mixture, then is stable above 40% of methanol. βE2 is quantified at 7 ng/g in the extracts obtained with 20% of methanol, but it is not detected when the proportion of methanol increases. Concerning E3, results are equivalent for extraction with 20, 40 or 60% of methanol. Neither αE2 nor EE2 are detected in this sludge sample.

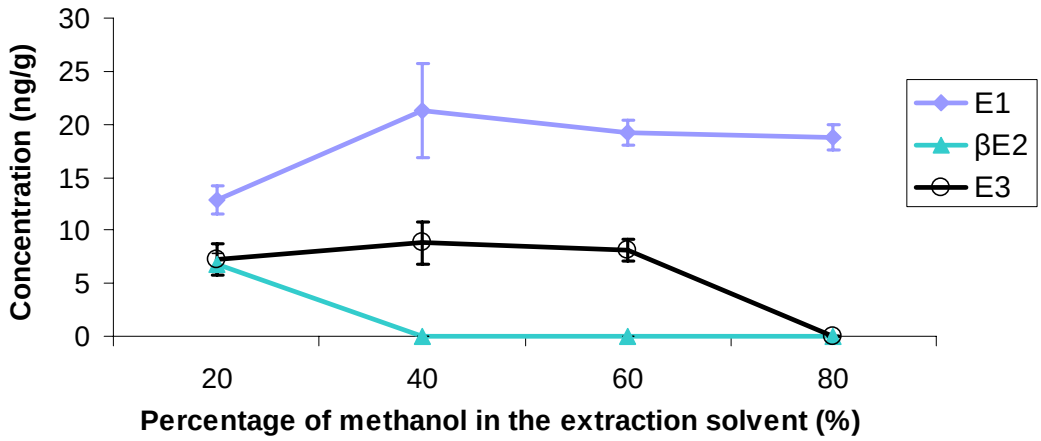


Fig. 1 Variation of the native estrogens concentration extracted from sludge A (± standard deviation (sd)) with the percentage of methanol used in the extraction solvent mixture (water/methanol; USE, n = 3); αE2 and EE2 were not detected.

The influence of co-extracted interferents was also evaluated by comparing the recovery obtained for spiked diluted extracts (Table 1). Recoveries obtained with 20% of methanol are satisfying (between 65 and 83% for all the molecules). The increase of methanol proportion

above 20% leads to similar (E3) or lower recoveries for all the molecules. This can be explained by a higher amount of co-extracted interferents in the presence of more methanol in the solvent mixture. These results also point out the similar behavior between deuterated and non deuterated hormones, showing that these compounds are good internal surrogates.

Table 1 Spiking recoveries (%) for sludge A extracts (diluted by 5) obtained with different extraction solvents

Percentage of methanol in the extraction solvent mixture (%)	Spiking recovery (%) for diluted sludge extracts								
	E1	αE2	βE2	E3	EE2	E1D4	E2D2	E3D2	EE2D4
20	72	69	69	82	65	77	66	83	68
40	57	42	26	87	29	60	22	81	28
60	53	31	17	80	13	52	15	83	16
80	2	/	1	86	1	3	1	92	1

/ : not applicable (molecule not detected)

In conclusion, taking into account the efficiency of the extraction for native compounds and the effects of interferents observed on diluted extracts, the mixture water/methanol 80/20 v/v appeared as the most appropriate solvent for the extraction of estrogens in sewage sludge.

Selection of the extraction method

Figure 2 shows the native concentrations of estrogens quantified in sludge A with extraction performed by USE or by ASE®. As expected, results obtained by ASE® are clearly better in terms of quantification of the studied molecules. In fact, for all molecules, concentrations at least twice higher are obtained for ASE® compared to USE. For instance, whereas 12 ng/g of E1 are quantified in the sludge by USE, 32 ng/g are measured by ASE®. The synthetic estrogen EE2 was not detected with both extraction method. Consequently, the chosen extraction protocol is as follows: ASE® (100°C, 100 bars) with the mixture water/methanol 80/20 v/v as extraction solvent. Previously, USE was used for extraction of estrogens from sediments and sludge samples [16]. However, the solvent used were methanol and acetone that can lead to the co-extraction of many interferents; 2 purifications and a derivatization step were used before the analysis by GC-MS/MS.

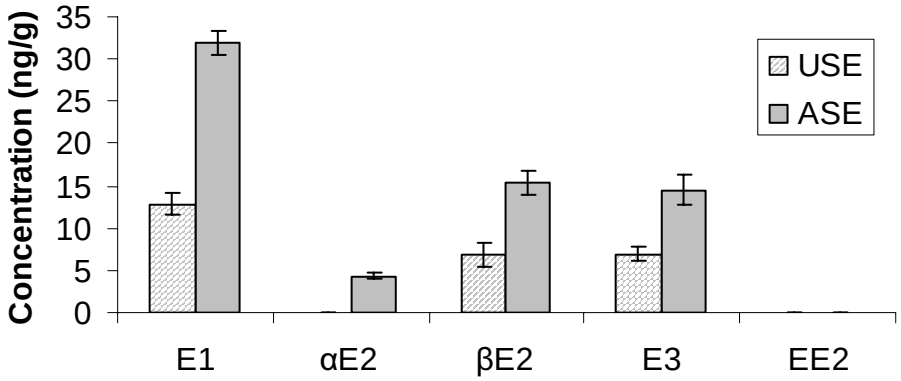


Fig. 2 Comparison of mean concentrations of native estrogens in sludge A (ng/g) ± sd with USE and ASE® (n=3)

Purification steps

Optimization of the purification on Oasis HLB® cartridge

Tests performed with spiked water showed that for almost all the elution solvent mixtures tested, the target molecules are quantitatively eluted with 2 fractions of 3 mL of eluting solvent. Only a significant proportion of E1 is quantified in the 3rd fraction when the elution is performed with pure methanol. Moreover mean recoveries between 82 and 101% are obtained for all analytes for elution performed with 6 mL of elution solvent containing 30 to 100% of ethyl acetate. With an ethyl acetate proportion below 30%, recoveries decrease: recoveries obtained with 6 mL of pure methanol are below 70% for all analytes, except E3 for which recovery reach 80%. For EE2, the best results are obtained with pure ethyl acetate.

Tests of the different solvent elution mixtures (elution volume of 6 mL) performed with sludge A extracts show comparable results with satisfying recoveries for all the molecules. Nevertheless, as observed with spiked water, the best results for EE2 are obtained with pure ethyl acetate. As a consequence, 6 mL of pure ethyl acetate is selected for the elution step of the purification on Oasis® HLB.

Purification on florisil cartridge

The comparison of purifications performances obtained on florisil or Strata® NH_2 cartridges does not show significant differences (Fig. 3). In fact, comparable recoveries and repeatability (standard deviations, sd) are generally obtained for all deuterated surrogates. Nevertheless, for E3D2, recoveries obtained with florisil improve slightly: 11% instead of 6%

with Strata® NH_2 cartridges. As a consequence, the purification on florisil is preferred to the purification on Strata® NH_2 used by Labadie et al. [12].

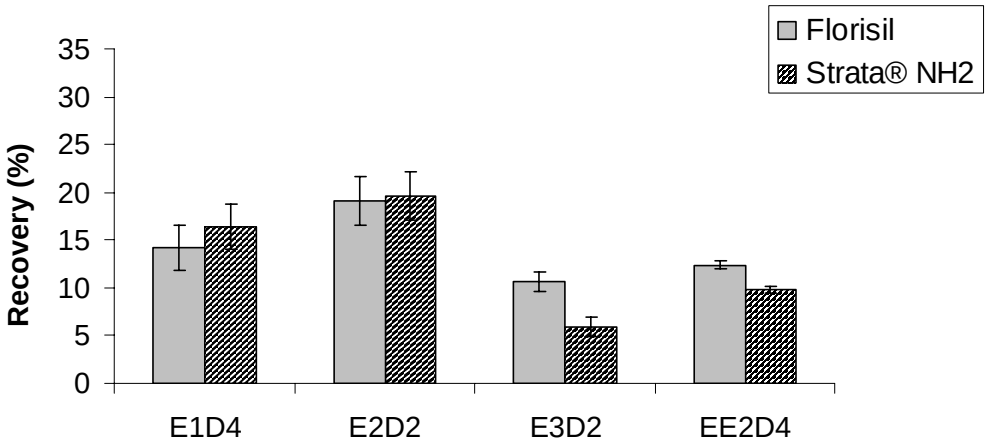


Fig. 3 Comparison of mean recoveries (%) ± sd obtained with sludge A extracts purified on florisil or Strata® NH_2 cartridges (n=3)

Recoveries obtained with the addition of florisil directly in the extraction cell are extremely low (below 3% for all analytes), especially for E2D2 (0% for 2 of the 3 replicates performed on sludge A). Tests performed with alumina give similar results. In fact, target molecules are adsorbed on the purification phase and the mixture water/methanol 80/20 v/v does not have a sufficient eluting power to desorb the estrogens in the experimental conditions used.

As a conclusion, after purification on Oasis® HLB with an elution step performed with 6 mL of pure ethyl acetate, the extracts are further purified on florisil cartridge with elution using 6 mL of 75/25 acetone/heptane mixture.

Matrix effect

Matrix effects already observed for wastewater samples [22] are suspected to be higher in sludge extracts. To study the performances of each analytical step and to evaluate matrix effects, sludge A extracts were spiked at different steps of the method with a solution containing the 4 deuterated surrogates:

- before the extraction step to evaluate the whole method recovery,
- before the purification on HLB® cartridge to evaluate the recovery of the 2 purification steps and the analysis,

- before the purification on florisil to assess the recovery of both florisil purification and the analysis steps,
- before the analysis to evaluate the recovery of the analysis step (linked to the matrix effect).

The extracts were prepared in triplicates and were analyzed by LC-MS/MS.

The results show that, even if recoveries linked to the analysis only are somewhat higher than those associated with the whole method, a strong matrix effect disturbs the quantification by LC-MS/MS (Fig. 4). Indeed, recoveries associated with the whole method are between 5% (for E3D2) and 11% (for E2D2); recoveries linked to the analysis step range between 14% (for E3D2) and 26% (for E2D2). Strong matrix effects are revealed in this step; they are responsible for a decrease of 75 to 85% of the estrogen signal in sludge extracts, hence they need to be limited.

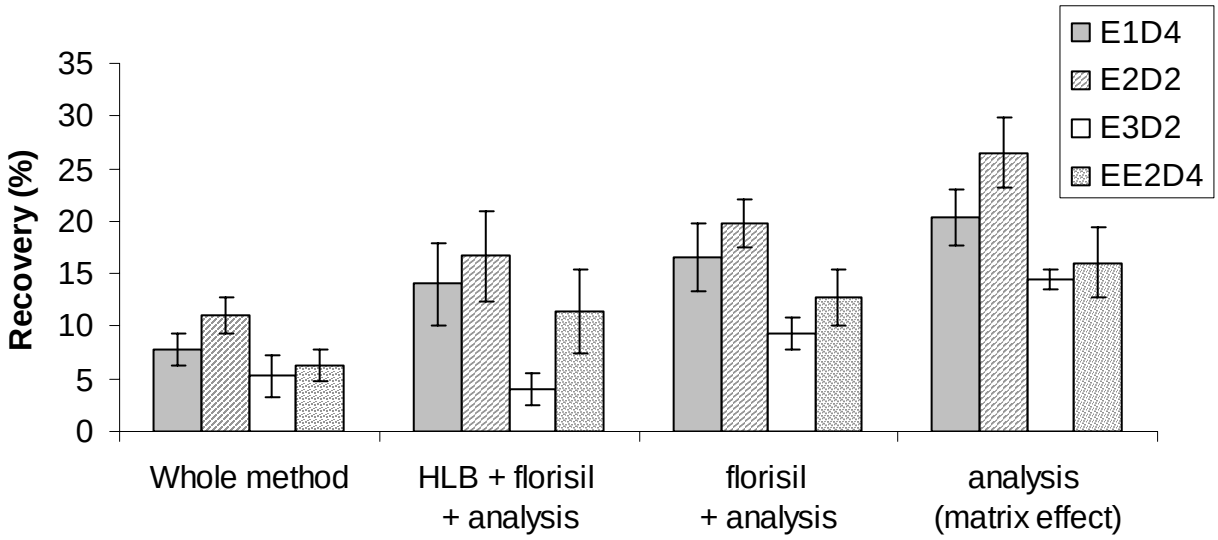


Fig. 4 Mean recoveries (%) ± sd obtained for sludge A for the different steps of the analytical method (n = 3)

Then, to determine if different matrix effects are observed depending on sludge samples, deuterated estrogen recoveries were evaluated in 4 different sludge samples (samples A, B, C and D) for the whole method (sludge spiked before extraction) and for the analysis step (sludge spiked before analysis) (Fig. 5). The objective here was to determine whether the low surrogate recoveries obtained for sludge A were linked to analytes losses occurring during sample preparation, or if they were related to matrix effects disturbing the LC-MS/MS quantification.

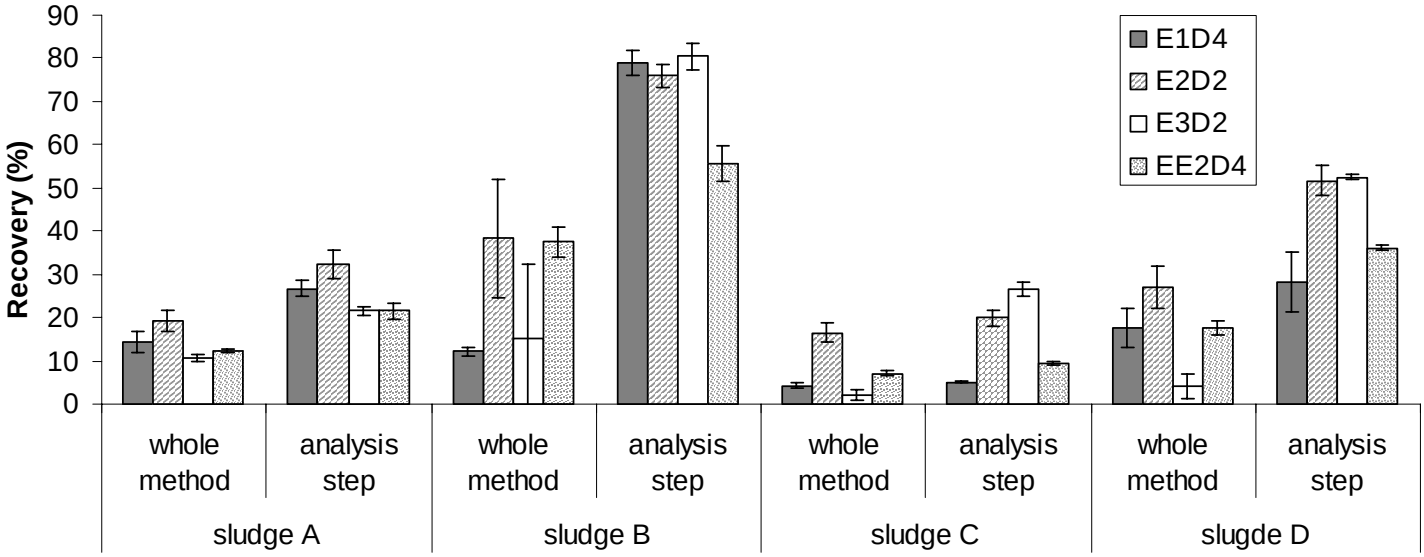


Fig. 5 Surrogates mean recoveries (%) ± sd for method and analysis step for 4 sludge samples (n=3)

For all studied sludge (except for sludge B), matrix effects are responsible for more than 50% of signal losses. For sludge B (limed stabilized sludge), which is the most mineralized matrix (VSS of 24% instead of 79, 66 and 76% for sludge A, C and D, respectively), matrix effects are more limited (20 to 45% of signal losses). Moreover, high pH prevailing in lime sludge may also improve estrogen desorption [24]. As a conclusion, matrix effects are present in all tested sludge samples displaying high variability depending on the sample nature.

Limitation of matrix effects by optimization of the chromatographic gradient

The easier method to limit matrix effect is to reduce coelutions during HPLC analysis by optimizing the elution gradient. The best results are obtained with a 20 min linear gradient: all molecules, except E3 and E3D2 (retention times around 3 min), are better retained in the column; as a consequence, recoveries related to deuterated surrogates are improved (for example, E1D4 recovery increases from 12% to 51% for one tested sludge sample). Nevertheless, as recoveries remain low for E3 and E3D2, we performed some additional tests consisting of reducing the initial proportion of organic solvent. With 10% ACN at the beginning of the gradient, retention times of E3 and E3D2 move from 3 to 19 min. As these molecules are better retained in the column, they are separated more efficiently from all non-retained polar interferents: for instance, recovery reaches 18% for E3D2. Hence, the selected chromatographic gradient is the following: 10% ACN from 0 to 4 min, then up to 100% ACN at 37 min and for 42 min.

The whole developed method is presented in figure 6. Freeze dried samples of sludge (0.5 g) are spiked with 25 µL of a solution containing the 4 deuterated estrogens in acetone at 500 µg/L. Then, samples are homogenized with Fontainebleau sand (inert material) and packed into 33 mL cell containing 2 filters at the bottom to avoid any clogging. Extraction is performed by solvent under controlled pressure and temperature (ASE®). The solvent mixture water/methanol 80/20 v/v at 100°C is the most suitable extraction solvent. The pressure employed is 100 bars. Extracts are first purified on Oasis® HLB 500 mg cartridges as follows: after conditioning with 5 mL of methanol and 5 mL of ultrapure water, extracts are percolated at 10 mL/min and washed with 10 mL of ultrapure water; elution is achieved with 6 mL of ethyl acetate. Then, extracts are evaporated to dryness and reconstituted in 1 mL of methylene chloride/heptane 50/50 v/v. A second purification step is performed on florisil 1g cartridges as follows: after conditioning with 2 mL of methylene chloride/heptane 50/50 v/v, the extracts are percolated, washed with 2 mL of methylene chloride/heptane 50/50 v/v and eluted with 5 mL of acetone/heptane 75/25 v/v. Finally, purified extracts are evaporated to dryness and reconstituted to 200 µL of water/acetonitrile 90/10 v/v; 150 µl are directly analyzed and the rest is diluted by 10 before analysis. Final concentrations are systematically corrected by recoveries of deuterated estrogens.

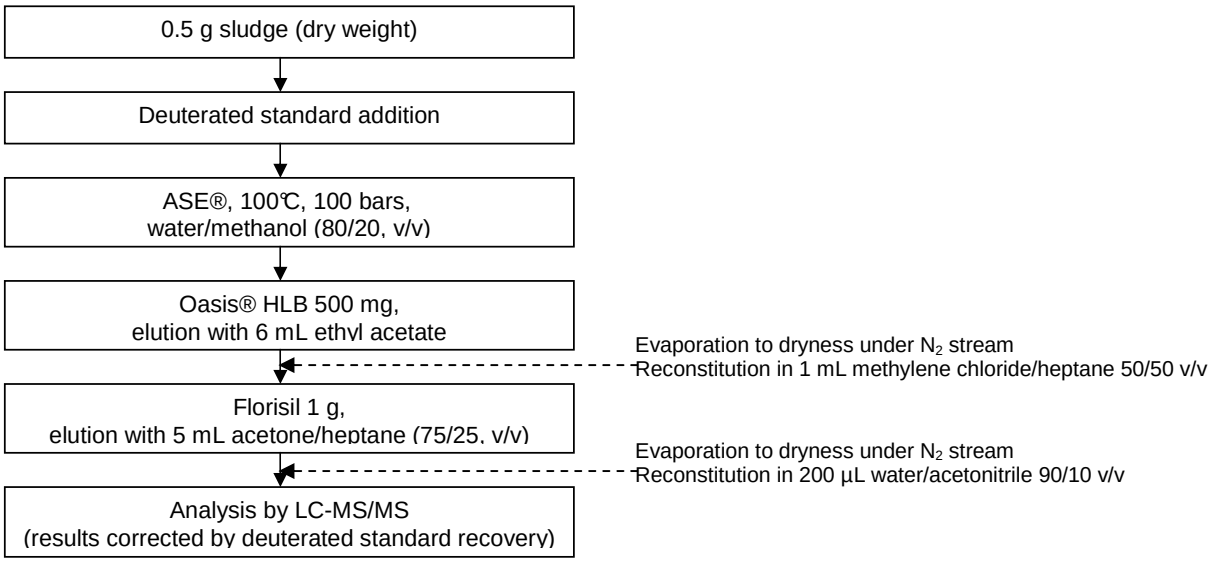


Fig. 6 Summary of the analytical method for the determination of estrogens in sludge

Performances and validation of the analytical method

Determination of method recoveries and study of repeatability and reproducibility

Mean recoveries evaluated for sludge A and relative standard deviation (RSD) obtained from the 5 replicates at 2 spiking levels (low spiking level set at 10 ng/g for all molecules except E1 (20 ng/g); high spiking level set at 60 ng/g) are presented in Table 2.

Table 2 Mean concentrations (ng/g) and spiking recoveries (%) and RSD obtained for sludge A at 2 spiking levels (n = 5)

	Mean concentration (n =4) (ng/g)	Low spiking level		High spiking level	
		R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
E1	27.7	95	27	116	2
αE2	5.4	126	16	105	2
βE2	10.3	89	11	95	3
E3	6.9	103	13	111	7
EE2	/	86	17	109	6

/: not quantified

Considering the complexity of the matrix, satisfying results were obtained with mean recoveries between 86 and 126% for the low spiking level and between 95 and 116% for the high spiking level, depending on the molecule.

The repeatability of the method, tested on 5 replicates of spiked samples is good especially for the high spiking level: RSD between 2 and 7%. For the low spiking level, variability is slightly higher but still acceptable with RSD between 11 and 27%.

Repeatability was also tested on 12 additional sludge samples analyzed in triplicate. Measured concentrations and RSD are presented in Table 3.

Table 3 Concentrations (ng/g) and RSD (%) measured for 12 sludge samples analyzed in triplicate

	n	Concentration (ng/g)			RSD (%)		
		Mean	Min	Max	Mean	Min	Max
E1	12	27.7	3.8	63.0	11	1	36
αE2	5	9.6	4.2	15.5	12	5	22
βE2	9	12.5	4.5	22.1	15	9	39
E3	10	8.2	5.3	13.1	7	1	16
EE2	0	/	/	/	/	/	/

n: number of quantified sample
/: not applicable (molecule not quantified)

As noted for spiked samples, satisfying repeatability is observed on native concentrations of estrogens with average RSD between 7 and 15%. Generally, RSD are below 20%. Nevertheless, αE2 presents a RSD of 22% in one sample; this is probably linked to the low concentration of the molecule in the sample (4.2 ng/g), near the limit of quantification (LOQ), hence associated to a higher analytical uncertainty. Moreover, in one sludge sample, E1 and βE2 present RSD of 36 and 39%, even if significant concentrations are measured (35.7 and

19.0 ng/g, respectively). In that case, the inhomogeneity of the sample could be an explanation. In fact, visually, this sample has a cotton-wool aspect and it was therefore difficult to take an homogenous aliquot of sludge. For EE2, it was not possible to conclude on the repeatability for non-spiked samples, as EE2 was not detected in any of the tested samples. Nevertheless, for this molecule, repeatability was already verified on spiked samples.

Reproducibility could not be evaluated for EE2 because this molecule was not detected in sludge A. For βE2, E1 and E3, satisfying RSD are obtained for the 4 measured concentration over time on sludge A: 14, 18 and 20%, respectively. Only a high RSD value is obtained (68%) for αE2 but that can be linked to the low concentration of αE2 in sludge A near the LOQ of the method. Except for αE2, these values are in the range of the results obtained for repeatability study. These reproducibility values (RSD) also include the variability linked to sample stability. Indeed, freeze-dried sludge A was stored for 7 months in amber glass bottles at ambient temperature and variations linked to reproducibility can not be distinguished from variations linked to stability.

Study of specificity

Regression curves [measured concentration = f (spiked concentration)] obtained for each molecule are presented in Figure 7.

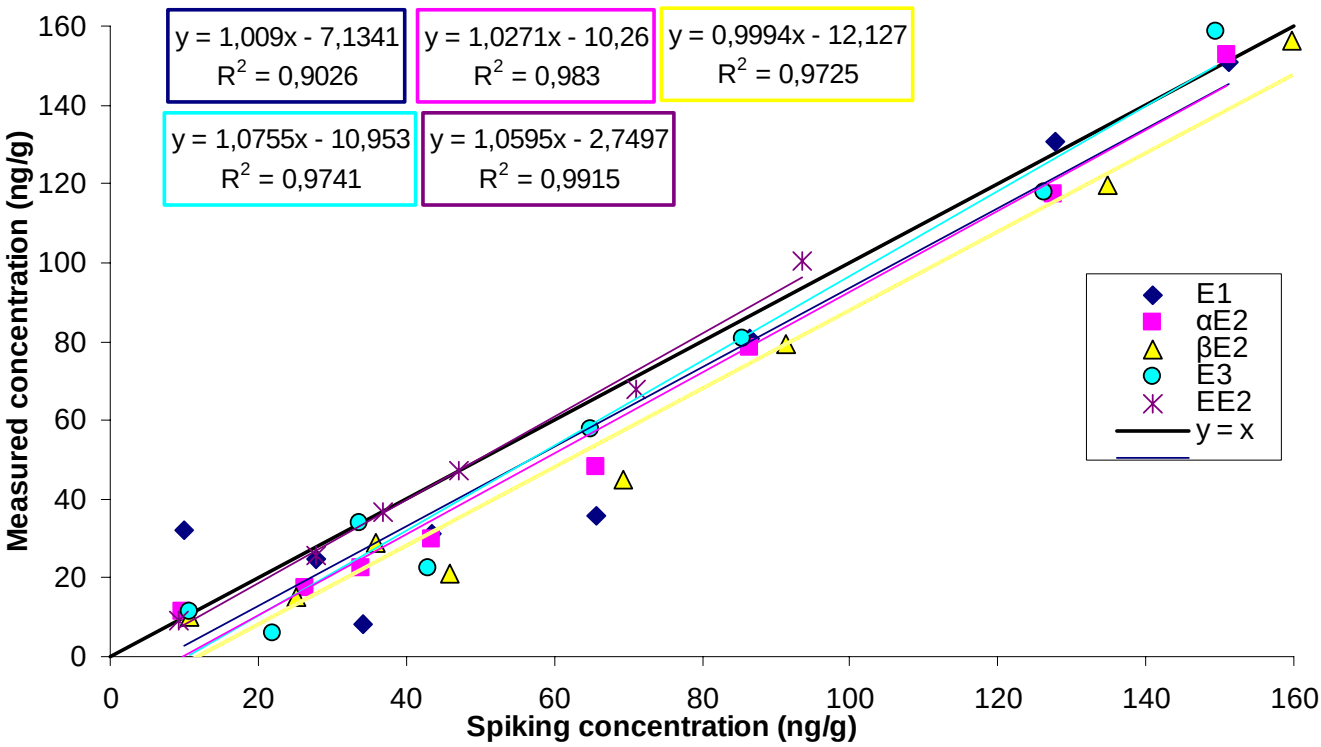


Fig. 7 Test of specificity of the method on sludge samples: comparison of the measured concentrations with the spiking concentrations for each molecule (n = 8 for each molecule except EE2, n = 6)

For all molecules, the specificity of the method was proved. Indeed, regression curves with slope coefficients not statistically different from 1 and origin ordinates not statistically different from 0 were obtained. For EE2, the specificity was only verified with 6 spiking levels from 10 to 100 ng/g) instead of the 8 spiking levels tested. In fact, measured concentrations of EE2 were slightly overestimated for spiking level above 100 ng/g (181 ng/g instead of 164 ng/g). Nevertheless, as EE2 was never quantified above 100 ng/g in sludge, this result does not invalidate the specificity of the method.

Coefficient of determination (R^2) range from 0.9725 to 0.9915 for all the molecules except E1, showing a good adequacy between the results and the model (linear curve). The lowest coefficient of determination value is obtained for E1 (0.9026). For this molecule, the least reliable results are obtained at the lowest spiking levels; these poor results are linked to the fact that significant amounts of native E1 (27, 36 and 110 ng/g) were already present in the tested sludge (A, E and B, respectively).

Sensibility

Considering the various matrix effects present in sludge sample, very different LOQ values were obtained for the same molecule. For instance, the LOQ values of E3 range from

0.7 to 14.7 ng/g. Nevertheless, mean LOQ were estimated around 1 ng/g for E1, between 2 and 4 ng/g for αE2, βE2 and E3 and around 5 ng/g for EE2.

Conclusion

The developed and validated method consists in an ASE® extraction followed by 2 purifications on HLB and florisil respectively, and a LC-MS/MS analysis. Relatively low deuterated estrogen recoveries were obtained for the tested sludge (between 18 and 51% for the 4 compounds) even after the optimization of the sample preparation steps and the chromatographic separation. These low recoveries are due to matrix effects, that are expressed by signal extinction up to 90% depending on the molecule and the sample. These results point out the difficulty of the quantification of estrogens in sludge samples and prove that sample preparation and clean up are major analytical steps. Nevertheless, the 4 deuterated compounds are good internal surrogates and allow to correct efficiently the measured concentrations of native compounds. After correction, the overall method recoveries ranged between 86 and 126%. Repeatability, tested on spiked and non-spiked samples, and reproducibility were evaluated and proved to be satisfying. As various matrix effects were pointed out from one sample to another, the study of specificity was a crucial point of the method validation. Nevertheless, to our knowledge, specificity has never been studied before for the analysis of estrogens in such matrices. The specificity of the method was evaluated on 8 points (8 different sludge spiked at 8 spiking levels) showing a good selectivity up to 150 ng/g for all molecules, except EE2 for which selectivity was proved up to 100 ng/g. Moreover, as no certified reference material exists for estrogenic compounds, the reliability of this method was also tested in an inter-comparison study. The thorough validation of the method enabled to ensure that the developed method is reliable and can be applied for the analysis of a variety of sludge samples. In fact, a total of 20 sludge samples of various origins were used for development and validation and all samples present satisfying results. Finally, this method was developed and validated for the analysis of estrogens in sludge samples but it was also applied to the analysis of estrogens in suspended particulate matter from wastewater with success.

Acknowledgments

This work was part of the AMPERES research project (Analysis of priority and emerging pollutants in wastewater and surface waters) and partly financed by the French National

Research Agency (ANR). The authors thank N. Morin for analytical support and J.M. Choubert for sampling assistance.

References

1. Arditsoglou A, Voutsa D (2008) Environ Sci Pollut Res 15: 228-36
2. Koha YKK, Chiu TY, Boobis A, Cartmell E, Lester JN, Scrimshaw MD (2007) J Chromatogr A 1173: 81-7
3. Gibson R, Becerril-Bravo E, Silva-Castro V, Jimenez B (2007) J Chromatogr A 1169: 31-9
4. Vulliet E, Baugros JB, Flament-Waton MM, Grenier-Loustalot MF (2007) Anal Bioanal Chem 387: 2143-51
5. Gomes RL, Birkett JW, Scrimshaw MD, Lester JN (2005) Int J Environ Anal Chem 85: 1-14
6. Komori K, Tanaka H, Okayasu Y, Yasojima M, Sato C (2004) Water Sci Technol 50: 93-100
7. Snyder SA, Keith TL, Verbrugge DA, Snyder EM, Gross TS, Kannan K, Giesy JP (1999) Environ Sci Technol 33: 2814-20
8. Chen HC, Kuo HW, Ding WH (2009) Chemosphere 74: 508-14
9. Viglino L, Aboulfadl K, Prevost M, Sauve S (2008) Talanta 76: 1088-96
10. Filali-Meknassi Y, Auriol M, Adams CD, Surampalli RY (2007) Water Environ Res 79: 687-96
11. Salvador A, Moretton C, Piram A, Faure R (2007) J Chromatogr A 1145: 102-9
12. Labadie P, Budzinski H (2005) Anal Bioanal Chem 381: 1199-205
13. Gomes RL, Avcioglu E, Scrimshaw MD, Lester JN (2004) Trends Analyt Chem 23: 737-44
14. Hajkova K, Pulkrabova J, Schurek J, Hajslova J, Poustka J, Napravnikova M, Kocourek V (2007) Anal Bioanal Chem 387: 1351-63
15. Matejicek D, Houserova P, Kuban V (2007) J Chromatogr A 1171: 80-9
16. Ternes TA, Andersen H, Gilberg D, Bonerz M (2002) Anal Chem 74: 3498-504
17. Muller M, Rabenoelina F, Balaguer P, Patureau D, Lemenach K, Budzinski H, Barcelo D, De Alda ML, Kuster M, Delgenes JP, Hernandez-Raquet G (2008) Environ Toxicol Chem 27: 1649-58
18. Gabet V, Miege C, Bados P, Coquery M (2007) Trends Analyt Chem 26: 1113-31
19. Benijts T, Lambert W, De Leenheer A (2004) Anal. Chem. 76: 704-11
20. Carpinteiro J, Quintana JB, Rodriguez I, Carro AM, Lorenzo RA, Cela R (2004) J. Chromatogr. A 1056: 179-85
21. Vanderford BJ, Pearson RA, Rexing DJ, Snyder SA (2003) Anal. Chem. 75: 6265-74
22. Miege C, Bados P, Brosse C, Coquery M (2009) Trends Analyt Chem 28: 237-44
23. AFNOR. 1999. Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique par rapport à une méthode de référence. pp. 58 pp
24. Ivashechkin P, Corvini PFX, Dohmann M (2004) Water Sci Technol 50: 133-140

3.1.2 L'analyse des bêtabloquants dans les boues

La méthode développée pour l'analyse des estrogènes dans les boues a été adaptée pour l'analyse des bêtabloquants dans les boues et les MES d'eaux usées. En effet, la méthode d'extraction développée et présentée dans la partie 3.1.1 couplée à l'étape de purification par SPE utilisée pour l'analyse des bêtabloquants ont montré satisfaction pour l'analyse des bêtabloquants dans les boues. Les détails concernant la méthode d'analyse des bêtabloquants dans les boues sont présentés dans la partie 2.3.4.

Pour caractériser cette méthode, différents paramètres ont été testés.

Les rendements de récupération ont tout d'abord été évalués. Pour cela, un échantillon de boue a été dopé avec une solution contenant les 10 bêtabloquants. Deux niveaux de dopage différents ont été déterminés à partir des teneurs mesurées dans les échantillons :

- Un niveau bas défini comme suit : 30 ng/g pour BET, OXP et TIM, 120 ng/g pour BIS, MET, NAD et PROP, et enfin 600 ng/g pour ACE, ATE et SOT.
- Un niveau haut défini comme suit : 80 ng/g pour BET, OXP et TIM, 320 ng/g pour BIS, MET, NAD et PROP, et enfin 1600 ng/g pour ACE, ATE et SOT.

Ces essais ont été réalisés en 5 réplicats de manière à déterminer la répétabilité de la méthode (1 seul jour, 1 seul échantillon de boue).

Le tableau 22 présente les rendements moyens obtenus pour chaque molécule (aux 2 niveaux de dopage différents) et les valeurs de CV associées.

Tableau 22 : Rendements de récupération moyens (%) et CV (%) obtenus pour l'analyse de 10 bêtabloquants dans un échantillon de boue dopés à 2 niveaux de dopage différents (n = 5)

	Dopage bas		Dopage haut	
	Rendement (%)	CV (%)	Rendement (%)	CV (%)
ACE	88	7	89	4
ATE	34	9	34	10
BET	29	30	26	13
BIS	72	13	64	9
MET	69	6	67	3
NAD	51	7	50	6
OXP	66	13	60	10
PROP	24	47	17	26
SOT	50	5	48	6
TIM	81	3	85	5

Les résultats présentés dans le tableau 22 montrent que les rendements moyens obtenus sont très variables d'une molécule à une autre. En effet, les rendements varient entre 24 et 88% pour le niveau de dopage bas et entre 17 et 89% pour le niveau de dopage haut.

Dans tous les cas, les moins bonnes performances sont obtenues pour PROP et BET (17 à 29%, respectivement) qui correspondent aux bêtabloquants les plus hydrophobes. Les rendements obtenus pour ATE, le bêtabloquant le plus hydrophile, sont également assez bas (34% en moyenne).

Par ailleurs, une bonne répétabilité est généralement observée. Les CV varient entre 3 et 26% pour le niveau de dopage haut. Pour le niveau de dopage bas, les CV sont compris entre 3 et 30%, sauf PROP qui présente un CV de 47%. Cependant, cette mauvaise performance est liée à la concentration élevée de PROP initialement présente dans la boue testée (concentration moyenne de 260 ng/g).

Comme pour l'analyse des estrogènes dans les boues, la sensibilité est déterminée pour chaque couple échantillon/composé (cf. partie 2.5.1). Globalement, les LQ varient entre 0,1 et 1 ng/g pour tous les composés, sauf MET, OXP et PROP (LQ comprise entre 1 et 4 ng/g).

Pour conclure, dans la mesure où une bonne répétabilité a été observée, cette méthode a été appliquée pour l'analyse des échantillons issus du projet AMPERES. L'utilisation d'ajouts dosés pour chaque échantillon de boue a permis de compenser les rendements de dopage parfois bas observés (résultats finaux corrigés par les rendements). Ces premiers résultats, ne représentent qu'un début de la validation de méthode ; les performances de la méthode seront effectivement caractérisées plus finement (reproductibilité, spécificité, etc.) dans des travaux ultérieurs.

3.2. Résultats dans les stations d'épuration

Un des objectifs de ce travail de thèse consiste à améliorer nos connaissances quant au comportement des estrogènes et des bêtabloquants dans les stations d'épuration. Ces molécules ont donc tout d'abord été analysées dans les phases dissoutes d'échantillons prélevés en différents points du traitement dans plusieurs stations d'épuration mettant en œuvre des procédés de traitement variés (cf. chapitre 3.2.1). Les boues générées par ces stations d'épuration ont ensuite été analysées afin d'évaluer la quantité d'estrogènes et de bêtabloquants adsorbées dessus (cf. chapitre 3.2.2). Enfin, un bilan global de l'élimination de ces molécules au cours du traitement, tenant compte des phases dissoutes, des phases particulaires et des boues a été réalisé sur 2 sites (cf. chapitre 3.2.3).

3.2.1 Résultats obtenus dans la phase dissoute de STEP

Afin d'évaluer les efficacités d'élimination de différents procédés épuratoires, plusieurs stations d'épuration ont été échantillonnées. Pour répondre à cet objectif, les molécules cibles (5 estrogènes et 10 bêtabloquants) ont été analysées dans les phases dissoutes des échantillons prélevés à différentes étapes du traitement. Bien que ne tenant pas compte des molécules adsorbées sur la phase particulaire, cette première étude permet déjà de comparer les efficacités des différents traitements et d'étudier l'influence de certains paramètres opératoires sur l'élimination des estrogènes et des bêtabloquants. Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise en janvier 2010 au journal ***Science of the total environment****.*

De nombreuses études se focalisant sur l'occurrence et l'élimination de micropolluants émergents dans les STEP ont déjà été publiées. Parmi les molécules les plus étudiées, on retrouve les hormones estrogéniques (Miege *et al.*, 2009b). Cependant, les informations récoltées ont été obtenues en majorité pour des procédés de type boue activée (BA), sur des sites divers et avec des méthodes analytiques différentes, rendant ainsi la comparaison des résultats difficile. Les bêtabloquants quant à eux sont plus rarement étudiés (Miege *et al.*,

2009b). Des questionnements subsistent donc quant à l'efficacité relative des différents procédés épuratoires sur l'élimination des estrogènes et des bêtabloquants.

L'objectif de ce travail était d'évaluer le comportement de 5 hormones estrogéniques et de 10 bêtabloquants dans les phases dissoutes de STEP mettant en œuvre des procédés épuratoire variés. Afin d'obtenir des résultats comparables, tous les échantillons ont été prélevés de la même façon et analysés avec les mêmes méthodes d'analyse. Pour chaque STEP étudiée, des échantillons moyens 24h asservis au débit ont été prélevés sur 2 ou 3 jours de semaine consécutifs (cf. chapitre 2.2.1). Une attention particulière a été portée à la fiabilité des données : l'innocuité du système de prélèvement a été vérifiée (absence de pertes de molécules par adsorption et de contamination par désorption), les échantillons ont été extraits dans les 24h qui suivent le prélèvement pour palier tout risque de dégradation, des traceurs deutérés pour les hormones et des ajouts dosés pour les bêtabloquants ont été utilisés pour corriger les effets matrice et des méthodes d'analyse validées ont été utilisées.

Pour les hormones estrogéniques, les formes libres mais également les formes conjuguées (analyse des hormones totales après déconjugaison enzymatique) ont été analysées. Dans les influents comme dans les effluents, on observe ainsi une large prédominance des formes libres. En effet, dans les influents, en moyenne 80 à 90 % des estrogènes quantifiés (E1, αE2, βE2 et E3) se trouvent sous forme libre. Dans les effluents, la même tendance est observée avec cependant une plus grande variabilité des résultats d'une STEP à une autre (CV variant de 13 à 54% dans les effluents contre 11 à 21% dans les influents). Dans la mesure où la déconjugaison des estrogènes peut se produire lors du traitement, il est donc important de prendre en considération les concentrations en hormones totales (formes libres et conjuguées) pour évaluer l'efficacité de traitement des procédés épuratoires.

Dans la mesure où les stations d'épuration ont été échantillonnées sur 2 ou 3 jours consécutifs, la variabilité journalière a pu être étudiée. Pour les estrogènes, comme pour les bêtabloquants, une faible variabilité des concentrations mesurées dans les échantillons d'eau a été notée. Ce résultat légitime le calcul de concentrations moyennes sur les différents jours de prélèvement.

En terme d'occurrence, 3 des 5 estrogènes analysés (E1, βE2 et E3) ont été quantifiés dans tous les échantillons d'influent. E3 est l'estrogène quantifié aux plus fortes concentrations (29 à 676 ng/L) dans les influents, devant E1 (22 à 181 ng/L), βE2 (3,5 à 50 ng/L) et αE2 (0,8 à 10,3 ng/L) ; l'hormone de synthèse EE2 n'est jamais quantifiée. Dans les effluents, E1 est l'estrogène le plus fréquemment quantifié (plus de 80 % des échantillons) ;

on le mesure à des concentrations variant entre 0,1 et 65 ng/L. E3 et EE2 sont quantifiés dans seulement 10 % des échantillons d'effluent (à des concentrations comprises entre 5 et 60 ng/L et entre 1,6 et 4,6 ng/L, respectivement). Enfin, les 2 isomères de E2 sont quantifiés dans 6 à 16 % des effluents à des concentrations allant de 1,1 à 11,3 ng/L.

Parmi les 10 bêtabloquants analysés, on distingue 3 groupes de composés. Le premier groupe est constitué de ACE, ATE et SOT ; ces molécules sont quantifiées dans tous les influents à des concentrations pouvant atteindre 9,8 µg/L. Le second groupe est constitué de BIS, MET, NAD et PROP ; ces molécules sont quantifiées dans la plupart des influents mais à des concentrations inférieures à celles du premier groupe (jusqu'à 980 ng/L). Le troisième groupe est constitué de BET, OXP et TIM, des composés rarement quantifiés et souvent non détectés. Pour les bêtabloquants, qui contrairement aux hormones sont des molécules exclusivement exogènes, une bonne adéquation est observée entre les données de consommation de ces molécules en France et les concentrations retrouvées dans les influents. Les trois groupes de molécules mis en évidence dans les influents sont toujours présents dans les effluents.

Pour les estrogènes comme pour la majorité des bêtabloquants, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les concentrations mesurées dans les influents provenant de zones urbaines et ceux provenant de zones rurales. On peut cependant noter qu'on mesure plus de TIM dans les influents provenant de zones rurales que dans ceux provenant de zones urbaines et que OXP est quantifié dans plus de 60 % des influents de zones urbaines et dans seulement 1 influent de zone rurale.

Les abattements globaux des 14 STEP ont ensuite été évalués (figure 11). Pour toutes les STEP étudiées, les estrogènes sont bien éliminés de la phase dissoute, avec des abattements moyens supérieurs à 90 % (pas de calculs pour αE2 et EE2 car ces molécules ne sont pas quantifiées ou à de faibles concentrations, i.e. inférieures à 10 ng/L). Pour les bêtabloquants, des comportements différents sont observés en fonction des molécules : ACE et NAD semblent bien éliminés (abattements moyens supérieurs à 80 %) alors que SOT et PROP ne sont pas impactés par les traitements épuratoires (abattements moyens inférieurs à 20 %). ATE, BET, BIS et MET sont partiellement éliminés avec des abattements moyens compris entre 40 et 70 %. Par ailleurs, alors que sur les 14 STEP, peu de différences sont observées pour les abattements des estrogènes (CV inférieurs à 20 %), des différences importantes (différence de 38 à 74 % entre le 1^{er} et le $3^{ème}$ quartile) sont observées pour les bêtabloquants (sauf ACE et NAD). Cette remarque suggère pour les bêtabloquants un effet du type de procédé sur l'efficacité d'élimination.

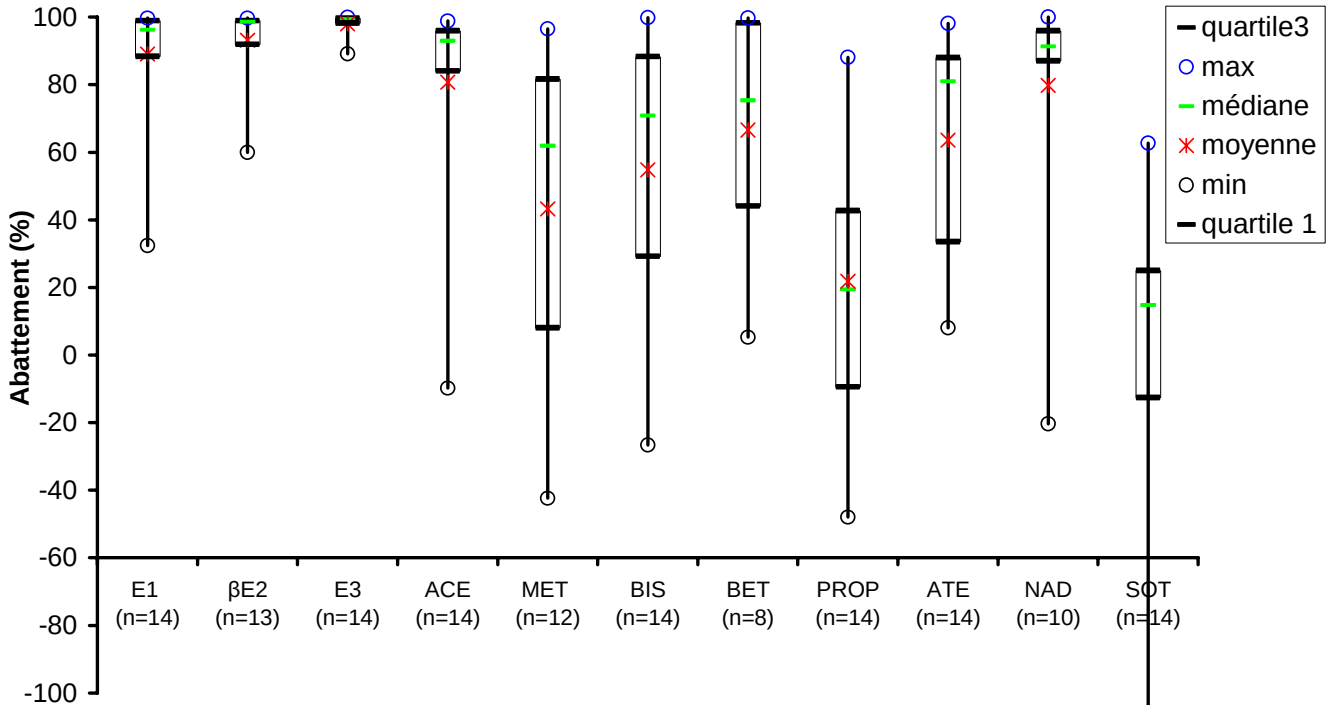


Figure 11 : Abattement global (%) des estrogènes et des bêtabloquants pour les 14 STEP étudiées (boîte à moustaches: valeurs minimum et maximum (o), médiane (-), moyenne (*), 1er et 3ème quartile); n : nombre de données quantifiées[1].

Afin d'appréhender plus finement le comportement des composés étudiés dans les STEP, plusieurs comparaisons ont été réalisées.

L'efficacité du traitement primaire sur l'élimination des estrogènes et des bêtabloquants a tout d'abord été étudiée. On observe que pour les estrogènes, un traitement primaire classique n'a pas d'effet (abattements négatifs), alors qu'un traitement primaire avec addition de chlorure ferrique ou de chaux permet d'atteindre jusqu'à 36 % d'abattement (abattements de 0-12%, 16-29% et 27-36%, pour E1, E3 et βE2, respectivement). Au contraire, pour les bêtabloquants, l'addition d'un traitement physico-chimique ne semble pas avoir d'impact sur l'élimination des molécules.

Pour les procédés de type BA, les effets de la température et de la charge massique sur l'élimination des molécules ont été étudiés. L'impact de la température du bassin de BA est seulement significatif pour ATE : abattements moyens de 41 et 84% à « 10°C » et « 20°C »,

[1] Pas de calculs d'abattement pour αE2, EE2, OXP et TIM qui ne sont pas quantifiés ou à de faibles concentrations (< 10 ng/L).

respectivement. Par ailleurs, pour les estrogènes comme pour les bêtabloquants, le procédé de type BA moyenne charge présente des abattements inférieurs à ceux obtenus avec une BA faible charge. L'ajout d'un biofiltre nitrifiant en sortie de BA moyenne charge permet pour les estrogènes, BET, NAD, PROP et SOT d'obtenir des performances similaires à celles obtenues avec une BA faible charge. En revanche, cette combinaison est moins performante que la BA faible charge seule pour l'élimination de ACE, MET, BIS et ATE.

La comparaison des performances obtenues pour les procédés biologiques à culture libre et à culture fixée met en évidence qu'à « 10°C » des performances similaires sont obtenues pour les estrogènes, alors que la BA faible charge (culture libre) offre de meilleures performances vis-à-vis de l'élimination des bêtabloquants. À « 20°C », pour les estrogènes comme pour les bêtabloquants, le bioréacteur à membranes (culture libre) donne des résultats équivalents, voire meilleurs, que ceux obtenus avec la BA faible charge. Cependant, les différences observées ne sont pas significatives, et il n'est pas possible de mettre en évidence des efficacités différentes pour les procédés à cultures libres et fixées.

Enfin, l'impact de 9 traitements tertiaires (1 lagune de finition, 3 décanteurs rapide, 1 filtration sur sable, 1 filtration sur charbon actif, 1 filtration silex, 1 microfiltration, 1 ozone, 1 osmose inverse et 1 UV) a été étudié pour les bêtabloquants. Des rendements d'élimination inférieurs à 30% ont été obtenus pour tous les bêtabloquants avec les traitements par UV, la décantation rapide, les filtrations sur sable et silex et la microfiltration. Au contraire, des rendements supérieurs à 80% sont obtenus pour tous les bêtabloquants avec l'ozonation, l'osmose inverse et la filtration sur charbon actif. Enfin, la lagune de finition présente une efficacité variable en fonction des molécules.

Pour conclure, cette étude a permis d'évaluer l'influence de différents paramètres opératoires sur l'élimination des estrogènes et des bêtabloquants. D'une manière générale, une bonne élimination des estrogènes par le traitement biologique a ainsi été montrée alors que des comportements très variables ont été mis en évidence pour les bêtabloquants. Cependant, seule la phase dissoute a été prise en compte dans ce travail. Néanmoins, compte tenu du caractère moyennement hydrophobe des molécules étudiées, la proportion d'estrogènes et de bêtabloquants adsorbée sur les matières en suspension peut être évaluée à moins de 30 % dans les influents et moins de 10 % dans les effluents. Ainsi, la prise en compte de la phase particulaire conduirait à une légère augmentation des valeurs d'abattements calculées sans remettre en cause les conclusions de cette étude basée sur les phases dissoutes uniquement. Cette hypothèse sera vérifiée par la suite. Effectivement, après une présentation des concentrations obtenues dans les boues issues de ces STEP (chapitre 3.2.2), un bilan complet

prenant en compte tous les compartiments (phases dissoutes, phases particulaires et boues) sera réalisé sur 2 STEP.

Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants.

V. Gabet-Giraud[1], C. Miège[1], J.M. Choubert[1], S. Martin Ruel[2], M. Coquery[1]

[1]**Cemagref**, UR MALY, 3 bis quai Chauveau – CP220, F-69336 Lyon Cedex 09, France
[2] **Cirsee**, Suez Environnement, 38 rue du président Wilson, F-78230 Le Pecq, France

Abstract

This study aims at evaluating the occurrence and the treatment efficiency of five estrogenic hormones and ten beta blockers in wastewater treatment plants (WWTP). The use of consistent sampling procedures, analytical techniques and data processing enabled to achieve an accurate comparison of the performances of the different treatment processes. The target molecules were measured at different treatment stages (primary, secondary and tertiary stages).

First, the occurrence of target molecules was evaluated in fourteen rural and urban WWTP located in France. Free and total estrogens were analyzed showing that more than 84% of estrogens in the dissolved phase of influent samples are in the free form. In effluent samples, comparable mean values but higher variation are underlined (RSD from 13 to 54% depending on the estrogen, compared to 11-21% for influents). Most of the target molecules are quantified in 30 influent and 31 effluent samples. Similar occurrence frequencies are obtained for influents from rural (6 WWTP) and urban areas (8 WWTP), except for betaxolol which is quantified in urban wastewaters but never quantified in rural wastewaters.

Removal efficiencies of 8 biological treatments types were studied: suspended growth biomass (activated sludge process) and various attached growth systems (biofilter, rotating biological contactor, reed-bed filter, trickling filter). Biological treatments are efficient to remove estrogens from the dissolved phase, with removal rate around 90%. For beta blockers, acebutolol and nadolol are efficiently removed (mean removal rate of 80%), whereas sotalol and propranolol are hardly impacted by biological treatments (removal rate below 20%).

