

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
Centre Eau, Terre et Environnement

**ENLÈVEMENT DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS (HORMONES) PAR
OXYDATION ENZYMATIQUE, DANS LES EAUX USÉES**

Par
Muriel AURIOL
D.E.A. sciences et techniques du déchet
Ingénieure en génie énergétique et environnement

Thèse présentée
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences de l'Eau

Jury d'évaluation

Président du jury	Pr. James A. Nicell, Mc Gill University
Examineur interne	Pr. Jean-François Blais, INRS-ETE
Examineur externe	Pr. James A. Nicell, Mc Gill University
Examineur externe	Pr. Maria Elektorowicz, Concordia University
Directeur de recherche	Pr. Rajeshwar D. Tyagi, INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Pr. Craig D. Adams, University of Missouri-Rolla

11 Avril 2007

REMERCIEMENTS

À mon directeur de recherche, Pr. R.D. Tyagi, toute ma reconnaissance pour m'avoir admise comme étudiante au Ph.D. dans son groupe de recherche. Mes remerciements s'adressent également à mon codirecteur, Pr. C.A. Adams de l'Université du Missouri-Rolla (UMR - USA), pour m'avoir tout d'abord accueillie dans son équipe, et pour ses commentaires et ses recommandations dans l'orientation de mon sujet de recherche et mes expériences en laboratoire.

Je tiens à remercier Dr. Y. Filali Meknassi pour sa grande disponibilité, ses conseils, et sa précieuse aide au niveau de la réalisation des expériences en laboratoire tout au long de ma recherche.

J'aimerais aussi adresser mes remerciements au Dr. B. Piña pour les analyses d'estrogénicité effectuées dans son laboratoire à Barcelone (Espagne) et ses recommandations.

Je désire également exprimer mes remerciements au groupe de recherche du Pr. C.A. Adams, en particulier à Evelyn Chamberlain pour le temps qu'elle m'a accordé au niveau du LC-MS.

Enfin, à ma famille, mon support le plus inestimable.

AVANT-PROPOS

Les résultats obtenus tout au long de cette thèse en science de l'eau ont fait l'objet de diverses publications publiées ou soumises à des revues scientifiques internationales :

Au cours de cette thèse

Articles en préparation

1. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., 2007. Horseradish peroxidase and laccase enzymes for the treatment of phenolic endocrine disrupting compounds.
2. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Surampalli R.Y., Timmons T., Adams C., 2007. Removal of Steroid Estrogens from Surface and Distilled Water in Conventional Water Treatment Processes.

Articles Soumis

3. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C., Noguerol T.-N., Piña, B., 2007. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. Soumis à *Chemosphere* (13/02/2007).

Article accepté

4. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C., 2007. Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. Accepté pour publication à *Water Research*.

Articles Publiés

5. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C., 2007. Oxidation of Natural and Synthetic Hormones by the Horseradish Peroxidase Enzyme in a Wastewater. *Chemosphere* (doi : 10.1016/j.chemosphere.2007.03.045).
6. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Adams C.D., Surampalli, R.Y., 2007. Quantification of steroid sex hormones using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Water Environment Research*, 79 (doi : 10.2175/106143007X156781).

7. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., 2007. Présence et devenir des hormones stéroïdiennes dans les stations de traitement des eaux usées. *Revue des Sciences de l'Eau*, 20(1), 89-108.
8. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C., Tyagi R.D., 2006. Natural and synthetic hormones removal using horseradish peroxidase enzyme: temperature and pH influence. *Water Research*, 40(15), 2847-2856.
9. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C., Surampalli R.Y., 2006. Endocrine disrupting compounds removal from the wastewater treatment plant, a new challenge. *Process Biochemistry*, 41(3), 525-539.

Rapports

10. Auriol M., Surampalli R.Y., 2006. Removal of Steroid estrogens from Surface and Distilled water in Conventional Water Treatment Processes. Rapport scientifique interne (avril 2006).
11. Auriol M., Mercier G., Blais J.-F., 2006. Identification d'une solution technologique au problème de la formation de struvite lors du traitement de lisier de porc par tamisage. Rapport de recherche R-872 remis à l'INRS-ETE (août 2006).

Hors thèse

Articles Publiés

12. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Tyagi R.D., Comeau Y., Surampalli R.Y., 2003. Design strategy for simultaneous nitrification/denitrification of slaughterhouse wastewater in a Sequencing Batch Reactor: ASM2d modeling and verification. *Environmental Technology*, 26(10), 1081-1100.
13. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Tyagi R.D., Comeau Y., Surampalli R.Y., 2005. Phosphorus co-precipitation in biological treatment of slaughterhouse wastewater in a Sequencing Batch Reactor. *Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 9(3), 179-192.

14. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., 2003. Treatment of slaughterhouse wastewater in a Sequencing Batch Reactor: Simulation vs. Experimental Studies. *Environmental Technology*, 25(1), 23-38.

Rapports

15. Auriol M., Sommar J., 2002. Development and assessment of atmospheric mercury sampling and measurement technique. Département de Chimie à Chalmers University of Technology (Sweden)*.
16. Auriol M., Filali-Meknassi Y., 2001. Traitement des eaux d'abattoirs dans un réacteur biologique séquentiel : simulations à l'aide du logiciel GPS-X et expérimentations en laboratoire. INRS-Eau (Canada)†.

L'étudiante a également participé à plusieurs conférences :

Au cours de cette thèse

1. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C., Tyagi R.D., Noguerol T.-N., Piña, B., 2007. Removal of natural and synthetic estrogens, and their associated estrogenicity, from municipal wastewater by laccase from *Trametes versicolor*. European Water and Wastewater Management Conference, St James' Park, NewCastle, Angleterre, 24-26 septembre 2007.
2. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C.D., Tyagi R.D., 2007. Comparison study between HRP and laccase for the oxidation of steroid estrogens in a municipal wastewater. MICROPOL & ECOHAZARD 2007, 5th IWA specialised conference on assesment and control of micropolluants, Frankfurt, Allemagne, 17-20 juin 2007. (Affiche).
3. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C.D., Tyagi R.D., 2007. Laccase-catalyzed removal of steroid estrogens from municipal wastewater. MICROPOL & ECOHAZARD 2007, 5th IWA specialised conference on assesment and control of micropolluants, Frankfurt, Allemagne, 17-20 juin 2007. (Affiche).
4. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Adams C.D., 2007. Steroid estrogens removal from surface water in conventional driking water works processes. MICROPOL & ECOHAZARD

* Rapport remis dans le cadre du stage DEA effectué à Chalmers University of Technology (Suède)

† Rapport remis dans le cadre du stage ingénieur de fin d'étude (Ecole INSA Lyon - France).

2007, 5th IWA specialised conference on assesment and control of micropolluants, Frankfurt, Allemagne, 17-20 juin 2007. (Affiche).

5. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C.D., Tyagi R.D., 2006. Laccase and Horseradish Peroxidase in Oxidation of The Synthetic Steroid Estrogen: 17 α -ethinylestradiol. Proceedings of the International Water Association (IWA). Biennial World Water Congress, Beijing, Chine, 9-14 septembre 2006.

6. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Adams C.D., Tyagi R.D., 2006. Removal of steroid Estrogens From a municipal wastewater by the enzyme horseradish peroxidase. Proceedings of the International Water Association (IWA). Biennial World Water Congress, Beijing, Chine, 9-14 septembre 2006.

7. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Adams C.D., 2006. Estrogen removal in drinking water treatment processes. Proceedings of the MWEA/AWWA Annual Meeting. Osage Beach, MO, USA, 28 mars 2006.

8. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C., Tyagi R.D., 2005. HRP-catalyzed oxidation of steroid estrogens in synthetic water vs. wastewater effluent. 21^{ème} Congrès du Canada sur la Qualité de l'Eau (ACQE), Québec (QC), Canada, 04 novembre 2005. (Affiche).

9. Adams C., Filali-Meknassi Y., Auriol M., 2005. Natural and synthetic hormones degradation by ozonation. 17^{ème} Congress of the International Ozone Association, Strasbourg, France, 22-25 août 2005.

10. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Adams C., Tyagi R.D., 2004. Natural and synthetic hormones removal by enzymatic degradation. 20^{ème} Association Canadienne sur la Qualité de l'Eau (ACQE), Ottawa, Canada, 29 octobre 2004.

11. Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C., Surampalli R.Y., 2004. Analytical methodologies for determination of natural and synthetic steroid sex hormones using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. 20^{ème} Association Canadienne sur la Qualité de l'Eau (ACQE), Ottawa, Canada, 29 octobre 2004. (Affiche).

12. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Adams C., Surampalli R.Y., 2004. Endocrine Disrupters Compounds in the Livestock Dejections and Slaughterhouses Effluent. Proceedings of the

International Water Association (IWA). Biennial World Water Congress (IWA), Marrakech, Maroc, 19-24 septembre 2004.

Hors thèse

13. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Tyagi R.D., Comeau Y., 2001. Simulation du traitement des eaux d'abattoirs en RBS en utilisant le modèle ASM2d. 17ème Association Canadienne sur la Qualité de l'Eau (ACQE), St-Foy (Qc), Canada, octobre 2001.

14. Filali-Meknassi Y., Auriol M., Tyagi R.D., Comeau Y., 2001. Traitement des eaux d'abattoirs : nouvelle approche pour un meilleur rendement en enlèvement du CNP. La Fondation des Gouverneurs, St-Hyacinthe (Qc), Canada, 12 sept 2001.

RÉSUMÉ

La principale source des estrogènes naturels (estrone – E1, 17 β -estradiol – E2 et estriol –E3) dans l'environnement aquatique est via les sécrétions humaines et animales. L'estrogène synthétique 17 α -éthinyloestradiol (EE2) est le composé principal des pilules contraceptives, et donc sécrété essentiellement par les femmes. Une importante contribution en ces hormones stéroïdiennes correspond aux effluents des stations de traitement des eaux usées (STEPs) municipales, qui sont rejetés directement dans l'environnement aquatique. En effet, plusieurs études de toxicité ont montré que ces composés sont largement responsables des effets estrogéniques observés chez les organismes aquatiques exposés.

L'objectif principal de ce projet de recherche a été de mettre en place un système de traitement innovateur et économiquement viable pour un enlèvement efficace des estrogènes naturels et synthétiques, ainsi que de leur estrogénicité associée, des effluents des STEPs municipales. Le choix du procédé s'est porté sur l'oxydation enzymatique des estrogènes par l'enzyme peroxydase de raifort (HRP) et l'enzyme polyphénolique laccase. La HRP a été sélectionnée comme enzyme de référence car c'est une enzyme très étudiée et efficace pour le traitement de composés phénoliques. La laccase a été choisie comme enzyme pouvant être produite à faible coût, par l'utilisation de biosolides comme substrat de croissance. Plusieurs expériences dans des réacteurs en batch ont été réalisées en laboratoire pour développer et optimiser le procédé enzymatique considéré, et évaluer l'efficacité de ce procédé de traitement pour l'enlèvement des estrogènes (E1, E2, E3 et EE2) présents dans les eaux usées municipales.

Les concentrations en estrogènes ont été déterminées par chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse (LC-MS). Les tests sur l'activité estrogénique après traitement enzymatique ont été effectués par le bio essai *in vitro* aux levures recombinantes (RYA).

Les expériences réalisées en eau synthétique ont indiqué que le pH optimum pour l'enlèvement de chaque estrogène était aux alentours de 6 pour la laccase et de 7 pour la HRP. La HRP permettait d'atteindre des taux d'enlèvement relativement élevés sur une large gamme de pHs (6–8). La laccase semblait, par contre, être fortement dépendante du pH. Cependant, les deux

enzymes présentaient un pH optimal compris dans l'intervalle des pHs retrouvés dans les STEP's municipales.

Le procédé par la HRP requière l'apport de H_2O_2 pour être activée et pouvoir oxyder les estrogènes. En eau synthétique et à des concentrations initiales en estrogènes de l'ordre du $\mu g/L$, le rapport molaire dioxyde/substrat optimal, à pH 7.0 et 25 ± 1 °C, correspondait approximativement au rapport stoechiométrique théorique, soit 0.5.

L'étude cinétique réalisée afin de déterminer l'affinité de chaque enzyme (HRP et laccase) envers chacun des substrats étudiés (E1, E2, E3 et EE2) et d'évaluer l'efficacité catalytique de ces enzymes a indiqué que l'oxydation par la HRP et la laccase des estrogènes étudiés correspondait à une réaction du pseudo premier ordre et suivait le modèle cinétique de Michaelis-Menten. Les expériences ont été menées en laboratoire dans une eau synthétique à pH 7.0 et 25 ± 1 °C pour des concentrations initiales en estrogènes de l'ordre du $\mu g/L$. De plus, en se basant sur le modèle de Michaelis-Menten, les résultats expérimentaux ont montré que les deux enzymes présentent une même affinité pour les estrogènes étudiés sous les conditions expérimentales utilisées. Des valeurs de K_M entre 1.32–7.47 μM ont été relevées pour la HRP et la laccase. Par ailleurs, les valeurs du rapport k_{cat}/K_M ont indiquées que le procédé de traitement par la HRP semblait plus efficace que le procédé de traitement par la laccase, pour l'enlèvement des estrogènes étudiés dans une eau synthétique.

Plusieurs expériences ont également été réalisées dans une eau usée municipale (STEP de Rolla, Missouri, US). Basés sur les résultats expérimentaux, en 1 heure de traitement et à 25 ± 1 °C, un enlèvement complet des 4 estrogènes étudiés (concentrations initiales de l'ordre du ng/L) de l'eau usée a été atteint avec 10 U/mL de HRP à pH 8.0 et avec 20 U/mL de laccase à pH 7.0. De plus, les tests ont aussi montré que l'enzyme HRP a été fortement affectée par les constituants présents dans l'eau usée. Par contre, l'enzyme laccase ne semblait pas être affectée par ces constituants.

Dans un traitement enzymatique, le coût associé à l'enzyme représente la plus grosse part de l'investissement. Ce coût peut être diminué par l'ajout de produits chimiques, moins chers que l'enzyme elle-même, qui peuvent améliorer l'efficacité catalytique de l'enzyme. Ainsi, des expériences ont été réalisées pour le traitement de l'eau usée par la laccase avec un apport de 1-hydroxybenzotriazole (HBT, concentration de 100 μM), en tant que médiateur, ou du glycol

polyéthylénique (PEG, concentration de 50 mg/L), comme additif protecteur. Les résultats expérimentaux ont montré que l'ajout de HBT a permis d'améliorer l'efficacité du traitement par la laccase pour l'oxydation des estrogènes étudiés. En effet, en 1 heure de traitement, à pH 7.0 et 25 ± 1 °C, l'ajout de HBT a permis de diminuer de 2–4 fois l'activité initiale en laccase nécessaire. Concernant l'ajout de PEG, bien qu'une forte concentration en PEG a été utilisée, aucune amélioration de l'efficacité du traitement enzymatique n'a pu être observée.

Le plus grand intérêt dans l'enlèvement d'EDCs estrogéniques des eaux usées porte sur l'estrogénicité résiduelle après n'importe quel procédé de traitement. Plusieurs tests ont alors été menés afin de déterminer l'activité estrogénique résiduelle après une oxydation par la HRP et la laccase d'une eau usée municipale contaminée en estrogènes (E1, E2, E3 et EE2). Les résultats obtenus par le bio essai RYA ont montré qu'après une heure de traitement enzymatique de l'eau usée municipale, l'activité estrogénique a été réduite de 97% par la laccase et 92% par la HRP, et complètement enlevée, dans les deux cas, après 8 heures de traitement.

Ce projet de recherche confirme donc que l'oxydation enzymatique (par HRP ou laccase) est un procédé de traitement efficace pour enlever les estrogènes (E1, E2, E3 et EE2), et leurs activités estrogéniques associées, des effluents des STEP's municipales. Ainsi, le rejet de ces composés fortement estrogéniques dans l'environnement aquatique pourrait être évité, ainsi que la perturbation endocrinienne des organismes aquatiques. Ce procédé de traitement pourrait donc servir comme traitement additionnel aux procédés conventionnels déjà en place dans les STEP's.

Mots clefs : estrogènes, hormones stéroïdiennes, procédé de traitement, traitement enzymatique, HRP, laccase.

ABSTRACT

The main source of natural steroid estrogens (estrone – E1, 17 β -estradiol – E2, and estriol – E3) in aquatic environment is related to human and animal excreta. The synthetic steroid 17 α -ethinylestradiol (EE2) is a component of the contraceptive pill, and therefore exclusively originated from women. As a result, important quantities of these hormones are going through municipal wastewater treatment plants (WWTPs) effluents and directly discharged via the effluent into the aquatic environment. Indeed, several toxicity studies indicate that these compounds are largely responsible for the estrogenic effects observed in aquatic organisms exposed to those discharges.

The key objective of this research was to develop a new and cost-effective treatment process for an efficient removal of natural and synthetic estrogens, as well as their associated estrogenicities, from municipal WWTPs effluents. Two processes were selected to be tested, the enzymatic oxidation of estrogens by the horseradish peroxidase (HRP) enzyme and the polyphenolic enzyme, laccase. HRP was chosen as a reference enzyme since this enzyme demonstrated being effective for phenolic compounds oxydation. Laccase was used since it could be produced at low-cost by the utilization of biosolids as growth substrate. Several laboratory experiments were performed in batch reactors to develop and optimize the enzymatic process, and also assess the efficiency of this treatment process for the oxidation of the studied estrogens (E1, E2, E3, and EE2) present in municipal wastewater.

Estrogen concentrations were determined by single-quad liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Estrogenic activity tests after enzymatic treatment were carried out by the recombinant yeast assay (RYA).

The experiments performed in synthetic water showed that the optimum pH for each estrogen removal was around 6 using laccase and 7 using HRP. HRP allowed to achieve relatively high removals over a large pH range (6–8), corresponding to pH values found in municipal WWTPs. In opposite, laccase seemed to be strongly pH-dependent.

HRP requires the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂) to be activated to oxidize the phenolic compounds, such as estrogens. In synthetic water and at initial $\mu\text{g/L}$ concentration of estrogens,

the optimal molar peroxide-to-substrate ratio at pH 7.0 and 25 ± 1 °C corresponded approximately to the theoretical molar stoichiometry ratio of 0.5.

The kinetic study was performed in order to determine the affinity of both enzymes (HRP and laccase) towards each studied estrogen (E1, E2, E3, and EE2), and to assess their catalytic efficiency, showed that the oxidation by HRP and laccase exhibited a pseudo-first-order dependence on the steroid estrogen concentration and followed Michaelis-Menten kinetics in the substrate concentration ranged studied. The experiments were conducted in synthetic water at pH 7.0 and 25 ± 1 °C at initial $\mu\text{g/L}$ concentration of estrogens. Furthermore, based on Michaelis-Menten kinetics, the experimental results showed that both enzymes present the same affinity for the studied estrogens under the experimental conditions. K_M values between $1.32\text{--}7.47\ \mu\text{M}$ were reported for HRP- and laccase-catalyzed systems. Moreover, values of k_{cat}/K_M ratio showed that the HRP-catalyzed process seemed to be more efficient than the laccase-catalyzed process for the removal of the studied estrogens removal from synthetic water.

Several experiments were also performed with a municipal wastewater (Rolla's WWTP, Missouri, US). Based on the experimental results, within 1-hour treatment and at 25 ± 1 °C a complete removal of the studied estrogens (at initial ng/L concentration) from wastewater was achieved by 10-U/mL HRP at pH 8.0 and by 20-U/mL laccase at pH 7.0. The tests showed as well that HRP was strongly affected by wastewater compounds, although laccase did not seem to be affected.

In enzymatic treatment the associated cost to the enzyme corresponds to the most important investment part of the process. The cost can be decreased by the addition of less expensive chemicals addition, which may improve the enzyme catalytic efficiency. Thus, several experiments were carried out in wastewater with laccase and an addition of 1-hydroxybenzotriazole (HBT, $100\ \mu\text{M}$), as a mediator, or polyethylene glycol (PEG, $50\ \text{mg/L}$) as protective additive. The experimental results showed that HBT addition allowed the improvement of the laccase-catalyzed process efficiency for the estrogens oxidation. Indeed, within 1-hour treatment at pH 7.0 and 25 ± 1 °C HBT addition reduced 2–4 times the required initial laccase activity. However, with PEG addition, even if high PEG concentrations were used, no improvement could be observed.

The main objective during the EDCs removal from wastewater should be the removal of their estrogenicity downstream from wastewater treatment processes. Thus, several tests were performed in order to determine the residual estrogenic activity after HRP- and laccase-catalyzed oxidation of municipal wastewater contaminated by estrogens (E1, E2, E3, and EE2). The RYA results showed that after 1-hour enzymatic treatment the estrogenic activity of the municipal wastewater was reduced by 97% with laccase-catalyzed process and 92% with HRP-catalyzed system, and completely removed, with both systems, after 8-hours treatment.

This research project proves that the enzymatic oxidation (by HRP or laccase) is an effective treatment process of estrogens (E1, E2, E3, and EE2) removal, and their associated estrogenic activities, from municipal WWTPs effluents. The release of these compounds strongly estrogenic in the aquatic environment could be, thus, avoided, as well as the endocrine perturbation of aquatic organisms and so, this treatment process could be implanted as an additional treatment process to the conventional WWTPs for estrogens removal.

Keywords: estrogens, steroid hormones, treatment process, enzymatic treatment, HRP, laccase.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
1 REVUE DE LITTÉRATURE	7
1.1 Introduction	7
1.1.1 Fonctionnement du système endocrinien	9
1.1.2 Mode d'action	11
1.1.3 Types de substances qui perturbent les systèmes endocriniens	13
1.1.4 Conséquences potentielles de l'impact des perturbateurs endocriniens sur les êtres vivants	20
1.1.5 Directives, normes et règlements	24
1.2 Méthodes d'analyse	26
1.2.1 Méthodes d'analyse chimiques	26
1.2.2 Bio essais	38
1.3 Hormones naturelles et synthétiques	44
1.3.1 Propriétés physico-chimiques	44
1.3.2 Entrée dans l'environnement	49
1.3.3 Sécrétion des hormones naturelles et synthétiques	59
1.4 Traitements des stations d'épuration	69
1.4.1 Traitements conventionnels	70
1.4.1.1 Traitements physiques	72
1.4.1.2 Traitements chimiques	77
1.4.1.3 Traitements biologiques	78
1.4.2 Traitements dits avancés	94
1.4.2.1 Procédé de chloration	94
1.4.2.2 Procédé d'ozonation et les procédés d'oxydation dits avancés (AOPs)	97
1.4.2.3 Réactions de photolyse	100
1.4.2.4 Traitement à l'oxyde de manganèse	103
1.4.3 Traitements enzymatiques	103
CHAPITRE II	
2 HYPOTHÈSES DE RECHERCHE, OBJECTIFS SPÉCIFIQUES ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE	117
2.1 Hypothèses de recherche	117
2.2 Objectifs spécifiques de recherche	118
2.3 Démarche expérimentale	118
2.3.1 Analyse chimique au LC-MS	119
2.3.2 Optimisation des conditions pour le traitement enzymatique	119

2.3.3	Étude cinétique.....	122
2.3.4	Traitement d'une eau usée municipale.....	122
2.3.5	Bio essais pour l'évaluation de l'estrogénicité.....	127
2.3.5.1	Plasmides et souches de levure	127
2.3.5.2	Test de l'activité estrogénique.....	128

CHAPITRE III

3	QUANTIFICATION OF STEROID SEX HORMONES USING SOLID -PHASE EXTRACTION FOLLOWED BY LIQUID CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY	131
3.1	Résumé.....	133
3.2	Abstract	134
3.3	Introduction	135
3.4	Methodology	137
3.4.1	Chemicals and Reagents.....	137
3.4.2	Standard Samples	138
3.4.3	Site Description.....	138
3.4.4	Sample Collection	138
3.4.5	Steroid Hormones Extraction and Cleanup	139
3.4.6	Chromatographic and Analysis Conditions: Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectroscopy	139
3.5	Results and Discussion.....	140
3.5.1	Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectroscopy Analysis Method.....	140
3.5.2	Environmental Monitoring.....	142
3.5.2.1	Steroid Hormones Profile.....	142
3.5.2.2	Steroid Hormones Removal	143
3.6	Conclusions	143
3.7	Credits	144
3.8	References	145

CHAPITRE IV

4	NATURAL AND SYNTHETIC HORMONES REMOVAL USING HORSERADISH PEROXIDASE ENZYME: TEMPERATURE AND PH INFLUENCE.....	163
4.1	Résumé.....	165
4.2	Abstract	166
4.3	Introduction	167
4.4	Experimental section	168
4.4.1	Chemicals.....	168
4.4.2	Enzyme assay	169
4.4.3	Estrogens analysis	169

4.4.4	Experimental protocol.....	170
4.5	Results and discussion.....	171
4.5.1	HRP initial activity determination.....	171
4.5.2	pH influence.....	171
4.5.3	Temperature influence.....	171
4.5.4	Kinetic study	172
4.5.5	Enzymatic treatment in Milli-Q water and wastewater from activated sludge.....	172
4.5.6	Estrogens at environmental concentrations	173
4.6	Conclusions	174
4.7	Acknowledgments.....	174
4.8	References	175

CHAPITRE V

5	OXIDATION OF NATURAL AND SYNTHETIC HORMONES BY THE HORSERADISH PEROXIDASE ENZYME IN A WASTEWATER.....	189
5.1	Résumé.....	191
5.2	Abstract.....	192
5.3	Introduction	193
5.4	Experimental	194
5.4.1	Chemicals.....	194
5.4.2	Methodology	194
5.4.3	Experimental protocol.....	195
5.4.3.1	Experiments conducted with synthetic water	195
5.4.3.2	Experiments conducted with wastewater samples.....	196
5.4.4	Estrogen analysis.....	197
5.4.4.1	Experiments conducted with synthetic water	197
5.4.4.2	Experiments conducted with wastewater samples.....	197
5.5	Results and Discussion.....	198
5.5.1	Experiments conducted with synthetic water	198
5.5.1.1	Initial HRP activity influence.....	198
5.5.1.2	[H ₂ O ₂] influence	198
5.5.1.3	Kinetic study	200
5.5.2	Experiments conducted with wastewater samples.....	201
5.5.2.1	Municipal wastewater treatment	201
5.5.2.2	H ₂ O ₂ dose influence	202
5.5.2.3	Wastewater matrix influence.....	202
5.6	Conclusion	203
5.7	Acknowledgments.....	203

5.8	References.....	204
-----	-----------------	-----

CHAPITRE VI

6	LACCASE-CATALYZED CONVERSION OF NATURAL AND SYNTHETIC HORMONES FROM A MUNICIPAL WASTEWATER	215
6.1	Résumé.....	217
6.2	Abstract	218
6.3	Introduction	219
6.4	Experimental section	220
6.4.1	Chemicals.....	220
6.4.2	Synthetic water.....	221
6.4.3	Sampling site and collection	221
6.4.4	Enzyme assay.....	221
6.4.5	Experimental protocol.....	222
6.4.5.1	Experiments conducted with synthetic water	222
6.4.5.2	Experiments conducted with wastewater samples.....	223
6.4.6	Estrogen analysis.....	224
6.4.6.1	Experiments conducted with synthetic water	225
6.4.6.2	Experiments conducted with wastewater samples.....	225
6.5	Results and Discussion.....	225
6.5.1	Experiments conducted with synthetic water	225
6.5.1.1	pH influence	226
6.5.1.2	Kinetic study	226
6.5.2	Experiments conducted with wastewater samples.....	227
6.5.2.1	Municipal wastewater treatment	228
6.5.2.2	Performance with a mediator or a protective additive.....	229
6.6	Conclusion	230
6.7	Acknowledgments.....	230
6.8	References	231

CHAPITRE VII

7	REMOVAL OF ESTROGENIC ACTIVITY OF NATURAL AND SYNTHETIC HORMONES FROM A MUNICIPAL WASTEWATER: EFFICIENCY OF HORSERADISH PEROXIDASE AND LACCASE FROM TRAMETES VERSICOLOR	241
7.1	Résumé.....	243
7.2	Abstract	244
7.3	Introduction	245
7.4	Experimental section	246
7.4.1	Chemicals.....	246

7.4.2	Synthetic water and wastewater.	246
7.4.3	Enzyme assay.	247
7.4.4	Experimental protocol.	247
7.4.5	Estrogens analysis.	248
7.4.6	Yeast strains and plasmids.	248
7.4.7	Estrogenic activity test.	249
7.5	Results and Discussion.	250
7.5.1	Analytical results.	250
7.5.2	Estrogenicity experiments.	251
7.5.3	Kinetic study.	252
7.6	Conclusion.	253
7.7	Acknowledgments.	254
7.8	References.	255
 CHAPITRE VIII		
8	SYNTHÈSE.	269
CONCLUSIONS & RECOMMANDATIONS.		277
APPENDICE A.		281
APPENDICE B.		327
APPENDICE C.		373
BIBLIOGRAPHIE.		379

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Exemples de fonctions nécessitant des hormones pour développer les actions vitales de l'organisme (Ministère de l'écologie et du développement durable, 2003).....	11
Tableau 1.2	Sources, types et exemples de substances, connues comme des perturbateurs endocriniens potentiels, (a) hormones naturelles et synthétiques ; (b) produits chimiques	14
Tableau 1.3	Effets de l'exposition humaine/animale à des doses modérées de substances perturbatrices connues du système endocrinien	22
Tableau 1.4	« Ambient Water Quality Criteria » de l'USEPA	25
Tableau 1.5	Agents de dérivation employés pour une analyse au GC.....	28
Tableau 1.6	Principales méthodes utilisées pour l'analyse des EDCs avec extraction en phase solide (SPE)	29
Tableau 1.7	Principales méthodes utilisées pour l'analyse des EDCs avec micro-extraction en phase solide (SPME)	38
Tableau 1.8	Propriétés chimiques et physiques de E1	45
Tableau 1.9	Propriétés chimiques et physiques de β E2	46
Tableau 1.10	Propriétés chimiques et physiques de E3	47
Tableau 1.11	Propriétés chimiques et physiques de EE2	48
Tableau 1.12	Concentrations en estrogènes à l'affluent des stations de traitement des eaux usées	51
Tableau 1.13	Concentrations en estrogènes à l'effluent des stations de traitement des eaux usées	53
Tableau 1.14	Concentrations en estrogènes présents dans les rivières/eaux de surface.....	55
Tableau 1.15	Les plus basses concentrations observées (« <i>Lowest-Observed-Effect-Concentration</i> » LOEC), induisant de la VTG chez les organismes aquatiques.....	57
Tableau 1.16	Estrogènes sécrétés dans les urines de l'être humain	60
Tableau 1.17	Propriétés chimiques et physiques de α E2	63
Tableau 1.18	Concentrations (ng/L) en estrogènes dans les déchets animaux après traitement (Tiré de Sarmah et al., 2006)	63
Tableau 1.19	Estimation des concentrations en estrogènes sécrétés par des animaux domestiques	67
Tableau 1.20	Représentation des 6 principales hormones de croissance	68
Tableau 1.21	Ambiguïté sur les processus d'enlèvement des estrogènes	72
Tableau 1.22	Coefficients de partage octanol-eau (Log (K_{OW})) des principaux estrogènes et xéno-estrogènes	74
Tableau 1.23	Enlèvement des EDCs durant différents procédés de traitement de STEPs, (a) hormones naturelles et synthétiques ; (b) produits chimiques	88
Tableau 1.24	Évaluation de l'activité estrogénique durant différents procédés de traitement de STEPs municipales (compilé de Svenson et al., 2003).....	93
Tableau 1.25	Constantes de vitesse apparentes de second ordre (k_{Cl}) déterminées pour le procédé de chloration (Deborde et al., 2004)	95
Tableau 1.26	Enlèvement des EDCs durant un traitement dit avancé.....	96
Tableau 1.27	Activité estrogénique des différents produits formés lors du procédé de chloration.....	97

Tableau 1.28	Constantes de vitesse déterminées pour les procédés d'ozonation (k_{O_3}) et pour les procédés d'oxydation dit avancée (k_{OH})	98
Tableau 1.29	Sous-produits formés pendant l'ozonation de β E2 et déterminés par LC-MS (tiré de Irmak et al., 2005)	100
Tableau 1.30	Constantes de vitesse de pseudo premier ordre déterminées (eau purifiée) pour les procédés de photolyse par UV (k_{UV}) et de photocatalyse au TiO_2 (k_{TiO_2})	101
Tableau 1.31	Principales recherches portant sur l'oxydation enzymatique de composés phénoliques	104
Tableau 1.32	Oxydation enzymatique de divers EDCs aromatiques par POD	107
Tableau 1.33	Oxydation enzymatique de divers EDCs aromatiques par PPO	109
Tableau 1.34	Réduction de l'activité estrogénique associée à divers EDCs aromatiques par oxydation enzymatique	111
Tableau 2.1	Caractéristiques (moyennes) de l'eau usée municipale étudiée, après filtration	124
Table 3.1	Lowest observed effective concentrations (LOEC) inducing VTG in aquatic organisms	151
Table 3.2	LC-MS detection limits reported in the literature	152
Table 3.3	LC-MS conditions used for analysis of estrogens and internal standards	153
Table 3.4	Recovery and detection limits of estrogens obtained with ZAN as an internal standard	154
Table 3.5	Recovery and detection limits of estrogens obtained with β E2-d4 as an internal standard	155
Table 3.6	Analytical data (ng/l) corresponding to the analysis of target compounds in STP influent, effluent, and river water during the sampling period from September 2004 to March 2005	156
Table 3.7	Reported analytical data (ng/l) corresponding to the analysis of target compounds in STP influent, effluent, and river water in the literature	157
Table 4.1	Physico-chemical properties of main natural and synthetic estrogens	179
Table 5.1	Characteristics of filtered municipal wastewater used in the study	212
Table 5.2	Experimental kinetics determination for the HRP-catalyzed reaction of each studied steroid estrogen at pH 7.0 and 25 ± 1 °C	213
Table 6.1	Characteristics of filtered municipal wastewater used in the study	234
Table 6.2	Experimental kinetics determination for the laccase-catalyzed reaction of each studied steroid estrogen at pH 7.0 and 25 ± 1 °C	235
Table 6.3	Chemical concentrations reported as inhibiting the laccase-catalyzed conversion of BPA (Adapted from Kim and Nicell, 2006a)	236
Table 6.4	The effect of HBT or PEG presence on steroid estrogens conversion (%) in wastewater matrix	237
Table 7.1	Characteristics of filtered municipal wastewater used in the study	262
Table 7.2	Estrogenic activity removal by enzymatic treatment of aqueous estrogens	263
Table 7.3	Main parameters of the kinetic experiments	264
Table 7.4	Experimental kinetics determination for both enzyme-catalyzed reaction of each studied steroid estrogen at pH 7.0 and 25 ± 1 °C	265
Tableau 8.1	Coûts associés au traitement enzymatique d'une eau usée municipale contaminée par E1, β E2, E3 et EE2	275

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Le système endocrinien de l'Homme.....	10
Figure 1.2	Mode d'action d'un perturbateur endocrinien.....	12
Figure 1.3	Potentiels estrogéniques relatifs de quelques EDCs (compilé de Gutendorf et Westendorf, 2001)	19
Figure 1.4	Diagramme schématique illustrant le principe de l'homéostasie au niveau de la régulation endocrinienne	21
Figure 1.5	Représentation schématique du test basé sur la force de liaison d'une substance au récepteur estrogène (Snyder et al., 2003a)	41
Figure 1.6	Représentation schématique du test MVLN (Snyder et al., 2003a)	43
Figure 1.7	Les principaux produits chimiques alkylphénoliques et leur structure chimique.....	70
Figure 1.8	Biodégradation et sorption du β E2 et de E1	82
Figure 1.9	Structure du diphenol A (C15H16O2, 2,2-bis(4-hydroxyphényl)propane).....	84
Figure 1.10	Cycle catalytique simplifié de la HRP, indiquant les principales réactions intervenant lors de l'oxydation d'un composé aromatique (le phénol dans ce cas)	105
Figure 1.11	Procédé d'oxydation du substrat organique par peroxydase de manganèse	106
Figure 1.12	Inactivation de l'enzyme HRP par H ₂ O ₂ , pouvant se produire durant un cycle catalytique (composé aromatique considéré : le phénol). HRPiii est momentanément sous la forme inactivée	113
Figure 1.13	Cycle catalytique simplifié du système laccase-médiateur (Burton, 2003).....	115
Figure 2.1	Représentation schématique de la STEP municipale de Rolla (Missouri, US)	123
Figure 3.1	Fate of natural and synthetic estrogens in the environment	158
Figure 3.2	Chemical structures and acronyms of the target compound	159
Figure 3.3	Flow scheme of the municipal wastewater treatment process with sampling location ⊗	160
Figure 3.4	LC-MS chromatograph of a mixed solution of 100 ng/L of E1, β E2, α E2, EE2, and E3, in (a) distilled deionized water and (b) wastewater	161
Figure 3.5	Estrogen concentrations in river water from September 2004 to March 2005. Error bars represent the standard deviation. For September 2004, no data was collected for α E2 concentration	162
Figure 4.1	Relative estrogenic activity of some EDCs obtained by a proliferation assay with MCF7-cells (E-Screen) (compiled from Gutendorf and Westendorf, 2001).....	180
Figure 4.2	HRP-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a function of pH at 25±1 °C for pH 4.5–9.5. Error bars represent the standard deviation	181
Figure 4.3	HRP-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a function of pH at 25±1 °C for pH 5–9.....	182
Figure 4.4	HRP-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a function of temperature at pH 7.0 and temperature of 5–35 °C. Error bars represent the standard deviation.....	183
Figure 4.5	HRP-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a function of temperature at pH 7.0 and temperature of 5–35 °C	184
Figure 4.6	Initial reaction velocity as a function of pH at 25±1 °C. Error bars represent the standard deviation.....	185

Figure 4.7	Initial reaction velocity as a function of temperature at pH 7.0. Error bars represent the standard deviation	186
Figure 4.8	HRP-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a mixed solution in Milli-Q water at pH 8.0 and at 25 °C	187
Figure 4.9	Initial HRP activity required to completely oxidize a mixture of E1, E2, E3, and EE2 in synthetic water and wastewater sample at pH 8.0 and at 25 °C	188
Figure 5.1	Schematic illustration of the batch reactor and experimental set-up	207
Figure 5.2	Initial HRP activity required for a complete removal of each studied steroid estrogen from synthetic water. Experimental conditions: 25±1 °C, pH 7.0, 400 nM estrogen, molar peroxide-to-substrate ratio of 2.0	208
Figure 5.3	Effect of hydrogen peroxide on the oxidation by HRP of each steroid estrogen in synthetic water. Experimental conditions: 25±1 °C, pH 7.0, 400 nM estrogen.	209
Figure 5.4	Steroid estrogens removed from synthetic water (A) and from municipal wastewater (B) as a function of initial HRP activity in 1-h batch treatment. Experimental conditions: 25±1 °C, pH 8.0, 0.4 nM estrogen, molar peroxide-to-substrate ratio of 0.5	210
Figure 5.5	Steroid estrogens removed from municipal wastewater as a function of the hydrogen peroxide concentration in 1-h batch treatment with an initial HRP activity of 5 U ml ⁻¹	211
Figure 6.1	Laccase-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a function of pH at 25±1 °C for pH 4–9. Error bars represent the standard deviation, if no error bars are represented thus the standard deviation was null. Reaction conditions: initial laccase activity of 0.8 U/ml, 1-h reaction time.....	238
Figure 6.2	Linear plot used in determining the catalytic parameters VMAX and KM of the laccase-catalyzed system of EE2 at pH 7.0 and 25±1 °C (Initial laccase activity of 0.8 U/ml)	239
Figure 6.3	Initial laccase activity required to completely oxidize a mixture of E1, E2, E3, and EE2 in synthetic water and wastewater at pH 7.0 and at 25±1 °C. 50% of experiments were replicated and error bars represent the average RSD of the replicated experiments	240
Figure 7.1	Decrease in estrogen concentration by laccase-catalyzed process. Solid symbols correspond to synthetic water treatment, and open symbols to wastewater treatment. Reaction conditions: pH 7.0, 25±1 °C, initial estrogen concentration of 0.4 nM, reaction time of 1 h	259
Figure 7.2	Decrease in estrogen concentration by HRP-catalyzed process. Solid symbols correspond to synthetic water treatment, and open symbols to wastewater treatment. Reaction conditions: pH 8.0, 25±1 °C, initial estrogen concentration of 0.4 nM, molar peroxide-to-substrate ratio of 0.5, reaction time of 1 h	260
Figure 7.3	Residual estrogenic activity (%) after laccase (diamonds) and HRP (circles) treatment of synthetic water (open symbols) and wastewater (solid symbols). Bars represent 95% confidence limits. Reaction conditions for laccase-catalyzed system: pH 7.0, 25±1°C, initial estrogen concentration of 0.4 nM, initial laccase activity of 20 U ml ⁻¹ . Reaction conditions for HRP-catalyzed system: pH 8.0, 25±1 °C, initial estrogen concentration of 0.4 nM, molar peroxide-to-substrate ratio of 0.5, initial HRP activity of 0.032 U ml ⁻¹ in synthetic water and 10 U ml ⁻¹ in wastewater samples.....	261