Despite the low hydraulic retention time of attached growth biomass systems compared to suspended growth biomass systems, similar removal efficiencies are obtained with both systems.

Finally, 9 tertiary treatment processes were evaluated, mainly at full scale plants. Ozonation, reverse osmosis and activated carbon filtration prove a high removal efficiency for beta blockers (above 80%). On the contrary, high speed chemical settler, sand filtration, silex

filtration, microfiltration and UV present generally removal rates below 30% for all beta blockers. The polishing pond studied presents variable removal performances depending on the molecules (up to 75% for propranolol). The role of the hydraulic retention time on the removal efficiencies is confirmed.

Keyword : estrogens, beta blockers, municipal wastewater, removal rate, biological and physical treatment

Abbreviations: ACE (acebutolol), ATE (atenolol), B (biological filter), BET (betaxolol), BIS (bisoprolol), C (carbon), E1 (estrone), βE2 (17β-estradiol), αE2 (17α-estradiol), E3 (estriol), EE2 (ethynylestradiol), F/M (food to microorganism ratio), HF (horizontal filter), Kd (solid/water distribution coefficient), Kow (octanol/water partition coefficient), LAS (low loaded activated sludge), LC-MS/MS (liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry), LOQ (limit of quantification), MAS (medium loaded activated sludge), MBR (membrane bioreactor), MET (metoprolol), MRM (Multiple Reaction Monitoring), N (nitrogen), NAD (nadolol), OXP (oxprenolol), PE (person equivalent), PROP (propranolol), RBC (Rotating Biodisc Contactor), RSD (relative standard deviation), SOT (sotalol), SPE (solid phase extraction), TIM (timolol), TSS (total suspended solid), VF (vertical filter), WWTP (wastewater treatment plant).

1. Introduction

Estrogenic hormones (estrogens) and beta blockers are excreted by humans and reach the aquatic environment, mainly via wastewater treatment plants (WWTP). The presence of such micropollutants in surface waters brought up various questions concerning their degradation, their potential toxic effects to aquatic organisms and their accumulation in the food chain. Deleterious effects on fish development and reproduction were already noticed for instance in English rivers and attributed to endocrine disruptors molecules (Jobling et al., 1998). Few studies focused on the effects of the presence of beta blockers in aquatic environment (Triebskorn et al., 2007; Winter et al., 2008; Christensen et al., 2009). But as beta receptors were found in fish tissues (Haider and Baqri, 2000), the question on the presence of beta blockers in waters is justified in order to anticipate the impact on these organisms. As WWTP are recognized as the main conveyor of pharmaceuticals in the aquatic environment (Ternes and Joss, 2006), it is important to evaluate the estrogens and beta blockers removal rates of the different wastewater treatment processes. In fact, WWTP were not originally designed for trace organic chemicals removal; they are able to partly remove

some molecules (Janex-Habibi et al., 2009), but they are not necessarily efficient to remove all pharmaceuticals from wastewaters.

A recent study reviewed research papers on pharmaceuticals and personal care products in WWTP and built a database on concentrations and removal rates; it showed that existing data mainly focus on removal rate for the activated sludge process (Miege et al., 2009a). Miege et al. (2009a) reported that hormones, including estrogens, were the most studied molecules in sewage water (30% of the reviewed data), whereas beta blockers represent only 2.8% of the data. Authors also underlined the difficulty to assess the reliability of data in the scientific papers. Indeed, most of the studies are carried out with 24h flow proportional composite samples (for representativeness of sampling), but other information like the WWTP types, the operating conditions, the analytical procedures and performances are not systematically documented. The comparison of processes removal rate with data collected in literature is proved to be difficult, as studies were lead in different countries using various sampling and analytical methods. For these reasons data collected and treated with a harmonized procedure are necessary to achieve a reliable comparison study of the performances of the most used treatment processes.

The present work proposes a study of estrogens and beta blockers concentrations in WWTP and a comparison of removal rates of different treatment processes, in particular for the different kinds of attached growth biomass systems. The use of consistent and robust sampling procedures, analytical techniques and data processing enabled to achieve an accurate comparison of the performances of the different treatment processes. The molecules were selected for their toxicity (estrogens) and their high consumption level in France (beta blockers). Moreover, with various physico-chemical properties (for example a wide range of log Kow values - between 0 and 3-), selected beta blockers enabled to point out different behaviour in the WWTP. Results are presented for common processes such as activated sludge, as well as less documented ones, such as attached growth biomass processes (i.e. submerged biofilters, trickling filters and reed-bed filters) and several advanced tertiary treatments (i.e. reverse osmosis, ozonation, activated carbon, etc.). Five estrogens (the free and the total fractions) and ten beta blockers were analysed. Free/conjugated estrogens partition, occurrence of these molecules in raw and treated wastewater and removal rates associated to primary, secondary and tertiary processes have been determined. In this aim, fourteen full-scale WWTP (four primary and secondary stages of treatment) were investigated. Additionally, seven other facilities including one pilot (tertiary stages) were studied. This study is based on 24h flow proportional composite samples, sampled on 2 or 3

consecutive days in order to assess the inter-day concentration variability. The different WWTP are properly described and a particular care was taken on the sampling procedures that condition the reliability of the results. The sensitive and validated analytical methods are precisely reported or referenced.

2. Materials and methods

2.1 Sample collection

Specific investigations were performed on 14 French WWTP, receiving wastewaters released in urban or rural areas. The different biological treatment types chosen are representative of the current practice in France for nitrogen removal, since the discharge objectives stated by the French regulation (MEDAD, 2007). The design capacities of treatment of these facilities are in the range of 100 to 950,000 person equivalent (PE). The 14 WWTP and treatment stages, the characteristics and operating conditions are detailed in table 1:

- Suspended growth biomass systems consist of 5 low loading-rate activated sludge (CA1, CA2, SE1, SE3, SE4), 1 activated sludge coupled with a high speed settler (SE2), 1 medium loading-rate activated sludge (CA3), 1 activated sludge followed by ultrafiltration membrane bioreactor (SE5);
- Attached growth biomass systems consist of 2 submerged biofilters (CA3, CA5, SE6), 1 rotating biological contactor (CA4) coupled with a polishing pond, 1 reed-bed filter (vertical and horizontal) configuration (CA6), 1 trickling filter (SE9) coupled with a vertical reed-bed filter and 1 waste stabilisation pond coupled with a vertical reed-bed filter (CA7) ;

The tertiary treatments studied (7 WWTP) include the following treatment stages: polishing pond (CA4), high speed settler (SE3, CA-PA2, SE-PA1), sand filtration and ozonation (CA-PA1), reverse osmosis (SE-PA1-pilot, SE-PA2), microfiltration (SE-PA2), UV (SE-PA1), silex filtration (SE-PA1-pilot), activated carbon filtration (CA-PA2).

Table 1: Process and operational characteristics of the selected WWTPs (1.A - Primary and secondary treatment stages; 1.B – Tertiary stages)

1.A - PRIMARY AND SECONDARY PROCESS	WWTP code	Design plant capacity (PE)	Measured flow rate (m^3/d)	T (°C)	Effluent concentration (daily average flow proportional)				HRT	SRT (d)
					BOD_5 ($gO_2.m^{-3}$)	NH_4-N ($gN.m^{-3}$)	NO_3-N ($gN.m^{-3}$)	P_{tot} ($gP.m^{-3}$)		
Activated sludge (C + N)	CA1	2 900	637	9	5	0.3	6	2	20-30 h	15-25
Activated sludge (C + N + P)	SE1	36 000	4 200	15	< 3	1	3	< 0.5	20-30 h	15-25
Activated sludge (C + N)	CA2	13 000	910	13	5	6	0.7	4	20-30 h	15-25
Primary settling tank + activated sludge (C + N + P)	SE2	250 000	28 000	20	3	1	14	1	20-30h	15-25
Primary settling tank + activated sludge (C) + biofilter (N)	CA3	950 000	306 870	20	8	5	23	5	AS: 5-10 h BF: 0.4-0.8 h	AS: 4-5 BF: NA
Activated sludge (C + N)	SE3	50 000	6 100	23	3	0.5	3	0.8	20-30 h	15-25
Activated sludge (C + N)	SE4	110 000	14 500	20	17	2	1	3	20-30 h	15-25
Membrane bioreactor (C + N)	SE5	24 000	1 500	24	9	0.5	31	0.5	20-30 h	15-25
Primary settling tank + biofilter (C + N)	SE6	26 000	3 950	21	4	3	39	0.5	1-2 h	NA
Rotating biological contactor + reed-bed filter (C + N)	CA4	1 000	133	10	4	0.5	27	6	RBC: 4-9 h RBC + VRB: 5-10 h	NA NA
Chemical settling tank + biofilter (C)	CA5	88 000	7 150	11	14	25	13	0.7	0.4-0.8 h	NA
Vertical reed-bed filter + horizontal reed-bed filter (C + N)	CA6	100	15	10	4	11	17	3	VRB: 5-10 h VRB + HRB: 40-50 h	NA NA
Trickling filter (TF) + reed-bed filter (C + N)	SE9	1 000	135	20	9	8	5	5	TF: 0.4-0.8 h	NA
Waste stabilisation ponds + vertical reed-bed filter (C + N)	CA7	300	35	20	15	0.9	39	4	70-90 d	NA

1.B - TERTIARY TREATMENT STAGE	WWTP code	Design plant capacity (PE)	Measured flow rate (m^3/d)	T (°C)	Effluent concentration (daily average flow proportional)				Operating conditions
					BOD_5 ($gO_2.m^{-3}$)	NH_4-N ($gN.m^{-3}$)	NO_3-N ($gN.m^{-3}$)	P_{tot} ($gP.m^{-3}$)	
High speed chemical settler	SE3	50 000	6 100	23	3	0.5	3	0.8	Dosage: 30 mg $FeCl_3$ /l, 0.8 mg polyelectrolite/l Lamellar velocity = 200 m/h ; HRT= 0.4 h
Polishing pond	CA4	1 000	133	10	4	0.5	27	6	HRT= 15-20 d
Sand filter + ozonation	CA-PA1	97 000	4 200	20	3.4	1.8	2.4	1.6	Sand filter velocity = 3.6 m/h Ozone dosage = 10 g O_3/m^3; contact time = 40 min
High speed chemical settler + activated carbon filter	CA-PA2	470 000	79 800	20	3	0.7	0.3	0.1	Dosage: 70 mg $FeCl_3$/l, 1 mg polyelectrolite/l, 1 g sand /l; Lamellar velocity = 6 m/h ; Filter velocity = 0.33 m/h; contact time = 2.1 h
High speed chemical settler + sand filter + UV	SE-PA1	300 000	28 600	20	-	-	-	-	Dosage: 30 mg $Al_2(SO_4)_3$ /l; 0.5 mg polyelectrolite/l, Lamellar velocity = 3.2 m/h; Sand filter = 20 m/h UV dose = 30 mJ/cm^2 (problem in the plant)
Silex fiter + ultrafiltration (UF) + reverse osmosis (RO)	SE-PA1 (pilot)	500	2.3	20	3	0.5	1.2	0.5	Sand filter velocity : 7.2 m/h ; UF : 50 $l/m^2/h$, 2 bar RO : 23 $l/m^2/h$, 8 bars
Sand filter + macrofiltration (UF) + reverse osmosis (RO)	SE-PA2	25 000	1040	20	3	1.4	0.3	0.5	Sand filter velocity : 3.5 m/h; MF : 80 $l/m^2/h$, 1.6 bar RO : 20 $l/m^2/h$, 21 bars

PE: population equivalent
T: temperature
NA: not applicable

HRT: hydraulic retention time
SRT: sludge retention time

AS: activated sludge
BF: biofilter
RBC: rotating biological contactor

VRB: vertical reed-bed filter
HRB: horizontal reed-bed filter
TF: trickling filter

Specific material (teflon tubing and glass containers) was used to limit the contamination when sampling or conditioning the raw or treated water into the containers sent to the laboratory. All material used on full-scale plants has undergone a thorough cleaning procedure (rinsed with water and detergent, acidified water, then acetone and finally with collected water). The absence of adsorption and contamination of the sampling material was regularly verified (i.e., field blank). To prevent from any artificial dilution of wastewater, sampling campaigns were run only during dry weather. Moreover, to obtain results as comparable as possible, sampling was not performed in summer. Automatic 24h composite samples were processed for 2 or 3 consecutive weekdays for all influents and effluents and at intermediate points when necessary. Influent samples were collected downstream of grit removal. Specific refrigerated (4°C) automatic samplers (Buhler 5010) with 24 glass containers (1 container for each hour) were used for the collection of composite samples. Considering the flow chart recorded with a flowmeter, hourly inflow rates were calculated. The daily average composite sample was then composed each day considering the weight of the hourly inflow rate. An ISCO Bubble flowmeter was used when a Venturi canal was available at the facility. A water level recording was used for tank feeding systems.

Wastewaters samples were carried to the laboratory within 6 to 24 hours at 4°C. Immediately after reception, dissolved and particulate phases were separated in order to preserve phase partition.

2.2 Analytical method

Wastewater samples were filtered through pyrolyzed (450°C, 1h) glass fiber filters less than 24h after sampling.

The detailed analytical method for the 5 estrogens (estrone -E1-, 17β-estradiol –βE2-, 17α-estradiol – αE2-, estriol –E3- and ethynylestradiol –EE2) is described elsewhere (Miege et al., 2009b). Briefly, aliquots of filtrate spiked with deuterated estrogens (E1D4, 17β-E2D2, 1EE2-D4 and E3D2) were extracted by solid phase extraction (SPE) on Oasis HLB® cartridges (elution with a mixture ethyl acetate / methanol (70/30 - v/v)) and purified on Florisil cartridges (elution with a mixture acetone / heptane 75/25 - v/v). For the analysis of total estrogens (i.e. after hydrolysis of conjugated forms), an enzymatic cleavage was performed using β-glucuronidase isolated from *Helix Pomatia* prior to extraction. Extracts were finally evaporated to dryness and reconstituted in a solution of E2 acetate, used as internal standard, at 40 µg/L in a mixture of water / acetonitrile (60/40 - v/v).

Ten beta blockers were analysed: acebutolol (ACE), atenolol (ATE), betaxolol (BET), bisoprolol (BIS), metoprolol (MET), nadolol (NAD), oxprenolol (OXP), propranolol (PROP), sotalol (SOT) and timolol (TIM). The filtrate (100 mL) was acidified with 0.1% formic acid (v/v) and spiked with a solution containing 10 beta blockers and 3 deuterated beta blockers in acetone at different concentrations between 100 and 2000 ng/L, depending on the molecule and the nature of the sample. Aliquots of acidified filtrate were extracted by SPE on Oasis MCX® cartridges (elution with a mixture methanol/ammonium hydroxide 95/5 - v/v) and then evaporated to dryness and reconstituted in a solution of metoprolol impurity A, used as internal standard, at 50 µg/L in water / acetonitrile 85/15 - v/v.

Analysis was performed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and acquisition was achieved in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. As recommended in the European Commission Decision 2002/657/EC (EC, 2002), the MS-MS conditions included the use of 2 ionization transitions for each compound (except for the deuterated surrogates), one for the quantification (QT) and one for the identity confirmation (CT).

Final estrogens concentrations were calculated using recoveries obtained for the internal deuterated surrogates (αE2 was corrected by 17β-E2D2). For beta blockers, final concentrations were calculated using recoveries obtained for the non deuterated beta blockers in spiked samples: concentrations were corrected only if the recoveries were below 80% or over 120%..

2.3 Quality assurance from sampling to analysis

To ensure the reliability of the results, several quality controls were applied from sampling to analysis step.

Field-blank procedures were regularly carried out (7 times over the project period) to quantify the possible contamination of the sampling/conditioning chain. We tested the absence of adsorption by analyzing wastewater before and after passing through the sampling chain (5 times). Then, the analysis of drinking mineral Evian water before and after passing through the sampling chain enabled to point out the absence of contamination by desorption (7 times). Among the different wastewater samples analyzed, no adsorption was detected: for estrogens, differences of concentrations for samples analyzed before and after passing the sampling chain range between 0 and 15%; for beta blockers, the variations range between 0 and 30% for high levels concentrations and between 0 and 50% for low concentrations (i.e.

below 10 ng/L). These values range within the analytical uncertainty of our method, showing the absence of adsorption in the sampling chain. Estrogens and beta blockers were generally not quantified in drinking mineral water before as well as after passing through the sampling chain. Only some molecules were detected at very low concentration (ng/L) in a few cases at the beginning of our experimentations but these measurements were either attributed to memory effects or contamination during the sample preparation and were negligible in comparison to sample concentration.

As estrogens are subject to degradation in wastewater samples (even stored at 4°C) from the first day (Miege et al., 2009b), samples were filtered and extracted as soon as they arrived in the laboratory. For beta blockers, stability was tested in acidified filtered samples at 4°C for up to 6 days; filtered samples were extracted within 3 days following their reception.

Analytical blank samples that followed the whole method preparation were regularly analyzed and proved the absence of contamination for estrogens as well as for beta blockers. Standards solutions prepared independently from the standards used for calibration curves, were regularly analyzed by LC-MS/MS (every 6 injections) to verify the absence of deviation during the analysis and the accuracy of the calibration curves. Blank samples were also injected every 3 samples to avoid any risk of memory effects.

For estrogens, results were systematically corrected by the recoveries of deuterated molecules, which were proved to behave as non deuterated molecules (Miege et al., 2009b). For the same molecule, deuterated recoveries can vary from one sample to another showing the importance of matrix effects, particularly for effluents. For beta blockers, as only 3 deuterated molecules were available, samples were systematically spiked with the 10 target molecules. In order to verify the coherence of results and the absence of interferences, samples were analyzed without dilution and also diluted (5 and 10 times).

Analytical methods were validated according to French standard NF XPT 90-210 (AFNOR, 1999). Linearity, limit of quantification, recovery, repeatability, reproducibility and specificity were studied. In our study, limit of quantification (LOQ) were evaluated for each molecule in each matrix. Indeed, in complex matrices such as wastewaters, interferences can occur and LOQ can vary from one sample to another. The LOQ were calculated from the first calibration point confirmed (with the 2 ionization transitions) and the spiked recoveries (for deuterated surrogates for estrogens and non deuterated molecules for beta blockers). LOQ ranged from 0.1 to 2.7 ng/L for estrogens and from 0.5 to 14.5 ng/L for beta blockers, depending on the molecule and the matrix. Repeatability was checked by analyzing triplicates samples. The relative standard deviation (RSD) ranged from 2 to 20% for estrogens and from

2 to 32% for beta blockers. Only for OXP, which was quantified at LOQ level, RSD reached up to 55%.

2.4 Strategies for data processing

2.4.1 Comparison of the treatment processes

Primary settling tanks without and with chemical precipitation were compared. Then biological processes were studied. Firstly, carbon removal processes were compared: medium loading rate activated sludge process (ASP) versus submerged biological filter. Secondly, nitrogen removal processes were compared: ASP with F/M ratio < 0.1 $kgBOD_5.(kgMLVSS.d)^{-1}$, submerged biological filter for nitrification, rotating biological contactor, membrane bioreactor and reed-bed filters. Finally, the efficiency of additional tertiary treatment stages was studied: polishing pond, high speed chemical settler, sand filtration, ozonation, reverse osmosis, microfiltration, UV, silex filtration and carbon filtration.

Attached growth biomass systems, for which the hydraulic retention time is low, and suspended growth biomass systems were compared. Also, the combination of medium loaded activated sludge process upgraded with a nitrifying submerged biological filter was compared with low loading rate activated sludge. Our work also aimed at evaluating influence of the temperature in the mixed liquor of the aeration tanks and the mass loading rate F/M ratio on estrogens and beta blockers removal rates for the ASP.

2.4.2 Calculation of removal rates

For each substance and each WWTP, global, primary and secondary mean removal rates were calculated as the average of the daily values (2 to 3 sampling days). The calculation of removal rates was not systematic and the following rules were applied to deal with low concentrations quantified in influent and/or effluents (i.e. below 10 ng/L). Indeed, while analytical uncertainty is evaluated at around 20-30% for high concentrations, it can reach up to 50 or even 100% for concentrations near the LOQ. If the difference between influent and effluent concentrations is in the range of the analytical uncertainty, the interpretation of removal rate should be done with care: for example in case of a removal rate around 20-30% it will be difficult to conclude on the elimination efficiency of the WWTP on the molecules.

When molecules are quantified at low concentrations in influent and effluent samples, removal rates are not calculated; thus, no removal rates are available for αE2, EE2, OXP and TIM. When molecules are quantified in influent with concentrations higher than 10 ng/L, but not in quantified in effluent, removal rates were calculated using the LOQ value for effluent. As we will see, negative removal rates can be obtained in some cases. They can be linked to the analytical uncertainty or explained by desorption of molecules from sludge and suspended particulate matter. Alternatively, some molecules (such as E1) can be produced during the treatment process by the degradation of other molecules (such as βE2 and EE2).

Each removal rate was calculated with the concentrations measured in influent samples. Only removal rates of tertiary treatments were calculated with concentrations measured before and after each specific treatment.

3. Results and discussion

3.1 Partition free/conjugated estrogens

To evaluate the removal of estrogens in WWTP, it is important to consider the total amount of estrogens (free and conjugated molecules). For each sample, estrogens were analyzed before and after deconjugation (hydrolysis step) to quantify both free and total fractions.

In the 30 influent samples (raw waters), for all target estrogens except EE2 (which was not quantified), the proportion of free estrogens varies between 41 and 100% of the total amount of estrogens. Mean values are comparable for all estrogens (84% for αE2, 87% for E1 and 89% for βE2 and E3) and the variability between samples is low (relative standard deviation (RSD) of 11% for E1, 14% for E3, 15% for βE2 and 21% for αE2).

Concerning the 31 effluent samples (treated waters), we expect higher free/total ratios than the values observed for influent samples due to the deconjugation occurring in WWTP (Ternes et al., 1999). Moreover, some authors reported the presence of free estrogens only in effluent samples (Labadie and Budzinski, 2005). However, we observe comparable results for the partition of free/total estrogens in treated and raw wastewaters. For E1, free forms in treated waters represent from 35 to 100% of the total amount of E1 (mean value 79%, RSD 21%). For the other estrogens, mean proportions range from 57% for αE2 to 67% for E3, 74% for βE2 and 93% for EE2. The variability observed in treated water is higher than in raw

water (RSD between 13% for EE2 to 23% for E3, 36% for βE2 and 54% for αE2). In the literature, many studies reported concentrations of free estrogens in WWTP, but only few focused on the partition between free and conjugated forms. The comparison of partition results obtained by the different authors is difficult due to the application of different methodologies: some authors focussed on the analyses of selected conjugated and free estrogens (D'Ascenzo et al., 2003; Isobe et al., 2003), while others analyzed free estrogens and the total amount of estrogens after a hydrolysis step (Belfroid et al., 1999; Adler et al., 2001; Mouatassim-Souali et al., 2003; Labadie and Budzinski, 2005). Nevertheless, a recent French study carried out on one WWTP (Muller et al., 2008) reported comparable free estrogens proportions as in our study for E1 and βE2 in raw water (from 83 to 94% and from 75 to 90%, respectively), while differences were observed for E3 (only 25%). In treated water, Muller *et al* (2008) only quantified free estrogens, except for EE2 for which the free form represented more than 60% of the total amount of EE2. In contrast, in an investigation carried out on six WWTP, conjugated forms of E1 and E3 were quantified in treated waters (D'Ascenzo et al., 2003).

In conclusion, the mean proportion of free estrogens in influent water is evaluated at around 80-90% of the total amount of estrogens. In effluent water, this proportion is in the same range, but it is more variable from one WWTP to another. Considering that hydrolysis of conjugated estrogens can occur in WWTP, the evaluation of removal rates only based on free estrogens can be biased.

3.2 Inter day variability

The inter-day variability of the dissolved concentrations has been studied for estrogens and beta blockers in raw wastewater (29 data), intermediate (21 data) and treated water (30 data) of the 14 WWTP. Relative standard deviation was calculated for samples collected on 2 or 3 consecutive working days.

For free and total estrogens, in all samples the inter-day variability is below 20% for 70% of the data and in all cases between 0 and 64% (mean value of 16%). The inter-day variabilities above 20% are due to low concentrations (below 10 ng/L) associated to a high analytical uncertainty or hydrolysis of conjugated estrogens which can be different from one day to another. The inter-day variability for total estrogens quantified above 10 ng/L is below 35%, except for one WWTP (SE6) for which the inter-day variability is high (e.g., 61% for βE2 in influent, 64% and 39% for βE2 and αE2 respectively, in intermediate water).

For beta blockers inter-day RSD are below 20% in more than 75% of raw and intermediates waters (between 0 and 122% in all cases). For treated water, the inter-day variability is between 0 and 38%. For concentrations above 10 ng/L, only 4 results present an inter-day variability above 40%: ACE, ATE and SOT in the influent samples of three WWTP (SE5, CA6 and CA4) with a RSD between 43-49%, and SOT in the intermediate samples of CA6 with a RSD of 55%.

These results prove in most cases the low inter-day variability of the concentration of these molecules in case of WWTP 24h composite sampling. Thus, we decided to present and discuss next only average concentrations over the different sampling days for each WWTP.

3.3 Occurrence of estrogens in influent and effluent samples

Table 2 presents the concentrations of free and total estrogens measured in the raw wastewaters and treated wastewaters of the 14 WWTP. Three estrogens are quantified in all the influent samples: E1, βE2 and E3. E3 is present at the highest concentrations, between 29 and 676 ng/L. The concentrations of E1 are between 22 and 181 ng/L. βE2 is quantified between 3.5 and 50 ng/L while the α form is only quantified between 0.8 and 10.3 ng/L. The synthetic hormone EE2 is not detected in any influent samples. These results are coherent with those reported in literature except for EE2 (Janex-Habibi et al., 2009; Miege et al., 2009a). Indeed, in her review, Miege *et al* (2009a) reported that EE2 was quantified at ng/L level in 91% and 59% of raw and treated water, respectively. Janex-Habibi *et al* (2009) also quantified EE2 in wastewater at ng/L level, but this molecule which was quantified in all influent samples (n = 18) was only quantified in 22% of the effluent samples (n = 18). However these reported concentrations of EE2 are close to our LOQ (ranging between 1 and 3 ng/L depending on the matrix).

Except for EE2, the analyzed estrogens are released from endogenous and exogenous sources (medicine for hormonal and contraceptive treatment). Thus, concentrations found in raw water can only be compared to the national data consumption for EE2. For EE2 (contraceptive pills), the national data of consumption was about 40 kg/year in France in 2004 (Besse and Garric, 2007). Thus, EE2 is expected to be quantified at the ng/L level (or even less) in influent samples, which is very close to our LOQ for this molecule. Qualitatively, we observe that E3, the estrogen with the highest concentrations in influent, is also the estrogen excreted in biggest amount by humans (Ternes and Joss, 2006).

The comparison of concentrations (mean value for each WWTP) measured in influents from WWTP located in rural areas with those located in urban areas is presented in figure 1a. The mean, maximum and minimum concentrations values are in the same range for all quantified estrogens. No significant differences are noted between concentrations observed in WWTP influent from rural and urban areas.

Contrary to the results obtained in influent samples, E1 is present at highest concentrations in effluent samples and E3 is only quantified in five effluent samples of 3 WWTP. The synthetic hormone EE2 is quantified in three effluent samples between 1.6 and 4.4 ng/L. Both isomers of E2 are quantified in only 13 to 29% of effluent samples, at concentrations between 1.1 and 11.3 ng/L.

The concentrations of estrogens in effluents are below 60 ng/L, whereas their concentrations in influents could reach more than 670 ng/L. This finding confirms the results published before showing that estrogens are well eliminated in WWTP. Several studies pointed out the ability of some bacteria isolated from activated sludge to convert these molecules (Vader et al., 2000; Shi et al., 2004; Yoshimoto et al., 2004; Ren et al., 2007). The relatively high concentration of E1 in treated effluent can be caused by the transformation of βE2 and EE2 into E1 before being further transformed (Ternes et al., 1999; Shi et al., 2004; Czajka and Londry, 2006).

Table 2: Concentrations of estrogens and beta blockers measured in influent and effluent of 14 wastewater treatment plants

	Concentrations in influents						Concentrations in effluents					
	Mean ($ng.L^{-1}$)	RSD (%)	Min ($ng.L^{-1}$)	Max ($ng.L^{-1}$)	n	n>LOQ (%)	Mean ($ng.L^{-1}$)	RSD (%)	Min ($ng.L^{-1}$)	Max ($ng.L^{-1}$)	n	n>LOQ (%)
E1 free	71.2	55	18.8	170	30	100	6.8	166	0.1	58.0	31	94
E1 total	78.8	50	21.7	181	30	100	8.2	158	0.2	64.9	31	97
αE2 free	4.6	50	0.9	9.0	30	67	3.8	97	0.6	9.5	31	16
αE2 total	5.2	54	0.8	10.3	30	67	4.7	82	1.9	10.2	31	13
βE2 free	20.4	48	5.1	37.9	30	97	3.9	92	0.5	11.9	31	26
βE2 total	23.7	54	3.5	49.9	30	100	4.2	74	1.1	11.3	31	29
E3 free	297	58	26.8	658	30	100	24.6	74	5.2	47.7	31	16
E3 total	313	57	28.8	676	30	100	33.5	58	10.6	58.3	31	16
EE2 free	/	/	/	/	30	0	2.6	63	1.6	4.6	31	10
EE2 total	/	/	/	/	30	0	2.7	56	1.6	4.4	31	10
ACE	2693	74	910	9867	30	100	475	173	32.0	3648	31	100
TIM	5.3	78	0.5	12.9	29	41	5.5	40	1.1	10.0	31	58
MET	223	59	4.6	473	30	97	156	89	15.8	435	31	94
OXP	10.3	59	0.9	21.0	30	33	10.5	87	1.1	28.0	31	58
BIS	213	42	44.0	429	30	100	89.7	74	8.4	220	31	97
BET	31.6	76	1.8	108	30	60	12.5	66	5.8	27.9	31	32
PROP	266	59	14.4	703	30	100	203	60	2.6	398	31	100
ATE	2407	61	990	8384	30	100	725	76	35.5	2257	31	100
NAD	167	127	3.4	983	30	73	23.3	124	3.3	98.0	31	58
SOT	1012	79	129	3200	30	100	1032	74	128	3334	31	100

/: not applicable

n: number of samples analyzed

n>LOQ: proportion of quantified data

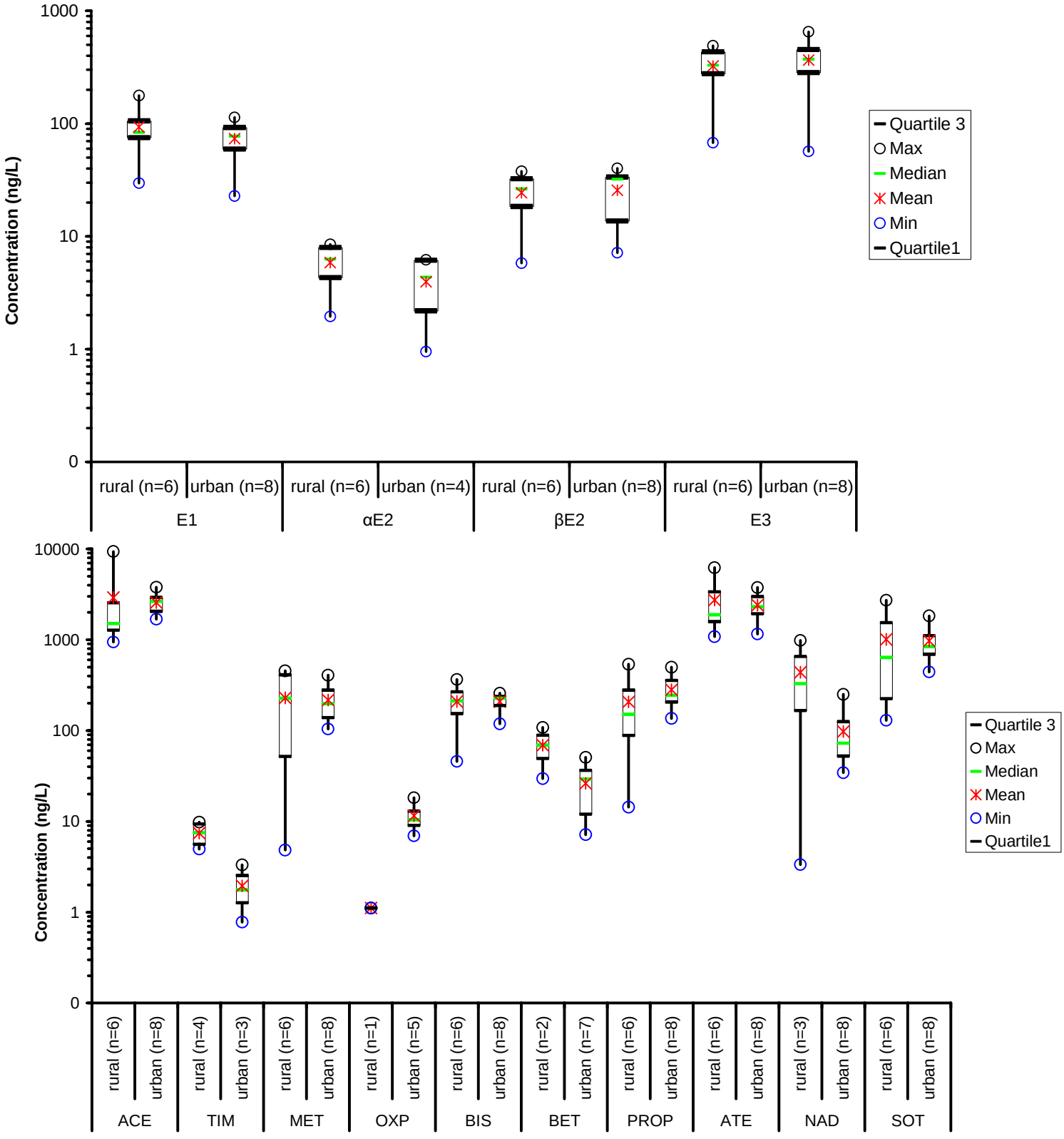


Figure 1: Comparison of target molecules mean concentrations (ng/L) measured in influents from WWTP located in rural and urban areas for estrogens (a) and beta blockers (b) (box-plot diagram Log-scale: minimum and maximum value (o), median (-), mean (*), first and third quartile); n : number of quantified data.

3.4. Occurrence of beta blockers in influent and effluent samples

Three groups of molecules can be distinguished for the ten beta blockers measured in the influent samples (Table 2). The first group is constituted by ACE, ATE and SOT. Those molecules are always quantified in influent wastewater at high concentrations (up to 9.8 µg/L). The second group is composed by BIS, MET, NAD and PROP: these beta blockers are quantified in most of the influent samples, but at concentration levels lower than the first group (up to 980 ng/L). BET, OXP and TIM are in the third group of molecules, which are less frequently quantified (30 to 60% of the samples).

As beta blockers are not endogenous molecules, the concentrations measured in influents can be compared to the consumption data. Unfortunately, French data are only available for ATE, BIS, MET, NAD, OXP and PROP. In 2004, ATE was used in the highest amount followed by PROP, MET, BIS, NAD and OXP (Besse et al., 2008). This classification order is similar to the one observed for raw wastewater concentrations. ATE is present at the highest concentration in influents, followed by PROP, MET, BIS, NAD and OXP (mean concentration of 2407, 266, 223, 213, 167 and 10.3 ng/L, respectively).

Concentrations in influents released in rural and urban areas are plotted in figure 1b. A Student t-test (95% confidence) proved a significant difference in concentrations of TIM in influent between urban and rural areas. Moreover, we can notice that OXP is quantified in more than 60% of the influents from WWTP located in urban areas (from 7 to 18 ng/L) and in only one of the influents from WWTP located in the rural areas (1 ng/L). For other beta blockers, no significant differences can be pointed out.

The 3 groups of beta blockers pointed out for influents are the same for effluents. ACE, ATE and SOT are always quantified at average concentrations above 470 ng/L. The molecules of the 2nd group (BIS, MET, NAD and PROP) are quantified in most effluent samples (more than 94% of them) except for NAD that is quantified in 58% of the effluents samples. Their average concentrations vary between 23 and 203 ng/L. Molecules of the 3rd group (BET, OXP and TIM) are less frequently quantified (30 to 60% of the samples) and their average concentrations are below 15 ng/L. Paffoni *et al* (2006) reported results for a WWTP located in the Paris area comparable to our study. In the 3 effluent samples analyzed, ATE, SOT, PROP and MET were quantified at mean concentrations of 570, 870, 190 and 100 ng/L, respectively (Paffoni et al., 2006). The same study showed that BIS was not quantified but the LOQ was relatively high (50 ng/L). In contrast, Piram et al. (2008a) who analyzed ACE, ATE, BIS, MET, NAD, PROP SOT, TIM, alprenolol and pindolol, quantified SOT and

TIM at the highest concentrations in treated effluent (65 and 58 ng/L, respectively), but this study was based on only one sample collected in the Lyon area, France. Finally, Ternes (1998) reported concentrations of 5 beta blockers in effluents of 29 German WWTP in the same concentration range as our study: PROP, BET and BIS were quantified at 170, 57 and 57 ng/L (median concentrations) respectively, while TIM was never quantified (LOQ of 25 ng/L). In this study, Ternes (1998) reported a median concentration of MET (730 ng/l) about 6 times higher than what we measured in our study (mean concentration of 156 ng/L).

3.5. Removal rate from the dissolved phase

Firstly, global removal rates of the molecules calculated for the 14 WWTP are discussed. Secondly, the efficiency of the primary treatment is studied. Then, results for the secondary biological treatments are presented: C removal only; C+N removal. The influence of the operating conditions (temperature, loading rate) is studied. Finally, the additional treatment that can be reached with a tertiary stage is discussed.

3.5.1 Global removal rate of the WWTP

Figure 2 presents global removal rates (biological and tertiary treatments when available) of estrogens and beta blockers calculated for the 14 WWTP (Table 1). Mean removal rate is higher than 90% for E1, βE2 and E3; the inter-quartile is around 10% that denotes a low variability. Moreover, the low variability of estrogens removal rate is proved by the low RSD obtained for the 14 WWTP: 3% for E3, 12% for βE2 and 20% for E1. In contrast, a homogeneous behaviour of beta blockers in WWTP can not be pointed out. Indeed, the 10 beta blockers studied have different chemical structures and they behave differently in the WWTP. ACE and NAD have mean removal rates over 80%, while they are below 20% for SOT and PROP. ATE, BET, BIS and MET have intermediate removal rates from 40 to 70%. Removal rates for beta blockers are highly variable in general (difference of 38-74% between quartile 1 and 3), except for ACE and NAD (difference of 9% between quartile 1 and 3).

These results are in agreement with those reviewed by Miege *et al* (2009a), with mean removal rates from the dissolved aqueous phase around 80% for E1, αE2 and βE2 and around 30% for MET. In contrast, a study lead over 6 days on 1 German municipal WWTP presents a mean removal rate above 90% for PROP (Ternes, 1998); although a more recent study presents for PROP a removal rate of 32% (Bendz et al., 2005) similar to our mean value

(22%; Fig. 2). Both studies were lead on WWTP consisting of primary clarification followed by activated sludge process with chemical phosphorous removal and final sedimentation (Ternes, 1998; Bendz *et al.*, 2005). These very different values reported for PROP in the literature are in agreement with the high variability of beta blockers removal rates that is observed in our study considering all WWTP types (Fig. 2). Removal rates linked to the different type of wastewater treatment will be studied further.

Considering medium to low octanol/water partition coefficient of the studied molecules (i.e., log Kow between 2.5 and 4 for estrogens, and between 0 and 3 for beta blockers), the major proportion of estrogens and beta blockers should be in the dissolved phase in wastewaters. Indeed, the proportion of analyte adsorbed to particulate matter is estimated (from Kd available in literature) to be below 10% in treated effluents and below 30% in raw wastewater. As a consequence, taking into account the particulate phase in the calculation of removal rates would probably lead to slightly higher values.

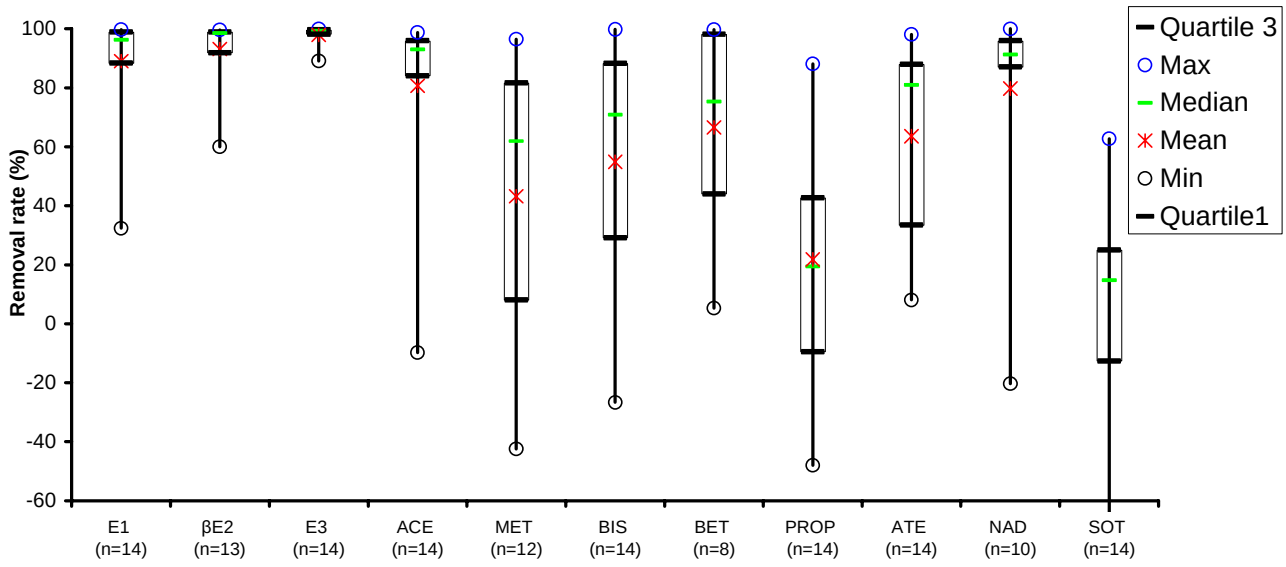


Figure 2: Global removal rate (%) of selected estrogens and beta blockers for the 14 biological WWTP studied (box-plot diagram: minimum and maximum value (o), median (-), mean (*),first and third quartile); n: number of quantified data.

3.5.2 Efficiency of primary treatment

Four WWTP are equipped with a primary treatment (table 1). For 3 of them (CA5, SE2 and SE6), the effluent of the primary settling tank was sampled and the efficiency of the primary treatment could be evaluated. SE2 has a primary treatment without physico-chemical process, whereas for CA5 and SE6 there is a chemical addition of ferric chloride with lime and polymer before the primary settling. The use of a chemical treatment enables to enhance the removal of colloids by increasing their coagulation and their flocculation. This type of treatment should therefore improve removal rate of hydrophobic molecules.

For estrogens, removal rates associated with the primary treatment of SE2 are systematically negative showing an absence of removal during this process. A chemical addition during primary settling (CA5 and SE6) increases removal rate of estrogens: removal rates are 0-12%, 16-29% and 27-36%, for E1, E3 and βE2, respectively. These observations are coherent with the medium hydrophobicity of estrogens (log Kow between 2.5 and 4). Moreover, no significant differences are noted between removal rates associated to CA5 (operated at 11°C) and to SE6 (operated at 21°C).

Concerning beta blockers, lower removal rates (below –15%) associated to primary treatment are obtained for CA5. No significant differences are noted between removal rates associated to primary treatment with and without chemical addition; in fact, removal rates obtained for SE2 and SE6 are in the same range (between –9 and 32% depending on the molecule). These results can be explained by the hydrophilic nature of beta blockers. However, among the different physico-chemical treatment studied (CA5, SE2 and SE6), CA5 presents lower removal rates and was working at the lowest temperature (11°C). So, for beta blockers, removal rate of primary treatment seems to be more influenced by the temperature than by the addition of chemical.

As a conclusion, while a physico-chemical treatment enables to increase removal rate of estrogens during the primary treatment, a higher temperature applied to a primary settling tank influences the removal of beta blockers during primary treatment even if this observation is only based on one result (CA5) and should be confirmed. A previous study performed on sewage primary treatment, did not show a significant influence of temperature on removal of several pharmaceuticals and personal care products, but among the different molecules tested there were no beta blocker (Carballa et al., 2005). The same study showed also that some molecules such as carbamazepine and ibuprofen (with log Kow in the same range as beta blockers) were not affected by the addition of a coagulant.

3.5.3 Efficiency of secondary biological treatment

3.5.3.1 Influence of the operational conditions

Influence of the temperature applied to the activated sludge tank. A comparison of removal rates observed for activated sludge processes has been carried out according to the temperature recorded in the biological tanks (table 1). Considering that estrogens as well as beta blockers prescriptions are not different in winter than in summer, this comparison will really point out the effect of temperature and will not result from the variation of concentrations in raw water linked to seasonal variations. The influence of temperature on removal rate efficiency was already showed for some pharmaceuticals such as antiphlogistics or lipid regulator (Vieno et al., 2005).

Three conventional activated sludge were sampled in winter with a tank temperature of 9-15°C ("10°C") (CA1, CA2, SE1), three were sampled in autumn or spring with a temperature of 20-23°C ("20°C") in the biological reactor (SE2, SE3, SE4). CA3 was not considered in this comparison as it does not perform nitrogen removal (medium loaded activated sludge).

For estrogens, E1 and βE2 removal rates seem to be slightly higher at higher temperature (figure 3a): for example, mean removal rate for E1 at "10°C" is 83% and it is 98% at "20°C". Nevertheless, even if removal rates for E1 and βE2 are less variable at "20°C" (RSD of 2 to 3%), compared to RSD of 11 and 21%, respectively, at "10°C", the differences in removal rates are in the range of the analytical uncertainty; a Student t-test at 95% confidence did not prove any significant difference. For E3, removal rates at "10°C" and "20°C" are not different. The activated sludge tank temperature does not seem to influence removal rate efficiency of most beta blockers either (figure 3b). We observe a higher removal rate at "20°C" only for ATE: mean removal rate of 41% at "10°C" and 84% at "20°C". The improvement of removal rate of ATE with an increase of temperature was already observed in a study lead on 6 activated sludge WWTP in Italy: the median value of removal rate was 10% in winter and it increased to 55% in summer (Castiglioni et al., 2006). Surprisingly, this study pointed out the absence of removal of E1 in winter as well as in summer. In our study, some negative removal rate are obtained for beta blockers. These values can be explained by the uncertainty of the analytical method which is evaluated at 20-30%. The desorption of molecules from sludge and suspended particulate matter which was observed for estrogens (Pholchan et al., 2008) might also be considered for beta blockers.

Even if few authors studied the influence of activated sludge tank temperature on removal rate of the target molecule, several authors studied the efficiency of activated sludge process on the removal of estrogens and beta blockers. The results obtained in our study are in agreement with literature (Baronti et al., 2000; Joss et al., 2004; Nakada et al., 2006; Muller et al., 2008). Concerning beta blockers, similar results were reported for ATE, SOT and MET (removal rate of 61.2 ± 18.6, 21.4 ± 31.5, 24.7 ± 44.9%, respectively) (Radjenovic et al., 2009), as well as for ATE and MET (removal rate of 63 and 34%, respectively) (Vieno et al., 2007). The results obtained for PROP and ACE are not in agreement with previously cited studies (removal rate of 58.8 ± 24.5% for PROP (Radjenovic et al., 2009) and of 60% for ACE (Vieno et al., 2007)). These results illustrate the high variability of removal rates from one WWTP to another. For the 6 activated sludge processes studied in this part, the highest variability is obtained for PROP, MET and SOT with RSD of 233, 79 and 93%, respectively.

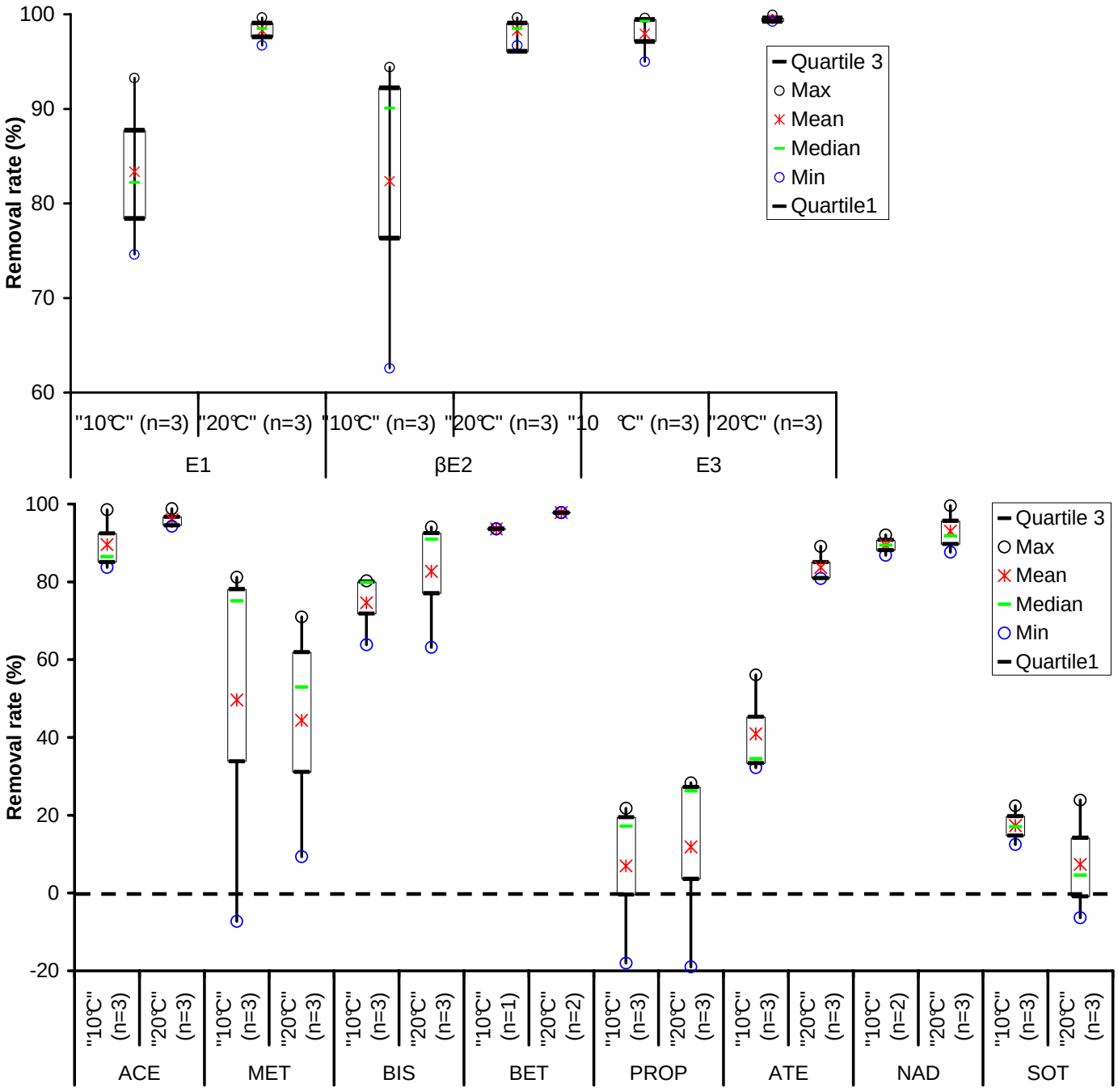


Figure 3: Influence of the activated sludge tank temperature on removal rates (%) of target molecules (estrogens (a) and beta blockers (b)) (box-plot diagram: minimum and maximum value (o), median (-), mean (*), first and third quartile); n : number of quantified data.

Influence of the loading rate of the activated sludge tank (low loaded versus medium loaded activated sludge process). Among the different activated sludge processes studied at "20°C", three are low loaded activated sludge plants with a F/M ratio applied below 0.1 kg BOD_5.(kgMLVSS.d)$^{-1}$, and one is a medium loaded activated sludge plant, CA3, with a F/M ratio applied of 0.5 kg BOD_5.(kgMLVSS.d)$^{-1}$. As we could expect, the medium loaded process which achieved partial treatment presents lower removal rates than those obtained with low loaded processes (figure 4a). For most studied molecules, removal rate of the medium loaded process is practically negligible. Only βE2, E3 and ACE are partly removed during the medium loaded process (removal rate between 51 and 81%). For beta blockers, some negative removal rates (between –2 and –19%) are observed and can be explained by analytical uncertainty. A negative removal rate value is also observed for E1 in the medium loaded activated sludge (removal rate of –35%). This observation can be linked to the formation of E1 from degradation of βE2 (Ternes et al., 1999; Czajka and Londry, 2006; Ren et al., 2007).

To meet the nitrogen standards set-up for the effluent released to sensitive areas, the medium loaded activated sludge was upgraded by building an additional stage of treatment (submerged biological filter) for TSS and NH_4-N removal. Removal rate obtained with these two-steps treatment is compared in figure 4b to the results obtained with the three low loaded activated sludge plants (mean value) studied at "20°C". The performances obtained for estrogens by both treatment are similar, but the combination "medium loaded activated sludge / nitrifying biological filter" (MAS + B) gives lower removal rates for beta blockers as those obtained with low loaded activated sludge: for ACE, removal rate of MAS + B is 36% whereas mean removal rate for low loaded activated sludge is 96%; for ATE removal rate increases from 11 to 84%; only BET, NAD, PROP and SOT present performances similar to the ones measured for low loaded activated sludge process. A submerged biofilter process operated under denitrifying conditions used as tertiary treatment was previously proved to be unsatisfying for ACE, ATE, MET and SOT (Vieno et al., 2007).