ABBREVIATIONS

β E2 : 17 β -estradiol

α E2 : 17 α -estradiol

β E2-d4 : 17 β -estradiol-2,4,16,16-d4

2,3,7,8-TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

4-n-NP : 4-n-nonylphénol

4-NP : 4-nonylphénol

4-t-OP : 4-tert-octylphénol

AAP : 4-aminoantipyrine

Abs : Anticorps

ABTS : 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

Ags : Antigène

AOP : Procédé d'oxydation dit avancé

AP : Phosphatase alcaline

AP: Alkylphénol

APEO : Alkylphénol éthoxylé

ARN : Acide ribonucléique

AS : Boue activée

BNR : Enlèvement biologique des nutriments

BPA : Diphénol A

BPC : Biphényle polychloré

BPR : Enlèvement biologique du phosphore

BSTFA : N,O-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide

CAS : « *Chemical Abstracts Service* »

CCE : Commission des Communautés Européennes

CEE : Communauté Européenne Économique

CNP : Carbone, azote et phosphore

COT : Carbone organique total

CPO : Chloroperoxidase

CSQVSP : Comité Scientifique des Questions Vétérinaires en rapport avec la Santé Publique

CSTEE : Comité Scientifique de la Toxicité, de l'Écotoxicité et de l'Environnement

DAD : Détection avec un réseau de diodes

DBO : Demande biologique en oxygène

DBO₅ : Demande biochimique en oxygène en 5 jours

DBT : Dibutyltin

DCO : Demande chimique en oxygène

DDE : Dichlorodiphényléthylène

DDT : Dichlorodiphényltrichloréthane

DEPA : Agence pour la Protection de l'Environnement du Danemark

DES : Diéthylstilbestrol

DI : Eau distillée et déminéralisée

DTE : Dithioerytrol

E1 : Estrone

E1-3S : Estrone-3-sulfate

E2 : 17β-estradiol

E3 : Estriol

EC50 : Concentration effective médiane

EDC : Perturbateur endocrinien

EE2 : 17 α -éthynylestradiol

ELISA : « *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* »

ER-CALUX : « *Chemical-Activated LUCiferase gene eXpression cell bioassay system* »

E-Screen-assay : Prolifération de cellules

ESI : Électronébulisation

FAO : « *Food and Agricultural Organisation* »

FDA : « *US Food and Drug Administration* »

FIIA : « *Flow-injection immunoassay* »

FQPA : « *Food Quality Protection Act* »

GAC : Charbon actif granulé

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse

H₂O₂ : Dioxyde d'hydrogène

HAP : Hydrocarbure aromatique polycyclique

HBT : 1-hydroxybenzotriazole

Hc : Potentiel de volatilisation

hER : Récepteur humain estrogène

Hg : Mercure

HO $\cdot$: Radical hydroxyle

HPLC : Chromatographie liquide à haute pression

HRGC-MS : Chromatographie en phase gazeuse à haute résolution- spectrométrie de masse

HRP : Peroxydase de raifort

IUPAC : « *International Union of Pure and Applied Chemistry* »

JEA : Agence Environnementale du Japon

JECFA : « *Expert Committee on Food Additives* »

Koc : Coefficient de partage organique carbone-eau

Kow : Coefficient de partage octanol-eau

LC-MS : Chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse

LCPE : Loi Canadienne sur la Protection de l'Environnement

LiP : Peroxidase de lignine

LLE : Extraction en phase liquide-liquide

LOD : Limite de détection

LOEC : « *Lowest-Observed-Effect-Concentration* »

LOQ : Limite de quantification

LPO : Lactoperoxidase

LSIP : Liste des substances d'intérêt prioritaire

MBT : Monobutyltin

MCL : Limite maximale critique de contamination

MF : Microfiltration

MGA : Acétate de mélangestrol

MIEX : Résine magnétique à échange d'ions

MLIT : Ministère des Terres, de l'Infrastructure et du Transport du Japon

MnO₂ : Oxyde de manganèse

MnP : Peroxydase de manganèse

MON : Matière organique naturelle

MS : Spectrométrie de masse

MSTFA : N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide

MTBSTFA : N-(tert-butyldiméthylsilyl)-N-méthyltrifluoroacétamide

NAS : Boues activées nitrifiées

NF : Nanofiltration

NH2 : Aminopropyl

NP : Nonylphénol

NP1EC : Acide nonylphénoxyacétique

NP1EO : Nonylphénol monoéthoxylé

NPEO : Nonylphénol éthoxylé

O₃ : Ozone

OD : Densité optique

OP : Octylphénol

OPEO : Octylphénol éthoxylé

PAC : Charbon actif en poudre

PCDD : Dibenzoparadioxine polychlorée

PCDF : Dibenzofurane polychloré

PCP : Pentachlorophénol

PEG : Glycol polyéthylénique

pKa : Log de la constante d'acidité

PNEC : « *Predicted-No-Effect-Concentration* »

POD : Enzyme peroxydase

PPCP : Produit personnel de soin et pharmaceutique

PPO : Enzyme oxydase polyphénolique

PTFE : Polytétrafluoroéthylène

RIA : Radioimmuno essai

RO : Osmose inverse

RSD : Écart-type relatif

RYA : Bio essai aux levures recombinantes

SA : Acide syringique

SBP: Peroxydase de soja

SDWA : « *Amendments to the Safe Drinking Water Act* »

SPBT : Substances persistantes, bioaccumulables et toxiques

SPE : Extraction en phase solide

SPME : Micro-extraction en phase solide

STEP : Station de traitement des eaux usées

TbA : Acétate de trenbolone

TBDMCS : Tert-butyldiméthylchlorosilane

TBT : Tributylétain

TCDD : Tétrachlorodibenzo-*p*-dioxin

TEMPO : 2,2,6,6-tétraméthoxypiperidine 1-oxyl

TEQ : EQuivalence Toxique

TiO₂ : Bioxyde de titane

TMCS : Triméthylchlorosilane

TMSI : Triméthylsilylimidazole

TPhT : Triphénylétain

TRH : Temps de rétention hydraulique

TRS : Âge de boue

TSS : Solides totaux en suspension

U : Unité d'activité enzymatique

UF : Ultrafiltration

USEPA : Agence pour la Protection de l'Environnement des États-Unis

UV : Ultraviolet

VTG : Vitellogénine

WHO : Organisation mondiale sur la santé

WWTP : « *Wastewater treatment plant* »

YES : « *Yeast Estrogen Screen* » - Expression du gène rapporteur

ZAN : Zearalanone (2,4-dihydroxy-6-[10-hydroxy-6-oxoundecyl]benzoic acid l-lactone)

τ : Temps de réaction

GLOSSAIRE

Agent tensioactif : Composé chimique qui, introduit dans un liquide, en abaisse la tension superficielle, ce qui a pour effet d'en augmenter les propriétés mouillantes.

Androgène : Qualifie une substance hormonale (naturelle ou synthétique) ayant une action masculinisante sur la croissance et le développement du système reproductif.

Anthropique : Se dit des produits qui sont fabriqués par l'Homme.

Bioaccumulable : Se dit d'une substance qui peut s'accumuler dans les organismes vivants, indépendamment du fait qu'elle ait un rôle métabolique ou qu'elle soit nocive à ces organismes.

Concentration effective (EC50) : concentration dans l'eau à laquelle on observe un effet négatif de la substance sur 50% des organismes tests, comparativement aux points limites biologiques tels que la croissance ou la reproduction.

Conjugaison : Délocalisation d'électron de type p, par exemple dans une séquence de liaisons simples et multiples alternées.

Endogène : Qui prend naissance ou se développe à l'intérieur d'un organisme.

Estrogène conjugué : Composé d'estrogènes, principalement d'estrone et d'équiline, extraits exclusivement de sources naturelles. Les estrogènes conjugués sont employés pour soulager les symptômes ménopausiques et traiter l'hypogonadisme ou les hémorragies vaginales imputables à un déséquilibre hormonal.

Estrogène naturel : Hormone, sécrétée par l'ovaire, présente naturellement dans l'organisme.

Estrogène synthétique : Substance dont la structure chimique est, soit dérivée de celle des estrogènes naturels, soit semblable à celle-ci.

Estrogène : Famille d'hormones femelles produites par les ovaires chez la femme et par les corticosurrénales dans les deux sexes.

Forme conjuguée : Réactif formé par liaison covalente entre 2 molécules.

Homéostasie : Tendance de l'organisme à maintenir ses différentes constantes (température, tension artérielle, débit sanguin, etc.) à des valeurs ne s'écartant pas de la normale.

Hormone libre : Non liée à la protéine de transport et donc potentiellement active.

Hormone stéroïdienne : Hormones liposolubles synthétisées à partir du cholestérol et intervenant dans des domaines variés (hormones sexuelles, hormones glucocorticoïdes, hormones minéralocorticoïdes).

Hormone : Médiateur chimique (protéine, stéroïde, dérivés aminés...) sécrété par une cellule dite « endocrine », puis déversé dans la circulation et agissant à distance sur une cellule cible présentant un récepteur spécifique.

Sorption : Prise et rétention d'une substance (le sorbé) en surface (adsorption) et à l'intérieur (absorption) d'une autre substance (le sorbant).

Tensioactif : Molécule naturelle ou synthétique ayant une double polarité (hydrophile -lipophile) et des propriétés mouillantes, émulsionnantes, détergentes, dispersantes, antiseptiques, moussantes.

Transférer : Infecter à l'aide d'un vecteur d'agent infectant.

Xénobiotique : Se dit d'une substance étrangère à l'organisme vivant.

Xéno-estrogène : Composé chimique qui imite l'effet estrogénique dans l'organisme. Ces composés sont trouvés dans les détergents, les plastiques et les pesticides.

INTRODUCTION

La liste des perturbateurs endocriniens (EDCs) provenant des activités humaines rencontrés dans les eaux usées est très longue (Council, 1999 ; Schäfer et Waite 2002 ; Lucier, 1997 ; Stahlschmidt-Allner et *al.*, 1997 ; Crisp et *al.*, 1998 ; Arcand-Hoy et *al.*, 1998 ; USEPA, 1997 ; Keith, 1998). En effet, beaucoup de substances chimiques montrent une activité estrogénique et sont suspectées de causer des effets nuisibles chez l'Homme et/ou les organismes environnementaux (Tyler et Routledge, 1998). Cependant, les hormones stéroïdiennes naturelles (estrone – E1, 17 β -estradiol – β E2, estriol – E3) et synthétiques (17 α -éthinyloestradiol – EE2) sont les EDCs qui contribuent le plus à l'activité estrogénique observée dans les effluents domestiques (Desbrow et *al.*, 1998; Rodgers-Gray et *al.*, 2000 ; Aerni et *al.*, 2004) et les eaux réceptrices (Ternes et *al.*, 1999a ; Belfroid et *al.*, 1999). Par exemple, les alkylphénols exhibent généralement une activité estrogénique plus faible que les hormones stéroïdiennes, même si leur concentration dans les eaux est normalement plus élevée (Jobling et Sumpter, 1993 ; Harries et *al.*, 1997 ; Spengler et *al.*, 2001 ; Nakada et *al.*, 2004). Par ailleurs, récemment il a été démontré que les estrogènes sécrétés par les humains, via les systèmes d'eaux usées, sont les principaux composés causant la féminisation des poissons (DEPA, 2003).

La perturbation endocrinienne des organismes aquatiques a été à plusieurs reprises démontrée et donc le risque potentiel pour la santé humaine lié à l'exposition environnementale d'estrogènes exige une meilleure compréhension des sources et du devenir des estrogènes dans l'environnement (Hanselman et *al.*, 2003) ainsi que le développement de procédés performants de traitement des déchets afin de réduire la décharge des estrogènes dans l'environnement. La source la plus susceptible des estrogènes dans l'environnement aquatique est la décharge des effluents municipaux (Jürgens et *al.*, 2002). Par conséquent, il est nécessaire de se concentrer sur l'enlèvement des hormones stéroïdiennes naturelles et synthétiques par les stations de traitement des eaux usées (STEP) municipales (Rudder et *al.*, 2004).

Les systèmes conventionnels ne sont généralement pas conçus pour un enlèvement efficace des estrogènes et ne permettent pas d'obtenir des concentrations à l'effluent inférieures aux LOECs (« Lowest-Observed-Effect-Concentration »). Il est généralement observé qu'un traitement

primaire seul ne permet pas, ou très peu, un enlèvement des estrogènes des eaux usées, tandis qu'un traitement secondaire à boue activée peut réduire de manière significative les quantités en estrogènes. En effet, il s'avère que le β E2 et le E3 sont enlevés efficacement dans les systèmes à boues activées, alors que l'enlèvement de E1 est plus faible et variable, et que le EE2 est le composé le plus persistant à la biodégradation. Cependant, l'enlèvement atteint avec les systèmes conventionnels de traitement ne permet pas de respecter les limites induisant des effets estrogéniques chez les organismes aquatiques. Quant aux procédés dits avancés, ils permettent d'obtenir un très bon enlèvement des estrogènes. Cependant, peu de données existent sur l'efficacité de ces traitements et la plupart des études ont employé des eaux synthétiques contenant des concentrations en estrogènes largement supérieures aux concentrations environnementales. De plus, la majorité de ces traitements produisent des sous-produits, dont leur activité estrogénique est soit inconnue ou soit plus élevée que l'activité du composé mère (Hu et *al.*, 2003 ; Moriyama et *al.*, 2004). Depuis quelques années, les procédés de traitement basé sur les actions catalytiques des enzymes ont montré leur grande efficacité pour l'enlèvement de composés récalcitrants aromatiques, tels que les phénols, les alkylphénols, le diphénol A (BPA), les estrogènes. Ces procédés catalytiques présentent plusieurs avantages par rapport aux procédés conventionnels et aux procédés dits avancés, qui sont généralement coûteux, qui demandent beaucoup de temps, et qui peuvent produire des résidus toxiques (Nicell, 2003). Les enzymes peroxydases (POD) et les oxydases polyphénoliques (PPO) ont été largement étudiées pour le traitement des phénols, alkylphénols et BPA, par contre concernant l'oxydation enzymatique des estrogènes, seulement deux études (Suzuki et *al.*, 2003; Tamagawa et *al.*, 2006) existent. Ces études montrent que les enzymes peroxydase de manganèse (MnP) et laccase peuvent permettre un bon enlèvement de E1, β E2 et EE2, et de leurs activités estrogéniques associées. Cependant, les concentrations en estrogènes dans ces études sont 10^6 fois supérieures aux concentrations environnementales, et le traitement enzymatique a été testé dans de l'eau pure. De plus, l'utilisation de l'enzyme MnP n'est pas applicable dans les systèmes de traitement des eaux usées, puisque cette enzyme requière des concentrations élevées en Mn(III), inusuelles dans les STEP's municipales. Ainsi, des recherches plus approfondies sur le traitement enzymatique des estrogènes s'avèrent indispensable.

L'objectif général de cette recherche est de développer un procédé de traitement pour enlever efficacement les estrogènes des effluents des STEP's municipales. Cette thèse de doctorat, qui a

été conçue sous la forme d'une thèse par articles, est tout d'abord constituée d'une revue de littérature, présentant les problématiques générales et spécifiques, qui sont à l'origine des études réalisées et du choix des composés et du traitement étudiés. Les hypothèses, les objectifs spécifiques de recherche ainsi que la démarche expérimentale sont présentés au second chapitre. Les chapitres 3 à 7 regroupent les quatre articles scientifiques issus de ces travaux de doctorat. Le huitième chapitre présente une synthèse de cette recherche sous forme d'une discussion générale. Enfin, le dernier chapitre est consacré aux principales conclusions et recommandations issues de ce projet de recherche.

CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE

Une partie de cette revue a été utilisée pour rédiger deux articles publiés à *Process Biochemistry* (Appendice A) et *Revue des Sciences de l'Eau* (Appendice B)

CHAPITRE I

1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Introduction

Les systèmes endocriniens jouent un rôle essentiel dans la régulation à court et long terme des procédés métaboliques, tels que les procédés nutritionnels, reproductifs et comportementaux (Ministère de l'écologie et du développement durable, 2003). Une perturbation de n'importe quel de ces systèmes, entraînant une sécrétion d'hormones sur ou sous actives, provoque inévitablement des effets néfastes sur différents organes et fonctions de l'organisme. Cependant, le fait que les êtres vivants soient exposés à certains produits chimiques ne signifie pas obligatoirement qu'une perturbation endocrinienne aura lieu, car les effets d'un perturbateur endocrinien (EDC) dépendent du niveau et de la durée d'exposition ainsi que du moment de l'exposition (WHO, 2002).

La perturbation endocrinienne est donc un mécanisme qui influe sur le fonctionnement du système endocrinien des êtres humains et des animaux (CCE, 2001). En effet, des chercheurs ont récemment découvert un éventail de perturbations des systèmes endocriniens chez les poissons et dans la faune de plusieurs régions du monde (Environnement Canada, 1999). De plus, il est admis que l'effet perturbateur de certains produits chimiques sur le système endocrinien des poissons, des grenouilles et de certains mammifères (rats, etc.) peuvent alors par analogie affecter les êtres humains (Filali-Meknassi et *al.*, 2004). Cependant, bien que certains effets des EDCs sur la santé humaine aient été observés depuis assez longtemps, tel que la baisse de la fertilité masculine dans certaines régions agricoles, ce sont plutôt des résultats concernant la productivité des écosystèmes et des anomalies de la reproduction, spécialement chez les moules et les poissons, qui ont mis à jour le problème relatif à l'exposition des êtres vivants à des EDCs. De ce fait, l'action de certains produits chimiques sur le système endocrinien est devenue un important sujet d'actualité.

De nos jours, les scientifiques pensent que les systèmes endocriniens peuvent être affectés par une variété de substances et ont montré qu'il existe une relation entre la présence des substances estrogène-actives et les dysfonctionnements du système de différenciation sexuelle (Filali-

Meknassi et *al.*, 2004). En 1996, la Commission Européenne a défini cette classe de composés comme « des substances exogènes, par interaction avec le système hormonal, qui peuvent causer des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact ou sur celle de sa progéniture, avec pour conséquence des changements de la fonction endocrinienne » (Fawell et *al.*, 2001). Par ailleurs, l'agence de la protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) a proposé une définition plus détaillée d'un EDC : « un perturbateur endocrinien est un agent exogène, qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles présentes dans l'organisme, qui sont responsables de la maintenance de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et/ou du comportement. » (USEPA, 1997).

Ainsi, les scientifiques ont commencé à s'intéresser de plus en plus aux effets irréversibles de certains produits chimiques sur la santé de la faune et des êtres humains, comme les troubles au niveau du contrôle hormonal, de la croissance, du développement et de la reproduction (Helaleh et *al.*, 2001a,b ; USEPA, 2002). Cette préoccupation s'est basée sur :

- des observations d'anomalies de reproduction et de développement dans les populations animales, après une exposition à des niveaux modérés et élevés de polluants persistants ;
- les conséquences sur la santé d'êtres humains exposés accidentellement à des niveaux élevés de ces substances ou à des estrogènes pharmaceutiques durant leur croissance ;
- l'augmentation de défauts à la naissance des fonctions reproductrices masculines et des cancers des poumons, testicules, prostate et des glandes thyroïdiennes.

De plus, les études en laboratoire sur des animaux ont montré qu'une exposition à des polluants omniprésents et persistants même à de faibles concentrations, durant les périodes fœtale et néonatale, provoque des effets irréversibles sur les fonctions reproductrices et neurales (effets nuisibles à long terme) (Filali-Meknassi et *al.*, 2004).

Ces observations ont amené les scientifiques à faire l'hypothèse suivante : l'exposition, bien qu'à de faibles concentrations, à des produits chimiques anthropiques a dû causer des effets irréversibles sur la santé, la reproduction, l'immunité et l'intelligence de la population humaine à travers le monde industriel (Colborn et *al.*, 1993). Donc, l'analyse des EDCs dans les eaux et leur rejet dans l'environnement sont de première importance, pour les organisations environnementales, dû à la toxicité de ces composés et leur présence dans le milieu naturel

(Environnement Canada, 1999). Ainsi, plusieurs États membres de l'Europe ont lancé des programmes nationaux de recherche portant sur la perturbation endocrinienne (notamment le Danemark, la Finlande et le Royaume-Uni). D'autres États membres (la Suède, la Belgique, le Royaume-Uni, le Pays-Bas, le Danemark) ont déjà instauré des mesures spécifiques pour restreindre ou interdire l'utilisation de certaines substances suspectes en raison des effets toxiques signalés à leur égard (CCE, 2001). La gestion environnementale des EDCs est liée à la réduction des sources d'EDCs, la limitation d'exposition des populations vulnérables, et le traitement des déchets, des cours d'eau et des sites pollués (Campbell et *al.*, 2006).

Jusqu'à aujourd'hui, la plus grande partie des travaux de recherche portait sur les substances persistantes, bioaccumulables et toxiques (SPBT) (comme les dioxines, les byphéniles polychlorés [BPCs] et les pesticides organochlorés). Ces substances sont largement répandues dans l'environnement, et bien que leur fabrication et leur utilisation ont été réduites ou complètement interdites, elles se retrouvent encore chez les oiseaux, les poissons et les mammifères (Environnement Canada, 1999). De nos jours, les scientifiques s'intéressent à un certain nombre de substances qui, sans être aussi persistantes, sont répandues dans l'environnement et qui, même à des concentrations relativement faibles (de l'ordre du ng/L), peuvent agir sur la croissance, la reproduction et le développement des organismes présents dans les écosystèmes. Il s'agit de substances chimiques synthétiques ou naturelles présentes dans les effluents industriels et municipaux ainsi que dans les eaux de ruissellement agricoles (Environnement Canada, 1999).

1.1.1 Fonctionnement du système endocrinien

Les animaux pluricellulaires possèdent 2 mécanismes généraux de coordination des activités des tissus et organes à travers l'organisme : les communications nerveuse et endocrinienne. La première est sujette à un transport rapide de signaux électrochimiques à travers le réseau de cellules nerveuses et sert généralement à coordonner des événements rapides ou très proches dans le temps (de l'ordre de la minute à la seconde). La communication endocrinienne nécessite, par contre, un transfert de signaux chimiques (hormones) des cellules sécrétrices aux cellules cibles, à travers le système de circulation générale. La communication endocrinienne coordonne des événements de période de temps plus long (de l'ordre de la minute à la semaine, voire au mois) (Colborn et *al.* 1993 ; Santé Canada, 1999).

Les glandes endocriniennes (Figure 1.1), telles que la thyroïde, les gonades, l'hypophyse et les glandes surrénales, sécrètent des hormones, comme la thyroxine, l'œstrogène, la testostérone et l'adrénaline, qui agissent comme des "messagers chimiques". En se liant à des "récepteurs" cellulaires, les hormones peuvent déclencher des réactions très spécifiques et, ainsi, réguler le développement, la croissance, la reproduction et le comportement des animaux et des êtres humains (Environnement Canada, 1999). Les tissus humains présentant un récepteur œstrogène incluent le cerveau, le système d'immunité, le système cardiovasculaire, les poumons, les glandes mammaires, le foie, les reins, l'appareil génital (ovaires, testicules, utérus, prostate), les tissus adipeux et les os (Müller, 2004). Le Tableau 1.1 présente les différentes fonctions nécessitant des hormones pour développer des actions vitales pour l'organisme humain.

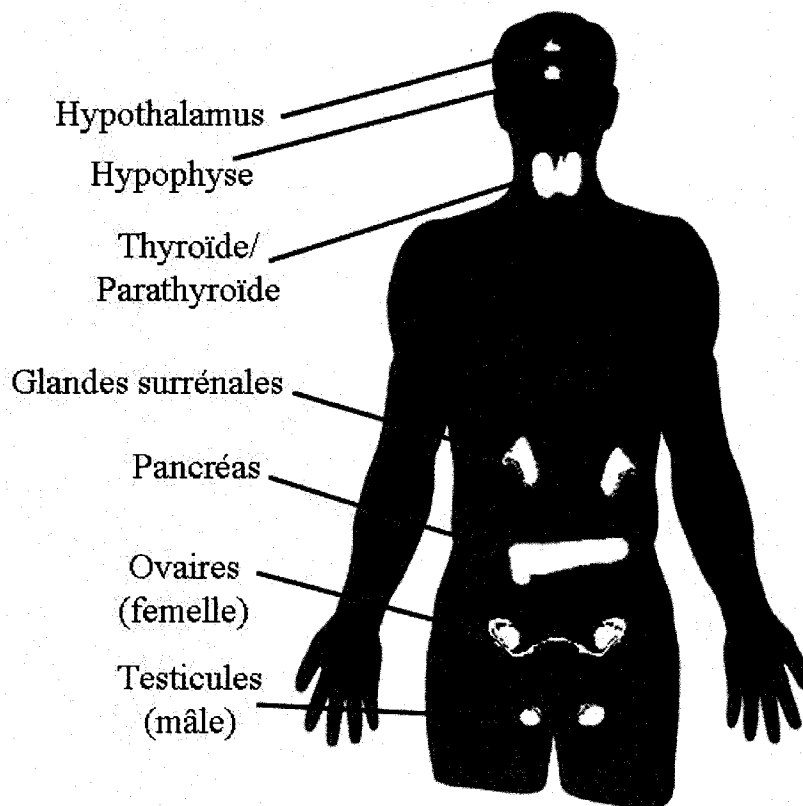


Figure 1.1 Le système endocrinien de l'Homme

Les systèmes endocriniens sont donc sujets à des mécanismes complexes, de communication interne coordonnée et régulée à travers des cellules et des récepteurs hormonaux par des messagers chimiques. Les récepteurs hormonaux lient leurs hormones-cibles avec une si grande

affinité que des fluctuations très subtiles de concentrations ont des répercussions considérables sur la réponse des cellules-cibles (Filali-Meknassi et *al.*, 2004 ; Santé Canada, 1999).

Tableau 1.1 Exemples de fonctions nécessitant des hormones pour développer les actions vitales de l'organisme (Ministère de l'écologie et du développement durable, 2003)

Fonctions	Hormones	Réponses
Reproduction	Androgènes, estrogènes, progestérone, hormones hypophysaires (LH, FSH, prolactine).	Production de gamètes, facteurs de croissance, lactation, gestation, instauration des caractéristiques secondaires et du comportement sexuel.
Croissance et développement	Hormone de croissance, hormones thyroïdiennes, insuline, glucocorticoïdes, androgènes, estrogènes, progestérone.	Large action sur la croissance
Maintien de l'environnement interne	Vasopressine, aldostérone, hormone parathyroïdienne et prostaglandine.	Contrôle du volume et de la pression. Contrôle de la balance des électrolytes. Contrôle des os, des muscles et de la graisse.
Disponibilité énergétique	Insuline, glucagon, hormones thyroïdiennes.	Régulation du métabolisme

1.1.2 Mode d'action

Les mécanismes spécifiques par lesquels des substances arrivent à perturber les systèmes endocriniens sont très complexes et pas encore complètement maîtrisés (Filali-Meknassi et *al.*, 2004). Les EDCs sont des substances exogènes altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous populations. Un perturbateur endocrinien peut interférer avec la synthèse, le stockage, la libération, la sécrétion, le transport, l'élimination ou l'action des hormones naturelles (Ministère de l'écologie et du développement durable, 2003). Il est admis que ces substances interfèrent avec le fonctionnement du système endocrinien de la façon suivante (Figure 1.2) :

- En imitant l'action de l'hormone produite naturellement, telle que l'estrogène ou la testostérone, déclenchant, ainsi, des réactions chimiques dans l'organisme ;

- En bloquant les récepteurs d'une hormone, empêchant ensuite l'action normale des hormones naturelles ;
- En perturbant la synthèse, le transport, le métabolisme et la sécrétion des hormones, altérant ainsi les concentrations des hormones naturelles dans l'organisme.

De plus, généralement un EDC ne se trouve pas seul et isolé dans un environnement. Il faut donc considérer et étudier comment ils interagissent entre eux pour pouvoir évaluer le risque réel. Il a été démontré par des études antérieures que différents EDCs, présents dans un même milieu et à des quantités inférieures à leur seuil d'activité observable, peuvent causer des effets additifs ou même synergiques (Jobling et *al.*, 1998 ; Allen et *al.*, 1999).

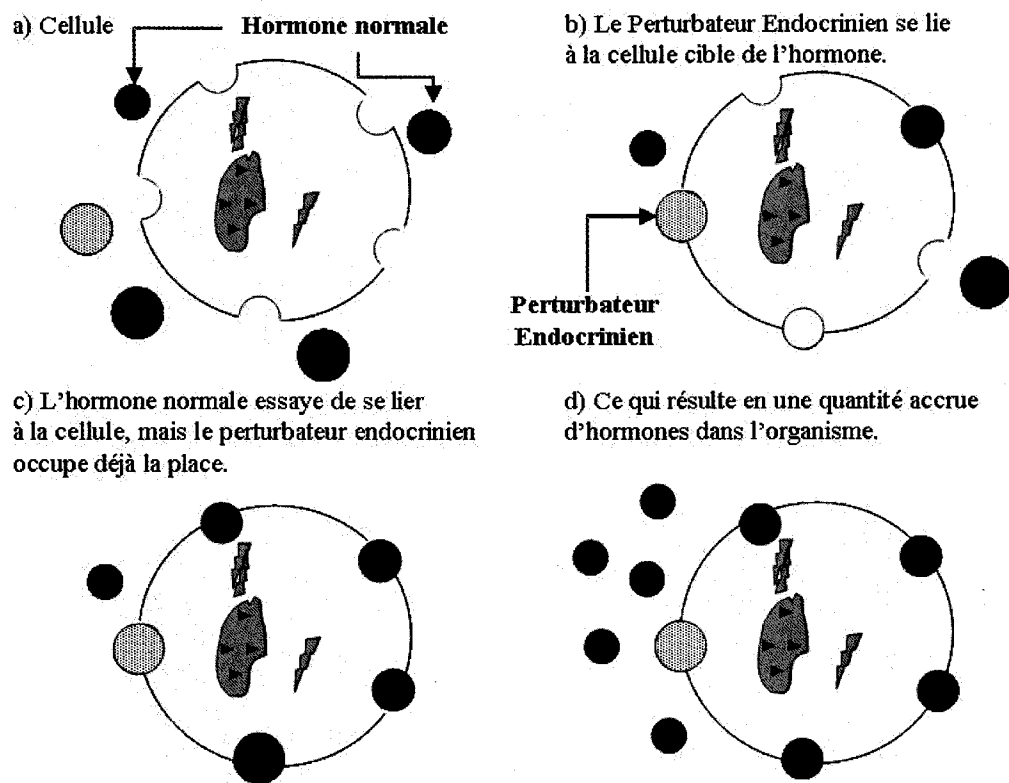


Figure 1.2 Mode d'action d'un perturbateur endocrinien

En règle générale, la vulnérabilité d'une espèce donnée dépend des propriétés intrinsèques du produit chimique, de l'importance, de la durée, de la fréquence et de la voie d'exposition, ainsi que de la façon dont une espèce donnée peut absorber, distribuer, transformer et éliminer ces

substances. Elle dépend également de la sensibilité d'organes particuliers à différentes étapes du développement (CCE, 2001).

Pour les animaux terrestres et les mammifères marins, l'alimentation est probablement la principale source d'exposition. La situation est différente pour la faune aquatique, l'absorption directe de substances chimiques dissoutes dans l'eau est la voie d'exposition la plus significative. En outre, le mode de reproduction des organismes aquatiques, qui place les embryons et les formes primitives sans protection dans le milieu ambiant, les rend particulièrement sensibles aux substances chimiques présentes dans l'eau (CCE, 2001). Chez les êtres humains, les voies éventuelles d'exposition à des EDCs incluent l'exposition directe sur le lieu de travail ou par l'intermédiaire de produits de consommation tels que les denrées alimentaires, certains plastiques, les détergents, les cosmétiques, certaines peintures, ainsi que l'exposition indirecte via l'environnement (air, eau, sol) (CCE, 2001).

1.1.3 Types de substances qui perturbent les systèmes endocriniens

Compte tenu de la complexité des systèmes endocriniens, il n'est pas surprenant que l'éventail des substances qui le perturbent soit large et varié et qu'il comprenne des produits chimiques à la fois naturels et synthétiques (Tableau 1.2) (Environnement Canada, 1999 ; Filali-Meknassi et *al.*, 2004). Les EDCs peuvent se décomposer en trois classes majeures, dont les composés estrogéniques (qui imitent ou bloquent les estrogènes naturels), les composés androgéniques (qui imitent ou bloquent la testostérone naturelle), et les composés thyroïdiens (qui agissent directement ou indirectement sur les glandes thyroïdiennes) (Snyder et *al.*, 2003a).

Selon une étude de l'Union Européenne (CCE, 2001), 118 composés sont classés comme EDCs potentiels ; et une priorité particulière a été assignée à l'étude de 12 de ces composés : sulfure de carbone, o-phénylphénol, diphenyl-éther-tétrabromé, 4-chloro-3-méthylphénol, 2,4-dichlorophénol, résorcinol, 4-nitrotoluène, 2,2'-bis(4-(2,3-époxypropoxy)phényl)propane, 4-octylphénol, estrone, éthinylestradiol, et estradiol (*Commission lists priority hormone chemicals*, 2001). Ces substances peuvent être répertoriées sous deux catégories (CCE, 2001) :

- Les hormones naturelles qui comprennent les estrogènes, la progestérone et les androgènes (testostérone et androstérone), naturellement présentes dans l'organisme des hommes et des animaux, et les phyto-estrogènes qui sont des substances présentes dans certaines plantes,

Tableau 1.2 Sources, types et exemples de substances, connues comme des perturbateurs endocriniens potentiels, (a) hormones naturelles et synthétiques ; (b) produits chimiques

a)		Principales sources					Exemples	
		Êtres vivants		Industries pharmaceutiques		Ruissellement agricole	Effluents/Sous-produits/Décharges	
		Humain /Animaux	Plantes	Traitements hormonaux	Additifs pour animaux		Municipaux	Industriels
Hormones naturelles	Estrogène	17 β -estradiol (β E2)	×			×	×	
		Estrone (E1)	×			×	×	
		Estriol (E3)	×			×	×	
		17 α -estradiol (α E2)	×			×	×	
	Progestérone		×			×	×	
	Androgène	Testostérone	×			×	×	
		Androstérone	×			×	×	
	Phyto-estrogène	Lignan	×			×		×
		Sitosterol	×			×		×
Hormones synthétiques	17 α -éthinyloestradiol			×	×	×	×	Hormones de croissance pour le bétail
	Trenbolone			×	×	×	×	
	Mélengestrol			×	×	×	×	
	DES			×	×	×	×	
	Mestranol			×	×	×	×	

b)		Principales sources					Exemples	
		Agriculture (produits, ruissellement)	Déchets		Application domestique ou/et industrielle	Ports (Bâteaux)		Transport atmosphérique
			Incinération	Effluents/Sous-				
				produits/Décharges Municipaux Industriels				
Composés phénoliques	Phénol				×		Industries de pâtes et papiers, de textile et de cuir	
	4-nitrophénol				×			
	2,4-dinitrophénol				×			
	2-chlorophénol				×			
	2-nitrophénol				×			
	2,4-diméthylphénol				×			
	2,4-dichlorophénol				×			
	2,4,6-trichlorophénol				×			
	Pentachlorophénol				×			
Composés organotins	TBT	×			×	×	Préservation du bois, protection agrochimique et des matériaux (cuir, papier) Agrochimie, textile Stabilisant du PVC Stabilisant du PVC	
	TPhT	×			×			
	MBT				×			
	DBT	×			×			
Composés aromatiques	Benzo(a)pyrène			×	×			
	Benzophénone			×	×			
	4-nitrotoluène			×	×			
	Octachlorostyrène			×	×			
	Dimère du styrène			×	×			
	Trimère du styrène			×	×			

b)			Principales sources					Exemples	
			Agriculture (produits, ruissellement)	Déchets		Application domestique ou/et industrielle	Ports (Bâteaux)		Transport atmosphérique
				Incinération	Effluents/Sous- produits/Décharges				
					Municipaux			Industriels	
Agents de surface	APEO	NPEO	×	×	×	×	Industries du textile et du cuir ; produits cosmétiques, détergents		
		OPEO	×	×	×	×			
	Alkylphénols	NP	×	×	×	×	Industries de pâtes et papiers, du textile et du cuir ; produits cosmétiques, détergents et pesticides		
		OP	×	×	×	×			
		4-n-nonylphénol	×	×	×	×			
		4-t-octylphénol	×	×	×	×			
		4-n-octylphénol	×	×	×	×			
		4-t-butylphénol	×	×	×	×			
		4-n-butylphénol	×	×	×	×			
		4-n-pentylphénol	×	×	×	×			
		4-n-hexylphénol	×	×	×	×			
		4-n-heptylphénol	×	×	×	×			
	Adipate	Adiapate, (2-diéthylhexyl)		×	×				
Pesticides Ogarnochlorés	DDT		×		×		×		
	Dieldrine		×		×		×		
	Lindane		×		×		×		
	Atrazine		×		×		×		
	Trifluraline		×		×		×		
	Permethrin		×		×		×		

b)		Principales sources					Exemples	
		Agriculture (produits, ruissellement)	Déchets		Application domestique ou/et industrielle	Ports (Bâteaux)		Transport atmosphérique
			Incinération	Effluents/Sous- produits/Décharges				
				Municipaux			Industriels	
Composés polyaromatiques	HAPs				×		Industries de pâtes et papiers	
	BPCs	×			×			
	n-butylbenzène			×	×			
	Monomère du styrène			×	×			
Composés organiques oxygénés	Cl _n -BPA	BPA			×	×	Industries de pâtes et papiers, de polymères et de plastifiants	
		Cl-BPA			×	×		
		Cl ₂ -BPA			×	×		
		Cl ₃ -BPA			×	×		
	Dioxine	PCDD	×			×	Sous-produits de procédés industriels et de combustion	
		PCDF	×			×		
		TCDD	×			×		
	Phthalates	Diéthyl phthalate			×	×	PCV, plastifiants, insecticides	
		Dipropyl phthalate			×	×		
		Di-n-butyl phthalate			×	×		
		Dipentyl phthalate			×	×		
		Dihexyl phthalate			×	×		
		Benzyl butyl phthalate			×	×		
		Di-(2-éthylhexyl) phthalate			×	×		
		Dicyclohexyl phthalate			×	×		

comme les germes de luzerne et le soja, et qui ont une activité semblable à celles des estrogènes une fois ingérées par l'organisme ;

- Les substances anthropiques qui comprennent :
 - les hormones de synthèse, y compris celles qui sont identiques aux hormones naturelles, telles que les contraceptifs, les traitements hormonaux de substitution et certains additifs alimentaires pour animaux, spécialement conçues pour agir sur le système endocrinien et le moduler, et
 - les produits chimiques anthropiques conçus pour être utilisés dans l'industrie (par exemple, dans certains produits industriels d'entretien), dans l'agriculture (certains pesticides) et dans des biens de consommation (par exemple, dans certains additifs pour plastiques et détergents). Cette catégorie comprend aussi les substances chimiques qui sont des sous-produits industriels suspectés d'influer sur le système endocrinien de l'homme et de l'animal (tels que les dioxines, les plastifiants, les surfactants non-ioniques). Ces produits chimiques présentent une bioactivité similaire aux hormones stéroïdiennes et peuvent affecter le développement, la maturation sexuelle et la reproduction des vertébrés (Ackermann et *al.*, 2002).

Ainsi, spécifiques exemples d'EDCs incluent : les pesticides tels que l'atrazine (Ramamoorthy et *al.*, 1997 ; Kiesecker, 2002), les agents de surface et ses éthoxylates (Ying et *al.*, 2002a), les hormones naturelles et synthétiques (Ying et *al.*, 2002b ; DEPA, 2004), les phyto-estrogènes tels que isoflavonoïdes et coumestrol (Bacaloni et *al.*, 2005 ; Stopper et *al.*, 2005), ainsi que les autres composés industriels tels que le diphénol A (BPA) (Maffini et *al.*, 2006).

Par ailleurs, un certain nombre de perturbateurs endocriniens naturels, tels que les hormones stéroïdiennes, sont communs aux humains, aux végétaux et aux animaux. Ils sont produits par les vertébrés et les invertébrés, et il existe des récepteurs d'estrogènes chez les reptiles, les oiseaux et les mammifères. Ainsi, une perturbation endocrinienne peut donc intervenir à tous les niveaux de la faune (Ministère de l'écologie et du développement durable, 2003).

La grande variété de substances et de sources présente un énorme défi pour les responsables environnementaux industriels et gouvernementaux. De plus, les EDCs sont souvent dominants et peuvent se disperser rapidement dans l'environnement. Les EDCs peuvent être rejetés dans

l'atmosphère, comme résultat d'activités de combustion et d'incinération (hydrocarbures aromatiques polycycliques [HAPs], dioxines) (Ying et *al.*, 2002a), mais les principaux réservoirs pour les EDCs sont les fleuves, les lacs, etc. (Esperanza et *al.*, 2004). Des substances estrogéniques ont été identifiées et mesurées dans une grande variété d'environnements liés aux effluents industriels et municipaux, aussi bien qu'aux ruissellements urbains et agricoles au Canada (Servos et *al.*, 2005). D'ailleurs, plusieurs de ces composés ont pu également être détectés dans les eaux de surface et les sédiments, qui reçoivent des décharges d'eaux usées au Canada et ailleurs dans le monde (Bennie et *al.*, 1997 ; WHO, 2002 ; Schlenk et *al.*, 2005). Les 4 principales classes d'EDCs (estrogènes naturels, estrogènes synthétiques, phyto-estrogènes et produits chimiques industriels) sont généralement représentées suivant leur potentiel estrogénique (MacLatchy et *al.*, 1997 ; Mazur et Adlercreutz, 1998 ; Servos, 1999 ; Islinger et *al.*, 1999) (Figure 1.3). Les estrogènes naturels et synthétiques ont normalement des effets estrogènes plus accentués que les phyto- et xéno-estrogènes. Cependant, les concentrations en phyto- et xéno-estrogènes dans l'environnement aqueux sont usuellement plus élevées (Spengler et *al.*, 2001).

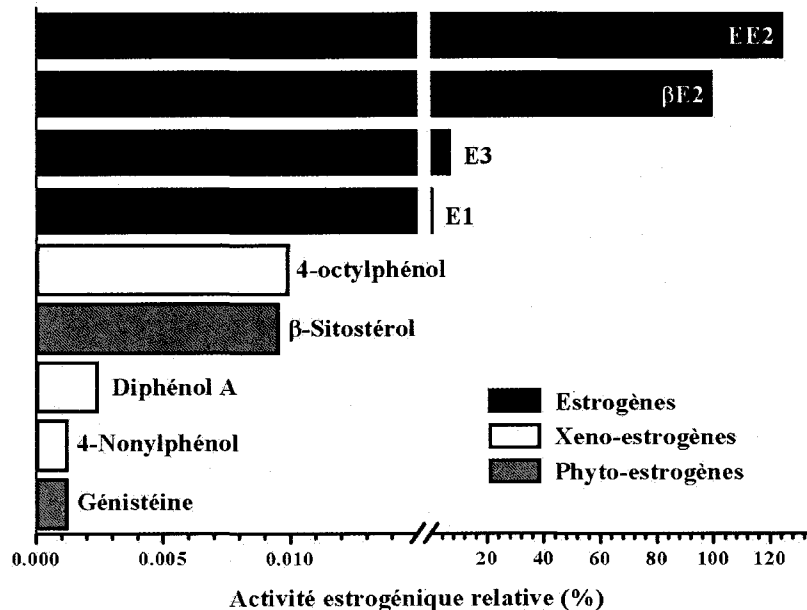


Figure 1.3 Potentiels estrogéniques relatifs de quelques EDCs (compilé de Gutendorf et Westendorf, 2001)

Par ailleurs, certains EDCs sont persistants et peuvent être transportés sur de longues distances et se retrouver pratiquement dans toutes les régions du monde. Par exemple, plusieurs études ont prouvé que le 4-nonylphénol (4-NP) (Stephanou et Giger, 1982 ; Wahlberg et *al.*, 1990 ; Field et Reed, 1996) et le BPA (del Olmo et *al.*, 1997) sont persistants et stables dans les stations de traitement des eaux usées (STEPs) et les eaux de surface. De plus, Cravedi (1999) a rapporté que l'utilisation fréquente du NP dans l'industrie des matières plastiques et sa stabilité ont pour conséquence une contamination croissante des cours d'eau et des risques de bioaccumulation dans la chaîne trophique. Les autres EDCs sont, soit rapidement dégradés dans l'environnement ou dans l'organisme humain, soit présents seulement à court terme, mais pendant des périodes critiques du développement des êtres vivants (WHO, 2002).

1.1.4 Conséquences potentielles de l'impact des perturbateurs endocriniens sur les êtres vivants

La coordination de la croissance, le développement et la maturation des êtres vivants impliquent une interaction complexe de signaux hormonaux dont la chronologie et la dose peuvent avoir des conséquences permanentes sur les formes et les fonctions futures de nombreux tissus (Colborn et *al.*, 1993 ; Santé Canada, 1999). Cependant, une exposition à l'âge adulte peut être compensée par des mécanismes normaux homéostatiques (Figure 1.4) et donc peut ne pas avoir d'impact significatif et détectable sur l'organisme (WHO, 2002). Par contre, l'exposition à des doses beaucoup plus faibles pendant des périodes critiques, par exemple au moment de la différenciation cellulaire, peut modifier le processus de développement de ces tissus, ce qui peut entraîner des changements permanents dans la physiologie des tissus chez l'être vivant adulte (Colborn et *al.*, 1993 ; Santé Canada, 1999).

Le phénomène de la perturbation endocrinienne n'est pas nouveau :

- L'hypothèse que certains composés peuvent imiter les hormones endogènes des animaux a été rapportée dès les années 1930 (Snyder, 2002 ; Cook et *al.*, 1934).
- Depuis les années 1930, les estrogènes provenant de plantes, connus sous le nom de phytoestrogènes, ont été, dans certains cas, liés à l'échec de la reproduction des mammifères (Brookbanks et *al.*, 1969 ; Metzler et Pfeiffer, 1995 ; Safe et Gaido, 1998 ; Snyder, 2002).

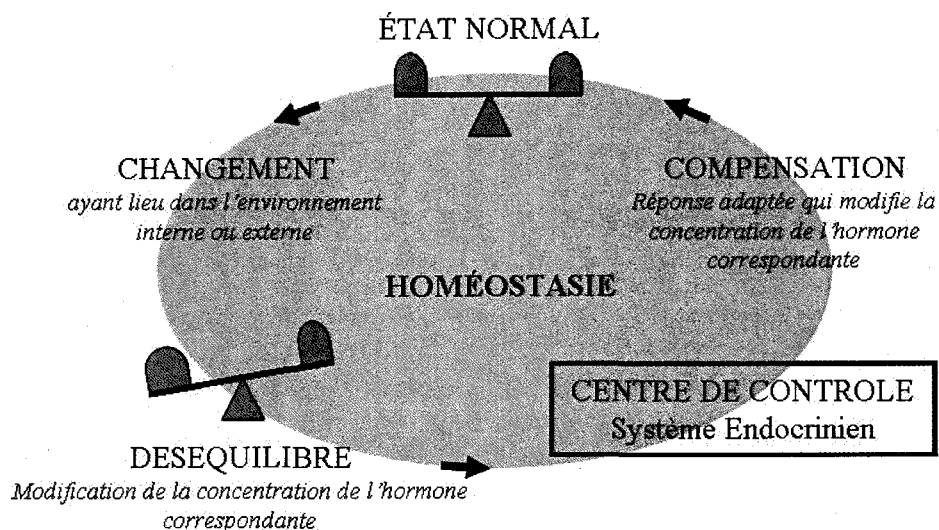


Figure 1.4 Diagramme schématisant le principe de l'homéostasie au niveau de la régulation endocrinienne

- En 1938, le diéthylstilbestrol (DES, estrogène synthétique) avait été mis au point pour empêcher les avortements spontanés chez la femme et pour stimuler la croissance du bétail. Dans les années 1970/1980, il s'est avéré que cette substance était à l'origine de malformations chez les enfants exposées *in utero* : les filles ont développé des anomalies du vagin ou de l'utérus et des formes inhabituelles de cancer de l'utérus lorsqu'elles ont atteint la puberté. Il s'agit du premier exemple documenté d'une substance chimique qui, lorsqu'elle est administrée à une femme enceinte, peut induire un cancer chez le fœtus (CCE, 2001 ; Herbst et *al.*, 1971). Le DES a été retiré du marché et interdit dans les années 1970 (Ministère de l'écologie et du développement durable, 2003).
- En 1948, la capacité des composés estrogéniques et androgènes d'interférer avec la métamorphose naturelle des amphibiens a été observée (Snyder, 2002).

Le Tableau 1.3 répertorie les principaux cas d'effets estrogéniques observés sur les êtres vivants. L'évidence de l'impact des EDCs sur les humains provient principalement des accidents industriels, des contaminations alimentaires ou des dosages pharmaceutiques, survenus pendant des périodes critiques du développement de l'être humain. Ce sont des cas spécifiques d'exposition par négligence à des concentrations élevées de perturbateurs endocriniens.

Tableau 1.3 Effets de l'exposition humaine/animale à des doses modérées de substances perturbatrices connues du système endocrinien

Contaminant	Effet
DES	L'exposition prénatale cause le cancer du vagin, des malformations de l'utérus et la stérilité chez la femme, et une production réduite de spermatozoïdes, un hypospadias et une cryptorchidie chez les hommes.
Chlordécone	L'exposition professionnelle des hommes cause la stérilité.
Dioxine	Chez les adultes, l'exposition entraîne une acné chronique ; un risque accru de maladies cardiovasculaires ; un risque accru de cancers de la glande thyroïde, des tissus mous et de leucémies ; un risque inférieur de cancer du sein. Chez le fœtus, l'exposition cause l'avortement spontané, des malformations congénitales, une mauvaise dentition. On a noté une corrélation négative entre les taux de dioxine sérique chez la mère et le nouveau-né et les taux d'hormones thyroïdiennes.
PCDD, PCDF	Problèmes de reproduction et de malformations des oiseaux mangeant les poisons (US, Grands Lacs).
2,3,7,8-TCDD, Dieldrine	Hermaphrodisme chez les baleines beluga.
BPC et dibenzofuranes	Chez les adultes, l'exposition provoque des changements du bilan thyroïdien et des lésions cutanées. Chez le fœtus, l'exposition entraîne des troubles neurodéveloppementaux, des déficits immunitaires, des déficiences auditives, des malformations génitales.
Consommation de poissons contaminés (BPC, métaux lourds, DDE)	Déficiences cognitives, retard du développement neural, hypotrophie à la naissance et petite taille des enfants de mères qui ont consommé du poisson contaminé des Grands Lacs (US) pendant la grossesse. Cycles menstruels plus courts chez les femmes qui consomment du poisson contaminé des Grands Lacs (US).
Hg	Cryptorchidie chez les panthères.
Pesticides de type DDT	Problèmes de reproduction des alligators.
HAPs	Réduction des naissances et anomalies morphologiques des sternes pierregarins
Composés organochlorés	Anomalies dans le développement, féminisation des chélydres serpentes.
Estrogènes, NP	VTG induite chez les poissons mâles (Flets, truites arc-en-ciel).
OP	VTG induite chez les poissons mâles (Flets).

Des effets néfastes pour la santé ont pu être observés sur les populations qui vivent dans des sites hautement pollués, comme celui de Seveso en Italie, suite à l'accident qui a déversé dans l'environnement des grandes quantités de dioxine. De même, une étude réalisée en Belgique en 2002 a démontré une maturation sexuelle retardée chez les adolescents vivant dans des zones contaminées par les BPCs et la dioxine (Den Hond et *al.*, 2002). Chez l'être humain, il existe peu d'études spécifiques sur d'éventuels effets des EDCs dans l'environnement en dehors de la description de cas d'accidents (Ministère de l'écologie et du développement durable, 2003). Cependant, dans la plupart des cas, les conséquences de l'exposition chez les êtres humains imitent les effets relevés chez les animaux (Colborn et *al.*, 1993).

Le Comité Scientifique de la Toxicité, de l'Écotoxicité et de l'Environnement (CSTEE) de la Commission des Communautés Européennes (CCE), dans son avis du 4 mars 1999 (« *Human and Wildlife Health Effects of Endocrine disrupting chemicals, with emphasis on Wildlife and on Ecotoxicology test methods* »), indique que des études réalisées en laboratoire, dans des conditions d'exposition réaliste, montrent clairement que plusieurs substances chimiques présentes dans l'environnement sont susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne. De plus, le CSTEE parle de problème global, bien que la plupart des effets observés à ce jour concernent des zones fortement polluées (CCE, 2001). Depuis quelques années, de nombreux effets des EDCs ont émergé, incluant le changement de sexe des poissons de rivière, une déficience dans la reproduction et des anomalies observées chez les invertébrés marins, les oiseaux, les alligators et les ours polaires (Sonnenschein et Soto, 1998 ; Maczka et *al.*, 2000). Ainsi peut être cité l'exemple des tributylétains (TBT) contenus dans les peintures destinées à la protection des navires contre les salissures biologiques : les TBT, très toxiques même à faible dose, entraînent des modifications significatives de la sexualité des gastéropodes marins, se traduisant par le développement de caractères mâles chez les femelles. Un autre exemple est celui des estrogènes naturels et synthétiques retrouvés dans les eaux usées et qui induisent la féminisation des poissons mâles. Nakamura (1984) ont en effet trouvé que des saumons (*Oncorhynchus masou*), exposés à une concentration en β E2 de 250–5000 ng/L, présentaient une distribution sexuelle de 84–100% de poissons femelles, contre seulement 49% dans le cas d'expériences de contrôle. Par ailleurs, une récente étude a montré qu'aux États-Unis d'Amérique et en Europe il y a un déclin dans la densité de spermatozoïdes (Swan et *al.*, 1997).

En ce qui concerne la santé humaine, le CSTEE arrive à la conclusion qu'il existe une association entre les substances chimiques perturbant le système endocrinien, telles qu'on les connaît actuellement, et les problèmes de santé humaine, tels que les cancers des testicules, du sein et de la prostate, la baisse du nombre de spermatozoïdes, les malformations des organes reproducteurs, les dérèglements thyroïdiens, ainsi que les troubles intellectuels et neurologiques. Néanmoins, le rôle d'agent causal n'a pas été confirmé (CCE, 2001).

1.1.5 Directives, normes et règlements

De façon générale, aucune directive américaine ou européenne sur la qualité des eaux n'a été développée pour les hormones stéroïdiennes.

En 1996, le vote de deux lois, « *Food Quality Protection Act* » (FQPA - projet de loi, numéro P.L. 104-170) et « *Amendments to the Safe Drinking Water Act* » (SDWA - projet de loi, numéro S.1316) ont mandaté l'USEPA pour identifier les EDCs présents dans les sources d'eau potable et de nourriture (Federal Register, 1998a, b). Ainsi, l'USEPA a pu établir une liste de composés classés comme des perturbateurs endocriniens potentiels. Par ailleurs, aux États-Unis d'Amérique la réglementation sur les contaminants de l'eau potable a été mise en vigueur en 1962 avec le « *Public Health Services Standards* », qui incluait plusieurs composés maintenant connus comme EDCs, par exemple certains phénols. En 1974, le SDWA demandait à l'USEPA d'établir des limites maximales critiques de contamination (MCLs) pour les différents contaminants de l'eau potable, ayant une activité endocrinienne, incluant certains pesticides. Cependant, la perturbation endocrinienne, jusqu'en 1995, n'était pas spécifiquement nommée dans toutes les législations des États-Unis d'Amérique. En 1996, l'adoption des amendements SDWA et FQPA mandatait que l'activité endocrinienne des produits chimiques et leurs formulations soient vérifiées avant que les produits chimiques ne soient fabriqués ou utilisés dans certains procédés, où de l'eau potable et/ou de la nourriture peuvent être contaminées. Par ailleurs, l'USEPA a déterminé un « *Ambient Water Quality Criteria* » concernant certains EDCs pour les eaux douces (Tableau 1.4). Cependant, ces critères ne correspondent pas à des limites réglementaires, mais plutôt à des suggestions, afin de protéger la vie aquatique, basées sur des études performées par l'USEPA (Campbell et al., 2006).

Tableau 1.4 « Ambient Water Quality Criteria » de l'USEPA

EDC	Concentration à ne pas dépasser (µg/L)		Référence
	Exposition aiguë ¹	Exposition chronique ²	
NP	28	6.6	USEPA, 2005
TBT	0.46	0.072	USEPA, 2003a
Atrazine	1500	-	USEPA, 2003b
DDT	1.1	-	USEPA, 1980

¹ Concentration moyenne sur une heure à ne pas dépasser plus d'une fois tous les 3 ans.

² Concentration moyenne sur quatre jours à ne pas dépasser d'une fois tous les 3 ans.

Au Canada, la loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999) (LCPE) (Environnement Canada, 2001) a exigé des Ministres Fédéraux de l'Environnement et de la Santé qu'ils préparent et publient une liste des substances d'intérêt prioritaire (LSIP), identifiant les substances chimiques, les groupes de substances chimiques, les effluents et les déchets, qui peuvent être nocifs pour l'environnement ou constituer un danger pour la santé humaine. Les directives sur la qualité des eaux ont posé comme concentration limite 1 µg TEQ/L pour le nonylphénol et ses dérivés éthoxylés. Le 23 juin 2001, le Ministère Canadien de l'Environnement et de la Santé a recommandé d'ajouter le NP et ses dérivés éthoxylés (NPEO) à la liste des substances toxiques dans la LCPE 1999 (Canada Gazette, 2001). La directive 86/278 de la Communauté Européenne Économique (CEE) a proposé de son côté une liste de concentrations limites pour le NP et ses dérivés éthoxylés (par exemple, 50 mg/kg dans la boue utilisée sur les terres agricoles).

En 1998, l'Agence Environnementale du Japon (JEA) a publié des programmes stratégiques sur les perturbateurs endocriniens (SPEED'98), dans lesquels plusieurs directives basiques et des approches spécifiques au problème sont documentées : 1) étudier et surveiller la pollution par les EDCs, leurs sources, et les effets sur la vie sauvage et les êtres humains ; 2) développer la recherche ; 3) promouvoir les évaluations de risque environnemental ; 4) développer le réseau international. Dans ce document, le JEA a listé plus de 70 produits chimiques pouvant induire des anomalies chez les animaux à très faibles concentrations. Le Ministère des Terres, de l'Infrastructure et du Transport (MLIT) du Japon a mandaté plusieurs études intensives sur le

devenir des perturbateurs endocriniens dans les rivières et les STEP. Des 70 produits chimiques, 27 ont été considérés pour les rivières et 25 pour les STEP (Komori et *al.*, 2004).

1.2 Méthodes d'analyse

L'intérêt grandissant pour les EDCs, en particulier pour les estrogènes, a promu le développement de diverses méthodes de détection et de quantification dans les solutions aqueuses (tels que Hansen et *al.*, 1998 ; Snyder et *al.*, 1999 ; Croley et *al.*, 2000 ; Garcia-Reyero et *al.*, 2001 ; Huang et Sedlak, 2001 ; Legler et *al.*, 2002 ; Braun et *al.*, 2003 ; Heisterkamp et *al.*, 2004 ; Zhang et *al.*, 2004 ; Fan et *al.*, 2005). Deux grands types de méthodes d'analyse se distinguent : les méthodes d'analyse chimiques et les tests biologiques, ou bio essais (Campbell et *al.*, 2006).

1.2.1 Méthodes d'analyse chimiques

Les méthodes d'analyse chimiques permettent de déterminer les types d'EDCs présents dans diverses matrices aqueuses (telles que les eaux usées, les eaux de surface et les eaux douces, les boues), ainsi que de quantifier avec précisions ces EDCs. Ces méthodes analytiques incluent la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) (Peñalver et *al.*, 2002 ; Fan et *al.*, 2005 ; Almeida et Nogueira, 2006), la chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (GC-MS) (Braun et *al.*, 2003 ; Sabik et *al.*, 2003 ; Esperanza et *al.*, 2004 ; Ballesteros et *al.*, 2006), GC-MS-MS (Huang et Sedlak, 2001 ; Ternes et *al.*, 2002 ; Fine et *al.*, 2003), la chromatographie en phase liquide – spectrométrie de masse (LC-MS) (Rodriguez-Mozaz et *al.*, 2004 ; Hu et *al.*, 2005), et LC-MS-MS (Isobe et *al.*, 2003 ; Laganà et *al.*, 2004 ; Beck et *al.*, 2005 ; Mitani et *al.*, 2005 ; Schlüsener et Bester, 2005). La plupart de ces méthodes incluent une extraction en phase solide (SPE) des composés avant l'analyse. D'autres types d'extraction peuvent aussi être utilisés, tels que l'extraction liquide-liquide (LLE) (Sabik et *al.*, 2003) et la micro-extraction en phase solide (SPME) (Braun et *al.*, 2003 ; Mitani et *al.*, 2005).

Concernant les estrogènes naturels et synthétiques, leurs déterminations dans les eaux usées est une tâche analytique difficile, parce que les limites de détection exigées sont très faibles et la complexité de la matrice d'eau usée et de boue rendent nécessaire l'exécution d'un nombre considérable d'étapes (Johnson et *al.*, 2000 ; López de Alda et Barceló, 2001 ; Aerni et *al.*, 2004 ; Esperanza et *al.*, 2004). Plusieurs études (Belfroid et *al.*, 1999 ; Huang et Sedlak, 2001 ; Spengler et *al.*, 2001 ; Xiao et *al.*, 2001 ; Ternes et *al.*, 2002) ont porté sur l'utilisation du GC-

MS et GC-MS-MS. Ces méthodes incluent une SPE suivie d'une dérivation (Tableau 1.5) avant la détection par GC-MS ou GC-MS-MS. La dérivation est nécessaire pour augmenter la volatilité des estrogènes et ainsi améliorer la séparation chromatographique. Un complexe protocole combinant le HPLC et le GC-MS a été développé par Belfroid et *al.* (1999). Cette méthode inclut une SPE sur disques. Après extraction, les hormones ont été séparées par HPLC et les fractions contenant les hormones ont été analysées par GC-MS, précédé par une dérivation. Cependant, la dérivation représente une phase critique de préparation de l'échantillon. De plus, une série de problèmes avec les deux méthodes de silylation les plus utilisées [N,O-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) et N-(tert-butyldiméthylsilyl)-N-méthyltrifluoroacétamide (MTBSTFA)] a été rapportée (Shareef et *al.*, 2004). En effet, Shareef et *al.* (2004) ont remarqué que le EE2 était partiellement ou totalement converti en E1 durant la dérivation et/ou la séparation chromatographique. Ainsi, ce type de procédures d'analyse, sous les conditions décrites dans les précédentes études (Mol et *al.*, 2000 ; Ding et Chiang, 2003 ; Kelly, 2000), ne peuvent pas quantifier de façon fiable un mélange de EE2 et de E1.

Le LC-MS et le LC-MS-MS sont des technologies applicables à un large éventail de matrices. Elles sont généralement préférées grâce à leur sensibilité et spécificité. De plus, aucune dérivation n'est requise. Ainsi, ces dernières années, ces méthodes d'analyse pour la détermination et la quantification des estrogènes ont été très développées par les laboratoires de recherche (Croley et *al.*, 2000 ; Petrovic et *al.*, 2002 ; Benijts et *al.*, 2002 ; Isobe et *al.*, 2003 ; Laganà et *al.*, 2004 ; Rodriguez-Mozaz et *al.*, 2004 ; Hu et *al.*, 2005 ; Mitani et *al.*, 2005 ; Schlüsener et Bester, 2005). Laganà et *al.* (2000) ont montré que l'analyse au LC-MS-MS a permis d'obtenir une plus grande sensibilité, comparée aux précédentes méthodes d'analyse au GC-MS. Cependant, l'instrumentation requise pour effectuer des analyses au LC-MS-MS est très coûteuse. Les tableaux 1.6 et 1.7 répertorient les principales méthodes d'analyse des estrogènes dans diverses matrices et les limites de détection (LOD) correspondantes.

Tableau 1.5 Agents de dérivation employés pour une analyse au GC

Agent de dérivation	Référence
BSTFA avec 10% de triméthylchlorosilane (TMCS)	Barber et <i>al.</i> , 2000, cité par López de Alda et Barceló, 2001
BSTFA avec 1% de TMCS	Ding et Chiang, 2003
MTBSTFA avec 1% de tert-butyldiméthylchlorosilane (TBDMCS)	Kelly, 2000 ; Mol et <i>al.</i> , 2000
Mélange d'acétonitrile, de pyridine, de MTSBSTFA et de TMCS	Spengler et <i>al.</i> , 2001
N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (MSTFA)– triméthylsilylimidazole (TMSI)–dithioerytrol (DTE)	Ternes et <i>al.</i> , 1999a, 2002 ; Kuch et Ballschmiter, 2000
Pentafluorobenzoyl	Xiao et <i>al.</i> , 2001
Anhydride heptafluorobutyrique	Huang et Sedlak, 2001
Acide pentafluoropropionique	Laganà et <i>al.</i> , 2000
Anhydride acétique	Larsson et <i>al.</i> , 1999

Tableau 1.6 Principales méthodes utilisées pour l'analyse des EDCs avec extraction en phase solide (SPE)

Limites de détection (ng/L)					Type de matrice
	LC-MS	LC-MS-MS	GC-MS	GC-MS-MS	HRGC-MS
E1	50[1]				Effluent de STEP & rivière
	2.5[2]				Rivière
	6.6[3]				Rivière
	2.5[4]				Rivière
	0.1[28]				Rivière
		5[5]			Rivière & effluent de STEP
		0.4-0.5[6]			Affluent de STEP
		0.2-0.25[6]			Effluent de STEP
		0.33[7]*			Affluent de STEP
		0.16[7]*			Effluent de STEP
		0.1[8]			Rivière & effluent de STEP
		1.2[9]			Affluent de STEP
		0.8[9]			Effluent de STEP
		0.1[9]			Rivière
		0.02[29]			Mer
		1.3[30]*			Affluent de STEP
		0.7[30]*			Effluent de STEP
		0.40[33]			Affluent de STEP

Limites de détection (ng/L)					Type de matrice
LC-MS	LC-MS-MS	GC-MS	GC-MS-MS	HRGC-MS	
E1	0.04[33]				Effluent de STEP
	0.005[33]				Rivière
	0.8[34]				Eau purifiée
	0.23[35]*				Rivière
	0.26[36]*				Affluent de STEP d'industrie pharmaceutique
	0.73[36]*				Effluent de STEP d'industrie pharmaceutique
		0.2[10]			Effluent de STEP
		0.5[11]			Effluent de STEP domestique
		0.7[12]			Effluent de STEP
		0.2[13]			Effluent de STEP & eaux de rivière
		<1[14]			Effluent de STEP
		1[15]			Effluent de STEP municipale
		1.6[31]*			Eau pure
			0.1-1.8[6]		STEP domestique
			0.3-1[17]		Effluent de STEP domestique/industrielle
			0.2-0.3[17]		Rivière
			0.5[18]		Rivière
			1[18]		Effluent de STEP municipale
			1[19]		Effluent de STEP

Limites de détection (ng/L)					Type de matrice
LC-MS	LC-MS-MS	GC-MS	GC-MS-MS	HRGC-MS	
E1		0.3[20]			Eaux usées
		0.2-0.6[21]			Eaux souterraines
		0.5[22]			Effluents après chaque étape du traitement
			0.1 [24]		Effluent de STEP municipale & rivière
βE2	50[1]				Rivière & effluent de STEP
	5[2]				Rivière
	5[3]				Rivière
	2.5[4]				Rivière
	0.1 [28]				Rivière
	5[5]				Rivière & effluent de STEP
	0.4-0.5[6]				Affluent de STEP
	0.2-0.25[6]				Effluent de STEP
	0.66[7]*				Affluent de STEP
	0.33[7]*				Effluent de STEP
	0.3[8]				Rivière & effluent de STEP
	1.9[9]				Affluent de STEP
	0.8[9]				Effluent de STEP
	0.2[9]				Rivière
	0.3[29]				Mer
	2.6[30]*				Affluent de STEP

Limites de détection (ng/L)					Type de matrice
LC-MS	LC-MS-MS	GC-MS	GC-MS-MS	HRGC-MS	
βE2	2.6[30]*				Effluent de STEP
	0.65[33]				Affluent de STEP
	0.16[33]				Effluent de STEP
	0.02[33]				Rivière
	0.5[34]				Eau purifiée
	0.23[35]*				Rivière
	0.3[36]*				Affluent de STEP d'industrie pharmaceutique
	0.37 [36]*				Effluent de STEP d'industrie pharmaceutique
		0.2[10]			Effluent de STEP
		0.5[11]			Effluent de STEP domestique
		0.4[12]			Effluent de STEP
		0.03[13]			Rivière & effluent de STEP
		<1[14]			Effluent de STEP
		1[15]			Effluent de STEP municipale
		1.6[31]*			Eau pure
		300[32]			Eau de surface
			0.1-1.8[6]		STEP domestique
			0.5-2.4[17]		Effluent de STEP domestique/industrielle
			0.3-0.6[17]		Rivière

Limites de détection (ng/L)				Type de matrice
LC-MS	LC-MS-MS	GC-MS	GC-MS-MS	HRGC-MS
βE2		0.5[18]		Rivière
		1[18]		Effluent de STEP municipale
		1[19]		Effluent de STEP
		0.3[20]		Affluent
		0.2-0.6[21]		Eaux souterraines
		0.5[22]		Effluents après chaque étape du traitement
		0.2-0.4[23]		Effluent de STEP municipale & eau de surface
			0.15[24]	Effluent de STEP municipale & rivière
αE2	0.2[8]			Effluent de STEP & rivière
		0.1-0.3[17]		Rivière
		0.1-1.2[17]		Effluent de STEP domestique/industrielle
			0.15[24]	Effluent de STEP municipale & rivière
E3	50[1]			Effluent de STEP & eaux de rivière
	0.25[2]			Rivière
	10.6[3]			Rivière
	5.04[4]			Rivière
	0.2[28]			Rivière
	5[5]			Effluent de STEP & rivière

Limites de détection (ng/L)					Type de matrice
LC-MS	LC-MS-MS	GC-MS	GC-MS-MS	HRGC-MS	
E3	0.4-0.5[6]				Affluent de STEP
	0.2-0.25[6]				Effluent de STEP
	0.66[7]*				Affluent de STEP
	0.33[7]*				Effluent de STEP
	1.5[8]				Effluent de STEP & rivière
	7.0[9]				Affluent de STEP
	0.5[9]				Effluent de STEP
	0.3[9]				Rivière
	1.0[29]				Mer
	11.5[30]*				Affluent de STEP
	5.0[30]*				Effluent de STEP
	0.85[33]				Affluent de STEP
	0.24[33]				Effluent de STEP
	0.03[33]				Rivière
	1.4[34]				Eau purifiée
	0.50[35]*				Rivière
	0.33[36]*				Affluent de STEP d'industrie pharmaceutique
	0.73[36]*				Effluent de STEP d'industrie pharmaceutique
		0.06[13]			Effluent de STEP & rivière

Limites de détection (ng/L)				Type de matrice
LC-MS	LC-MS-MS	GC-MS	GC-MS-MS	HRGC-MS
E3		1[15]		Effluent de STEP municipale
		1.6[31]*		Eau pure
			0.3[20]	Eaux usées
			0.2-0.6[21]	Eaux souterraines
EE2	50[1]			Effluent de STEP & rivière
	4.2[3]			Rivière
	3.22[4]			Rivière
	0.1[28]			Rivière
		5[5]		Rivière & effluent de STEP
		0.4-0.5[6]		Affluent de STEP
		0.2-0.25[6]		Effluent de STEP
		0.2[8]		Rivière & effluent de STEP
		1.6[9]		Affluent de STEP
		1.1[9]		Effluent de STEP
		0.4[9]		Rivière
		0.45[29]		Mer
		2.0[30]*		Affluent de STEP
		2.0[30]*		Effluent de STEP
		0.80[33]		Affluent de STEP
		0.24[33]		Effluent de STEP

Limites de détection (ng/L)					Type de matrice
LC-MS	LC-MS-MS	GC-MS	GC-MS-MS	HRGC-MS	
EE2	0.03[33]				Rivière
	1.2[34]				Eau purifiée
	0.30[35]*				Rivière
	0.18[36]*				Affluent de STEP d'industrie pharmaceutique
	0.37 [36]*				Effluent de STEP d'industrie pharmaceutique
		0.2[10]			Effluent de STEP
		2[11]			Effluent de STEP domestique
		0.4[12]			Effluent de STEP
		0.05[13]			Eaux de rivière & effluent de STEP
		<0.5[14]			Effluent de STEP
		1[15]			Effluent de STEP municipale
		10[16]			Affluent & effluent
		1.6[31]*			Eau pure
		50[32]			Eau de surface
			0.1-1.8[6]		STEP domestique
			0.3-1.8[17]		Effluent de STEP domestique/industrielle
			0.1-0.3[17]		Rivière
			0.5[18]		Rivière
			1[18]		Effluent de STEP municipale

Limites de détection (ng/L)					Type de matrice
LC-MS	LC-MS-MS	GC-MS	GC-MS-MS	HRGC-MS	
EE2		1[19]			Effluent de STEP
		0.3[20]			Eaux usées
		0.2-0.6[21]			Eaux souterraines
		0.5[22]			Effluents après chaque étape du procédé de traitement
		0.2-0.4[23]			Rivière & effluent de STEP municipale
				0.1[24]	Effluent de STEP municipale & rivière

**Des calculs ont été faits pour déterminer la LOD à partir de la limite de quantification (LOQ) donnée par les auteurs*

[1]Solé et al., 2000	[2]Petrovic et al., 2002	[3]Benijts et al., 2002	[4]Rodriguez-Mozaz et al., 2004
[5]Croley et al., 2000	[6]Johnson et al., 2000	[7]D'Ascenzo et al., 2003	[8]Isobe et al., 2003
[9]Laganà et al., 2004	[10]Desbrow et al., 1998	[11]Larsson et al., 1999	[12]Spengler et al., 2001
[13]Xiao et al., 2001	[14]Rodgers-Gray et al., 2000	[15]Esperanza et al., 2004	[16]Braun et al., 2003
[17]Belfroid et al., 1999	[18]Ternes et al., 1999a	[19]Kelly, 2000	[20]Fawell et al., 2001
[21]Fine et al., 2003	[22]Carballa et al., 2004	[23]Huang et Sedlak, 2001	[24]Kuch et Ballschmiter, 2001
[25]Behnisch et al., 2001	[26]Snyder et al., 1999	[27]Majima et al., 2002	[28]Hu et al., 2005
[29]Beck et al., 2005	[30]Schlüsener et Bester, 2005	[31]Ding et Chiang, 2003	[32]Mol et al., 2000
[33]Gentili et al., 2002	[34]Komori et al., 2004	[35]Yamamoto et al., 2006	[36]Cui et al., 2006

Tableau 1.7 Principales méthodes utilisées pour l'analyse des EDCs avec micro-extraction en phase solide (SPME)

	Limites de detection (ng/L)			Type de matrice
	HPLC	LC-MS-MS	GC-MS	
E1	700 (détection à UV) ^[1]			Eaux de rivière
	70 (détection électrochimique) ^[1]			Eaux de rivière
		2.7 ^[2]		Eau pure
βE2	300 (détection à UV) ^[1]			Eaux de rivière
	70 (détection électrochimique) ^[1]			Eaux de rivière
		7.4 ^[2]		Eau pure
αE2	400 (détection à UV) ^[1]			Eaux de rivière
	80 (détection électrochimique) ^[1]			Eaux de rivière
E3		11.7 ^[2]		Eau pure
EE2	400 (détection à UV) ^[1]			Eaux de rivière
	70 (détection électrochimique) ^[1]			Eaux de rivière
		10.5 ^[2]		Eau pure
			40 ^[3]	Affluent et effluent
[1] Peñalver et al., 2002			[2] Mitani et al., 2005	
			[3] Braun et al., 2003	

1.2.2 Bio essais

Les méthodes analytiques chimiques sont nécessaires dans les études sur le devenir et le transport des EDCs dans l'environnement, cependant ces méthodes ne permettent pas d'obtenir des données sur les effets estrogéniques ou les influences synergiques ou antiestrogéniques dues à la présence de plusieurs composés estrogéniques (Campbell et al., 2006).

Ainsi, plusieurs bio essais et bio senseurs ont été développés afin d'établir les niveaux de toxicité des effluents d'eaux usées (Farré et Barceló, 2003) et évaluer le contenu global des substances estrogéniques, comparé à la réponse du β E2 (DEPA, 2002). Les bio essais correspondent à des méthodes de détection alternatives *in vivo* ou *in vitro*, et peuvent engendrer des réponses qualitatives ou quantitatives. Les techniques biologiques présentent un potentiel important comme petits outils rentables pour une détection directe et *in situ*. Ainsi, les approches biologiques appliquées en conjonction avec les analyses chimiques produisent des informations plus complètes sur l'impact biologique potentiel des effluents pollués (Farré et *al.*, 2005).

Ces méthodes peuvent utiliser des organismes entiers, des cellules entières, ou des matériaux biologiques comme des anticorps ou des récepteurs estrogène (Campbell et *al.*, 2006). La détection peut s'effectuer via de nombreux mécanismes, incluant la prolifération des cellules, la liaison avec un ligand, l'induction de la vitellogénine (VTG), l'induction de luciférase, ou l'interaction antigène-anticorps (Campbell et *al.*, 2006). La méthode de prolifération des cellules estime la reproduction et la croissance de cellules dans différents échantillons, et la méthode de liaison avec un ligand utilise un site de liaison spécifique pour les estrogènes qui peut être quantifié (Soto et *al.*, 1995). La VTG est une protéine seulement présente dans le foie des poissons femelles, qui est induite par l'activité estrogénique. Sa présence chez les poissons mâles suggère une exposition à des produits chimiques estrogènes et donc indique une perturbation endocrinienne (Johnson et Sumpter, 2001). La méthode d'induction de la luciférase utilise les récepteurs estrogènes pour produire la protéine luciférase, qui peut être quantifiée par luminescence après la lyse des cellules et l'addition de luciférine (Legler et *al.*, 2002). Les interactions antigènes-anticorps produisent les bases de l'immunoessai, établi sur la liaison non covalente des antigènes aux anticorps (Gascón et *al.*, 1997).