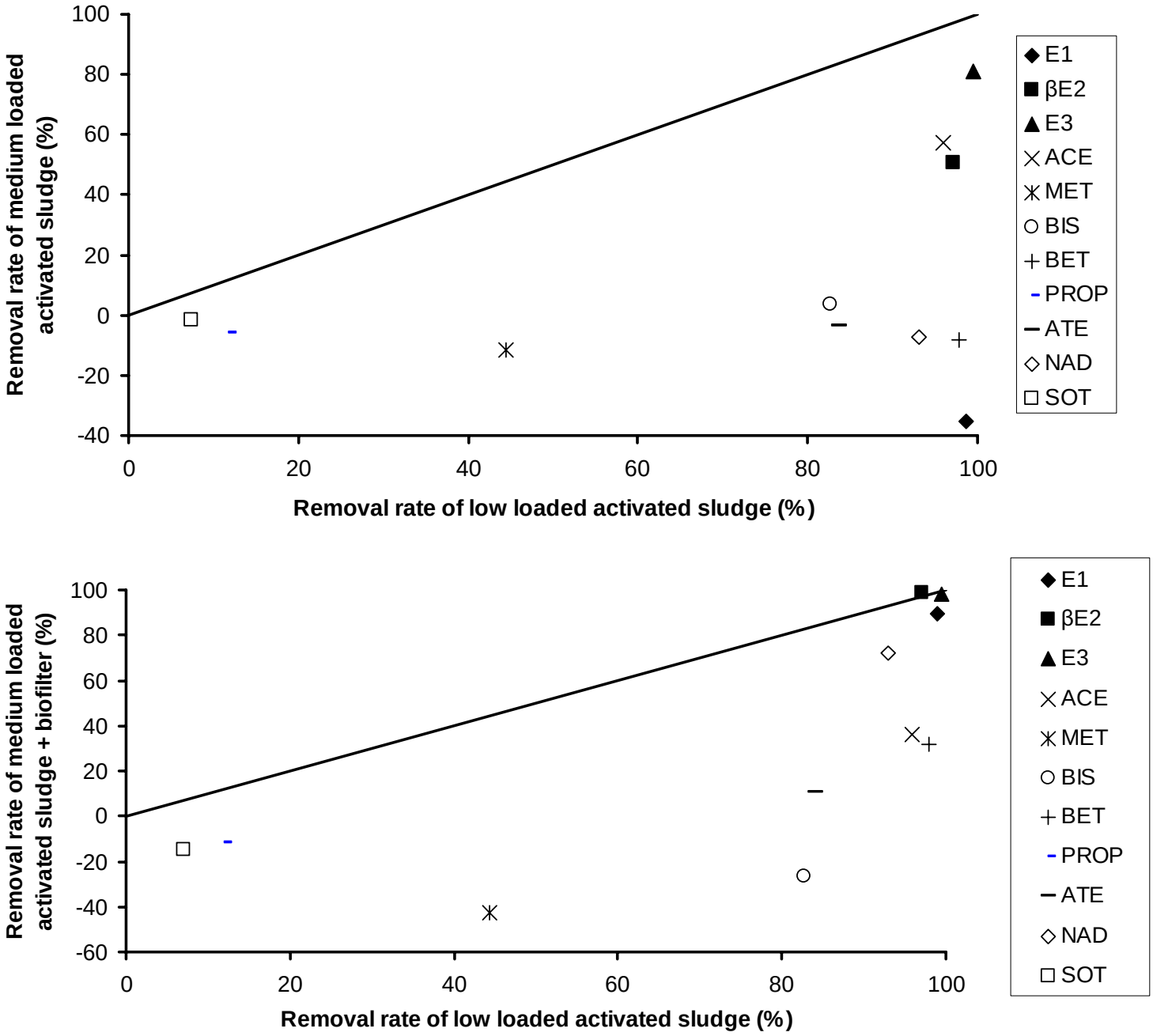


Figure 4: Comparison between estrogens and beta blockers removal rates (%) obtained at "20°C" with low loaded activated sludge and (a) medium loaded activated sludge (b) the combination medium loaded activated sludge / nitrifying filter.

3.5.3.2 Influence of the configuration of biological nitrogen-removal treatment

First, we compared processes operated at "10°C". Attached growth processes (represented by 1 activated sludge (C) + biofilter (N) (CA3), 1 rotating biological contactor (RBC) + 1 reed bed filter (CA4) and horizontal + vertical reed bed filters (CA6)) are compared to suspended growth processes represented by 3 conventional activated sludge process (composed of CA1, CA2 and SE1).

For estrogens, we show that removal rates of the different attached growth processes are at least as effective as conventional activated sludge process, with removal rates always above 89% (figure 5a). For beta blockers, results differ depending on the molecules. For ACE, BIS, PROP and SOT, the combination activated sludge (C) + biofilter (N) gives the lower performances (removal rates between –27 and 36%) due to a short hydraulic retention time. For most of the beta blockers (BIS, BET, NAD and SOT), higher removal rates are obtained with suspended growth processes (removal rates of 17% for SOT and between 75 and 94% for the other molecules). The combination of vertical and horizontal reed bed filters gives satisfying performances for ACE, MET, BIS, PROP and ATE (removal rate between 51 and 94% depending on the molecule).

In conclusion, at "10°C" suspended and attached growth processes give comparable removal performances for estrogens, while low loaded activated sludge (LAS) appears as the most appropriate process to remove most of the quantified beta blockers from raw waters (ACE, BIS, BET, NAD and SOT).

Then, we compared processes operated at "20°C" (figure 5b). Suspended growth processes are represented by 3 LAS (SE2, SE3 and SE4) and one membrane bioreactor (SE5). For attached growth processes, 3 WWTP are selected: CA7 (pond + vertical reed bed filter), SE6 (biological filter) and SE9 (trickling filter + reed-bed filter). We observe that for estrogens as well as for beta blockers, the hollow-fibre membrane bioreactor (MBR) is as efficient as LAS (removal rates of 100% for estrogens and between 26 and 99% for beta blockers). This result can be explained by the equivalent sludge retention times that are applied (15 to 20 days for LAS, and 17 days for MBR). A study carried out on a pilot-scale MBR with different pharmaceuticals including beta blockers (ATE, SOT, MET and PROP) also showed that hollow-fibre MBR gave similar results as LAS, but pointed out that flat-sheet MBR slightly improved (up to 20%) the removal of beta blockers (Radjenovic et al., 2009). The combination of trickling filter and reed-bed filter provides lower removal rates for

the majority of the molecules (E1, βE2, MET, BIS, BET, PROP), certainly because of partial nitrification by the system.

For beta blockers, high removal rates (from 60 to 100%) are obtained for the WWTP equipped with a pond followed by a vertical reed bed filter (CA7). High hydraulic retention time (70-90 days, 8 times higher than for LAS) and photo-degradation are the operating conditions that can explain such good performances.

In conclusion, at "10°C" LAS seems to be more efficient than attached growth processes to remove several beta blockers. At "20°C", MBR was proved to be as efficient as LAS to remove estrogens as well as beta blockers. Nevertheless, as proved by a Student t-test at 95% confidence, we can not conclude on the relative efficiency of attached compared to suspended growth processes.

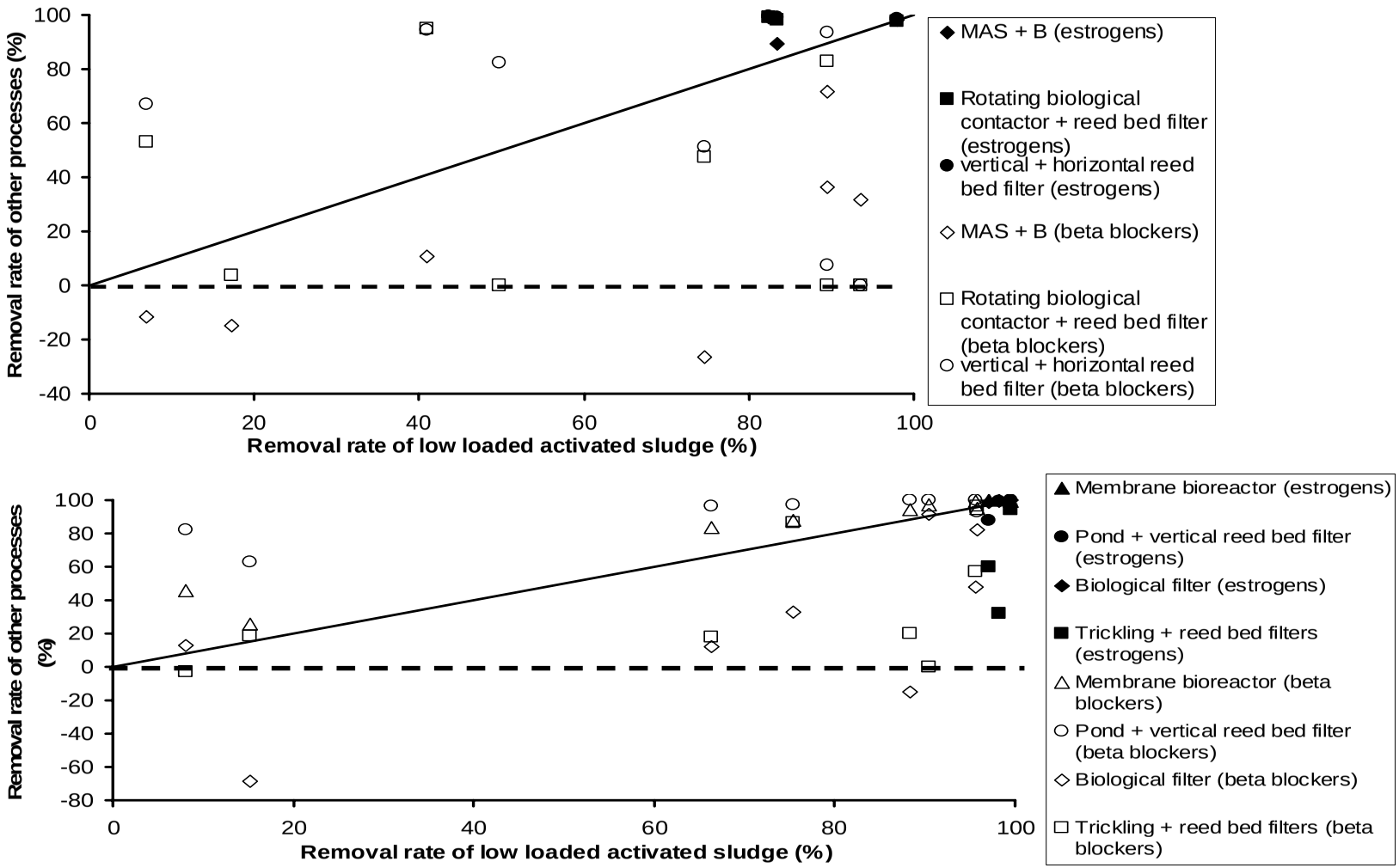


Figure 5: Comparison between estrogens and beta blockers removal rates (%) obtained for low loaded activated sludge and the biological process type operated at (a) "10°C" (medium loaded activated sludge + biofilter (MAS +B), rotating contactor + reed bed filter and vertical + horizontal reed bed filter vs low loaded activated sludge) (b) "20°C" (membrane bioreactor, pond + vertical reed bed filter, biological filter and trickling filter + reed bed filter).

3.6. Removal rate from the dissolved phase of effluent through additional treatment (tertiary stage)

Table 3 presents removal rates obtained for the target molecules at each stage of tertiary treatments and the concentrations measured in secondary and final effluents. The efficiency of tertiary treatment was not evaluated on estrogens as they are already almost totally removed by the secondary treatment (removal rate between 98 and 100%).

High speed chemical settler, sand filter, silex filter, microfiltration and UV present removal rates below 30% for all beta blockers. All these treatments (except UV) are based on precipitation or adsorption on suspended solid, so these results are coherent with the relatively low hydrophobicity of studied beta blockers. A previous study performed on 8 pharmaceuticals (ibuprofen, naproxen, diclofenac, carbamazepine, diazepam, galaxolide, tonalide and celestolide) already proved that supplementation of $FeCl_3$ into the aeration tank was negligible for enhancing removal of selected pharmaceuticals (Serrano et al., 2009). Nevertheless, for one of the 3 high speed chemical settler studied, PROP shows a higher removal rate (68%). This better performance is observed for the WWTP where the highest concentrations of PROP were measured in secondary effluents (5 to 30 times higher than concentrations measured in secondary effluent for the 2 other WWTP). Moreover, for the sand filtration (SE-PA2), removal rates of 37 and 100% are obtained for ATE and PROP, respectively.

Removal rates above 80% are obtained for all beta blockers with ozonation, reverse osmosis and activated carbon filtration (Table 3). Only NAD in CA-PA2 and ACE in SE-PA2 present lower removal rates (29 and 62%, respectively). However, we note that despite these high removal rates, most of the beta blockers are still quantified in final effluents at concentration up to 89 ng/L.

The polishing pond (CA4) studied present variable removal performances depending on the molecules. While ACE and MET are not removed by this treatment (removal rates below 20%), the other target beta blockers are partially removed with removal rates between 42 and 75% (42% for SOT, 57% for BIS, 62% for ATE and 75% for PROP). These results can be explained by the long term hydraulic retention time (15 to 20 days) and the relatively short half lives of these molecules in effluent wastewater under UV exposure, which were reported to be in the range of 3-4 h, 4-8 h and 15-70 h for PROP, SOT and BIS, respectively (Piram et al., 2008b).

Table 3: Removal rate (%) and concentrations (ng/L) of beta blockers measured in the dissolved phase of the tertiary treatments.

Treatment stage types	WWTP code	Removal rate (%)									
		ACE	TIM	MET	OXP	BIS	BET	PROP	ATE	NAD	SOT
High speed chemical settler	SE3	-40	NA	-1	NA	-32	NA	12	-10	-3	4
	SE-PA1	-19	NC	-19	-23	-16	NC	-21	-8	-34	0
	CA-PA2	-11	NC	5	-2	-12	NA	68	-11	-15	-6
Polishing pond	CA4	13	NA	-90	NA	57	NA	75	62	NA	42
Sand filter	SE-PA1	0	NC	-4	10	8	NC	16	-15	10	-7
	CA-PA1	-8	NC	8	27	7	NC	3	8	-2	-14
	SE-PA2	-17	NA	24	-32	5	NA	100	37	NC	12
UV	SE-PA1	7	NC	15	29	21	NC	-10	30	9	11
Ozonation	CA-PA1	86	NC	97	86	97	NC	100	97	98	100
Microfiltration/Ultrafiltration	SE-PA1 (pilot)	-4	NC	10	NC	-15	NC	-28	5	NC	-4
Reverse osmosis	SE-PA2	62	NA	97	NA	84	NA	NA	89	NA	88
	SE-PA1 (pilot)	82	NC	95	NC	95	NC	96	99	NC	98
Silex filter	SE-PA1 (pilot)	-1	NC	-3	NC	-6	NC	5	11	NC	9
Activated carbon	CA-PA2	95	NC	99	NQ	99	NA	99	84	29	99

WWTP code	Sampling point	Concentration in the dissolved phase (ng/L)									
		ACE	TIM	MET	OXP	BIS	BET	PROP	ATE	NAD	SOT
SE3	Secondary effluent	140	2.0	43	2.7	14	< 0.9	293	301	4.1	535
	Final effluent	186	< 0.4	42	2.2	18	< 0.8	260	332	4.2	514
CA4	Secondary effluent	215	4.8	12	< 2.1	141	< 0.7	251	100	< 0.4	1513
	Final effluent	187	5.1	22	< 0.7	59	< 1.6	64	37	< 2.2	870
SE-PA1	Secondary effluent	18	4.3	30	17	94	1.3	54	635	9.7	123
	Final effluent	20	4.5	33	13	86	1.8	54	579	11	119
CA-PA1	Secondary effluent	358	10	285	45	409	6.0	793	2719	91	1153
	Final effluent	46	< 0.5	7.0	7.4	12	0.3	1.6	79	1.5	3.0
SE-PA2	Secondary effluent	11	< 1.0	37	4.2	17	< 0.6	32	425	2.5	28
	Final effluent	5.3	NA	1.3	< 0.5	2.1	< 0.7	< 1.0	26	< 0.5	2.6
CA-PA2	Secondary effluent	126	5.0	91	7.5	56	1.0	1483	496	16	481
	Final effluent	6.5	10	< 1.4	< 0.9	< 0.7	< 1.5	4.3	89	12	3.5
SE-PA1 (pilot)	Secondary effluent	16	3.7	34	4.1	89	2.6	46	653	6.2	140
	Final effluent	3.0	< 0.8	1.7	2.1	5.8	< 1.0	2.0	4.4	< 0.2	3.1

NC: not calculated (low concentrations, i.e below 10 ng/L)
NA: not applicable (molecule not quantified)

4. Conclusions

The presence of estrogens and beta blockers in the dissolved phase of raw and treated wastewaters released in rural and urban areas was studied. Different WWTP representative of the wastewater processes used in France and several treatment stages were investigated. The sampling procedure was proved to be efficient and not to influence the concentrations of

estrogens and beta blockers: absence of adsorption and a limited desorption (below 1.5 ng/L, with no repetition for the same molecule) that can be considered as negligible.

The mean proportion between free and total estrogens is evaluated in the range of 80-90% in influent samples and slightly lower in treated water (from 57 to 93%). A higher variability is pointed out in effluent samples, certainly linked to the different processes studied. As a result, it is of high importance to apply a deconjugation step during analysis, to evaluate removal rates for these molecules. Estrogens concentrations up to 676 ng/L for E3 are quantified in influent samples, whereas the highest concentration measured in effluent samples is below 60 ng/L (for E1 and E3). Beta blockers are quantified in influent up to 9.8 µg/L and are generally quantified in 60 to 100% of influent and effluent samples. Among the 10 beta blockers analyzed, only TIM, OXP and BET are less frequently detected in the samples of raw and treated water released from secondary biological treatments.

In the 14 WWTP, mean removal rates linked to estrogens in the dissolved phase are above 90% showing that these molecules are highly sensible to the biological treatment. For beta blockers, the different molecules showed various behaviours in the WWTP: some, such as ACE or NAD, have mean removal rate around 80%, but others like SOT or PROP are not impacted by the treatment (mean removal rate below 20%). For the rest of beta blockers (MET, BET, BIS and MET), mean removal rates range from 40 to 70%. Moreover, highly variable removal rates are obtained for beta blockers depending on the WWTP. The impact of the activated sludge tank temperature was also evaluated and pointed out that ATE is the only molecule for which higher removal rates are obtained with higher tank temperature (removal rate is twice higher when the temperature increases from 10 to 20°C). We have confirmed that removal rates of medium loaded activated sludge are significantly lower than low loaded activated sludge for which hydraulic retention time is higher. We also compared the performances obtained for low loaded process and for a combination medium activated sludge / nitrifying biological filter. Both treatments have similar removal performances, for estrogens and BET, NAD and PROP. For the rest of beta blockers, lower performances are obtained with the combination medium activated sludge / nitrifying biological filter due to short hydraulic retention time. Finally, the efficiency of tertiary treatments was evaluated on beta blockers. High speed settler, sand filter, silex filter, microfiltration and UV were proved to have poor removal rate (below 30%), while ozonation, reverse osmosis and activated carbon filtration showed a significant efficiency (over 80%). The polishing pond provided variable removal rates depending on the molecule.

These results only focussed on the dissolved phase and did not include the quantity of estrogens and beta blockers adsorbed in the particulate phase. Nevertheless, considering that less than 10 to 30% of molecules are adsorbed to particulate matter in effluent and influent water, respectively, taking into account the particulate phase would only slightly increase removal rates values.

Acknowledgements

The authors thank the Agence nationale de la recherche (ANR Precodd AMPERES project) and the Agence de l'eau Rhône Méditerranée et Corse for financial support. We are also grateful to Philippe Bados, Corinne Brosse, Julie Moriceau and Séverine Schiavone (Cemagref) for analytical support and to Jean-Luc Beckert, Clément Crétollier, Mohamed Hadjab, Alain Liénard, Jean-Marc Perret and Maxime Pomiès (Cemagref) for sampling assistance.

References

Adler P, Steger-Hartmann T, Kalbfus W. Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from Southern and Middle Germany. Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica 2001; 29 (4): 227-241.

AFNOR (1999). Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique par rapport à une méthode de référence. **Norme NF XPT 90-210:** 58 pp.

Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. Environ Sci Technol 2000; 34 (24): 5059-5066.

Belfroid AC, Van der Horst A, Vethaak AD, Schafer AJ, Rijs GBJ, Wegener J, Cofino WP. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. Science of the Total Environment 1999; 225 (1-2): 101-108.

Bendz D, Paxeus NA, Ginn TR, Loge FJ. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. Journal of Hazardous Materials 2005; 122 (3): 195-204.

Besse JP, Garric J (2007). Médicaments à usage humain : risques d'exposition et effets sur les milieux récepteurs, Rapport Phase 1, Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surfaces continentales. Lyon, Cemagref.

Besse JP, Kausch-Barreto C, Garric J. Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment: Application to the French situation and preliminary prioritization. Human and Ecological Risk Assessment 2008; 14 (4): 665-695.

Carballa M, Omil F, Lema JM. Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. Water Research 2005; 39 (19): 4790-4796.

Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, Pomati F, Calamari D, Zuccato E. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. Environ Sci Technol 2006; 40 (1): 357-363.

Christensen AM, Markussen B, Baun A, Halling-Sorensen B. Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges. Chemosphere 2009; 77 (3): 351-358.

Czajka CP, Londry KL. Anaerobic biotransformation of estrogens. Science of the Total Environment 2006; 367 (2-3): 932-941.

D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. Science of the Total Environment 2003; 302 (1-3): 199-209.

EC (2002). Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **2002/657/EC:** 29p.

Haider S, Baqri SSR. beta-Adrenoceptor antagonists reinitiate meiotic maturation in Clarias batrachus oocytes. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology 2000; 126 (4): 517-525.

Isobe T, Shiraishi H, Yasuda M, Shinoda A, Suzuki H, Morita M. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 2003; 984 (2): 195-202.

Janex-Habibi ML, Huyard A, Esperanza M, Bruchet A. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: The benefit of wastewater treatment. Water Research 2009; 43 (6): 1565-1576.

Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. Widespread sexual disruption in wild fish. Environ Sci Technol 1998; 32 (17): 2498-2506.

Joss A, Andersen H, Ternes T, Richle PR, Siegrist H. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization. Environ Sci Technol 2004; 38 (11): 3047-3055.

Labadie P, Budzinski H. Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). Environ Sci Technol 2005; 39 (14): 5113-5120.

MEDAD (2007). Arrêté du 22 juin 2007 relative à la collecte, au transport et au traitement des eaux usées des agglomérations d'assainissement ainsi qu'à la surveillance de leur fonctionnement et de leur efficacité, et aux dispositifs d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique supérieure à 1.2 kg/j de DBO5. **DEVO0754085A**.

Miege C, Choubert JM, Ribeiro L, Eusebe M, Coquery M. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. Environmental Pollution 2009a; 157 (5): 1721-1726.

Miege C, Bados P, Brosse C, Coquery M. Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices. Trends Analyt Chem 2009b; 28 (2): 237-244.

Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak SL, Perdiz D, Cargouet M, Levi Y. Validation of a quantitative assay using GC/MS for trace determination of free and conjugated estrogens in environmental water samples. Journal of Separation Science 2003; 26 (1-2): 105-111.

Muller M, Rabenoelina F, Balaguer P, Patureau D, Lemenach K, Budzinski H, Barcelo D, De Alda ML, Kuster M, Delgenes JP, Hernandez-Raquet G. Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. Environ Toxicol Chem 2008; 27 (8): 1649-1658.

Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K, Takada H. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. Water Research 2006; 40 (17): 3297-3303.

Paffoni C, Welte B, Gousailles M, Montiel A. Nouvelles molecules mises en cause par les directives européennes : de la station d'épuration à l'usine de traitement d'eau potable. European Journal of Water Quality 2006; 37 (1): 21-38.

Pholchan P, Jones M, Donnelly T, Sallis PJ. Fate of estrogens during the biological treatment of synthetic wastewater in a nitrite-accumulating sequencing batch reactor. Environ Sci Technol 2008; 42 (16): 6141-6147.

Piram A, Salvador A, Gauvrit JY, Lanteri P, Faure R. Development and optimisation of a single extraction procedure for the LC/MS/MS analysis of two pharmaceutical classes residues in sewage treatment plant. Talanta 2008a; 74 (5): 1463-1475.

Piram A, Salvador A, Verne C, Herbreteau B, Faure R. Photolysis of beta-blockers in environmental waters. Chemosphere 2008b; 73 (8): 1265-1271.

Radjenovic J, Petrovic M, Barcelo D. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. Water Research 2009; 43 (3): 831-841.

Ren HY, Ji SL, Ahmad NUD, Dao W, Cui CW. Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 alpha-ethynylestradiol by Sphingobacterium sp JCR5. Chemosphere 2007; 66 (2): 340-346.

Serrano D, Lema JM, Omil F (2009) Influence of the employment of co-precipitation and adsorption agents for the removal of PPCPs in Conventional Activated Sludge (CAS) systems. Xenowac, Paphos, Cyprus.

Shi JH, Suzuki Y, Nakai S, Hosomi M. Mimbial degradation of estrogens using activated sludge and night soil-composting microorganisms. Water Sci Technol 2004; 50 (8): 153-159.

Ternes TA. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Research 1998; 32 (11): 3245-3260.

Ternes TA, Joss A.2006 Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances: The challenge of micropollutants in urban water management. IWA Publishing.

Ternes TA, Kreckel P, Mueller J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. Science of the Total Environment 1999; 225 (1-2): 91-99.

Triebskorn R, Casper H, Scheil V, Schwaiger J. Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and common carp (Cyprinus carpio). Anal Bioanal Chem 2007; 387 (4): 1405-1416.

Vader JS, van Ginkel CG, Sperling F, de Jong J, de Boer W, de Graaf JS, van der Most M, Stokman PGW. Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. Chemosphere 2000; 41 (8): 1239-1243.

Vieno N, Tuhkanen T, Kronberg L. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. Water Research 2007; 41 (5): 1001-1012.

Vieno NM, Tuhkanen T, Kronberg L. Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. Environ Sci Technol 2005; 39 (21): 8220-8226.

Winter MJ, Lillicrap AD, Caunter JE, Schaffner C, Alder AC, Ramil M, Ternes TA, Giltrow E, Sumpter JP, Hutchinson TH. Defining the chronic impacts of atenolol on embryo-larval development and reproduction in the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquatic Toxicology 2008; 86 (3): 361-369.

Yoshimoto T, Nagai F, Fujimoto J, Watanabe K, Mizukoshi H, Makino T, Kimura K, Saino H, Sawada H, Omura H. Degradation of estrogens by Rhodococcus zopfii and Rhodococcus equi isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. Applied and Environmental Microbiology 2004; 70 (9): 5283-5289.

3.2.2 Etat des lieux des teneurs mesurées dans les boues de STEP

Dans cette partie, sont présentées les teneurs en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans des boues de station d'épuration. L'objectif de ce travail est de réaliser une première évaluation des teneurs mesurées dans les boues. Les méthodes utilisées pour analyser les estrogènes et les bêtabloquants dans ces échantillons sont présentées dans le chapitre 2.3. Au total, 31 échantillons de boue (Annexe 2) issus de 14 des 16 stations échantillonnées dans le programme AMPERES (Tableaux 17 a et 17 b) ont été analysés. Les échantillons analysés ont été répartis en 6 classes afin de pouvoir déterminer les niveaux de concentration retrouvés en fonction du type de boue étudié (boues d'origines différentes) :

- les boues primaires (issues du traitement primaire), n = 4,
- les boues biologiques (issues du traitement biologique), n = 8,
- les boues tertiaires (issues du traitement tertiaire), n = 2,
- les boues mixtes (regroupement de boues de différentes natures : primaires, biologiques et tertiaires), n = 2,
- les boues déshydratées (boues primaires, mixtes ou biologiques ayant simplement subi une déshydratation mécanique), n = 5,
- les boues traitées (boues ayant subi un traitement spécifique : chaulage, séchage thermique, digestion, compostage, lit de séchage), n = 10.

3.2.2.a. Qualité des données

Les performances des méthodes d'analyse utilisées ont été caractérisées et sont présentées dans la partie 3.1. L'utilisation de traceurs de méthode deutérés pour les estrogènes et d'ajouts dosés pour les bêtabloquants permet de tenir compte des effets matrice inhérents à chaque échantillon. De plus, les contrôles qualité détaillés dans le chapitre 2.3.2 ont été mis en place pour assurer la fiabilité de ces données (blancs méthode, utilisation de traceurs deutérés ou d'ajouts dosés, utilisation de blancs d'analyse, dilution systématique de l'extrait, utilisation de 2 transitions en spectrométrie de masse).

Lors de la validation de méthode, nous avons décidé de déterminer la sensibilité (LD et LQ) pour chaque couple échantillon/composé (cf. chapitre 2.5.1). En effet, comme noté lors

du développement de la méthode d'analyse des hormones dans les boues (cf. chapitre 3.1), des effets matrice très différents peuvent être obtenus d'un échantillon à un autre. Déjà visible dans les eaux usées, ce phénomène est d'autant plus prononcé dans les échantillons de boue (extinction de signal). De plus, nous avons observé une baisse progressive de la sensibilité de la LC-MS/MS au cours de la séquence d'analyse des échantillons de boue. Tous ces phénomènes contribuent à l'obtention de limites de quantification différentes pour une même molécule dans des échantillons différents. En effet, même si les LQ sont généralement du même ordre que celles déterminées dans la partie 3.1, des variations importantes sont parfois notées. Ainsi, pour E3 les limites de quantification varient, par exemple, entre 0,2 et 10,8 ng/g (pour une boue biologique et une boue tertiaire, respectivement) ; pour TIM, les limites de quantification varient entre 0,1 et 3,1 ng/g (pour une boue biologique et une boue traitée, respectivement). La diversité des sensibilités obtenues peut rendre plus difficile l'exploitation des données. Cependant, ces résultats mettent également en évidence le problème lié à l'utilisation de limites de quantifications unique pour tous les échantillons de boue.

3.2.2.b. Teneurs mesurées dans les boues primaires

Parmi les échantillons analysés, 4 sont des boues primaires (figure 12). Les résultats obtenus montrent que seuls E1, βE2, SOT, ACE et PROP sont quantifiés dans toutes les boues primaires. Au contraire, EE2 n'est jamais détecté et OXP est quantifié dans un seul des échantillons (à moins de 1 ng/g).

ACE et PROP sont mesurés aux plus fortes teneurs : respectivement 213 et 169 ng/g en moyenne. Avec un log Kow entre 2,6 et 3,6, le PROP est, parmi les bêtabloquants étudiés, le plus hydrophobe. Il n'est donc pas étonnant de retrouver cette molécule adsorbée sur les boues. De plus, cette molécule est présente en quantité significative dans les influents des STEP (cf. chapitre 3.2.1). Au contraire, ACE présente un caractère plutôt hydrophile (log Kow de 1,42). Sa présence dans les boues primaires peut en partie s'expliquer par la forte concentration de cette molécule dans les influents de STEP ; cette molécule est en effet le bêtabloquant le plus concentré dans les influents des STEP dont sont issus ces échantillons de boue (STEP CA3, CA6 et SE2). Pour toutes les autres molécules étudiées, les teneurs moyennes mesurées dans les boues primaires sont inférieures à 50 ng/g : les estrogènes sont quantifiés entre 17 et 27 ng/g en moyenne, et les bêtabloquants entre 1 et 46 ng/g. On peut également noter que ATE, qui est le bêtabloquant le plus hydrophile étudié (log Kow entre –0,026 et 0,46) est quantifié dans les boues primaires à des teneurs pouvant atteindre 56 ng/g

(teneur moyenne de 46 ng/g). Cependant, ATE fait partie, avec ACE et SOT, des bêtabloquants retrouvés aux plus fortes concentrations dans les influents. Quoi qu'il en soit, les interactions hydrophobes ne peuvent pas, à elles seules, expliquer la répartition de ces molécules car d'autres types d'interactions entrent également en compte (interactions ioniques, etc.).

Ces valeurs correspondent aux données publiées dans la littérature qui faisaient état de teneurs moyennes dans les boues primaires de 12, 15, 32 et 84 ng/g pour E1, βE2, PROP et ATE, respectivement (Herry-Leroy *et al.*, 2006; Radjenovic *et al.*, 2009a).

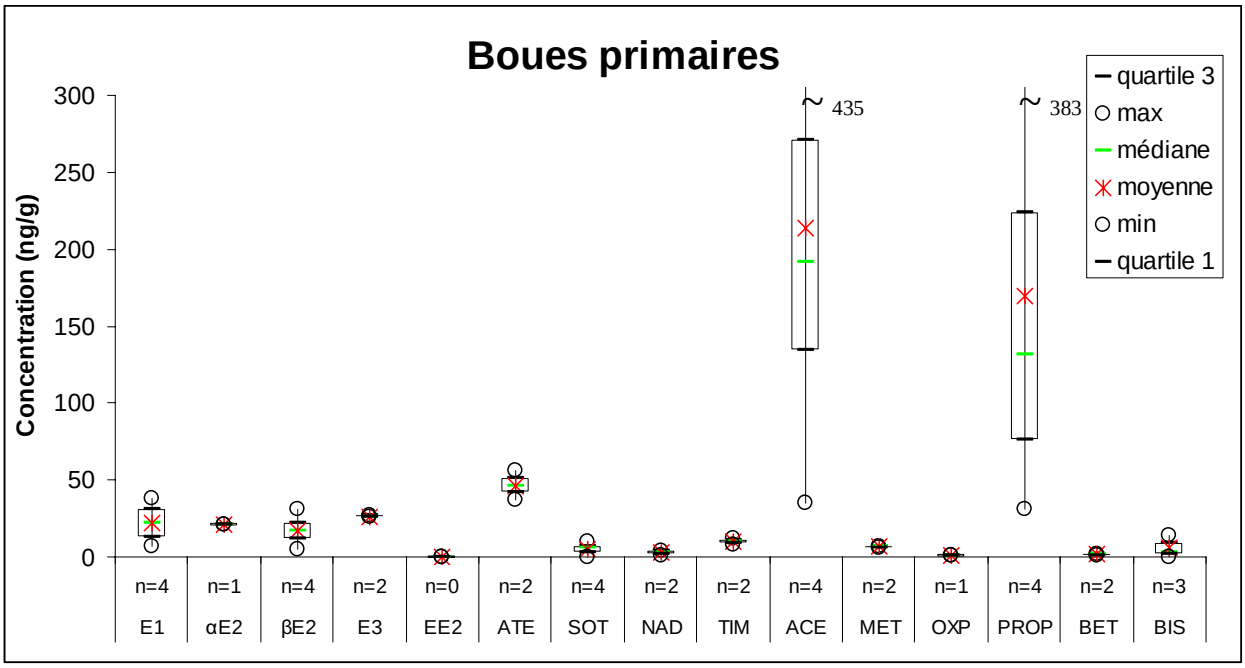


Figure 12 : Teneurs en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans 4 boues primaires en ng/g de poids sec (représentation par boîte à moustaches : valeurs minimum et maximum (o), médiane (-), moyenne (*), premier et troisième quartile); n : nombre de données quantifiées.

3.2.2.c. Teneurs mesurées dans les boues biologiques

Sur les 8 boues biologiques analysées, seuls ACE, ATE, MET et PROP sont quantifiés dans tous les échantillons (figure 13). Comme observé pour les boues primaires, ACE et PROP correspondent également aux molécules quantifiées aux plus fortes teneurs dans les boues biologiques : 50 et 110 ng/g en moyenne pour ACE et PROP, respectivement. On peut déjà noter que les teneurs mesurées dans les boues biologiques sont inférieures à celles mesurées, pour ces mêmes molécules, dans les boues primaires (213 et 169 ng/g, respectivement). Par ailleurs, EE2 n'est jamais détectée dans les échantillons analysés. Pour toutes les autres molécules étudiées, les teneurs moyennes mesurées sont inférieures à 40

ng/g : entre 7 et 35 ng/g pour les estrogènes et entre 0,7 et 16 ng/g pour les bêtabloquants. On peut également noter que NAD et OXP qui sont quantifiés dans respectivement 50 et 25% des échantillons, présentent des teneurs moyennes inférieures à 1 ng/g. De plus, pour ACE, ATE et PROP, les teneurs les plus élevées sont mesurées dans les boues issues de la STEP CA3 qui met en œuvre un procédé de type boue activée moyenne charge.

Pour les estrogènes, plusieurs valeurs de teneur dans les boues biologiques ont été rapportées dans la littérature. Pour E1, une bonne correspondance est notée entre les teneurs obtenues dans cette étude et celles précédemment publiées : E1 a été quantifié en moyenne entre 6 et 37 ng/g (Ternes *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2005; Herry-Leroy *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2008). Seul un auteur n'a jamais quantifié cette molécule dans les boues biologiques (n = 2) (Joss *et al.*, 2004). Pour βE2, les teneurs généralement rapportées dans la littérature sont plus faibles que celles mesurées ici (i.e. 34 ± 8 ng/g) : entre 0,3 et 11 ng/g (Ternes *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2003; Joss *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2005; Herry-Leroy *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2008). Enfin, les teneurs de EE2 mesurées varient entre 0,42 et 9 ng/g (Ternes *et al.*, 2002; Joss *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2008), alors que nous ne l'avons pas quantifié.

Concernant les bêtabloquants, seules 2 molécules ont été étudiées précédemment (Radjenovic *et al.*, 2009a). Le PROP a été mesuré à des teneurs moyennes variant entre 33 et 47 ng/g en fonction du procédé (boue activée ou bioréacteur à membranes, n = 7 pour chaque type de boue). Ces valeurs sont donc 2 à 3 fois plus faibles que celles mesurées dans notre étude, cependant l'étude présentée par Radjenovic *et al.* (2009a) n'a été menée que sur un seul site échantillonné sur 7 semaines consécutives. Pour ATE, les teneurs moyennes mesurées varient entre < 5,6 ng/g dans les bioréacteurs à membranes et 63 ng/g dans les boues activées, ce qui est dans la même gamme de teneurs que les mesures réalisées dans notre étude.

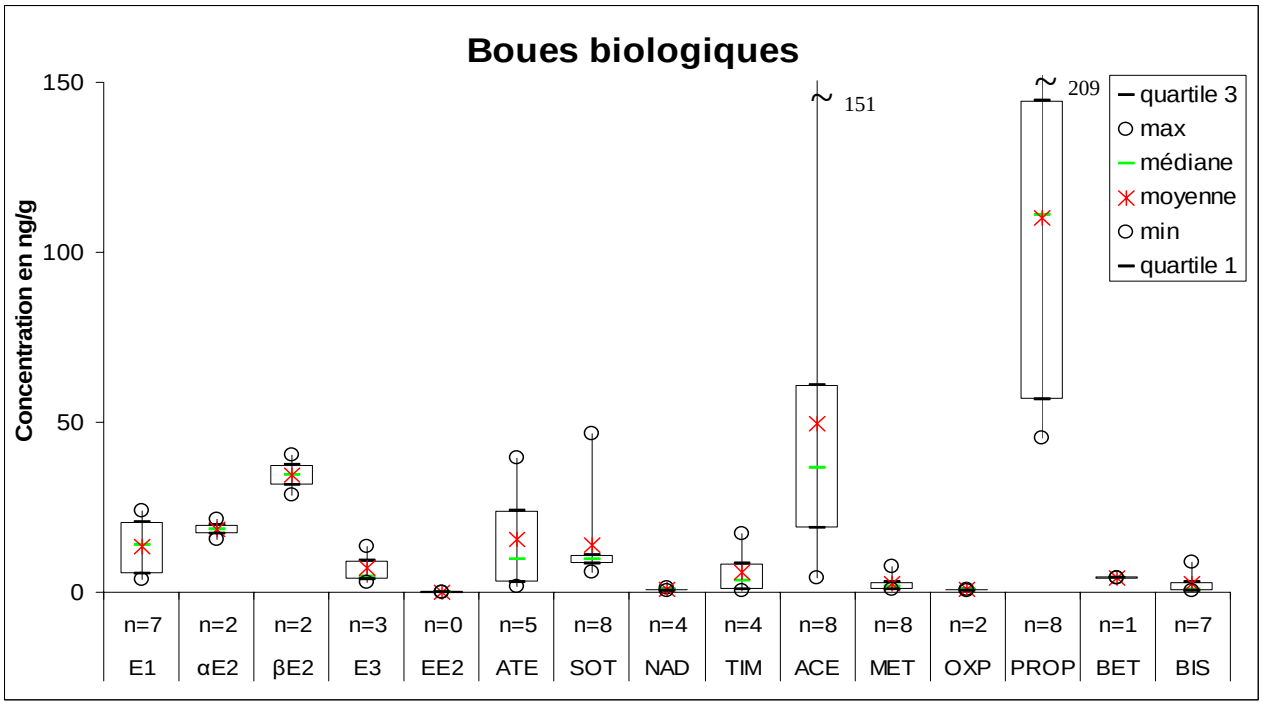


Figure 13 : Teneurs en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans 8 boues biologiques en ng/g de poids sec (représentation par boîte à moustaches : valeurs minimum et maximum (o), médiane (-), moyenne (*), premier et troisième quartile); n : nombre de données quantifiées.

3.2.2.d. Teneurs mesurées dans les boues tertiaires

Parmi les échantillons analysés, seules 2 boues sont issues d'un traitement tertiaire (décanteur tertiaire et lagune tertiaire). Les résultats obtenus montrent que seuls SOT, ACE et PROP sont quantifiés dans tous les échantillons (tableau 23). Sur les 15 molécules analysées, 9 ne sont jamais quantifiées : αE2, E3, EE2, ATE, BET, MET, NAD, OXP et TIM. Ces molécules correspondent généralement aux composés les plus hydrophiles (ATE et NAD) et aux molécules les moins quantifiées dans les phases dissoutes des effluents issus du traitement biologique (αE2, E3, EE2, BET, NAD, OXP et TIM). Pour les molécules quantifiées, les teneurs restent relativement faibles : entre 3,5 et 33 ng/g. De plus, parmi les différentes catégories de boues analysées, les boues tertiaires sont celles contenant les plus faibles teneurs d'estrogènes et de bêtabloquants. Ce résultats est cependant à nuancer dans la mesure où seules 2 boues tertiaires ont été analysées.

Dans la littérature, aucune donnée présentant des teneurs d'estrogènes et de bêtabloquants dans les boues tertiaires n'a été trouvée.

Tableau 23 : Teneurs en estrogènes et en bêtabloquants en ng/g de poids sec mesurées dans les échantillons de boues tertiaire

	E1 n=1	αE2 N=0	βE2 n=1	E3 n=0	EE2 n=0	ACE n=2	ATE n=0	BET n=0	BIS n=1	MET n=0	NAD N=0	OXP n=0	PROP n=2	SOT n=2	TIM n=0
Boue 27	<2,2	<2,1	<21,2	<10,8	<29,3	13,0	<0,1	<0,1	<0,2	<0,7	<0,2	<2,0	32,7	6,8	<0,1
Boue 247	3,5	< 0,2	7,1	< 1,1	< 3,3	16,9	< 0,1	< 0,1	1,3	< 0,4	< 0,4	< 0,2	24,8	5,0	< 0,1

n : nombre de données quantifiées

3.2.2.e. Teneurs mesurées dans les boues mixtes

Parmi les échantillons analysés, seules 2 boues sont des boues mixtes (tableau 24). Les résultats obtenus montrent que EE2 et TIM ne sont jamais quantifiés, alors que E1, ACE, ATE, BIS, PROP et SOT le sont systématiquement. Ce sont ACE et PROP que l'on retrouve aux plus fortes teneurs (jusqu'à 187 ng/g pour ACE et 134 ng/g pour PROP).

Tableau 24 : Teneurs en estrogènes et en bêtabloquants en ng/g de poids sec mesurées dans les échantillons de boues mixtes

	E1 n=2	αE2 N=1	βE2 n=1	E3 n=1	EE2 n=0	ACE n=2	ATE n=2	BET n=1	BIS n=2	MET N=1	NAD n=1	OXP n=1	PROP n=2	SOT n=2	TIM n=0
Boue 233	34,4	20,9	23,4	18,1	< 6,0	186,5	54,1	0,6	12,8	10,3	1,4	0,6	134,0	5,1	< 0,4
Boue 37	6,1	< 3,1	< 3,1	< 0,5	< 7,1	21,1	6,1	<0,3	0,5	<1,8	<0,3	<0,9	65,8	22,6	<1,2

n : nombre de données quantifiées

3.2.2.f. Teneurs mesurées dans les boues déshydratées

Sur les 5 échantillons de boue déshydratée analysés, seuls ACE, BIS, PROP et SOT sont toujours quantifiés (figure 14). EE2 est la seule molécule jamais quantifiée dans ce type d'échantillon. Les molécules quantifiées aux plus fortes teneurs sont ACE, ATE, SOT et PROP avec des valeurs moyennes supérieures à 55 ng/g. Les bêtabloquants restant sont quantifiés en moyenne entre 1 et 12 ng/g et les teneurs moyennes des estrogènes varient entre 10 et 26 ng/g.

Pour les estrogènes, ces résultats correspondent aux résultats rapportés dans la littérature. En effet, dans les boues déshydratées, E1 a été quantifiée entre 2 et 54 ng/g (Braga *et al.*, 2005; Herry-Leroy *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2008) et βE2 a été quantifiée entre 0,6 et 27 ng/g (Braga *et al.*, 2005; Herry-Leroy *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2008). Concernant les bêtabloquants, aucune donnée n'a été trouvée dans la littérature.

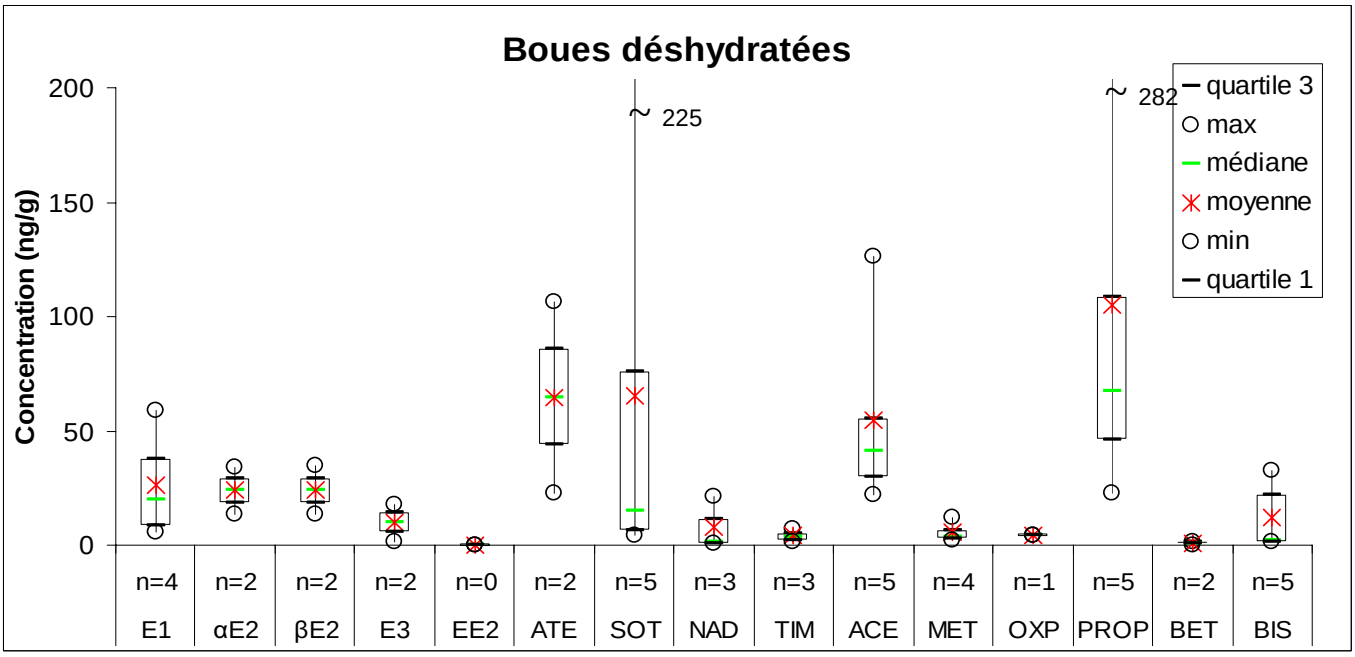


Figure 14 : Teneurs en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans 5 boues déshydratées en ng/g de poids sec (représentation par boîte à moustaches : valeurs minimum et maximum (o), médiane (-), moyenne (*), premier et troisième quartile); n : nombre de données quantifiées.

3.2.2.g. Teneurs mesurées dans les boues traitées

Au total, 10 échantillons de boue traitée ont été analysés (figure 15). Seuls E1, ACE et PROP sont quantifiés dans tous les échantillons analysés. Ces molécules correspondent également aux substances mesurées aux plus fortes teneurs : teneurs moyennes de 30, 40 et 149 ng/g pour ACE, E1 et PROP, respectivement. En revanche, αE2 et EE2 ne sont jamais quantifiés. Pour les autres molécules, les teneurs moyennes sont inférieures à 12 ng/g.

D'une manière générale, on peut remarquer que les teneurs mesurées dans les boues traitées sont généralement inférieures à celles mesurées dans les boues déshydratées. Seuls E1, PROP et TIM présentent des teneurs moyennes supérieures dans les boues traitées : 40 ng/g contre 26 ng/g pour E1, 5 ng/g contre 4 ng/g pour TIM et 149 ng/g contre 105 ng/g pour PROP. Cependant, pour E1 et TIM, on peut considérer que les différences entre les teneurs mesurées dans les boues déshydratées et traitées ne sont pas significatives. Pour PROP, la moyenne calculée dans les boues traitées est influencée par la teneur très élevée mesurée dans un échantillon (766 ng/g) et la comparaison des médianes (72 ng/g dans les boues traitées et 68 ng/g dans les boues déshydratée) révèle, là encore, une différence non significative.

Dans la littérature, plusieurs auteurs rapportent des teneurs d'estrogènes dans les boues traitées. Généralement, il s'agit de boues digérées (Ternes *et al.*, 2002 ; Andersen *et al.*, 2003), cependant certaines publications font référence à différents types de traitement des boues. Ainsi, Janex-Habibi *et al.* (2009) ont analysé différentes boues traitées (digérées, séchées thermiquement, compost) mais présentent seulement les valeurs minimum et maximum obtenues, tous types de boues confondues. Par ailleurs, certains auteurs ne précisent pas le type de traitement des boues utilisé (Herry-Leroy *et al.*, 2006). Les résultats présentés dans la littérature sont globalement en cohérence avec les résultats obtenus dans notre étude. Ainsi, E1 est quantifié entre 2,5 et 28 ng/g (Ternes *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2003; Herry-Leroy *et al.*, 2006) et sa teneur peut même atteindre 107 ng/g (Janex-Habibi *et al.*, 2009). Pour βE2, les teneurs mesurées varient entre 4,5 et 49 ng/g (Ternes *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2003; Herry-Leroy *et al.*, 2006; Janex-Habibi *et al.*, 2009). Par ailleurs, EE2 non quantifiée par certains auteurs (Andersen *et al.*, 2003; Herry-Leroy *et al.*, 2006) (n = 2 et 1, respectivement) est quantifiée dans une boue digérée entre 2 et 17 ng/g par Ternes et al (2002) (n = 2). Enfin, αE2 qui n'est pas toujours quantifiée peut atteindre 2,1 ng/g (Janex-Habibi *et al.*, 2009). Pour les bêtabloquants, des teneurs de ATE et PROP ont été présentées dans des boues digérées (n = 7) ; les teneurs moyennes mesurées sont 7 et 26 ng/g pour ATE et PROP, respectivement (Radjenovic *et al.*, 2009a).

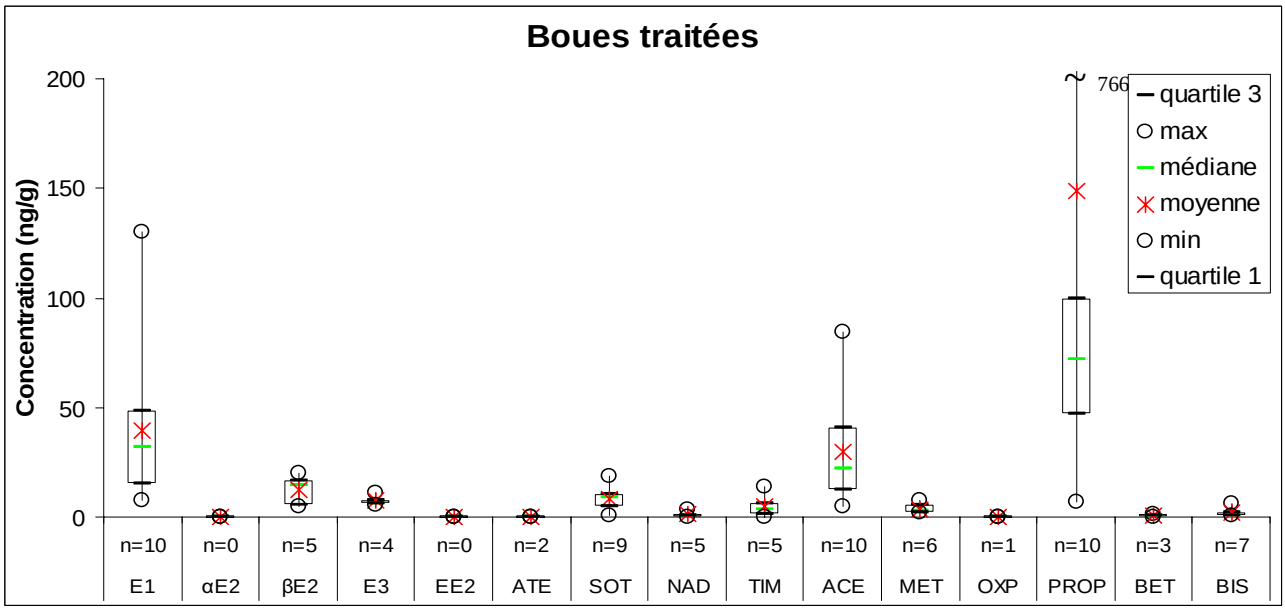


Figure 15 : Teneurs en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans 10 boues traitées en ng/g de poids sec (représentation par boîte à moustaches : valeurs minimum et maximum (o), médiane (-), moyenne (*), premier et troisième quartile); n : nombre de données quantifiées.