Les bio essais *in vivo* présentent l'avantage de permettre une évaluation de l'impact réel de l'estrogénicité sur les espèces cibles (Campbell et *al.*, 2006). Ils ont principalement recouru à l'utilisation de poissons (truites arc-en-ciel), d'invertébrés (daphnie), de plantes (avoine, choux de chine) et de micro-organismes (bactéries) (Cook et *al.*, 1934 ; Wrenn et *al.*, 1970 ; Jobling et Sumpter, 1993 ; Sumpter et Jobling, 1995 ; Harries et *al.*, 1996, 1997 ; Baldwin et *al.*, 1997 ; Lye et *al.*, 1997 ; Routledge et *al.*, 1998 ; Allen et *al.*, 1999 ; Andersen et *al.*, 1999 ; Harries et *al.*, 1999 ; Nichols et *al.*, 1999 ; Solé et *al.*, 2000 ; Fawell et *al.*, 2001 ; Metcalfe et *al.*, 2001 ; Tabata

et *al.*, 2001 ; Arukwe et *al.*, 2002 ; Hayes et *al.*, 2002 ; Legler et *al.*, 2002 ; Sheahan et *al.*, 2002 ; Huggett et *al.*, 2003 ; Giesy et *al.*, 2003 ; Aerni et *al.*, 2004 ; Garcia-Reyero et *al.*, 2004 ; Pawlowski et *al.*, 2004 ; Diniz et *al.*, 2005a, b ; Park et Kidd, 2005 ; Tyler et *al.*, 2005 ; Ueda et *al.*, 2005 ; Bistodeau et *al.*, 2006 ; Gordon et *al.*, 2006 ; Höger et *al.*, 2006 ; An et *al.*, 2007). Généralement, les bio essais avec les poissons montrent une bonne sensibilité et permettent une analyse en temps réel, mais ils souffrent de problèmes de standardisation. Ainsi, ces tests demandent beaucoup de temps et des équipements spécialisés. Par contre, l'utilisation de daphnies permet une sensibilité et une reproductibilité élevées, une procédure expérimentale simple, et des temps d'exposition courts grâce au court cycle de reproduction des daphnies. Les plantes permettent des coûts de maintenance faibles et une activation du test rapide, avec des avantages pour l'évaluation d'écotoxicité des déchets solides. Cependant, les tests basés sur la croissance des plantes requièrent un long temps d'exposition, tel que 4 à 6 jours pour la mesure de la longueur des racines. Il existe aussi des bio essais bactériologiques, qui permettent une approche directe, rapide et rentable pour évaluer le stress chimique. Communément, des tests de luminescence sont utilisés avec des bactéries marines. Ces tests sont très efficaces, mais doivent être menés dans une solution saline.

En général, les tests *in vivo* sont considérablement plus coûteux et demandent habituellement plus de temps que les essais *in vitro*. Cependant, il existe quelques tests *in vivo* de courte durée pour évaluer l'activité estrogénique (Zacharewski, 1998), incluant les effets sur les poids de certains organes, la différenciation cellulaire, l'expression de protéines et les activités enzymatiques (Zacharewski, 1997). Deux des plus répandus sont les tests de kératinisation des cellules vaginales et utérine. L'augmentation du poids humide utérine est une mesure établie de l'estrogénicité de produits chimiques, par contre la kératinisation des cellules vaginales épithéliales chez les rongeurs peut être induite seulement par des composés considérés comme estrogéniques (Zacharewski, 1998). Enfin, un essai *in vivo* utilisant l'induction de VTG dans le sang chez les poissons mâles, tels que les jeunes truites arc-en-ciel, est aussi très employé car la VTG est un marqueur biologique très sensible pour l'activité estrogénique (Sumpter et Jobling, 1995 ; Hansen et *al.*, 1998). Par ailleurs, Garcia-Reyero et *al.* (2004) ont récemment développé un bio essai se basant sur l'induction de « VTG ARNm » dans le foie de différentes espèces de poissons. Ce test requiert une très petite quantité d'échantillons comparée au test sur la détection de VTG dans le sang des poissons mâles. Cependant, la majeure difficulté avec

l'application des analyses ARNm à des échantillons environnementaux est la labilité de l'ARN, qui est rapidement dégradée après que l'animal soit tué (Garcia-Reyero et *al.*, 2004).

Les essais *in vitro* sont des outils très attractifs, parce qu'ils sont rapides, pas chers, et généralement donnent des résultats reproductibles (Snyder et *al.*, 2003a). La plupart de ces essais peuvent se classer en quatre catégories : a) mesure de l'affinité d'un produit chimique à se lier au récepteur humain estrogène (hER), b) la prolifération de cellules (« *E-Screen-assay* »), c) l'expression du gène rapporteur (« *YES-assay* ») (Fang et *al.*, 2000), et d) l'interaction antigène-anticorps (tests immunoessais) (Farré et *al.*, 2005).

Les tests, basés sur la force de liaison d'une substance au récepteur estrogène, sont bien décrits (Figure 1.5) (White et *al.*, 1994 ; Leush et *al.*, 2006) et sont utiles pour déterminer rapidement certains EDCs (USEPA 1998 ; Zacharewski 1997). Dans ces essais, des récepteurs purifiés (tels que ER) sont utilisés pour évaluer les affinités relatives de liaison de divers produits chimiques (Snyder et *al.*, 2003a). Cependant, « l'activité de liaison » ne semble pas être suffisante pour pouvoir déterminer l'estrogénicité globale que présente une substance, car le potentiel estrogénique dépend aussi de l'habilité du ligand à provoquer une réponse estrogène-récepteur (Farré et *al.*, 2005). Basé sur leurs expériences, Leush et *al.* (2006) ont rapporté que ce type de tests permet quand même de fournir un outil fiable et rentable pour une détermination à grande échelle des produits chimiques présentant une activité estrogénique ou androgénique.

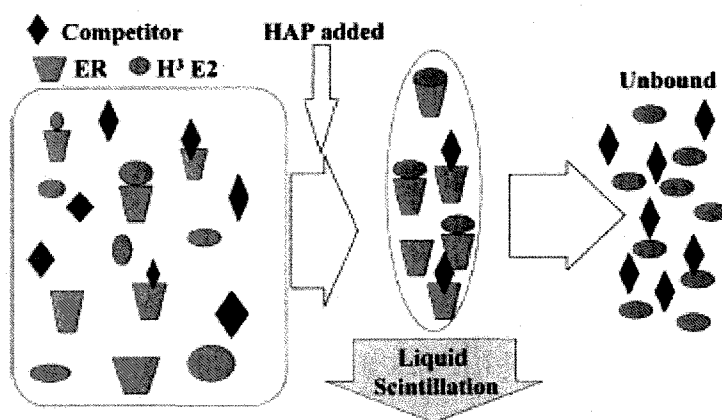


Figure 1.5 Représentation schématique du test basé sur la force de liaison d'une substance au récepteur estrogène (Snyder et *al.*, 2003a)

Le « *E-screen-assay* », dans lequel la prolifération de cellules humaines du cancer du sein (MCF-7) est mesurée comme une réponse à un effet estrogénique (Soto et *al.*, 1995), a aussi permis de déterminer l'estrogénicité des effluents de STEP et des eaux du surface (Körner et *al.*, 1999, 2001). Cependant, aucune information directe sur les mécanismes impliqués n'est révélée (Andersen et *al.*, 1999). De plus, bien que ces tests soient simples d'utilisation, plusieurs facteurs peuvent affecter l'activité des substances estrogéniques, tels que les différences dans les conditions de culture, la densité cellulaire, et ainsi rendre la standardisation de ces méthodes difficiles (Farré et *al.*, 2005).

Depuis les dix dernières années, un nombre important de tests employant l'expression du gène rapporteur ont été développés. Essentiellement, ces tests se basent sur le modèle simple des cellules, qui expriment un gène sous le contrôle de promoteurs définis, répondant à des substances spécifiques, et qui produisent ainsi un signal facilement quantifiable (Snyder et *al.*, 2001). Ces essais montrent un grand intérêt pour la détermination rapide de l'estrogénicité des composés naturels et artificiels. Dans les systèmes intégrés, les modèles cellulaires sont très utiles pour étudier la synergie et l'antagonisme de différentes substances, et pour les recherches environnementales de terrain, ces méthodes offrent d'excellents outils pour identifier les EDCs (Farré et *al.*, 2005). Certains d'entre eux sont basés sur la bioluminescence, tels que le « *YES-assay* », utilisant des cellules de levure (Fawell et *al.*, 2001 ; Garcia-Reyero et *al.*, 2001 ; Kirk et *al.*, 2002 ; Hugget et *al.*, 2003 ; Aerni et *al.*, 2004 ; Gibson et *al.*, 2005 ; Vermeirssen et *al.*, 2006). Le « *YES-assay* » est souvent utilisé dû à sa manipulation simple. Spécifiquement, c'est un essai basé sur la souche recombinante du DNA de la levure *saccharomyces cerevisiae*, qui contient un gène pour le hER et le gène rapporteur β -galactosidase (Routledge et Sumpter, 1996 ; Desbrow et *al.*, 1998). Une version modifiée appelée LYES a aussi été développée par Schultis et Metzger (2004). Cette méthode est plus rapide et plus sensible que les autres bio essais (Campbell et *al.*, 2006). D'autres essais utilisent des cellules humaines de cancer du sein transfectées, par exemple, avec la luciférase dans le test ER-CALUX (« *Chemical-Activated LLuciferase gene eXpression cell bioassay system* ») (Murk et *al.*, 2002), dans le test MVLN (Figure 1.6) (Khim et *al.*, 1999 ; Snyder et *al.*, 2001 ; Hashimoto et *al.*, 2005) ou dans le test MELN (Cargouët et *al.*, 2004 ; Pillon et *al.*, 2005 ; Cargouët et *al.*, 2006). Les cellules humaines de cancer du sein contiennent déjà le récepteur humain estrogène.

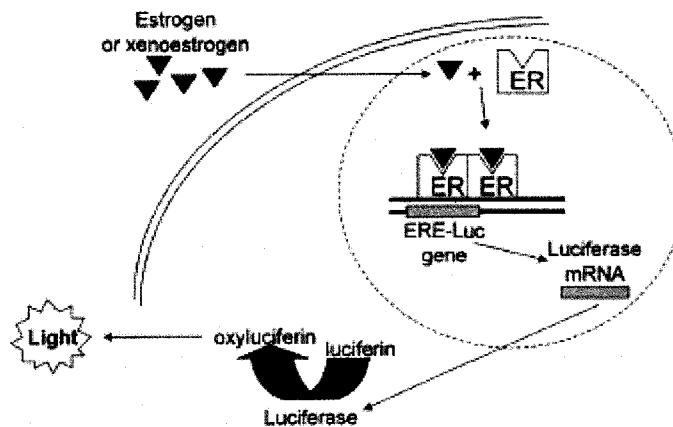


Figure 1.6 Représentation schématique du test MVLN (Snyder et *al.*, 2003a)

Il existe aussi des bio essais qui n'utilisent pas des cellules entières, évitant ainsi les difficultés rencontrées avec la perméabilité membranaire, la fonction cellulaire, et les étapes de vie de l'organisme (Campbell et *al.*, 2006). Ces bio essais, appelés immunoessais, se basent sur les propriétés de liaison entre anticorps (Abs) et antigènes (Ags). Les technologies immunochimiques les plus représentatives pour les analyses environnementales regroupent « *Enzyme-based immunoassays* » (ELISA), « *Radioimmunoassay* » (RIA) (Snyder et *al.*, 2003a), « *Flow-injection immunoassay* » (FIIA), « *Immunoaffinity column* », et les immunosenseurs (Farré et *al.*, 2005). L'ELISA offre plusieurs avantages par rapport aux autres immunoessais, car son signal est amplifié grâce à la formation d'une quantité importante de molécules produites. De plus, c'est une instrumentation robuste, fournissant des mesures rapides, et demandant peu de personnel qualifié pour son utilisation (Hintermann et *al.*, 2006). Ainsi, cette méthode est très répandue pour les analyses environnementales (Gascón et *al.*, 1997 ; Goda et *al.*, 2000 ; Valentini et *al.*, 2002 ; Schneider et *al.*, 2004 ; Hintermann et *al.*, 2006). Les principales enzymes utilisées sont la peroxydase de raifort (HRP), la phosphatase alcaline (AP) et la β -galactosidase. Les désavantages de cette méthode concernent les effets de matrice et les réactions croisées (Farré et *al.*, 2005). La méthode RIA utilise des radio-isotopes au lieu d'enzymes, comme anticorps conjugués (Snyder et *al.*, 1999). Généralement, le RIA est une technique plus performante que l'ELISA, mais c'est une méthode plus coûteuse et demandant de gérer des matériaux radioactifs (Snyder et *al.*, 2003a).

En conclusion, les tests *in vitro* représentent un système artificiel (Aerni et *al.*, 2004) et ne possèdent pas les mêmes capacités métaboliques que celles présentes dans les essais *in vivo*. Ainsi les tests *in vitro* peuvent générer des résultats erronés dus à l'incapacité d'inactiver métaboliquement une substance estrogénique (Zacharewski, 1998). En effet, Huggett et *al.* (2003) ont comparé les résultats obtenus avec le « *YES-assay* » et l'induction de VTG chez les poissons et ont remarqué que l'activité estrogénique dans le test *in vivo* était 10 fois plus élevée qu'avec le bio essai *in vitro*, dû à la présence de ligands avec un récepteur nonestrogénique, qui entraîne des effets estrogéniques chez le poisson à travers des mécanismes indirects. Ainsi, l'utilisation des essais *in vitro* peut sous estimer le potentiel estrogénique de l'eau usée (Huggett et *al.*, 2003). Donc, afin de pouvoir évaluer correctement l'activité estrogénique potentielle d'une substance ou d'un mélange complexe, il est essentiel d'utiliser une série de tests *in vitro* et *in vivo* (Aerni et *al.*, 2004 ; Zacharewski, 1998). Ainsi, les bio essais *in vitro* sont complémentaires et non des substituts aux tests *in vivo* (Zacharewski, 1997). Cependant, les tests *in vitro* produisent aussi des informations sur le mécanisme potentiel de l'action d'un produit chimique présumé estrogénique ainsi que sur l'identification de ces métabolites (Zacharewski, 1997).

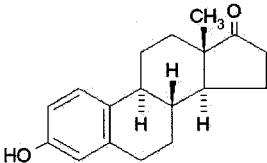
1.3 Hormones naturelles et synthétiques

La connaissance d'une pollution potentielle par les hormones remonte aux années 1980 (Layton et *al.*, 2000). Plusieurs études (Desbrow et *al.*, 1998 ; Routledge et *al.*, 1998 ; Spengler et *al.*, 2001 ; Körner et *al.*, 2001 ; Furuichi et *al.*, 2004 ; Nakada et *al.*, 2004) ont rapporté que les hormones stéroïdiennes semblent être les majeurs contributeurs à l'activité estrogénique des effluents de STEP et donc les principaux responsables de la perturbation endocrinienne observée chez les organismes aquatiques.

1.3.1 Propriétés physico-chimiques

La fonction première des estrogènes naturels est le développement et la fonction des organes sexuels femelles. Ces composés incluent l'estrone (E1), le 17 β -estradiol (β E2) et l'estriol (E3). L'estrogène synthétique, 17 α -éthynylestradiol (EE2), est un ingrédient actif présent dans les pilules contraceptives. Les principales propriétés physico-chimiques des estrogènes naturels et de EE2 sont données dans les Tableaux 1.8, 1.9, 1.10 et 1.11 (Adaptés de Young et *al.*, 2002). Leur composition chimique comprend un squelette stéroïde et un nombre de groupes substitués.

Tableau 1.8 Propriétés chimiques et physiques de E1

Nom chimique (IUPAC*)	3-hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17-one
Synonymes	Estrone, Oestrone, E1
Numéro CAS**	53-16-7
Formule chimique	C ₁₈ H ₂₂ O ₂
Structure moléculaire	
Masse molaire (g/mol)	270.37 ^[1]
Composition	C-79.96%, H-8.20%, O-11.84%
Apparence	Cristaux blancs ^[2]
Point de fusion (°C)	254.5–256 ^[2,3]
Pression de vapeur (Pa)	3 x 10 ⁻⁸ ^[4]
Solubilité dans l'eau (mg/L)	0.8–13 ^[4,5]
Log (Kow)	2.45–4.54 ^[4,6,7]
Log (Koc)	3.1–3.5 ^[4,8]
pKa	10.3–10.8 ^[5]
Temps de demi-vie (eau douce - biodégradation)	3–4 jours ^[9] ; 0.1–10.9 jours / moyenne de 3 jours ^[10]

*IUPAC : « International Union of Pure and Applied Chemistry »

**CAS : « Chemical Abstracts Service »

[1]Donné par Sigma-Aldrich

[2]IARC, 1979

[3]Merck, 1996*

[4]Lai et al., 2000

[5]Hanselman et al., 2003

[6]Sayles, 2001

[7]Estimé par Nghiem et al., 2004

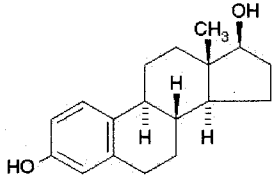
[8]Meylan et Howard, 1995

[9]Jürgens et al., 1999*

[10]Williams et al., 2001*

*Cité par Young et al., 2002

Tableau 1.9 Propriétés chimiques et physiques de β E2

Nom chimique (IUPAC)	Estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol
Synonymes	17 β -estradiol, β E2, Estradiol, Oestradiol, E2
Numéro CAS	50-28-2
Formule chimique	C ₁₈ H ₂₄ O ₂
Structure moléculaire	
Masse molaire (g/mol)	272.38 ^[1]
Composition	C-79.37%, H-8.88%, O-11.75%
Apparence	Prismes blancs/crémeux ^[2]
Point de fusion (°C)	178–179 ^[2]
Pression de vapeur (Pa)	3 x 10 ⁻⁸ à 25°C ^[3]
Solubilité dans l'eau (mg/L)	3.9–13.3 ^[4,5]
Log (Kow)	3.10–4.01 ^[5,6,7]
Log (Koc)	2.78–3.8 ^[5,8,9]
pKa	10.3–10.8 ^[4]
Temps de demi-vie (eau douce - biodégradation)	<3–4 jours ^[8] ; 0.2–8.7 jours / moyenne de 2.8 jours ^[10]
Temps de demi-vie (eau douce - photolyse)	10-12 jours ^[10]
Temps de demi-vie (estuaire - biodégradation)	6-27 jours ^[8]

[1]Donné par Sigma-Aldrich

[2]IARC, 1979

[3]Schweinfurth et al., 1996*

[4]Hanselman et al., 2003

[5]Lai et al., 2000

[6]Sayles, 2001

[7]Yoon et al., 2003

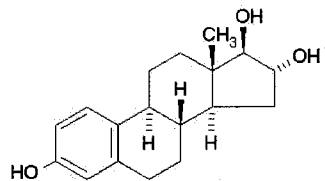
[8]Jürgens et al., 1999*

[9]Meylan et Howard, 1995

[10]Williams et al., 2001*

*Cité par Young et al., 2002

Tableau 1.10 Propriétés chimiques et physiques de E3

Nom chimique (IUPAC)	Estra-1,3,5(10)triene-3,16 α ,17 β -triol
Synonymes	Estriol, Oestriol, E3, 16 α -hydroxy-oestradiol
Numéro CAS	50-27-1
Formule chimique	C ₁₈ H ₂₄ O ₃
Structure moléculaire	
Masse molaire (g/mol)	288.38 ^[1]
Composition	C-74.97%, H-8.39%, O-16.64%
Apparence	Cristaux monocycliques ^[2]
Point de fusion (°C)	282 ^[2]
Pression de vapeur (Pa)	9 x 10 ⁻¹³ [3,4]
Solubilité dans l'eau (mg/L)	3.2–13.3 ^[5]
Log (Kow)	2.55–2.81 ^[6,7]
Log (Koc)	2.5–3.5 ^[6,8]
pKa	10.4 ^[5]

[1]Donné par Sigma-Aldrich

[2]IARC, 1979

[3]Tabak et al., 1981*

[4]Schweinfurth et al., 1996*

[5]Hanselman et al., 2003

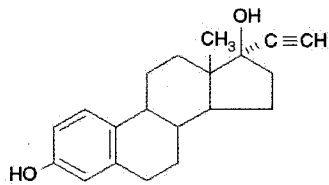
[6]Lai et al., 2000

[7]Sayles, 2001

[8]Meylan et Howard, 1995

*Cité par Young et al., 2002

Tableau 1.11 Propriétés chimiques et physiques de EE2

Nom chimique (IUPAC)	19-nor-17 α -pregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,17-diol
Synonymes	17 α -ethinylestradiol, 17 α -ethinyloestradiol, EE2
Numéro CAS	57-63-6
Formule chimique	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
Structure moléculaire	
Masse molaire (g/mol)	296.41 ^[1]
Composition	C-81.04%, H-8.16%, O-10.80%
Apparence	Fines aiguilles blanches ^[2]
Pression de vapeur (Pa)	6 x 10 ⁻⁹ ^[3]
Solubilité dans l'eau (mg/L)	4.8 ^[4,5]
Log (Kow)	3.67–4.15 ^[4,6,7,8]
Log (Koc)	3.8 ^[4,9]
pKa	10.4 ^[10]
Temps de demi-vie (eau douce - biodégradation)	17 jours ^[11] ; 46 jours ^[12]
Temps de demi-vie (eau douce - photolyse)	10–12 jours ^[11]

[1]Donné par Sigma-Aldrich

[2]IARC, 1979

[3]Schweinfurth et al., 1996*

[4]Lai et al., 2000

[5]Lee et al., 2003

[6]Sayles, 2001

[7]Yoon et al., 2003

[8]Ternes et al., 1999b

[9]Meylan et Howard, 1995

[10]Huber et al., 2003

[11]Williams et al., 2001*

[12]Jürgens et al., 1999*

*Cité par Young et al., 2002

C'est la nature de ces substituents qui est responsable de l'activité œstrogénique de ces composés (Young et al., 2002).

Il y a relativement peu d'informations disponibles sur les propriétés physico-chimiques des estrogènes ; certaines d'entre elles sont déterminées par modélisation ou par calculs plutôt que à travers des expériences en laboratoire (Young *et al.*, 2002). De l'étude des tableaux 1.8, 1.9, 1.10 et 1.11, il est possible d'effectuer les observations suivantes :

- Les quatre estrogènes présentent des valeurs faibles en pression de vapeur, ainsi ces composés ne sont pas susceptibles de se volatiliser.
- Les solubilités dans l'eau sont identiques pour chaque estrogène, dont EE2 présente la plus faible.
- Les valeurs du coefficient de partition ($\log(K_{ow})$) montrent que la sorption potentielle sur les matières organiques se ferait dans l'ordre décroissant suivant : $EE2 > E2 \sim E1 > E3$.
- Les valeurs reportées pour le temps de demi-vie de ces composés montrent que EE2 est considérablement plus persistant que les estrogènes naturels. En effet, EE2 est synthétisé afin de résister à la biodégradation pour pouvoir être effectif comme contraceptif oral. Il doit être noté que la biodégradation dans les eaux de surface peut varier suivant plusieurs facteurs, tels que la faune bactérienne et la température.

1.3.2 Entrée dans l'environnement

Les humains comme les animaux peuvent sécréter des hormones stéroïdiennes, qui finissent dans l'environnement à travers la décharge des eaux usées et la disposition des déchets animaux (Ying *et al.*, 2002b). L'organisme humain est capable de décomposer facilement et de sécréter rapidement les hormones. Elles restent très peu de temps dans l'organisme et ne s'accumulent pas dans les tissus, comme c'est le cas de certaines substances anthropiques. Mais les risques associés à la très forte consommation d'aliments contenant ces substances doivent être considérés. Les hormones de synthèse, y compris celles qui sont identiques aux hormones naturelles, telles que les contraceptifs oraux, les traitements hormonaux de substitution et certains additifs alimentaires pour animaux (par exemple), sont spécialement conçues pour agir sur le système endocrinien et le moduler. Ainsi, des hormones naturelles ou des produits de synthèse, en plus de ceux produits naturellement par l'homme et les animaux, se retrouvent dans les rejets humains, animaux, végétaux et/ou industriels (Ministère de l'écologie et du développement durable, 2003).

La source principale des estrogènes dans l'environnement a été jusqu'ici attribuée aux sécrétions humaines (DEPA, 2003) et animales. Ces substances ont été détectées dans les effluents des STEP s et dans les eaux de surface à travers le monde, incluant la France (Cargouët et *al.*, 2004), le Danemark (DEPA, 2004), les Pays-Bas (Belfroid et *al.*, 1999 ; Vethaak et *al.*, 2005), la Suède (Larsson et *al.*, 1999), l'Angleterre (Desbrow et *al.*, 1998 ; Rodgers-Gray et *al.*, 2000 ; Fawell et *al.*, 2001), l'Allemagne (Ternes et *al.*, 1999a ; Kuch et Ballschmiter, 2001 ; Beck et *al.*, 2005 ; Schlüsener et Bester, 2005), l'Italie (Baronti et *al.*, 2000 ; Laganà et *al.*, 2004), l'Espagne (Solé et *al.*, 2000 ; Petrovic et *al.*, 2002 ; Rodriguez-Mozaz et *al.*, 2004), le Canada (Lee et Peart, 1998 ; Ternes et *al.*, 1999a), la Chine (Hu et *al.*, 2005), le Japon (Nasu et *al.*, 2001 ; Tabata et *al.*, 2001 ; Isobe et *al.*, 2003) et les États-Unis d'Amérique (Folmar et *al.*, 1996 ; Snyder et *al.*, 1999 ; Huang et Sedlack, 2001). Les Tableaux 1.12, 1.13 et 1.14 présentent les concentrations observées aux affluents et effluents de STEP s, ainsi que dans les eaux de surface, à travers le monde. Il est nécessaire de souligner que les concentrations relevées dans les différentes études dépendent des méthodes d'analyse utilisées et de leurs limites de détection correspondantes (cf. Paragraphe II). En effet, la variabilité dans les concentrations reportées dépend pas seulement du pays où a été effectuée l'étude ou de l'efficacité de la STEP correspondante, mais aussi de la méthode d'analyse utilisée (Young et *al.*, 2002).

Ainsi, un grand nombre de recherches ont montré que plusieurs effluents de STEP s et plusieurs rivières (Tableaux 1.12, 1.13 et 1.14) contiennent des quantités en estrogènes suffisantes pour induire des effets néfastes chez les poissons (Tableau 1.15). Toutes études confondues, les concentrations à l'affluent de STEP sont comprises entre 1.8–130 ng/L en E1, <0.3–150 ng/L en β E2, <0.25–470 ng/L en E3 et non détecté à 7.1 ng/L en EE2. Pour les effluents de STEP, les concentrations sont de l'ordre de <0.3–76 ng/L en E1, <0.3–55 ng/L en β E2, <0.25–99 ng/L en E3 et <0.05–12 ng/L en EE2. D'après les études reportées dans le Tableau 1.14, les concentrations en rivières/eau de surface, où les composés sont soumis à la dilution, la biodégradation et la sorption, varient entre <0.1–21.7 ng/L pour E1, <0.03–7.1 ng/L pour β E2, <0.06–8 ng/L pour E3 et non détecté à 17.2 ng/L pour EE2. De plus, Ma et *al.* (2006) ont rapporté des valeurs en estrogénicité de 0.1–4.7 ng EEQ/L dans les rivières réceptrices, en Chine (Pékin).

Tableau 1.12 Concentrations en estrogènes à l'affluent des stations de traitement des eaux usées

Lieu d'échantillonnage	Concentrations à l'affluent (ng/L)					Méthode d'analyse	Référence
	E1	β E2	α E2	E3	EE2		
Paris, France	9.6-17.6	11.1-17.4	-	11.4-15.2	4.9-7.1	GC-MS	Cargouët et <i>al.</i> , 2004
Danemark	19-75	6.1-27	-	-	<1-4.8	-	DEPA, 2004
Pays-Bas	20-130	17-150	<0.7-15	-	<0.3-5.9	GC-MS-MS	Vethaak et <i>al.</i> , 2005
Angleterre	1.8-4.1	<0.3	-	-	<LOD ^[1]	GC-MS-MS	Fawell et <i>al.</i> , 2001
Allemagne	66	22.7	-	-	-	LC-MS-MS	Johnson et <i>al.</i> , 2000
Allemagne	32-87	11-22	-	54-470	<LOD ^[2]	LC-MS-MS	Schlüsener et Bester, 2005
Italie	52	12	-	80	3	LC-MS-MS	Baronti et <i>al.</i> , 2000
Rome, Italie	31	9.7	-	57	4.8	LC-MS-MS	Johnson et <i>al.</i> , 2000
Rome, Italie	100	2	-	100	20	LC-MS-MS	Gentili et <i>al.</i> , 2002
Rome, Italie	44	11	-	72	-	LC-MS-MS	D'Ascenzo et <i>al.</i> , 2003
Italie centrale	15-60	10-31	-	23-48	<LOD ^[3]	LC-MS-MS	Laganà et <i>al.</i> , 2004
Barcelone, Espagne	<2.5-115	<5-30.4	-	<0.25-70.7	<5	LC-MS	Petrovic et <i>al.</i> , 2002
Chine*	80	85	-	73	155	LC-MS-MS	Cui et <i>al.</i> , 2006

Lieu d'échantillonnage	Concentrations à l'affluent (ng/L)					Méthode d'analyse	Référence
	E1	β E2	α E2	E3	EE2		
Japon	-	20-94	-	-	-	ELISA	Nasu et <i>al.</i> , 2001
Japon	-	5	-	-	-	ELISA	Behnisch et <i>al.</i> , 2001
Japon	10-57	n.d.-21	-	27-220	n.d.	LC-MS-MS	Komori et <i>al.</i> , 2004
Australie	54.8	22.0	-	-	<5.0	GC-MS	Braga et <i>al.</i> , 2005

n.d. : non détecté [1] 0.3 ng/L [2] 2 ng/L [3] 1.6 ng/L

*Station de traitement des eaux provenant d'une industrie pharmaceutique

Tableau 1.13 Concentrations en estrogènes à l'effluent des stations de traitement des eaux usées

Lieu d'échantillonnage	Concentrations à l'effluent (ng/L)					Méthode d'analyse	Référence
	E1	β E2	α E2	E3	EE2		
Paris, France	6.2-7.2	4.5-8.6	-	5.0-7.3	2.7-4.5	GC-MS	Cargouët et <i>al.</i> , 2004
Danemark	<2-11	<1-4.5	-	-	<1-5.2	-	DEPA, 2004
Pays-Bas	<0.4-47	<0.6-12	<0.1-5	-	<0.2-7.5	GC-MS-MS	Belfroid et <i>al.</i> , 1999
Suède	5.8	1.1	-	-	4.5	GC-MS	Larsson et <i>al.</i> , 1999
Angleterre	1.4-76	2.7-48	-	-	<LOD ^[1] -4.3	GC-MS	Desbrow et <i>al.</i> , 1998
Angleterre	<LOD ^[2]	<LOD ^[2]	-	-	<LOD ^[2]	GC-MS-MS	Fawell et <i>al.</i> , 2001
Angleterre	6.4-29	1.6-7.4	-	2-4	<LOD ^[3]	GC-MS	Xiao et <i>al.</i> , 2001
Allemagne	9	<LOD ^[4]	-	-	1	GC-MS-MS	Ternes et <i>al.</i> , 1999a
Allemagne	14.6	4.6	-	-	-	LC-MS-MS	Johnson et <i>al.</i> , 2000
Allemagne	7	6	-	3	3	HRGC-MS	Kuch et Ballschmiter, 2001
Allemagne	<LOD ^[5] -18	<LOD ^[6] -15	-	-	<LOD ^[6] -12	GC-MS	Spengler et <i>al.</i> , 2001
Allemagne	<LOD ^[7] -5.3	<LOD ^[8] -8.6	-	<LOD ^[9] -99	<LOD ^[10]	LC-MS-MS	Schlüsener et Bester, 2005
Italie	3	1.4	-	20.4	0.6	LC-MS-MS	Baronti et <i>al.</i> , 2000

Lieu d'échantillonnage	Concentrations à l'effluent (ng/L)					Méthode d'analyse	Référence
	E1	βE2	αE2	E3	EE2		
Rome, Italie	24	4	-	11.7	1.4	LC-MS-MS	Johnson et al., 2000
Rome, Italie	5	-	-	-	5	LC-MS-MS	Gentili et al., 2002
Rome, Italie	17	1.6	-	2.3	-	LC-MS-MS	D'Ascenzo et al., 2003
Italie centrale	5-30	3-8	-	<LOD ^[11] -1	<LOD ^[12]	LC-MS-MS	Laganà et al., 2004
Espagne	<2.5-8.1	<5-14.5	-	<0.25-21.5	<5	LC-MS	Petrovic et al., 2002
Chine*	17	23	-	11	51	LC-MS-MS	Cui et al., 2006
Japon	-	<LOD ^[1] -55	-	-	-	ELISA	Nasu et al., 2001
Japon	-	<LOD ^[4]	-	-	-	ELISA	Behnisch et al., 2001
Japon	-	12-18	-	-	-	-	Tabata et al., 2001
Japon	2.5-34	0.3-2.5	-	-	-	LC-MS-MS	Isobe et al., 2003
Japon	n.d.-180	n.d.-11	-	n.d.-5.8	n.d.	LC-MS-MS	Komori et al., 2004
Canada	6-14	<5	-	<10-33	-	GC-MS	Lee et Peart, 1998
Australie	<0.1	<0.1	-	-	<0.1	GC-MS	Braga et al., 2005
<i>n.d. : non détecté</i> <i>ng/L [9] 5 ng/L</i> <i>pharmaceutique</i>							
<i>[1] 0.2 ng/L [2] 0.3 ng/L [3] 0.05 ng/L [4] 1 ng/L [5] 0.7 ng/L [6] 0.4 ng/L [7] 0.7 ng/L [8] 2.6</i> <i>[10] 2 ng/L [11] 0.5 ng/L [12] 1.1 ng/L</i> <i>*Station de traitement des eaux provenant d'une industrie</i>							

Tableau 1.14 Concentrations en estrogènes présents dans les rivières/eaux de surface

Lieu d'échantillonnage	Concentrations (ng/L)					Méthode d'analyse	Référence
	E1	β E2	α E2	E3	EE2		
Paris, France	1.1-3.0	1.4-3.2	-	1.0-2.5	1.1-2.9	GC-MS	Cargouët et <i>al.</i> , 2004
Pays-Bas	<0.1-3.4	<0.3-5.5	<0.1-3	-	<0.1-4.3	GC-MS-MS	Belfroid et <i>al.</i> , 1999
Aurtiche	n.d.-4.6	n.d.-1.2	n.d.-0.31	n.d.-1.9	n.d.-0.33	HRGC-MS	Bursch et <i>al.</i> , 2004
Angleterre	0.2-10	<LOD ^[1] -7.1	-	<LOD ^[2] -3.1	<LOD ^[3]	GC-MS	Xiao et <i>al.</i> , 2001
Angleterre	<LOD ^[4] -12.2	<LOD ^[4] -8.76	-	-	<LOD ^[5] -4.6	GC-MS-MS	Williams et <i>al.</i> , 2001*
Allemagne	<LOD ^[5]	<LOD ^[5]	-	-	<LOD ^[5]	GC-MS-MS	Ternes et <i>al.</i> , 1999a
Allemagne (mer baltique)	0.10-0.53	<LOD ^[6]	-	<LOD ^[7]	1.7-17.2	LC-MS-MS	Beck et <i>al.</i> , 2005
Rome, Italie	1.5	0.11	-	0.33	0.04	LC-MS-MS	Baronti et <i>al.</i> , 2000
Italie centrale	5-12	2-6	-	2-5	<LOD ^[4] -1	LC-MS-MS	Laganà et <i>al.</i> , 2004
Espagne (NE)	4.3	6.3	-	8	-	LC-MS	Petrovic et <i>al.</i> , 2002
Espagne	<LOD ^[8] -21.7	-	-	-	-	LC-MS	Rodriguez-Mozaz et <i>al.</i> , 2004
Chine	1.1	0.2	-	-	-	LC-MS	Hu et <i>al.</i> , 2005
Japon	-	1.8-2.1	-	-	-	-	Tabata et <i>al.</i> , 2001

Lieu d'échantillonnage	Concentrations (ng/L)					Méthode d'analyse	Référence
	E1	β E2	α E2	E3	EE2		
Japon	-	<LOD ^[9]	-	-	-	ELISA	Behnisch et <i>al.</i> , 2001
Tokyo, Japon	-	32	-	5.5	-	TR-FIA	Majima et <i>al.</i> , 2002
Japon	0.2-6.6	0.6-1.0	-	-	-	LC-MS-MS	Isobe et <i>al.</i> , 2003
California, USA	-	0.05-0.8	-	-	<0.05-0.07	ELISA	Huang et Sedlak, 2001
California, USA	-	0.38	-	-	-	GC-MS-MS	Huang et Sedlak, 2001

n.d. : non détecté *Cité par Young et *al.* (2002)

[1] 0.03 ng/L [2] 0.06 ng/L [3] 0.05 ng/L [4] 0.4 ng/L [5] 0.5 ng/L [6] 0.30 ng/L [7] 1.0 ng/L [8] 2.5 ng/L [9] 1 ng/L

Tableau 1.15 Les plus basses concentrations observées (« *Lowest-Observed-Effect-Concentration* » – LOEC), induisant de la VTG chez les organismes aquatiques

EDC	LOEC (ng/L)	Organismes étudiés	Référence
E1	25-50	Truites arc-en-ciel mâles	Routledge et <i>al.</i> , 1998
	3.2	Truites arc-en-cieljeunes femelles	Thorpe et <i>al.</i> , 2001*
βE2	1	Truites arc-en-ciel adultes mâles	Purdom et <i>al.</i> , 1994 ; Hansen et <i>al.</i> , 1998
	1-10	Truites arc-en-ciel mâles	Routledge et <i>al.</i> , 1998
	12	Truites arc-en-ciel jeunes femelles	Thorpe et <i>al.</i> , 2001*
	5	Poissons adultes mâles (<i>Japanese medaka</i>)	Tabata et <i>al.</i> , 2001
	1-10	Carpes mâles	Petrovic et <i>al.</i> , 2002
EE2	0.1	Truites arc-en-ciel adultes mâles	Purdom et <i>al.</i> , 1994
	0.1-10	Truites arc-en-ciel jeunes	Larsson et <i>al.</i> , 1999
	10	Dard-perches femelles	Van den Belt et <i>al.</i> , 2001
	1	Truites arc-en-cieljeunes femelles	Thorpe et <i>al.</i> , 2001*
	<10	Poissons tête-de-boule	Van Aerle et <i>al.</i> , 2002
	1	Poissons tête-de-boule	Pawlowski et <i>al.</i> , 2004

*Cité par Young et *al.* (2002)

Concernant l'eau potable, Kuch et Ballschmiter (2001) ont rapporté des concentrations en E1, βE2 et EE2 de 0.2–0.6 ng/L (identification positive sur 4/10 échantillons), 0.2–2.1 ng/L (identification positive sur 5/10 échantillons) et 0.15–0.5 ng/L (identification positive sur 4/10

échantillons), respectivement. La méthode d'analyse employée était le GC-MS et trois systèmes allemands de traitement d'eau potable ont été évalués.

Swartz et *al.* (2006) ont évalué la contamination en E1 et β E2 des eaux souterraines se trouvant à proximité de systèmes septiques. Ces systèmes de traitement desservent approximativement 25% des ménages aux États-Unis d'Amérique. Les concentrations relevées dans différentes fosses septiques (Cape Cod, MA, USA) s'échelonnaient de 49–74 ng/L et 16–19 ng/L en E1 et β E2, respectivement. Swartz et *al.* (2006) ont observé que les concentrations en E1 et β E2 dans les zones anoxiques (eaux souterraines profondes) sont similaires aux concentrations des fosses septiques. De plus, à 6 m du puit de lixiviats, des concentrations de 20 ng/L et 3.0 ng/L en E1 et β E2, respectivement, ont pu être relevées (Swartz et *al.*, 2006).