3.2.2.h. Calcul des coefficients de sorption

Le Kd est le coefficient caractérisant la distribution à l'équilibre d'une molécule entre une phase solide (ici la boue) et une phase liquide (phase dissoute). Dans ce paragraphe, des coefficients de sorption (en L/kg) sont calculés pour les boues primaires, biologiques et tertiaires. Pour les boues biologiques, afin d'avoir un résultat significatif, seules les boues issues de bassins à boue activée sont utilisées pour le calcul du Kd. Les Kd sont calculés comme suit :

$$K_{d,boue-eau} \frac{C_{i,adsorbé}}{C_{i,dissous}} \times 10^3$$

avec $C_{i,\ adsorbé}$ la teneur mesurée dans les boues en ng/g

$C_{i,\ dissous}$ la concentration mesurée dans la phase dissoute en ng/L

Pour le calcul des Kd, on prend comme hypothèse que :

- Pour les boues primaires, la concentration dans la phase liquide est égale à celle mesurée dans les influents.
- Pour les boues activées, la concentration dans la phase liquide est égale à celle mesurée en sortie de traitement primaire ou dans les influents (pour les stations non équipées de traitement primaire).
- Pour les boues tertiaires, la concentration dans la phase liquide est égale à celle mesurée en sortie de traitement secondaire.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 25.

Tableau 25 : Coefficients de distribution boue/eau (Kd en L/kg) calculés pour les estrogènes et les bêtabloquants dans les boues primaires, les boues biologiques de type boue activée et les boues tertiaires

	Log Kow	Boues primaires		Boues biologiques (de type boue activée)		Boues tertiaires	
		Kd	CV (%)	Kd	CV (%)	Kd	CV (%)
E1	3,1 – 4,0	433	50	132	69	1756	NA
αE2	3,1 – 4,0	8240	NA	/	NA	/	NA
βE2	3,1 – 4,0	1291	64	/	NA	/	NA
E3	2,6 – 2,8	99	16	28	87	/	NA
EE2	3,7 – 4,1	/	NA	/	NA	/	NA
ACE	1,42	62	101	17	123	86	11
ATE	-0,026 – 0,46	25	2	9	130	/	NA
BET	3,265	82	NA	/	NA	/	NA
BIS	1,69 – 1,84	30	101	6	89	9	NA
MET	1,69	36	60	9	59	/	NA
NAD	0,71 – 1,17	34	7	5	83	/	NA
OXP	1,83	83	NA	/	NA	/	NA
PROP	2,60 – 3,585	1267	129	355	48	53	123
SOT	0,24 – 0,37	17	80	18	51	8	83
TIM	1,75 – 1,761	3511	NA	/	NA	/	NA

/ : pas calculé car molécule non quantifiée dans la phase liquide et/ou la boue
NA : moins de 2 valeurs disponibles

Pour les estrogènes, les Kd calculés pour les boues primaires peuvent atteindre 8240 L/kg ; cette valeur a été obtenue pour βE2 dans un seul échantillon. E3 est l'estrogène le plus hydrophile et présente les Kd les plus faibles. D'une manière générale, comme déjà observé par Radjenovic *et al.* (2009b) pour les bêtabloquants, on peut noter que les Kd les plus élevés sont obtenus dans les boues primaires.

Pour les bêtabloquants, les Kd les plus élevés sont généralement obtenus pour PROP qui est le bêtabloquant le plus hydrophobe. De plus, un Kd élevé est calculé pour TIM dans les boues primaires. Cependant, ce résultats est a nuancé car il provient d'une seule valeur. Dans les boues primaires et les boues activées, Radjenovic *et al.* (2009b) avaient calculés pour PROP des Kd de 641±478 et 366±138 L/kg, respectivement. Pour ATE, cette même étude rapporte des Kd de 95±60 et 64±88 L/kg dans les boues primaires et activées, respectivement. D'une manière générale, pour les bêtabloquants, seul PROP présente des valeurs de Kd élevées ; ceci montre que mis à part cette molécule, les bêtabloquants auront une faible tendance à s'adsorber sur les boues (i.e. Kd < 500 L/kg ; Ternes *et al.*, 2004).

3.2.2.i. Conclusion

Les résultats présentés dans cette partie permettent de faire un premier état des lieux des teneurs mesurées dans les boues issues de station d'épuration. Ces données sont d'autant

plus précieuses pour les bêtabloquants que seulement une publication a étudié la présence de ces molécules dans ce type de matrice (Radjenovic *et al.*, 2009b); cette publication ne rapportant des données que pour 2 bêtabloquants, ATE et PROP. Cette analyse a permis de mettre en évidence la présence d'estrogènes et de bêtabloquants dans les boues aux différents stades de traitement. Quel que soit le type de boue, les molécules retrouvées en plus forte teneur sont ACE et PROP ; ces molécules correspondent (avec ATE et SOT) aux bêtabloquants les plus concentrés dans la phase dissoute des eaux de STEP (influents et effluents). ATE et SOT, étant plus hydrophiles (log Kow < 0,5) il n'est pas surprenant de les retrouver à de plus faibles teneurs dans les boues. En ce qui concerne les estrogènes, c'est E1 que l'on quantifie le plus souvent et à une teneur moyenne de 29 ng/g.

A partir des valeurs mesurées dans les boues et dans les phases dissoutes correspondantes, des Kd ont été calculés. Pour toutes les molécules étudiées, les Kd les plus élevés sont généralement obtenus pour les boues primaires. Pour les estrogènes dans les boues primaires, des Kd relativement élevés ont été obtenus pour E1, αE2 et βE2 ce qui met en évidence la capacité de ces composés à s'adsorber sur les boues. Parmi les bêtabloquants étudiés, seul PROP et, dans une moindre mesure, TIM (une seule valeur de Kd calculée), semblent montrer une tendance à s'adsorber sur les boues. Pour les autres bêtabloquants, l'adsorption est a priori un phénomène mineur.

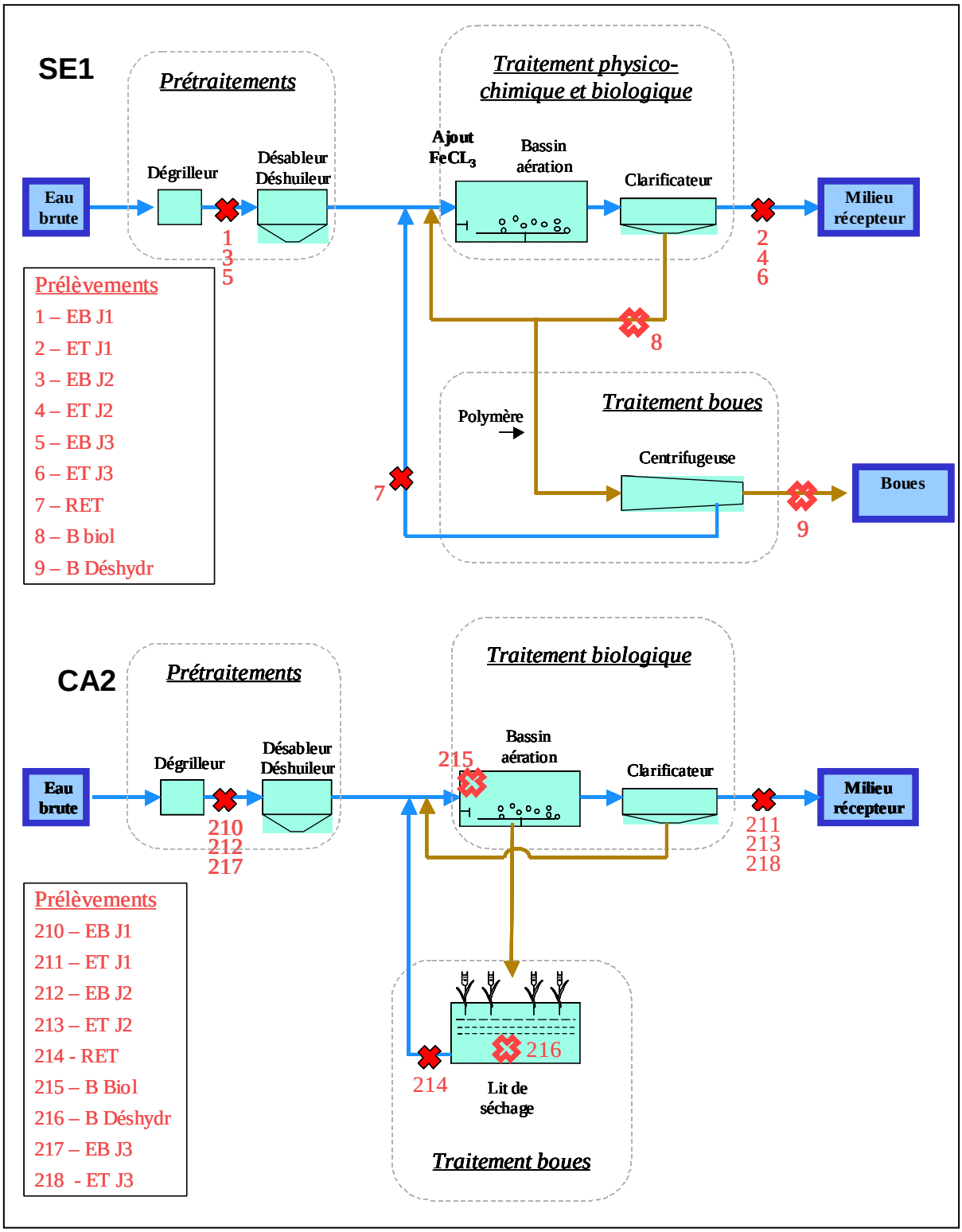
L'objectif de ce travail était de réaliser un état des lieux des teneurs en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans les différentes catégories de boues définies. Il ne s'agissait donc pas d'éavluer l'impact des traitements des boues sur les molécules cibles. Cependant, la comparaison des teneurs mesurées dans les boues déshydratées avec celles mesurées dans les boues traitées, semble mettre en évidence un léger impact du traitement des boues sur l'élimination des molécules ciblées. Néanmoins, la différence observée entre les niveaux de teneurs est faible et des études supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier cette tendance. Une étude des différents procédés de traitement (chaulage, digestion, compostage, etc.) permettrait également d'observer plus spécifiquement l'impact et l'efficacité du type de traitement sur l'élimination de ces substances.

3.2.3 Bilan matière global sur 2 installations de type boue activée faible charge

Un bilan global prenant en compte à la fois les concentrations présentes dans les phases dissoutes et particulaires (matières en suspension et boues) des échantillons a été réalisé sur 2 STEP de type boue activée faible charge. L'objectif est dans un premier temps d'évaluer les flux d'estrogènes et de bêtabloquants transitant dans la STEP et de déterminer les abattements de ces molécules par la filière eau. Dans un deuxième temps, il s'agit également d'évaluer le taux de dégradation des estrogènes et des bêtabloquants dans le bassin d'aération afin de déterminer si ces micropolluants sont dégradés lors du traitement biologique ou s'ils sont simplement concentrés dans les boues.

Ce bilan a été réalisé sur 2 installations : SE1 et CA2 (figure 16). Le choix s'est porté sur ces deux stations pour plusieurs raisons :

- Il s'agit de stations de type boue activée faible charge ce qui représente la majorité du parc français.
- Ces stations (boue activée faible charge à aération prolongée) réalisent une élimination poussée du carbone et de l'azote (dans l'eau traitée DBO_5 < 5 mgO_2/L, NH_4-N = 1 mgN/L, NO_3-N < 5 mgN/L).
- Ces stations reçoivent principalement des effluents domestiques.
- Ces stations ont été échantillonnées sur 3 jours consécutifs (et pas 2 comme d'autres STEP du programme AMPERES).



EB : influent ; ET : effluent ; RET : retour en tête ; B Biol : boue biologique ; B Déshydr : boue déshydratée

Figure 16 : Schéma des stations d'épuration SE1 et CA2 avec indication des points de prélèvement (d'après Pomies, 2008)

Les stations SE1 et CA2 sont constituées d'une filière de traitement des eaux et d'une filière de traitement des boues. Les eaux brutes subissent tout d'abord un prétraitement

(dégrillage, dessablage, dégraissage), puis un traitement biologique (de type boue activée faible charge), une décantation gravitaire, avant d'être rejetées dans le milieu aquatique. A noter cependant qu'un traitement physico-chimique est ajouté pour la station SE1 (ajout de $FeCl_3$).

Les eaux sont prélevées en entrée de filière eau (après le dégrillage, sur 3 jours consécutifs : échantillons 1, 3 et 5 pour SE1 et 210, 212 et 217 pour CA2) et en sortie de traitement biologique (sur trois jours consécutifs : échantillons 2, 4 et 6 pour SE1 et 211, 213 et 218 pour CA2). Les boues produites lors du traitement biologique sont extraites du bassin d'aération (échantillons 8 et 215 prélevés de manière représentative). Ces boues sont ensuite déshydratées soit par centrifugation, soit envoyées vers le lit de séchage planté de roseaux. Les boues traitées (échantillons 9 et 216 pour les stations SE1 et CA2, respectivement) sont prélevées de manière à constituer un échantillon représentatif. Enfin, l'eau extraite des boues (centrifugeuse ou lit de séchage), aussi appelée « retour en tête » (RET), est renvoyée dans la filière eau en entrée de traitement biologique (échantillons 7 et 214 pour les stations SE1 et CA2, respectivement).

3.2.3.a. Concentrations totales des estrogènes et des bêtabloquants dans la colonne d'eau (fractions dissoute et particulaire)

Afin de déterminer les abattements des molécules dans les installations, les concentrations totales des échantillons (dissous + particulaire) sont calculées. Pour les échantillons issus de la filière eau, les approximations suivantes sont réalisées :

- Comme on ne peut pas réaliser de déconjugaison sur les solides, on considère que les concentrations en hormones libres mesurées dans les boues et les MES sont égales aux concentrations en hormones totales (formes libres + conjuguées). Autrement dit, les concentrations en hormones conjuguées sont considérées comme nulles dans les solides. Cette hypothèse de travail est également défendue par le fait que les hormones conjuguées sont plus hydrophiles que les hormones non conjuguées et auront donc moins tendance à s'adsorber sur les particules (Lévesque *et al.*, 2001).
- Lorsque les analytes sont quantifiés dans la phase dissoute et non quantifiés dans la phase particulaire, la concentration totale (C_{tot}) est estimée égale à la concentration de la phase dissoute ($C_{dissous}$).
- Lorsque les analytes ne sont pas quantifiés dans les phases dissoutes et particulaires, on considère que C_{tot} est inférieure à $LQ_{dissous}$.

Pour l'échantillon de RET, seule la phase dissoute a été analysée. Pour le calcul de la concentration totale, il faut donc estimer la concentration de la phase particulaire. Pour cela, on multiplie le taux de MES dans le RET par la concentration (µg/gMS) mesurée dans les boues traitées (échantillons 9 et 216).

Les concentrations totales mesurées dans la colonne d'eau ainsi que les partitions dissous/totale sont présentées dans le tableau 26.

Tableau 26 : Concentrations totales (dissous + particulaire) en hormones et en bêtabloquants dans les échantillons de la filière eau et le retour en tête (RET) et partition dissous/total (%) des molécules pour les stations SE1 et CA2

SE1	Molécule	Concentration (ng/L)							Partition dissous/total (%)					
		Influent			Effluent			RET	Influent			Effluent		
		1	3	5	2	4	6	7	1	3	5	2	4	6
Estrogènes	E1	116,3	114,5	87,3	8,3	5,0	6,2	5,7	93	91	92	99*	98*	94*
	αE2	<7,0	<10,4	<11,4	<5	<5,0	<3,3	<2,2	/	/	/	/	/	/
	βE2	37,2	34,8	28,9	<0,5	<4,9	<0,3	<0,2	94*	98	100	/	/	/
	E3	510,7	489,5	344,0	<3,7	<0,7	<1,1	0,8	98	98	97*	/	/	/
Bêtabloquants	ACE	2869	2940	2428	39,2	36,9	40,8	48,9	97	97	96	96	99	98
	ATE	1674	1537	3034	686,6	919,3	924,6	351,7	100	100	99	100*	100	100
	BET	37,5	29,0	37,0	< 2,8	< 0,9	< 2,8	< 0,4	99*	100*	88	/	/	/
	BIS	264,3	247,1	290,0	53,2	49,3	53,9	40,5	97	98	96	100	99	99
	MET	290,5	203,0	267,8	60,9	59,2	62,6	54,8	100*	100*	95	100*	100*	100*
	NAD	214,3	142,3	157,2	9,6	8,3	10,4	10,6	70	55	97	99*	99*	99*
	OXP	< 1,7	< 0,4	< 0,5	2,4	1,9	3,0	< 4,5	/	/	/	96*	95*	97*
	PROP	490,3	817,5	773,6	399,4	372,9	366,9	518,0	70	86	58	99	99	98
	SOT	748,5	651,7	623,3	755,2	428,2	443,7	733,3	96	95	95	100	100	100
	TIM	<0,4	<0,4	< 0,4	7,7	7,1	6,7	8,8	/	/	/	99*	99*	99*

CA2	Molécule	Concentration (ng/L)							Partition dissous/total (%)					
		Influent			Effluent			RET	Influent			Effluent		
		210	212	217	211	213	218	214	210	212	217	211	213	218
Estrogènes	E1	117,6	76,6	99,4	20,6	12,8	7,7	3,0	65	93	87	99	99*	90*
	αE2	9,0	4,6	6,5	< 1,1	< 0,6	< 0,8	< 1,0	89	88*	90*	/	/	/
	βE2	21,8	13,9	19,3	3,3	1,4	< 0,4	< 0,5	87	91*	95	97*	93*	/
	E3	293	294	348	< 2,7	< 1,9	< 1,9	< 3,7	97	99	98	/	/	/
Bêtabloquants	ACE	1466	1911	2026	273	198	190	76,7	91	96	97	100	100	98
	ATE	1390	1713	1577	1085	890	970	486	96	98	98	100	100	100
	BIS	311	442	387	146	120	117	62,2	94	97	98	100	100	99
	MET	257	309	312	363	275	272	151	98	99	99	100	100	100
	NAD	254	389	373	43	38	43	18,2	95	98	98	99	100	99
	OXP	9,6	9,1	7,3	< 2,2	< 2,2	< 2,2	< 2,2	42*	44*	49*	/	/	/
	PROP	247	195	235	171	138	165	69,3	86	88	90	99	99	97
	SOT	2374	3258	2712	2394	1814	1942	1483	97	98	98	100	100	100
	TIM	< 2,8	< 2,8	< 2,8	< 8,2	< 8,2	< 7,2	0,01	/	/	/	/	/	/

EE2 non quantifié dans tous les échantillons (SE1 et CA2) et BET non quantifié dans les échantillons CA2 ; / : molécule non quantifiée ; * : calcul réalisé avec la valeur de LQ

Les résultats présentés dans le tableau 26 montrent que la majeure partie des hormones se concentre dans la phase dissoute. En effet, que ce soit pour les influents ou les effluents, plus de 90% des hormones sont généralement présentes sous forme dissoute (87 à 100% dans les influents et 90 à 99% dans les effluents). Seule E1 dans un échantillon d'influent de la STEP CA2 présente une plus faible proportion dans la phase dissoute (65%). Cette observation est en accord avec la littérature qui met en évidence qu'en général, plus de 90% des estrogènes étudiés (E1, αE2, βE2 et EE2) se trouvent dans la phase dissoute (Janex-Habibi *et al.*, 2009). Pour les bêtabloquants, le même constat peut être réalisé : la plupart des bêtabloquants étudiés est majoritairement présente dans la phase dissoute (86 à 100%). Néanmoins, dans 2 des 3 effluents de la campagne SE1, NAD et PROP présentent des répartitions différentes : 50 et 70% pour NAD et 58 et 70% pour PROP. De plus, OXP présente également un comportement différent : dans les influents de la campagne CA2, seulement 42 à 49% de cette molécule est présente dans la phase dissoute. Les propriétés physico-chimiques prises en compte (log Kow et solubilité dans l'eau) ne permettent pas, a priori, d'expliquer ce comportement dans la mesure où OXP et NAD ne sont ni les bêtabloquants ayant les plus fortes valeurs de log Kow, ni ceux présentant la plus faible solubilité dans l'eau. Pour le PROP en revanche, ces résultats sont moins surprenants dans la mesure où ce bêtabloquant est le plus hydrophobe.

3.2.3.b. Teneurs en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans les boues

Les teneurs mesurées dans les boues sont présentées dans le tableau 27. Comme pour les MES, on considère que la teneur en hormones libres mesurée dans la boue est égale à la teneur en hormones totales (formes libres + conjuguées).

Tableau 27 : Teneurs en hormones et en bêtabloquants mesurées dans les échantillons de boue en ng/g de matière sèche

	Molécule	Log Kow	Teneur (ng/g)			
			SE1		CA2	
			Boue 8 (entrée)	Boue 9 (sortie)	Boue 215 (entrée)	Boue 216 (sortie)
Estrogènes	**E1**	3,1 – 4,0	5,5	5,4	3,6	7,3
	αE2	3,1 – 4,0	< 1,5	< 1,5	< 3,0	< 0,5
	βE2	3,1 – 4,0	< 4,5	< 4,5	< 3,0	< 1,1
	E3	2,6 – 2,8	4,7	1,5	< 0,4	< 0,4
	EE2	3,7 – 4,1	<16,1	<13,2	< 6,3	< 7,1
Bêtabloquants	**ACE**	1,42	40,4	40,8	4,1	4,7
	ATE	-0,026 – 0,46	<0,1	<0,2	2,9	<1,1
	BET	3,265	<0,1	<0,3	<0,2	<3,6
	BIS	1,69 – 1,84	1,0	2,0	0,6	<1,8
	MET	1,69	1,9	3,1	1,1	<1,8
	NAD	0,71 – 1,17	1,2	1,4	<0,2	<4,6
	OXP	1,83	<2,0	<0,8	<0,9	<14,4
	PROP	2,60 – 3,585	157	282	45,2	42,5
	SOT	0,24 – 0,37	12,3	14,6	9,8	4,6
	TIM	1,75 – 1,761	5,6	7,4	1,2	<0,7

Pour les estrogènes, seul E1 est quantifié dans tous les échantillons de boue à des teneurs de 3,6 et 7,3 ng/g. Cet estrogène est celui le plus quantifié dans les effluents de STEP et possédant la plus faible solubilité dans l'eau (0,8 à 12,4 mg/L). Par ailleurs, on peut noter que les teneurs mesurées dans les boues d'entrée et de sortie de filière sont du même ordre de grandeur, ce qui met en évidence que la déshydratation mécanique et le lit de séchage ne permettent pas de diminuer la teneur spécifique des estrogènes dans les boues. Dans les boues issues de la STEP SE1 (boues 8 et 9), on quantifie également E3 à des teneurs de 4,7 et 1,5 ng/g. Cette observation est plus étonnante dans la mesure où cette molécule est la plus hydrophile des estrogènes étudiés et où elle n'est pas quantifiée en sortie de STEP. Cette molécule est en revanche l'estrogène quantifié aux plus fortes concentrations dans les influents.

Pour les bêtabloquants, OXP et BET ne sont jamais quantifiés alors que ACE, PROP et SOT le sont systématiquement. BIS, MET et TIM sont, quant à eux, quantifiés dans tous les échantillons (entre 0,6 et 7,4 ng/g) sauf dans la boue 216. ATE, qui est un des bêtabloquants les plus hydrophiles parmi ceux étudiés (tableau 27) est seulement quantifié dans l'échantillon 215 et à seulement 2,9 ng/g. Enfin, NAD qui est également plutôt hydrophile n'est quantifié que dans la STEP SE1 (à 1,2 et 1,4 ng/g). En terme de niveau de teneur, le PROP qui est, parmi les bêtabloquants étudiés, le moins hydrophile est retrouvé aux plus fortes teneurs dans les boues (entre 42,5 et 282 ng/g). Au contraire, ATE, BIS et NAD sont systématiquement

quantifiés à moins de 3 ng/g dans les boues. Comme observé pour les estrogènes, on remarque que les teneurs mesurées dans les échantillons de boue en entrée et en sortie de filière sont similaires ; seul PROP voit sa teneur augmenter entre les boues 8 et 9 (157 à 282 ng/g). Il est cependant difficile de conclure quant à l'efficacité des traitements de la filière boue à éliminer les estrogènes et les bêtabloquants. En effet, il faudrait pour cela faire un bilan plus complet, sur une période plu longue, des flux de boue transitant dans la filière boue et la comparaison des teneurs spécifiques en micropolluants dans les boues ne permet pas de conclure sur cette question pour les procédés à fort temps de séjour.

3.2.3.c. Abattements mesurés dans les STEP

Afin de déterminer l'abattement des molécules dans les STEP, les flux transitant dans la STEP sont estimés en faisant les approximations suivantes :

- Le système fonctionne en régime pseudo-permanent (i.e., système à l'équilibre). L'hypothèse est d'autant plus vraie qu'il n'y a pas de temps de pluie les jours qui précèdent, et que l'extraction des boues a été pratiquée régulièrement le mois qui précède la campagne de mesure.
- Le débit d'eau entrant dans la filière eau est équivalent au débit d'eau sortant de la filière.
- Dans le calcul du flux de boue extraite, on néglige la phase liquide.
- Les flux de la filière eau sont calculés à partir des moyennes des concentrations totales obtenues sur les 3 jours de prélèvement.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 28. Ce tableau présente les valeurs des différents flux transitant dans la STEP. Pour la filière eau (phase dissoute + particulaire) qui est échantillonnée pendant 3 jours consécutifs, des valeurs extrêmes (min et max) sont également présentées afin de pouvoir estimer les variations de ces flux. On remarque ainsi que, dans l'ensemble, les valeurs de flux varient peu sur 3 jours consécutifs (environ 20% de variation observée).

Tableau 28 : Flux d'estrogènes et de bêtabloquants (phases dissoutes et particulaires) transitant dans la STEP en mg/j

		Flux (mg/j)							
		SE1				CA2			
	Molécules	Entrée filière eau (min – max)	RET	Boue extraite	Sortie filière eau (min – max)	Entrée filière eau (min – max)	RET	Boue extraite	Sortie filière eau (min – max)
Estrogènes	E1	449 (370 – 492)	1,7	13,4	28 (21 – 35)	157 (123 – 188)	0,5	0,9	22 (12 – 33)
	αE2	< 48,3	<0,7	<3,7	< 21	11 (7 – 14)	< 0,2	< 0,8	< 1,8
	βE2	142 (122 – 158)	<0,1	<11,0	< 21	29 (22 – 35)	< 0,1	< 0,8	4 (2 – 5)
	E3	1897 (1457 – 2162)	0,2	11,6	< 16	499 (469 – 557)	< 0,6	< 0,1	< 4,3
Bêtabloquants	ACE	11624 (10280 – 12448)	14,5	98,9	165 (156 – 173)	2883 (2346 – 3244)	12,7	1,0	353 (303 – 437)
	ATE	8813 (6509 – 12845)	104,5	<0,2	3571 (2907 – 3915)	2497 (2225 – 2743)	80,7	0,7	1571 (1425 – 1736)
	BET	146 (123 – 159)	<0,1	<0,2	< 27,9	< 3,5	< 0,3	< 0,1	< 10,6
	BIS	1131 (1046 – 1228)	12,0	2,5	221 (209 – 228)	608 (497 – 707)	10,3	0,1	205 (188 – 234)
	MET	1074 (860 – 1230)	16,3	4,6	258 (251 – 265)	469 (412 – 499)	25	0,3	485 (435 – 582)
	NAD	725 (602 – 907)	3,2	2,8	40 (35 – 44)	542 (407 – 623)	3,0	< 0,1	67 (61 – 70)
	OXP	<7,2	<1,3	<4,9	10 (8 – 13)	14 (12 – 15)	< 0,4	< 0,2	< 3,5
	PROP	2938 (2076 – 3461)	153,8	383,8	1608 (1553 – 1691)	361 (312 – 395)	11,5	11,5	253 (221 – 273)
	SOT	2856 (2639 – 3169)	217,8	30,2	2296 (1813 – 3197)	4453 (3801 – 5216)	246	2,5	3282 (2904 – 3832)
	TIM	<11,9	2,6	13,7	30 (29 – 33)	< 4,5	0,002	0,3	< 13,1

EE2 jamais quantifié

Les abattements de la filière eau (phase dissoute + particulaire) et de la station dans son ensemble sont ensuite calculés comme suit :

- abattement de la filière eau (prétraitement + traitement biologique) :

$$\frac{(flux\ entrée\ eau + flux\ RET) - (flux\ sortie\ eau + flux\ boue\ extraite)}{flux\ entrée\ eau + flux\ RET} \times 100$$

- abattement global de la station d'épuration (filières eau + boue) :

$$\frac{flux\ entrée\ eau - flux\ sortie\ eau}{flux\ entrée\ eau} \times 100$$

Les abattements calculés sont présentés dans le tableau 29.

Tableau 29 : Abattements (%) du traitement biologique (filière eau) et de la station globale (filières eau + boue) calculés pour les hormones estrogéniques et les bêtabloquants en tenant compte des phases dissoutes et particulaires

	Molécule	Abattement (%)			
		SE1		CA2	
		Traitement biologique - filière eau -	Station globale - filières eau + boue - (min – max)	Traitement biologique - filière eau -	Station globale - filières eau + boue - (min – max)
Estrogènes	**E1**	91	94 (90 – 96)	85	86 (73 – 93)
	αE2	/	/	76*	83* (75* – 93*)
	βE2	78*	85* (83* – 87*)	87	87 (76 – 93)
	E3	99	99* (99* – 99*)	99*	99* (99* – 99*)
Bêtabloquants	**ACE**	98	99 (98 – 99)	88	88 (81 – 91)
	ATE	60	59 (40 – 77)	39	37 (22 – 48)
	BET	81*	92* (90* – 93*)	/	/
	BIS	80	80 (78 – 83)	67	66 (53 – 73)
	MET	76	76 (69 – 80)	2	-4 (-41 – 13)
	NAD	95	94 (93 – 96)	88	88 (83 – 90)
	PROP	36	45 (19 – 55)	29	30 (12 – 44)
	SOT	24	20 (-21 – 43)	30	26 (-1 – 44)

*abattement calculé avec valeur LQ ; EE2 jamais quantifié ; / : non calculable (molécule non quantifiée) ; calculs non réalisés pour TIM et OXP qui sont quantifiés à de très faibles concentrations

Bien que quantifiés, TIM et OXP sont mesurés à des concentrations proches des limites de quantification. Compte tenu de l'incertitude analytique liée à ces résultats, les abattements ne sont donc pas calculés.

Les résultats présentés dans le tableau 29 mettent en évidence que l'élimination des estrogènes se fait au niveau du traitement biologique de la filière eau. Pour presque toutes les molécules, des abattements supérieurs à 85% en moyenne sont obtenus lors du traitement biologique. Seules αE2 dans la campagne CA2 et βE2 dans la campagne SE1 présentent un abattement inférieur à 85% (76 et 78%, respectivement), cependant, ces molécules ne sont pas quantifiée en sortie de traitement biologique (calculs réalisés avec valeurs des LQ). On peut donc en conclure que tous les estrogènes étudiés sont éliminés efficacement par le traitement de type boue activée faible charge.

En ce qui concerne les bêtabloquants, alors que ACE, BET, BIS, et NAD sont bien éliminés par le traitement biologique (abattements moyens supérieurs à 67%), PROP et SOT sont peu impactés par ce traitement (abattements moyens inférieurs à 36%). De plus, avec des abattements de 39 et 60% en moyenne, ATE est moyennement éliminé par le traitement biologique. Enfin, MET présente des comportements différents dans les 2 STEP étudiées : bien éliminé dans la STEP SE1, le MET n'est pas impacté par le traitement dans la STEP CA2 (abattements de 76 et 2%, respectivement).

Une comparaison des abattements obtenus pour le traitement biologique avec et sans prise en compte des concentrations des MES est ensuite réalisée (tableau 30).

Tableau 30 : Comparaison des abattements de la station (filières eau + boue) (%) obtenus pour les estrogènes et les bêtabloquants avec et sans prise en compte des MES

		Abattement global de la STEP – filières eau + boue - (%)			
		SE1		CA2	
		Avec prise en compte des MES	Sans prise en compte des MES	Avec prise en compte des MES	Sans prise en compte des MES
Estrogènes	E1	94	93	86	83
	αE2	/	/	83*	80*
	βE2	85*	94*	87	86
	E3	99*	99*	99*	99*
Bêtabloquants	ACE	99	99	88	87
	ATE	59	59	37	36
	BET	92*	91*	/	/
	BIS	80	80	66	65
	MET	76	76	-4	-5
	NAD	94	93	88	87
	PROP	45	25	30	22
	SOT	20	16	26	25

*abattement calculé avec valeur LQ ; / : non calculable (molécule non quantifiée) ; EE2 jamais quantifiée et TIM et OXP présents à de trop faibles concentrations

Les résultats présentés dans le tableau 30 mettent en évidence des résultats d'abattement similaires si l'on prend ou non en compte les MES, que ce soit pour les estrogènes ou pour les bêtabloquants. En effet, compte tenu de la faible hydrophobie des molécules étudiées, une large proportion de ces molécules se trouve en phase dissoute (généralement plus de 90%). Néanmoins, pour PROP, le bêtabloquant le plus hydrophobe, la prise en compte des MES permet d'augmenter la valeur de l'abattement global de la STEP de 50%. Pour les autres molécules, la prise en compte des concentrations mesurées dans les MES conduit systématiquement à des abattements identiques ou légèrement supérieurs (quelques %). Ce résultat est lié à la forte diminution du taux de MES dans la STEP (0,2 à 0,5 g/L en entrée et 0,01 g/L en sortie).

3.2.3.d. Biodégradation dans le réacteur d'un procédé boues activées aération prolongée

Afin de déterminer si les molécules s'accumulent dans les boues ou si elles sont dégradées (totalement ou en partie) lors du traitement biologique, le taux de dégradation des molécules dans le bassin d'aération est calculé. Pour cela, on calcule les quantités d'estrogènes et de bêtabloquants éliminées dans le bassin de boue activée (influent et RET

auquel est soustrait le flux sortant) pendant une durée équivalente au temps de séjour des boues (18 jours pour SE1 et 16 jours pour CA2). Ces quantités sont comparées aux quantités d'estrogènes et de bêtabloquants adsorbées sur les boues durant la même période : bassin d'aération, clarificateur (estimé à 10% du bassin d'aération) et boue extraite. La différence entre ces deux valeurs permet d'estimer le taux de dégradation des molécules dans le bassin d'aération. Le taux de dégradation (%) est donc calculé comme suit :

$$taux\ dégradation = \frac{[(flux\ entrée - flux\ sortie + flux\ RET) \times SRT] - [(flux\ boue\ extraite \times SRT) + boue\ réacteur + boue\ clarif]}{(flux\ entrée - flux\ sortie + flux\ RET) \times SRT} \times 100$$

avec

flux entrée : le flux de mircropolluants entrant dans la STEP (en mg/j)
flux sortie : le flux de micropolluants sortant de la STEP par la filière eau (en mg/j)
flux RET : le flux de micropolluants apporté par le RET (en mg/j)
SRT : le temps de séjour des boues (en j)
flux boue extraite : le flux de micropolluants envoyé vers la filière boue (en mg/j)
boue réacteur : la quantité de micropolluants adsorbée sur les boues contenues dans le bassin de boue activée (en mg)
boue clarif : la quantité de micropolluants adsorbée sur les boues résiduelles présentes dans le clarificateur (en mg)

et

$$boue\ réacteur = C_{boue\ liquide} \times MES_{boue\ liquide} \times V_{réacteur}$$

$$boue\ clarif = boue\ réacteur \times \frac{10}{100}$$

avec

$C_{boue\ liquide}$: la concentration en micropolluants mesurée dans la boue liquide (en mg/g)
$MES_{boue\ liquide}$: le taux de MES dans la boue liquide (en g/L)
$V_{réacteur}$: le volume du réacteur (en L)

Le tableau 31 présente les quantités d'estrogènes et de bêtabloquants transitant dans la STEP pendant une durée équivalente au temps de séjour des boues. Ces résultats mettent en évidence qu'une large majorité des estrogènes éliminés lors du traitement biologique est effectivement dégradée et pas simplement adsorbée sur les boues. En effet, entre 78% pour βE2 et 100% pour E3 des estrogènes éliminés lors du traitement biologique sont bien dégradés. Pour les bêtabloquants, on observe la même tendance avec des taux de dégradation supérieurs à 93%. On note cependant pour PROP un taux de dégradation de 27 et 81% dans les STEP SE1 et CA2, respectivement. Les différences observées entre ces 2 sites sont liées aux concentrations mesurées dans les boues. En effet, alors que des concentrations de PROP

variant de 157 et 282 ng/g sont mesurées dans les boues issues de SE1, elles seulement de 43 et 45 ng/g dans les boues de CA2.

Tableau 31 : Quantité d'estrogènes et de bêtabloquants (mg) transitant dans le bassin d'aération pendant un âge de boue (18 jours pour SE1 et 16 jours pour CA2) et taux de dégradation de ces molécules dans le bassin d'aération (%)

SE1	Molécules	Quantité (mg) en 18 jours								Taux de dégradation (%)
		Influent	RET	Effluent	Total abattu lors du traitement biologique	Boue bassin d'aération	Boue clarificateur (10% de la masse du BA)	Boue extraite	Total adsorbé sur les boues	
Estrogènes	**E1**	8304	32	509	*7826*	408	41	248	*696*	**91**
	αE2	<894	<13	<392	*< 515*	<112	<11	<68	*< 191*	***I***
	βE2	2634	<2	<383	*2634*	<335	<34	<204	*<573*	**78***
	E3	35096	5	<290	*35101*	352	35	214	*352*	**99**
Bêtabloquants	**ACE**	215051	269	3053	*212266*	3012	301	1830	*6065*	**98**
	ATE	163049	1933	66069	*98912*	<7,5	<0,8	<4	*<12*	**100***
	BET	2703	<2	<220	*2703*	<7,5	<0,8	<4	*< 12*	**100***
	BIS	20925	222	4086	*17061*	76	8	46	*4162*	**99**
	MET	19878	301	4769	*15409*	139	14	85	*4909*	**98**
	NAD	13415	58	738	*12735*	86	9	52	*738*	**99**
	PROP	54345	2846	29744	*27447*	11687	1169	7100	*41431*	**27**
	SOT	52834	4029	42482	*14381*	920	92	559	*43402*	**89**

CA2	Molécules	Quantité (mg) en 16 jours								Taux de dégradation (%)
		Influent	RET	Effluent	Total abattu lors du traitement biologique	Boue bassin d'aération	Boue clarificateur (10% de la masse du BA)	Boue extraite	Total adsorbé sur les boues	
Estrogènes	**E1**	2538	8	356	*2191*	13	1,3	14,9	*29*	**99**
	αE2	174	< 3	< 29	*174*	< 10,7	< 1,3	< 13,0	*<25*	**86***
	βE2	475	< 2	61	*414*	< 10,7	< 1,3	< 13,0	*<25*	**94***
	E3	8087	< 10	< 70	*8087*	< 1,4	< 0,2	< 1,6	*<3,2*	**100***
Bêtabloquants	**ACE**	46712	206,3	5714	*41204*	15	1,5	16,8	*33*	**100**
	ATE	40458	1307	25454	*16311*	10	1,0	11,9	*23*	**100**
	BIS	9847	167,3	3317	*6698*	2	0,2	2,4	*5*	**100**
	MET	7592	405	7863	*133*	4	0,4	4,7	*9*	**93**
	NAD	8786	49,0	1081	*7753*	< 0,7	<0,2	< 1,6	*<2,5*	**100***
	PROP	5846	186	4093	*1939*	162	16	186	*364*	**81**
	SOT	72138	3989	53163	*22965*	35	3,5	40,5	*79*	**100**

BA : boue activée ; *taux de dégradation calculé avec valeur LQ ; EE2 jamais détecté et BET non quantifié dans la STEP CA2 ; calculs non réalisés pour TIM et OXP qui sont quantifiés à de très faibles concentrations

3.2.3.e. Conclusion

En conclusion, on peut noter que les estrogènes et les bêtabloquants se trouvent en majeure partie dans la phase dissoute des échantillons. En effet, plus de 90% des molécules se trouvent généralement sous forme dissoute.

Dans les boues, et avec la méthode de mesure employée, aucune différence significative n'est notée entre les teneurs d'estrogènes et de bêtabloquants présentes dans les boues biologiques (entrée de filière) et les boues traitées (sortie de filière). Cette observation met en évidence que le lit de séchage ne permet pas de diminuer la teneur spécifique des boues en estrogènes et en bêtabloquants.

Les calculs d'abattement ont mis en évidence une bonne élimination des estrogènes (76 à 99% d'abattement) et de ACE, BET, BIS et NAD (abattements moyens supérieurs à 67%) lors du traitement biologique. D'autres bêtabloquants comme PROP et SOT sont mal éliminés par le traitement biologique (abattements moyens inférieurs à 36%). ATE quant à lui est moyennement sensible au traitement biologique (abattements entre 39 et 60% en moyenne). Enfin, MET a présenté des comportements différents dans les 2 sites étudiés (abattements moyens de 2 et 76%). Ces résultats correspondent aux abattements mesurés précédemment dans les stations de type boue activée faible charge (partie 3.2.1). Il a par ailleurs été vérifié, pour les estrogènes comme pour les bêtabloquants, que les abattements calculés correspondent à une dégradation des molécules lors du traitement secondaire et pas seulement à une concentration des molécules dans les boues (81 à 100% des molécules éliminées lors du traitement biologique sont réellement dégradées). Seul PROP, sur une des 2 installations étudiées a montré un comportement différent : seulement 27% des molécules éliminées lors du traitement épuratoire ont été dégradées.

Par ailleurs, il a été montré que pour les traitements par boue activée faible charge et dans le cas des estrogènes et des bêtabloquants, excepté PROP, la prise en considération des concentrations adsorbées sur les MES n'est pas indispensable. En effet, les abattement calculés avec et sans les MES donnent des résultats similaires (différence d'abattement de + 4% au maximum). Cependant, pour le PROP, la prise en compte des MES semble augmenter la valeur globale de l'abattement de la STEP de près de 50%. Néanmoins, pour les molécules ciblées dans cette étude, on peut considérer que les calculs d'abattement sans prise en compte de la fraction particulaire, permet d'obtenir une évaluation fiable des abattements bien que légèrement inférieure à l'abattement réel : différence entre 0 et +4% pour toutes les molécules sauf PROP (différence entre +8 et +20%).

3.3. Impact des stations d'épuration sur le milieu récepteur

Les premiers résultats de ce travail de thèse ont mis en évidence que les molécules cibles (5 estrogènes et 10 bêtabloquants) ne sont pas totalement dégradées ou retenues dans les stations d'épuration. Dans cette dernière partie, nous avons donc cherché à étudier l'impact des rejets de stations d'épuration sur le milieu récepteur. Cette étude a été menée sur 3 stations d'épuration situées dans la région Rhône-Alpes. De plus, une évaluation du risque environnemental lié à la présence de ces composés dans l'environnement a été menée sur 12 sites supplémentaires. Ces résultats font l'objet d'une publication en préparation, en vue d'une soumission dans ***Environmental Pollution****.*

Plusieurs études rapportent des données de concentration d'estrogènes et de bêtabloquants dans le milieu aquatique impactés par des stations d'épuration (Baronti *et al.*, 2000; Gros *et al.*, 2006; Kuch *et al.*, 2001; Kuster *et al.*, 2008; Lagana *et al.*, 2004; Loos *et al.*, 2007; Miege *et al.*, 2006; Morteani *et al.*, 2006; Ternes *et al.*, 1998; Vethaak *et al.*, 2005; Vieno *et al.*, 2006; Vigano *et al.*, 2006). Cependant l'objectif de ces études consiste le plus souvent à étudier l'occurrence de ces molécules dans les eaux de surface et ne s'intéresse pas spécifiquement à l'impact des stations d'épuration sur le milieu récepteur. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux appréhender cette question.

Pour répondre à nos objectifs, 3 sites ont été échantillonnés sur plusieurs semaines consécutives (3 à 4 semaines) : la Saône au niveau de Fontaines sur Saône, l'Ardières au niveau de Beaujeu et enfin la Bourbre au niveau de Bourgoin Jallieu. Sur ces différents sites, des échantillons ponctuels ont été prélevés en amont et en aval du rejet de STEP ; les effluents de chaque STEP (échantillons moyens 24h asservis au débit) ont également été collectés. Les 5 estrogènes et les 10 bêtabloquants ciblés dans cette étude ont été analysés dans les phases dissoutes des différents échantillons.

L'occurrence des estrogènes et des bêtabloquants dans les effluents et les eaux de surface a tout d'abord été étudiée.

Au total, entre novembre 2007 et septembre 2008, les estrogènes ont été analysés dans 8 échantillons d'effluent et dans 43 échantillons d'eau de surface. Parmi les 5 estrogènes analysés, seuls E1 et E3 ont été quantifiés. L'estrogène le plus fréquemment quantifié est E1 : 100% des effluents et 98% des eaux de surface. Les concentrations de E1 mesurées varient

entre 1,7 et 20 ng/L dans les effluents et entre 0,3 et 3,9 ng/L dans les eaux de surface. L'autre estrogène quantifié, E3, est seulement détecté quelques échantillons collectés sur le site de Fontaines sur Saône. Au total, E3 est quantifié dans 25% des effluents (entre 202 et 218 ng/L) et dans 2% des eaux de surface (26 ng/L). Les formes libres et conjuguées (total après déconjugaison) des estrogènes ont été analysées dans les différents échantillons et mettent en évidence une différence non significative entre les concentrations en hormones libres et en hormones totales, que ce soit dans les effluents ou dans les eaux de surface. On peut donc en conclure que dans les effluents et dans les eaux de surface, la majorité des estrogènes se trouve sous forme libre. Ce résultat est cohérent avec ceux publiés précédemment (Belfroid *et al.*, 1999). De plus, il a été montré que même si les estrogènes sont excrétés sous forme conjuguée, une déconjugaison peut se produire lors du traitement biologique (Baronti *et al.*, 2000 ; Ternes *et al.*, 1999).

Pour les bêtabloquants qui ne sont pas analysés dans les échantillons prélevés à Fontaines sur Saône en 2008, 8 effluents et 34 eaux de surface ont été analysés. Dans les effluents comme dans les eaux de surface, les bêtabloquants les plus quantifiés (en terme de fréquence et de concentration) sont l'acébutolol, l'aténolol, et le sotalol. Le bisoprolol, le métoprolol et le propranolol sont, quant à eux, quantifiés dans tous les effluents et dans plus de 60% des eaux de surface. Le nadolol et le timolol quantifiés dans respectivement 50 et 88% des effluents sont quantifiés dans 32 et 44% des eaux de surface. L'oxprénolol, quantifié dans 38% des effluents, est quantifié dans seulement 9% des eaux de surface. De même, le bétaxolol quantifié dans 25% des effluents est mesuré dans 15% des eaux de surface. En termes de concentrations, les bêtabloquants les plus concentrés (acébutolol, aténolol et soltalol) sont quantifiés en moyenne entre 495 et 1043 ng/L dans les effluents et entre 34 et 50 ng/L dans les eaux de surface. Le propranolol quantifié en moyenne à 158 ng/L dans les effluents est quantifié à 8,1 ng/L dans les eaux de surface. Enfin, les autres bêtabloquants sont quantifiés, en moyenne, entre 4,6 et 149 ng/L dans les effluents et entre 0,6 et 9,2 ng/L dans les eaux de surface.

Parmi les 3 sites étudiés, celui de Bourgoin Jallieu (la Bourbre) est celui pour lequel l'impact de la station est le plus marqué. Ce site correspond en effet, à la plus faible dilution de l'effluent dans la rivière (dilution par 14 environ contre 70 et 7000 pour l'Ardières et la Saône, respectivement). Cependant, pour la plupart des molécules étudiées, l'augmentation des concentrations entre les échantillons prélevés en amont et en aval des rejets de STEP est visible sur tous les sites (tableau 32).

Tableau 32 : Concentrations moyennes (min-max) d'estrogènes et de bêtabloquants mesurées dans les échantillons prélevés dans les 3 sites étudiés (en ng/L)

		ACE	ATE	BIS	BET	MET	NAD	OXP	PROP	SOT	TIM	E1
Bourbre	**Upstream**	14 (6.0-33)	28 (11-74)	1.6 (0.3-3.7)	/	1.3 [c] (0.8-1.8)	42 [a] (42-42)	/	2.5 [c] (1.5-3.4)	8.4 (3.4-19)	/	1.6 (0.5-3.9)
Bourgoin Jallieu WWTP	**Effluent**	393 (289-521)	599 (470-796)	41 (26-63)	/	32 (25-47)	23 (2.1-45)	/	80 (62-110)	470 (315-695)	2.9 (1.5-3.9)	9.2 (3.5-16.1)
Bourbre	**Downstream 1**	99 (58-168)	123 (85-165)	11 (3.5-21)	/	9.0 (4.4-19)	3.4 [c] (2.8-4.0)	/	17 (7.6-35)	120 (60-213)	1.0 [a] (1.0-1.0)	2.5 (1.9-3.3)
Bourbre	**Downstream 2**	54 (5.8-111)	65 (10-137)	5.2 (0.3-13)	/	8.3 [c] (4.9-12)	2.3 [a] (2.3-2.3)	/	16 [c] (12-21)	63 (4.5-158)	0.8 [a] (0.8-0.8)	1.2 (0.3-2.1)
Ardières	**Upstream 1**	5.0 (3.1-7.3)	2.2 [d] (2.1-2.4)	0.9 [d] (0.9-0.9)	/	0.4 [d] (0.4-0.5)	/	/	1.4 [d] (0.7-2.1)	2.3 [d] (1.6-3.0)	1.8 (1.5-2.0)	1.4 (0.8-2.3)
Ardières	**Upstream 2**	9.1 (3.0-16)	76 (0.4-209)	1.0 [b] (1.0-1.0)	/	0.7 [d] (0.5-0.9)	3.7 [d] (0.4-7.1)	/	1.4 [b] (1.4-1.4)	3.5 [d] (3.3-3.6)	1.6 (1.4-1.8)	1.4 (1.2-1.5)
Beaujeu WWTP	**Effluent**	147 (68-226)	628 (388-868)	9.5 (6.6-12)	/	39 (22-55)	/	/	231 (167-294)	153 (97-208)	3.2 (2.8-3.6)	2.7 (1.7-3.7)
Ardières	**Downstream 1**	39 (12-62)	29 (13-56)	1.4 [d] (1.2-1.6)	/	1.2 (0.9-1.8)	0.6 [b] (0.6-0.6)	/	1.8 (1.1-2.9)	5.2 (4.9-5.8)	1.6 (1.3-1.8)	1.4 (1.1-1.6)
Ardières	**Downstream 2**	23 (13-30)	26 (19-41)	1.1 (0.4-1.1)	/	1.2 (1.0-1.4)	/	/	6.3 (4.5-7.4)	4.4 (3.5-5.1)	1.6 (1.5-1.7)	1.6 (1.5-1.8)
Saône	**Upstream**	14 (12-18)	10 (9.8 – 10)	14 (1.3-30)	0.2 [b] (0.2-0.2)	1.9 (1.7-2.3)	18 [b] (18-18)	0.1 [b] (0.1-0.1)	3.8 [d] (2.8-4.8)	22 (16-28)	/	1.4 (1.9-0.7)
Fontaines sur Saône WWTP	**Effluent**	1446 (1436-1455)	2345 (2240-2450)	507 (383-630)	18 (17-19)	206 (190-223)	56 (52-61)	30 (27-32)	240 (237-243)	886 (855-918)	8.7 (8.0-9.5)	16.2 (12.4-20)
Saône	**Downstream 1**	76 (21-183)	93 (14-240)	27 (9.0-38)	1.1 [d] (0.4-1.7)	12 (2.1-29)	2.7 [d] (1.0-4.4)	1.9 [d] (0.3-3.4)	11 (4.1-25)	67 (22-153)	1.0 [b] (1.0-1.0)	1.7 (1.3-2.0)
Saône	**Downstream 2**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.6 (1.0-1.9)

[a] fréquence de quantification de 25%
[b] fréquence de quantification de 33%
[c] fréquence de quantification de 50%
[d] fréquence de quantification de 66%
/ : pas quantifié

Afin d'illustrer l'impact des STEP sur le milieu récepteur, le ratio correspondant à l'augmentation de concentration entre l'amont et l'aval est calculé comme suit :

$$Augmentation = \frac{Aval\ 1 - Amont\ 2}{Amont\ 2}$$

avec *Aval 1* la concentration mesurée en aval immédiat du rejet de STEP (en ng/L)
Amont 2 la concentration mesurée en amont immédiat de la STEP (en ng/L)

On observe alors que les concentrations mesurées en aval du rejet peuvent être jusqu'à 13 fois plus élevées que les concentrations mesurées en amont de STEP (tableau 33). En effet, pour les molécules les plus concentrées dans les effluents de STEP (l'acébutolol, l'aténolol, le sotalol et le propranolol), les concentrations après le rejet de la STEP sont multipliées par 3 à 13 dans la Bourbre, par 0 à 12 dans l'Ardières et par 2 à 8 dans la Saône. De plus, comme noté précédemment de manière qualitative, le ratio d'augmentation met en évidence que l'impact de la STEP est bien moins visible sur l'Ardières que sur la Saône et la Bourbre. Ainsi, à concentrations moyennes équivalentes dans l'effluent (32 et 39 ng/L pour la Bourbre et l'Ardières, respectivement), les concentrations de métoprolol sont multipliées par 6 dans la Bourbre, alors qu'aucune augmentation significative n'est notée dans l'Ardières (ratio d'augmentation de 1). Etonnamment, à concentration équivalente dans les effluents, la concentration d'aténolol dans la Bourbre est multipliée par 3 après le rejet de la STEP alors que cette concentration est multipliée par 12 dans l'Ardières. Ce résultat est lié à la concentration élevée mesurée en amont de la Bourbre (concentration moyenne de 28 ng/L). Pour le timolol qui est quantifié aux plus faibles concentrations dans les effluents des 3 sites, aucun impact n'est visible sur les rivières en termes d'augmentation de concentration. La même observation peut être faite pour le nadolol qui fait également partie des bêtabloquants quantifiés aux plus faibles concentrations.