La présence des estrogènes naturels et synthétiques dans l'environnement a été principalement allouée à leur enlèvement incomplet dans les procédés de traitement des eaux usées (Layton et *al.*, 2000 ; Körner et *al.*, 2000 ; López de Alda et Barceló, 2001 ; DEPA, 2002 ; Kolpin et *al.*, 2002 ; Legler et *al.*, 2002 ; Gomes et *al.*, 2003 ; Snyder et *al.*, 2003b ; Filali-Meknassi et *al.*, 2004 ; Sumpter, 2005). En effet, dès 1980, plusieurs expériences avec des poissons mis en cage ont soulevé la possibilité que les effluents des STEP, recevant principalement des eaux usées domestiques, sont l'une des sources d'estrogènes contaminant l'environnement aquatique (Baronti et *al.*, 2000 ; Rudder et *al.*, 2004, Höger et *al.*, 2006). Par ailleurs, des scientifiques anglais ont montré que la truite arc-en-ciel mâle produit de la VTG, due à une exposition à des effluents d'eaux usées ou à des eaux de surface souillées (Harries et *al.*, 1996, 1997). Des études de terrain employant des cages contenant des truites (*Oncorhynchus mykiss*), des gardons cyprinicoles sauvages (*Rutilus rutilus*) (Jobling et *al.*, 1998) et des flets marins (*Platichthys flesus*) (Allen et *al.*, 1999 ; Lye et *al.*, 1997) ont démontré que l'estrogénicité persiste dans les eaux réceptrices et les niveaux présents dans les rivières et les estuaires sont assez élevés pour provoquer des conséquences sérieuses sur la reproduction des espèces. Petrovic et *al.* (2002) ont montré que les composés E3 et E1, détectés dans les eaux de rivière, seraient responsables de l'augmentation de la VTG observée chez les carpes mâles (*Cyprinus carpio*) en aval de STEP, en Espagne. De plus, les estrogènes naturels et synthétiques (tels que β E2 et EE2) semblent être les responsables de la perturbation endocrinienne chez les poissons (Routledge et *al.*, 1998 ; Desbrow et *al.*, 1998). D'autres recherches ont aussi prouvé que les oiseaux, les reptiles et les

mammifères dans des milieux pollués subissent aussi des changements du système reproducteur endocrinien (Preziosi, 1998).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que même de faibles concentrations (ng/L) en β E2 peuvent induire de la VTG chez les espèces mâles et les jeunes truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) expérimentalement exposés (Sumpter et al., 1996 ; Routledge et al., 1998). En effet, Purdom et al. (1994) et Hansen et al. (1998) ont remarqué que des concentrations en β E2 aussi faibles que 1 ng/L induisent de la VTG chez les truites mâles, alors que Petrovic et al. (2002) ont rapporté des niveaux ayant un effet estrogénique pour les poissons s'échelonnant de 1 à 10 ng/L. Par ailleurs, Larsson et al. (1999) ont noté que le EE2 peut être un danger potentiel pour les poissons et les autres organismes aquatiques, même présent à des concentrations de 0.1–10 ng/L. Dans l'étude réalisée par Purdom et al. (1994), le composé EE2 a pu induire de la VTG chez les poissons mâles à partir d'une concentration de 0.1 ng/L. Les différentes limites estrogéniques pouvant induire de la VTG chez un organisme sont synthétisées dans le Tableau 1.15. Cependant, la détermination des niveaux seuils d'estrogènes provoquant des troubles chez les organismes aquatiques, dépend des limites de détection des méthodes d'analyse employées.

Young et al. (2002), dans le rapport technique de l'agence environnementale d'Angleterre, ont proposé des concentrations prédites comme n'induisant pas d'effets estrogéniques (« *Predicted-No-Effect-Concentration* » – PNEC) en β E2 et EE2 dans les eaux douces. Afin de déterminer les PNECs, Young et al. (2002) se sont basés sur plusieurs études de toxicité portant sur divers organismes aquatiques et différents effets estrogéniques. Ils ont donc proposé des PNECs pour β E2 et EE2 de 1.0 ng/L et 0.1 ng/L, respectivement. Vu le peu d'études portant sur les toxicités de E1 et E3, Young et al. (2002) n'ont pas pu déterminer de PNECs pour ces composés. Cependant, considérant les données disponibles sur le potentiel estrogénique relatif de E1 par rapport à β E2, Young et al. (2002) ont suggéré une échelle de concentrations prévisionnelle égale à 3–5 ng/L pour E1 dans les eaux douces.

1.3.3 Sécrétion des hormones naturelles et synthétiques

La principale source des estrogènes naturels correspond aux sécrétions humaines et animales (Young et al., 2002 ; Khanal et al., 2006). Les trois estrogènes naturels (E1, β E2 et E3) sont des hormones stéroïdiennes femelles, qui sont produites naturellement par les humains femelles et mâles. Les estrogènes stéroïdiens se retrouvent principalement dans les urines (Johnson et al.,

2000 ; Jürgens *et al.*, 2002). En effet, Ranney (1977, cité par Johnson *et al.*, 2000) a estimé que seulement 5% du β E2 sont sécrétés dans les fèces. Par ailleurs, Johnson *et al.* (2000) ont négligé dans leur étude la quantité des estrogènes sécrétés dans les excréments, parce que la majorité de cette source serait absorbée et dégradée par les bactéries présentes dans les fèces avant d'atteindre les STEPs. La production et la sécrétion des hormones stéroïdiennes varient durant la vie (DEPA, 2002) (Tableau 1.16). Un nombre important de facteurs influence la quantité d'estrogènes sécrétés, tel que le sexe, la race, le statut hormonal (pré vs. post-ménopause), le moment de menstruation, l'utilisation de contraceptifs oraux, le fait de fumer. Les femmes enceintes sécrètent le plus d'estrogènes naturels, suivies par les femmes qui ne sont pas ménopausées, puis les utilisatrices de contraception orale et les hommes, avec les femmes ménopausées sécrétant le moins (Young *et al.*, 2002). Dans le cas des femmes enceintes, l'estrogène naturel sécrété en grande quantité correspond à E3 (Baronti *et al.*, 2000).

Tableau 1.16 Estrogènes sécrétés dans les urines de l'être humain

EDC (μ g/jour)	Homme	Femme			
		Ménopausée	Pendant les menstruations		Enceinte
E1	3.9 ^[3]	4 ^[3]	8 ^[3]	10-100 ^[1]	600 ^[3]
β E2	1.6 ^[3]	2.3 ^[3]	3.5 ^[3]	10-100 ^[1]	259 ^[3]
E3	1.5 ^[3]	1 ^[3]	4.8 ^[3]	10-100 ^[1]	6000 ^[3]
EE2	-	-	-	10-100 ^[1]	-
Estrogène	2-25 ^[2]	5-10 ^[2]	-	-	30000 (principalement du E3) ^[1] 2700 ^[4]

[1] Baronti *et al.*, 2000

[2] DEPA, 2003

[3] Reporté par Johnson *et al.*, 2000

[4] Shore *et al.*, 1993

De plus, les estrogènes naturels et synthétiques sont utilisés en large quantité dans les médicaments, comme les contraceptifs et les médicaments utilisés en estrogénothérapie. Approximativement 65% et 15% du β E2, ou du E1, administrés oralement sont respectivement sécrétés dans les urines et les fèces (DEPA, 2002). Un autre composé largement sécrété par les

êtres humains est le EE2, présent dans beaucoup de contraceptifs, et largement répandu dans les doses orales quotidiennes s'étendant de 20 à 50 µg (Arcand-Hoy et *al.*, 1998 ; Snyder et *al.*, 1999) avec 35 µg la dose la plus prescrite (Arcand-Hoy et *al.*, 1998). De la quantité de EE2 ingéré, il est supposé que 26% sont rejetés par le corps humain (Reed et *al.*, 1972, cité par Johnson et *al.*, 2000). Selon Johnson et *al.* (2000), des valeurs de 30 à 90% du EE2 ingéré seraient sécrétés dans les urines. D'ailleurs, López de Alda et Barceló (2001) ont rapporté que la présence du EE2 dans l'environnement pourrait avoir augmenté nettement depuis les dernières décennies, en raison de l'utilisation répandue des pilules contraceptives et d'autres médicaments, préparés à base d'estrogènes et d'autres composés analogues, pour le traitement du cancer ou des perturbations hormonales, comme la ménopause. En effet, les contraceptifs oraux sont les produits pharmaceutiques les plus vendus dans le monde. Sur une échelle globale, Murad et Kuret (1991, cité par Kozak et *al.*, 2001) ont estimé qu'approximativement 60 millions de femmes utilisent les contraceptifs oraux. De nos jours, il est évalué que plus de 100 millions de femmes dans le monde (Population Reports, 2000), dont plus de 10 millions aux États-Unis d'Amérique (Arcand-Hoy et *al.*, 1998), ont recours aux pilules contraceptives. Une utilisation annuelle de 0.029 tonnes de EE2 a été estimée en Angleterre (Webb, 2000, cité par Young et *al.*, 2002). En comparaison, il a été évalué que 0.088 tonnes de contraceptifs oraux (EE2 et mestranol) sont utilisées annuellement aux États-Unis (Arcand-Hoy et *al.*, 1998). Par ailleurs, les estrogènes conjugués utilisés pour le traitement du cancer, du déséquilibre hormonal, de l'ostéoporose, etc. correspondent aux deuxièmes médicaments les plus prescrits aux États-Unis d'Amérique et sont administrés oralement à des doses de 0.3 à 2.5 mg (Snyder et *al.*, 1999). De plus, depuis 25 ans, il est reconnu que les estrogènes synthétiques, EE2 et mestranol, utilisés dans les contraceptifs ne sont pas complètement biodégradés le long des STEP (Körner et *al.*, 2000). Ainsi, l'utilisation croissante des hormones naturelles et synthétiques dans les médicaments mène à une augmentation de la présence de ces composés dans l'environnement (Kuster et *al.*, 2004).

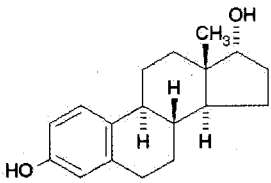
Deux autres sources potentielles d'estrogènes synthétiques pourraient être d'une part les effluents des industries produisant ces composés, résultant à une contamination locale du média environnemental, d'autre part la disposition des pilules contraceptives périmées ou non voulues, qui sont jetées soit dans la poubelle domestique, soit dans les toilettes (Young et *al.*, 2002). Cui et *al.* (2006) ont évalué les concentrations en estrogènes à l'affluent et à l'effluent d'une station

de traitement d'eaux usées provenant d'une industrie pharmaceutique en Chine (Tableaux 1.12 et 1.13). Ils ont relevé des concentrations encore très élevées à l'effluent : 17 ng/L en E1, 23 ng/L en β E2, 11 ng/L en E3, et 51 ng/L en EE2, largement supérieures, par exemple, aux LOECs induisant de la VTG chez les organismes aquatiques (Tableau 1.15).

En plus des effluents des STEP, la sécrétion des estrogènes naturels par les animaux de ferme (tels que bétails, moutons, porcs, volailles) représente potentiellement une source importante de pollution de l'environnement (Shore et al., 1993 ; Arcand-Hoy et al., 1998 ; Ying et al., 2002b ; Lee et al., 2003 ; DEPA, 2003 ; Hanselman et al., 2003 ; Kolodziej et al., 2004). Shore et al., (1993) ont comparé les concentrations en estrogènes naturels à l'effluent de STEP domestiques et de petites unités de fermes, basé sur des données obtenues par des techniques immunoessai. Suivant la saison, les concentrations étaient de 40–120 et 150–350 ng/L, respectivement, indiquant que les unités de ferme peuvent être une source importante d'estrogènes naturels. Cependant, les décharges attribuables à l'écoulement agricole, l'épandage, ou à l'infiltration dans les eaux souterraines des déchets traités ne sont pas généralement mesurés (Kolodziej et al., 2004). Sarmah et al. (2006) ont examiné les concentrations en E1, β E2, 17 α -estradiol (α E2, Tableau 1.17), E3 et EE2 présents dans les déchets issus des fermes laitières (7), d'une porcherie et d'une ferme avec des chèvres en Nouvelle-Zélande. Ces déchets contenaient des fèces, des urines, et les liquides utilisés pour le lavage des hangars et subissaient un traitement d'oxydation via des étangs de stabilisation. Par SPE/GC-MS, Sarmah et al. (2006) ont évalué les concentrations en estrogènes après le passage de l'effluent dans les étangs. Les résultats sont résumés dans le Tableau 1.18 et démontrent la présence de quantités significatives en E1, β E2 et α E2 dans les déchets animaux après traitement, particulièrement pour les fermes laitières. Comme ces déchets peuvent être par la suite appliqués sur les terres ou rejetés dans les eaux, Sarmah et al. (2006) ont conclu qu'une contamination des eaux de surface et souterraines aux alentours de ce type de fermes peut être envisageable.

Les principaux composés sécrétés par les animaux de ferme sont le E1, le β E2, le α E2 et leurs conjugués (tels que les glucuroconjugués et les sulfates) (Lange et al., 2002 ; DEPA, 2003). Contrairement aux humains, la sécrétion du α E2 est significative chez les animaux de ferme, selon Okkerman et al. (2003, cité par DEPA, 2003) supérieur à 56%.

Tableau 1.17 Propriétés chimiques et physiques de α E2

Nom chimique (IUPAC)	Estra-1,3,5(10)-triene-3,17 α -diol
Synonymes	17 α -estradiol, 17 α -oestradiol, α E2
Numéro CAS	57-91-0
Formule chimique	C ₁₈ H ₂₄ O ₂
Structure moléculaire	
Masse molaire (g/mol)	272.38 ^[1]
Composition	C-79.37%, H-8.88%, O-11.75%
Point de fusion (°C)	221.5 ^[2]
Pression de vapeur (Pa)	3 x 10 ⁻⁸ ^[3]
Solubilité dans l'eau (mg/L)	3.2–13.3 ^[2,3]
Log (Kow)	3.4–4.01 ^[2,3,4]
Log (Koc)	4.205 ^[2]

[1]Donné par Sigma-Aldrich

[2]de Voogt et van Hattum, 2003

[3]Lai et al., (2002

[4]DEPA, 2003

Tableau 1.18 Concentrations (ng/L) en estrogènes dans les déchets animaux après traitement (Tiré de Sarmah et al., 2006)

EDC	Concentration (ng/L)		
	Fermes laitières (7)	Ferme avec des chèvres	Porcherie
E1	40.9-3123	157	27.3
β E2	n.d.-331	47.1	8.0
α E2	18.8-1028	172	10.9
E3	n.d.	n.d.	n.d.
EE2	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. : non détecté

L'aquiculture représente une autre opération agricole intensive, source d'hormones stéroïdiennes pour les eaux de surface. En effet, les pratiques rudimentaires en traitement des eaux usées utilisées par la plupart des industries d'aquiculture sont peu susceptibles d'enlever les hormones stéroïdiennes (Kolodziej et *al.*, 2004). Kolodziej et *al.* (2004) ont étudié les contributions des hormones aux eaux de surface des exploitations laitières et des opérations d'aquiculture en Californie centrale (États-Unis d'Amérique). Ils ont rapporté d'une part que dans une lagune à déchets de produits laitiers, les estrogènes endogènes : β E2 et E1, et l'hormone androgène : testostérone, ont été détectés à des concentrations aussi élevées que 650 ng/L. Ainsi, bien que la voie de transport par laquelle les hormones atteignent les eaux de surface soit peu claire, les échantillons d'eau de surface collectés autour d'industries laitières, et ne présentant aucune source significative d'eau usée municipale, renferment parfois du β E2, du E1, et de la testostérone à des concentrations comparables à celles observées dans les effluents d'eaux usées municipales. D'autre part, Kolodziej et *al.* (2004) ont noté que les concentrations en hormones stéroïdiennes observées au niveau des effluents des industries d'aquiculture et dans les eaux de surface d'une zone agricole intensive sont également comparables aux concentrations typiquement observées dans les effluents des STEPs municipales.

Par ailleurs, le fumier de bétail et de volaille a été rapporté comme une source de β E2, de testostérone et de trenbolone (Lee et *al.*, 2003). En outre, Hanselman et *al.* (2003) ont rapporté que l'engrais de bétail contient des quantités appréciables du β E2, de E1 et de E3, qui peuvent potentiellement contaminer les eaux de surface et souterraines. Par ailleurs, de grandes quantités de déchets et de biosolides des animaux sont généralement appliquées sur les champs agricoles, et ainsi les estrogènes pourraient se retrouver dans les eaux superficielles voisines ou infiltrer, par le sol, les eaux souterraines (Lee et *al.*, 2003). Cependant, aux États-Unis d'Amérique, il n'est pas nécessaire de traiter le fumier avant son épandage, tant que le fumier n'est pas rejeté directement dans les eaux (Khanal et *al.*, 2006). Par ailleurs, malgré l'évidence que des estrogènes fertilisants peuvent être rejetés dans l'environnement en grande quantité et que les eaux de surface et les eaux souterraines peuvent être affectées par ces composés (Folmar et *al.*, 1996), leur abondance dans les systèmes de traitement et de stockage des déchets animaux est mal documentée, rendant ainsi difficile de déterminer quelles lignes de partage des eaux sont exposées au plus grand risque d'une telle pollution (Raman et *al.*, 2004).

Les quantités d'estrogènes sécrétées par les animaux domestiques dépendent de l'espèce animale et du type de production animale. En effet, les bétails sécrètent plutôt, via les fèces (58%), du β E2, α E2, E1 en tant que métabolites libres et conjugués, tandis que les porcs et la volaille sécrètent plutôt, dans les urines (96% et 69%, respectivement), du α E2, E1, E3 ainsi que des conjugués (Hanselman et *al.*, 2003). Par conséquent, les évaluations des quantités totales sécrétées sont entourées d'incertitudes, de plus que les différences régionales dans la pratique agricole animale doivent être considérées (DEPA, 2003). De plus, des estrogènes stéroïdiens sont fréquemment donnés aux animaux de ferme comme hormones de croissance, ce qui pourrait augmenter la quantité d'estrogènes rejetés par les animaux dans l'environnement (Khanal et *al.*, 2006). Callantine et *al.* (1961, cité par Khanal et *al.*, 2006) ont montré que le β E2 administré chez les animaux de ferme pourrait augmenter de 5–6 fois la quantité de β E2 rejetée dans les urines. Une vue d'ensemble de différentes évaluations de quantité d'estrogènes sécrétés par les animaux de ferme est résumée dans le Tableau 1.19, cependant les données disponibles sur la quantité de stéroïdes sexuels sécrétée par le bétail sont encore limitées (Lange et *al.*, 2002). En effet, en raison de la nature de la matrice et de la difficulté qui en résulte pour détecter les estrogènes, très peu d'investigations sont effectuées sur la détermination des concentrations en estrogènes d'origine animale dans le fumier et le sol.

Par ailleurs, une autre source possible de pollution, mais souvent négligée, serait les résidus d'hormones dans les viandes des animaux domestiques traités avec des hormones de croissance (Andersson et Skakkebæk, 1999). En effet, le traitement des bétails avec les hormones naturelles ou synthétiques est un procédé très rentable pour les producteurs de bétails (Andersson et Skakkebæk, 1999). Puisque β E2, la progestérone et la testostérone permettent certains effets de croissance chez les animaux, des stéroïdes sont fréquemment employés dans la production animale, afin de contrôler le cycle oestral, de traiter les problèmes de reproduction et provoquer l'avortement (Refsdal, 2000). Cependant, cette pratique pourrait considérablement augmenter la génération des hormones stéroïdiennes dans les urines des bétails (Ying et *al.*, 2002b).

Ainsi, il existe des risques associés à une exposition directe ou indirecte, notamment une absorption involontaire d'hormones de synthèse (ou de croissance) par des populations non ciblées, due, par exemple, à la présence de résidus de ces substances dans l'alimentation ou dans les eaux résiduaires (CCE, 2001). En effet, les stéroïdes exogènes sont très utilisés dans les

industries de transformation des viandes animales aux États-Unis d'Amérique depuis les 50 dernières années, ainsi qu'au Canada, en Australie et en Nouvelle-Zélande (Andersson et Skakkebak, 1999 ; Lange et *al.*, 2002). En effet, selon l'association américaine « *Cattlemen on the Hill* », Lange et *al.* (2002) ont rapporté qu'environ 63% des cheptels bovins aux États-Unis d'Amérique sont traités par des hormones de croissance. Et Thacker (2004) a signalé que 10 millions de vaches et 43 millions de porcs aux États-Unis d'Amérique sécrètent un mélange quotidien de 10–30 kilogrammes de β E2 et de 20–80 kg de E1. « *The Joint Food and Agricultural Organisation/World Health Organisation (FAO/WHO) Expert Committee on Food Additives* » (JECFA) et « *the US Food and Drug Administration* » (FDA) considéraient, en 1988, que les résidus trouvés dans les viandes des animaux traités ne posaient pas de problème pour la consommation (Andersson et Skakkebak, 1999). Cependant, Andersson et Skakkebak (1999) ont réévalué les conclusions du JECFA concernant les résidus de β E2 dans les viandes à la lumière de données scientifiques récentes. Ils ont pu conclure que des effets nuisibles sur la santé humaine par la consommation de la viande des animaux traités aux hormones ne peuvent pas être exclus. En Europe, l'utilisation de ces stéroïdes pour la production des viandes a été interdite en 1989 (Andersson et Skakkebak, 1999). Par ailleurs, le 30 avril 1999, le Comité Scientifique des Questions Vétérinaires en rapport avec la Santé Publique (CSQVSP) a émis un avis concernant les risques pour la santé humaine liés à la présence de résidus d'hormones dans la viande de bœuf et les produits à base de viande bovine. Pour les six substances examinées (3 hormones naturelles ou identiques aux hormones naturelles : β E2, progestérone, testostérone et 3 hormones de synthèse: acétate de mélangestrol [MGA], trenbolone et zeranol) (Tableau 1.20), le comité a conclu que des effets endocriniens étaient envisageables, de même que des effets sur le développement et des effets immunologiques, neurobiologiques, immunotoxiques, génotoxiques et cancérogènes. De plus, des concentrations d'hormones stéroïdiennes (E2, E1, progestérone, testostérone) ont aussi été détectées chez les poissons, les volailles, les œufs, les porcs, le fromage, le lait et ses produits dérivés (Hartmann et *al.*, 1998). Le CSQVSP a également précisé qu'un nombre considérable d'éléments récents tend à prouver que le β E2 (estrogène naturel sécrété notamment par les ovaires de la femme adulte) doit être considéré comme une substance cancérogène. Cependant, une hormone synthétique équivalente (forme identique à cette hormone naturelle) est autorisée et largement utilisée comme hormone de croissance dans certains pays (CCE, 2001).

Tableau 1.19 Estimation des concentrations en estrogènes sécrétés par des animaux domestiques

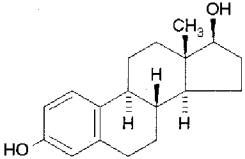
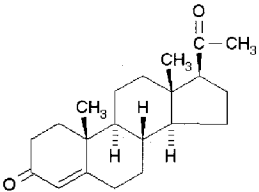
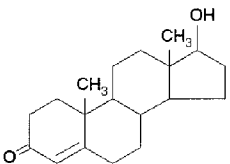
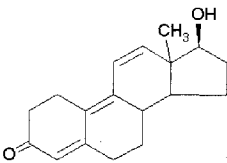
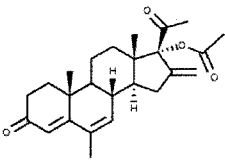
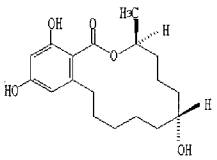
		Estrogène			E1	βE2	αE2		
Animaux domestiques	Vache	Selles	30µg/kg ^[3]	299µg/j	-	-	-	-	-
		Urine	15µg/L ^[3]	2.7mg/j* ^[2]	-	-	-	-	-
		-	1.3mg/j ^[3]	-	-	13ng/L ^[1]	-	-	-
	Truie	Selles	5.65-11.3µg/kg	120µg/j	-	-	-	-	-
		Urine	1.13mg/kg* ^[3]	192µg/j* ^[2]	-	-	-	-	-
	Brebis	Selles	-	23µg/j	-	-	-	-	-
		Urine	-	52µg/j* ^[2]	-	-	-	-	-
	Poule	Selles	-	20µg/j ^[2]	-	-	-	-	-
		Urine	-	-	-	-	-	-	-
		Déchets	-	-	14-533ng/g ^[4]	-	44ng/g ^[4]	-	-
	Animal	Fumier	-	-	28-72ng/g ^[5]	-	46-50ng/g ^[5]	120-190ng/g ^[5]	-
Pays de l'étude		Pays-Bas	Allemagne	Australie	Pays-Bas	-	Australie	Pays-Bas	

* Femelle en gestation

[1] Erb et al., 1977, cité par Ying et al., 2002b [2] Lange et al., 2002 [3] Okkerman et al., 2003, cité par DEPA, 2003

[4] Shemesh et Shore, 1994, cité par Ying et al., 2002b [5] Vethaak et al., 2002, cité par DEPA, 2003

Tableau 1.20 Représentation des 6 principales hormones de croissance

Hormones de croissance	Structure	Formule	Masse molaire (g/mol) *
βE2		C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38
Progestérone		C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46
Testostérone		C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.42
Trenbolone		C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.37
Mélangestrol		C ₂₅ H ₃₂ O ₄	396.52
Zeranol		C ₁₈ H ₂₆ O ₅	322.40

* Donnée par Sigma-Aldrich

Ainsi, l'utilisation d'hormones de croissance est devenue une préoccupation patente, depuis que non seulement des hormones résiduelles ont été détectées dans les viandes, mais également dans les sols et les eaux à cause des excréments des animaux (Lange et *al.*, 2002). Par exemple, Schiffer et *al.* (2001) ont rapporté que le fumier des bétails traités avec de l'acétate de trenbolone (TbA) et du MGA contenait 5–75 ng/g TbOH et 0.3–8 ng/g MGA. Cependant, il n'y a pas assez

de données sur la quantité additionnelle d'hormones atteignant l'environnement due au traitement hormonal des animaux de ferme (Lange et *al.*, 2002).

1.4 Traitements des stations d'épuration

La perturbation endocrinienne est devenue un sujet de recherche majeur ces dix dernières années (Matthiessen, 2003). De nos jours, de très bonnes évidences supportent l'hypothèse que la perturbation endocrinienne des organismes aquatiques (tels que la féminisation des poissons mâles) vivants dans les rivières réceptrices des effluents de STEP est due à la présence de produits chimiques estrogéniques à l'effluent (Harries et *al.*, 1997 ; Jobling et *al.*, 1998 ; Ternes et *al.*, 1999a ; Belfroid et *al.*, 1999 ; Larsson et *al.*, 1999 ; Spengler et *al.*, 2001 ; Kolpin et *al.*, 2002 ; Legler et *al.*, 2002 ; Snyder et *al.*, 2003b ; Kavanagh et *al.*, 2004).

De raisonnables progrès ont été faits pour identifier et quantifier les principaux produits chimiques présents dans les effluents de STEP (Sumpter et *al.*, 2006). Desbrow et *al.* (1998) ont montré que les estrogènes naturels E1 et β E2 et l'estrogène synthétique EE2 représentent les principaux composés estrogéniques de la plupart des effluents de STEP. Plusieurs autres études ont supporté ces conclusions (Spengler et *al.*, 2001 ; Körner et *al.*, 2001 ; Furuichi et *al.*, 2004 ; Nakada et *al.*, 2004). Par exemple, des recherches ont montré que pour des stations de traitements à boues activées, jusqu'à 40% des hormones stéroïdiennes naturelles et synthétiques peuvent passer à travers le système de traitement (Lee et Peart, 1998 ; Baronti et *al.*, 2000 ; Johnson et *al.*, 2000 ; Nasu et *al.*, 2001). Par ailleurs, il existe certains endroits, tels que le point de rejets des industries textiles, où les produits chimiques alkylphénoliques (tels que NP et ses éthoxylates) (Figure 1.7) apparaissent de contribuer de façon significative au potentiel global estrogénique des rivières (Solé et *al.*, 2000 ; Sheahan et *al.*, 2002 ; Quiros et *al.*, 2005). Ainsi, il semble très probable que les hormones stéroïdiennes et/ou les alkylphénols soient la principale cause de la perturbation endocrinienne observée chez les poissons, dans la plupart des cas (Sumpter et *al.*, 2006). Par ailleurs, les composés estrogéniques persistants peuvent aussi se retrouver dans l'eau potable destinée à la consommation, puisque beaucoup de communautés mondiales utilisent, pour leur production d'eau potable, des ressources en eau qui contiennent une partie significative de l'eau provenant des rivières et des nappes phréatiques (Filali-Meknassi et *al.*, 2004).

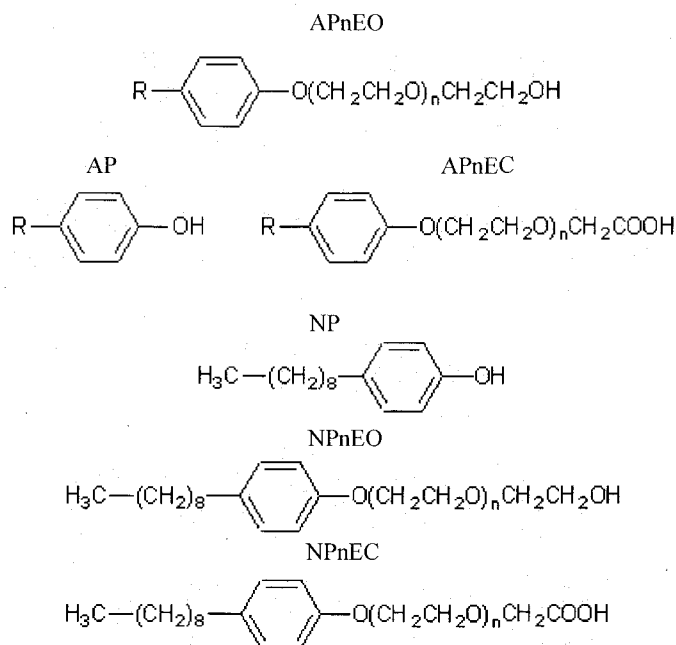


Figure 1.7 Les principaux produits chimiques alkylphénoliques et leur structure chimique

1.4.1 Traitements conventionnels

Les eaux usées municipales et industrielles contiennent une multitude de composés organiques persistants dérivés des applications domestiques et industrielles. Ces composés peuvent passer à travers les systèmes de traitement des eaux usées sans être interceptés et sont continuellement rejetés dans l'environnement et principalement dans les rivières ou les nappes phréatiques. Par exemple, bien que les APEOs peuvent être facilement enlevés par un traitement biologique conventionnel, l'effluent des stations de traitement des eaux usées reste une des sources principales des APs et des APEOs, dû à l'enlèvement et la dégradation incomplets de ces agents de surface. Les concentrations des métabolites de ces APEOs varient suivant les différentes installations de traitement, selon la conception des installations et leur efficacité (Ying et *al.*, 2002a).

Les usines de traitement des eaux usées existantes ont été normalement conçues pour l'enlèvement du CNP (carbone, azote et phosphore), mais souvent un enlèvement partiel des EDCs a lieu simultanément. Cependant, très peu de données existent sur le devenir des EDCs, en particulier des estrogènes, le long des procédés des STEPs (Ternes et *al.*, 1999b ; Young et *al.*,

2002 ; DEPA, 2002, 2003). En effet, bien que les procédés de transformation ou de dégradation peuvent éliminer les EDCs des eaux usées à des proportions variables selon les auteurs, une grande ambiguïté persiste sur les processus d'enlèvement mis en jeu. Par exemple, l'enlèvement des polluants organiques durant le traitement biologique secondaire inclut l'adsorption sur les floccs microbiens et l'enlèvement par les boues, la dégradation chimique et biologique, les transformations et la volatilisation durant la période d'aération (Birkett et Lester, 2003). Concernant les estrogènes stéroïdiens, plusieurs études en laboratoire ont indiqué que les estrogènes naturels peuvent être rapidement biodégradés. Basée sur leur faible solubilité dans l'eau et leur coefficient de partage octanol-eau (Kow), l'adsorption sur les boues pourrait aussi jouer un rôle dans leur enlèvement (Young et *al.*, 2002). Cependant, Mastrup et *al.* (2001) estime que moins de 10% des estrogènes naturels et synthétiques sont enlevés par l'intermédiaire de la biodégradation, alors qu'une quantité considérable est adsorbée dans la boue, que la majorité des composés restent solubles à l'effluent et que la vaporisation durant l'aération est négligeable. Par contre, Johnson et *al.* (2000) n'ont pas pu déterminer quel procédé entre la sorption et la biodégradation intervient dans l'enlèvement de ces composés. Récemment, Andersen et *al.* (2005) ont montré que la sorption n'est pas un facteur important pour le devenir des estrogènes (E1, β E2, et EE2) dans les STEPs comparé à la biodégradation. Ainsi, il n'est pas toujours clair dans quelle mesure l'enlèvement des estrogènes est le résultat de l'adsorption ou de la biodégradation (Kuster et *al.*, 2004), en considérant que la volatilisation est négligeable (Tableau 1.21). Il est donc nécessaire d'approfondir les connaissances concernant les mécanismes d'enlèvement afin d'améliorer les efficacités des systèmes de traitement existants et de développer de nouvelles stratégies de traitement pour enlever les EDCs des eaux usées et des boues. Cependant, généralement les procédés conventionnels instaurés dans les stations de traitement des eaux usées municipales ne peuvent pas éliminer les EDCs à un niveau satisfaisant (Harries et *al.* 1996 ; Jürgens et *al.*, 2002), ainsi des procédés plus performants de traitement doivent être développés pour réduire au minimum la décharge de ces composés à l'effluent.

Tableau 1.21 Ambiguïté sur les processus d'enlèvement des estrogènes

Espèces	Sorption	Biodégradation	Soluble	Référence
E3	-	80-95%	-	Lee et Peart, 1998
	-	95%	-	Baronti et <i>al.</i> , 2000
E1	35-45	-	-	DEPA, 2004
	-	(E1) ¹	-	Johnson et Sumpter, 2001
βE2	(βE2) ¹	-	-	
	-	90%	-	Ternes et <i>al.</i> , 1999a
	55-65%	-	-	DEPA, 2004
	28%	-	-	Kozak et <i>al.</i> , 2001
EE2	68%	-	-	
	-	20%	-	DEPA, 2003
	55-65%	-	-	DEPA, 2004
	Quantité importante	10%	Majorité	Mastrup et <i>al.</i> , 2001
	Environ 5%	-	-	Andersen et <i>al.</i> , 2003
Équivalent en βE2	3% ²	87% ²	-	Körner et <i>al.</i> , 2000

¹Johnson et Sumpter (2001) ne donne pas un pourcentage précis mais rapporte que βE2 est adsorbé alors que E1 est biodégradé.

²Sur la base de l'activité estrogénique.

1.4.1.1 Traitements physiques

La nature non polaire et hydrophobe de beaucoup d'EDCs fait qu'ils sont facilement adsorbés sur les substances particulaires. Ainsi, les polluants organiques, tels que les EDCs, doivent se concentrer dans les boues durant les procédés de traitement des eaux usées. En effet, les

techniques mécaniques de séparation, comme la sédimentation, provoqueraient un enlèvement significatif des EDCs de la phase aqueuse vers les boues primaires et secondaires (Birkett et Lester, 2003).

De plus, la caractéristique principale, qui détermine le devenir d'un contaminant donné dans l'eau, est sa capacité à réagir avec des substances particulières. Ces substances particulières peuvent être naturelles (argile, sédiments, colloïdes enduits de produits organiques naturels, micro-organismes) ou ajoutées pendant le traitement (boues activées, charbon actif en poudre, résine échangeuse d'ions, coagulants) (Schäfer et Waite, 2002). La solubilité aqueuse (mg/L), le coefficient de partage organique carbone-eau (K_{OC}) et le coefficient K_{OW} influencent la sorption d'un composé pendant le traitement. En outre, le potentiel de volatilisation du composé (H_C) indique aussi la probabilité d'évaporation du composé pendant le traitement (Birkett et Lester, 2003). Ohlenbusch et *al.* (2000) ont prouvé que l'interaction entre les composés phénoliques et la matière organique naturelle (MON) dépend des caractéristiques du contaminant et du MON. Selon la polarité des composés hydrophobes, des interactions spécifiques peuvent se produire. Schäfer et Waite (2002) ont montré que, en raison de leur K_{OW} élevé (Tableau 1.22), les contaminants agissent fortement avec des produits organiques naturels. De plus, les valeurs du $\log(K_{OW})$ des estrogènes indiquent que ces composés devraient sensiblement s'adsorber sur les sédiment et les boues (Ternes et *al.*, 2002). Cette hypothèse est confortée par la détection de concentrations élevées en estrogènes dans l'eau provenant de la déshydratation des boues d'épuration (Matsui et *al.*, 2000) et dans les boues d'épuration digérées (49 ng/g de $\beta E2$ et 37 ng/g de $E1$) (Ternes et *al.*, 2002). Dans de récentes études, Ternes et *al.* (2004) ont déterminé qu'entre 4% et 12% du $EE2$ (de concentration initiale de 1.7 $\mu g/L$) ont été enlevés par adsorption sur les boues primaires et secondaires provenant d'une STEP municipale en Allemagne (expériences en laboratoire). De même, Holbrook et *al.* (2004) ont rapporté qu'entre 1 et 60% de $\beta E2$ et $EE2$ pourraient se lier au carbone organique colloïdal pendant le procédé à boues activées dans deux différentes STEP s étudiées.

Karickhoff et *al.* (1979) ont étudié la sorption des composés hydrophobes sur des sédiments d'étangs et de rivières et ont démontré que les coefficients de partage sont directement liés au contenu en carbone organique pour une dimension particulière donnée.

Tableau 1.22 Coefficients de partage octanol-eau (Log (K_{OW})) des principaux estrogènes et xéno-estrogènes

EDC	Log (K _{OW})	Référence
E1	2.45-3.43	Lai et <i>al.</i> , 2000 ; Sayles, 2001
E2	3,94-4.01	Lai et <i>al.</i> , 2000 ; Sayles, 2001
E3	2.55-2.81	Lai et <i>al.</i> , 2000 ; Sayles, 2001
EE2	3.67-4.15	Ternes et <i>al.</i> , 1999b ; Lai et <i>al.</i> , 2000 ; Sayles, 2001
BPA	3.32, 3.43	Howard, 1989 ; Hu et Aizawa, 2003
Phénol	1.48	Hu et Aizawa, 2003
4-n-NP	4.48, 6.19	Ahel et Giger, 1993 ; Hu et Aizawa, 2003
4-t-OP	4.12, 5.66	Ahel et Giger, 1993 ; Hu et Aizawa, 2003
NP1EO	4.17	Ahel et Giger, 1993
NP2EO	4.21	Ahel et Giger, 1993
OP1EO	4.10	Ying et <i>al.</i> , 2002a
OP2EO	4.00	Ying et <i>al.</i> , 2002a

D'autre part, selon Jaffe (1991), les petites particules avec un contenu en carbone organique élevé seront les plus sujettes à l'adsorption, comme le montre le coefficient de partage organique élevé. D'autres recherches ont aussi étudié les interactions des estrogènes avec les particules naturelles, à des concentrations normalement présentes dans l'environnement, ou dans le cas d'un traitement à boues activées. La plupart des résultats ont prouvé que la quantité adsorbée de contaminants dépend de la dimension particulaire et de la rugosité de celui-ci et par conséquent dépend de la surface de contact disponible de la particule ainsi que des caractéristiques matérielles de celle-ci. Par contre, les résultats de Schäfer et Waite (2002) prouvaient que la quantité adsorbée d'un produit chimique est fonction de la masse de la particule. En effet, ils ont remarqué que les

grandes particules d'environ 100 μm avaient la plus faible capacité d'adsorption, pendant des essais avec des boues activées.

Cependant, si les contaminants sont adsorbés sur les particules de boues, ils s'accumulent dans les déchets solides des usines de traitement des eaux usées. Et dans ce cas, l'utilisation des boues comme fertilisant peut causer une contamination potentielle des sols et des eaux souterraines (Ternes et *al.*, 1999a). En effet, dans leur étude, à échelle pilote, sur le devenir des estrogènes (E1, β E2, E3, EE2) à travers un système de traitement d'eaux usées municipales, Esperanza et *al.* (2007) ont observé que des quantités importantes en E1, β E2 et EE2 se sont retrouvées dans les boues primaires. Par ailleurs, si les contaminants sont dissous ou associés aux produits organiques naturels dissous ou même aux colloïdes stables et instables, ils sont alors facilement transportés à travers les systèmes de traitement (Schäfer et *al.*, 2002).