Dans un second temps, afin d'appréhender le comportement des molécules dans le milieu, un facteur d'atténuation a été calculé. Ce facteur est déterminé comme suit :

$$Atténuation = \frac{(Aval\ 1 - Amont) - (Aval\ 2 - Amont)}{(Aval\ 1 - Amont)} \times 100$$

avec *Aval 1* : la concentration mesurée en aval immédiat de la STEP (en ng/L)
Aval 2 : la concentration mesurée en aval 2 de la STEP (en ng/L)
Amont : la concentration mesurée en amont de la STEP (en ng/L)

Cette étude a permis de montrer la persistance du métoprolol, du nadolol et du propranolol, même 2000m après le rejet de la STEP. Pour d'autres bêtabloquants comme l'acébutolol, le bisoprolol et le sotalol, une atténuation de 45 à 70% est observée entre les 2 points de prélèvement situés en aval du rejet. Compte tenu du caractère hydrophile de ces

composés (log Kow < 2), on peut penser que l'adsorption ne sera pas un phénomène prépondérant et que l'atténuation observée traduit certainement une dégradation partielle de ces molécules dans la rivière.

Tableau 33 : Ratio d'augmentation des concentrations en estrogènes et en bêtabloquants mesurées dans les rivières entre l'amont et l'aval du rejet de station d'épuration et atténuation entre les concentrations mesurées en aval du rejet.

		ACE	ATE	BIS	MET	NAD	PROP	SOT	TIM
Augmentation	**Bourbre**	6	3	6	6	-1	6	13	1
	Ardières	3	12*	0	1	-1	0	1	0
	Saône	4	8	1	5	-1	2	2	1
Atténuation (%)	**Bourbre**	53	61	61	9	NA	5	51	NA
	Ardières	54	11	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*calculé avec la concentration mesurée dans l'amont 1, car la concentration mesurée dans l'amont 2 est anormalement élevée
NA : non applicable (augmentation pas significative)

Enfin, l'impact de la STEP a été mis en évidence en comparant l'abondance relative des bêtabloquants dans les différents échantillons prélevés. Cette étude menée sur le site le plus impacté par le rejet de STEP (site de la Bourbre) a montré la similarité des compositions des échantillons d'effluents et des échantillons de rivière prélevés en aval immédiat (5 m) du rejet. Au contraire, la composition des échantillons prélevés en aval du rejet (aval 2, situé à 2000 m) est très proche de celle des échantillons prélevés en amont.

La comparaison des concentrations mesurées dans le milieu avec les concentrations prédites à partir des concentrations mesurées dans les effluents de STEP (PEC) montre, en général, une bonne adéquation.

A partir des valeurs mesurées dans le milieu et des valeurs de PNEC collectées dans la littérature, une évaluation des risques a été menée sur les 3 sites étudiés. De plus, comme les PEC se sont avérées être relativement cohérentes avec les concentrations réellement mesurées dans le milieu, une évaluation des risques a été menée sur les 12 STEP échantillonnées dans le cadre du projet AMPERES. Avec des quotients de risque inférieurs à 1, de faibles risques environnementaux sont associés aux estrogènes. Concernant les bêtabloquants, le propranolol a présenté des quotients de risque supérieurs à 1 ce qui suggère un risque environnemental possible. Au contraire, l'aténolol, l'acébutolol et le métoprolol qui présentent des quotients de risque inférieurs à 0,1, ne semblent pas représenter de risque pour l'environnement. Cependant, même si le risque associé à une molécule est faible, chaque molécule présente dans l'environnement contribue au potentiel toxique global des substances présentent dans l'environnement.

Impact of wastewater treatment plants on receiving surface waters and tentative of risk assessment: the case of estrogens and beta blockers

V. Gabet-Giraud, C. Miège, R. Jacquet, M. Coquery

Abstract:

Five estrogenic hormones (free and conjugated fractions) and ten beta blockers were analyzed in 3 wastewater treatment plant (WWTP) effluents and 3 receiving river waters in the area of Lyon, France. In the different samples, only two estrogens were quantified: estrone and estriol. Concerning beta blockers, while some molecules such as atenolol, acebutolol and sotalol were almost always quantified, other like betaxolol, nadolol or oxprenolol were rarely quantified. Measured concentrations in rivers water were in the range of the ng/L for estrogens and between 0.3 and 210 ng/L for beta blockers, depending on the molecule and the distance to the WWTP outfall. The impact of the WWTPs on the receiving rivers was studied showing a clear increase of concentrations near the WWTP outfall. For estrogens, persistence was not evaluated considering the low concentrations levels (aroung 1 ng/L). For beta blockers, concentrations measured downstream WWTP outfall can be up to 16 times higher than concentrations measured upstream. Moreover, the persistence of metoprolol, nadolol and propranolol was noted even 2 km downstream the WWTP outfall. The comparison of beta blockers fingerprints in the samples collected in effluent and in the river also showed the impact of WWTP outfall on surface water. Finally, a tentative of risk assessment was performed on 15 sites by calculating the ratio between receiving waters concentrations and PNEC (Predicted Non-Effect Concentration). For 3 of these sites, measured environmental concentrations (MEC) were used for risk assessment. For the 12 other sites, predicted environmental concentrations (PEC) were calculated from concentrations measured in effluent samples. Unfortunately, few PNEC are available and risk evaluation was only possible for 4 of the 10 beta blockers: acebutolol, atenolol, metoprolol and propranolol. Only propranolol presented a ratio in the range or above 1 showing a possible environmental risk in 4 receiving waters on 15. For estrogens, a global PNEC of 5 ng/L was considered and these molecules were not linked to a major environmental risk (only one site showed an environmental risk ratio above 1).

Keywords: estrogens, beta blockers, effluent, surface water, risk assessment

Abbreviations: E1 (estrone), αE2 (17α-estradiol), βE2 (17β-estradiol), E3 (estriol), EE2 (ethynylestradiol), E1-D4 (estrone-D4), E2-D2 (17βestradiol-D2), E3-D2 (estriol-D2), EE2-D4 (17αethynylestradiol-D4), Eff. (effluent), SW (surface water), WWTP (wastewater treatment plant), ACE (acebutolol), ATE (atenolol), BET (betaxolol), BIS (bisoprolol), MET (metoprolol), NAD (nadolol), OXP (oxprenolol), PROP (propranolol), SOT (sotalol), TIM (timolol), ATE-D7 (atenolol-D7), MET-D7 (metoprolol-D7), PROP-D7 (propranolol-D7), MEC (measured environmental concentration), PNEC (Predicted Non-Effect Concentration), LC-MS/MS (liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry), MRM (Multiple Reaction Monitoring), PEC (Predicted Environmental Concentration), QMNA5 (5-years lowest water flow discharge), NOEC (chronic non observed effect concentration), EC50 (half maximal effective concentration)

Introduction:

Worldwide, pharmaceuticals are excreted by human beings and animals and reach the aquatic environments. Nowadays, the presence of these molecules in environment in general and in aquatic environment in particular is proved (Kummerer, 2009). In fact, pharmaceuticals have been quantified at the ng/L level in surface waters in different countries (Grujic et al., 2009; Kasprzyk-Hordern et al., 2009; Zhou et al., 2009). For several years, the scientific community has worked on this subject and tried to analyse these micropollutants and to evaluate their biological effects in aquatic environments. In fact, these molecules used for therapeutic treatments are conceived to produce a biological effect in very weak dose. That is the reason why they can have a harmful effect in surface waters. Problems put down by their presence in surface waters are of several orders: they degrade more or less well, they have a toxic effect at short or long term and at different concentration levels, they scatter in environment and they can pile up in the food chain.

Wastewater treatment plants (WWTPs) are recognised as the main pathway of these molecules to the aquatic environment (Bendz et al., 2005; Castiglioni et al., 2006; Nakada et al., 2006). Indeed, these installations are not conceived to treat and remove this kind of pollution, and pharmaceuticals are more or less degraded during sewage treatment. Beta blockers are a class of drugs used for various indications such as cardiac arrhythmias, hypertension or cardio protection after heart attack. These pharmaceuticals are widely used in France where for example more than 18 t of atenolol were consumed in 2004 (Besse et al., 2008). Once consumed, beta blockers are excreted partly under unchanged form (Vieno et al., 2006; Hernando et al., 2007; Maurer et al., 2007) and reach the aquatic environment. Consequences of the presence of beta blockers in aquatic environment are not well-documented. Nevertheless, as beta-adrenergic receptors were found in fish (Haider and Baqri, 2000), the presence of beta blockers in aquatic environment may have an impact on these

animals. Moreover, growth dysfunctions were observed on invertebrates in presence of a concentration of 0.5 mg/L of propranolol (Huggett et al., 2002). Contrary to beta blockers which are exclusively exogenous molecules used for therapeutic, estrogens can have a natural origin and are secreted daily by human bodies. The quantities of estrogens excreted vary depending on the age and sex of human beings and can reach 29 mg/d for E3 during pregnancy. They also can be consumed to treat, for example, menopausal problems or for contraception. In Europe, EE2, a synthetic estrogen, is commonly used in contraceptive pills: in 2004 in France, 40 kg of EE2 were consumed (Besse et al., 2008). These molecules act as endocrine-disrupting compounds and can induce effects on fish's reproduction from the ng/L level (Hansen et al., 1998; Larsson et al., 1999; Jobling et al., 2003; Gutjahr-Gobell et al., 2006).

Studies of beta blockers in WWTPs effluents and surface waters have already been performed (Ternes, 1998; Andreozzi et al., 2003; Gros et al., 2006; Miege et al., 2006; Vieno et al., 2006) but most of the analytical methods used are multi-residue methods (i.e. not specific) and only aimed at analyzing 4 or 5 beta blockers. Moreover, as beta blockers consumption can vary from one country to another, it is important to collect data for each country. In France, few data of concentrations in river are available (Andreozzi et al., 2003; Miege et al., 2006; Coetsier et al., 2009) and as author's knowledge, no data are available for atenolol, nadolol and sotalol which are amongst the most hydrophilic beta blockers. Considering estrogens, many studies focused on their analysis in effluents and surface waters (Baronti et al., 2000; Kuch and Ballschmiter, 2001; Lagana et al., 2004; Vethaak et al., 2005; Morteani et al., 2006; Vigano et al., 2006; Loos et al., 2007; Kuster et al., 2008) but few were leaded in France (Cargouet et al., 2004; Labadie and Budzinski, 2005; Vulliet et al., 2008; Miege et al., 2009c). Even if some estrogens are often analyzed (such as E1, βE2 and EE2), other like αE2 and E3 are less studied. Moreover, for estrogens as well as for beta blockers, few studies focus on the impact of WWTP and on risk assessment. In fact, many authors study the occurrence of pharmaceuticals in rivers that receive organic wastes from urban areas but the impact of WWTP outfall on river water and the behaviour and fate of estrogens and beta blockers in river downstream effluent release is not well documented. Nevertheless, Labadie et al. (2005) studied the impact of a WWTP on receiving river by analyzing estrogens. In this study, samples were collected from 30 m to 10 km downstream WWTP outfall and focused on temporal and spatial steroids distributions along the river. Moreover Castiglioni et al. (2006) studied the distribution and fate of pharmaceuticals (including atenolol, estrone, 17β-estradiol and ethynylestradiol) in surface water receiving effluents of

WWTP; in this study, percentage of attenuation in river water were also evaluated. Nevertheless, these studies only focused on one site. On the contrary, Vieno et al. (2006) studied phamaceuticals in 2 rivers impacted by WWTP, but only 4 beta blockers were analyzed (acebutolol, atenolol, metoprolol and sotalol). The authors compared concentrations at different sampling points in the river and estimated loss of the compounds by comparing the load in the downstream river with the loads from all the WWTP located on the river. Finally, Miege et al. (2009) proposed a study of risk assessment on 5 rivers impacted by effluent release. Nevertheless, the study is only based on predictive environmental concentrations in river (not measured). As a conclusion, further investigations are needed to improve our knowledge on the extent of this contamination which might vary according to the geographical location or the type of WWTP.

The objective of this study was to evaluate the impact of French WWTPs on the receiving waters. We analyzed 10 beta blockers (acebutolol –ACE-, atenolol –ATE-, betaxolol –BET-, bisoprolol –BIS-, metoprolol –MET-, nadolol –NAD-, oxprenolol –OXP-, propranolol –PROP-, sotalol –SOT- and timolol –TIM) and 5 estrogens (estrone -E1-, 17α-estradiol – αE2-, 17β-estradiol –βE2-, estriol –E3- and ethynylestradiol –EE2) selected because of their high consumption, the data available in scientific literature or their acute toxicity. To evaluate the impact of WWTP on receiving rivers, 3 sites located in the Lyon area were studied and both effluent and river samples were analyzed. For each site, concentrations measured in river upstream the WWTP outfall were compared to concentrations measured in samples collected downstream the outfall. Moreover, a tentative of risk assessment was performed for the 3 sites but also for 12 other sites. For the 12 other sites, only effluent samples were analyzed and predicted concentrations in receiving rivers were calculated from effluent concentrations.

Materials and methods:

Instrumentation, materials and chemicals

The LC system consisted on an Agilent 1100 (Agilent, Massy, France) coupled with an API 4000 with triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems-MDS Sciex, Courtaboeuf, France). Solid phase extractions were performed with an Autotrace workstation (Caliper Life Science, Roissy Charles de Gaulle, France). The hydrolysis of conjugated forms was performed with a Memmert incubator (Memmert, Schwabach, Germany).

Glass fiber filter (GF/F, 0.7 µm pore size) were obtained from Whatman (Versailles, France). OASIS® HLB cartridges, 200 mg, 6 mL (Waters, Guyancourt, France), OASIS® MCX cartridges, 60 mg, 3 mL (Waters, Guyancourt, France) and Supelclean LC FLORISIL® cartridges, 1 g, 6 mL (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) were used for extraction and clean-up. We used Xbridge Waters C18 endcaped column (150 mm x 2.1 mm x 3.5 µm) and guard column for chromatographic separation (Waters, Guyancourt, France). Ammonium hydroxide for analysis ACS and formic acid pure at 99 + % were supplied by Acros Organics (Noisy le Grand, France). Acetic acid, pure at 98.9%, was supplied by Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Methylene chloride, heptane, ethyl acetate, methanol, acetone of pesticide analysis grade, acetonitrile and ultrapure water (used for mobile phase) of HPLC grade were obtained from SDS (Val-De-Reuil, France). Ultrapure water was obtained from a MilliQ water system (Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Gazeous nitrogen of standard quality (industrial) was used for evaporation (Air Liquide, Pierre Bénite, France). Deuterated hormones (powder) (estrone-D4 [E1-D4], 17βestradiol-D2 [17β-E2-D2], 17αethynylestradiol-D4 [EE2-D4] and estriol-D2 [E3-D2])) and βestradiol acetate were obtained from C.I.L. Cluzeau (Sainte-Foy-La-Grande, France). Beta blockers and deuterated beta blockers (powder) (acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprololhemifumarate, metoprololtartrate, nadolol, oxprenolol, propranolol hydrochloride, sotalol hydrochloride, timolol hydrogenomaleate atenolol-D7, metoprolol-D7, propranolol-D7 and metoprolol impurety A) were obtained from C.I.L. Cluzeau and/or Sigma Aldrich depending on the availability. A crude solution of beta glucuronidase aryl sulfatase enzyme (*Helix pomatia* juice) was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Sampling

To study the impact of wastewater treatment plants (WWTP) on surface waters, river water and effluent samples were collected. For effluents, automatic 24h composite samples were collected. For surface waters, grab samples were collected in 2.5 L amber glass bottles previously rinsed 2 times with the water sample. All samples were stored at 4°C in glass amber bottles during transport to the laboratory. The extractions were performed within 24h after sampling.

Three rivers located in the area of Lyon (France) were sampled (figure 1): the Saône near Fontaines sur Saône, the Ardières near Beaujeu and the Bourbre near Bourgoin Jallieu. The Saône River (480 km length) is the main tributary of the Rhône River. The collected site is impacted by domestic and industrial contaminations. The Ardières River (29.9 km length)

is a tributary of the Saône River located in the north of Rhône department. This site is impacted by different contamination sources: wastewater treatment plants, industries, agriculture (viticulture in particular). The Bourbre River (72.2 km length) is a tributary of the Rhône River located in the Isère department. This site is impacted by domestic and industrial contaminations.

The characteristics of the WWTPs studied are presented in table 1. The capacities of these WWTPs range from 2 900 to 78 000 population equivalent. Over those WWTPs, 2 are equipped with a primary treatment (primary settling). Biological treatments consist of activated sludge (conventional or medium rate) or biological filter. None of them are equipped with a tertiary treatment.

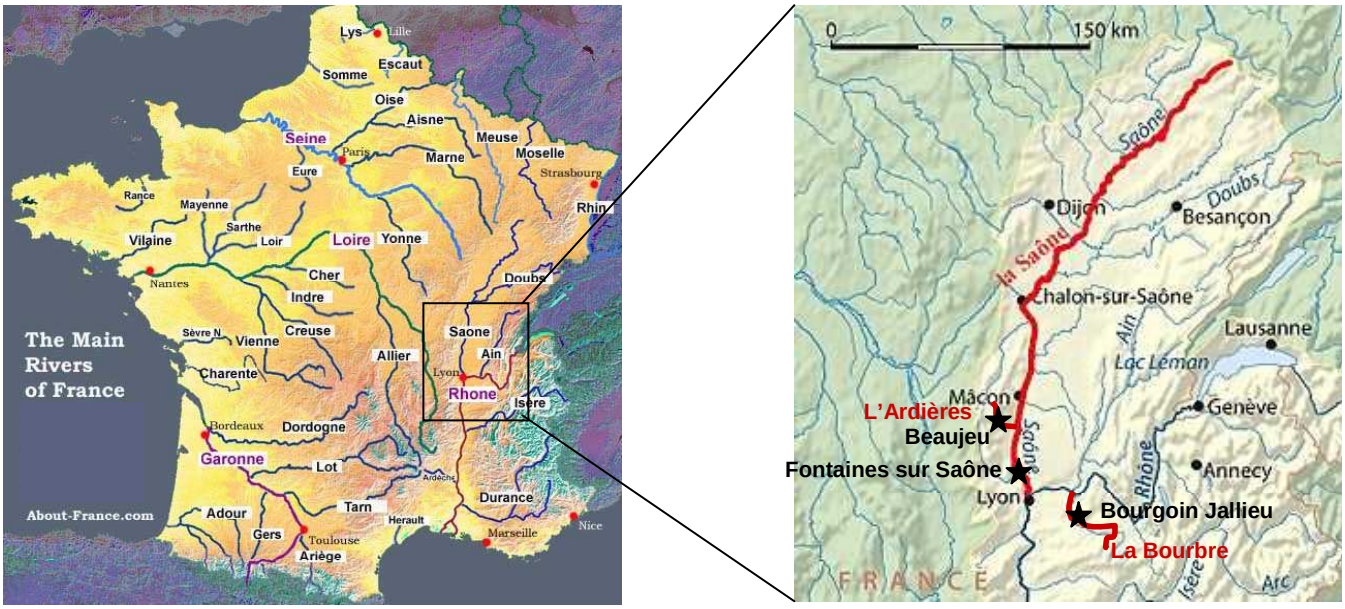


Figure 1: Location of the 3 sampling sites near the area of Lyon, France

Table 1: Characteristics of the WWTPs studied

WWTP	Sampling period	Treatment process	Population equivalent (PE)	Flow (m3/d)	Outfall River
Beaujeu	10 and 24/06/08	Activated sludge (C + N)	2 900	750	Ardières
Bourgoin Jallieu	2, 9, 16 and 24/09/08	Primary settling + medium-rate activated sludge	78 000	17 500	Bourbre
Fontaines sur Saône	13 and 16/11/07	Primary settling + Biological filter (C + N)	30 000	6 500	Saône

To study the impact of WWTP on receiving rivers, river samples were collected upstream and downstream effluent release. Generally, 2 sampling points were collected downstream: the first one was closed to the effluent release to observe WWTP impact and the

second one was located further to observe the fate of micropollutants some meters after the WWTP outfall. Punctual samples were collected but, in order to have representative results, sampling was performed once per week for 3 consecutives weeks at least. A total of 43 surface water samples and 8 effluent samples were collected between November 2007 and September 2008. The Saône River was sampled upstream (1 sampling station located 200 m upstream WWTP outfall) and downstream (1 sampling station in 2007 and 2 in 2008, located 50 m and 200 m downstream WWTP outfall) the WWTP on 6 different days in November 2007 and June 2008. The Bourbre River (figure 2b) was sampled upstream (1 sampling point located 20 m upstream confluence) and downstream (2 sampling points located 5 m and 2 km downstream confluence) the confluence with the Bion which is supplied by the WWTP. The Bion was also sampled upstream the WWTP outfall (2 km upstream the confluence). Sampling was performed in 4 different weeks in September 2008. Finally the Ardières River (figure 2b) was sampled upstream (2 sampling stations located 20 m and 4 km upstream WWTP outfall) and downstream (2 sampling stations located 5 m and 20 m downstream WWTP outfall) the WWTP on 3 different weeks in June 2008.

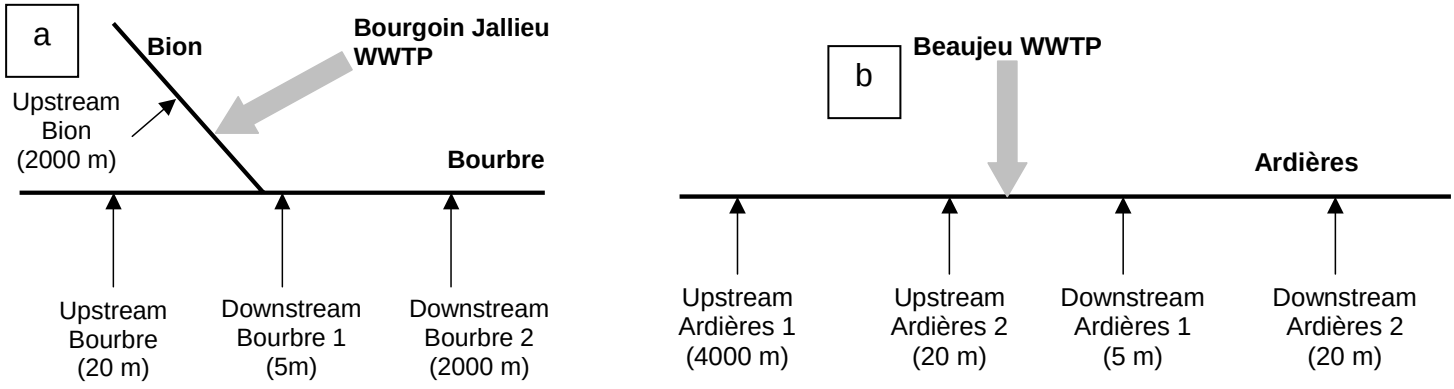


Figure 2: Configuration of the different sampling points on the Bourbre (a) and Ardières (b) Stream

Sample preparation and analysis

Estrogens (conjugated + non conjugated fraction) and beta blockers were analysed in each sample except the effluent sample from Fontaines sur Saône collected the 16/11/07 in which only free estrogens were analyzed.

Once received in the laboratory, water samples were filtered through pyrolyzed (450°C, 1h) glass fibre filters.

The analytical method for the 5 estrogens was described elsewhere (Miege et al., 2009a). Briefly, aliquots of filtrate spiked with deuterated estrogens (E1-D4, E2-D2, E3-D2

and EE2-D4) were extracted by solid phase extraction (SPE) on Oasis HLB® cartridges (elution with a mixture ethyl acetate/methanol 70/30 - v/v) and purified on Florisil cartridges (elution with a mixture acetone/heptane 75/25 - v/v). Extracts were finally evaporated to dryness and reconstituted in a solution of E2 acetate, used as internal standard, at 40 µg/L in a mixture of water / acetonitrile (60/40 - v/v). For the analysis of total estrogens (i.e. after hydrolysis of conjugated forms), an enzymatic cleavage was performed using β-glucuronidase isolated from *Helix Pomatia* prior to extraction.

For the analysis of the 10 beta blockers, filtrate was acidified with 0.1% formic acid (v/v) and a part was spiked with a solution containing 10 beta blockers in acetone at different concentrations between 100 and 2000 ng/L, depending on the molecule and the nature of the sample. Aliquots of acidified filtrate were extracted by SPE on Oasis MCX® cartridges (elution with a mixture methanol/ammonium hydroxide 95/5 - v/v) and then evaporated to dryness and reconstituted in a solution of metoprolol impurity A, used as internal standard, at 50 µg/L in water / acetonitrile 85/15 - v/v.

Analysis of estrogens and beta blockers were performed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and acquisition was achieved in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. As recommended in the EU Commission Decision 2002/657/EC, the MS-MS conditions included the use of 2 ionization transitions for each compound (except for the deuterated surrogates), one for the quantification and one for the identity confirmation.

Final estrogens concentrations were calculated using recoveries obtained for the internal deuterated surrogates (αE2 was corrected by E2D2). For beta blockers, final concentrations were calculated using recoveries obtained for the non deuterated beta blockers in spiked samples: concentrations were corrected only if the recoveries were below 80% or above 120%.

Method limit of quantification (LOQ) were estimated for each couple molecule/sample as described elsewhere (Miege et al., 2009a); in brief, LOQ was calculated by correcting the value of the first confirmed calibration point (by the ratio of confirmation and quantification ionization transitions) by the recovery of deuterated estrogen or spiked beta blockers in the sample. For estrogens, LOQ are generally below 1 ng/L. However, LOQ values ranged between 0.3 and 2.7 ng/L and can reach 9.0 ng/L for EE2. For beta blockers, LOQ ranged between 0.2 and 1.1 ng/L.

Environmental risk assessment

In order to evaluate the potential impact of each substance on the aquatic environment, we determined the risk quotient which is calculated as the ratio of the predicted environmental concentration (PEC) and the predicted non effect concentration (PNEC). The PNEC represent the concentration of the molecule for which adverse effects are not expected to occur and is determined from toxicity tests performed on several test organisms. An ecological risk is suspected when the ratio PEC/PNEC equals or exceeds 1 for one given molecule.

A tentative of risk assessment was performed on the 3 selected sites but also for receiving rivers of 12 WWTP located in France and analysed previously within the context of the AMPERES project. The 15 WWTP have various capacities (between 2900 and 700000 PE) and discharge their effluents in river of different sizes (from 0.02 to 600 m^3/s). For these WWTP, PEC were calculated from mean concentrations (n = 2 or 3) measured in effluent samples (Gabet et al., 2009).

Results and discussion:

Occurrence of estrogens

The measured concentrations are presented in table 2. Among the 5 estrogens analyzed, 3 (αE2, βE2 and EE2) are never quantified in effluents as well as in surface waters.

The most frequently quantified estrogen is E1: this molecule is quantified in 100% of the effluent samples and in 98% of surface water samples. Measured concentrations of E1 ranged from 1.7 to 20 ng/L in effluent samples and from 0.3 to 3.9 ng/L in surface waters with mean concentrations of 1.6 and 9.3 ng/L in surface water and effluent, respectively. This molecule corresponds to one of the most concentrated estrogen in influent samples (Gabet et al., 2009) and is also produced by biodegradation of βE2 and EE2 (Ternes et al., 1999a; Czajka and Londry, 2006; Ren et al., 2007).

The other quantified estrogen, E3, is quantified in 25% of the effluent samples (samples from Fontaines sur Saône WWTP) and in 2% of the surface water samples (1 of the 9 samples collected in the Saône downstream the WWTP). The measured concentrations in effluent samples are high (between 202 and 218 ng/L) and, in surface water, the only concentration of E3 measured in one sample collected in the Saône River was 26 ng/L.

In literature, αE2, βE2 and EE2 were already not quantified in effluent as well as in surface water (Boyd et al., 2003; Rodriguez-Mozaz et al., 2004; Labadie and Budzinski, 2005; Farre et al., 2006; Kuster et al., 2008; Vulliet et al., 2008). Concerning E1, a recent review (Miege et al., 2009b) showed that this molecule was quantified in 93% of the effluent samples

(n = 79) at concentrations ranging between 0.6 and 95 ng/L (mean value of 20.9 ng/L) which is in agreement with our result. This review also presents quantification frequency in effluent samples (n = 33) of more than 90% for E3 and the measured concentrations in our study set in the range of the maximum values reported. For surface water, results from literature confirmed the low quantification frequency of E3 (Rodriguez-Mozaz et al., 2004; Labadie and Budzinski, 2005; Farre et al., 2006; Kuster et al., 2008). In surface water, reported concentrations of E3 ranged from 1 to 50 ng/L (Morteani et al., 2006; Vigano et al., 2006; Kuster et al., 2008; Peng et al., 2008). From the literature, the frequency of quantification of E1 in surface water impacted by WWTP is highly variable. A study lead on Mississippi River (samples collected at a site outside of direct influence of discharge points of known private or municipal sewage treatment plants) and on Lake Pontchartrain, showed that E1 was never detected (n = 4, LOD = 0.3 ng/L) (Boyd et al., 2003). Moreover, in a study lead on several European rivers including the Ardières and Bourbre Rivers, quantification frequency of 16% were reported for E1 (n = 122, average concentration of 4 ng/L) (Loos et al., 2009); in the Bourbre River, E1 was quantified at 3 ng/L while it was not quantified in the Ardières River (Strub, 2008). Nevertheless, in this study the analytical method showed relatively high LOD for E1 (2 ng/L). On the contrary, in a study lead in Italy in the Po and Lambro Rivers, E1 was quantified in all samples (n = 3) between 4 and 47 ng/L (Vigano et al., 2006); in the same study, E3 was also quantified in all samples (n = 3) at concentrations ranging between 4 and 50 ng/L. In samples collected in Japanese River and Lake (Tamagawa River and Lake Kasumigaura) receiving WWTP outfall, E1 was quantified in all samples between 0.2 and 3.8 ng/L (n = 8) and E3 was never detected (LOD of 1.5 ng/L) (Isobe et al., 2003). In surface waters collected in France, the frequency of quantification of E1 is also variable. A study lead on an urban dam (receiving effluents from various WWTP and industrial effluents) and a Lake (supplied by different rivers from rural zones) in the Rhône-Alpes area, showed that E1 was only quantified in Lake samples (n = 1) at 0.3 ng/L (Vulliet et al., 2008). Then, in Paris area, E1 was never detected in the Seine River (n = 6) between 200 and 355 km downstream Paris area (LOD between 0.3 and 8.0 ng/L depending on the analyte and the matrix) (Labadie and Budzinski, 2005) while it was quantified from 1.1 to 3.0 ng/L in all samples (n = 6) collected in Seine and Oise Rivers upstream and downstream (about 60 km) Paris area (Cargouet et al., 2004). Nevertheless some studies reported higher concentrations: up to 65 ng/L in a Chinese river located in one of the most developed and densely populated areas in China (Peng et al., 2008).

The differences between unconjugated and total (i.e. conjugated + unconjugated fractions) fraction of estrogens are not significant: the mean proportion of free estrogens represent 79 and 82% of the total amount of estrogens (measured after hydrolysis step) for surface water and effluent water, respectively. The differences between concentrations measured in samples with and without hydrolysis can be linked to analytical uncertainty which was estimated in the range of 20 to 50% depending on the measured concentration. This analytical uncertainty is higher when measured concentrations are close to the limit of quantification. As a consequence, we can consider that most of the estrogens present in surface water and effluent samples are in free form. Comparable results were already obtained in surface water samples (Belfroid et al., 1999). In fact, estrogens are excreted by bodies in conjugated forms (glucuronide or sulphate) which are more soluble, but, in activated sludge process, cleavages (E1-3S in E1, and E2-17G in βE2) were observed (Ternes et al., 1999b; Baronti et al., 2000).

Occurrence of beta blockers

Beta blockers were analyzed in 8 effluents and 34 surface water samples (table 2); they were not measured in the Saône River in 2008.

In effluent samples, ACE, ATE, BIS, MET, PROP and SOT are always quantified. The other beta blockers, TIM, NAD, OXP and BET are quantified in 88, 50, 38 and 25% of effluent samples, respectively. The most concentrated molecules in effluents are ATE, SOT, ACE and PROP with median concentrations of 705, 435, 381 and 138 ng/L, respectively. Median concentrations of 48, 38, 37 and 27 ng/L are measured for NAD, MET, BIS and OXP, respectively. Finally, only traces of TIM are measured in effluents (median concentration of 3.6 ng/L). In surface water, ACE, ATE and SOT are the most frequently quantified beta blockers with quantification frequency of 100, 97 and 91%, respectively, while OXP is only quantified in 9% of the samples. Moreover, BET, and in less extend NAD, are rarely quantified with quantification frequency of 15 and 32%, respectively. Finally, BIS, MET, PROP and TIM are quantified between 82, 71, 65 and 44% of surface water samples, respectively. The most concentrated molecules in surface water samples are ATE, ACE and SOT: mean concentrations of 50, 35 and 34 ng/L, respectively. For the rest of the beta blockers, mean concentrations vary between 0.6 and 9.2 ng/L.

In literature, ACE, ATE, BIS, MET, PROP and SOT are generally quantified in effluent samples (quantification frequency between 86 and 100% depending) (Andreozzi et al., 2003; Vieno et al., 2006; Miege et al., 2009b). Reported mean concentrations ranged

between 10 and 990 ng/L. For a molecule, concentrations can vary from one country to another. For example, while MET was quantified at 80 ng/L (n = 2) in France (Andreozzi et al., 2003), concentrations between 910 and 1070 ng/L (n = 3) were measured in Finland (Vieno et al., 2006). For NAD and OXP reported detection frequencies were higher than those observed in our study. In fact, in a study lead in the United States of America, NAD was quantified in 71% of the effluent samples (n = 34) at a median concentration of 51 ng/L (Huggett et al., 2003). Moreover, in a monitoring campaign of WWTP effluents lead in 4 European countries (including France), OXP was quantified in 71% of the samples (n = 7, median concentration = 20 ng/L) (Andreozzi et al., 2003). On the contrary, while TIM was quantified in 88% of the effluent samples in our study (mean concentration of 3.6 ng/L), it was only quantified in less than 7% of German effluents (n = 29); nevertheless, the LOQ in the German study was relatively high (25 ng/L) (Ternes, 1998). For BET which is only quantified in 25% of the effluent samples, a previous study reported concentrations below the detection limit (Andreozzi et al., 2003). Nevertheless, the detection limit are not detailed in this study.

In surface water, various results were reported. In a study lead in the River Po and Lambro, in the most densely inhabitated and industrialized areas in Italy, ATE was quantified in all river samples (n = 8) between 3.4 and 241 ng/L (Calamari et al., 2003). On the contrary, ATE was only quantified in 60% of the samples collected in the River Vantaa, located at the most densely populated area in Finland, at concentrations between 12 and 25 ng/L (Vieno et al., 2006); the same study reported quantification frequency of 80% (n = 5) for ACE, SOT and MET with concentrations between 2 and 8 ng/L, 15 and 52 ng/L and 20 and 116 ng/L, respectively. On the contrary, a study performed in Seine River in Paris area, quantified MET in only 30% of the collected samples (n = 10) at mean concentration of 10 ng/L (Paffoni et al., 2006); in this study, ATE, SOT, PROP and BIS were also analyzed (n = 10, quantification frequency of 100, 100, 50 and 0%, respectively) and measured with mean concentrations of 26, 45, 12 ng/L and <10 ng/L, respectively. For PROP, the same quantification frequency (50%, n = 6) was observed in a study lead in Rivers Taff (UK) and Warta (Poland) with measured concentrations between 5 and 6 ng/L (Kasprzyk-Hordem et al., 2007); in this study, ATE and MET were also measured between 3 and 60 ng/L, and 7 and 155 ng/L, respectively (quantification frequency of 67 and 50%, respectively). In surface water collected in Spain in the Ebro river basin, MET and PROP were not detected (n = 10, LOD of 3 and 2, respectively) and SOT and ATE were quantified up to 70 and 250 ng/L, respectively (Gros et al., 2006). In a general way, BIS, BET, NAD, MET, PROP and TIM reported concentrations

are generally below 10 ng/L (Ternes, 1998; Gros et al., 2006; Paffoni et al., 2006). Nevertheless, concentrations measured in surface water can reach high values such as BIS and MET which were quantified above 2 000 ng/L in river water samples (Ternes, 1998).

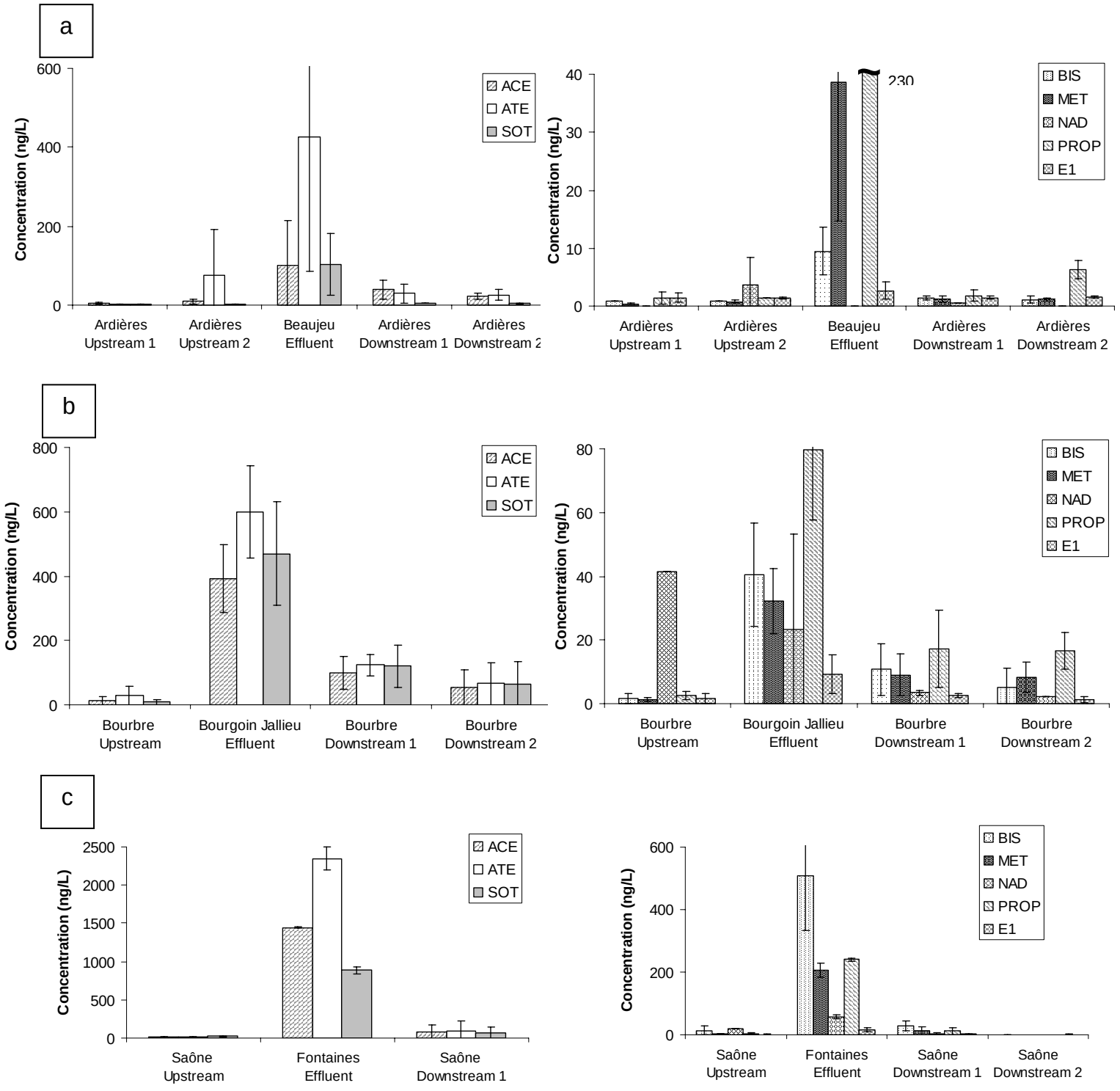
Table 2: Concentrations of estrogens and beta blockers measured in effluent and surface water samples of 3 sites in France (Ardières, Bourbre and Saône Rivers and WWTP) from November 2007 to September 2008

	Quantification frequency (%)		Mean (ng/L)		Median (ng/L)		Min (ng/L)		Max (ng/L)	
	Eff.	**SW**	**Eff.**	**SW**	**Eff.**	**SW**	**Eff.**	**SW**	**Eff.**	**SW**
ACE	100	100	595	35	381	14	68	3.0	1455	183
ATE	100	97	1043	50	705	17	388	0.4	2450	240
BET	25	15	18	0.6	18	0.4	17	0.2	19	1.7
BIS	100	82	149	7.3	37	1.7	6.6	0.3	630	38
MET	100	71	77	4.4	38	1.8	22	0.4	223	29
NAD	50	32	40	9.2	48	4.0	2.1	0.4	61	42
OXP	38	9	20	1.3	27	0.3	0.8	0.1	32	3.4
PROP	100	65	158	8.1	138	4.6	62	0.7	294	35
SOT	100	91	495	34	435	5.5	97	1.6	918	213
TIM	88	44	4.6	1.5	3.6	1.6	1.5	0.8	9.5	2.0
E1	100	98	9.3	1.6	8.7	1.5	1.7	0.3	20	3.9
E3	25	2	210	26	210	26	202	26	218	26

Eff.: effluent (n = 8 for estrogens and beta blockers)
SW: surface water (n = 34 for beta blockers and 43 for estrogens)
αE2, βE2, EE2 never detected

Impact of WWTP on surface water for the 3 sampling sites near Lyon area, France

In a general way, among the different sites studied, the Bourbre River is the one where the impact of the WWTP outfall is the most obvious (Figure 3, Annexe). In fact, this site corresponds to the river where the WWTP outfall is the less diluted: average dilution factor of 14 while it was 70 and 7000 for Ardières and Saône, respectively.



αE2, βE2 and EE2 never quantified; E3 only quantified in Fontaines sur Saône (in all effluents and in 1 surface water sample); BET and OXP only quantified in the samples from Fontaines sur Saône (mean concentrations below 2 ng/L for surface water and of 18 and 30 ng/L in effluents for BET and OXP, respectively); TIM only quantified at low levels (mean concentrations below 3 ng/L in surface water and between 2.9 and 8.7 ng/L in effluent samples)

Figure 3: Mean concentrations of estrogens and beta blockers (± sd) in the different sampling points of the 3 studied sites (a, Ardières; b, Bourbre; c, Fontaines sur Saône)

For estrogens, because of the relatively low concentrations measured in effluent samples (when compared to beta blockers), the impact of WWTP in surface water is not very pronounced. In fact, the increase of estrogens concentration after the WWTP outfall is generally not significant. Only in the Bourbre River, the high concentration of E1 in the effluent (maximum of 16 ng/L) is high enough to lead to a slight increase of E1 average concentration in the river from 1.6 to 2.5 ng/L immediately downstream (5 m) the WWTP. Nevertheless, 2 km after the outfall of the WWTP (sampling point "Downstream 2") concentrations of E1 are not impacted anymore by the WWTP effluent and are equivalent to those measured upstream. The other estrogens were not quantified, except E3 which was quantified in all effluent samples of Fontaines sur Saône (average concentration of 210 ng/L) and in one sample collected downstream the outfall (at 26 ng/L).

For beta blockers, the impact of WWTP is also more visible in the Bourbre River. Concentrations of ACE, ATE and SOT, the most concentrated beta blockers in effluent samples, increase significantly after the WWTP outfall. For example, the average concentration increases from 14 to 99 ng/L for ACE, from 28 to 123 ng/L for ATE and from 8.4 to 120 ng/L for SOT. In the Saône River, the same phenomena is observed: the average concentration increases from 14 to 76 ng/L for ACE, from 10 to 93 ng/L for ATE and from 22 to 67 ng/L for SOT. In the Bourbre River as in the Saône River, the increase of concentration after the WWTP is also visible for BIS, MET and PROP. In the Ardières River, average concentrations increase from 9.1 to 39 ng/L for ACE and from 2.2 to 29 ng/L for ATE after the WWTP outfall (for ATE concentration of upstream 1 is considered because of the abnormally high concentration in upstream 2). However, in this river, the concentration of SOT brought by WWTP effluent does not lead to a significant increase of concentration in the river (from 3.5 to 5.2 ng/L).

To evaluate quantitatively this increase of concentration, we calculated a ratio of increase as follow:

$$Increase = \frac{C_{Downstream\,1} - C_{Upstream}}{C_{Upstream}}$$

Then, when a significant increase was noted, a percentage of "attenuation" was calculated as the difference in concentration between downstream 1 and downstream 2 as follow:

$$Attenuation = \frac{(C_{Downstream\ 1} - C_{Upstream}) - (C_{Downstream\ 2} - C_{Upstream})}{(C_{Downstream\ 1} - C_{Upstream})} \times 100$$

with $C_{Downstream\ 1}$ the measured concentration in the river immediately downstream WWTP outfall, in ng/L; $C_{Upstream}$ the measured concentration in the river upstream WWTP outfall, in ng/L; $C_{Downstream\ 2}$ the measured concentration in the river in the second point downstream WWTP outfall, in ng/L.

Insofar as only low concentrations of E1 were measured in river water, this study was only lead on beta blockers.

Table 3: Increase factor for beta blockers concentrations in river samples from upstream to downstream the WWTP outfall and attenuation (%) measured between the 2 sampling points downstream the WWTP outfall.

	WWTP	River	Dilution factor of effluent in river	ACE	ATE	BIS	MET	NAD	PROP	SOT	TIM
Increase ratio	**Bourgoin Jallieu**	**Bourbre**	14	6	3	6	6	-1	6	13	1
	Beaujeu	**Ardières**	70	3	12*	0	1	-1	0	1	0
	Fontaines	**Saône**	7000	4	8	1	5	-1	2	2	1
Attenuation (%)	**Bourgoin Jallieu**	**Bourbre (2 km)**	14	53	61	61	9	NA	5	51	NA
	Beaujeu	**Ardières (20 m)**	70	54	11	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*calculated with upstream 1, because one suspicious concentration in upstream 2
NA : attenuation not calculated because no increase was noted

As showed in table 4, concentrations of beta blockers measured in samples collected downstream WWTP outfall can be multiplied up to 13 compared to concentrations measured upstream. In fact, for the 4 molecules quantified at the highest concentrations, in effluents (ACE, ATE, SOT and PROP), concentrations increase by 3 to 13 in the Bourbre River, by 0 to 12 in the Ardières River and by 2 to 8 in the Saône River. Moreover, as noted previously (because of river flow compared to WWTP discharge flow –Table 4-), the impact of WWTP outfall is more visible on the Bourbre River than on the Saône or Ardières River, except for ATE. For example, MET which is quantified at similar concentrations in effluent from Beaujeu and Bourgoin Jallieu WWTP, has a concentration 6-fold higher in surface water after WWTP outfall in the Bourbre River, while no concentration variation is noted for the Ardières River. On the contrary, while ATE concentration is multiplied by 3 after WWTP outfall in the Bourbre River, it is surprisingly multiplied by 12 in the Ardières River; this result is linked to the high concentration of ATE measured upstream WWTP outfall in the Bourbre River (mean concentration of 28 ng/L). For NAD and TIM which were quantified at low concentrations in effluent samples from 3 sites, the impact of the WWTP outfall is not visible on river concentrations.

In order to apprehend the fate and behaviour of beta blockers in the downstream rivers, the attenuation of concentration between samples collected immediately after the effluent outfall (5 m) and samples collected further downstream (20 m for Bourbre River and 2 km for Ardières River) was evaluated. MET and PROP seems to be the most persistent beta blockers as at both sites the attenuation was below 10 %. At both the Bourbre and the Ardières sites, similar attenuations of concentration are noted for ACE: 53 and 54%. Considering the low hydrophobicity of this molecule (log Kow of 1.42) (Detroyer et al., 2001), it is not likely to be adsorbed to particulate matter. The attenuation observed could therefore be explained by degradation occurring in river water and observed up to 20 m downstream the effluent outfall. For ATE, while an attenuation of 61% is noted in the Bourbre River it is only 11% in the Ardières River. This observation is surprising, insofar as the sampling point located downstream the WWTP outfall is more distant in the Bourbre River than in the Ardières River. It is therefore difficult to conclude on the attenuation in the river. In fact, this study only represents a first approach and more experiments are needed to obtain more reliable conclusions. The analysis of particulate matter and the analysis of samples collected at several points downstream the effluent release could enable to better apprehend the behaviour and fate of beta blockers in aquatic environments. Another study lead on different pharmaceuticals including ATE also evaluated the attenuation between measured concentrations in the River Olona, in Italy, 100 m and 1000 m downstream a WWTP outfall (Castiglioni et al., 2006). It showed an attenuation value of 29% for ATE. Surprisingly, this molecule was detected in particulate matter. However, the proportion of the molecule adsorbed to particulate matter can not be evaluated as the analytical method was only qualitative for particulate samples. Another study focused on the fate and behaviour of pharmaceuticals, including ACE, ATE, MET and SOT, in the Vantaa River, in Finland, downstream several WWTP outfalls by comparing the load of pharmaceuticals from all WWTP which released their effluent in the river with the load in the river downstream the WWTP outfall (Vieno et al., 2006). Results showed, the persistence of ATE and SOT (loss $\leq$ 10%) and the significant elimination of ACE and MET (loss > 60%) along the river. The distance between the last WWTP and the sampling point in the river was much higher than in our study (above 10 km).

To evaluate the impact of WWTP on river water, we also compared the profile of the effluent samples with those of river water upstream and downstream the WWTP outfall. For each sampling point, the relative abundance of each molecule was calculated. Then, profiles

of each sampling point were compared. This study was only lead on samples from the Bourbre River as it represents the site where the WWTP impact is the most visible.

The comparison of relative distributions of beta blockers enables to point out the influence of WWTP outfall on receiving water (Figure 4). Indeed, while the profile observed in river water collected upstream the WWTP is different from the profile of the effluent sample, the river water collected immediately after the WWTP outfall ("Downstream 1", collected 5m after the WWTP outfall) and the effluent have almost similar profile. The fingerprint of the WWTP effluent is clearly visible on the river water 5 m downstream the outfall. Moreover, we note the similarity between the profiles of samples collected upstream and downstream 2showing a return to "upstream" conditions 2 km after the WWTP outfall.

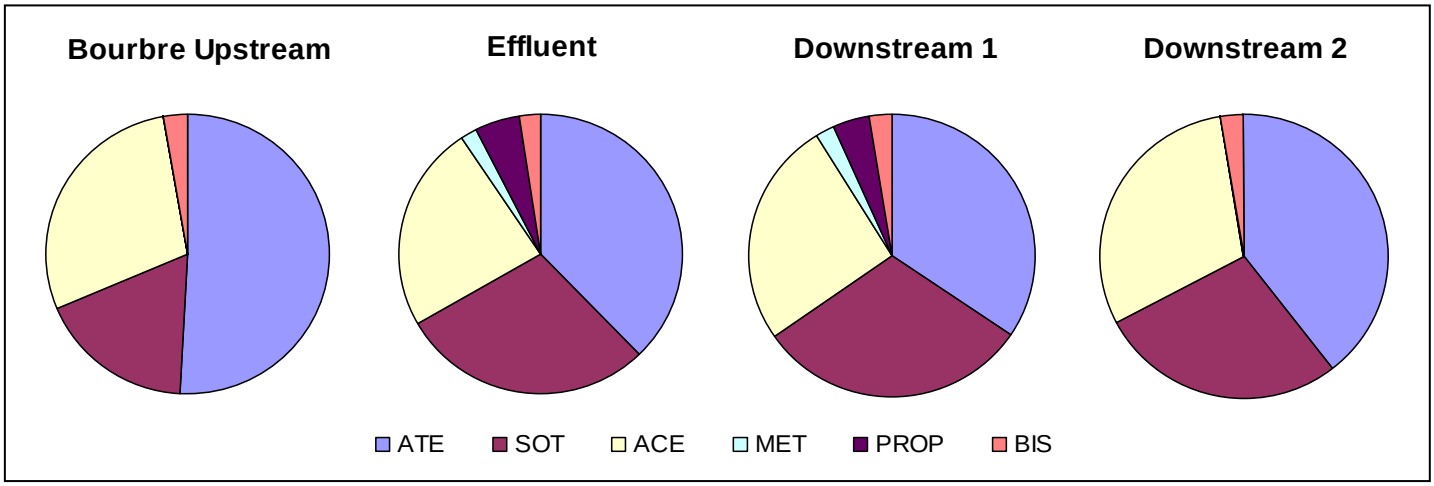


Figure 4: Relative abundance (%) of quantified beta blockers for each sampling point of the Bourbre River and in the effluent from the WWTP located on the Bourbre River

Calculation of predicted environmental concentrations (PEC) and comparison with measured concentrations (MEC)

Predicted environmental concentrations (PEC) were calculated using concentrations measured in WWTPs effluents and compared to concentrations measured in the 3 rivers. For PEC calculation, fluxes of micropollutants were calculated (from concentrations measured in effluents and WWTP flow) and divided by the 5-years lowest water flow discharges of the receiving river (European Commission, 2003). Table 4 presents the calculated PEC and the concentrations (min and max values) measured in the rivers (MEC).