En plus de la sorption sur les solides en suspension comme mécanisme d'enlèvement, il est possible que les composés puissent être adsorbés sur des corps gras non polaires ainsi que des lipides présents dans les eaux usées brutes. En effet, les eaux usées domestiques contiennent généralement des corps gras, des huiles minérales, des graisses, et des agents tensioactifs (Birkett et Lester, 2003).

Les composés organiques à l'état de trace, tels que les hormones naturelles (Schäfer et *al.*, 2003), un large éventail de pesticides (Kiso et *al.*, 2000), les alkyl phthalates (Kiso et *al.*, 2001) et les produits personnels de soin et pharmaceutiques (PPCPs) (Schäfer et *al.*, 2002), peuvent être enlevés en utilisant la nanofiltration (NF) ou l'osmose inverse (RO) et peuvent ainsi s'accumuler dans le résidu solide concentré (Schäfer et *al.*, 2002). Le procédé NF est une technique de filtration promettant pour un grand nombre d'applications dans le domaine du traitement de l'eau potable et usée (Bodzek et Dudziak, 2006). Schäfer et *al.* (2003) ont observé que certaines membranes NF enlèvent E1 par sélection de taille et par adsorption. Ces effets d'adsorption peuvent être dus à la liaison hydrogène entre E1 et la membrane (Schäfer et *al.*, 2003). Par ailleurs, la microfiltration (MF) et l'ultrafiltration (UF) ne peuvent enlever les EDCs et les PPCPs dissous, seulement quand une adsorption antérieure est complète (Schäfer et *al.*, 2002). Yoon et *al.* (2006, 2007) ont comparé l'efficacité des procédés NF et UF pour la rétention de plusieurs EDCs / PPCPs ayant des propriétés physico-chimiques différentes (tels que des hormones stéroïdiennes, des antibiotiques, des pesticides, des hydrocarbures aromatiques polycycliques -

HAPs). Ils ont montré que la membrane NF permet de retenir de nombreux EDCs / PPCPs, dû à l'adsorption hydrophobe et la sélection de taille, alors que la membrane UF a retenu typiquement des composés fortement hydrophobes, dû principalement à l'adsorption hydrophobe. Par ailleurs, Yoon *et al.* (2006, 2007) ont conclu que le phénomène de transport associé à l'adsorption peut dépendre de la chimie de l'eau considérée et du matériel constituant la membrane.

Bien que la MF et l'UF ne semble pas enlever normalement les petits composés polaires, Schäfer et Waite (2002) ont observé que l'enlèvement des contaminants à l'état de trace par des membranes submergées de MF (Memcor) et d'UF (Zenon) était aussi élevé que lors d'un traitement avec du charbon actif en poudre (PAC). Cet enlèvement était élevé pour des pH faibles et neutres, alors qu'il était sensiblement plus faible à un pH supérieur à 10.5. Schäfer et Waite (2002) ont attribué ceci aux effets d'adsorption, assimilables à la liaison hydrogène et à la sorption hydrophobe. Les études de Chang *et al.* (2002) sur la MF ont confirmé que des concentrations significatives d'hormones naturelles, telles que E1, pouvaient s'accumuler sur les membranes hydrophobes à fibres creuses grâce à la sorption. Cependant, ils ont également remarqué que la rétention diminue avec l'augmentation de la quantité en E1 accumulés sur la surface membranaire.

Par ailleurs, Snyder (2002) a observé que quand les molécules prennent une charge négative à pH élevé, une répulsion entre la membrane chargée négativement et les anions organiques cause la réduction de l'adsorption lors d'un procédé de NF et le transport des particules est alors facilité par les membranes. Cependant, pour quelques membranes à pores fins, il n'y a aucun effet du pH sur la rétention quand les pores sont plus petits que les contaminants et dans ce cas la membrane est une barrière efficace indépendamment des interactions chimiques (Snyder, 2002). Nghiem et Schäfer (2006) ont montré que les membranes NF et RO peuvent servir d'un réservoir important pour les EDCs (tels que BPA, NP, E1, β E2), mais une désorption complète de ces composés peut être possible pendant l'étape de nettoyage de la membrane ou par des variations de la valeur du pH pendant le procédé de filtration. Ainsi, le traitement du concentrat et de la solution récupérée pendant l'étape de nettoyage doit être considéré.

Weber *et al.* (2004) ont montré que le taux d'élimination d'une membrane NF dépend du matériel membranaire. En effet, dans leurs expériences en laboratoire, la membrane constituée de polyamide a permis un enlèvement en estrogènes (E1, β E2, EE2, de concentrations initiales de

100 µg/L) de plus de 99%, alors que la membrane constituée de fibres de polyéthersulfone hydrolysé était moins efficace (40–60%), dû à la différence de la taille des pores et de la perméabilité de la structure membranaire.

Schäfer *et al.* (2002) ont également montré que la présence de substances particulières (naturelles ou chimiques), qui adsorbent de tels contaminants, peut de manière significative augmenter la capacité de la MF, de l'UF et de la NF, pour enlever les contaminants à l'état de trace. Ainsi, un prétraitement approprié des eaux usées suivi d'un procédé hybride : MF ou UF combiné avec, par exemple, du PAC, un coagulant ou une résine échangeuse d'ion (MIEX), pourrait enlever une quantité considérable de contaminants de petite taille (tels que des produits pharmaceutiques, des EDCs comprenant les hormones et certains produits agrochimiques, des virus, etc.) (Schäfer *et al.*, 2002). En effet, Schäfer *et al.* (2001) ont montré qu'un procédé hybride couplant une MIEX à une MF a permis une adsorption jusqu'à 70% de E1 présent à des concentrations environnementales. Le pH influençait les mécanismes de sorption et il a été supposé que la sorption hydrophobe est un des principaux mécanismes pour des pKa inférieurs à celui de E1 (~10.4), tandis que l'échange ionique est le mécanisme dominant pour des pH supérieurs à cette valeur. Par ailleurs, Ong *et al.* (2001) ont signalé que le procédé hybride, PAC couplé à une MF, s'est avéré très efficace pour l'enlèvement de E1 (jusqu'à 90%) pour les conditions étudiées.

Il est important de comprendre les effets de rétention, d'adsorption et de désorption avant de choisir la membrane qui doit agir comme une barrière fiable aux contaminants, ainsi que pour mieux comprendre le devenir des polluants dans les systèmes de traitement (Schäfer et Waite, 2002). De ce fait, les recherches sur les aspects fondamentaux et appliqués du procédé membranaire doivent mener à une optimisation de son efficacité et contribuer à l'amélioration des stratégies des traitements (Filali-Meknassi *et al.*, 2004).

1.4.1.2 Traitements chimiques

Des recherches comparatives ont été menées sur les adsorbants utilisés communément dans l'industrie de traitement des eaux usées, incluant le PAC, le chlorure ferrique (FeCl_3) et le MIEX, qui permettent généralement d'enlever des contaminants de petite taille (tels que les EDCs incluant les hormones et certains produits agrochimiques) (Schäfer et Waite, 2002). Les coagulants, tels que l'aluminium et les sels ferriques, ont été étudiés, bien que leur utilisation soit souvent difficile due à leurs coûts élevés (Commission Européenne, 2001).

Quelques résultats préliminaires indiquent que le PAC est efficace pour l'enlèvement de certains EDCs et des PPCPs (Snyder, 2002). De plus, Schäfer et Waite (2002) ont montré que le FeCl_3 et le MIEX[®] ne sont pas très adéquats pour enlever la majorité des contaminants à l'état de trace (EDCs et PPCPs). Pendant la coagulation au chlorure ferrique (Fe_2Cl_6), l'enlèvement de E1 est généralement minimal, puisque le procédé de coagulation tend à favoriser l'enlèvement des gros composés hydrophobes (Schäfer et Waite, 2002). Par contre, Ong et *al.* (2001) et Schäfer et Waite (2002) ont montré que le PAC est très efficace vis à vis de l'enlèvement de E1 et semble être le choix préférentiel, lorsqu'il est ajouté en concentration suffisamment élevée. Yoon et *al.* (2005) ont observé un taux d'enlèvement en βE2 de 95% par le procédé PAC pour de concentrations initiales en βE2 de 27 ng/L. Ils ont aussi rapporté que l'efficacité du procédé augmentait avec le temps de réaction et que la présence d'anions/cations et le pH avaient peu d'effet sur le pourcentage d'enlèvement de βE2 . Par contre, l'efficacité du procédé PAC semblait être affectée par la présence de MON. Zhang et Zhou (2005) ont également comparé l'efficacité de divers adsorbants (charbon actif granulé - GAC, chitine, chitosane, MIEX, et adsorbant carboné, préparé à partir des déchets provenant d'une usine de fertilisation pour lisier en Inde) pour l'enlèvement de E1 et βE2 . Ils ont montré que la cinétique d'adsorption dépend de l'adsorbant et du composé. De plus, le procédé montrant la plus importante capacité d'adsorption correspondait à l'adsorbant carboné, suggérant la possibilité de réutilisation de déchets solides pour l'enlèvement des estrogènes. Le GAC présentait aussi un taux d'adsorption élevé pour les deux estrogènes. Cependant, Zhang et Zhou ont aussi remarqué que la capacité d'adsorption du charbon actif décroît lorsque des surfactants et/ou de l'acide humique sont présents.

1.4.1.3 Traitements biologiques

La dégradation et la transformation biologiques se produisent sous des conditions aérobies par oxydation biologique en boues activées, lits bactériens, ou sous des conditions anaérobies dans le système de traitement des eaux usées ou dans les digesteurs anaérobies des boues. Cependant, dans une étude sur la distribution des estrogènes naturels (E1 et βE2) dans 18 stations de traitement municipales à travers le Canada, Servos et *al.* (2005) ont noté que le lit bactérien n'a permis aucun enlèvement significatif du βE2 . De plus, Svenson et *al.* (2003) ont rapporté que les lits bactériens étaient moins efficaces que les systèmes à boues activées pour l'enlèvement de l'activité estrogénique, et les taux d'enlèvement les plus élevés ont été obtenus dans les stations

de traitement utilisant des procédés combinant des traitements biologique et chimique de la matière organique, de l'azote et du phosphore. Par ailleurs, Servos et *al.* (2005) ont rapporté que les lagunes étaient généralement très efficaces pour l'enlèvement du β E2, avec une efficacité apparente s'échelonnant de 80 à 98%, et que les stations avec un procédé de nitrification avaient permis une augmentation du taux d'enlèvement des hormones et de leur activité estrogénique.

Le procédé à boue activée est communément utilisé pour traiter les eaux usées des grandes villes et principalement pour enlever les composés organiques présents dans l'affluent des STEP (Johnson et Sumpter, 2001). Cependant, tous les composés ne sont pas complètement biodégradés ou convertis en biomasse. En effet, les composés alkylphénols estrogéniques et les stéroïdes estrogéniques, par exemple, retrouvés dans les effluents des STEP sont des sous-produits d'une décomposition incomplète (Johnson et Sumpter, 2001). Les études en batch réalisées par Johnson et Sumpter (2001) ont indiqué que E1, EE2 et les alkylphénols ne sont pas complètement éliminés dans un traitement à boue activée, dans les configurations actuelles du procédé. Les données recueillies suggèrent que les procédés à boue activée peuvent enlever plus de 85% de β E2, de E3 et de EE2, tandis que les performances d'enlèvement pour E1 apparaissent être plus faibles et beaucoup plus variables (Johnson et Sumpter, 2001). En effet, dans une revue sur les efficacités d'enlèvement des stéroïdes estrogéniques, Johnson et *al.* (2000) ont rapporté que 88% de β E2 et 74% de E1 ont pu être enlevés par des usines utilisant un procédé à boue activée. De plus, Baronti et *al.* (2000) ont recensé six STEP employant un système à boues activées, aux alentours de Rome. Ils ont relevé des enlèvements moyens de 87% en β E2, 61% en E1, 85% en EE2 et 95% en E3 (Baronti et *al.*, 2000). Ternes et *al.* (1999a) ont constaté qu'environ 2/3 du β E2 a été éliminé le long du procédé de traitement de STEP municipales tandis que les efficacités d'enlèvement en E1 et en EE2 étaient faibles (<10%). Dans des expériences suivantes menées en laboratoire avec les boues activées de ces mêmes stations de traitement, Ternes et *al.* (1999b) ont confirmé, sous condition aérobie, la persistance du EE2, tandis que E1 et β E2 étaient dégradés assez rapidement. De même, Esperanza et *al.* (2004) ont rapporté que les efficacités d'enlèvement en E1 et EE2 étaient environ de 60% et 65%, respectivement, pour deux stations d'eaux usées municipales à échelle pilote, bien que plus de 94% du β E2 a pu être éliminé dans le bassin d'aération.

Alors que des taux d'enlèvement élevés en E3, en β E2 (Baronti et *al.*, 2000 ; Onda et *al.*, 2003), et en EE2 (Baronti et *al.*, 2000) sont obtenus, on remarque qu'au plus 69% de E1 sont enlevés par un traitement à boues activées (Baronti et *al.*, 2000 ; Onda et *al.*, 2003), et dans quatre tests sur trente, les concentrations à l'effluent en E1 étaient encore plus grandes que les concentrations à l'affluent (Baronti et *al.*, 2000). Onda et *al.* (2003) et Johnson et Sumpter (2001) ont conclu qu'il est nécessaire de considérer le procédé de conversion du β E2 en E1. En effet, les résultats en batch obtenus par Onda et *al.* (2003) et Esperanza et *al.* (2004) ont indiqué que β E2 était transformé en E1, comme produit intermédiaire. Lee et Liu (2002) ont examiné le devenir du β E2 dans des réacteurs à boues activées aérobies et anaérobies et ont observé une rapide dégradation du β E2 en E1, mais n'ont pas observé la formation d'autres métabolites majeurs et/ou stables. De même, Weber et *al.* (2005) ont montré que E1 est le principal microbien métabolite de β E2. De plus, chez les humains et animaux, les estrogènes sont sécrétés dans les urines comme glucuroconjugués ou conjugués sulfatés (Layton et *al.*, 2000 ; Jürgens et *al.*, 2002). En effet, Andreolini et *al.* (1987) ont observé que le composé E1 est sécrété dans l'urine des grossesses retardées préférentiellement sous forme conjuguée, l'estrone-3-sulfate (E1-3S). Adler et *al.* (2001, cité par Servos et *al.*, 2005) ont rapporté que 50% du β E2 et 58% de E1 sont sous forme conjuguée dans les eaux usées brutes. Sur cette base, Johnson et Sumpter (2001) ont présumé que le comportement anormal du composé E1 libre observé dans leur étude et dans celles de Shore et *al.* (1993) et de Baronti et *al.* (2000), était le résultat d'une déconjugaison microbienne du composé E1-3S après son passage dans le réseau d'égouts pendant le traitement à boues activées de la STEP. En effet, un certain nombre d'études ont suggéré que la déconjugaison pourrait se produire à travers les procédés microbiens dans les STEPs (Desbrow et *al.*, 1998 ; Tyler et Routledge, 1998 ; Allen et *al.*, 1999 ; Ternes et *al.*, 1999b ; Layton et *al.*, 2000 ; Jürgens et *al.*, 2002) et dans les rivières (Allen et *al.*, 1999). Ternes et *al.* (1999b) ont rapporté durant leurs études dans des réacteurs en batch, que les glucuroconjugués du β E2 (17 β -estradiol-(17 ou 3)- β -D-glucuronide) sont rapidement clivés au contact des boues activées diluées. En effet, après moins de 15 minutes, du β E2 et de E1 ont pu être détectés. Carballa et *al.* (2004) ont étudié le comportement des estrogènes naturels (E1 et β E2) le long des différentes unités d'une STEP municipale située en Galicie (Espagne). Pendant le traitement secondaire (boues activées conventionnelles), l'augmentation de la concentration en E1 à l'effluent a pu être expliquée par l'oxydation du β E2 dans le bassin d'aération et par le clivage des conjugués. Ainsi,

pendant les procédés de traitement des STEP, β E2 est rapidement converti en E1, qui est alors dégradé beaucoup plus lentement (Ternes et *al.*, 1999a ; Weber et *al.*, 2005). C'est pourquoi, généralement, une plus grande quantité de E1 que de β E2 est retrouvée dans les effluents de STEP (Tableau 1.13).

Par ailleurs, D'Ascenzo et *al.* (2003) ont étudié le devenir des formes conjuguées des trois estrogènes naturels les plus communs se trouvant dans l'environnement aqueux municipal. Les concentrations de E3 conjugué et libre, du β E2 et de E1 ont été étudiées en considérant trois scénarios : (1) urine femelle ; (2) un réservoir septique rassemblant l'eau usée domestique, et (3) affluents et effluents de six STEP à boues activées. Ils ont confirmé par un test de biodégradation en laboratoire, que les glucuroconjugués des estrogènes sont facilement déconjugués dans les eaux usées domestiques, vraisemblablement dû aux grandes quantités d'enzyme β -glucuronidase (Dray et *al.*, 1972) produite par les bactéries fécales (*Escherichia coli*). La déconjugaison a continué à travers les égouts. Comme la plupart des estrogènes et des androgènes sont principalement sécrétés sous forme conjuguée, la présence de ces hormones "libres" dans l'environnement aquatique (par exemple les effluents des STEP et les rivières) est probablement due à leur déconjugaison par les bactéries *in situ* (Shore et *al.*, 1993 ; Desbrow et *al.*, 1998 ; Lee et Peart, 1998 ; Belfroid et *al.*, 1999 ; Ternes et *al.*, 1999a ; Baronti et *al.*, 2000 ; Johnson et Sumpter, 2001 ; Tyler et *al.*, 1998 ; Kirk et *al.*, 2002). Cette conjugaison, qui inactive l'action hormonale de ces composés (tels que les glucuroconjugués et les sulfates), augmente sa solubilité dans l'eau et ainsi ces composés deviennent plus mobiles dans l'environnement que les hormones libres correspondantes (Kozak et *al.*, 2001). Selon l'étude réalisée par D'Ascenzo et *al.* (2003), le traitement d'eaux usées a donc complètement enlevé les résidus de glucuroconjugués d'estrogène et une bonne efficacité d'enlèvement (84–97%), pour les autres analytes, a été observée, mais pas pour les composés E1 (61%) et E1-3S (64%). Donc, D'Ascenzo et *al.* (2003) ont conclu suite à cette étude, que E1 est le plus important EDC naturel, si on considère que (1) la quantité des espèces E1 rejetées par les STEP dans l'environnement aqueux est 10 fois plus élevée que dans le cas de β E2, (2) le potentiel estrogénique de E1 correspond à la moitié du potentiel du composé β E2, (3) une certaine fraction de E1-3S pourrait être reconvertie en E1 dans les eaux réceptrices.

De plus, la forme des estrogènes influence considérablement le pouvoir estrogénique du composé. Matsui et *al.* (2000) ont comparé l'activité estrogénique de diverses substances en utilisant l'EC50 (concentration effective médiane) et le YES. Par exemple, l'activité de la forme conjuguée 17 β -estradiol 3-sulfate était égale à 5.3 (10^{-5}) fois l'activité du β E2, de même l'activité du 17 β -estradiol 17- β -D-glucuronide et 17 β -estradiol 3- β -D-glucuronide étaient 5.9 (10^{-7}) et 3.1 (10^{-5}) fois celle du β E2, respectivement (Matsui et *al.*, 2000). Les potentiels estrogéniques des formes conjuguées des estrogènes sont visiblement très inférieurs aux activités estrogéniques des formes non-conjuguées. Le clivage du glucuroconjugué pendant le traitement peut donc considérablement augmenter l'activité estrogénique de l'effluent (Servos et *al.*, 2005, Khanal et *al.*, 2006). La Figure 1.8 représente une schématisation simplifiée du cheminement du β E2 et de E1 durant un procédé biologique.

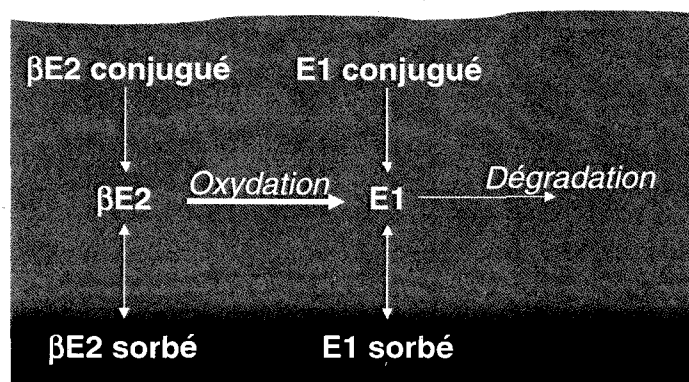


Figure 1.8 Biodégradation et sorption du β E2 et de E1

De même que pour les hormones naturelles, l'hormone synthétique EE2, utilisée comme composé estrogénique dans les contraceptifs, est métabolisée dans le corps humain avant sa sécrétion. Elle se retrouve alors surtout sous la forme conjuguée (Carr et Griffin, 1998 ; Jürgens et *al.*, 2002). En effet, Carr et Griffin (1998) ont remarqué qu'après 24 heures, seulement 3% de la dose en EE2 (20–50 μ g/jour) contenue dans les contraceptifs reste dans le plasma alors que plus de 60% sont sécrétés dans l'urine. Dans un système à boues activées, Turan (1995) n'a rapporté aucun changement dans la concentration en EE2 après plus de 120 heures de traitement. Cependant, quand Vader et *al.* (2000) ont ajouté de l'hydrazine en tant que donneur externe d'électrons pour fournir de l'énergie réductrice illimitée, la dégradation du EE2 était alors légèrement plus importante. Ceci a démontré que la dégradation du EE2 est atténuée par une

activité mono-oxygénase. De plus, Vader et *al.* (2000) ont constaté que sous des conditions de dénitrification, il n'y avait aucune dégradation du EE2, tandis que des boues nitrifiées oxydaient le EE2 en composés plus hydrophobes. Layton et *al.* (2000) ont également trouvé dans des expériences en laboratoire que les boues non nitrifiées ne permettaient pas de dégrader de manière significative le EE2. Andersen et *al.* (2003) ont observé que EE2 a été dégradé (>90%) seulement pendant le procédé de nitrification de la STEP municipale étudiée, alors que E1 et β E2 ont été largement biodégradés (>98%) dans les bassins de dénitrification et de nitrification aéré du système de boues activées. Vader et *al.* (2000) ont suggéré que les effets saisonniers de la température sur la nitrification puissent avoir comme conséquence des changements de la capacité des systèmes de traitement à enlever EE2 et les composés qui lui sont liés. Par contre, Lee et Liu (2002) ont prouvé à la suite d'expériences en batch que le β E2 était sous des conditions anaérobies plus persistant que sous des conditions aérobies, mais restait toujours biodégradable. Par ailleurs, Shi et *al.* (2004) ont étudié la biodégradabilité des estrogènes naturels et synthétiques en employant des boues activées nitrifiées (NAS) et *Nitrosomonas europaea* capable d'oxyder l'ammonium. Les résultats ont confirmé que le NAS dégrade de manière significative les estrogènes naturels et synthétiques. Parmi les quatre estrogènes, le β E2 a été le plus facilement dégradé et il est clair que E1 n'ait été seulement qu'un sous-produit transitoire et consécutivement dégradé en d'autres composés par le NAS. Concernant le EE2, Shi et *al.* (2004) ont trouvé le même comportement que rapporté par Vader et *al.* (2000). Shi et *al.* (2004) ont aussi montré que les bactéries capables d'oxyder l'ammonium, telle que *N. europaea*, peut contribuer à la dégradation des estrogènes par le NAS. Toutefois, le NAS dégrade les estrogènes et leurs sous-produits, alors que *N. europaea* ne dégrade que les estrogènes. Ainsi, d'autres micro-organismes pourraient être responsables de la dégradation des sous-produits. En effet, E1 a été produit quand le NAS a dégradé le β E2, alors que E1 n'a pas été produit durant la dégradation du β E2 par *N. europaea*. Ainsi, la dégradation du β E2 par la formation intermédiaire de E1 est considérée être provoquée par d'autres bactéries hétérotrophes et non pas par des bactéries nitrifiantes, telle que *N. europaea*. Par ailleurs, dans une récente étude danoise sur les procédés d'enlèvement des estrogènes dans les boues activées (DEPA, 2004), la dégradation de E1, β E2 et EE2 a été étudiée sous conditions aérobies et anaérobies dans un système de boues activées. Il a été conclu que sous conditions anaérobies, les taux de dégradation en E1 et EE2 étaient considérablement inférieurs (10–20 fois) que sous conditions aérobies, alors que la

dégradation du β E2 n'était pas sensiblement changée (DEPA, 2004). Ainsi, la nitrification permettrait un meilleur enlèvement des estrogènes naturels et synthétiques, dû d'une part aux bactéries nitrifiantes, et d'autre part aux longs âges de boues (TRS) nécessaires pour le procédé de nitrification (Khanal et *al.*, 2006). En effet, Birkett et Lester (2003) ont rapporté que l'enlèvement des estrogènes stéroïdiens peut être influencé par le temps de rétention hydraulique (TRH) et le TRS employés par les STEP (Birkett et Lester, 2003). Dans une revue de littérature danoise sur les substances causant la féminisation des poissons (DEPA, 2002), il a été conclu qu'un TRH et un TRS élevés ont une influence positive sur la capacité d'une STEP à enlever les estrogènes. De même, Kreuzinger et *al.* (2004) ont montré qu'avec un TRS élevé, la biodégradation est plus importante. Clara et *al.* (2005) ont déterminé que pour les estrogènes naturels (E1, β E2, E3) et le BPA (Figure 1.9) une forte corrélation existe entre les concentrations obtenues à l'effluent et la valeur du TRS employé, alors que pour EE2 d'autres facteurs (autre que le TRS) semblent aussi influencer l'efficacité du traitement. Pour les estrogènes naturels, une valeur approximative de 10 jours a été identifiée comme critique pour un TRS à 10 °C. Ainsi, Clara et *al.* (2005) ont conclu que pour des STEP opérées avec une valeur en TRS à 10 °C supérieure à 10 jours permettent d'atteindre des concentrations faibles à l'effluent. De même, Ternes et *al.* (1999a) ont rapporté une amélioration dans l'efficacité d'enlèvement de E1 et β E2 de 64 à 94% et de 75 à 96%, respectivement, lorsque le TRS a augmenté de 6 à 11 jours.

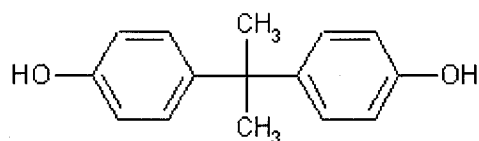


Figure 1.9 Structure du diphénol A (C₁₅H₁₆O₂, 2,2-bis(4-hydroxyphényl)propane)

D'autre part, comme il a été vu précédemment, les estrogènes sont des composés organiques hydrophobes de faible volatilité, ainsi la sorption dans les boues pourrait jouer un rôle important dans l'enlèvement de ces composés durant le traitement. Par exemple, vu que EE2 est un composé hydrophobe et semble être persistant à la biodégradation, la sorption dans les boues pourrait jouer un rôle important dans son enlèvement, tandis que pour les composés relativement faiblement hydrophobes, comme E3, la biodégradation serait le facteur privilégié (Johnson et Sumpter, 2001). Basés sur le rapport du DEPA (2004), pour des boues de densités normales,

environ 35–45% de E1 et 55–65% du β E2 et EE2 peuvent être absorbées sur les boues activées. Cependant, d'après les expériences d'Andersen et *al.* (2005), la sorption, comparée à la biodégradation, n'est pas un facteur important pour le devenir des estrogènes (E1, β E2, et EE2), durant un procédé à boues activées. De même, une étude sur le bilan de masse des estrogènes dans une STEP en Allemagne (Körner et *al.*, 2000) a démontré que la majeure partie de l'activité estrogénique dans les eaux usées a été biodégradée pendant le traitement plutôt qu'adsorbée sur les solides en suspension. La réduction de la charge estrogénique a été évaluée à 90%, et moins de 3% de l'activité estrogénique ont été retrouvés dans les boues (Tableau 1.21). D'ailleurs, du β E2 marqué a été employé dans une étude sur le devenir des estrogènes dans les STEPs (Fuerhacker et *al.*, 1999). Fuerhacker et *al.* (1999) ont conclu qu'à de faibles concentrations, la majorité du β E2 marqué est restée dans la phase liquide, et ainsi les propriétés physico-chimiques, telles que le coefficient de partage octanol-eau, n'ont pas reflété la situation pour des concentrations de l'ordre du ng/L (Fuerhacker et *al.*, 1999). Par contre, dans une autre étude (Johnson, 1999, cité par Birkett et Lester, 2003), le contenu en solides en suspension était un facteur important. Une concentration plus élevée en solide en suspension a eu comme conséquence un enlèvement en estrogènes plus important, alors qu'une augmentation de la concentration en estrogène dans les eaux à traiter causait une diminution de l'enlèvement, probablement due à la sorption d'EDCs sur les solides en suspension. Clara et *al.* (2004) ont observé un fort potentiel pour l'adsorption du BPA, β E2 et EE2 sur les boues municipales, qui est dépendant du pH. En effet, un rejet de la fraction adsorbée sur les boues peut se produire à fort pH (autour du pKa des composés considérés), pendant par exemple le traitement de la boue par la chaux (Clara et *al.*, 2004). Dans une autre étude sur le devenir des estrogènes dans différentes STEPs, Matsui et *al.* (2000) ont trouvé que pendant la déshydratation des boues, de grandes quantités d'estrogènes (concentrations de près de 500 ng EEQ/L) ont été libérées dans la phase aqueuse (réutilisée par la suite par le système de traitement).

Le procédé à boues activées permet donc d'atteindre des taux d'enlèvements des EDCs plus ou moins élevés (Baronti et *al.*, 2000 ; Johnson et Sumpter, 2001 ; Svenson et *al.*, 2003 ; Onda et *al.*, 2003 ; D'ascenzo et *al.*, 2003), cependant il ne permet pas d'atteindre des concentrations à l'effluent en estrogènes et en alkylphénols, qui respectent les niveaux seuils déterminés comme produisant des effets estrogéniques chez les poissons et les autres organismes aquatiques (Tableaux 1.23 et 1.24). Par exemple, Servos et *al.* (2005) ont rapporté que la dégradation des

estrogènes dans des réacteurs aérobies en batch contenant une boue d'épuration était très rapide, en effet le β E2 et le E1 ont été réduits de plus de 95% en moins de 24 heures. Cependant, même après 120 heures, une activité estrogénique a pu être détectée (Servos et *al.*, 2005). Par ailleurs, il faut souligner que les concentrations et les taux d'enlèvement obtenus dans les différentes études sont difficilement comparables entre eux, puisque d'une part les conditions de traitements des STEPs sont souvent décrites de façon incomplète et d'autre part les stratégies d'échantillonnage et d'analyses peuvent varier d'une étude à l'autre (Johnson et Sumpter, 2001).

Le bioréacteur membranaire peut être défini comme un système intégrant une dégradation biologique des déchets avec une filtration membranaire (Cicek et *al.*, 1998). L'application d'un tel bioréacteur pour le traitement des eaux usées municipales augmente dans plusieurs pays, à cause de la réutilisation des eaux usées et des standards élevés à atteindre pour le rejet dans des zones sensibles (Stephenson et *al.*, 2001, cité par Wintgens et *al.*, 2004). En effet, ces systèmes de traitement ont prouvé leur efficacité pour enlever les contaminants organiques et inorganiques ainsi que des entités biologiques provenant des eaux usées (Cicek, 2002). En effet, comme les estrogènes se lient rapidement à la matière organique, le bioréacteur à membrane peut fournir un environnement approprié à la biodégradation des EDCs, dû à la quantité élevée en matière organique présente dans la liqueur mixte et à la rétention des matières particulaires et colloïdales. De plus, afin d'accumuler les EDCs sur la membrane, le bioréacteur membranaire contient des concentrations élevées en biomasse permettant une bio acclimatation considérable. En outre, la possibilité de maintenir des TRS élevés dans le bioréacteur membranaire permet d'avoir une culture bactérienne diverse, incluant des organismes à croissance lente, capable de briser les molécules organiques complexes (Cicek et *al.*, 1999 ; Wintgens et *al.*, 2002 ; Urase et *al.*, 2005).

Ainsi, comparé à n'importe quel autre traitement biologique, Buenrostro-Zagal et *al.* (2000, cité par Cicek, 2002) ont trouvé de meilleures efficacités d'enlèvement de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (produit chimique utilisé dans la préparation d'un herbicide commercial) avec un bioréacteur à membrane sélective. Par ailleurs, Wintgens et *al.* (2002) ont étudié l'utilisation de bioréacteurs membranaires et de la NF dans le but d'évaluer leurs potentiels à enlever des EDCs. Il a été évident aux vues des résultats que la majeure partie de la charge a été réduite dans le bioréacteur à membrane, tandis que le traitement par GAC, appliqué en aval, servait uniquement comme étape de polissage. En effet, le bilan de matière a indiqué une

élimination considérable du NP dans le bioréacteur membranaire, qui pourrait être dû à la dégradation ou au traitement à air forcé (« *air stripping* ») (Wintgens et *al.*, 2002). Dans une récente étude, Wintgens et *al.* (2004) ont conclu que le bioréacteur membranaire (UF) peut contribuer de façon efficace à l'enlèvement des composés estrogéniques comme le BPA et le NP. Par un bilan de masse, Wintgens et *al.* (2004) ont remarqué que la dégradation biologique semble être le mécanisme le plus important dans un système à bioréacteur membranaire. Par ailleurs, Urase et *al.* (2005) ont étudié l'enlèvement en E1, β E2 et EE2 (concentrations initiales en β E2 et EE2 de 100 μ g/L) lors d'un traitement dans un réacteur membranaire à MF. Ils ont observé d'une part que l'enlèvement de β E2 et EE2 n'était pas influencé par le pH, d'autre part que l'enlèvement de β E2 était toujours élevé quelque soit le temps de réaction. De plus, la concentration en E1 à l'effluent correspondait à 20–40% de la concentration en β E2 à l'affluent, ainsi une part considérable de β E2 a été convertie en E1, qui reste soluble à l'effluent.

Certaines configurations du bioréacteur membranaire permettraient donc de retenir et de biodégrader certains EDCs (tels que les hormones naturelles et synthétiques, les produits chimiques industriels, les pesticides et herbicides) sans requérir des procédés sophistiqués de traitement tertiaire (Cicek, 2002).

Tableau 1.23 Enlèvement des EDCs durant différents procédés de traitement de STEPs, (a) hormones naturelles et synthétiques ; (b) produits chimiques

a)		Concentrations (ng/L)		Enlèvement (%)	Type de traitement	Type de matrice	Références	
		Affluent	Effluent					
Hormones naturelles	Estrogène	E1	44	17	61	AS	Eaux usées municipales	D'Ascenzo et <i>al.</i> , 2003
			31	24	23	AS	Eaux usées domestiques	Johnson et <i>al.</i> , 2000
			43.1	12.3	69	AS	Eaux usées domestiques	Onda et <i>al.</i> , 2003
		-	-	-	83	AS	Eaux usées municipales	Ternes et <i>al.</i> , 1999b
			54.8	8.2	85	AS	Eaux usées domestiques	Braga et <i>al.</i> , 2005
		-	-	-	86*	AS	Eaux usées municipales	Nakada et <i>al.</i> , 2006
		βE2	5	<1	>80	Biodégradation/sédimentation + traitement additionnel avec du charbon	Déchets des décharges municipales	Behnisch et <i>al.</i> , 2001
			11	1.6	86	AS	Eaux usées municipales	D'Ascenzo et <i>al.</i> , 2003
			9.69	4	59	AS	Eaux usées domestiques	Johnson et <i>al.</i> , 2000
			28.1	1.2	96	AS	Eaux usées domestiques	Onda et <i>al.</i> , 2003
	-	-	-	100	AS	Eaux usées municipales	Ternes et <i>al.</i> , 1999b	

a)		Concentrations (ng/L)		Enlèvement (%)	Type de traitement	Type de matrice	Références
		Affluent	Effluent				
Hormones naturelles	Estrogène	βE2 22	0.88	96	AS	Eaux usées domestiques	Braga et <i>al.</i> , 2005
		-	-	90	AS	Eaux usées municipales	Nakada et <i>al.</i> , 2006
		E3 72	2.3	97	AS	Eaux usées municipales	D'Ascenzo et <i>al.</i> , 2003
		57.29	11.71	80	AS	Eaux usées domestiques	Johnson et <i>al.</i> , 2000
		381.5	5.6	99	AS	Eaux usées domestiques	Onda et <i>al.</i> , 2003
		-	-	100	AS	Eaux usées municipales	Nakada et <i>al.</i> , 2006
Hormones synthétiques		EE2 4.84	1.40	71	AS	Eaux usées domestiques	Johnson et <i>al.</i> , 2000
		-	-	78	AS	Eaux usées municipales	Ternes et <i>al.</i> , 1999b

AS : boue activée.