For E1, PEC calculated for the Bourbre River are generally in the same range of the concentrations measured in the river. On the contrary, for the Saône and the Ardières Rivers, the PEC are systematically underestimated compared to measured values. In the Saône River

PEC values ranged from 0.02 to 0.03 ng/L and measured concentrations varied from 0.7 to 3.8 ng/L i.e. 20 to 100 times higher. For the Ardières, differences between PEC and MEC are smaller: MEC are 3 to 16 times higher than PEC. Concerning E3 that was only quantified in effluents from one of the 3 sites, PEC are in the range of the detection limits and it is therefore difficult to compare PEC and MEC.

For beta blockers, in the Bourbre and Ardières Rivers, 77% of the PEC are higher than corresponding MEC by a factor of 1.1 to 4. Nevertheless, for these rivers, PEC are in the range of measured concentrations in the river and a good adequacy can generally be noted between PEC and MEC. PEC calculated for beta blockers in the Saône River are generally underestimated by a factor of 2 to 9 for all beta blockers except PROP, BIS and SOT (factor of 16, between 18 and 30, and 20, respectively). For this site, PEC are not representative of MEC.

Table 4: Predicted environmental concentrations (PEC) and measured concentrations (MEC, min-max) at the different sampling point of the river downstream of WWTP

WWTP	Sampling day	WWTP flow (m^3/s)	QMNA5 (m^3/s)		Concentration (ng/L)											
					E1 tot	E3 tot	ATE	SOT	NAD	TIM	ACE	MET	OXP	PROP	BET	BIS
Fontaines on Saône	13/11/07	124	40	PEC	0.03	0.3	3,4	1,3	0,1	0,01	2,2	0,3	0,05	0,4	0,03	1,0
				MEC	0.8 - 3.8	< 0.2	9.8 – 26.5	< 8.9 - 153	< 1.0 - 1.0	< 1.3	11.7 – 23.2	1.8 – 4.4	0.1 – 0.3	< 0.8 - 4.1	0.2 – 0.4	29.6 – 34.7
	16/11/07	267	40	PEC	0.02[a]	0.3[a]	3,5	1,3	0,1	0,01	2,1	0,3	0,04	0,3	0,02	0,5
				MEC[b]	0.7 - 0.8	< 2.6	10.1 – 13.8	24.5 - 28.0	< 1.1	< 1.0	17.9 – 21.0	1.7 – 2.1	< 0.9	4.8 – 5.7	< 0.9	9.0 – 11.2
Beaujeu on Ardières	10/06/08	0.827	0.444	PEC	0.1	/	32.1	8.0	/	0.23	5.6	1.8	0.1	13.8	/	0.5
				MEC	1.2 - 1.6	/	0.4 - 19.6	< 0.4 - 5.8	< 0.2 - 0.6	1.7 - 2.0	3.0 - 13.2	< 0.3 - 1.8	< 0.3	< 0.4 - 6.9	< 0.3 - 0.5	< 0.2 - 1.6
	24/06/08	0.345	0.444	PEC	0.3	/	65.1	15.6	/	0.3	16.9	4.2	/	22.1	/	0.9
				MEC	0.8 - 1.8	/	< 0.8 - 209	< 0.1 - 5.0	< 0.2 - 7.1	1.6 - 1.8	3.1 - 43.5	0.4 - 1.0	/	< 0.5 - 7.4	/	< 0.3 - 0.4
Bourgoin Jallieu on Bourbre	02/09/08	2.07[b]	0.105	PEC	1.8	/	165	243	15.6	1.4	151	16.5	/	38.4	/	22.1
				MEC	1.5 - 1.9	/	73.5 - 165	19.2 - 213	2.3 - 41.5	< 0.1 - 1.0	33.3 - 168	1.8 - 18.5	/	3.4 - 34.5	/	3.7 - 20.9
	09/09/08	2.41	0.105	PEC	1.4	/	202	179	/	/	129	10.6	/	24.3	/	16.2
				MEC	0.3 - 2.3	/	11.7 - 125	3.4 - 113	< 0.3 - 2.8	/	7.6 - 110	< 0.2 - 8.3	/	< 0.3 - 16.1	/	0.5 - 13.7
	16/09/08	4.70	0.105	PEC	5.0	/	251	128	/	0.6	118	10.2	/	25.9	/	10.4
				MEC	0.4 - 3.3	/	10.9 - 118	4.5 - 94.3	/	< 0.5	5.8 - 59.5	< 0.3 - 5.0	/	< 0.4 - 10.7	/	0.3 - 3.5
	23/09/08	2.27	0.105	PEC	5.9	/	292	151	0.8	1.2	191	10.9	/	30.8	/	11.8
				MEC	2.1 - 3.9	/	16.3 - 103	5.5 - 80.4	< 0.5	< 0.6	9.5 - 111	0.8 - 4.9	/	1.5 - 12.5	< 0.2 - 0.4	1.9 - 6.4

QMNA5: 5-years lowest water flow discharges

/: not quantified in the samples (of effluent for PEC and surface water for MEC); LOQ estimated between 0.2 and 1.1 for beta blockers and between 0.3 and 3.1 for E3

[a] free concentration

[b] MEC of the 20/11/07

Tentative of risk assessment for the downstream rivers of 15 French WWTPS

In order to evaluate environmental risk linked to the presence of estrogens and beta blockers in rivers, measured concentrations in the 3 rivers studied for each molecule were compared to the PNEC found in literature. In addition, a tentative of risk assessment was also performed for 12 previously studied WWTP located in France (Paris area, Lyon area and in the south of France). For these WWTP, PEC were calculated from mean concentrations (n = 2 or 3) measured in effluent samples previously analyzed within the context of AMPERES project (Gabet et al., 2009).

PNEC are computed from toxicity tests but PNEC are only available for some of the studied molecules. For estrogens, a rough estimation of PNEC of 5 ng/L was evaluated (Stuer-Lauridsen et al., 2000). For beta blockers, PNEC are available for only 4 of the 10 beta blockers analysed. An author estimates EC50 (half maximal effective concentration) for ATE, MET and PROP on different species: invertebrate (*Daphnia magna*), alga (*Desmodesmus subspicatus*) and aquatic plant (*Lemna minor*). PNEC, were obtained by dividing the lowest EC50 by an assessment factor of 1000 (Cleuvers, 2005). The following results were obtained: PROP was the most toxic substance with a PNEC of 0.73 µg/L and the PNEC of ATE and MET were evaluated at 7.9 and 310 µg/L, respectively. Another study, present PNEC at 10 ng/L for PROP derived from chronic tests on fish (Ferrari et al., 2004). For ACE, PNEC was evaluated at 1 250 µg/L on invertebrate organism (*Ceriodaphnia dubia*) by dividing the lowest NOEC (chronic non observed effect concentration) by 50 (Garric et al., 2006). No PNEC value was found for NAD, but the toxicity tests performed on aquatic invertebrates show that acute exposure to NAD (100 mg/L) resulted in no changes in species survival (Huggett et al., 2002). Thus, the following PNEC were used for this environmental risk assessment study: 5 ng/L for estrogens, 1250 µg/L for ACE, 7.9 µg/L for ATE, 310 µg/L for MET and 10 ng/L for PROP.

For global estrogens, risk characterisation ratios evaluated for the 3 rivers (Ardières, Bourbre and Saône) range between 0.3 and 5.5 (Table 6). The ratio above 1 is linked to the high concentration of E3 measured in one of the samples collected in the Saône River. Among the 12 additional WWTP studied, risk characterisation ratios never exceed 0.8. That shows a generally low predicted environmental risk associated to these substances.

Concerning beta blockers, for ACE, ATE and MET, the ratio between measured concentrations (or PEC) and the PNEC are in most cases below 0.2, showing an insignificant predicted environmental risk. For PROP, the mean ratio are 1.7, 0.8 and 0.3 for the Ardières, the Saône and the Bourbre Rivers, respectively (ratio between 0.8 and 3.5 for Ardières River,

between 0.3 and 2.5 for Saône River and between 0.1 and 0.7 for Bourbre River). Moreover for PROP, among the 12 WWTP effluents analyzed, a ratio below 0.1 is calculated for 7 sites, while 4 sites show ratio between 0.1 and 1 and 4 sites have ratio between 2.6 and 34.2. These 4 sites correspond to the rivers where the WWTP effluents are the less diluted (Maurepas, Maldroit, Bouillide and Ardières Rivers). That shows that PROP can represent a potential environmental risk up to a dilution ratio of the effluent in the river of 13. Previous study performed on big rivers (the Saône and the Rhône) presented lower ratio PEC/PNEC for PROP: between 0.03 and 0.45 depending on the studied site (Miege et al., 2006). In our study, the fluxes of propranolol are in the same range as those observed by Miege *et al.* (2006) but the 5 years lowest water flow discharges are 100 times lower (ratio WWTP outfall flow/QMNA5 above 70).

Table 5: Risk assessment for estrogens and 4 beta blockers (ACE, ATE, MET and PROP) in the downstream rivers of 15 sites

WWTP	River	Population equivalent (PE)	WWTP outflow (m^3/d)	5 years lowest water flow discharges (m^3/s)	Calculated dilution factor	MEC (average value) or PEC (ng/L)									PEC/PNEC			
						E1	αE2	βE2	E3	EE2	ACE	ATE	MET	PROP	Sum of estrogènes	ACE	ATE	MET	PROP
Beaujeu	Ardières	2 900	750	0.11	13	1.5	/	/	/	/	19.0	36.2	0.9	3.2	0.3	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.3
Bourgoin Jallieu	Bourbre	78 000	17 500	0.44	2	1.8	/	/	/	/	76.3	94.4	8.8	17.0	0.4	< 0.1	< 0.1	< 0.1	1.7
Fontaines sur Saône	Saône	30 000	6 500	40	532	1.6	/	/	25.9	/	44.7	51.7	6.9	8.4	5.5	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.8
1	Maurepas	36000	4430	0.11	2	3.1	/	/	/	/	18.1	400	28.9	179	0.6	< 0.1	0.1	< 0.1	17.8
2	Seine	250000	26737	63.0	204	$0.3*10^{-2}$	/	/	/	/	0.2	2.0	1.2	1.2	0.0	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.1
3	Maldroit	50000	6486	0.09	1	3.9	/	/	/	/	155	277	34.9	217	0.8	< 0.1	< 0.1	< 0.1	21.7
4	Gave of Pau	110000	14513	14.0	83	$0.9*10^{-2}$	/	/	/	/	1.2	7.3	1.6	1.9	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.2
5	Vallon St Antoine	24000	1459	0.78	46	$0.4*10^{-2}$	/	/	/	/	3.6	9.7	0.5	2.6	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.3
6	Bouillide	26000	3750	0.02	1	0.8	/	/	/	/	518	1378	165	342	0.2	< 0.1	0.2	< 0.1	34.2
7	CanteRane	1000	81	0.03	34	1.5	0.2	0.3	0.7	/	/	/	/	2.2	0.5	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.2
8	Ardières	2900	674	0.10	13	0.6	/	/	/	/	15.6	55.7	2.3	26.3	0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	2.6
9	Rhône	13000	1061	600	48860	$0.3*10^{-3}$	/	$0.5*10^{-4}$	/	/	$0.4*10^{-2}$	$0.2*10^{-1}$	$0.1*10^{-1}$	$0.3*10^{-2}$	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
10	Rhône	700000	312767	600	166	$0.4*10^{-1}$	/	/	/	/	/	8.2	1.2	1.2	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.1
11	Rhône	88000	7150	600	7250	$0.1*10^{-2}$	$0.3*10^{-3}$	$0.4*10^{-3}$	$0.7*10^{-2}$	$0.3*10^{-3}$	0.4	0.3	0.1	0.1	0.0	< 0.1	0.0	0.0	0.0
12	Arvan	17000	1198	0.74	54	0.1	/	0.3	0.6	/	15.8	8.9	5.0	3.6	0.2	< 0.1	0.0	0.0	0.4

/: not quantified

PNEC: 5 ng/L for estrogens (Stuer-Lauridsen et al., 2000), 1250000 ng/L for ACE (Garric et al., 2006), 7900 ng/L for ATE (Cleuvers, 2005), 310000 for MET (Cleuvers, 2005) and 10 ng/L for PROP (Ferrari et al., 2004).

Conclusion

Among the 5 estrogens analyzed, only E1 and E3 were quantified in effluent and river water. The most frequently quantified estrogen is E1. The concentration of estrogen can reach 220 ng/L in effluent (for E3) and 26 ng/L in river water (for E3), nevertheless, mean estrogen concentration in surface water is generally at the ng/L level. Among the 10 beta blockers analyzed, acebutolol, atenolol and sotalol are quantified in almost all the collected samples (100% of effluent samples and in more than 90% of river water samples). Other molecules such as betaxolol, nadolol and oxprenolol are rarely quantified. Beta blockers concentration can reach 2450 ng/L in effluent and 240 ng/L in surface water (for atenolol). Nevertheless, mean concentration of individual beta blocker in river water is below 50 ng/L.

The impact of WWTP on the receiving river is visible for all studied sites, except for estrogens in Fontaines sur Saône where the effluent is highly diluted in the river (dilution by nearly 7000). Concentrations of estrogens and beta blockers increase downstream the WWTP outfall and the phenomena is particularly visible on the Bourbre River which is, among the different sites studied, the one where the effluent is the less diluted in the river. For estrogens, the study of WWTP impact is nevertheless complicated considering the low concentrations present in surface water (close to the quantification limit). The study of beta blockers was therefore more pertinent. Downstream the effluent outflow, the beta blockers concentration can be up to 13 times higher than upstream the WWTP. The study of the attenuation of concentration between samples collected immediately after the effluent outfall (5 m) and samples collected further downstream (20 m or 2 km) showed that some beta blockers, such as metoprolol and propranolol are not degraded even 2 km after the WWTP outfall and other like acebutolol are mostly degraded (more than 50%). The similarity of the relative distribution (fingerprint) of the beta blockers was pointed out between samples of effluent and river samples collected immediately downstream the effluent outflow.

An environmental risk assessment was performed for estrogens and the beta blockers for which PNEC are available. For estrogens, risk characterisation ratios were systematically below 1, except in one site, and showed a low predictive environmental risk. With a ratio below 0.1, the predictive environmental risk linked to the presence of atenolol, acebutolol and metoprolol in river water seems to be negligible. On the contrary, ratios above 1 were obtained for propranolol showing a possible environmental risk for 5 different sites. These molecule can represent a potential environmental risk up to a dilution ratio of the effluent in the river of 13. Unfortunately, no PNEC were found for sotalol which is one of the most concentrated beta blocker. Thus, it was impossible to evaluate the risk linked to the presence

of this molecule in the aquatic environment. To conclude, we have to keep in mind that even if no specific toxic effect is pointed out, each molecule contributes to the overall toxic potential of the substances present in the aquatic environment. Moreover, this environmental risk assessment did not take into account the synergistic and antagonist effects, or bioaccumulation.

Acknowledgement

Philippe Bados, Corinne Brosse and Severine Schiavonne are thanked for analytical support. We also thank the Agence de l'Eau Rhône-Méditerrannée-Corse and the Agence nationale de la recherche (ANR Precodd AMPERES project) for financial support.

Annexe: Mean concentrations (min-max) of estrogens and beta blockers measured in the different sampling points of the 3 studied sites

		ACE	ATE	BIS	BET	MET	NAD	OXP	PROP	SOT	TIM	E1
Bourbre	**Upstream**	14 (6.0-33)	28 (11-74)	1.6 (0.3-3.7)	/	1.3 [c] (0.8-1.8)	42 [a] (42-42)	/	2.5 [c] (1.5-3.4)	8.4 (3.4-19)	/	1.6 (0.5-3.9)
Bourgoin Jallieu WWTP	**Effluent**	393 (289-521)	599 (470-796)	41 (26-63)	/	32 (25-47)	23 (2.1-45)	/	80 (62-110)	470 (315-695)	2.9 (1.5-3.9)	9.2 (3.5-16.1)
Bourbre	**Downstream 1**	99 (58-168)	123 (85-165)	11 (3.5-21)	/	9.0 (4.4-19)	3.4 [c] (2.8-4.0)	/	17 (7.6-35)	120 (60-213)	1.0 [a] (1.0-1.0)	2.5 (1.9-3.3)
Bourbre	**Downstream 2**	54 (5.8-111)	65 (10-137)	5.2 (0.3-13)	/	8.3 [c] (4.9-12)	2.3 [a] (2.3-2.3)	/	16 [c] (12-21)	63 (4.5-158)	0.8 [a] (0.8-0.8)	1.2 (0.3-2.1)
Ardières	**Upstream 1**	5.0 (3.1-7.3)	2.2 [d] (2.1-2.4)	0.9 [d] (0.9-0.9)	/	0.4 [d] (0.4-0.5)	/	/	1.4 [d] (0.7-2.1)	2.3 [d] (1.6-3.0)	1.8 (1.5-2.0)	1.4 (0.8-2.3)
Ardières	**Upstream 2**	9.1 (3.0-16)	76 (0.4-209)	1.0 [b] (1.0-1.0)	/	0.7 [d] (0.5-0.9)	3.7 [d] (0.4-7.1)	/	1.4 [b] (1.4-1.4)	3.5 [d] (3.3-3.6)	1.6 (1.4-1.8)	1.4 (1.2-1.5)
Beaujeu WWTP	**Effluent**	147 (68-226)	628 (388-868)	9.5 (6.6-12)	/	39 (22-55)	/	/	231 (167-294)	153 (97-208)	3.2 (2.8-3.6)	2.7 (1.7-3.7)
Ardières	**Downstream 1**	39 (12-62)	29 (13-56)	1.4 [d] (1.2-1.6)	/	1.2 (0.9-1.8)	0.6 [b] (0.6-0.6)	/	1.8 (1.1-2.9)	5.2 (4.9-5.8)	1.6 (1.3-1.8)	1.4 (1.1-1.6)
Ardières	**Downstream 2**	23 (13-30)	26 (19-41)	1.1 (0.4-1.1)	/	1.2 (1.0-1.4)	/	/	6.3 (4.5-7.4)	4.4 (3.5-5.1)	1.6 (1.5-1.7)	1.6 (1.5-1.8)
Saône	**Upstream**	14 (12-18)	10 (9.8 – 10)	14 (1.3-30)	0.2 [b] (0.2-0.2)	1.9 (1.7-2.3)	18 [b] (18-18)	0.1 [b] (0.1-0.1)	3.8 [d] (2.8-4.8)	22 (16-28)	/	1.4 (1.9-0.7)
Fontaines sur Saône WWTP	**Effluent**	1446 (1436-1455)	2345 (2240-2450)	507 (383-630)	18 (17-19)	206 (190-223)	56 (52-61)	30 (27-32)	240 (237-243)	886 (855-918)	8.7 (8.0-9.5)	16.2 (12.4-20)
Saône	**Downstream 1**	76 (21-183)	93 (14-240)	27 (9.0-38)	1.1 [d] (0.4-1.7)	12 (2.1-29)	2.7 [d] (1.0-4.4)	1.9 [d] (0.3-3.4)	11 (4.1-25)	67 (22-153)	1.0 [b] (1.0-1.0)	1.7 (1.3-2.0)
Saône	**Downstream 2**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.6 (1.0-1.9)

[a] quantification frequency of 25%
[b] quantification frequency of 33%
[c] quantification frequency of 50%
[d] quantification frequency of 66%
/: not quantified (LOQ between 0.2 and 1.1 depending on the sample and the molecule)
NA: not analyzed

References

Andreozzi, R., Raffaele, M. and Nicklas, P. (2003) Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. Chemosphere 50 (10), 1319-1330.

Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A. and Samperi, R. (2000) Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. Environmental Science & Technology 34 (24), 5059-5066.

Belfroid, A. C., Van der Horst, A., Vethaak, A. D., Schafer, A. J., Rijs, G. B. J., Wegener, J. and Cofino, W. P. (1999) Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. Science of the Total Environment 225 (1-2), 101-108.

Bendz, D., Paxeus, N. A., Ginn, T. R. and Loge, F. J. (2005) Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. Journal of Hazardous Materials 122 (3), 195-204.

Besse, J. P., Kausch-Barreto, C. and Garric, J. (2008) Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment: Application to the French situation and preliminary prioritization. Human and Ecological Risk Assessment 14 (4), 665-695.

Boyd, G. R., Reemtsma, H., Grimm, D. A. and Mitra, S. (2003) Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. Science of the Total Environment 311 (1-3), 135-149.

Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R. and Fanelli, R. (2003) Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. Environmental Science & Technology 37 (7), 1241-1248.

Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S. and Levi, Y. (2004) Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). Science of the Total Environment 324 (1-3), 55-66.

Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D. and Zuccato, E. (2006) Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. Environmental Science & Technology 40 (1), 357-363.

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

Coetsier, C. M., Spinelli, S., Lin, L., Roig, B. and Touraud, E. (2009) Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs? Environment International 35 (5), 787-792.

Czajka, C. P. and Londry, K. L. (2006) Anaerobic biotransformation of estrogens. Science of the Total Environment 367 (2-3), 932-941.

Detroyer, A., Heyden, Y. V., Carda-Broch, S., Garcia-Alvarez-Coque, M. C. and Massart, D. L. (2001) Quantitative structure-retention and retention-activity relationships of beta-blocking agents by micellar liquid chromatography. Journal of Chromatography A 912 (2), 211-221.

European Commission, J. R. C. (2003) Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directives 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, Part II Environmental Risk Assessment - Office for official publications of the European Communities, Luxembourg.

Farre, M., Brix, R., Kuster, M., Rubio, F., Goda, Y., de Alda, M. J. L. and Barcelo, D. (2006) Evaluation of commercial immunoassays for the detection of estrogens in water by

comparison with high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry HPLC-MS/MS (QqQ). Analytical and Bioanalytical Chemistry 385 (6), 1001-1011.

Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. and Garric, J. (2004) Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? Environmental Toxicology and Chemistry 23 (5), 1344-1354.

Gabet, V., Miege, C., Choubert, J. M., Martin Ruel, S. and Coquery, M. (2009) Estrogens and beta blockers in wastewater treatment plants. Water Research

Garric, J., Ferrari, B., Fraysse, B., Mons, R. and Vollat, B. (2006) Effects of some human pharmaceutical on freshwater organisms (Impact de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce). Environnement, Risques et Santé 5 (4), 290-295.

Gros, M., Petrovic, M. and Barcelo, D. (2006) Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. Talanta 70 (4), 678-690.

Grujic, S., Vasiljevic, T. and Lausevic, M. (2009) Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1216 (25), 4989-5000.

Gutjahr-Gobell, R. E., Zaroogian, G. E., Horowitz, D. J. B., Gleason, T. R. and Mills, L. J. (2006) Individual effects of estrogens on a marine fish, Cunner (Tautogolabrus adspersus), extrapolated to the population level. Ecotoxicology and Environmental Safety 63 (2), 244-252.

Haider, S. and Baqri, S. S. R. (2000) beta-Adrenoceptor antagonists reinitiate meiotic maturation in Clarias batrachus oocytes. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology 126 (4), 517-525.

Hansen, P. D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M. and Blaise, C. (1998) Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. Trac-Trends in Analytical Chemistry 17 (7), 448-451.

Hernando, M. D., Gomez, M. J., Aguera, A. and Fernandez-Alba, A. R. (2007) LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in wastewater and surface water. Trac-Trends in Analytical Chemistry 26 (6), 581-594.

Huggett, D. B., Brooks, B. W., Peterson, B., Foran, C. M. and Schlenk, D. (2002) Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 43 (2), 229-235.

Huggett, D. B., Khan, I. A., Foran, C. M. and Schlenk, D. (2003) Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in United States wastewater effluent. Environmental Pollution 121 (2), 199-205.

Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A., Suzuki, H. and Morita, M. (2003) Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 984 (2), 195-202.

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A. P. and Tyler, C. R. (2003) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aquatic Toxicology 65 (2), 205-220.

Kasprzyk-Hordem, B., Dinsdale, R. M. and Guwy, A. J. (2007) Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive

electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1161 (1-2), 132-145.
Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M. and Guwy, A. J. (2009) The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. Water Research 43 (2), 363-380.
Kuch, H. M. and Ballschmiter, K. (2001) Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. Environmental Science & Technology 35 (15), 3201-3206.
Kummerer, K. (2009) The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. Journal of Environmental Management 90 (8), 2354-2366.
Kuster, M., de Alda, M. J., Hernando, M. D., Petrovic, M., Martin-Alonso, J. and Barcelo, D. (2008) Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). Journal of Hydrology 358 (1-2), 112-123.
Labadie, P. and Budzinski, H. (2005) Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry 381 (6), 1199-1205.
Lagana, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G. and Marino, A. (2004) Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. Analytica Chimica Acta 501 (1), 79-88.
Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. H., Olsson, P. E. and Forlin, L. (1999) Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? Aquatic Toxicology 45 (2-3), 91-97.
Loos, R., Gawlik, B. M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S. and Bidoglio, G. (2009) EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. Environmental Pollution 157 (2), 561-568.
Loos, R., Wollgast, J., Huber, T. and Hanke, G. (2007) Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. Analytical and Bioanalytical Chemistry 387 (4), 1469-1478.
Maurer, M., Escher, B. I., Richle, P., Schaffner, C. and Alder, A. C. (2007) Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants. Water Research 41 (7), 1614-1622.
Miege, C., Bados, P., Brosse, C. and Coquery, M. (2009a) Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices. Trac-Trends in Analytical Chemistry 28 (2), 237-244.
Miege, C., Choubert, J. M., Ribeiro, L., Eusebe, M. and Coquery, M. (2009b) Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. Environmental Pollution 157 (5), 1721-1726.
Miege, C., Favier, M., Brosse, C., Canler, J. P. and Coquery, M. (2006) Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers. Talanta 70 (4), 739-744.
Miege, C., Karolak, S., Gabet, V., Jugan, M. L., Oziol, L., Chevreuil, M., Levi, Y. and Coquery, M. (2009c) Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. Trac-Trends in Analytical Chemistry 28 (2), 186-195.
Morteani, G., Moller, P., Fuganti, A. and Paces, T. (2006) Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and sewage plants in the hydrological basin

of Prague (Czech Republic). Environmental Geochemistry and Health 28 (3), 257-264.

Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K. and Takada, H. (2006) Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. Water Research 40 (17), 3297-3303.

Paffoni, C., Welte, B., Gousailles, M. and Montiel, A. (2006) New molecules involved by the european directives: from wastewater to drinking water treatment plants. European Journal of Water Quality 37 (1), 21-38.

Peng, X. Z., Yu, Y. J., Tang, C. M., Tan, J. H., Huang, Q. X. and Wang, Z. D. (2008) Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. Science of the Total Environment 397 (1-3), 158-166.

Ren, H. Y., Ji, S. L., Ahmad, N. U. D., Dao, W. and Cui, C. W. (2007) Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 alpha-ethynylestradiol by Sphingobacterium sp JCR5. Chemosphere 66 (2), 340-346.

Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M. J. L. and Barcelo, D. (2004) Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1045 (1-2), 85-92.

Strub, M. P. (2008). Enseignements nationaux de l'opération européenne de recherche des substances émergentes dans les eaux de surface EUMORE FATE, Note de synthèse Réf. 08-0037B.

Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L. P., Lutzhoft, H. C. H. and Halling-Sorensen, B. (2000) Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. Chemosphere 40 (7), 783-793.

Ternes, T. A. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Research 32 (11), 3245-3260.

Ternes, T. A., Kreckel, P. and Mueller, J. (1999a) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. Science of the Total Environment 225 (1-2), 91-99.

Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R. D. and Servos, M. (1999b) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. Science of the Total Environment 225 (1-2), 81-90.

Vethaak, A. D., Lahr, J., Schrap, S. M., Belfroid, A. C., Rijs, G. B. J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A. S., Grinwis, G. C. M., Kuiper, R. V., Legler, J., Murk, T. A. J., Peijnenburg, W., Verhaar, H. J. M. and de Voogt, P. (2005) An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. Chemosphere 59 (4), 511-524.

Vieno, N. M., Tuhkanen, T. and Kronberg, L. (2006) Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. Journal of Chromatography A 1134 (1-2), 101-111.

Vigano, L., Mandich, A., Benfenati, E., Bertolotti, R., Bottero, S., Porazzi, E. and Agradi, E. (2006) Investigating the estrogenic risk along the River Po and its intermediate section. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51 (4), 641-651.

Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R. and Grenier-Loustalot, M. F. (2008) Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1210 (1), 84-91.

Zhou, J. L., Zhang, Z. L., Banks, E., Grover, D. and Jiang, J. Q. (2009) Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. Journal of Hazardous Materials 166 (2-3), 655-661.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La question de la présence de micropolluants dans l'environnement aquatique est aujourd'hui d'actualité. A l'heure où le bon état écologique de l'eau et des milieux aquatiques doit être atteint, il est important de déterminer l'efficacité des différents procédés épuratoire sur l'élimination de ces substances et de pouvoir dresser le bilan de leur présence dans le milieu aquatique.

Ce travail de thèse propose une étude approfondie du comportement et du devenir de 5 hormones estrogéniques et de 10 bêtabloquants dans les stations d'épuration et donne des éléments de réponse quant à la présence de ces molécules dans le milieu aquatique. Des études antérieures présentent des résultats de concentration et d'abattement pour ces molécules et en particulier pour les estrogènes. Cependant, peu d'études ont pris en compte les formes libres et conjuguées des estrogènes et seuls quelques rares auteurs se sont intéressés aux matières en suspension et aux boues. Pour ce qui est des bêtabloquants, peu de résultats sont disponibles, particulièrement pour les matières solides (MES et boues) et les milieux naturels. De plus, compte tenu de la diversité des méthodes analytiques utilisées (souvent peu décrites), il est très difficile de comparer les différents résultats obtenus dans la littérature.

Afin de satisfaire aux objectifs fixés, la fiabilité des résultats est un paramètre crucial qui conditionne la pertinence des conclusions obtenues. Il s'agit donc dans un premier temps d'obtenir des échantillons représentatifs. Pour cela, la plupart des échantillons d'eau prélevés sont des échantillons moyens 24h asservis au débit. Seuls les échantillons d'eau de rivière n'ont pas été, pour des raisons pratiques, prélevés dans ces conditions. De plus, l'innocuité de la chaîne de prélèvement et de conditionnement a été vérifiée très soigneusement afin de s'assurer de l'absence de pollution par désorption et de l'absence de pertes des analytes par adsorption. Les étapes de préparation et d'analyse des molécules cibles dans les échantillons sont ensuite très importantes pour s'assurer de la fiabilité des données. Pour l'analyse de la phase dissoute, des méthodes validées développées au laboratoire ont été utilisées. De plus, chaque analyse a été réalisée en respectant des protocoles d'assurance qualité stricts (extraction dans les 48h qui suivent le prélèvement, blancs d'analyse et blancs méthode

réguliers, utilisation de 2 transitions de fragmentation en spectrométrie de masse, utilisation de traceurs de méthode ou de la méthode des ajouts dosés, etc.).

Pour l'analyse des MES et des boues de station d'épuration, de nouvelles méthodes ont été développées. Le premier objectif de ce travail a donc consisté à développer une méthode pour l'analyse des estrogènes dans les solides (boues et MES), cette méthode étant ensuite adaptée pour l'analyse des bêtabloquants. Quelques rares auteurs présentent des méthodes permettant d'analyser les estrogènes et les bêtabloquants dans les boues de station d'épuration. Cependant, les méthodes publiées présentent peu, voire pas, de détail(s) sur la validation (i.e. performances de la méthode). Pourtant, étant donnée la complexité de ce type de matrice, nous avons constaté qu'il est très important d'étudier l'influence de la matrice sur les résultats obtenus. Le développement d'une méthode permettant d'analyser les molécules ciblées dans les boues était donc nécessaire. Pour la préparation de l'échantillon, les objectifs étaient d'une part, de réaliser une extraction quantitative tout en limitant la co-extraction d'interférents et d'autre part, de mettre au point une purification efficace permettant d'éliminer ces interférents. Cependant, malgré les différentes étapes de purification mises en place et optimisées, la présence de forts effets matrice persiste (extinction de signal pouvant atteindre 90 % dans certains échantillons). Cette observation justifie donc l'importance d'utiliser des traceurs de méthode (ou la mise en œuvre de la quantification par ajouts dosés, le cas échéant) et de réaliser une validation exhaustive du protocole. Lors de la validation de méthode, une attention particulière a été portée sur l'étude de la spécificité qui permet de s'assurer de l'obtention d'une réponse exacte quelle que soit la matrice testée. Finalement, la méthode développée et validée pour les estrogènes apparaît tout à fait adaptée : répétabilité (testée sur des micropolluants dopés ou natifs) et reproductibilité satisfaisantes et spécificité statistiquement vérifiée (testée sur 8 boues (ou 6 pour EE2)). La méthode mise au point pour l'analyse des bêtabloquants dans les boues, bien qu'ayant subi une validation moins poussée (étude des rendements et de la répétabilité seulement), a été mise en œuvre avec succès sur différents échantillons de boue et sur des matières en suspension d'eau usée.

L'attention portée sur les conditions de prélèvement (conditions identiques pour toutes les installations étudiées) et l'ensemble du travail sur les méthodologies analytiques a permis de comparer différents procédés de traitement des eaux usées urbaines. Pour l'étude des STEP, 14 sites mettant en œuvre des procédés épuratoires variés ont été étudiés. L'analyse des molécules ciblées dans la phase dissoute a mis tout d'abord en évidence que les estrogènes se trouvent majoritairement sous forme libre (i.e. non conjuguée) dans les STEP, la proportion d'hormones libres représentant en moyenne 80 % des hormones totales (i.e. libres

et conjuguées). De plus, une faible variabilité inter-journalière des concentrations d'estrogènes et de bêtabloquants a été observée (généralement inférieure à 20 %). En terme de concentrations mesurées dans les STEP, pour les estrogènes, ce sont E3 et E1 qu'on retrouve le plus fréquemment (100 % des échantillons) et aux plus fortes concentrations dans les influents (concentrations moyennes de 313 et 79 ng/l, respectivement). Dans les effluents, l'estrogène le plus souvent quantifié est E1 (84 % des échantillons) à une concentration moyenne de 8 ng/L ; ce résultat coïncide avec le fait que E1 fait partie des estrogènes les plus quantifiés dans les influents et que cette molécule peut être également formée lors de la dégradation de βE2 et EE2. En ce qui concerne les bêtabloquants, 5 des 10 molécules analysées sont systématiquement quantifiées dans les influents (ACE, ATE, BIS, PROP et SOT) ; les molécules mesurées aux plus fortes concentrations étant ACE, ATE et SOT (concentrations moyennes de 2693, 2407 et 1012 ng/L, respectivement). Une bonne cohérence a d'ailleurs été observée entre les bêtabloquants les plus consommés en France et ceux présents aux plus fortes concentrations dans les influents de STEP. Dans les effluents, 4 bêtabloquants sont toujours quantifiés (ACE, ATE, PROP et SOT) et, comme observé dans les influents, ce sont ACE, ATE et SOT qui sont présents aux plus fortes concentrations (concentrations moyennes de 475, 725 et 1032 ng/L, respectivement).

Du point de vue de l'élimination des molécules ciblées, les estrogènes sont bien éliminés de la phase dissoute par les traitements biologiques (abattements moyens supérieurs à 90 %). Ce résultat ne prend pas en compte les phases particulaires. Néanmoins, le bilan de matière global (tenant compte des phases dissoutes, particulaires et des boues) réalisé sur 2 STEP de type boue activée confirme ce résultat et met en évidence que les estrogènes sont effectivement dégradés en large majorité par le traitement biologique et ne sont pas simplement transférés vers les boues. Pour les bêtabloquants, les abattements mesurés dans la phase dissoute diffèrent d'une molécule à l'autre. Certains bêtabloquants sont bien éliminés avec des abattements moyens de plus de 80 % (ACE et NAD), alors que d'autres ne sont pas impactés par les traitements (abattements inférieurs à 10 % pour SOT et PROP). Les bêtabloquants restants (ATE, BET, BIS et MET) présentent quant à eux des abattements moyens (entre 40 et 70 %). Comme observé pour les estrogènes, la prise en compte de la phase particulaire ne modifie pas beaucoup les résultats obtenus et confirme que l'abattement observé correspond bien à une dégradation et non pas à une accumulation dans les boues.

Le traitement primaire a montré une faible efficacité quant à l'élimination des estrogènes et des bêtabloquants de la phase dissoute. Cependant, l'ajout d'un traitement physico-chimique a permis d'augmenter l'élimination des estrogènes alors qu'aucun bénéfice

n'a été observé vis à vis de l'élimination des bêtabloquants. En revanche, lors du traitement primaire, un effet de la température a été observé sur l'élimination des bêtabloquants, même si cette observation demande à être confirmée. D'autre part, l'effet de la température du bassin de boue activée a seulement été noté pour ATE. La plus grande efficacité de la boue activée faible charge par rapport à la boue activée moyenne charge a été prouvée pour tous les micropolluants. De plus, l'addition d'un biofiltre nitrifiant en sortie de boue activée moyenne charge n'a pas permis d'atteindre les performances de la boue activée pour ACE et ATE. La comparaison des efficacités d'élimination des procédés à cultures libres et fixées n'a pas permis de dégager une tendance générale.

L'analyse d'échantillons de boue de différentes natures (boues primaires, boues biologiques, boues tertiaires, boues mixtes, boues déshydratées, boues traitées) a montré la présence d'estrogènes et de bêtabloquants dans les boues aux différents stades de traitement. Ces teneurs peuvent atteindre 766 ng/g pour les bêtabloquants (teneur maximale observée pour PROP dans une boue traitée) ; les teneurs moyennes mesurées varient entre 0,1 et 213 ng/g en fonction de la molécule et du type de boue. Pour les estrogènes, les teneurs moyennes mesurées dans les boues sont de l'ordre de 20 ng/g (sauf pour EE2 jamais détectée). Tous types de boues confondus, les molécules retrouvées en plus forte teneur sont ACE et PROP ; ces molécules correspondent avec ATE et SOT aux bêtabloquants les plus concentrés dans la phase dissoute ; ATE et SOT, étant plus hydrophiles -log Kow < 0,5-, il n'est pas surprenant de les retrouver à de plus faibles teneurs dans les boues. En ce qui concerne les estrogènes, c'est E1 (estrogène le plus quantifié dans les effluents, et formé par dégradation d'autres estrogènes) qu'on quantifie le plus souvent.

L'impact des STEP sur le milieu récepteur est réellement visible. On observe en effet que l'effluent de STEP représente une source d'estrogènes et de bêtabloquants. Les molécules les plus quantifiées dans le milieu sont E1 pour les estrogènes (98 % des échantillons, concentration moyenne de 1,6 ng/L) et ACE, ATE et SOT pour les bêtabloquants (93 à 100 % des échantillons, concentrations moyennes comprises entre 32 et 49 ng/L). On peut ainsi noter que les molécules les plus quantifiées dans les effluents de STEP sont identiques à celles les plus quantifiées dans le milieu aquatique. D'un point de vue du risque environnemental lié à la présence de ces molécules dans le milieu aquatique, PROP est le seul bêtabloquant qui s'est avéré présenter un risque pour l'environnement pour 4 des 15 sites étudiés. Pour les estrogènes, E3 qui a été quantifié dans un seul des échantillons d'eau de surface analysés présente également un potentiel risque environnemental pour le milieu aquatique.

Ce travail a donc permis d'apporter des premiers éléments de réponses quant au comportement des hormones et des bêtabloquants dans les STEP et à leur occurrence dans le milieu aquatique. En effet, un état des lieux assez complet de l'impact de différents traitement épuratoires sur l'élimination des molécules ciblées a pu être réalisé. Ce type de données est assez rare dans la mesure où le comportement des molécules dans les stations d'épuration est souvent étudié sur une seule installation ou sur des pilotes. Ici, 14 sites mettant en œuvre des procédés épuratoires variés (traitement primaire avec ou sans traitement physico-chimique, boue activée, biofiltre, bioréacteur à membrane, disque biologique, lit bactérien, lagunage, etc.) ont été étudiés sur plusieurs jours consécutifs. Les données étant acquises dans des conditions similaires, une comparaison des résultats a pu être réalisée. Cependant, il reste encore des questions en suspens dans le domaine.

D'un point de vue de l'élimination des substances dans les STEP, ce travail de thèse a permis de bien documenter les procédés biologiques, mais il serait intéressant d'étudier plus en détail les traitements tertiaires. Cette étude serait particulièrement enrichissante pour les bêtabloquants qui sont peu, voire pas, éliminés par les traitements conventionnels. En effet, seuls 2 traitements tertiaires ont été étudiés ici (le décanteur tertiaire et la lagune). Dans le cadre du projet AMPERES, 4 STEP ont été échantillonnées spécifiquement pour leur traitement tertiaire : 1 filtre à sable rapide, 1 décanteur rapide, 1 décanteur rapide associé à un filtre à sable et à 1 traitement UV et un filtre à sable associé à une microfiltration. Faute de temps, ces résultats ne figurent pas dans cette thèse, mais leur exploitation permettra d'améliorer les connaissances concernant le comportement des estrogènes et des bêtabloquants dans les STEP. Par ailleurs, il serait intéressant, en utilisant l'ensemble des données générées par le projet AMPERES, d'essayer d'identifier les propriétés physico-chimiques explicatives du comportement des molécules dans les STEP.

En ce qui concerne les molécules bien éliminées dans les STEP (les estrogènes, ACE et NAD), il serait intéressant d'étudier les métabolites formés lors de la dégradation qui s'opère durant le traitement épuratoire. En effet, comme l'impact des rejets de STEP sur le milieu aquatique a été prouvé, il est important de pouvoir identifier et caractériser les métabolites formés pour, par la suite, pouvoir les tracer dans le milieu. Peu de données existent concernant les métabolites formés par la dégradation des estrogènes et des bêtabloquants lors des traitements épuratoires. Cependant, une étude récente a permis d'identifier le produit de la dégradation microbienne de l'aténolol (l'acide aténolique) ; ce produit de dégradation a été quantifié dans les eaux usées à des concentrations équivalentes à celles du composé parent (Radjenovic *et al.*, 2008). Cet aspect est d'autant plus important que

les métabolites formés lors de la dégradation peuvent parfois s'avérer être plus toxique vis-à-vis de l'écosystème aquatique que les molécules parents.

Concernant l'étude des rejets de STEP dans le milieu, il peut être intéressant, pour les estrogènes, de coupler les analyses chimiques avec des tests de toxicité. Une étude couplant des analyses chimiques et biologiques a été réalisée en 2008 dans le cadre du PIREN-Seine (Miege *et al.*, 2009) sur des rivières situées en zone urbaine (recevant une pollution domestique). Ces résultats (publication présentée en annexe 4) ont mis en évidence une bonne cohérence entre les mesures chimiques et les potentiels perturbateur endocrinien mesurés (test MELN). Dans le cas de l'étude du PIREN-Seine, les analyses chimiques se sont montrées appropriées pour tracer les effets perturbateur endocrinien dans les eaux de surface. En effet, par rapport aux tests biologiques, l'analyse chimique a permis d'obtenir une meilleure sensibilité et d'être sélectif (chaque estrogène est quantifié individuellement). Cependant, d'un point de vue général, ces 2 types d'analyse sont complémentaires ; en effet si l'analyse chimique permet d'étudier sélectivement les molécules recherchées, l'analyse biologique permet d'estimer l'effet (dans ce cas perturbateur endocrinien) produit par l'ensemble des substances présentes dans l'échantillon. Pour les bêtabloquants, les concentrations mesurées dans le milieu ne semblent pas, dans la plupart des cas, représenter de risque environnemental majeur. Cependant, nous ignorons, à l'heure actuelle, si les effets de la présence de plusieurs micropolluants sont cumulatifs, antagonistes ou s'il en découle un effet synergique. Une étude récente de toxicité menée sur des cellules de foie de poisson (truite arc-en-ciel) avec plusieurs produits pharmaceutiques (anti-inflammatoires, antidépresseurs, etc.) a cependant montré que la toxicité résultante de la présence de plusieurs molécules appartenant à une même classe thérapeutique était additive (Schnell *et al.*, 2009). En revanche, cette même étude montre que la toxicité résultant de la présence de plusieurs molécules de classes thérapeutiques différentes était supérieure à la somme des toxicités de chaque molécule (effet synergique). Des études d'écotoxicité supplémentaires permettraient de progresser encore davantage sur les risques relatifs à la présence de ces molécules dans le milieu aquatique, en prenant notamment en compte les effets cocktail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adeoya-Osiguwa, S. A., Markoulaki, S., Pocock, V., Milligan, S. R. et Fraser, L. R. (2003) 17 beta-estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. Human Reproduction 18 (1), 100-107.

Adler, P., Steger-Hartmann, T. et Kalbfus, W. (2001) Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from Southern and Middle Germany. Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica 29 (4), 227-241.

AFFSAPS (2003). Analyse des ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France 1991-2001. Troisième édition.

AFNOR (1999). Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique par rapport à une méthode de référence. **Norme NF XPT 90-210:** 58 pp.

Almeida, C. et Nogueira, J. M. F. (2006) Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41 (4), 1303-1311.

Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sorensen, B. et Ternes, T. A. (2003) Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. Environmental Science & Technology 37 (18), 4021-4026.

Andreozzi, R., Raffaele, M. et Nicklas, P. (2003) Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. Chemosphere 50 (10), 1319-1330.

Arditsoglou, A. et Voutsa, D. (2008) Determination of phenolic and steroid endocrine disrupting compounds in environmental matrices. Environmental Science and Pollution Research 15 (3), 228-236.

Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A. et Samperi, R. (2000) Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. Environmental Science & Technology 34 (24), 5059-5066.

Beck, I. C., Bruhn, R., Gandrass, J. et Ruck, W. (2005) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. Journal of Chromatography A 1090 (1-2), 98-106.

Belfroid, A. C., Van der Horst, A., Vethaak, A. D., Schafer, A. J., Rijs, G. B. J., Wegener, J. et Cofino, W. P. (1999) Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. Science of the Total Environment 225 (1-2), 101-108.

Bendz, D., Paxeus, N. A., Ginn, T. R. et Loge, F. J. (2005) Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. Journal of Hazardous Materials 122 (3), 195-204.

Benijts, T., Lambert, W. et De Leenheer, A. (2004) Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and dual-polarity ionization LC-ion trap-MS/MS. Analytical Chemistry 76 (3), 704-711.

Besse, J. P. et Garric, J. (2007a). Médicaments à usage humain : risques d'exposition et effets sur les milieux récepteurs, Rapport Phase 1, Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surfaces continentales. Lyon, Cemagref.

Besse, J. P. et Garric, J. (2007b). Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surfaces continentales.

Besse, J. P., Kausch-Barreto, C. et Garric, J. (2008) Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment: Application to the French situation

and preliminary prioritization. Human and Ecological Risk Assessment 14 (4), 665-695.

Bones, J., Thomas, K., Nesterenko, P. N. et Paull, B. (2006) On-line preconcentration of pharmaceutical residues from large volume water samples using short reversed-phase monolithic cartridges coupled to LC-UV-ESI-MS. Talanta 70 (5), 1117-1128.

Boyd, G. R., Reemtsma, H., Grimm, D. A. et Mitra, S. (2003) Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. Science of the Total Environment 311 (1-3), 135-149.

Braga, O., Smythe, G. A., Schafer, A. I. et Feitz, A. J. (2005) Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants. Environmental Science & Technology 39 (9), 3351-3358.

Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R. et Fanelli, R. (2003) Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. Environmental Science & Technology 37 (7), 1241-1248.

Caldwell, D. J., Mastrocco, F., Hutchinson, T. H., Lange, R., Heijerick, D., Janssen, C., Anderson, P. D. et Sumpter, J. P. (2008) Derivation of an aquatic predicted no-effect concentration for the synthetic hormone, 17 alpha-ethinyl estradiol. Environmental Science & Technology 42 (19), 7046-7054.

Carballa, M., Omil, F. et Lema, J. M. (2005) Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. Water Research 39 (19), 4790-4796.

Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Rodriguez, I., Gomez, M. et Ternes, T. (2004) Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. Water Research 38 (12), 2918-2926.

Carpinteiro, J., Quintana, J. B., Rodriguez, I., Carro, A. M., Lorenzo, R. A. et Cela, R. (2004) Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1056 (1-2), 179-185.

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

Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D. et Zuccato, E. (2006) Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. Environmental Science & Technology 40 (1), 357-363.

Chen, H. C., Kuo, H. W. et Ding, W. H. (2009) Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction. Chemosphere 74 (4), 508-514.

Choubert, J. M., Martin Ruel, S. et Coquery, M. (2009) Prélèvement et échantillonnage des substances prioritaires et émergentes dans les eaux usées, les prescriptions techniques du projet de recherche AMPERES. Techniques - Sciences - Méthodes 104 (4), 88-101.

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

Coquery, M., Choubert, J. M., Gabet, V., Gourlay-Francé, C., Jacquet, R., Miege, C., Martin Ruel, S., Bruchet, A., Esperanza, M., Budzinski, H., Le Menach, K., Soulier, C., Augagneur, S., Devier, M. H. et Lorgeoux, C. (2009). Projet AMPERES, Analyse de Micropolluants Prioritaires et Emergents dans les Rejets et les Eaux Superficielles, Rapport Final.

Czajka, C. P. et Londry, K. L. (2006) Anaerobic biotransformation of estrogens. Science of the Total Environment 367 (2-3), 932-941.

D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M. et Samperi, R. (2003) Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. Science of the Total Environment 302 (1-3), 199-209.

de Alda, M. J. L. et Barcelo, D. (2001) Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 371 (4), 437-447.

Detroyer, A., Heyden, Y. V., Carda-Broch, S., Garcia-Alvarez-Coque, M. C. et Massart, D. L. (2001) Quantitative structure-retention and retention-activity relationships of beta-blocking agents by micellar liquid chromatography. Journal of Chromatography A 912 (2), 211-221.

EC (2002). Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **2002/657/EC:** 29p.

Esperanza, M., Suidan, M. T., Marfil-Vega, R., Gonzalez, C., Sorial, G. A., McCauley, P. et Brenner, R. (2007) Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: Conventional treatment. Chemosphere 66 (8), 1535-1544.

EU (2000). Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau, Journal officiel **2000/60/CE:** 1-73.

Farre, M., Brix, R., Kuster, M., Rubio, F., Goda, Y., de Alda, M. J. L. et Barcelo, D. (2006) Evaluation of commercial immunoassays for the detection of estrogens in water by comparison with high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry HPLC-MS/MS (QqQ). Analytical and Bioanalytical Chemistry 385 (6), 1001-1011.

Fent, K., Weston, A. A. et Caminada, D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals (vol 76, pg 122, 2006). Aquatic Toxicology 78 (2), 207-207.

Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. et Garric, J. (2004) Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? Environmental Toxicology and Chemistry 23 (5), 1344-1354.

Filali-Meknassi, Y., Auriol, M., Adams, C. D. et Surampalli, R. Y. (2007) Quantification of steroid sex hormones using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. Water Environment Research 79 (6), 687-696.

Fraysse, B. et Garric, J. (2005) Prediction and experimental validation of acute toxicity of beta-blockers in Ceriodaphnia dubia. Environmental Toxicology and Chemistry 24 (10), 2470-2476.

Gabet, V., Miege, C., Bados, P. et Coquery, M. (2007) Analysis of estrogens in environmental matrices. Trac-Trends in Analytical Chemistry 26 (11), 1113-1131.

Gibson, R., Becerril-Bravo, E., Silva-Castro, V. et Jimenez, B. (2007) Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine, disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1169 (1-2), 31-39.

Gomes, R. L., Avcioglu, E., Scrimshaw, M. D. et Lester, J. N. (2004) Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in method development. Trac-Trends in Analytical Chemistry 23 (10-11), 737-744.

Gomes, R. L., Birkett, J. W., Scrimshaw, M. D. et Lester, J. N. (2005) Simultaneous determination of natural and synthetic steroid estrogens and their conjugates in aqueous matrices by liquid chromatography/mass spectrometry. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 85 (1), 1-14.

Gomez, M. J., Petrovic, M., Fernandez-Alba, A. R. et Barcelo, D. (2006) Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid

chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. Journal of Chromatography A 1114 (2), 224-233.

Gros, M., Petrovic, M. et Barcelo, D. (2006) Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. Talanta 70 (4), 678-690.

Gutjahr-Gobell, R. E., Zaroogian, G. E., Horowitz, D. J. B., Gleason, T. R. et Mills, L. J. (2006) Individual effects of estrogens on a marine fish, Cunner (Tautogolabrus adspersus), extrapolated to the population level. Ecotoxicology and Environmental Safety 63 (2), 244-252.

Haider, S. et Baqri, S. S. R. (2000) beta-Adrenoceptor antagonists reinitiate meiotic maturation in Clarias batrachus oocytes. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology 126 (4), 517-525.

Hajkova, K., Pulkrabova, J., Schurek, J., Hajslova, J., Poustka, J., Napravnikova, M. et Kocourek, V. (2007) Novel approaches to the analysis of steroid estrogens in river sediments. Analytical and Bioanalytical Chemistry 387 (4), 1351-1363.

Hansen, P. D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M. et Blaise, C. (1998) Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. Trac-Trends in Analytical Chemistry 17 (7), 448-451.

Heberer, T. (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. Toxicology Letters 131 (1-2), 5-17.

Hernando, M. D., Gomez, M. J., Aguera, A. et Fernandez-Alba, A. R. (2007) LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in wastewater and surface water. Trac-Trends in Analytical Chemistry 26 (6), 581-594.

Hernando, M. D., Mezcua, M., Gomez, M. J., Malato, O., Aguera, A. et Fernandez-Alba, A. R. (2004a) Comparative study of analytical methods involving gas chromatography-mass spectrometry after derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. Journal of Chromatography A 1047 (1), 129-135.

Hernando, M. D., Petrovic, M., Fernandez-Alba, A. R. et Barcelo, D. (2004b) Analysis by liquid chromatography-electro spray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for beta-blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. Journal of Chromatography A 1046 (1-2), 133-140.

Herry-Leroy, G., Raulet, C. et Beausse, J. (2006) Etude de nouveaux polluants émergents dans le milieu environnemental : les perturbateurs endocriniens - Analyse des hormones stéroidiennes dnas les stations d'épuration par LC-MS/MS. European Journal of Water Quality 37 (1), 39-52.