*Moyenne sur 5 STEPs municipales au Japon (Tokyo)

b)		Concentrations (µg/L)		Enlèvement (%)	Type de traitement	Type de matrice	Références	
		Affluent	Effluent					
Composés phénoliques	Phénol	6	ND	-	Traitement physico-chimique + procédé biologique	Eaux usées municipales + de tanneries	Farré et <i>al.</i> , 2002	
	Nitrophénol	11	ND	-	Traitement physico-chimique + procédé biologique	Eaux usées municipales + de tanneries	Farré et <i>al.</i> , 2002	
	2,4-dichlorophénol	83	16	81	Traitement physico-chimique + procédé biologique	Eaux usées municipales + de tanneries	Farré et <i>al.</i> , 2002	
Agents de surface	APEO	NP1EO	140.03	1.99	99	Prétraitement + clarificateur primaire + bassin d'aération + clarificateur secondaire	Eaux usées industrielles + domestiques	Planas et <i>al.</i> , 2002
		NP2EO	140.03	1.99	99	Prétraitement + clarificateur primaire + bassin d'aération + clarificateur secondaire	Eaux usées industrielles + domestiques	Planas et <i>al.</i> , 2002
	Alkylphénols	NP	2.8	<0.05	>98	Biodégradation/sédimentation + traitement additionnel avec du charbon	Épandage de déchets municipaux	Behnisch et <i>al.</i> , 2001
			1.5	6.6	-	Traitement physico-chimique + procédé biologique	Eaux usées municipales + de tanneries	Farré et <i>al.</i> , 2002
			57.64	0.65	99	Prétraitement + clarificateur primaire + bassin d'aération + clarificateur secondaire	Eaux usées industrielles + domestiques	Planas et <i>al.</i> , 2002
			10	1	90	AS	Eaux usées domestiques	Onda et <i>al.</i> , 2003

b)		Concentrations		Enlèvement (%)	Type de traitement	Type de matrice	Références
		Affluent	Effluent				
Agents de surface	Alkylphénols	NP	73	47.5	35	Prétraitement + clarificateur primaire + biofiltres	Eaux usées industrielles Sheahan et <i>al.</i> , 2002
			-	-	61-75*	AS	Eaux usées municipales Nakada et <i>al.</i> , 2006
		OP	-	-	32-65*	AS	Eaux usées municipales Nakada et <i>al.</i> , 2006
		4-NP	2.365	0.945	60	Clarificateur primaire + AS + BNR + BPR + Bassin de décantation	Eaux usées municipales Körner et <i>al.</i> , 2000
		4-t-octylphénol	0.877	0.319	64	Clarificateur primaire + AS + BNR + BPR + Bassin de décantation	Eaux usées municipales Körner et <i>al.</i> , 2000
Composés polyaromatiques		PCBs	46 ng/L	1.2 ng/L	97	Biodégradation/sédimentation + traitement additionnel avec du charbon	Déchets des décharges municipales Behnisch et <i>al.</i> , 2001
Composés organiques oxygénés	Cl _h -BPA	BPA	0.13 µg/L	<0.005 µg/L	>96	Biodégradation/sédimentation + traitement additionnel avec du charbon	Déchets des décharges municipales Behnisch et <i>al.</i> , 2001
			7.1 µg/L	ND	-	Traitement physico-chimique + procédé biologique	Eaux usées municipales Farré et <i>al.</i> , 2002 + de tanneries
			2.5 µg/L	ND	-	Traitement physico-chimique + procédé biologique	Eaux usées municipales Farré et <i>al.</i> , 2002
			1.776 µg/L	0.210 µg/L	88	Clarificateur primaire + AS + BNR + BPR + Bassin de décantation	Eaux usées municipales Körner et <i>al.</i> , 2000

b)		Concentrations		Enlèvement (%)	Type de traitement	Type de matrice	Références
		Affluent	Effluent				
Composés organiques oxygénés	Cl _n -BPA	BPA	0.55 µg/L	0.14 µg/L	75	AS	Eaux usées domestiques Onda et <i>al.</i> , 2003
		-	-	>92*	AS	Eaux usées municipales	Nakada et <i>al.</i> , 2006
	Dioxine	PCDD	21 pg/L	5.2 pg/L	75	Biodégradation/sédimentation + traitement additionnel avec du charbon	Déchets des décharges municipales Behnisch et <i>al.</i> , 2001
		PCDF	8.7 pg/L	3.3 pg/L	62	Biodégradation/sédimentation + traitement additionnel avec du charbon	Déchets des décharges municipales Behnisch et <i>al.</i> , 2001

BNR : Enlèvement biologique des nutriments

BPR : Enlèvement biologique du phosphore

**Moyenne sur 5 STEPs municipales au Japon (Tokyo)*

Tableau 1.24 Évaluation de l'activité estrogénique durant différents procédés de traitement de STEPs municipales (compilé de Svenson et *al.*, 2003)

Procédé de traitement utilisé		Concentration en ng estradiol équivalent /L		Efficacité d'enlèvement (%)
Traitement biologique	Précipitation	Affluent	Effluent	
-	Directe, Al	11,9	12,4	-
-	Directe, Al	10,8	12,7	-
-	Directe, Fe(III)	5,45	5,9	-
-	Directe, chaux	4,15	1,1	73,5
AS	Pré, Fe(III)	29,8	12,3	58,7
AS	Simultanée, Al	5	0,3	94
AS	Simultanée, Al	10,2	4,3	57,8
AS	Simultanée, Fe(III)	5	1,6	68
AS	Simultanée + post, Fe(III)	12,5	1,45	88,4
AS	Pré + post, Al	8	2,55	68,1
AS biosorption	Post, Al	6,05	1,2	80,2
AS & enlèvement de l'azote	Post, Al	3,85	<0,1	>97,4
AS & enlèvement de l'azote	Pré, Fe(II)	19,5	<0,1	>99,5
Lit bactérien/AS	Pré + post, Al	6,95	<0,1	>98,5
Lit bactérien	Pré, Al	6,75	1,7	74,8
Lit bactérien	Post, Al	22,35	14,85	33,6
Lit bactérien	Post, Al	3,05	10,75	-
Biorotor	Post, Fe(III)	1,6	5,25	-

1.4.2 Traitements dits avancés

Incontestablement, les techniques actuellement appliquées dans le traitement des eaux usées sont inadéquates pour enlever de manière significative les polluants présents à l'état de trace, tels que les EDCs (Coleman et *al.*, 2000 ; Ternes et *al.*, 2003). Par conséquent, des technologies plus évoluées, tels que les procédés de chloration, d'ozonation, les procédés d'oxydation dits avancés (AOPs) et les réactions de photo décomposition, ont été développées. D'ailleurs, ces procédés de décomposition devraient être favorisés plutôt que les procédés de séparation tels que l'adsorption sur charbon actif, la floculation, la sédimentation et la filtration sur membrane. En effet, par les procédés de séparation, les EDCs se retrouvent, fortement concentrés, dans les boues, montrant ainsi l'intérêt de la dégradation et de l'élimination (Nakagawa et *al.*, 2002).

1.4.2.1 Procédé de chloration

L'hypochlorite de sodium et le bioxyde de chlore, appelé chlore disponible, ont été largement utilisés en tant qu'agent de blanchissement dans les usines de papier et comme agent de désinfection dans les STEP's grâce à leurs capacités oxydantes, et leurs faibles coûts (Moriyama et *al.*, 2004). D'autre part, il est bien connu que la désinfection par chloration est une étape essentielle dans le système de traitement des eaux potables et que les composés phénoliques sont réactifs avec l'hypochlorite (Draley, 1975, cité par Hu et *al.*, 2003). Ainsi, plusieurs études ont étudié l'efficacité du traitement par chloration de certains EDCs (Hu et *al.*, 2002a,b ; Hu et *al.*, 2003 ; Moriyama et *al.*, 2004 ; Lee et *al.*, 2004 ; Gallard et *al.*, 2004 ; Deborde et *al.*, 2004). Il a été montré que la chloration était un procédé de traitement efficace pour l'oxydation de nombreux EDCs, cependant la formation de sous-produits biologiquement actifs a été rapportée. De plus, certains produits chlorés sont cancérigènes et/ou mutagènes (Moriyama et *al.*, 2004). Ainsi, il est important d'identifier les produits de réaction des EDCs avec le chlore et leurs activités estrogéniques associées (Hu et *al.*, 2003 ; Moriyama et *al.*, 2004).

Dans de récentes études (Gallard et *al.*, 2004 ; Deborde et *al.*, 2004) sur la chloration de différents EDCs (E1, β E2, E3, EE2, progestérone, 4-NP, et BPA), il a été montré que toutes les molécules incluant un cycle phénolique dans leur structure chimique étaient oxydées par le chlore, alors que la progestérone est restée inchangée. Quelque soit le pH, la chloration exhibe des vitesses de réaction de second ordre (Tableau 1.25). Hu et *al.* (2003) et Moriyama et *al.* (2004) ont prouvé que le β E2 et le EE2 réagissent rapidement avec le HOCl et sont

complètement enlevés (Tableau 1.26). De plus, Kobuke et *al.* (2002) ont rapporté que l'activité estrogénique diminuait en raison de la chloration. Bien que les mécanismes impliqués dans les processus de chloration sont peu clairs, l'oxydation par le chlore libre peut être suffisante pour changer la structure chimique du composé estrogénique, ce qui semble déterminer le pouvoir estrogénique.

Cependant, plusieurs produits chlorés sont formés. En effet, Hu et *al.* (2003) ont pu observer principalement la formation du 4-chloro-E2, 2,4-dichloro-E2 et 2,4-dichloro-E1, et d'autres composés non identifiés (Tableau 1.27). Hu et *al.* (2003) ont conclu que les sous-produits de la réaction du β E2 avec le chlore avaient une activité estrogénique. D'ailleurs, Moriyama et *al.* (2004) ont confirmé la formation de deux sous-produits dans les solutions fortement chlorées après 60 minutes de réaction (4Cl-EE2, 1-6 mol% ; 2,4-diCl-EE2, 3-25 mol%). L'activité estrogénique du 4-Cl-EE2 était semblable à celle du EE2, et l'activité du 2,4-diCl-EE2 était d'environ 10 fois inférieure (Tableau 1.27). Par ailleurs, Gallard et *al.* (2004) ont étudié la chloration du BPA en eau pure. Ils ont montré que le BPA a disparu en 4 heures de traitement, et que des congénères chlorés du BPA ont été rapidement formés et restaient en solution pendant plus de 10–20 heures quand de faibles doses de chlore étaient utilisées (0.5–1 mg/L). Pour limiter la présence de ses congénères à l'effluent, Gallard et *al.* (2004) ont proposé de maintenir de fortes concentrations en chlore afin de produire et décomposer rapidement les sous-produits chlorés du BPA.

Tableau 1.25 Constantes de vitesse apparentes de second ordre (k_{Cl}) déterminées pour le procédé de chloration (Deborde et *al.*, 2004)

EDC	k_{Cl} (1/M.s)
E1	131.1
β E2	115.2
E3	113.6
EE2	112.1
4-NP	12.6

Tableau 1.26 Enlèvement des EDCs durant un traitement dit avancé

	EDC	Enlèvement (%)	τ (min)	Dose ajoutée	Concentration en EDC	Référence
Ozonation	E1	>80	18	5 mg O ₃ /l	15 ng E1/l ⁽¹⁾	Ternes et <i>al.</i> , 2003
	E1, β E2	95	10	5 mg O ₃ /l	9.7-28 ng E1/l ⁽²⁾ 3.0-21 ng β E2/l ⁽²⁾	Nakagawa et <i>al.</i> , 2002
	EE2	>90%	10	2 mg O ₃ /l	1 μ g EE2/l ⁽³⁾	Huber et <i>al.</i> , 2005
Chloration	β E2	100	10	1.46 mg/L de sodium hypochlorite	50 μ g β E2/l ⁽⁴⁾	Hu et <i>al.</i> , 2003
	β E2	(a)	2160	1.5 mg/L de Chlorine	10 ⁻⁷ M de β E2 ⁽⁴⁾	Lee et <i>al.</i> , 2004
	EE2	100	5	1 mmol/l de Chlorine	0.2 mmol EE2/l ⁽⁴⁾	Moriyama et <i>al.</i> , 2004
MnO ₂	EE2	81.7	67.2	-	15 μ g EE2/l ⁽⁴⁾	Rudder et <i>al.</i> , 2004
TiO ₂	E1	90	30	TiO ₂ immobilisé	100 μ g E1/l ⁽⁴⁾	Tanizaki et <i>al.</i> , 2002
	β E2	98	210	-	0.05-3 μ mol β E2/l ⁽⁴⁾	Coleman et <i>al.</i> , 2000
	β E2	99	30	1.0 g/L de TiO ₂ en suspension	10 ⁻⁶ M de β E2 ⁽⁴⁾	Ohko et <i>al.</i> , 2002
	β E2	100 ^(b)	180	1.0 g/L de TiO ₂ en suspension	10 ⁻⁶ M de β E2 ⁽⁴⁾	Ohko et <i>al.</i> , 2002
	β E2	90	120	TiO ₂ immobilisé	100 μ g E1/l ⁽⁴⁾	Tanizaki et <i>al.</i> , 2002
	EE2	90	30	TiO ₂ immobilisé	100 μ g E1/l ⁽⁴⁾	Tanizaki et <i>al.</i> , 2002

τ : Temps de réaction

^(a) Elimination complète de l'activité estrogénique ^(b) Complètement décomposé en CO₂ ⁽¹⁾ Effluent d'une STEP municipale

⁽²⁾ Eaux usées provenant d'un traitement secondaire ⁽³⁾ Effluent du procédé conventionnel à boues activées d'une STEP municipale

⁽⁴⁾ Eau synthétique

Tableau 1.27 Activité œstrogénique des différents produits formés lors du procédé de chloration

EDC	Produits de formation	Activité œstrogénique	EC50 (nM)	Référence
βE2	4-chloro-E2	Même activité que E1	10 ²	Hu et <i>al.</i> , 2003
	2,4-chloro-E2	40% de l'activité de E1	10 ³	Hu et <i>al.</i> , 2003
	2,4-chloro-E1	Plus faible	10 ³	Hu et <i>al.</i> , 2003
	4 autres composés	×	×	Hu et <i>al.</i> , 2003
EE2	4-chloro-EE2	Même activité que EE2	Plus que EE2	Moriyama et <i>al.</i> , 2004
	2,4-dichloro-EE2	10 fois plus faible que EE2	Plus que EE2	Moriyama et <i>al.</i> , 2004
	4 autres composés	×	×	Moriyama et <i>al.</i> , 2004

× : Non-identifié ou non-analysé

1.4.2.2 Procédé d'ozonation et les procédés d'oxydation dits avancés (AOPs)

L'ozonation et les AOPs sont largement reconnus comme des technologies efficaces pour l'enlèvement des produits chimiques récalcitrants des eaux (Glaze et *al.*, 1987, cité par Kosaka et *al.*, 2000 ; Ternes et *al.*, 2003 ; Huber et *al.*, 2003), par exemple dans le traitement de l'eau potable, pour l'oxydation des produits pharmaceutiques (Huber et *al.*, 2003). Westerhoff et *al.* (2005) ont rapporté que le traitement à l'ozone est plus efficace pour l'oxydation de composés comportant un cycle phénolique dans leur structure chimique, tels que les œstrogènes. De plus, l'ozonation et les AOPs peuvent être exécutés à des températures et des pressions normales et sont capables de traiter une grande quantité d'eau (Nakagawa et *al.*, 2002).

Kosaka et *al.* (2000), Nakagawa et *al.* (2002) et Ternes et *al.* (2003) ont pu considérablement éliminer divers œstrogènes pendant un traitement à ozonation (Tableau 1.26). Larsen et *al.* (2004) ont rapporté que des doses en ozone de 10–15 mg/L permettent un excellent enlèvement de E1. Cependant, ils ont aussi souligné le fait que le traitement de l'effluent par ozonation peut causer une augmentation de 40–50% de la demande en énergie d'une STEP conventionnelle. De plus, Huber et *al.* (2003) ont déterminé, durant des expériences à échelle du laboratoire, les constantes de vitesse du EE2 pour le procédé d'ozonation (k_{O_3}) et pour l'AOP (K_{OH}). Par ailleurs, Deborde et *al.* (2005) ont montré que E1, βE2, E3, EE2, BPA et 4-NP réagissent très rapidement avec O₃ à des conditions de pH neutres (Tableau 1.28). De

plus, ils ont conclu que le procédé d'ozonation pourrait oxyder efficacement les EDCs étudiés sous des conditions typiques de système de traitement des eaux.

Tableau 1.28 Constantes de vitesse déterminées pour les procédés d'ozonation (k_{O_3}) et pour les procédés d'oxydation dit avancée (k_{OH})

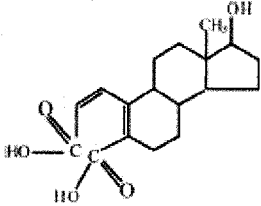
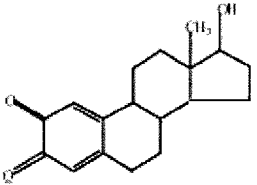
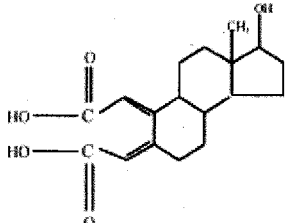
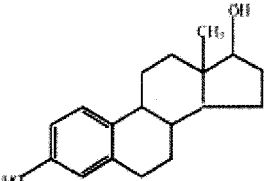
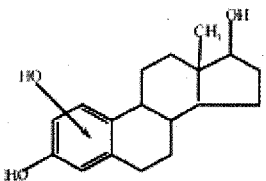
EDC	k_{O_3} (1/M.s)	k_{OH} (1/M.s)	Traitement	Référence
E1	$1.53 (10^5)$	-	O_3 ($T=20\pm 2$ °C)	Deborde et <i>al.</i> , 2005
β E2	$1 (10^6)$	-	O_3 (pH 7, $T=20$ °C)	Huber et <i>al.</i> , 2003
	$2.21 (10^5)$	-	O_3 ($T=20\pm 2$ °C)	Deborde et <i>al.</i> , 2005
	-	1.41 ± 0.33 (10^{10})	UV/ H_2O_2	Rosenfeldt et Linden, 2004
E3	$1.01 (10^5)$	-	O_3 ($T=20\pm 2$ °C)	Deborde et <i>al.</i> , 2005
EE2	$3 (10^6)$	-	O_3 (pH 7, $T=20$ °C)	Huber et <i>al.</i> , 2003, 2005
	$1.83 (10^5)$	-	O_3 ($T=20\pm 2$ °C)	Deborde et <i>al.</i> , 2005
	-	$9.8\pm 1.2 (10^9)$	UV/ H_2O_2 (pH 7, $T=25$ °C)	Huber et <i>al.</i> , 2003, 2005
	-	1.08 ± 0.23 (10^{10})	UV/ H_2O_2	Rosenfeldt et Linden, 2004
Testostérone	$1 (10^5)$	-	O_3 (pH 7, $T=20$ °C)	Huber et <i>al.</i> , 2003
BPA	$1-10 (10^6)$	-	O_3 (pH 7, $T=20$ °C)	Huber et <i>al.</i> , 2003
	$1.68 (10^4)$	-	O_3 ($T=20\pm 2$ °C)	Deborde et <i>al.</i> , 2005
	-	1.02 ± 0.06 (10^{10})	UV/ H_2O_2	Rosenfeldt et Linden, 2004
4-NP	$1-10 (10^6)$	-	O_3 (pH 7, $T=20$ °C)	Huber et <i>al.</i> , 2003
	$3.80 (10^4)$	-	O_3 ($T=20\pm 2$ °C)	Deborde et <i>al.</i> , 2005
Micropolluants	-	$10^9 - 10^{10}$	O_3/H_2O_2	Kosaka et <i>al.</i> , 2000

Dans les AOPs, le radical hydroxyle ($HO^\bullet$), agissant comme oxydant, est produit pendant les réactions en chaîne initiées par les combinaisons, telles que ozone/dioxyde d'hydrogène (O_3/H_2O_2) et ozone/ultraviolet (O_3/UV) (Kosaka et *al.*, 2000). Cependant, les EDCs co-existent avec d'autres composés organiques et inorganiques dont les concentrations sont relativement élevées dans les eaux. La réaction avec le $HO^\bullet$ est moins sélective et ainsi le $HO^\bullet$ généré est inefficacement consommé par les composés organiques et inorganiques. Il est

supposé que les efficacités d'enlèvement des EDCs dépendent des concentrations des EDCs, des composés co-existants et de leurs réactivités avec l'ozone et le HO[•]. D'ailleurs, l'interaction entre les EDCs et les autres composés hydrophobes (par exemple, les substances humiques) peut également potentiellement affecter l'efficacité des AOPs (Kosaka et *al.*, 2000). Dans son étude, Kosaka et *al.* (2000) ont prouvé que le β E2 est fortement réactif avec l'ozone puisque β E2 a deux groupes hydroxyles, groupes fonctionnels réactifs envers l'ozone. De plus, Kosaka et *al.* (2000) ont également conclu que la décomposition du β E2 a été peu affectée par la présence de l'acide humique. Irmak et *al.* (2005) ont comparé les procédés d'ozonation O₃ et l'AOP O₃/UV pour la dégradation de β E2 et du BPA. Ils ont montré que le système O₃/UV permet de diminuer la consommation de O₃ requise, ainsi que le temps de réaction, pour atteindre un même taux d'enlèvement de β E2. De plus, l'oxydation de β E2 par O₃ semblait être un système plus efficace que l'oxydation du BPA par O₃. D'un point de vue économique, Irmak et *al.* (2005) ont conclu que l'ozonation et l'AOP ne sont pas des techniques bon marché.

En outre, les sous-produits d'ozonation sont encore inconnus (Ternes et *al.*, 2003). Cependant, Ternes et *al.* (2003) ont rapporté que l'ozonation augmente généralement le nombre de groupes fonctionnels et la polarité de la molécule. En effet, les estrogènes hydroxylés devraient ainsi perdre leur affinité avec le récepteur d'estrogène, et donc réduire considérablement les activités estrogéniques des eaux usées, mais cette supposition reste à être prouvée (Ternes et *al.*, 2003). Dans l'étude de Huber et *al.* (2003) sur les cheminements de dégradation, il est accepté qu'une majeure partie des réactions avec les radicaux OH aurait lieu sur les cycles benzène, ayant pour résultat le clivage des cycles phénoliques. Sur la base de cette information, Huber et *al.* (2003) ont pu conclure que les modifications provoquées par l'ozonation ou les AOPs devraient être suffisantes pour éliminer les effets estrogéniques du EE2. Cependant, les réactions avec l'ozone et les radicaux OH pendant un procédé d'ozonation n'auront pas comme conséquence la minéralisation complète du EE2 (Huber et *al.*, 2003). Irmak et *al.* (2005) ont identifié par LC-MS les sous-produits formés pendant l'ozonation du β E2 (Tableau 1.29). Ils ont montré que les sous-produits sont formés via l'oxydation du cycle aromatique du composé β E2 par l'ozone et les radicaux OH.

Tableau 1.29 Sous-produits formés pendant l'ozonation de β E2 et déterminés par LC-MS (tiré de Irmak et *al.*, 2005)

Sous-produit	Temps de rétention (min)	Sous-produit	Temps de rétention (min)
	5.06		19.99
ou/et			
	7.21		22.88
	8.15		

1.4.2.3 Réactions de photolyse

Des réactions de photolyse ont été intensivement étudiées pour éliminer les EDCs, spécifiquement les estrogènes (Tableau 1.26), de l'environnement aqueux (Segmuller et *al.*, 2000 ; Coleman et *al.*, 2000, 2004 ; Ohko et *al.*, 2002 ; Ike et *al.*, 2002 ; Liu et Liu, 2004). Le Tableau 1.30 présente les différentes vitesses de dégradation déterminées pour divers EDCs (Ike et *al.*, 2002 ; Coleman et *al.*, 2004).

Dans leur revue sur le transport et le devenir des estrogènes naturels, Khanal et *al.* (2006) ont rapporté que la dégradation de E1 par photolyse directe requière une plus grande énergie de départ que la dégradation de β E2. Rosenfeldt et Linden (2004) ont étudié la photolyse directe conventionnelle (lampe UV monochromatique à faible pression - LP) et la photolyse avec une lampe UV polychromatique à moyenne pression (MP) pour la dégradation de β E2, EE2 et BPA. Ils ont montré que le système MP est plus efficace que le système conventionnel. Liu et Liu (2004) ont examiné la photolyse directe par une lampe à ultraviolet et une lampe à mercure à haute pression (UV-Vis) de deux estrogènes, le β E2 et le E1, dans des solutions

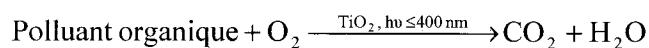
aqueuses à des concentrations élevées. Ils ont pu prouver que la photolyse des estrogènes cause le clivage et l'oxydation des cycles benzènes formant ainsi des composés contenant des groupes carbonyles. D'ailleurs, Ohko et *al.* (2002), dans son étude sur la dégradation du β E2 par photolyse au bioxyde de titane (TiO_2), ont montré que le cycle phénol de la molécule β E2 devrait être le point de départ de l'oxydation photocatalytique du β E2. De plus, puisque les produits intermédiaires n'ont pas de cycle phénol, Ohko et *al.* (2002) ont conclu que leurs activités estrogéniques sont négligeables.

Tableau 1.30 Constantes de vitesse de pseudo premier ordre déterminées (eau purifiée) pour les procédés de photolyse par UV (k_{UV}) et de photocatalyse au TiO_2 (k_{TiO_2})

EDC	$k_{\text{UV}} (\text{min}^{-1})$	$k_{\text{TiO}_2} (\text{min}^{-1})$	Référence
E1	0.011	0.106	Coleman et <i>al.</i> , 2004
	-	0.058	Tanizaki et <i>al.</i> , 2002
β E2	0.012	0.086	Coleman et <i>al.</i> , 2004
	-	0.015	Tanizaki et <i>al.</i> , 2002
EE2	0.035	0.086	Coleman et <i>al.</i> , 2004
	-	0.050	Tanizaki et <i>al.</i> , 2002
NP	-	0.062	Ike et <i>al.</i> , 2002
	-	0.055	Tanizaki et <i>al.</i> , 2002
NP1EO	-	0.044	Ike et <i>al.</i> , 2002
NP1EC	-	0.016	Ike et <i>al.</i> , 2002
OP	-	0.14	Tanizaki et <i>al.</i> , 2002
BPA	-	0.15	Tanizaki et <i>al.</i> , 2002

La photocatalyse, comme son nom l'indique, implique la lumière et un catalyseur (appelé aussi semi-conducteur) pour amener à une réaction chimique (Coleman et *al.*, 2004). Ces dernières années, le TiO_2 est un catalyseur largement étudié et employé dans le traitement des

EDCs présents dans l'environnement aquatique (Coleman et *al.*, 2000, 2004 ; Ohko et *al.*, 2002 ; Horikoshi et *al.*, 2002 ; Ike et *al.*, 2002 ; Kohtani et *al.*, 2002 ; Tanizaki et *al.*, 2002 ; Nakashima et *al.*, 2002, 2003 ; Fukahori et *al.*, 2003 ; Watanabe et *al.*, 2003). C'est un catalyseur très stable chimiquement et non polluant. Les polluants traités sont usuellement des composés organiques, et ainsi, le processus global de la réaction peut être résumé par l'équation suivante (Mills et *al.*, 1993) :



Dans ce procédé, le semi-conducteur TiO_2 absorbe la lumière et convertit l'énergie photonique en énergie chimique par un système redox. Les polluants organiques peuvent ainsi être dégradés en présence d'oxygène en espèces minérales non toxiques. Le processus initial de cette minéralisation est une attaque directe des molécules ou la formation de radicaux $\text{OH}^\cdot$.

Coleman et *al.* (2004) ont comparé l'efficacité de la photocatalyse vs. la photolyse. Ils ont montré que la photocatalyse au TiO_2 était la méthode la plus efficace et permettait d'enlever complètement l'estrogénicité, combinée de E1, βE2 et EE2, en 1 heure de traitement. Par contre, la photolyse par UV prenait 9 fois plus longtemps pour enlever l'estrogénicité associée à E1, 6 fois plus pour βE2 et 2.4 fois plus pour EE2, que la photocatalyse. Par ailleurs, les vitesses de dégradation de E1, βE2 et EE2 étaient identiques dans le cas de la photocatalyse, alors qu'elles étaient variables et bien plus faibles pour le traitement par photolyse, dans l'ordre suivant $\text{EE2} > \text{E1} > \beta\text{E2}$ (Tableau 1.30). De plus, Khanal et *al.* (2006) ont rapporté que la photodégradation de βE2 en présence de TiO_2 requière beaucoup moins d'énergie. Tanizaki et *al.* (2002) ont étudié la décomposition de différents EDCs (concentration initiale de 100 $\mu\text{g/L}$) par photolyse et photocatalyse au TiO_2 . Ils ont montré que la photolyse seule n'a pas permis de dégrader βE2 et que seulement 20% de E1 et EE2 ont pu être décomposés. Par contre, la photocatalyse a permis une réduction de 90% en 2 heures de traitement pour βE2 et en 30 minutes pour E1 et EE2. Ainsi, E1 et EE2 montre une vitesse de décomposition plus rapide que βE2 (Tableau 1.30) (Tanizaki et *al.*, 2002). Par ailleurs, Nakashima et *al.* (2003) ont étudié la décomposition de E1 et βE2 (concentrations initiales de 250 $\mu\text{g/L}$) par photocatalyse avec du TiO_2 immobilisé sur des feuilles minces de polytétrafluoroéthylène (PTFE). Sous une illumination UV relativement faible (1.2 mW.cm^{-2}), la décomposition a été rapide.

1.4.2.4 Traitement à l'oxyde de manganèse

Une nouvelle stratégie pour l'enlèvement des composés trace, tels que les EDCs, présents dans les eaux usées pourrait être la réalisation d'une étape biocatalytique supplémentaire au traitement conventionnel. Dans ce but, Rudder et *al.* (2004) ont employé de l'oxyde de manganèse (MnO_2) comme substrat oxydant pour l'enlèvement en EE2. En effet, le MnO_2 est un oxydant bien connu, et ses réactions redox avec des produits organiques xénobiotiques ont été intensivement étudiées. De plus, le MnO_2 a été utilisé pour adsorber des métaux et des composés organiques (Rudder et *al.*, 2004). Rudder et *al.* (2004) ont observé un enlèvement de 81.7% en EE2 dans un réacteur contenant du MnO_2 (Tableau 1.26). De plus, comme après 40 jours de traitement le réacteur contenant du MnO_2 n'était pas encore saturé, Rudder et *al.* (2004) ont conclu que le EE2 n'a pas été qu'adsorbé sur les granules MnO_2 , mais plutôt aussi dégradé en d'autres composés. Ainsi, le cycle d'auto régénération du MnO_2 semble être possible et rend ainsi ce traitement rentable, car de cette façon la matrice n'a pas besoin d'être remplacée (Rudder et *al.*, 2004). Cependant, Rudder et *al.*, (2004) n'ont pas étudié les métabolites formés du EE2 ainsi que leur activité estrogénique correspondante, et les expériences ont été menées dans une eau synthétique à des concentrations élevées (de l'ordre du $\mu\text{g/L}$).

En outre, Rudder et *al.* (2004) ont comparé le traitement par le réacteur contenant MnO_2 au traitement par charbon actif granulé (GAC). Ce dernier a eu une capacité élevée d'adsorption (99.8%) du EE2 pour des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/L}$, alors que pour des concentrations environnementales (de l'ordre du ng/L), le système de traitement au GAC ne peut seulement adsorber que de faibles quantités (Rudder et *al.*, 2004).

1.4.3 Traitements enzymatiques

Le traitement des déchets industriels, des eaux usées, des boues et des sols, contaminés par des phénols et d'autres composés aromatiques, par des enzymes telles que des peroxydases (POD) ou des oxydases polyphénoliques (PPO) (Tableau 1.31) est une nouvelle et intéressante stratégie. En effet, il a été rapporté qu'un grand nombre d'enzymes provenant d'une variété de différents micro-organismes et plantes jouent un rôle important dans les traitements des déchets (Karam et Nicell, 1997). Cette méthode a été efficacement appliquée pour l'enlèvement de phénols et produits phénoliques dans les eaux usées (Cooper et Nicell, 1996 ; Edwards et *al.*, 1999 ; Wagner et Nicell, 2001 ; Gianfreda et *al.*, 2003). Les enzymes peuvent agir avec une grande spécificité sur les polluants récalcitrants, qui peuvent être

ensuite enlever par précipitation ou transformer en d'autres produits (Karam et Nicell, 1997 ; Caza et *al.*, 1999).

Tableau 1.31 Principales recherches portant sur l'oxydation enzymatique de composés phénoliques

Enzyme		Référence
POD	CPO	Öberg et <i>al.</i> , 1990 ; De Riso et <i>al.</i> , 2003
	HRP	Öberg et <i>al.</i> , 1990 ; Nicell et <i>al.</i> , 1995 ; Cooper et Nicell, 1996 ; Tatsumi et <i>al.</i> , 1996 ; Wu et <i>al.</i> , 1997 ; Tong et <i>al.</i> , 1997 ; Kazunga et <i>al.</i> , 1999 ; Ghiourelotis et Nicell, 1999, 2000 ; Zhang et Nicell, 2000 ; Wagner et Nicell, 2001, 2002a, b ; De Riso et <i>al.</i> , 2003 ; Sakuyama et <i>al.</i> , 2003 ; Wagner et Nicell, 2003 ; Huang et <i>al.</i> , 2005 ; Huang et Weber, 2005 ; Lai et Lin, 2005 ; Wagner et Nicell, 2005 ; Bódalo et <i>al.</i> , 2006a ; Cheng et <i>al.</i> , 2006
	MnP	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001 ; Suzuki et <i>al.</i> , 2003 ; Tamagawa et <i>al.</i> , 2006
	LiP	Ehlers et Rose, 2005
	LPO	Öberg et <i>al.</i> , 1990 ; De Riso et <i>al.</i> , 2003
	SBP	Caza et <i>al.</i> , 1999 ; Flock et <i>al.</i> , 1999 ; Ghiourelotis et Nicell, 1999 ; Wrigth et Nicell, 1999 ; Ghiourelotis et Nicell, 2000 ; Kinsley et Nicell, 2000 ; Kennedy et <i>al.</i> , 2002 ; Bassi et <i>al.</i> , 2004 ; Bódalo et <i>al.</i> , 2006a,b
PPO	Laccase	Xu, 1996 ; Majcherczyk et <i>al.</i> , 1998 ; Fukuda et <i>al.</i> , 2001 ; Uchida et <i>al.</i> , 2001 ; Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001 ; d'Acunzo et <i>al.</i> , 2002 ; Gianfreda et <i>al.</i> , 2003 ; Suzuki et <i>al.</i> , 2003 ; Fukuda et <i>al.</i> , 2004 ; Keum et Li, 2004 ; Saito et <i>al.</i> , 2004 ; Kurniawati et Nicell, 2005 ; Modaressi et <i>al.</i> , 2005 ; Diano et <i>al.</i> , 2007 ; Kim et Nicell, 2006a,b ; Tamagawa et <i>al.</i> , 2006
	Tyrosinase	Edwards et <i>al.</i> , 1999 ; Ikehata et Nicell, 2000 ; Bevilaqua et <i>al.</i> , 2002 ; Yoshida et <i>al.</i> , 2002 ; Ensuncho et <i>al.</i> , 2005 ; Yamada et <i>al.</i> , 2005

HRP-peroxydase de raifort SBP-peroxydase de soja MnP-peroxydase de manganèse
LiP-peroxidase de lignine LPO-lactoperoxidase CPO-chloroperoxidase

Une fois activée par du dioxyde d'hydrogène (H₂O₂), les PODs catalysent l'oxydation des composés aromatiques pour produire des radicaux libres qui interagissent spontanément pour former des polymères à forte masse moléculaire et de faible solubilité (Buchanan et Nicell, 1998). Les sous-produits de réaction ainsi formés sont polymérisés par un procédé non enzymatique, qui mène à la formation de précipités insolubles dans l'eau qui peuvent être

facilement enlevés des eaux usées par sédimentation ou filtration (Karam et Nicell, 1997 ; Buchanan et Nicell, 1998 ; Nicell, 2003). Typiquement, le cycle catalytique de ces enzymes implique une oxydation par échange d'un électron de deux molécules substrat par les intermédiaires catalytiques de l'enzyme, nommés « composé i » et « composé ii » (Figure 1.10) (De Riso et *al.*, 2003). Par ailleurs, le procédé catalytique avec les PODs (López-Molina et *al.*, 2003), en particulier l'enzyme peroxydase de raifort (HRP) (Buchanan et Nicell, 1998), a un potentiel pour les applications dans le traitement des eaux et eaux usées contaminées par des polluants phénoliques. En effet, plusieurs études à échelle du laboratoire (Cooper et Nicell, 1996 ; Wagner et Nicell, 2001) ont démontré que la HRP peut catalyser la transformation de contaminants dans une matrice d'eau usée réelle.

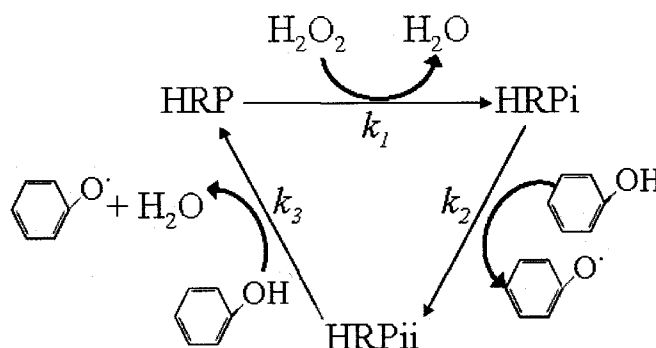


Figure 1.10 Cycle catalytique simplifié de la HRP, indiquant les principales réactions intervenant lors de l'oxydation d'un composé aromatique (le phénol dans ce cas, adapté de Buchanan et Nicell, 1997).

Les PPOs catalysent deux réactions en présence d'oxygène moléculaire, l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (activité de la monophénolase) et l'oxydation des *o*-diphénols en *o*-quinones (activité de la diphénolase). Les quinones sont extrêmement instables en solution, réagissant, à travers une réaction non enzymatique, pour produire des polymères insolubles (Duckworth et Coleman, 1970 cités par Bevilaqua et *al.*, 2002). La grande spécificité du substrat des PPOs fait que ces enzymes sont très efficaces pour le traitement des déchets industriels (Edwards et *al.*, 1999), mais ces applications peuvent souffrir des limitations dues à de basses concentrations d'oxygène dissous dans l'eau (López-Molina et *al.*, 2003).

Plusieurs recherches ont étudié la caractérisation des principales enzymes (HRP, SBP, laccase et tyrosinase) pour traiter des solutions phénoliques. L'influence de différents

paramètres (tels que le pH, la température) sur le traitement enzymatique a été évaluée. Karam et Nicell (1997) ont rapporté que les conditions opératoires optimales dépendent d'une part de l'enzyme étudiée et d'autre part du substrat considéré. Ainsi, un certain nombre d'enzymes (Karam et Nicell, 1997) ont été, avec succès, utilisés pour l'enlèvement des composés aromatiques, tels que des phénols, alkylphénols et certains estrogènes. Cependant, peu de données existent sur l'oxydation enzymatique de ces derniers composés.

Suzuki et *al.* (2003) et Tamagawa et *al.* (2006) ont rapporté l'application de l'enzyme peroxydase de manganèse (MnP), de la laccase et du système laccase-médiateur, avec le 1-hydroxybenzotriazole (HBT) comme médiateur, pour le traitement du β E2 et du EE2 (Suzuki et *al.*, 2003) et de E1 (Tamagawa et *al.*, 2006). Suzuki et *al.* (2003) ont pu considérablement réduire la concentration en β E2 et EE2 après une heure de traitement (Tableaux 1.32 et 1.33). De plus, comme aucun métabolite dans le mélange n'a été trouvé, Suzuki et *al.* (2003) ont suggéré que la réduction des activités estrogéniques du β E2 et EE2 est due au clivage du cycle aromatique de ces composés (Suzuki et *al.*, 2003). Tamagawa et *al.* (2006) ont montré que E1 avait complètement disparu en 1 heure de traitement par l'enzyme MnP ou laccase, et que l'activité estrogénique associée à E1 était totalement enlevée en 2 heures de traitement (Tableaux 1.32, 1.33 et 1.34). Cependant, les concentrations en estrogènes utilisées dans ces études étaient de l'ordre de 10^6 fois plus élevées que les concentrations environnementales généralement observées. De plus, comme l'utilisation de l'enzyme MnP demande des concentrations élevées en Mn(III) (Figure 1.11), son application dans le traitement des eaux usées semble irréalisable (Karam et Nicell, 1997).

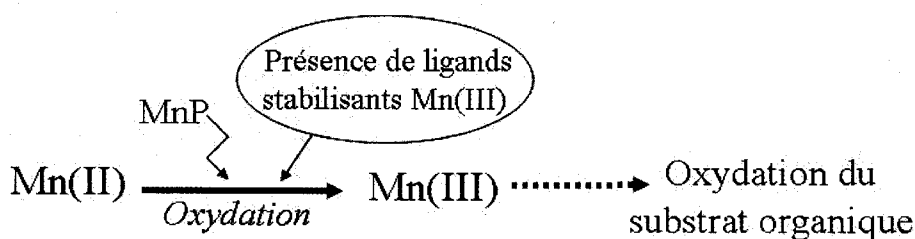


Figure 1.11 Procédé d'oxydation du substrat organique par peroxydase de manganèse

Concernant le phénol et les alkylphénols, diverses enzymes ont permis un traitement efficace des solutions aqueuses contaminées par ces composés. Parmi les PODs, la HRP est l'une des enzymes les plus étudiées dans le domaine du traitement enzymatique des déchets (Nicell, 2003). López-Molina et *al.* (2003) ont également étudié le traitement d'une solution aqueuse

Tableau 1.32 Oxydation enzymatique de divers EDCs aromatiques par POD

EDC	[EDC] (mM)	Enzyme	[Enzyme] (U/mL)	Enlèvement (%)	τ (min)	Remarque	Référence
Phénol total	3.30	HRP	13	99	30	[H ₂ O ₂]=4.9mM	Cooper et Nicell, 1996
Phénol total	3.30	HRP	0.6	98.5	30	[H ₂ O ₂]=4.9mM [PEG]=80mg/L	Cooper et Nicell, 1996
Phénol	2	HRP	0.9	25	15	[H ₂ O ₂]=2mM	Bódalo et <i>al.</i> , 2006a
Phénol	2	HRP	0.9	90	15	[H ₂ O ₂]=2mM [PEG]=250mg/L	Bódalo et <i>al.</i> , 2006a
BPA	0.15	HRP	2.5	100	25	[H ₂ O ₂]=0.15mM	Huang et Weber, 2005
BPA	2	HRP	0.3	10	60	[H ₂ O ₂]=3mM	Sakuyama et <i>al.</i> , 2003
BPA	2	HRP	66.7	>99	15	[H ₂ O ₂]=3mM	Sakuyama et <i>al.</i> , 2003
PCP*	0.05	HRP	0.05	80	40	[H ₂ O ₂]=0.025mM	Zhang et Nicell, 2000
PCP	0.05	HRP	0.1	80	15	[H ₂ O ₂]=0.025mM	Zhang et Nicell, 2000
PCP	0.05	HRP	0.1	80	8	[H ₂ O ₂]=0.05mM	Zhang et Nicell, 2000
Phénol	2	SBP	1.8	75	120	[H ₂ O ₂]=2mM	Bódalo et <i>al.</i> , 2006a

EDC	[EDC] (mM)	Enzyme	[Enzyme] (U/mL)	Enlèvement (%)	τ (min)	Remarque	Référence
Phénol	2	SBP	1.8	80	50	[H ₂ O ₂]=2mM [PEG]=250mg/L	Bódalo et <i>al.</i> , 2006a
Phénol	5	SBP	1.6	>95	180	[H ₂ O ₂]=10mM [PEG]=176mg/L	Kinsley et Nicell, 2000
Phénol	1	SBP	3.3	>99	180	[H ₂ O ₂]=2mM	Wright et Nicell, 1999
βE2, EE2	0.01	MnP	0.6	100	60	[H ₂ O ₂]=?	Suzuki et <i>al.</i> , 2003
E1	0.01	MnP	0.6	100	60	[H ₂ O ₂]=?	Tamagawa et <i>al.</i> , 2006
BPA	0.22	MnP	0.1	100	60	[H ₂ O ₂]=?	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
NP	0.23	MnP	0.1	100	60	[H ₂ O ₂]=?	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
BPA	0.40	Peroxydase microbienne	5	100	30	[H ₂ O ₂]=0.8mM	Sakurai et <i>al.</i> , 2001

? informations non-données par les auteurs.