Hilton, M. J. et Thomas, K. V. (2003) Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1015 (1-2), 129-141.

Huggett, D. B., Brooks, B. W., Peterson, B., Foran, C. M. et Schlenk, D. (2002) Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 43 (2), 229-235.

Isobe, T., Serizawa, S., Horiguchi, T., Shibata, Y., Managaki, S., Takada, H., Morita, M. et Shiraishi, H. (2006) Horizontal distribution of steroid estrogens in surface sediments in Tokyo Bay. Environmental Pollution 144 (2), 632-638.

Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A., Suzuki, H. et Morita, M. (2003) Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction

followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 984 (2), 195-202.

Janex-Habibi, M. L., Huyard, A., Esperanza, M. et Bruchet, A. (2009) Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: The benefit of wastewater treatment. Water Research 43 (6), 1565-1576.

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A. P. et Tyler, C. R. (2003) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aquatic Toxicology 65 (2), 205-220.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. et Sumpter, J. P. (1998) Widespread sexual disruption in wild fish. Environmental Science & Technology 32 (17), 2498-2506.

Johnson, A. C., Williams, R. J., Simpson, P. et Kanda, R. (2007) What difference might sewage treatment performance make to endocrine disruption in rivers? Environmental Pollution 147 (1), 194-202.

Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P. R. et Siegrist, H. (2004) Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization. Environmental Science & Technology 38 (11), 3047-3055.

Jurgens, M. D., Holthaus, K. I. E., Johnson, A. C., Smith, J. J. L., Hetheridge, M. et Williams, R. J. (2002) The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. Environmental Toxicology and Chemistry 21 (3), 480-488.

Kasprzyk-Hordem, B., Dinsdale, R. M. et Guwy, A. J. (2007) Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1161 (1-2), 132-145.

Koha, Y. K. K., Chiu, T. Y., Boobis, A., Cartmell, E., Lester, J. N. et Scrimshaw, M. D. (2007) Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1173 (1-2), 81-87.

Komori, K., Tanaka, H., Okayasu, Y., Yasojima, M. et Sato, C. (2004) Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan. Water Science and Technology 50 (5), 93-100.

Kuch, H. M. et Ballschmiter, K. (2001) Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. Environmental Science & Technology 35 (15), 3201-3206.

Kuster, M., de Alda, M. J., Hernando, M. D., Petrovic, M., Martin-Alonso, J. et Barcelo, D. (2008) Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). Journal of Hydrology 358 (1-2), 112-123.

Labadie, P. et Budzinski, H. (2005a) Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). Environmental Science & Technology 39 (14), 5113-5120.

Labadie, P. et Budzinski, H. (2005b) Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry 381 (6), 1199-1205.

Lagana, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G. et Marino, A. (2004) Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. Analytica Chimica Acta 501 (1), 79-88.

Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. H., Olsson, P. E. et Forlin, L. (1999) Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? Aquatic Toxicology 45 (2-3), 91-97.

Lee, H. B., Sarafin, K. et Peart, T. E. (2007) Determination of beta-blockers and beta(2)-agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1148 (2), 158-167.

Lévesque, E., Hum, D.W. et Bélanger A. (2001) Rôle des UDP-glucuronosyltransférases (UGT) dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes. Médecine/Sciences 17, 33-43.

Liu, Q. T. et Williams, H. E. (2007) Kinetics and degradation products for direct photolysis of beta-blockers in water. Environmental Science & Technology 41 (3), 803-810.

Matejicek, D., Houserova, P. et Kuban, V. (2007) Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatographic-ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments. Journal of Chromatography A 1171 (1-2), 80-89.

Maurer, M., Escher, B. I., Richle, P., Schaffner, C. et Alder, A. C. (2007) Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants. Water Research 41 (7), 1614-1622.

MEDAD (2007). Arrêté du 22 juin 2007 relative à la collecte, au transport et au traitement des eaux usées des agglomérations d'assainissement ainsi qu'à la surveillance de leur fonctionnement et de leur efficacité, et aux dispositifs d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique supérieure à 1.2 kg/j de DBO5. . **DEVO0754085A**.

Miege, C., Bados, P., Brosse, C. et Coquery, M. (2009a) Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices. Trac-Trends in Analytical Chemistry 28 (2), 237-244.

Miege, C., Choubert, J. M., Ribeiro, L., Eusebe, M. et Coquery, M. (2009b) Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. Environmental Pollution 157 (5), 1721-1726.

Miege, C., Favier, M., Brosse, C., Canler, J. P. et Coquery, M. (2006) Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers. Talanta 70 (4), 739-744.

Miege, C., Karolak, S., Gabet, V., Jugan, M. L., Oziol, L., Chevreuil, M., Levi, Y. et Coquery, M. (2009c) Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. Trac-Trends in Analytical Chemistry 28 (2), 186-195.

Miege, C., Schiavone, S. et Coquery, M. (2009d) Method validation for the analysis of beta blockers in aqueous matrices, *In prep*.

Morteani, G., Moller, P., Fuganti, A. et Paces, T. (2006) Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and sewage plants in the hydrological basin of Prague (Czech Republic). Environmental Geochemistry and Health 28 (3), 257-264.

Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S. L., Perdiz, D., Cargouet, M. et Levi, Y. (2003) Validation of a quantitative assay using GC/MS for trace determination of free and conjugated estrogens in environmental water samples. Journal of Separation Science 26 (1-2), 105-111.

Muller, M., Rabenoelina, F., Balaguer, P., Patureau, D., Lemenach, K., Budzinski, H., Barcelo, D., De Alda, M. L., Kuster, M., Delgenes, J. P. et Hernandez-Raquet, G. (2008) Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. Environmental Toxicology and Chemistry 27 (8), 1649-1658.

Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato, N. et Takada, H. (2007) Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. Water Research 41 (19), 4373-4382.

Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K. et Takada, H. (2006) Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. Water Research 40 (17), 3297-3303.

Nikolai, L. N., McClure, E. L., MacLeod, S. L. et Wong, C. S. (2006) Stereoisomer quantification of the beta-blocker drugs atenolol, metoprolol, and propranolol in wastewaters by chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1131 (1-2), 103-109.

Noppe, H., De Wasch, K., Poelmans, S., Van Hoof, N., Verslycke, T., Janssen, C. R. et De Brabander, H. (2005) Development and validation of an analytical method for detection of estrogens in water. Analytical and Bioanalytical Chemistry 382 (1), 91-98.

Noppe, H., Verslycke, T., De Wulf, E., Verheyden, K., Monteyne, E., Van Caeter, P., Janssen, C. R. et De brabander, H. F. (2007) Occurrence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2-year survey. Ecotoxicology and Environmental Safety 66 (1), 1-8.

Paffoni, C., Welte, B., Gousailles, M. et Montiel, A. (2006) Nouvelles molecules mises en cause par les directives européennes : de la station d'épuration à l'usine de traitement d'eau potable. European Journal of Water Quality 37 (1), 21-38.

Peng, X. Z., Yu, Y. J., Tang, C. M., Tan, J. H., Huang, Q. X. et Wang, Z. D. (2008) Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. Science of the Total Environment 397 (1-3), 158-166.

Petrovic, M., Eljarrat, E., de Alda, M. J. L. et Barcelo, D. (2001) Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. Trac-Trends in Analytical Chemistry 20 (11), 637-648.

Petrovic, M., Gros, M. et Barcelo, D. (2006) Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1124 (1-2), 68-81.

Pholchan, P., Jones, M., Donnelly, T. et Sallis, P. J. (2008) Fate of estrogens during the biological treatment of synthetic wastewater in a nitrite-accumulating sequencing batch reactor. Environmental Science & Technology 42 (16), 6141-6147.

Piram, A., Salvador, A., Gauvrit, J. Y., Lanteri, P. et Faure, R. (2008a) Development and optimisation of a single extraction procedure for the LC/MS/MS analysis of two pharmaceutical classes residues in sewage treatment plant. Talanta 74 (5), 1463-1475.

Piram, A., Salvador, A., Verne, C., Herbreteau, B. et Faure, R. (2008b) Photolysis of beta-blockers in environmental waters. Chemosphere 73 (8), 1265-1271.

Pitarch, E., Hernandez, F., ten Hove, J., Meiring, H., Niesing, W., Dijkman, E., Stolker, L. et Hogendoorn, E. (2004) Potential of capillary-column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitative trace analysis of small molecules - Application to the on-line screening of drugs in water. Journal of Chromatography A 1031 (1-2), 1-9.

Pomies, M. (2008). Rapport de stage de fin d'étude : Processus et performances des procédés d'épuration conventionnels vis-à-vis des polluants métalliques. Département Génie des Procédés et Environnement. Toulouse, Insa.

Radjenovic, J., Jelic, A., Petrovic, M. et Barcelo, D. (2009a) Determination of pharmaceuticals in sewage sludge by pressurized liquid extraction (PLE) coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Analytical and Bioanalytical Chemistry 393 (6-7), 1685-1695.

Radjenovic, J., Pereza, S., Petrovic, M. et Barcelo, D. (2008) Identification and structural characterization of biodegradation products of atenolol and glibenclamide by liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion trap mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1210 (2), 142-153.

Radjenovic, J., Petrovic, M. et Barcelo, D. (2009b) Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. Water Research 43 (3), 831-841.

Refsdal, A. O. (2000) To treat or not to treat: a proper use of hormones and antibiotics. Animal Reproduction Science 60 109-119.

Ren, H. Y., Ji, S. L., Ahmad, N. U. D., Dao, W. et Cui, C. W. (2007) Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 alpha-ethynylestradiol by Sphingobacterium sp JCR5. Chemosphere 66 (2), 340-346.

Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M. J. L. et Barcelo, D. (2004) Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1045 (1-2), 85-92.

Sacher, F., Lang, F. T., Brauch, H. J. et Blankenhorn, I. (2001) Pharmaceuticals in groundwaters - Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany. Journal of Chromatography A 938 (1-2), 199-210.

Sadezky, A., Löffler, D. et Ternes, T. (2007). KNAPPE D1.2 Proposal of an environmental indicator and classification system of phamaceuticals product residues for environmental management.

Salvador, A., Moretton, C., Piram, A. et Faure, R. (2007) On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants. Journal of Chromatography A 1145 (1-2), 102-109.

Sarmah, A. K., Northcott, G. L., Leusch, F. D. L. et Tremblay, L. A. (2006) A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand. Science of the Total Environment 355 (1-3), 135-144.

Schnell, S., Bols, N. C., Barata, C. et Porte, C. (2009) Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1. Aquatic Toxicology 93 (4), 244-252.

Serrano, D., Lema, J. M. et Omil, F. (2009) Influence of the employment of co-precipitation and adsorption agents for the removal of PPCPs in Conventional Activated Sludge (CAS) systems. Xenowac, Paphos, Cyprus.

Shi, J. H., Suzuki, Y., Nakai, S. et Hosomi, M. (2004) Mimbial degradation of estrogens using activated sludge and night soil-composting microorganisms. Water Science and Technology 50 (8), 153-159.

Snyder, S. A., Keith, T. L., Verbrugge, D. A., Snyder, E. M., Gross, T. S., Kannan, K. et Giesy, J. P. (1999) Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. Environmental Science & Technology 33 (16), 2814-2820.

Stolker, A. A. M., Niesing, W., Fuchs, R., Vreeken, R. J., Niessen, W. M. A. et Brinkman, U. A. T. (2004a) Liquid chromatography with triple-quadrupole and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for the determination of micro-constituents - a comparison. Analytical and Bioanalytical Chemistry 378 (7), 1754-1761.

Stolker, A. A. M., Niesing, W., Hogendoorn, E. A., Versteegh, J. F. M., Fuchs, R. et Brinkman, U. A. T. (2004b) Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water. Analytical and Bioanalytical Chemistry 378 (4), 955-963.

Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L.P., Lutzhoft, H.C.H., Halling-Sorensen, B. (2000) Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. Chemosphere 40 (7), 783-793.

Tanaka, H., Yakou, Y., Takahashi, A., Higashitani, T. et Komori, K. (2001) Comparison between estrogenicities estimated from DNA recombinant yeast assay and from chemical analyses of endocrine disruptors during sewage treatment. Water Science and Technology 43 (2), 125-132.

Ternes, T. A. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Research 32 (11), 3245-3260.

Ternes, T. A., Andersen, H., Gilberg, D. et Bonerz, M. (2002) Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. Analytical Chemistry 74 (14), 3498-3504.

Ternes, T. A., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H. et Joss, A. (2004) A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K-d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. Water Research 38 (19), 4075-4084.

Ternes, T. A. et Joss, A. (2006) Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances: The challenge of micropollutants in urban water management. IWA Publishing.

Ternes, T. A., Kreckel, P. et Mueller, J. (1999) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. Science of the Total Environment 225 (1-2), 91-99.

Thomas, K. V., Dye, C., Schlabach, M. et Langford, K. H. (2007) Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. Journal of Environmental Monitoring 9 (12), 1410-1418.

Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Rexing, D. J. et Snyder, S. A. (2006) Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. Chemosphere 65 (11), 1990-1998.

UE (2008). Directive 2008/105/CE du Parlement Européen et du Conseil du 18 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE, Journal officiel de l'Union européenne. **2008/105/CE**.

Vader, J. S., van Ginkel, C. G., Sperling, F., de Jong, J., de Boer, W., de Graaf, J. S., van der Most, M. et Stokman, P. G. W. (2000) Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. Chemosphere 41 (8), 1239-1243.

Vanderford, B. J., Pearson, R. A., Rexing, D. J. et Snyder, S. A. (2003) Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Analytical Chemistry 75 (22), 6265-6274.

Vethaak, A. D., Lahr, J., Schrap, S. M., Belfroid, A. C., Rijs, G. B. J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A. S., Grinwis, G. C. M., Kuiper, R. V., Legler, J., Murk, T. A. J., Peijnenburg, W., Verhaar, H. J. M. et de Voogt, P. (2005) An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. Chemosphere 59 (4), 511-524.

Vieno, N., Tuhkanen, T. et Kronberg, L. (2007) Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. Water Research 41 (5), 1001-1012.

Vieno, N. M., Tuhkanen, T. et Kronberg, L. (2005) Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. Environmental Science & Technology 39 (21), 8220-8226.

Vieno, N. M., Tuhkanen, T. et Kronberg, L. (2006) Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase

extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. Journal of Chromatography A 1134 (1-2), 101-111.

Vigano, L., Mandich, A., Benfenati, E., Bertolotti, R., Bottero, S., Porazzi, E. et Agradi, E. (2006) Investigating the estrogenic risk along the River Po and its intermediate section. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51 (4), 641-651.

Viglino, L., Aboulfadl, K., Prevost, M. et Sauve, S. (2008) Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. Talanta 76 (5), 1088-1096.

Vulliet, E., Baugros, J. B., Flament-Waton, M. M. et Grenier-Loustalot, M. F. (2007) Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteriods in wastewater. Analytical and Bioanalytical Chemistry 387 (6), 2143-2151.

Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R. et Grenier-Loustalot, M. F. (2008) Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1210 (1), 84-91.

Wiegel, S., Aulinger, A., Brockmeyer, R., Harms, H., Loffler, J., Reincke, H., Schmidt, R., Stachel, B., von Tumpling, W. et Wanke, A. (2004) Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. Chemosphere 57 (2), 107-126.

Williams, R. J., Jurgens, M. D. et Johnson, A. C. (1999) Initial predictions of the concentrations and distribution of 17 beta-oestradiol, oestrone and ethinyl oestradiol in 3 English rivers. Water Research 33 (7), 1663-1671.

Yoshimoto, T., Nagai, F., Fujimoto, J., Watanabe, K., Mizukoshi, H., Makino, T., Kimura, K., Saino, H., Sawada, H. et Omura, H. (2004) Degradation of estrogens by Rhodococcus zopfii and Rhodococcus equi isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. Applied and Environmental Microbiology 70 (9), 5283-5289.

Zorita, S., Martensson, L. et Mathiasson, L. (2009) Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. Science of the Total Environment 407 (8), 2760-2770.

Annexe 1 :

Points de prélèvements des STEP étudiées

Code Station	Points de prélèvement filière eau	Points de prélèvement filière boue
CA1	Influent Effluent Retour en tête lit de séchage	Boue d'entrée (biologique) Boue de sortie (lit de séchage)
SE1	Influent Effluent Retour en tête centrifugeuse	Boue d'entrée (biologique) Boue de sortie (centrifugeuse)
CA2	Influent Effluent Retour en tête	Boue d'entrée (biologique) Boue de sortie (lit de séchage)
SE2	Influent Eau sortie traitement primaire Effluent Retour en tête global Retour en tête centrifugeuse Retour en tête curage	Boue primaire Boue biologique Boue digérée Boue chaulée Matière de vidange
CA3	Influent Eau sortie traitement biologique Effluent Retour en tête	Boue primaire Boue biologique Boue de lavage Boue entrée centrifugeuse Boue sortie
SE3	Influent Eau sortie traitement biologique Effluent Retour en tête global Retour en tête sécheur Eau de lavage sécheur	Boue biologique Boue tertiaire Boue déshydratée Boue sortie
SE4	Influent Effluent Retour en tête centrifugeuse Matière de vidange	Boue d'entrée (primaires + biologiques + graisses) Boue chaulée Graisses traitées
SE5	Influent Effluent Retour en tête centrifugeuse	Boue biologique Boue sortie (chaulée)
SE6	Influent Eau sortie traitement primaire Effluent Retour en tête épaississeur Eau de lavage biofiltre	Boue primaire Boue déshydratée
CA4	Influent Eau sortie disques biologiques Eau de sortie traitement biologique Effluent	Boue haut filtre vertical Boue bas filtre vertical Boue lagune
CA5	Influent Eau sortie traitement primaire Effluent Retour en tête centrifugeuse Eau de lavage biofiltre	Boue sortie épaississeur Boue sortie (centrifugeuse)

Code Station	Points de prélèvement filière eau	Points de prélèvement filière boue
CA6	Influent Eau sortie filtre vertical Effluent Eau sortie filtre horizontal apatite	Boue haut filtre vertical Bous bas filtre vertical
SE9	Influent Eau sortie lits bactériens Effluent	Boue haut filtre vertical Bous bas filtre vertical
CA7	Influent Eau sortie lagune Effluent Retour en tête lit de séchage	Boue lit de séchage (filtre le plus minéralisé) Boue lit de séchage (filtre en alimentation)
CA8	Influent Effluent Retour en tête centrifugeuse	Boue biologique Boue sortie (centrifugeuse)
SE7	Retour en tête stockeur	Boue déshydratée Co-produit Compost entrée silo Compost
SE8	Retour en tête centrifugeuse Retour en tête sécheur	Boue primaire Boue biologique Boue digérée Boue entrée sécheur Boue séchée
CA-PA1	Eau sortie traitement biologique Eau sortie filtre à sable Effluent (eau sortie ozoneur) Eau lavage filtre à sable	-
CA-PA2	Eau sortie traitement biologique Eau sortie décanteur tertiaire Effluent (eau sortie colonne charbon actif)	Boue décanteur rapide
SE-PA1	Eau sortie traitement biologique Eau sortie clarifloculateur Eau sortie filtre à sable Effluent (eau sortie UV)	Boue clarifloculateur Eau de lavage du filtre à sable
SE-PA2	Eau sortie traitement biologique Eau sortie filtre à sable Effluent (eau sortie osmose inverse) Refus osmose inverse	-

Annexe 2 :

Caractéristiques des boues étudiées

Type de boue	STEP	Echantillon n°	Nature de boue / Traitement
Boue primaire	CA3	231	Boue issue du décanteur primaire
	CA6	278	Boue issue du haut du filtre vertical primaire
	CA6	279	Boue issue du bas du filtre vertical primaire
	SE2	10	Boue issue du décanteur primaire
Boue biologique	CA1	206	Boue issue du bassin d'aération (boue activée)
	CA2	215	Boue issue du bassin d'aération (boue activée)
	CA3	234	Boue issue du bassin d'aération (boue activée)
	CA4	245	Boue issue du filtre vertical
	SE1	8	Boue issue du bassin d'aération (boue activée)
	SE2	11	Boue issue du bassin d'aération (boue activée)
	SE3	24	Boue issue du bassin d'aération (boue activée)
	SE5	46	Boue issue du bioréacteur à membranes
Boue tertiaire	CA4	247	Boue issue d'une lagune tertiaire
	SE3	27	Boue issue du décanteur tertiaire
Boue mixte	CA3	233	Mélange de boues primaires (décanteur primaire), biologiques (boue activée) et tertiaires (biofiltre tertiaire)
	SE4	37	Mélange de graisses (issues du prétraitement) et de boues biologiques
Boue déshydratée	CA3	232	Boue mixte centrifugée
	SE1	9	Boue biologique centrifugée
	SE3	25	Boue biologique centrifugée
	SE3	34	Boue biologique centrifugée
	SE6	55	Boue primaire centrifugée
Boue traitée	CA1	207	Boue issue du lit de séchage
	CA2	216	Boue issue du lit de séchage
	CA7	308	Boue issue du lit de séchage
	SE2	12	Boue digérée
	SE2	13	Boue digérée chaulée
	SE3	35	Boue séchée (séchage thermique)
	SE5	47	Boue chaulée
	SE4	38	Boue chaulée
	SE7	67	Compost
	SE8	72	Boue digérée séchée (séchage thermique)

Annexe 3 :

Tableaux récapitulatifs des résultats

Récapitulatif des concentrations d'estrogènes (formes libres et déconjuguées) et de bêtabloquants mesurées dans la phase dissoute des influents et effluents de stations d'épuration

		E1		αE2		βE2		E3		EE2		ATE	SOT	NAD	TIM	ACE	MET	OXP	PROP	BET	BIS
		li.	tot.	li.	tot.	li.	tot.	li.	tot.	li.	tot.										
Influents	n	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	29	30	30	30	30	30	30
	Fréquence de quantification (%)	100	100	67	67	97	100	100	100	0	0	100	100	73	41	100	97	33	100	60	100
	Moyenne (ng/L)	71	79	4,6	5,2	20	24	297	313	/	/	2407	1012	167	5,3	2693	223	10	266	32	213
	Médiane (ng/L)	65	74	4,1	4,8	20	23	311	319	/	/	2111	819	85	5,2	2239	216	10	237	30	226
	CV (%)	55	50	50	54	48	54	58	57	/	/	61	79	127	78	74	59	59	59	76	42
	Min (ng/L)	19	22	0,9	0,8	5,1	3,5	27	29	/	/	990	129	3,4	0,5	910	4,6	0,9	14	1,8	44
	Max(ng/L)	170	181	9,0	10	38	50	658	676	/	/	8384	3200	983	13	9867	473	21	703	108	429
Effluents	n	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
	Fréquence de quantification (%)	94	97	16	13	26	29	16	16	10	10	100	100	58	58	100	94	58	100	32	97
	Moyenne (ng/L)	6,8	8,2	3,8	4,7	3,9	4,2	25	33	2,6	2,7	725	1032	23	5,5	475	156	10	203	13	90
	Médiane (ng/L)	4,2	5,6	3,1	3,3	3,7	3,3	18	31	1,7	2,1	625	786	9,7	5,8	187	94	9,3	188	9,5	83
	CV (%)	166	158	97	82	92	74	74	58	63	56	76	74	124	40	173	89	87	60	66	74
	Min (ng/L)	0,1	0,2	0,6	1,9	0,5	1,1	5,2	11	1,6	1,6	36	128	3,3	1,1	32	16	1,1	2,6	5,8	8,4
	Max(ng/L)	58	65	9,5	10	12	11	48	58	4,6	4,4	2257	3334	98	10	3648	435	28	398	28	220

Récapitulatif des teneurs en estrogènes et bêtabloquants mesurées dans les boues de stations d'épuration

		E1	αE2	βE2	E3	EE2	ATE	SOT	NAD	TIM	ACE	MET	OXP	PROP	BET	BIS
Boues primaires	**n**	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Fréquence de quantification (%)	100	25	100	50	0	50	100	50	50	100	50	25	100	50	75
	Moyenne (ng/g)	22	21	17	27	/	46	5,4	2,7	10	213	6,6	0,9	169	1,5	5,8
	Médiane (ng/g)	22	21	17	27	/	46	5,7	2,7	10	192	6,6	0,9	131	1,5	3,2
	CV (%)	64	/	63	3	/	28	73	85	22	78	14	/	91	48	123
	Min (ng/g)	6,9	21	4,5	26	/	37	0,4	1,1	8,5	35	5,9	0,9	32	1,0	0,3
	Max(ng/g)	38	21	31	27	/	56	9,7	4,4	12	435	7,2	0,9	383	2,1	14
Boues biologiques	**n**	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Fréquence de quantification (%)	88	25	25	38	0	63	100	50	50	100	100	25	100	13	88
	Moyenne (ng/g)	13	18	34	7,1	/	16	14	0,7	6,1	50	2,4	0,7	110	4,0	2,5
	Médiane (ng/g)	14	18	34	4,7	/	9,6	9,8	0,7	3,4	36	1,5	0,7	111	4,0	1,0
	CV (%)	66	22	25	78	/	103	94	58	128	94	95	22	54	/	124
	Min (ng/g)	3,6	16	28	3,1	/	1,9	6,1	0,3	0,3	4,1	0,8	0,6	45	4,0	0,3
	Max(ng/g)	24	21	40	13	/	39	46	1,2	17	150	7,6	0,8	209	4,0	9,0
Boues tertiaires	**n**	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Fréquence de quantification (%)	50	0	50	0	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	50
	Moyenne (ng/g)	3,5	/	7,1	/	/	/	5,9	/	/	14,9	/	/	28,7	/	1,3
	Médiane (ng/g)	3,5	/	7,1	/	/	/	5,9	/	/	14,9	/	/	28,7	/	1,3
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	22	/	/	19	/	/	19	/	/
	Min (ng/g)	3,5	/	7,1	/	/	/	5,0	/	/	13,0	/	/	24,8	/	1,3
	Max(ng/g)	3,5	/	7,1	/	/	/	6,8	/	/	16,9	/	/	32,7	/	1,3
Boues mixtes	**n**	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Fréquence de quantification (%)	100	50	50	50	0	100	100	50	0	100	50	50	100	50	100
	Moyenne (ng/g)	20	21	23	18	/	30	14	1,4	/	104	10	0,6	100	0,6	6,7
	Médiane (ng/g)	20	21	23	18	/	30	14	1,4	/	104	10	0,6	100	0,6	6,7
	CV (%)	99	/	/	/	/	113	89	/	/	113	/	/	48	/	130
	Min (ng/g)	6,1	21	23	18	/	6,1	5,1	1,4	/	21	10	0,6	66	0,6	0,5
	Max(ng/g)	34	21	23	18	/	54	23	1,4	/	186	10	0,6	134	0,6	13
Boues déshydratées	**n**	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Fréquence de quantification (%)	80	40	40	40	0	40	100	60	60	100	80	20	100	40	100
	Moyenne (ng/g)	26	24	24	9,7	/	65	65	7,9	4,0	55	5,5	4,1	105	0,7	12
	Médiane (ng/g)	20	24	24	9,7	/	65	15	1,4	3,2	41	3,8	4,1	68	0,7	2,0
	CV (%)	94	62	63	120	/	92	144	151	76	76	82	/	98	136	124
	Min (ng/g)	5,4	13	13	1,5	/	23	4,5	0,6	1,4	22	2,3	4,1	23	0,1	1,2
	Max(ng/g)	59	34	35	18	/	106	225	22	7,4	126	12	4,1	282	1,5	33
Boues traitées	**n**	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Fréquence de quantification (%)	100	0	50	40	0	20	90	50	50	100	60	10	100	30	70
	Moyenne (ng/g)	40	/	12	7,4	/	7,2	8,0	1,2	5,0	30	3,8	0,1	149	0,7	1,7
	Médiane (ng/g)	32	/	14	6,4	/	7,2	8,8	0,8	3,3	22	2,7	0,1	72	0,6	0,7
	CV (%)	90	/	56	34	/	22	71	96	107	83	62	/	151	55	122
	Min (ng/g)	7,3	/	4,8	5,6	/	6,1	0,4	0,3	0,3	4,7	1,9	0,1	6,9	0,3	0,5
	Max(ng/g)	130	/	20	11	/	8,4	19	3,3	14	85	7,3	0,1	766	1,1	6,4

Annexe 4 :

Publications et communications

Communications orales

Occurrence des hormones estrogéniques et des bêtabloquants dans les eaux usées et traitées de 6 stations d'épuration domestiques. V. Gabet, C. Miège, J.M. Choubert, S. Martin, M. Coquery, Congrès du GRUTTEE, Pau, France, *Octobre 2007*.

Evaluation du potentiel perturbateur endocrinien dans le bassin versant de l'Orge : analyses chimique et biologique. V. Gabet, C. Miège, P. Bados, M. Coquery, M.L. Jugan, M. Bimbot, V. Huteau, S. Karolak, Y. Levi, Colloque annuel du programme PIREN-Seine, Paris, France, *Février 2008*.

Devenir des estrogènes et des bêtabloquants dans les filières eau de 10 stations d'épuration biologiques des eaux résiduaires urbaines françaises. V. Gabet, C. Miège, J.M. Choubert, S. Martin, M. Coquery, Congrès Effluents liquides des établissements de santé, Chambéry, France, *Novembre 2008*.

Development and validation of an analytical method by LC-MS/MS for the quantification of estrogens in sewage sludge and suspended particulate matter. V. Gabet, C. Miège, M. Coquery, International conference 'Xenobiotics in the urban water cycle – XENOWAC', Paphos, Chypre, *Mars 2009*.

Publications scientifiques (Revue internationale avec comité de lecture)

Analysis of estrogens in environmental matrices. V. Gabet, C. Miège, P. Bados, M. Coquery, Trends in Analytical Chemistry, 26 (2007), 1113-1131.

Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. C. Miège, S. Karolak, V. Gabet, M.L. Jugan, L. Oziol, M. Chevreuil, Y. Levi, M. Coquery, Trends in Analytical Chemistry, 28 (2009), 186-195.

Estrogens and beta blockers in wastewater treatment plants. V. Gabet-Giraud, C. Miège, J.M. Choubert, S. Martin Ruel, M. Coquery, Water Research (soumis, août 2009).

Development and validation of an analytical method by LC-MSMS for the quantification of estrogens in sewage sludge. V. Gabet-Giraud, C. Miège, B.

Herbreteau, G. Hernandez-Raquet, M. Coquery, Analytical and Bioanalytical Chemistry (soumis, octobre 2009).

Impact of wastewater treatment plants on receiving surface waters and tentative of risk assessment: the case of estrogens and beta blockers. V. Gabet-Giraud, C. Miège, R. Jacquet, M. Coquery, Environmental Pollution (en préparation).

Publications scientifiques (Revue sans comité de lecture)

Devenir d'oestrogènes et de bêtabloquants dans les filières eau de dix stations d'épuration biologiques des eaux résiduaires urbaines françaises. V. Gabet, C. Miège, J.M. Choubert, S. Martin Ruel, M. Coquery, Techniques Hospitalières, 717 (2009), 61-66.

Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis

C. Miège, S. Karolak, V. Gabet, M.-L. Jugan, L. Oziol, M. Chevreuil, Y. Levi, M. Coquery

We studied estrogenic disrupting potency in rivers and wastewaters in the Orge catchment area near Paris, using analytical and biological approaches simultaneously. The MELN test was applied to surface-water samples, urban storm run-off and wastewater-treatment plant (WWTP) effluent in parallel with analytical determinations of natural estrogens and synthetic estrogen (ethinylestradiol) using liquid chromatography and tandem mass spectrometry.

We quantified estrone in all samples in the range 0.1–15.7 ng/L. We also quantified β-estradiol in all samples, but at a lower level (0.1–2.3 ng/L), but we never detected α-estradiol. We quantified ethinylestradiol only in WWTP effluent (0.2 ng/L); we measured estriol in WWTP effluent (12.1 ng/L) and downstream effluent (4.9 ng/L).

The biological responses using the MELN test closely followed the chemical responses. Analytical quantification of estrogens appears to be a simple way to trace estrogenic disruption in surface waters of urban areas, as these hormones are mainly responsible for biological effects.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Biological analysis; Chemical analysis; Equivalent Estrogenic Quantity; Estrogenic disrupting potency; Estrogenic hormone; Liquid chromatography; Mass spectrometry; MELN test; Surface water; Urban wastewater

C. Miège*,
V. Gabet,
M. Coquery
Cemagref, UR QELY, 3 bis quai Chauveau, CP 220 - F-69336 Lyon, France

S. Karolak*,
M.-L. Jugan,
L. Oziol,
Y. Levi
Univ. Paris Sud 11, IFR 141, Faculté de Pharmacie, Laboratoire Santé Publique – Environnement, 5 rue J.B. Clément, 92290 Chatenay-Malabry, France

M. Chevreuil
Laboratoire Hydrologie et Environnement – EPHE, UMR 7619, 4, place Jussieu 75252 Paris cedex 05, France

*Corresponding authors.
E-mail: cecile.miege@cemagref.fr, sara.karolak@u-psud.fr

1. Introduction

Natural estrogens are a group of steroid hormones that include the main active hormone, 17ß-estradiol, estrone and estriol. Endocrine disruptors are defined as substances that interfere with the endocrine system and disrupt the physiological functions of hormones. The presence of estrogenic compounds in surface waters has been noted since the early 1980s [1]. Numerous endocrine-disrupting substances [e.g., industrial or domestic chemicals (e.g., plasticizers, flame retardants and pesticides) and natural or synthetic hormones excreted by human bodies] reach the aquatic environment daily via sewage systems. Indeed, industrial and domestic wastewaters are

0165-9936/$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.trac.2008.11.007

recognized as the main sources for these pollutants, which may act with different modes of disruption on animal and human endocrine systems. The consequences of the presence of these substances in the aquatic environment are still largely unknown, but some negative impacts have been reported (e.g., the feminization of fish in large rivers and toxicological effects on wildlife) [2,3]. Great scientific efforts are therefore in progress to improve evaluation of the presence and the effect of these compounds in the environment and to identify their sources and modes of transfer to the aquatic ecosystems.

Many papers have reported the presence of estrogenic hormones (i.e., estrone [E1], 17β and α-estradiol [17β and α-E2], 17α-ethinylestradiol [EE2] and estriol [E3]) in wastewaters and surface waters. In a recent paper, Miège et al. [4] compiled concentrations and removal efficiencies measured in the dissolved phase of influents and effluents of wastewater-treatment plants (WWTPs) with activated sludge processes. Detailed datasets were drawn from 117 research papers covering the period from January to June 2006 for international studies and to February 2007 for French studies. In Table 1, we reported mean, minimum and maximum concentrations in WWTP influent and effluent for the five estrogenic hormones as well as their removals (data from [4]). Concentrations range from 0.4 ng/L for EE2 to 670 ng/L for E1 in influents and from 0.1 ng/L for α-E2 to 275 ng/L for E3 in effluents. Removal efficiencies ranged from 68% for EE2 to 92% for E3. Thus, although removal rates are relatively high, WWTPs nonetheless represent an evident source of estrogenic hormones contaminating surface waters.

In France, some studies have reported the concentration of estrogenic hormones in river water. Cargouët et al. [5] found concentrations of free E1, β-E2, E3 and EE2 in the dissolved phase in the range 1.0–3.2 ng/L. Labadie et al. [6] analyzed free and conjugated fractions of the same hormones in the dissolved and suspended particular phase of the Jalles d'Eysine river and detected none of them.

In the dissolved phase of German rivers, Zuehlke et al. [7] analyzed the free fraction of E1, β-E2 and EE2 in the Berlin area and detected only E1 (0.16–0.86 ng/L, n = 5). Ternes [8] did not quantify any of the estrogenic hormones studied (E1, β-E2, EE2, n = 15). In the dissolved phase of German rivers and creeks, Kuch et al. [9] quantified E1 in 29 samples out of 31, at an average concentration of 0.7 ng/L; EE2 and β-E2 were quantified in about half of the samples, at an average concentration of 0.8 ng/L and 0.6 ng/L, respectively; α-E2 was quantified in 8 samples out of 31 at an average concentration of 0.6 ng/L.

Beck et al. [10] measured the concentration of estrogenic hormones in the dissolved phase of 10 Baltic Sea sites and pointed out that E1 was always quantified (0.10–0.53 ng/L), β-E2 and E3 were never detected, and EE2 was quantified in all the sampling sites except one (0.45–17.2 ng/L).

In the dissolved phase of Italian rivers, Lagana et al. [11] found the free fraction of E1, β-E2, E3 and EE2 at 8 ng/L, 4 ng/L, 1 ng/L and 3 ng/L, respectively (7 samples in the Tiber river), while Zuccato et al. [12], who analyzed only EE2, did not quantify it (one sample in the Lambro river and 7 samples in the Po river).

Other studies have been realized all over the world. Boyd et al. [13] did not quantify E1 or β-E2 in the dissolved phase of American rivers and lakes. Farré et al. [14] did not quantify E1, β-E2, E3 or EE2 in the dissolved phase of Spanish rivers (three sites). Morteani et al. [15] studied 19 sites of rivers and creek waters in the Czech Republic and found: E1 at 7.4 ng/L and E3 at 1.7 ng/L only at one site; β-E2 at 7 sites at a maximum concentration of 3.8 ng/L; and, EE2 at 6 sites at a maximum level of 4.6 ng/L.

In summary, most studies report concentrations of free estrogens in the dissolved phase and estrogens were not systematically detected in surface waters. Concentrations measured were generally in the range of 1 ng/L and rarely over 10 ng/L. Since these molecules are moderately hydrophobic, with log Kow values between 2.6 for estriol and 4.1 for 17α-ethinylestradiol, they have also been detected in sediments in a few studies. For example, Labadie et al. [16] analyzed 7 samples of river sediments from the River Ouse (UK) supposedly differently contaminated (located 0.2–5 km downstream of

Table 1. Mean, minimum, maximum concentrations and removals (with relative standard deviation) for estrogenic hormones in the dissolved phase of wastewater-treatment plants with activated sludge processes (from [4])

Hormones	Influent concentration (ng/L)				Effluent concentration (ng/L)				Removal (%)		
	min	max	mean	n	min	max	mean	n	R	RSD	n
E1	2.4	670	67	109	0.6	95	21	79	74	39	59
α-E2	1.5	17	7.4	36	0.1	3	0.8	9	79	22	6
β-E2	2.5	125	22	108	0.3	30	2.8	63	88	13	52
EE2	0.4	70	4.2	70	0.2	5	0.9	33	68	33	46
E3	15	660	115	36	0.4	275	13	33	92	20	36

n, Number of individual data.

WWTP effluents). Measured concentrations varied in the ranges 0.4–3.3 ng/g dry weight for E1 and <0.03–1.2 ng/g dry weight for E2, and were below 0.04 ng/g dry weight for EE2.

Chemical analyses of estrogenic hormones have the advantages of reaching very low Limits of Detection (LODs) (in the sub-ng/L range) and identifying molecules precisely. But other estrogenic disruptors are known to induce estrogenic effects in aquatic environments (e.g., bisphenol A, polybrominated diphenyl ethers, phthalates, organochlorines, alkylphenols or dioxin). They would also have to be measured specifically. Hence, in order to check if estrogenic hormones are good tracers of urban sources of contamination of endocrine disruptors in aquatic environments, it appears valuable to combine chemical analysis of estrogenic hormones with biological tests of estrogenic effects.

Estrogenic activity can be measured using different biological tests. Global biological disrupting effects are generally expressed as equivalent estrogenic quantity of 17β-estradiol (EEQ). The yeast estrogen screen (YES) test, based on recombinant yeast cultures expressing human estrogen receptor, has been used for investigations in influents and effluents of WWTPs [17–19] and surface waters [20]. Levels were up to 130 ng/L EEQ in WWTP influents, <20 ng/L EEQ in effluents and around 1 ng/L EEQ in surface waters.

Korner et al. [21] used the E-screen test involving proliferation of human breast-cancer cells MCF-7 under estrogenic control to quantify estrogenic activity in WWTP influent and found concentrations of 58–70 ng/L EEQ. The ER-CALUX and MELN tests are similar bioassays using human breast-cancer cells T47D and MCF-7, respectively, stably transfected with luciferase reporter gene.

Murk et al. [22] used the ER-CALUX bioassay and quantified estrogenic agonist activities on estrogen receptors in influents (1.1–119.8 ng/L EEQ), effluents (0.03–16.1 ng/L EEQ) and surface waters (0.25–1.72 ng/L EEQ).

Using the MELN test, Pillon et al. [23] found 1.4 ng/L EEQ in surface waters.

In a previous study around the greater suburban area of Paris, Cargouët et al. [5] applied the MELN test and found 43–63 ng/L EEQ in influents, 2–24 ng/L EEQ in effluents and 1–3.2 ng/L EEQ in surface water.

Estrogenic activities determined in areas located in different countries therefore appeared relatively homogeneous. High levels are reported at the entry of WWTP influent, then estrogenic activities are significantly reduced by the WWTPs, in a 60–95% range, leading to residual EEQ values in surface water of nearly 1–4 ng/L.

However, the results may differ depending on the bioassay used. Thus, Nelson et al. [17] compared EEQ values obtained with the E-screen and the YES tests and obtained correlation factors of 0.56–0.75, depending on the operating conditions.

The sensitivity of the bioassay is expressed as the EC50 determined with 17β-estradiol. The YES test appears less efficient, with an EC50 value of 203 ± 67 pM (55.3 ± 18.3 ng/L), which is four times larger than that measured using the E-screen test {i.e., 53.2 ± 7.2 pM (14.5 ± 2.0 ng/L) [17]}.

Sonneveld et al. [24] determined an EC50 value of 16 pM (4.36 ng/L) using the ER-CALUX test. This value is similar to that calculated for the MELN test by Pillon et al. [23] [i.e. 16.6 pM (4.52 ng/L)].

Using the MELN test, Berckmans et al. [25] reported an average value twice that reported by Pillon et al. [23] (i.e. 33 ± 7 pM or 8.99 ± 1.91 ng/L).

This last difference underlines the importance of the variability inherent in biological material and operating conditions (e.g., incubation time or the measurement method for luciferase activity). These factors should be assessed to optimize the sensitivity and the LOD of a bioassay.

The MELN test was adapted in our laboratory and an EC50 value of 6.2 ± 0.4 pM (1.69 ± 0.11 ng/L) was validated on several assays. It is worth noting that the MELN and ER-CALUX tests have been selected to define a standardized test for the *in vitro* evaluation of estrogenic activity [26]. In these studies, biological tests were used as a global approach to give an indication of the endocrine-disruption risk for aquatic wildlife exposed in the environments studied.

As mentioned above, several substances are known to be estrogenic disruptors. These substances are able to react with an estrogen receptor, and, using this ability, they could be detected with the bioassays described previously. However, their affinities to estrogen receptors are far weaker than the affinities of natural estrogenic hormones or ethinylestradiol. For example, Pillon et al. [23] measured EC50 values with the MELN test of 339 pM (74.70 ng/L) for p-nonylphenol and 11 μM (2.42 mg/L) for n-nonylphenol.

It is interesting to compare biological results of estrogenic activity to analytical determinations of estrogenic substances, in particular for natural and synthetic estrogenic hormones. Such a study was realized by Cargouët et al. [5] on four WWTPs located upstream or downstream Paris, France, and in surface waters. Estrogenic activities assessed by the MELN test were mainly associated with estrogenic hormone concentrations (E1, E2, E3 and EE2) quantified in WWTP influent and effluent samples. Using weighting factors, chemical EEQ was estimated from estrogenic hormone concentrations and compared to biological EEQ; chemical EEQs represented half of the biological EEQs in WWTP influent and were equal to the biological EEQs in effluent; chemical EEQs were higher than the biological EEQs in surface-water samples, and this difference was partly explained by the relatively high EE2 concentrations compared to those in WWTP samples. In a similar study

on wastewaters, Nelson et al. [17] found correlation factors (r) of 0.71–0.80 when comparing biological EEQs measured with the E-Screen or YES tests and chemical EEQs obtained from analytical determinations (n = 10, effluent or influent from 5 WWTPs). In this study, the authors obtained chemical EEQs using EEQ factors reported in the literature for the different bioassays. Similarly, Salste et al. [18], using the YES test, showed that the main estrogenic activity observed in the effluents of one WWTP in Finland was mainly due to E1.

The objective of our study was to assess estrogenic activity using the MELN tests for surface-water samples, urban storm run off and WWTP effluent, in parallel with analytical determination of natural estrogenic hormones and a synthetic estrogenic hormone (i.e. ethinylestradiol). We chose to analyze surface-water samples collected in different areas on a single catchment basin, with the aim of following the variation of estrogenic hormone concentration and biological activity along the river flow and urban and country settings. An urban storm run-off and a WWTP were located along the rivers studied, causing local input of ethinylestradiol and natural estrogenic hormones.

2. Methods

2.1. Sampling sites and protocols

Sampling was performed on the Prédecelle and Orge rivers, the latter being a tributary of the River Seine. They merge in an urban area upstream of Paris (Fig. 1). The Orge watershed has a surface of 952 km^2; it is covered by agricultural land upstream and is entirely urbanized downstream. The Orge river, in contrast with its two main tributaries (the Yvette and Remarde rivers) does not receive any WWTP input. However, some diffuse domestic wastewater discharges can reach the Orge river due to poor connections on the stormwater-sewer system. Sampling sites were chosen upstream or downstream of specific points (i.e. urban sites, WWTP effluent, stormwater output, tributary junctures and a marsh area). Samples were collected on the 24 September 2007 on the Prédecelle River and on the 25 September on the Orge River downstream the Remarde tributary (Fig. 1). As we wanted to characterize the longitudinal gradient of contamination, we choose to sample during low flow; flow rates were <0.9 m^3/s for the Orge river. A rain event occurred on the 24 September and allowed us to collect a stormwater sample (i.e. mixture of rain-water run-off and domestic wastewater from a combined sewer system).

For each sampling site, 1 L surface water or WWTP effluent was collected in amber-glass bottles with Teflon caps, previously washed and rinsed with methanol and ultrapure water. Special care was taken to rinse the bottle at least twice with sampling water before collection. Two samples were collected at each site, one for analytical measurement and one for biological testing.

2.2. Chemical analysis

We analyzed the dissolved fraction of hormones, including free and conjugated forms. We have described the analytical methodology in detail [27]. Below, we briefly describe the main steps.

2.2.1. Preparation before extraction. Aqueous samples were filtered on site, on the same day, through a pyrolyzed (450°C, 1 h) glass-fiber filter (GF/F, 0.7 μm pore size). The samples were then submitted to enzymatic hydrolysis by beta glucuronidase aryl sulfatase from *Helix pomatia* (1/1000, v/v) at pH 5.2 and 52°C for 15 h.

Perdeuterated hormones (E1-D4, 17β-E2-D2, 17α-EE2-D4 and E3-D2), used as internal surrogates, were spiked before the extraction step, at a concentration of 125 ng/L in WWTP influents and 50 ng/L in effluents or river waters.

2.2.2. Extraction and clean-up protocols. Sample volumes were 100 mL for influents and 250 mL for river waters and effluents. Solid-phase extractions were performed with an Autotrace workstation (Caliper Life Science) with Oasis HLB cartridges as follows: after washing with 6 mL of methanol and 6 mL of ultrapure water, sample was percolated and elution was achieved with 4 mL of a mixture ethyl acetate/methanol (70/30, v/v). The extract was evaporated to dryness and reconstituted in a mixture of 1 mL of methylene chloride/heptane (50/50, v/v). The extract was then purified on Florisil as follows: after percolation of the extract, 5 mL of a mixture of acetone/heptane (75/25, v/v) were used for elution, then evaporation to dryness was performed and the extract was reconstituted in 200 μL of a mixture of water/acetonitrile (60/40, v/v). Finally, β-estradiol acetate, used as internal standard, was spiked at 40 μg/L just before injection into the chromatographic system.

2.2.3. Liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS^2). Chromatographic analyses were performed on an Xbridge Waters C18 end-capped column (150 mm × 2.1 mm × 3.5 μm) and guard column with an Agilent 1110 coupled with an API 4000 with triple-quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems-MDS Sciex). The injected volume was 10 μL. A gradient with LC-grade water and acetonitrile (flow rate, 0.2 mL/min) was applied for the separation of the 5 hormones: 40% acetonitrile 0–2 min, up to 80% acetonitrile at 4.5 min and until 15 min. The column temperature was set at 35°C. Ionization was performed with an electrospray source in a negative mode and acquisition was achieved in multiple reaction monitoring (MRM) mode. As recommended in EU Commission Decision 2002/657/EC [28], the MS^2 conditions

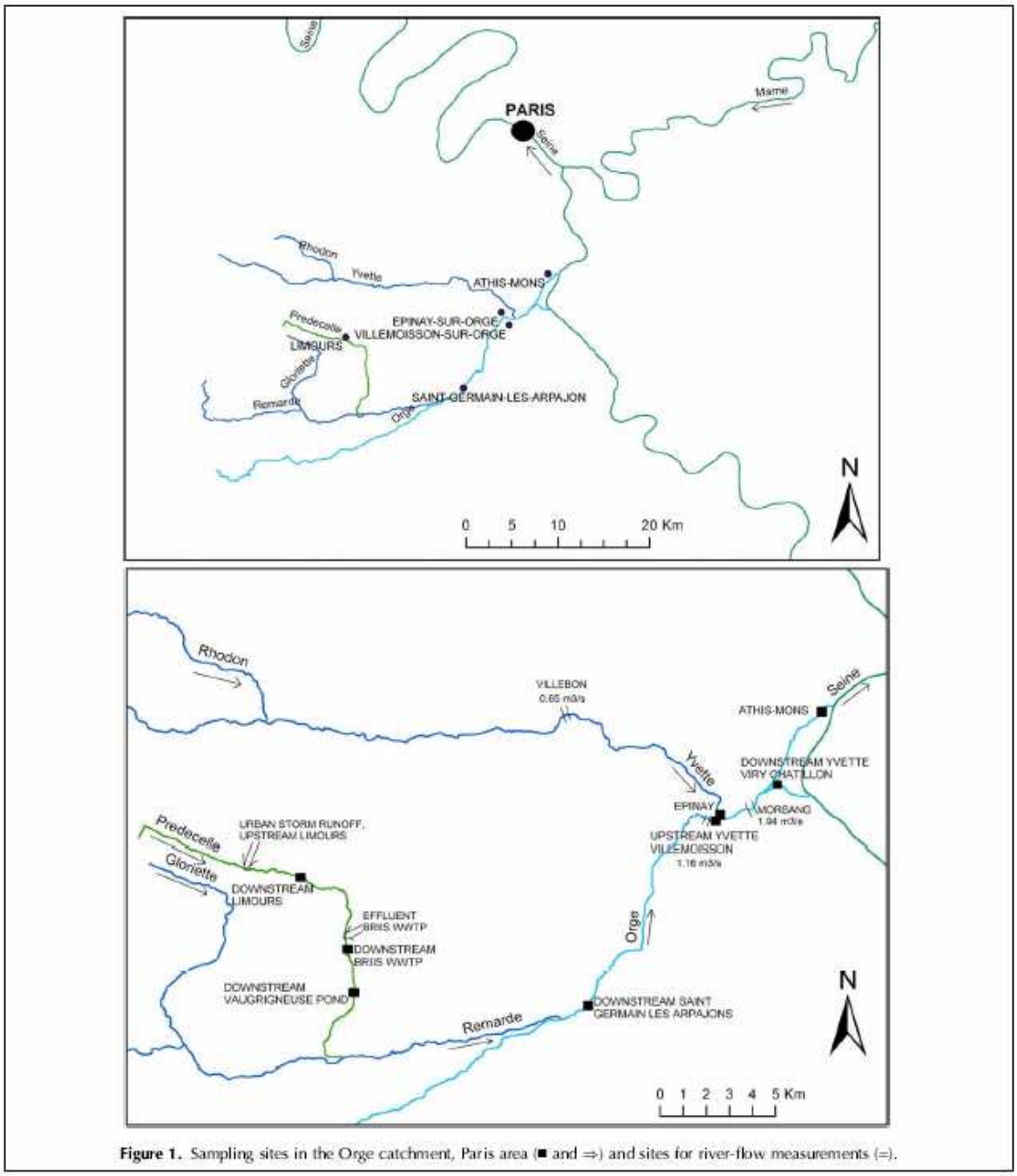


Figure 1. Sampling sites in the Orge catchment, Paris area (■ and ⇒) and sites for river-flow measurements (=).

included the use of 2 ionization transitions for each compound (except for the perdeuterated surrogates), one for the quantification (QT) and one for the identity confirmation (CT). Final concentrations were calculated using recoveries obtained for the internal perdeuterated surrogates (17α-E2-D2 is corrected by 17β-E2-D2).

2.2.4. Performances of the analytical method and quality controls. We have reported the performances of the method in detail [27]. The method was validated according to the French standard NF XPT 90-210 [29]. Acceptable linear responses were obtained for all 5 hormones using standard mixtures containing

0.5–80 μg/L of hormones in vials before injection, which correspond to concentration ranges of 1.0–200 ng/L for influents and 0.4–80 ng/L for effluents and river waters. During validation of the method, limits of quantification (LOQs) were estimated from 0.4 ng/L for E1 and α-E2 to 1.0 ng/L for EE2 in surface and effluent waters, and from 0.8 ng/L for α-E2 to 3.0 ng/L for EE2 in influent waters. However, LOQs greatly depend on the sample matrix and on the sensitivity of the instrument, which can vary from day to day. For this study, results were considered higher than the LOQ when:

(i) the 2 ionization transitions (for QT and identity CT) were confirmed, as explained in the EU Commission Decision 2002/657/EC [28];
(ii) the concentration value was within the range of the calibration curve.

Within-day recoveries obtained for 5 replicate samples of surface water, WWTP influent and effluent were generally in the range 82–115% with relative standard deviations <22%. The specificity of the method was verified for the 5 estrogenic hormones, which meant that matrix effects were not significant (i.e. the use of per-deuterated hormones as internal surrogates appears to be an efficient method to correct for matrix effects).

During sample analysis, we obtained satisfactory quality controls: none of the 5 estrogenic hormones was detected in blank samples and, by using standard solutions, we verified that instrumental sensitivity did not vary.

2.3. Biological analysis

2.3.1. Materials and chemicals. 17ß-estradiol (β-E2) was from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Standard solutions were made in dimethylsulfoxide (DMSO, HPLC grade, Sigma-Aldrich). For sample preparation, glass-fiber filters (1 μM) were from Whatman and Oasis HLB-500 mg cartridges were purchased from Waters (Guyancourt, France). Methanol HPLC grade, acetone Normapur and hexane Pestinorm were from VWR (Strasbourg, France). The material for cell culture was supplied by Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). The luciferase reporter-gene assay kit was supplied by Roche Applied Science (Meylan, France) and a Centro LB 960 microplate luminometer (Berthold, Thoiry, France) was used to measure luminescence.

2.3.2. Liquid-sample preparation. Sample preparation procedures were similar to that for chemical analysis, but special care was taken to avoid contamination from extraction material that could lead to false-positive results. Sample preparation was progressed within 24 h after collection. Filtered liquid phase was extracted on Oasis HLB cartridges previously washed with 10 mL methanol and 10 mL purified water. Then, 1 L of water sample was passed through the cartridge at a flow rate of 6 mL/min. After drying the cartridge for 5 min under vacuum aspiration, elution was carried out using 10 mL of methanol at a flow rate of 1 mL/min. The extract was then evaporated to dryness under nitrogen at 40°C and dissolved in 350 μL DMSO; it was then stored at −20°C before analysis. Just before biological testing, the extract has to be diluted 1000-fold to avoid cellular toxicity.

2.3.3. Biological tests. One bioluminescent cellular model was used to test estrogen-receptor agonist potential of the samples extracts. The MELN cells were seeded into 96-wells, white opaque, culture plates at a density of 2×10^4 cells per well and left to develop 24 h before use. DMSO extracts of sample or calibration standards of β-E2 (10^{-13}–10^{-8} mol/L) were left 16 h for incubation at 37°C. The cells were then washed twice with PBS buffer, and luciferase activity was measured on lysed cells. Each analysis was repeated 5 times using 5 replicate culture wells. The mean of the 5 luminescence activities was used for calculation and results were expressed as relative luminescence unit (RLU) that corresponded to the mean luminescence value related to the one of DMSO control.

In parallel to the MELN cells, the MTT test was used to verify cellular viability, as described by Mosmann [30].

2.3.4. Performances of the biological tests. LOD, estimated as the concentration of hormone leading to luciferase activity significantly different ($p = 0.05$) from the DMSO control, was 0.1 pM (0.03 ng/L of β-E2). Repeatability was around 12% for each test ($n = 5$). Sigmoïdal dose-response curves were estimated from calibration standards allowing LOQs in a range 10^{-12}–10^{-9} M (0.3–272 ng/L of β-E2).

In order to determine the relative biological activity of the chemically-analyzed estrogens, dose-response curves were drawn using calibration standards of hormone for each compound leading to EC50 values of 193.3 pM (52.3 ng/L) for E1, 6.3 pM (1.69 ng/L) for β-E2, 69.4 pM (20.0 ng/L) for E3 and 3.9 pM (1.16 ng/L) for EE2. The relative potencies to β-E2 (EC50 ratio), estimated from 3 repeated curves in a same run, were 0.04 ± 0.01, 0.11 ± 0.04 and 1.79 ± 0.45 for E1, E3 and EE2, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Chemical analysis

Fig. 2 shows the concentrations of the 5 estrogenic hormones.

E1 was quantified in all samples: from 0.1 ng/L downstream Limours (Station 2) to 15.7 ng/L in Briis WWTP effluents (Station 3). A relatively high concentration (13.7 ng/L) was also measured in the urban storm run-off (upstream of Limours, Station 1).

β-E2 was also quantified in all samples, but at a lower level: from 2.3 ng/L in the urban storm run-off (up-

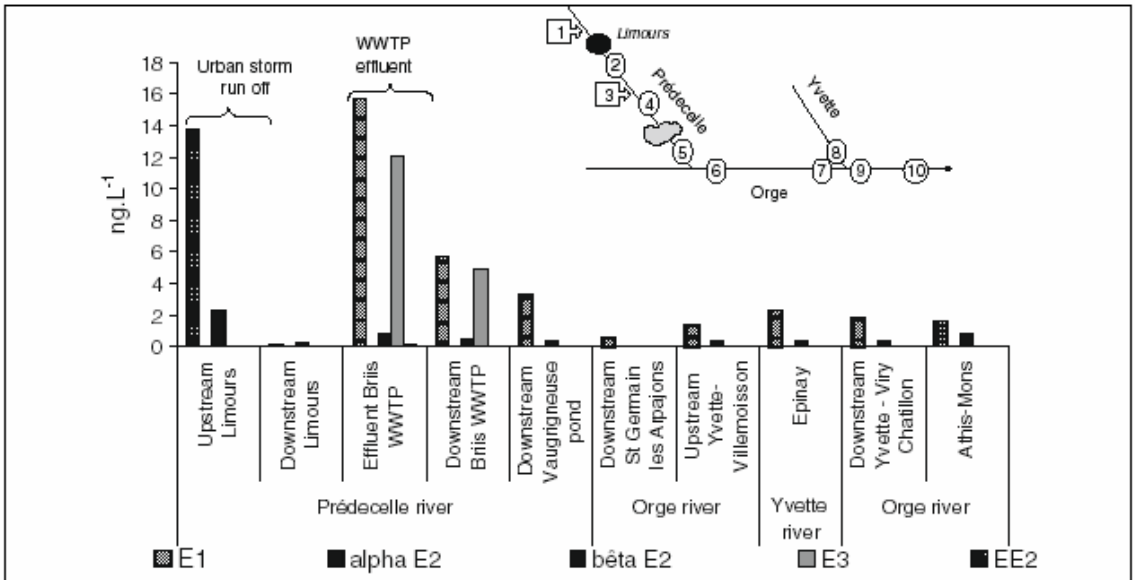


Figure 2. Concentration (ng/L) of the 5 estrogenic hormones in the dissolved phase of surface waters, storm run-off and wastewater-treatment plant (WWTP) effluent from selected sites in the Orge catchment.

stream of Limours, Station 1) to 0.1 ng/L downstream St. Germain les Arpajons (Station 6).

α-E2 was never detected.

EE2 was only quantified in Briis WWTP effluent (0.2 ng/L, Station 3).

E3 was measured in Briis WWTP effluent (12.1 ng/L, Station 3) and downstream Briis effluent (4.9 ng/L, Station 4).

When compared with the levels of other hormones, the higher concentrations of E1 can partly be explained by it being a degradation product of β-E2 and EE2.

The decreasing concentrations of E1 and β-E2 from the urban storm run-off upstream Limours to downstream of Limours (Stations 1 and 2) can be explained by dilution in the river flow, and degradation and adsorption on river sediment.

If we consider the concentration of E1 or the sum of concentration of the five hormones, we observe a strongly decreasing gradient all along the Prédecelle river, from the WWTP Briis effluent input (Station 3), identified as a source of contamination, to the junction with the Orge river at St. Germain les Arpajons (Station 6).

As mentioned in Fig. 1, river flows measured on the 25 September were equal to 0.65 m^3/s for the Yvette river at Villebon (i.e. 10 km upstream the junction with the Orge river), 1.16 m^3/s for the Orge river upstream of the junction with the Yvette river and 1.94 m^3/s for the Orge river at Morsang, downstream the junction with the Yvette river.

We can estimate the mean daily flow of the sum of the 5 hormones from the measured concentrations (i.e. sum of the 5 hormones concentrations × river flow). This estimated hormones flow in the Orge river at Morsang downstream the Yvette river (Station 9, 4.07 μg/s) is similar to that in the Yvette river (Station 8, 1.76 μg/s) plus the one in the Orge river upstream the Yvette river (Station 7, 2.00 μg/s). These results allow us to validate our concentration measurements.

For information, from [31], the mean annual river flow is 1.33 m^3/s for the Yvette river at Villebon (evaluated in the period 1968–2008), 2.23 m^3/s for the Orge river upstream the junction with the Yvette river (evaluated in the period 1982–2008) and 3.89 m^3/s for the Orge river at Morsang, downstream of the junction with the Yvette river (evaluated in the period 1967–2008).

3.2. Biological analysis

Estrogenic potential, reported as RLUs in Fig. 3, was observed for all samples. A high RLU value of 22.6 was observed in WWTP effluent that decreased downstream as a function of the distance from the river input. In the same way, an RLU value of 14.1 was observed in the Yvette river, with a constant decrease observed after the junction with the Orge river.

Meanwhile, estrogenic activities were generally low and Quantification was only possible for 5 out of 10 samples: 2.8 ng/L EEQ was measured in the WWTP effluent and values near 1 ng/L EEQ were measured for the four river samples (Fig. 4). These values are similar to those reported in surface waters of the River Seine in our previous study [5].

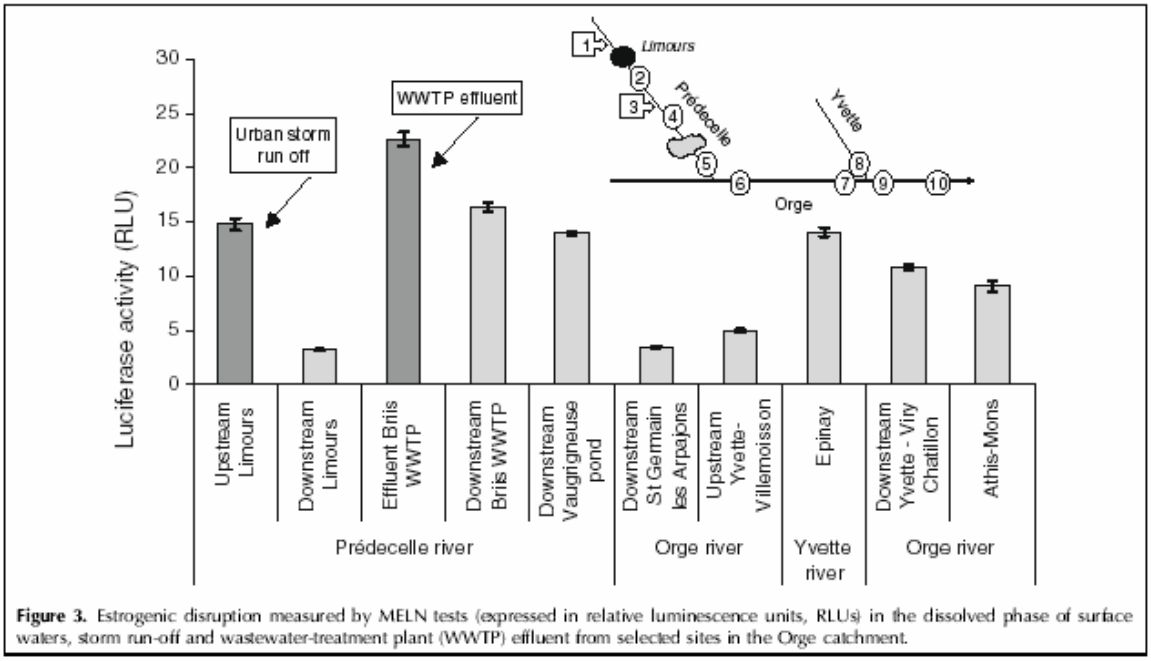


Figure 3. Estrogenic disruption measured by MELN tests (expressed in relative luminescence units, RLUs) in the dissolved phase of surface waters, storm run-off and wastewater-treatment plant (WWTP) effluent from selected sites in the Orge catchment.

3.3. *Chemical vs. biological analysis*

Chemical analysis and RLU in Figs. 2 and 3, respectively, showed similar profiles, especially for the decreasing concentrations downstream of the WWTP effluent input and for the mixing of Yvette and Orge rivers beyond their junction.

The chemical EEQ values were calculated from E1, β-E2, E3 and EE2 concentrations weighted by a factor obtained from relative estrogenic potential on MELN cells (i.e. a weighting factor equal to 1.79 for EE2, 1.00 for β-E2, 0.11 for E3, and 0.04 for E1). In Table 2, these chemical EEQ values are compared with the RLU values obtained from the MELN test. The correlation was confirmed as good with a Spearman Rank test coefficient of 0.87 ($p < 1\%$).

The biological EEQ values were determined for the five samples with RLU values above the LOQ. From Fig. 4, we observe that the chemical EEQ is higher than the bio-

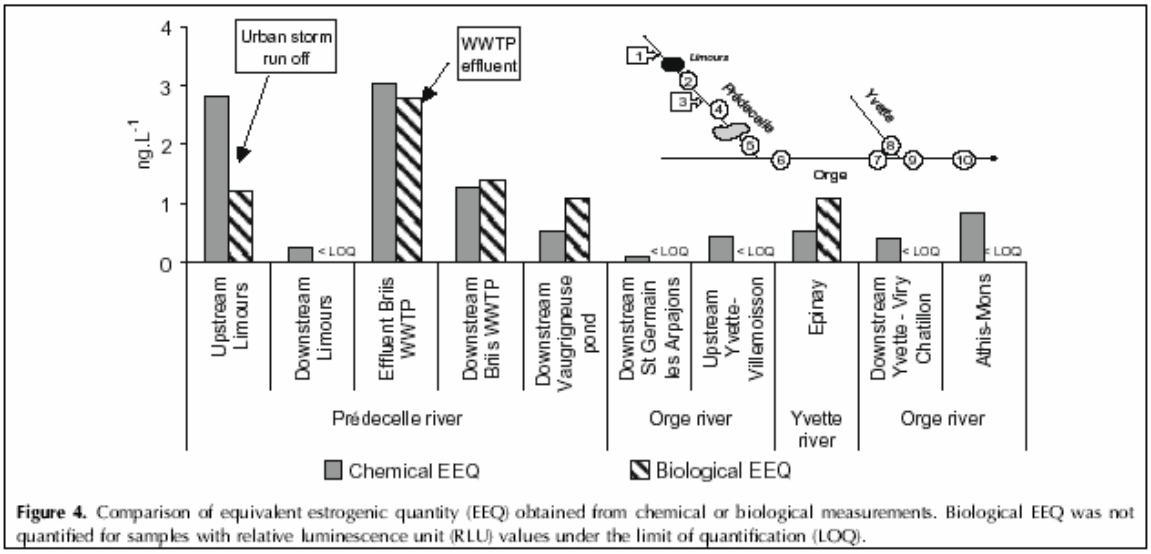


Figure 4. Comparison of equivalent estrogenic quantity (EEQ) obtained from chemical or biological measurements. Biological EEQ was not quantified for samples with relative luminescence unit (RLU) values under the limit of quantification (LOQ).

Table 2. Comparison study between relative luminescence units (RLU) values and chemical equivalent estrogenic quantity (EEQ)

Sample sites	RLU	Chemical EEQ (ng/L)
Urban storm run-off, upstream of Limours	14.77	2.82
Prédecelle river, downstream of Limours	3.22	0.25
Effluent from Briis WWTP	22.66	3.13
Prédecelle river, downstream of Briis WWTP	16.34	1.28
Prédecelle river, downstream of Vaugrigneuse pond	13.97	0.53
Orge river, downstream of St. Germain les Arpajons	3.46	0.10
Orge river, upstream of Yvette Villemoisson	4.97	0.43
Yvette river, Epinay	14.09	0.51
Orge river, downstream of Yvette Viry-Chatillon	10.84	0.40
Orge river, Athis-Mons	9.07	0.84

logical EEQ in the urban storm run-off. Chemical and biological EEQs are comparable for WWTP effluent and downstream of the WWTP, in which estrogenic hormones seem to be responsible for more than 90% of the biological effect.

For five samples, chemical EEQs can be quantified (i.e. in the Prédecelle river downstream of Limours and in the four sites of the Orge river), unlike biological EEQs (estrogenic disruption was detected but biological activity could not be quantified).

For two river samples (in the Prédecelle river downstream of the Vaugrigneuse pond and in the Yvette river at Epinay), the chemical EEQs are lower than the biological EEQs. For these biological EEQs, a contribution from other estrogenic disruptors has to be taken into account; this may explain the lower contribution (about 50%) of estrogenic hormones to the biological effect.

The result obtained in the urban storm run-off upstream of Limours clearly differs from others with a chemical EEQ twice as large as the biological EEQ.

In our previous study carried out near WWTPs in the river Seine [5], chemical EEQ values varied in the range 4.1–7.3 ng/L for surface water, whereas biological EEQs remained around 1 ng/L and the contribution of EE2 was estimated to be 35–48%. In the present study, EE2 was not quantified in surface water.

The low biological activity observed upstream of Limours could partly be explained by an inhibition effect due to a mixture of organic pollutants being present in the sample. This was clearly observed by Salste et al. [18], who studied some chromatographic fractions from WWTP-effluent samples and showed the inhibition of β-E2 activity measured with YES tests. The compounds responsible for this inhibition effect were said to interfere with the estrogen receptor.

4. Conclusion

Combining chemical and biological analyses of estrogenic disruptors allowed us to confirm a tendency for contamination to decrease along the rivers studied (Prédecelle, Yvette and Orge) downstream of a WWTP effluent and an urban storm run-off. This study showed that the biological responses using the MELN test closely followed the chemical responses.

The total (including the conjugated fraction) dissolved concentrations of the 5 hormones seemed to be a good tracer of urban sources of contamination of estrogenic disruptors in wastewaters and surface waters.

Chemical analysis had the following advantages:

(i) reaching lower LOQs than MELN tests, as verified on river samples collected at 5 sites (estrogenic disruption was detected but biological activity could not be quantified).

(ii) being specific (i.e. not affected by matrix interferents), thanks to the use of perdeuterated hormones;

(iii) being selective (i.e. quantifying each of the 5 estrogenic hormones individually).

Bioassays (e.g., MELN tests) have the advantage of measuring the estrogenic effect related to hormones and other estrogenic disruptors present in the samples, so they can be better adapted to screen estrogenic disruption in aquatic environments exposed to urban and industrial sources of contamination. However, the possible inhibition effect from a mixture of pollutants needs to be taken into account by performing chromatographic fractionation of samples and biological testing of the isolated fractions individually.

In conclusion, analytical quantification of estrogens appears to be a simple way to trace estrogenic disruption in surface waters of urban areas, as these hormones are mainly responsible for biological effects.

Acknowledgments

This study was supported by the Piren Seine program (CNRS) and a Ph.D. grant from Cemagref for V. Gabet. We thank Ph. Bados (Cemagref) for help for sample analysis, M. Bimbot and V. Huteau (Faculté de Pharmacie – Laboratoire Santé Publique Environnement, Univ. Paris Sud 11) for technical support for biological tests, M. Deschamps (*Syndicat intercommunal d'assainissement des communes de Limours*) for access to river sites, and M. Hollander (*Lyonnaise des eaux*) for access to the

WWTP. MELN cells were kindly provided by P. Balaguer (INSERM U 439, Montpellier, France).

References

[1] M.L. Richardson, J.M. Bowron, J. Pharm. Pharmacol. 37 (1985) 1.
[2] B. Halling-Sorensen, S.N. Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C.H. Lutzhoft, S.E. Jorgensen, Chemosphere 36 (1998) 357.
[3] M.Y. Gross-Sorokin, S.D. Roast, G.C. Brighty, Environ. Health Perspect. 114 (2006) 147.
[4] C. Miège, J.M. Choubert, L. Ribeiro, M. Eusèbe, M. Coquery, Environ. Poll. (in press).
[5] M. Cargouet, D. Perdiz, A.M. Souali, S. Tamisier-Karolak, Y. Levi, Sci. Total Environ. 324 (2004) 55.
[6] P. Labadie, H. Budzinski, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 5113.
[7] S. Zuehlke, U. Duennbier, T. Heberer, J. Sep. Sci. 28 (2005) 52.
[8] T.A. Ternes, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 419.
[9] H.M. Kuch, K. Ballschmiter, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3201.
[10] I.C. Beck, R. Bruhn, J. Gandrass, W. Ruck, J. Chromatogr., A 1090 (2005) 98.
[11] A. Lagana, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, Anal. Chim. Acta 501 (2004) 79.
[12] E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Fanelli, J. Hazard. Mater. 122 (2005) 205.
[13] G.R. Boyd, H. Reemtsma, D.A. Grimm, S. Mitra, Sci. Total Environ. 311 (2003) 135.
[14] M. Farre, R. Brix, M. Kuster, F. Rubio, Y. Goda, M. Lopez De Alda, D. Barcelo, Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 1001.
[15] G. Morteani, P. Moller, A. Fuganti, T. Paces, Environ. Geochem. Health 28 (2006) 257.
[16] P. Labadie, E.M. Hill, J. Chromatogr., A 1141 (2007) 174.
[17] J. Nelson, F. Bishay, A. van Roodselaar, M. Ikonomou, F.C. Law, Sci. Total Environ. 374 (2007) 80.
[18] L. Salste, P. Leskinen, M. Virta, L. Kronberg, Sci. Total Environ. 348 (2007) 343.
[19] B.V. Rutishauser, M. Pesonen, B.I. Escher, G.E. Ackermann, H.R. Aerni, M.J. Suter, R.I. Eggen, Environ. Toxicol. Chem. 23 (2004) 857.
[20] I.C. Beck, R. Bruhn, J. Gandrass, Chemosphere 63 (2006) 1870.
[21] W. Korner, U. Bolz, W. Sussmuth, G. Hiller, W. Schuller, V. Hanf, H. Hagenmaier, Chemosphere 40 (2000) 1131.
[22] A.J. Murk, J. Legler, M.M. van Lipzig, J.H. Meerman, A.C. Belfroid, A. Spenkelink, B. van der Burg, G.B. Rijs, D. Vethaak, Environ. Toxicol. Chem. 21 (2002) 16.
[23] A. Pillon, A.M. Boussioux, A. Escande, S. Ait-Aissa, E. Gomez, H. Fenet, M. Ruff, D. Moras, F. Vignon, M.J. Duchesne, C. Casellas, J.C. Nicolas, P. Balaguer, Environ. Health Perspect. 113 (2005) 278.
[24] E. Sonneveld, J.A. Riteco, H.J. Jansen, B. Pieterse, A. Brouwer, W.G. Schoonen, B. van der Burg, Toxicol. Sci. 89 (2006) 173.
[25] P. Berckmans, H. Leppens, C. Vangenechten, H. Witters, Toxicol. In Vitro 21 (2007) 1262.
[26] S. Bremer, Oral communication in ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) meeting, Refinements of In Vivo Tests Assessing the Reproductive/Developmental Hazards of Chemicals, 7 September 2006, Ispra, Italy.
[27] C. Miège, P. Bados, C. Brosse, M. Coquery, Trends Anal. Chem. 28 (2009) 238–245.
[28] European Commission, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC), EC, Brussels, Belgium, 2002, 29 pp.
[29] AFNOR, Norme NF XPT 90-210, Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique par rapport à une méthode de référence, AFNOR, Paris, France, 1999, 58 pp.
[30] T. Mosmann, J. Immunol. Methods 65/1–2 (1983) 55.
[31] Hydrological database (http://www.hydro.eaufrance.fr/index.php).

V. Gabet, C. Miège, J.-M. Choubert
UNITÉ DE RECHERCHE QUALITÉ DES EAUX
ET PRÉVENTION DES POLLUTIONS (UR QELY)
LABORATOIRE DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES
CEMAGREF, LYON

S. Martin Ruel
CENTRE INTERNATIONAL DE RECHERCHE SUR L'EAU
ET L'ENVIRONNEMENT (CIRSEE)
SUEZ-ENVIRONNEMENT, LE PECQ (78)

M. Coquery
UR QUALITÉ DES EAUX ET PRÉVENTION DES POLLUTIONS
LABORATOIRE D'ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES
DES MILIEUX AQUATIQUES
CEMAGREF, UR QELY, LYON

Devenir d'œstrogènes et de bêtabloquants

dans les filières eau de dix stations d'épuration biologiques des eaux résiduaires urbaines françaises

LES EFFLUENTS LIQUIDES DES ÉTABLISSEMENTS DE SANTÉ : ÉTAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES DE GESTION
26-27 NOVEMBRE 2008 – CHAMBÉRY[1]

La présence de micropolluants dans les milieux aquatiques a été notée dès les années 1980 (RICHARDSON et BOWRON, 1985). Depuis l'adoption de la directive-cadre sur l'eau (DCE) par le Conseil et par le Parlement européen en octobre 2000, les recherches menées sur l'étude des micropolluants, principalement sur les substances dites prioritaires, dans les eaux de surface et dans les rejets se sont multipliées. Néanmoins, si certaines substances classées prioritaires sont aujourd'hui réglementées (normes de qualité environnementale), ce n'est pas le cas des substances dites émergentes (notamment les pharmaceutiques) sur lesquelles le manque de connaissances est encore important.

Les stations d'épuration (Step) sont considérées comme étant l'un des principaux vecteurs de produits pharmaceutiques vers les eaux de surface. En ce sens, il est important de pouvoir quantifier ces micropolluants en différents points des Step, afin d'évaluer les concentrations et flux entrant et sortant, et l'efficacité d'élimination des différents traitements épuratoires. Cette étude s'attache à analyser cinq hormones œstrogéniques et dix bêtabloquants (**Tableau I**) dans les eaux de dix Step de type épuration biologique.

Les œstrogènes, ou hormones œstrogéniques, sont des molécules excrétées naturellement par l'organisme qui sont également utilisées en médecine humaine (p. ex. : contraceptifs, traitements hormonaux de substitution, etc.) et pour l'élevage intensif animal. Elles sont classées dans la catégorie des perturbateurs endocriniens. Parmi les cinq hormones œstrogéniques étudiées ici, seule EE2 n'est pas d'origine naturelle.

Les bêtabloquants sont des médicaments qui se fixent sur les récepteurs β de l'organisme sans pour autant déclencher de réaction de la part de ces récepteurs. Ils sont prescrits par exemple dans les cas d'hypertension artérielle ou d'insuffisance cardiaque. La présence de récepteurs β-spécifiques chez les poissons (HAIDER et BAQRI, 2000) a soulevé le problème de risques sanitaires potentiels en raison du risque de contamination *via* les milieux aquatiques superficiels.

Les hormones œstrogéniques et les bêtabloquants sont partiellement métabolisés dans les organismes et sont excrétés naturellement par l'intermédiaire

Tableau I - Noms et abréviations des différentes molécules analysées

	Nom de la molécule	Abréviation
Hormones œstrogéniques	Estrone	E1
	17α-estradiol	αE2
	17β-estradiol	βE2
	Estriol	E3
	Éthinylestradiol	EE2
Bêtabloquants	Acébutolol	ACE
	Aténolol	ATE
	Bétaxolol	BET
	Bisoprolol	BIS
	Métoprolol	MET
	Nadolol	NAD
	Oxprénolol	OXP
	Propranolol	PRO
	Sotalol	SOT
	Timolol	TIM

1- Cet article complète le dossier « Effluents liquides » paru en deux parties dans les numéros 714 (mars-avril 2009, État des lieux) et 715 (mai-juin 2009, Traitement) de *Techniques hospitalières*.

des urines. Ces molécules parviennent alors dans les milieux aquatiques *via* les Step. À ce jour, la toxicité et les niveaux d'exposition des produits pharmaceutiques donc leur impact potentiel sur les écosystèmes et la santé humaine sont peu connus. Afin d'évaluer les risques liés à la présence de ces molécules dans les milieux aquatiques, il est nécessaire d'accroître les connaissances, notamment sur les concentrations, les flux et les performances des procédés épuratoires. Notre étude s'inscrit dans le cadre du projet ANR-Precodd Amperes[2], dont l'objectif général est de quantifier les micropolluants dans les eaux usées domestiques et d'évaluer les performances de différentes filières d'épuration. Les substances visées sont les 33 molécules prioritaires de la directive cadre sur l'eau et des substances pharmaceutiques appartenant à plusieurs familles thérapeutiques. L'objectif de cet article est de présenter les résultats obtenus dans les eaux (phase dissoute) pour les hormones et les bêtabloquants lors des campagnes de mesures réalisées sur dix installations mettant en œuvre des procédés épuratoires de type traitement biologique.

Campagnes de prélèvement et traitement des échantillons

Au total, sur toute la durée du projet Amperes, 20 stations d'épuration caractéristiques des principaux procédés conventionnels de traitement rencontrés en France ont été étudiées entre janvier 2007 et octobre 2008. Les campagnes de prélèvements sont menées par le Cemagref de Lyon et par le Cirsee (Suez Environnement). Elles sont réalisées par temps sec en évitant les mois les plus chauds afin d'éviter toute dilution artificielle des échantillons et de se placer dans des conditions comparables de température. Pour les filières « eau » de chaque installation, des échantillons moyens journaliers sont constitués proportionnellement au débit transitant aux points de prélèvement : plusieurs points sont étudiés (influent, point intermédiaire, effluent) pendant deux ou trois jours consécutifs. Les filières « boue » qui y sont associées sont échantillonnées en trois points (boue d'entrée, boue de sortie, retour en tête) pendant un cycle complet de fonctionnement (p. ex. : déshydratation). Du matériel de prélèvement en Téflon et en verre a été utilisé et des précautions strictes de lavage et de vérification (blanc de prélèvement) ont été appliquées.

Les dix Step dont les résultats sont présentés ici sont des filières d'épuration biologique de plusieurs types, qui ont été choisies car ce sont les plus fréquemment rencontrées pour le traitement des eaux des collectivités (**Tableau II**). Les sites étudiés ont été sélectionnés pour la représentativité de leur fonctionnement. Les procédés suivants ont été étudiés : trois décanteurs primaires, six boues activées sous aération prolongée, une boue activée moyenne charge, un bioréacteur à membranes, deux biofiltres, un disque biologique associé à un filtre planté de roseaux. Leur capacité nominale effective est comprise entre 2 900 et 950 000 équivalents habitants.

Les échantillons d'eau sont filtrés et extraits dans les 24 heures qui suivent le prélèvement.

Tableau II - Description et caractéristiques des différentes stations d'épuration échantillonnées

Step	Période d'échantillonnage	Traitement primaire et secondaire	Traitement tertiaire	Capacité (EH)	Débit (m^3/jour)
CA1	5-8 février 2007	Boue activée (C + N)	-	2 900	637
SE1	26 février-01 mars 2007	Boue activée (C + N + P)	-	36 000	4 200
CA2	19-22 mars 2007	Boue activée (C + N)	-	13 000	910
SE2	23-26 avril 2007	Décantation primaire + boue activée (C + N ± P)	-	250 000	280 000
CA3	21-24 mai 2007	Décantation primaire + boue activée (C + N)	-	950 000	306 370
SE3	11-14 juin 2007	Boue activée (C + N ± P)	Décanteur rapide	50 000	6 100
SE4	10-12 septembre 2007	Boue activée (C + N)	-	110 000	14 500
SE5	8-11 octobre 2007	Bioréacteur à membrane	-	24 000	1 520
SE6	15-17 octobre 2007	Décantation primaire + biofiltre (C + N)	-	300 000	4 000
CA4	3-5 décembre 07	Disque biologique + filtre planté	Lagune	1 000	133,5

Step : station d'épuration
EH : équivalent habitants

2- Agence nationale de la recherche, Programme écotechnologies et développement durable, Analyse de micropolluants prioritaires et émergents dans les rejets et les eaux superficielles.

Tableau III - Concentration en hormones libre et totale (après déconjugaison) en ng/l dans les influents (n = 22) et les effluents (n = 23) de dix Step

	Concentration dans les influents (ng/l)					Concentration dans les effluents (ng/l)				
	Moyenne	RSD (%)	Min.	Max.	n < LQ (%)	Moyenne	RSD (%)	Min.	Max.	n < LQ (%)
E1 libre	66,1	51	18,8	155	0	4,1	87	0,1	14,9	0
E1 total	72,7	45	21,7	121	0	5,3	92	0,2	20,4	0
αE2 libre	4,0	54	< 0,1	8,2	45	5,2	/	< 0,1	5,2	96
αE2 total	4,7	67	< 0,1	9,1	45	/	/	/	/	100
βE2 libre	18,9	53	5,1	32,3	5	1,8	101	< 0,1	3,0	91
βE2 total	22,5	61	3,5	49,9	0	1,9	62	< 0,1	3,3	87
E3 libre	299	59	44,7	658	0	5,2	/	< 0,1	5,2	96
E3 total	313	56	56,6	676	0	10,6	/	< 0,2	10,6	96
EE2 libre	/	/	/	/	100	/	/	/	/	100
EE2 total	/	/	/	/	100	/	/	/	/	100

/ : non applicable ; RSD : Relative Standard Deviation ; LQ : limite de quantification

Le protocole analytique pour doser les cinq hormones œstrogéniques consiste en une extraction sur cartouche SPE Oasis HLB suivi d'une purification sur Florisil et d'une analyse par LC-MS-MS (Miège *et al.*, sous presse). Pour l'analyse des hormones totales, une déconjugaison (une hydrolyse enzymatique par la β-glucuronidase) est réalisée à température et pH contrôlés avant l'étape d'extraction. Ce protocole a été validé selon la norme NF XP T90 210 (Afnor, 1999). L'utilisation de quatre hormones deutérées[3] (estrone-d4, 17β-estradiol-d2, 17α-éthynylestradiol-d4 et estriol-d2) comme traceurs internes permet de corriger efficacement les résultats pour toute déviation éventuelle des rendements d'extraction due, notamment, à la matrice complexe.

L'analyse des bêtabloquants consiste en une extraction sur Oasis MCX suivie d'une analyse par LC-MS-MS. Comme il n'existe pas d'homologue deutéré pour chaque bêtabloquant étudié, chaque échantillon est doublé d'un échantillon dopé afin de contrôler au mieux les biais dus aux effets de matrice ou à des dysfonctionnements analytiques (essentiellement des pertes d'analystes pendant les étapes d'extraction ou d'évaporation). Les résultats présentés sont corrigés des rendements analytiques obtenus à partir des échantillons dopés.

Résultats

Un total de 23 échantillons d'influents, 22 échantillons d'effluents et 13 échantillons intermédiaires a été analysé. Les premiers résultats obtenus sur les phases dissoutes sont présentés ci-après.

Le **tableau III** présente les concentrations des cinq hormones (fractions libre et totale) dans les influents et les effluents. La molécule de synthèse EE2, contenue dans les pilules contraceptives, n'est quantifiée dans aucun échantillon, que ce soit les influents ou les effluents ; alors qu'elle l'était (entre 4,9 et 7,1 ng/l dans les influents et entre 2,7 et 4,5 ng/l dans les effluents) dans tous les échantillons d'une étude réalisée en 2001-2002 en région parisienne (Cargouet *et al.*, 2004). Dans tous les échantillons d'influents, E1, βE2 et E3 sont quantifiées ; E3 est mesurée aux concentrations les plus élevées, jusqu'à 676 ng/l et en moyenne 313 ng/l dans la fraction totale (libre + conjuguée). Dans les effluents, E3 a été quantifiée dans un seul des 23 échantillons analysés (à une concentration de 10,6 ng/l), alors que E1 est quantifiée dans tous les échantillons (à des concentrations variant entre 0,2 et 20,4 ng/l). La présence de E1 dans les effluents peut s'expliquer notamment par le fait que cette molécule peut se former lors de la dégradation de βE2 (Baronti *et al.*, 2000) et de EE2 (Ren *et al.*, 2007) dans les stations d'épuration. Pour chacune des dix Step, aucune tendance de partition hormone libre/hormone conjuguée n'a été mise en évidence entre les échantillons d'influent et d'effluent. Compte tenu de la variabilité de la répartition libre/conjuguée, la prise en compte de la fraction totale d'hormones permet de s'affranchir de cette variabilité donc de pouvoir par la suite calculer des efficacités d'élimination.

Les résultats sur les concentrations des bêtabloquants, présentés dans le **tableau IV**, montrent que l'on peut classer les dix molécules en trois groupes :

• le premier groupe de composés est constitué de l'acébutolol, de l'aténolol et du sotalol, qui sont tou-

3- Deutéré : qui contient du deutérium, isotope de l'hydrogène dont le noyau est formé d'un proton et d'un neutron. NDLR.

Tableau IV - Concentration en bêtabloquants en ng/l dans les influents (n = 23) et les effluents (n = 24) de dix Step

	Concentration dans les influents (ng/l)					Concentration dans les effluents (ng/l)				
Bêta-bloquant	Moyenne	RSD (%)	Min.	Max.	n < LQ (%)	Moyenne	RSD (%)	Min.	Max.	n < LQ (%)
ACE	2 160	41	910	5000	0	311	135	32,0	1 413	0
TIM*	2,9	77	< 0,4	5,9	68	5	35	< 0,2	8	54
MET	186	49	4,6	309	0	121	86	19,9	363	0
OXP	10,0	63	< 0,4	21,0	61	9	94	< 0,4	28	33
BIS	216	45	44,0	429	0	74	82	8,4	177	0
BET	26,3	64	< 0,3	54,0	43	8	23	< 0,3	10	75
PROP	307	49	133	703	0	221	45	60,0	397	0
ATE	2 068	45	990	3920	0	707	53	35,5	1 411	0
NAD	140	80	< 0,4	379	22	14	96	< 0,3	43	33
SOT	1 164	71	241	3 200	0	965	64	232	2 389	0

** pour TIM dans les influents, n = 22 ; RSD : Relative Standard Deviation ; LQ : limite de quantification*

jours quantifiés dans les influents et les effluents à des concentrations très élevées, pouvant atteindre 5 000 ng/l dans les influents ;

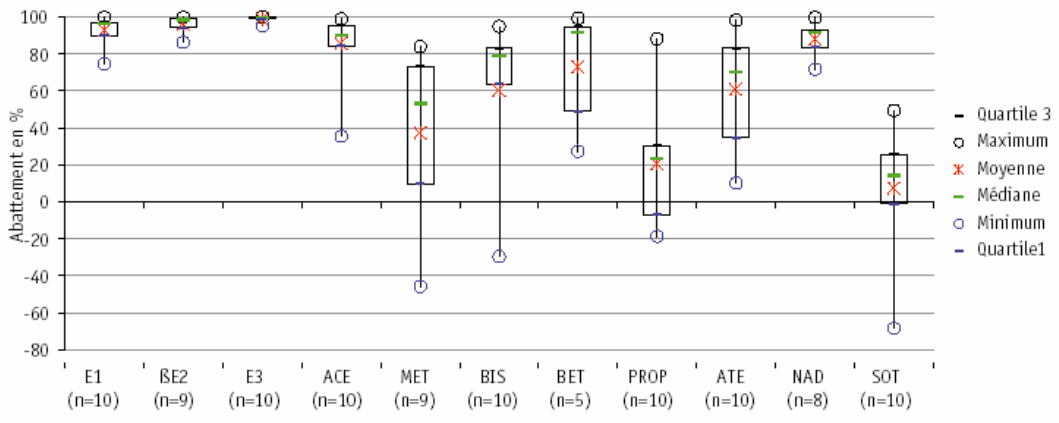
• le deuxième groupe est constitué du métoprolol, du bisoprolol, du propranolol et du nadolol, quantifiés dans la quasi-totalité des échantillons analysés mais dont la concentration est inférieure à celle retrouvée pour les molécules du premier groupe (généralement inférieure à 500 ng/l) ;

• le troisième groupe de composés comprend le timolol, l'oxprénolol et le bétaxolol, qui sont rarement quantifiés et souvent non détectés dans les échantillons analysés.

D'un point de vue général, les variations observées sur les concentrations mesurées pour un même point de prélèvement sur deux ou trois jours consécutifs sont généralement inférieures à 25 %. Les évaluations d'élimination sont donc calculées à partir des valeurs moyennes de concentration sur les deux ou trois jours de prélèvement. Nous présentons des abattements de la phase dissoute pour les molécules qui sont présentes en quantité significative. En effet, des calculs d'abattements sur des molécules présentes à des concentrations proches des limites de quantification en entrée de Step ne sont pas pertinents : les abattements ne sont donc pas évalués pour αE2, TIM, OXP (ainsi que pour EE2 qui n'est jamais détectée dans nos échantillons).

La **figure 1** présente les abattements obtenus pour les différentes molécules. Les dix stations étudiées sont globalement efficaces vis-à-vis de l'élimination des trois estrogènes étudiés : en moyenne, plus de

Figure 1 - Élimination (%) des hormones œstrogéniques totales (libres + conjuguées) et des bêtabloquants dans la phase dissoute des dix Step étudiées



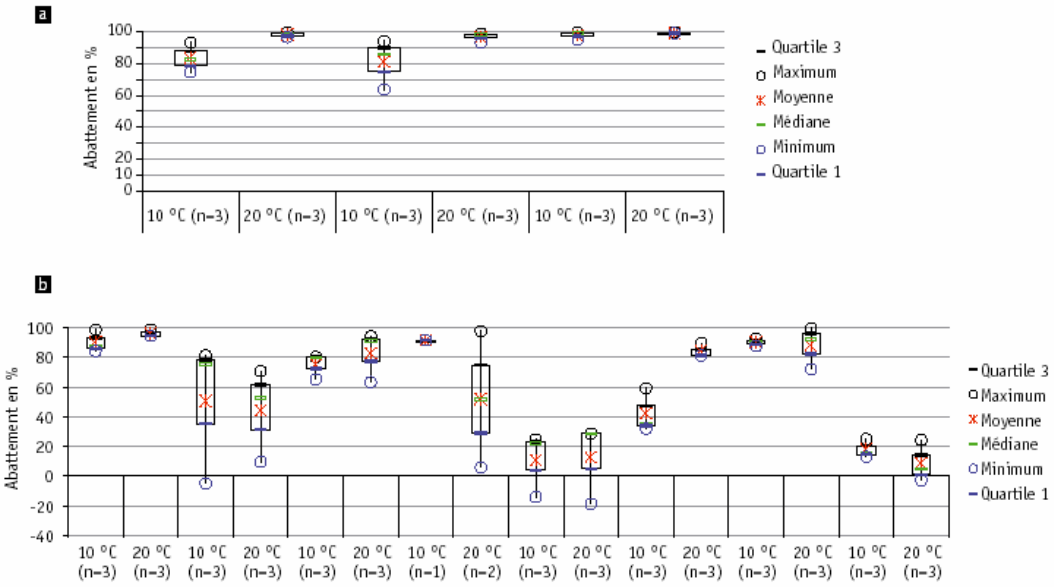
90 % de la concentration soluble initiale a disparu en sortie de Step.

En raison des différences de structure et de propriétés physico-chimiques des dix bêtabloquants étudiés, leurs comportements dans les Step sont variables et il est plus difficile de tirer une tendance générale quant à leur élimination de la phase dissoute. Néanmoins, d'un point de vue très global, on note que l'on obtient des abattements moyens supérieurs à 60 % pour ACE, BIS, BET, ATE et NAD (valeurs médianes supérieures à 70 %) et inférieurs à 40 % pour MET, PROP et SOT. Certaines molécules comme ACE ou NAD sont par exemple très bien éliminées (abattement moyen supérieur à 80 %), alors que d'autres comme SOT semblent insensibles aux traitements étudiés (abattement moyen de 7 %). Par ailleurs, la plupart des bêtabloquants présentent des abattements très variables d'une station à une autre : entre 10 et 98 % pour ATE, entre –46 et 84 % pour MET, entre 27 et 99 % pour BET et entre –19 et 88 % pour PROP. Des valeurs d'abattement négatives apparaissent effectivement pour plusieurs bêtabloquants : MET, BIS, PROP et SOT. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer ces valeurs. Elles peuvent tout d'abord être liées au protocole analytique, c'est-à-dire à de mauvais rendements de récupération analytiques pour les échantillons dopés, ce qui induit une correction surévaluée des concentrations finales dans les échantillons non dopés, ainsi qu'à la variabilité analytique qui est de l'ordre de 30 %. Ces abattements négatifs pourraient aussi s'expliquer par un transfert des molécules présentes sur les particules des eaux vers le compartiment dissous.

L'impact de la température du bassin de boue activée a également été évalué (**Figures 2 a et b**). Les installations évaluées à 10 °C ont des rendements d'élimination de la phase soluble plus faible que celles évaluées à 20 °C pour E1 et βE2 (abattement de l'ordre de 80 % à 10 °C et proche de 100 % à 20 °C). Pour E3, on ne note pas d'influence significative de ce paramètre, cette molécule étant bien éliminée quelle que soit la température du bassin. Concernant les bêtabloquants, l'influence de la température du bassin de boue activée est mise en évidence seulement pour ATE : les abattements à 10 °C varient entre 30 et 60 % alors qu'ils sont compris entre 80 et 90 % à 20 °C.

Enfin, l'efficacité du traitement tertiaire placé en aval d'un traitement secondaire biologique a été exa-

Figure 2 - Influence de la température du bassin de boue activée sur l'efficacité d'élimination (%) de la phase dissoute des hormones œstrogéniques (a) et des bêtabloquants (b)



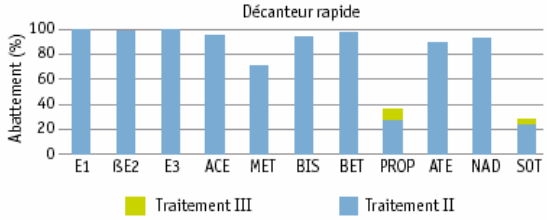
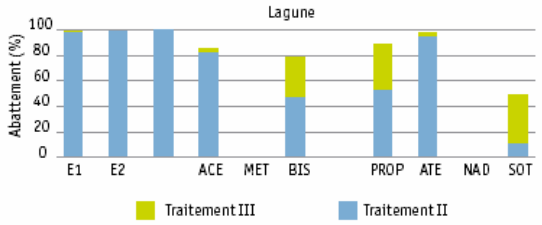


Figure 3 - Abattement de la phase dissoute des hormones œstrogéniques et des bêtabloquants en entrée et en sortie du décanteur rapide

Figure 4 - Abattement de la phase dissoute des hormones œstrogéniques et des bêtabloquants en entrée et en sortie de la lagune



minée pour deux procédés : SE3 (décanteur rapide, **figure 3**) et CA4 (lagune de finition, **figure 4**). Nous avons considéré les biofiltres nitrifiants des campagnes CA3 et SE6 qui interviennent en aval d'un traitement secondaire et qui traitent seulement le carbone, comme un complément de l'étage secondaire. Pour les œstrogènes, l'efficacité de ces procédés ne peut pas être évaluée car ces molécules sont déjà presque totalement éliminées de la phase dissoute en sortie de traitement secondaire. Pour les bêtabloquants, on note une très légère amélioration de l'abattement pour PROP et SOT avec le décanteur tertiaire. En revanche, l'efficacité de la lagune est prouvée pour BIS, PROP et SOT. En effet, les abattements passent respectivement de 47 à 77 %, de 53 à 88 % et de 12 à 49 % entre l'entrée et la sortie de la lagune de finition. Des séjours longs (> 20 jours) associés à des conditions favorables pour la photodégradation (eau limpide) peuvent expliquer la disparition de ces composés, notamment pour le PROP dont la demi-vie a été évaluée entre 0,6 et 12 jours en fonction de la concentration initiale, de la latitude et de la saison par Liu *et al.* (2007) et à moins de 16,8 jours par Andreozzi *et al.* (2003).

Conclusion

Ces résultats ont permis de mettre en évidence les faibles variations de concentration pour un même point échantillonné sur trois jours consécutifs (prélèvements moyens par 24 heures).

Les hormones œstrogéniques sont bien éliminées de la phase dissoute par les traitements de type boue activée et les biofiltres nitrifiants. Les conclusions sont moins évidentes concernant les dix bêtabloquants étudiés ; chimiquement très différents les uns des autres, ils montrent des comportements distincts dans les stations de traitement des eaux : on obtient des abattements généralement supérieurs à 80 % pour l'acébutolol, et rarement supérieurs à 30 % pour le sotalol. On a également observé qu'une augmentation de la température du bassin de boue activée de 10 à 20 °C permettait d'améliorer l'abattement de E1, βE2 et ATE de la phase dissoute. L'efficacité du traitement tertiaire sur l'élimination additionnelle des bêtabloquants, parmi les procédés étudiés, a seulement été prouvée pour BIS, PROP et SOT dans le cas d'une lagune.

Ces résultats sur la phase dissoute nous donnent déjà certaines indications concernant le comportement des hormones et des bêtabloquants dans les stations d'épuration, cependant il faudra attendre les résultats, en cours d'acquisition, sur les matières en suspension et les boues pour évaluer l'efficacité des procédés vis-à-vis de l'élimination de ces molécules.

Remerciements

Nous remercions l'Agence nationale de la recherche (ANR Precodd, projet Amperes) et l'Agence de l'eau Rhône-Méditerranée et Corse pour le cofinancement de ces travaux. Nous remercions également P. Bados, C. Brosse et J. Moriceau (Cemagref) pour l'appui analytique.

Références bibliographiques

Andreozzi, R., M. Raffaele, P. Nicklas (2003). «Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment.» Chemosphere 50(10): 1319-1330.

Baronti, C., R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Samperi (2000). «Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water.» Environmental Science & Technology 34(24): 5059-5066.

Cargouet, M., D. Perdiz, A. Mouatassim-Souali, S. Tamisier-Karolak, Y. Levi (2004). «Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France).» Science of the Total Environment 324(1-3): 55-66.

Haider, S. et S. S. R. Baqri (2000). «beta-Adrenoceptor antagonists reinitiate meiotic maturation in Clarias batrachus oocytes.» Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology 126(4): 517-525.

Liu, Q. T. et H. E. Williams (2007). «Kinetics and degradation products for direct photolysis of beta-blockers in water.» Environmental Science & Technology 41(3): 803-810.

Miège, C., P. Bados, C. Brosse, M. Coquery. «Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in various aqueous matrices». Trends in Analytical Chemistry (sous presse).

Ren, H. Y., S. L. Ji, N. U. D. Ahmad, W. Dao, C. W. Cui (2007). «Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 alpha-ethynylestradiol by Sphingobacterium sp JCR5.» Chemosphere 66(2): 340-346.

Richardson, M. L. et J. M. Bowron (1985). «The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment.» Journal of Pharmacy and Pharmacology 37: 1-12.

RESUME

Les estrogènes et les bêtabloquants transitent quotidiennement par les réseaux d'assainissement et les stations d'épuration des eaux résiduaires urbaines. Une première partie de ce travail a consisté à développer des méthodes pour analyser ces micropolluants émergents dans les boues de station d'épuration et les matières en suspension. L'efficacité des traitements épuratoires a ensuite été évaluée vis-à-vis de l'élimination de ces molécules. En règle générale, les 5 estrogènes étudiés (estrone, 17α- et 17β-estradiol, estriol, 17α-éthinylestradiol) sont plutôt bien éliminés par les stations d'épuration avec des efficacités d'élimination généralement supérieures à 90%. Pour les 10 bêtabloquants analysés (acébutolol, aténolol, bêtaxolol, bisoprolol, métoprolol, nadolol, oxprénolol, propranolol, sotalol et timolol), des comportements différents ont été observés. Alors que l'acébutolol et le nadolol sont éliminés (abattements moyens supérieurs à 80%), d'autres molécules comme le sotalol et le propranolol ne sont que peu impactées par les traitements épuratoires (abattements moyens inférieurs à 20%). Pour les autres bêtabloquants étudiés, des abattements intermédiaires (entre 40 et 70%) sont observés. Excepté le propranolol, qui est le plus hydrophobe des bêtabloquants étudiés, les molécules ciblées dans cette étude s'adsorbent peu sur les matières en suspension (en moyenne 90% des molécules se trouvent dans la phase dissoute) et ne sont pas concentrées dans les boues ; les abattements mesurés correspondent donc, sauf pour le propranolol, à une biodégradation et pas à un transfert des micropolluants vers les boues. Les molécules résiduelles non éliminées par le traitement épuratoire rejoignent le milieu aquatique récepteur. Les rejets de station d'épuration représentent en effet une source de contamination pour les milieux aquatiques et l'impact de ces rejets est visible, notamment en termes d'augmentation des concentrations de micropolluants mesurées dans le milieu. Néanmoins, les faibles concentrations mesurées ne semblent pas individuellement représenter de risque environnemental majeur ; seul le propranolol a présenté sur 4 des 15 sites étudiés un quotient de risque supérieur à 1 ce qui indique un risque environnemental probable. Cependant, même si le risque associé à une molécule est faible, chaque molécule présente dans l'environnement contribue au potentiel toxique global des substances présentes dans l'environnement.

Mots clés : estrogènes, bêtabloquants, eaux usées, eaux de surface, boues, efficacité d'élimination, évaluation du risque environnemental.

ABSTRACT

Estrogens and beta blockers are daily excreted by human beings and wastewater treatment plants are recognised as the main pathway of these emerging micropollutants to the aquatic environment. This study aims at analyzing 5 estrogens (estrone, 17α- and 17β-estradiol, estriol, 17α-ethynylestradiol) and 10 beta blockers (acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, propranolol, sotalol et timolol) in urban wastewater treatment plants and surface waters. First of all, methods were developed for the analysis of target molecules in sewage sludge and suspended particulate matters. Then, estrogens and beta blockers were studied in urban wastewater treatment plants. Generally, wastewater treatments are efficients to remove estrogens from wastewater with mean removal rates above 90%. For beta blockers, acebutolol and nadolol are efficiently removed (mean removal rates of about 80%), while sotalol and propranolol are hardly impacted by wastewater treatment (mean removal rates below 20%). Other studied beta blockers present intermediate removal rates (between 40 and 70%). Except propranolol which is the less hydrophilic molecule among the different studied beta blockers, target molecules are not adsorbed on suspended particulate matters (mean proportion of 90% of the target molecules are present in the dissolved phase) and are not concentrated into sludge. So, calculated removal rates correspond, except for propranolol, to biodegradation and not to transfer into sludge. Residual molecules which are not removed by wastewater treatment reach the aquatic environment. The impact of wastewater treatment plants on the receiving rivers was studied showing a clear increase of target molecules concentrations near the wastewater treatment plants outfall. However, only propranolol presented an environmental risk ratio in the range or above 1 showing a possible environmental risk in 4 studied receiving waters out of 15. Nevertheless, even if no specific toxic effects are pointed out, each molecule contributes to the overall toxic potential of the substances present in the aquatic environment.

Keywords: estrogens, beta blockers, wastewater, surface water, sludge, removal efficiency, environmental risk evaluation.