PEG : glycol polyéthylénique

*PCP : pentachlorophénol

Les procédures expérimentales suivies par les auteurs des études énumérées dans ce tableau peuvent être différentes.

Tableau 1.33 Oxydation enzymatique de divers EDCs aromatiques par PPO

EDC	[EDC] (mM)	Enzyme	[Enzyme] (U/mL)	Enlèvement (%)	τ (min)	Remarque	Référence
β E2, EE2	0.01	Laccase-HBT	0.6	100	60	[HBT]=0.2mM	Suzuki et <i>al.</i> , 2003
E1	0.01	Laccase	0.6	100	60	-	Tamagawa et <i>al.</i> , 2006
BPA	0.22	Laccase	0.1	70	60	-	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
BPA	0.22	Laccase-HBT	0.1	90	60	[HBT]=0.2mM	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
BPA	2.20	Laccase	1.5	90	180	-	Fukuda et <i>al.</i> , 2001
BPA	0.5	Laccase	0.004	95	180	-	Modaressi et <i>al.</i> , 2005
BPA	0.5	Laccase-PEG	0.001	95	180	[PEG]=75 mg/L	Modaressi et <i>al.</i> , 2005
BPA	0.12	Laccase	0.15	60	60	-	Kim et Nicell, 2006a
BPA	0.12	Laccase	0.3	75	60	-	Kim et Nicell, 2006b
BPA	0.12	Laccase	0.15	97	360	-	Kim et Nicell, 2006a
BPA	0.12	Laccase-ABTS	0.15	97	60	[ABTS]=0.1 mM	Kim et Nicell, 2006a
BPA	0.12	Laccase-HBT	0.15	<60	60	[HBT]=0.1 mM	Kim et Nicell, 2006a

EDC	[EDC] (mM)	Enzyme	[Enzyme] (U/mL)	Enlèvement (%)	τ (min)	Remarque	Référence
BPA	0.12	Laccase-PEG	0.3	85	60	[PEG]=5 mg/L	Kim et Nicell, 2006b
BPA	0.12	Laccase-PEG	0.3	86	60	[PEG]=50 mg/L	Kim et Nicell, 2006b
NP	0.23	Laccase	0.1	60	60	-	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
NP	0.23	Laccase-HBT	0.1	80	60	[HBT]=0.2mM	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
BPA	140	Tyrosinase	100	100	60	-	Yoshida et <i>al.</i> , 2002
Phénol	2.13	Tyrosinase	46	98	25	[chitosane]=50mg/L	Bevilaqua et <i>al.</i> , 2002
Phénol	0.50	Tyrosinase	8	100	180	-	Ikehata et Nicell, 2000
BPA	0.60	Enzyme de pomme de terre	?	>95	60	-	Xuan et <i>al.</i> , 2002

Les procédures expérimentales suivies par les auteurs des études énumérées dans ce tableau peuvent être différentes.

Tableau 1.34 Réduction de l'activité estrogénique associée à divers EDCs aromatiques par oxydation enzymatique

Enzyme		EDC	Activité estrogénique	τ (h)	Remarque	Référence
POD	MnP	β E2, EE2	Réduction de >80%	1	Ajout de H ₂ O ₂	Suzuki et <i>al.</i> , 2003
	MnP	E1	Complètement réduite	2	Ajout de H ₂ O ₂	Tamagawa et <i>al.</i> , 2006
	MnP	BPA	Réduction de 60%	1	Ajout de H ₂ O ₂	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
	MnP	NP	Réduction de 40%	3	Ajout de H ₂ O ₂	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
	MnP	NP	Complètement réduite	12	Ajout de H ₂ O ₂	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
PPO	Laccase-HBT	β E2, EE2	Complètement réduite	8	-	Suzuki et <i>al.</i> , 2003
	Laccase	E1	Complètement réduite	2	-	Tamagawa et <i>al.</i> , 2006
	Laccase	BPA	Réduction de 40%	1	-	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
	Laccase-HBT	BPA	Réduction de 80%	1	-	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
	Laccase	NP	Réduction de 10%	3	-	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
	Laccase	NP	Complètement réduite	12	-	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
	Laccase-HBT	NP	Réduction de 80%	1	-	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001
	Laccase-HBT	NP	Complètement réduite	6	-	Tsutsumi et <i>al.</i> , 2001

Les procédures expérimentales suivies par les auteurs des études énumérées dans ce tableau peuvent être différentes.

contaminée par des substances phénoliques en utilisant des extraits préparés à partir de déchets d'artichauts, contenant des enzymes avec une activité de POD et de PPO. Ainsi, les auteurs ont montré qu'employant un mélange d'enzymes rend le traitement des eaux usées plus efficace et flexible qu'en utilisant seule la POD ou le PPO. Par ailleurs, Nicell et Wright (1997) ont développé un modèle pour comparer le taux de dégradation d'un substrat pour deux peroxydases, HRP et SBP, ainsi que leur susceptibilité d'être inactivée. Ils ont ainsi pu conclure que l'enzyme SBP a besoin d'un temps de réaction plus long pour réaliser le même degré d'oxydation qu'avec l'enzyme HRP, pour une activité enzymatique équivalente. Leurs conclusions ont un réel impact sur la taille du système de traitement, par conséquent sur les coûts de traitement.

L'enzyme laccase a été l'enzyme la plus étudiée pour l'oxydation du BPA (Tsutsumi et *al.*, 2001 ; Uchida et *al.*, 2001 ; Fukada et *al.*, 2001, 2004 ; Saito et *al.*, 2004 ; Modaressi et *al.*, 2005 ; Diano et *al.*, 2007 ; Kim et Nicell, 2006a,b). De plus, le BPA a pu être efficacement traité par la HRP (Huang et Weber, 2005), par une peroxydase microbienne (Sakurai et *al.*, 2001), par la MnP (Tsutsumi et *al.*, 2001), par la tyrosinase (Yoshida et *al.*, 2002) et par l'enzyme de pomme de terre (Xuan et *al.*, 2002). Yoshida et *al.* (2002) ont observé que la tyrosinase provenant du champignon pourrait oxyder complètement le BPA en quinones (Tableau 1.33). Les quinones produits étaient la plupart instables et subissaient une polymérisation non enzymatique (Yoshida et *al.*, 2002 ; Karam et Nicell, 1997) pour former des substances insolubles, facilement enlevées par une simple filtration (Karam et Nicell, 1997). D'ailleurs, Xuan et *al.* (2002) ont proposé que la combinaison possible du BPA avec le récepteur estrogénique sur les cellules puisse être réduite par oxydation enzymatique par l'enzyme de pomme de terre.

Les différents résultats au sujet de l'enlèvement de ces EDCs et de leurs activités estrogéniques sont explicités dans les Tableaux 1.32, 1.33 et 1.34.

Cependant, l'enzyme (POD ou PPO) peut rapidement être inactivée par les produits formés pendant le procédé de polymérisation (Wu et *al.*, 1998) ainsi que par la présence de H₂O₂ pour les enzymes PODs (Nicell et Wright, 1997 ; Buchanan et Nicell, 1997, 1998 ; Wu et *al.*, 1999) (Figure 1.12). Ainsi, l'inactivation de l'enzyme présente un obstacle important pour l'utilisation de ce procédé comme alternative économiquement viable pour le traitement des eaux (Cooper et Nicell, 1996). Plusieurs études se sont donc focalisées sur le développement de modèle cinétique (Dunford et Adeniran, 1986 ; Sakurada et *al.*, 1990 ; Nicell, 1994 ; Nicell et Wright, 1997 ;

Buchanan et Nicell, 1997, 1998, 1999 ; Buchanan et *al.*, 1998 ; Wu et *al.*, 1998, 1999 ; Kurniawati et Nicell, 2005) pour décrire et mieux comprendre les mécanismes catalytiques et d'inactivation de l'enzyme.

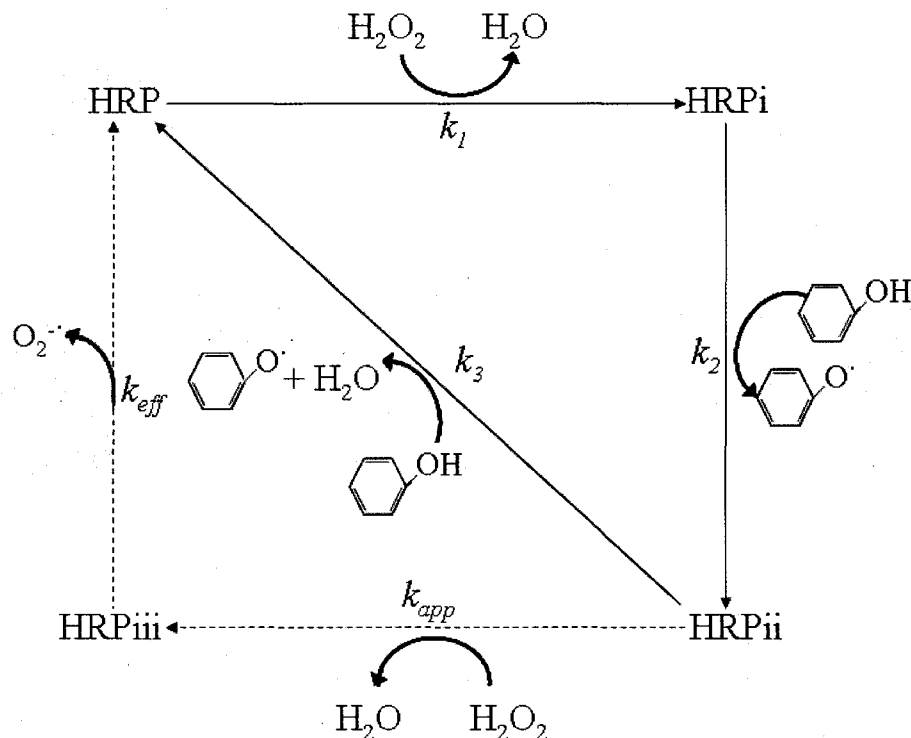


Figure 1.12 Inactivation de l'enzyme HRP par H_2O_2 , pouvant se produire durant un cycle catalytique (composé aromatique considéré : le phénol). HRPiii est momentanément sous la forme inactivée (Buchanan et Nicell, 1997).

Dans le cas des enzymes peroxydases, la vie catalytique peut être sensiblement prolongée en présence d'additifs protecteurs tels que le glycol polyéthylénique (PEG) de masse molaire élevée, le gélatine ou le chitosane menant à une réduction significative de la quantité d'enzyme requise (Wu et *al.*, 1998 ; Nakamoto et *al.*, 1992, cité par Wagner et Nicell, 2002a). Le principal mécanisme intervenant dans l'inactivation de l'enzyme correspond au piégeage de l'enzyme par les polymères formés. En présence d'additifs fortement hydrophiles, le temps catalytique de l'enzyme peut être amélioré de façon significative. Spécifiquement, l'additif protecteur peut présenter une plus grande affinité que l'enzyme pour les groupes hydroxyles des polymères, et alors permettant à l'enzyme de rester en solution pour catalyser d'autres réactions (Cooper et

Nicell, 1996). Wu et *al.* (1997) ont comparé l'efficacité de divers additifs (PEG, gélatine et 3 différents poly-électrolytes) par rapport à l'enlèvement des composés phénoliques par la HRP. Les auteurs ont pu conclure que le PEG était le meilleur choix car d'une part il a permis d'utiliser une plus petite quantité de HRP, et d'autre part aucun effet négatif dû au surdosage de PEG n'a été noté. De plus, comme il n'affecte que très peu la qualité de l'effluent pendant le traitement enzymatique, le PEG est l'additif le plus souvent utilisé (Cooper et Nicell, 1996). Cooper et Nicell (1996) ainsi que Wu et *al.* (1997) ont pu conclure que le PEG a augmenté de manière significative l'efficacité catalytique (quantité de polluant enlevée par rapport à l'activité enzymatique apportée) de la HRP, diminuant de ce fait le coût du procédé. En effet, l'ajout de 60 mg/L de PEG a permis de diminuer d'environ 80% l'activité enzymatique nécessaire pour dégrader les composés phénols présents dans une eau synthétique (Cooper et Nicell, 1996). De même, Wu et *al.* (1998) ont montré que l'additif peut de façon permanente se lier avec les polymères durant la réaction enzymatique, probablement parce que l'additif a une plus grande affinité avec le polymère produit que l'enzyme HRP. Par ailleurs, Caza et *al.* (1999), qui ont utilisé l'enzyme SBP pour enlever certains composés aromatiques d'une solution aqueuse, ont montré que l'absence de PEG a augmenté la quantité d'enzyme requise de 33% pour un taux d'enlèvement de 95%.

En outre, Flock et *al.* (1999) ont conclu que l'enzyme SBP peut être un candidat pour un usage industriel dans l'enlèvement du phénol. Quand une solution en chitosane a été utilisée, Bevilacqua et *al.* (2002) ont noté un enlèvement plus rapide du phénol en utilisant la tyrosinase. Cependant, Ikehata et Nicell (2000) ont signalé que le PEG et le chitosane n'ont pas permis de protéger la tyrosinase contre une inactivation pendant le traitement du phénol, par contre le chitosane a induit la précipitation des produits de réaction résultant de la transformation du phénol.

Par ailleurs, de récentes études (Kulys et *al.*, 2003 ; Modaressi et *al.*, 2005 ; Kim et Nicell, 2006b) ont montré que pour le traitement de certains composés aromatiques l'ajout d'un additif protecteur peut également protéger la laccase de l'inactivation potentielle par les polymères formés.

Tsutsumi et *al.* (2001) ont comparé les différentes efficacités d'enlèvement du MnP, de la laccase et du système laccase-médiateur pour le traitement du BPA et du NP (Tableaux 1.32 et 1.33). Ils ont remarqué que l'efficacité d'enlèvement de la laccase est plus faible qu'avec

l'enzyme MnP, mais l'addition de HBT, comme médiateur, dans le traitement avec la laccase a considérablement amélioré son potentiel. D'ailleurs, les activités estrogéniques du BPA et du NP ont été presque entièrement réduites après 12 heures de traitement avec le MnP et la laccase, alors que 6 heures de traitement ont suffi pour le système laccase-HBT (Tableau 1.34). Tsutsumi et *al.* (2001) ont supposé que les mécanismes d'enlèvement correspondent à une polymérisation et une dégradation partielle des produits chimiques provoquées par l'oxydation enzymatique.

L'utilisation d'un médiateur permet de maximiser l'efficacité de l'enzyme en stimulant le transfert d'électrons. Dans un tel procédé, la réaction enzymatique devient un procédé à deux étapes, où le médiateur redox réagit d'abord avec l'enzyme, générant un intermédiaire fortement oxydant, suivi par la réaction du médiateur oxydé avec le substrat (Burton, 2003). Ensuite, le médiateur retrouve sa forme originale (Figure 1.13).

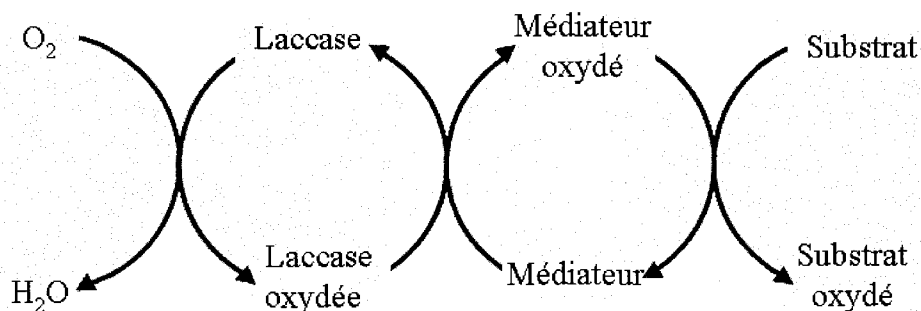


Figure 1.13 Cycle catalytique simplifié du système laccase-médiateur (Burton, 2003)

Une variété de médiateurs, qui ont été utilisés avec la laccase, ont été rapportés dans la littérature. Les médiateurs les plus communs incluent l'acide syringique (SA), l'ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)), le TEMPO (2,2,6,6-tetraméthoxypiperidine 1-oxyl), et le HBT (Kim et Nicell, 2006a). Kim et Nicell (2006a) ont montré dans leur étude comparative sur l'efficacité de différents médiateurs pour l'oxydation du BPA, que l'ABTS était le meilleur médiateur (Tableau 1.34).

L'immobilisation de l'enzyme (POD ou PPO) sur des supports solides ont aussi été explorés (Tatsumi et *al.*, 1996 ; Edwards et *al.*, 1999 ; Ehlers et Rose, 2005 ; Ensuncho et *al.*, 2005 ; Lai et Lin, 2005 ; Cheng et *al.*, 2006 ; Diano et *al.*, 2007) puisque les avantages de cette technique incluent la préservation de l'activité enzymatique (Copella et *al.*, 1990, cité par Nicell, 2003), le

potentiel pour un traitement à flux continu (Caldwell et Raushel, cité par Nicell, 2003) et la possibilité de réutiliser l'enzyme (Munnecke, 1977, cité par Nicell, 2003).

Pour résumer, ces procédés enzymatiques montrent donc un potentiel pour l'enlèvement des composés aromatiques dans les eaux usées, qui ne sont pas enlevés efficacement par les traitements conventionnels biologiques ou physico-chimiques. De plus, les systèmes de traitement enzymatiques ont de nombreux avantages par rapport aux autres traitements dits conventionnels (Nicell et *al.*, 1995 ; Karam et Nicell, 1997 ; Flock et *al.*, 1999) :

- La concentration en enzyme ne dépend pas du taux de croissance bactérienne ;
- Le traitement peut se faire avec des concentrations en contaminants élevées ou basses ;
- Le traitement peut se faire sur un large éventail de pH, de température et de salinité ;
- Absence des effets de changement de charge ;
- Absence des retards associés à l'acclimatation de la biomasse ;
- Réduction du volume de boue (aucune biomasse n'est produite) ;
- Facilité et simplicité du contrôle du procédé ;
- Faible besoin d'énergie.

Cependant, Karam et Nicell (1997) ont rapporté que l'utilisation de certaines enzymes, comme traitement additionnel, peut considérablement augmenter le coût du procédé de traitement. Toutefois, plusieurs recherches actuelles développent la production d'enzymes en utilisant des eaux usées, des boues et d'autres biomasses municipales et industrielles, comme substrat de base (Tyagi et *al.*, 2002, Ikehata et *al.*, 2004). Le développement de ces techniques de production d'enzymes permettra de réduire le coût global du traitement enzymatique, et rendre ainsi ce procédé de traitement rentable pour l'enlèvement des composés aromatiques des eaux usées municipales et/ou industrielles. Par ailleurs, très peu de données existent sur la dégradation enzymatique des estrogènes naturels et synthétiques. Ainsi, d'autres recherches dans ce domaine sont nécessaires.

CHAPITRE II

2 HYPOTHÈSES DE RECHERCHE, OBJECTIFS SPÉCIFIQUES ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

2.1 Hypothèses de recherche

Les hypothèses de recherche ont été établies suite à l'analyse de la documentation scientifique, spécifique au projet de recherche. Conséquemment, quatre hypothèses de recherche ont été définies :

Les procédés d'oxydation enzymatique ont montré leur efficacité pour le traitement de déchets phénoliques. Les estrogènes naturels (E1, β E2, E3) et synthétique (EE2) présentent dans leur structure chimique un groupement phénolique. Ainsi, l'hypothèse principale de cette étude est que les estrogènes pourraient être enlevés efficacement des eaux usées municipales via un traitement enzymatique ;

Parmi les PODs, l'enzyme HRP est l'enzyme la plus étudiée et semble être la plus efficace pour l'oxydation des composés phénoliques, tels que les phénols, les alkylphénols et le BPA. Ainsi, l'hypothèse qu'une bonne efficacité peut être obtenue lors du traitement des estrogènes par la HRP a été émise. La HRP pourrait ainsi être considérée comme enzyme de référence pour la suite de l'étude ;

La laccase a déjà été étudiée pour l'enlèvement de E1, β E2, et EE2, de concentrations initiales de l'ordre du mg/L et dans une matrice aqueuse purifiée. Ainsi, ce projet de recherche englobera le traitement d'eaux usées municipales contaminées par les estrogènes E1, β E2, E3, et EE2, aux conditions environnementales, par de l'enzyme PPO laccase ;

La quatrième hypothèse porte sur l'estrogénicité : l'oxydation enzymatique (par HRP ou laccase) des estrogènes (E1, β E2, E3, et EE2), et donc leur enlèvement des eaux usées municipales, s'accompagnerait de la réduction complète de l'activité estrogénique associée à ces composés et aux sous-produits formés durant le traitement.

2.2 Objectifs spécifiques de recherche

L'objectif principal de ce projet de recherche est de développer un système de traitement innovateur et économiquement viable pour l'enlèvement des estrogènes dans le but de solutionner la problématique actuelle liée à la contamination des eaux de surface en composés fortement estrogéniques. Ce procédé pourrait servir comme traitement additionnel aux procédés des stations de traitement des eaux usées. Plus spécifiquement, le procédé proposé est une oxydation enzymatique des principaux estrogènes naturels (E1, β E2, E3) et synthétique (EE2). Deux enzymes seront évaluées aux vues de leurs efficacités à oxyder E1, β E2, E3 et EE2. La sélection des enzymes étudiées a été établie suite à l'analyse de la revue de littérature. Le choix s'est porté sur l'enzyme HRP du groupe POD et l'enzyme laccase du groupe PPO. La réalisation de cet objectif principal reposera sur différents axes de recherche comprenant chacun un objectif secondaire spécifique, énoncé comme suit :

- 1) Mettre en place une méthode analytique performante pour la détermination des estrogènes étudiés dans une matrice complexe d'eaux usées, permettant d'évaluer par la suite l'efficacité du traitement enzymatique étudié ;
- 2) Déterminer les paramètres optimums du traitement enzymatique, dans une matrice aqueuse purifiée, afin d'optimiser l'enlèvement des estrogènes ;
- 3) Effectuer une étude cinétique pour comparer les efficacités catalytiques des deux enzymes (laccase et HRP) pour l'enlèvement des estrogènes étudiés ;
- 4) Tester, optimiser et valider le procédé enzymatique optimisé pour le traitement d'une eau usée municipale contaminée en estrogènes ;
- 5) Optimiser le traitement enzymatique pour réduire complètement l'estrogénicité de l'eau usée municipale traitée.

2.3 Démarche expérimentale

Afin de répondre aux objectifs spécifiques définis précédemment, une démarche expérimentale a été envisagée, elle est présentée ci-dessous.

2.3.1 Analyse chimique au LC-MS

Cette étape constitue un point essentiel pour la réalisation de ce projet de recherche. Afin d'évaluer l'efficacité du procédé de traitement proposé, une méthode d'analyse fiable et sensible des estrogènes (E1, β E2, E3 et EE2) est essentielle. Le choix s'est porté sur le LC-MS, aux vues de la littérature ainsi qu'après avoir mené plusieurs tests de comparaison entre les performances du LC-MS et celles du GC-MS pour l'analyse des composés ciblés par cette étude.

La spectrométrie de masse (MS) correspond au système « Agilent 1100 Seris LC-MS System » (G1946D) composé d'une unité de dégazage des solvants, d'une pompe à gradient, d'un échantillonneur automatique, d'un contrôleur de température de la colonne, et d'un spectromètre de masse. Les substances à analyser sont séparées par chromatographie sur une colonne C18(2) (Luna Phenomenex, Torrance, California) 5 μ m, de diamètre interne 4.6 mm et de longueur 150 mm, protégée par une précolonne C18, de diamètre interne 3 mm et de longueur 4 mm, fournie par Phenomenex. La composition initiale de la phase mobile était de 96% en eau pure (A) et 4% en acétonitrile (B). Le gradient ci-dessus a été utilisé durant l'analyse (rampe linéaire – durée totale de l'analyse de 15 minutes) : 60% en solution B à 1 minute, 76% en solution B à 5 minutes, et 100% en solution B à 11 minutes, maintenus pour un temps additionnel de 3 minutes pour le nettoyage de la colonne. Le débit de la phase mobile était de 0.7 mL/min et le volume d'échantillon injecté était de 30 μ L.

Le spectromètre de masse fonctionnait en ions négatifs avec une interface ESI (électronébulisation). L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation, gaz de séchage et gaz de collision. La température du nébulisateur était de 350 °C. Le temps de transition était de 45 ms. Le détecteur de masse fonctionnait en fragmentométrie (SIM) sur les masses suivantes (m/z) : m/z 269 (E1), m/z 271 (β E2), m/z 287 (E3), m/z 295 (EE2), m/z 318.9 (ZAN, standard interne) et m/z 275.2 (β E2-d4, standard interne). L'analyse des données était effectuée avec le logiciel Target 4.1 (ThermoQuest Thru-Put Software, Orlando, Florida, US).

2.3.2 Optimisation des conditions pour le traitement enzymatique

Dans cette partie des expériences, la solution de réaction contenait un estrogène (E1, E2, E3 ou EE2) par expérience, de concentration initiale de 4×10^{-4} mM, dans une eau déionisée et purifiée (« Milli-Q RG system » – Millipore, Billerica, MA, USA) tamponnée au sodium de phosphate

(0.1 M). Des réacteurs en batch de 35 mL contenant le mélange réactif et l'enzyme étudiée (HRP ou laccase) ont été utilisés. Les réacteurs sont mélangés et la température est contrôlée à l'aide d'un bain marie muni d'un système externe de circulation d'eau (Compact Low Temperature Circulator, RM6-S, LAUDA). Dans le cas du système laccase, la concentration initiale en oxygène dans le réacteur était portée à saturation en mélangeant vigoureusement la solution avant d'initier la réaction enzymatique. La solution mère de laccase était aussi mélangée séparément pendant quelques minutes pour permettre à la solution de laccase d'être également saturée complètement en oxygène. La réaction enzymatique était initiée par l'ajout d'une quantité mesurée en laccase saturée en oxygène. Quant à la réaction avec la HRP, l'oxydation des estrogènes était initiée par l'ajout successif de quantités mesurées de HRP et puis de H_2O_2 dans le mélange réactif testé. Les deux ajouts étaient quasi-instantanés, permettant de négliger les interactions entre l'enzyme et les conditions du milieu (tel que le pH, la température).

Des aliquotes (0.5 mL) sont échantillonnés au cours de la réaction à différents intervalles de temps et mis dans des tubes à essai en verre, dans lesquels la catalase, dans le cas de l'enzyme HRP, ou d'une solution d'HCl concentrée, dans le cas de l'enzyme laccase, se trouvait et permettait d'arrêter la réaction enzymatique. Les échantillons étaient alors extraits par une LLE au dichlorométhane pour être ensuite analysés au LC-MS. Le standard interne était ajouté avant de procéder à la LLE.

La LLE se déroulait comme suit : 1 mL de dichlorométhane était mélangé à l'échantillon, puis extrait. Le solvant recueilli (dichlorométhane), contenant les estrogènes et le standard interne, était alors évaporé à sec dans un TurboVap (Caliper Life Sciences, MA, USA) sous un flux d'azote. Ensuite, les échantillons étaient reconstitués avec 1 mL de méthanol et mélangés pendant 5 s. Les échantillons étaient alors gardés dans des fioles en verre ambré sous $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'analyse au LC-MS.

Pour chaque série d'expériences, des tests de contrôle ont été effectués afin de vérifier si la réaction enzymatique a bien été stoppée. Pour cela, après avoir initié la réaction enzymatique, la catalase dans le cas de la HRP et la solution concentrée en HCl dans le cas de la laccase ont été immédiatement rajoutées afin d'arrêter la réaction. Les analyses au LC-MS ont montré qu'au cours du temps les concentrations en estrogène restaient inchangées et égales aux concentrations initiales en estrogène.

Les divers paramètres évalués et optimisés sont le pH (5–9), la température (5–35 °C), l'activité initiale enzymatique (U/mL), et dans le cas de l'enzyme HRP, la dose de H₂O₂ apportée (rapport molaire H₂O₂/substrat). Chacun de ces facteurs ont été étudiés pour optimiser l'enlèvement de chaque estrogène. Les premières expériences et avant l'optimisation de la dose de H₂O₂ apportée, un rapport molaire peroxyde-susbtrat initial de 2 a été choisi en se basant sur la littérature existante sur les autres composés phénoliques (Kinsley and Nicell, 2000; Sakurai et al., 2001).

La solution de H₂O₂ était préparée périodiquement en utilisant de l'eau purifiée (distillée et déionisée) et était couramment vérifiée pour la concentration en H₂O₂ en performant des titrations contre une solution de permanganate de potassium standardisée.

Le pH a été fixé à l'aide de solutions concentrées en HCl et NaOH.

La température du système réactif a été stabilisée à ± 1 °C grâce au système externe de circulation d'eau (Compact Low Temperature Circulator, RM6-S, LAUDA) et était contrôlée durant la réaction enzymatique. De plus, l'équilibre thermique de la solution devait être atteint avant d'initier la réaction enzymatique.

Des essais colorimétriques ont été utilisés régulièrement pour déterminer l'activité enzymatique des solutions mères de HRP et laccase. Le test utilisé pour évaluer l'activité de la HRP contenait du phénol, du 4-aminoantipyrine (AAP), et du H₂O₂. L'activité enzymatique était proportionnelle à la vitesse d'apparition d'un produit qui adsorbe la lumière à une longueur d'onde de 510 nm, avec un coefficient d'extinction (ϵ) de 7100 M⁻¹cm⁻¹. Une unité d'activité (U) est définie comme le nombre des micromoles de H₂O₂ utilisées par minute à pH 7.4 et 25 $\pm$ 1 °C (Wagner et Nicell, 2002a). Le mélange consistait à ajouter 10 mM de phénol, 2.4 mM de AAP, 0.2 mM de H₂O₂ et une quantité suffisante d'enzyme. La valeur de l'absorbance à 510 nm était enregistrée chaque seconde pendant 1 min. Le test colorimétrique pour la laccase utilisait le produit chimique ABTS, selon la méthode de Fukuda et *al.* (2001). Le mélange réactif était composé de 5.0 mM d'ABTS, de 0.1 M de solution tamponnée d'acétate de sodium et une quantité suffisante d'enzyme, pour un volume final de 1.0 mL. L'oxydation de l'ABTS a été suivie, à pH 5 et à 37 °C, par l'augmentation dans l'absorbance à 420 nm, avec un ϵ de 3.6x10⁴ M⁻¹cm⁻¹. Une unité d'activité enzymatique (U) était définie comme la quantité d'enzyme, qui catalyse l'oxydation de 1 micromole d'ABTS par minute à 37 °C. Pour fournir des valeurs fiables, ces deux tests

colorimétriques étaient effectués en triplicata ; les écart-types relatifs (RSD) obtenus étaient toujours inférieurs à 5% pour la HRP et à 3% pour la laccase.

2.3.3 Étude cinétique

Une étude cinétique pour chaque estrogène a été menée en eau synthétique, afin de déterminer d'une part l'ordre de réaction enzymatique par rapport au substrat, et d'autre part pour comparer les paramètres cinétiques des deux enzymes évaluées.

Pour cette étude, la procédure expérimentale était exactement la même que celle décrite précédemment (paragraphe 2.3.2), excepté que les aliquotes de 0.5 mL étaient pris toutes les 10 s durant la première minute de réaction. Pour calculer la vitesse de réaction initiale, seules les données correspondant à une conversion maximale de 20–30% du substrat en produit ont été considérées (Marangoni, 2002).

2.3.4 Traitement d'une eau usée municipale

Les deux procédés enzymatiques développés et optimisés en eau synthétique ont été ensuite testés pour le traitement d'une eau usée réelle.

L'eau usée utilisée dans cette étude correspondait à l'effluent du procédé à boue activée de la STEP municipale de Rolla (Missouri, US). La STEP était composée de procédés de traitement conventionnels, incluant des procédés à boue activée et lits bactériens (Figure 2.1). Les données opérationnelles étaient les suivantes : un débit moyen d'eau (entrant) de 11 920 m³/jour ; une demande biochimique en oxygène en 5 jours (DBO₅) à l'affluent de 120 mg/L ; et une concentration en solides totaux en suspension (ST) à l'affluent de 100 mg/L. À l'effluent traité, la DBO₅ et la concentration en ST étaient de 6 et 5 mg/L, respectivement. Le pH de l'eau usée était de 8.0 ± 0.5.

Les échantillons d'eaux usées étaient récupérés dans des bouteilles ambrées après une filtration sur le terrain en utilisant des filtres à fibres de verre de 0.7 µm (GF/C, Whatman). Ensuite, les échantillons étaient de nouveau filtrés en laboratoire avec un filtre de 0.45 µm (Millipore Durapore® Membrane Filters). Le filtrat était gardé à 4 °C jusqu'à son utilisation, 48h après l'échantillonnage.

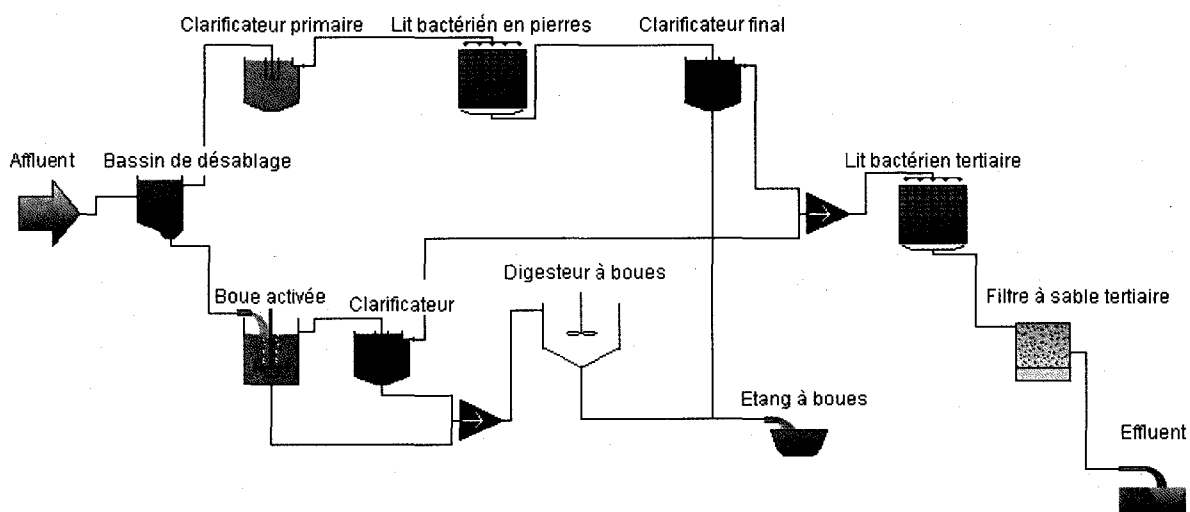


Figure 2.1 Représentation schématique de la STEP municipale de Rolla (Missouri, US)

L'eau usée municipale a été caractérisée en terme de pH, de demande chimique en oxygène (DCO), de carbone organique total (COT), de turbidité, ainsi que de contenu des principaux métaux (Tableau 2.1).

Le pH a été mesuré en utilisant un pHmètre Corning 430. La DCO a été mesurée en utilisant la méthode Hach 8000 (Hach, 1997). Le COT a été déterminé avec l'analyseur 5000A (Shimadzu, MD, USA). La turbidité a été évaluée à l'aide d'un turbidimètre Hach modèle 2100P. Les concentrations en métaux ont été mesurées par spectrométrie de masse couplée à un plasma induit (ICP-MS – Perkin Elmer SCIEX, Concord, Ontario, Canada). Les échantillons ont été préparés suivant la méthode standard 200.8 de l'USEPA. Une recherche des possibles inhibiteurs d'enzyme (HRP et laccase) a été conduite, basée sur plusieurs publications récentes, qui ont montré que les sulfures, les nitrites, le mercure, les cyanures, les chlorures et les fluorures peuvent inhiber les réactions enzymatiques avec la HRP et/ou la laccase (Einollahi et *al.*, 2006 ; Kim et Nicell, 2006a,b). Les sulfures, les nitrites, les cyanures et le fluorure ont été analysés en utilisant les méthodes Hach 8131, 8507, 8027, et 8029, respectivement (Hach, 1997). Le mercure a été obtenu par spectrométrie de fluorescence atomique en vapeur froide (CVAFS – Tekran Series 2600). Les chlorures ont été déterminés en utilisant la chromatographie par échanges

d'ions DX-120 avec un échantillonneur automatique AS40. L'eau usée municipale a aussi été analysée en estrogènes stéroïdiens par LC-MS.

Tableau 2.1 Caractéristiques (moyennes) de l'eau usée municipale étudiée, après filtration

Eau usée municipale	
Estrogènes stéroïdiens	
E1 (ng/L)	25.5
E2 (ng/L)	20.6
E3 (ng/L)	4.9
EE2 (ng/L)	3.7
DCO (mg/L)	29
COT (mg/L)	13
pH	8 ± 0.5
Turbidité (NTU)	0.83
Métaux	
Cu (µg/L)	16.9
Cd (µg/L)	3.51
Fe (µg/L)	179.6
Na (mg/L)	142.5
Ca (mg/L)	35.1
Mercure (Hg – ng/L)	15
Sulfure	ND ^a
Nitrite (mg/L NO ₂ -N)	0,393
Chloride (mM Cl)	7.13
Fluoride (mM F ⁻)	0.05
Cyanure (mg/L CN ⁻)	0.002

^aND : non détecté, concentration plus faible que la limite de détection

Comme pour les tests en eau synthétique (paragraphe 2.3.2), les réacteurs étaient placés dans un système à recirculation d'eau (Compact Low Temperature Circulator, RM6-S, LAUDA), maintenu à 25 ± 1 °C et étaient mélangés à l'aide d'un aimant et d'un agitateur magnétique. Avant toute réaction, l'équilibre thermique de la solution devait être atteint. Dans le cas du système laccase, la concentration initiale en oxygène dans le réacteur, ainsi que dans la solution mère de laccase, était portée à saturation par un mélange vigoureux avant d'initier la réaction enzymatique. La réaction enzymatique était initiée par l'ajout d'une quantité mesurée en laccase saturée en oxygène. Quant à la réaction enzymatique par HRP, elle était initiée par l'ajout successif de quantités mesurées de HRP et puis de H_2O_2 dans le mélange réactif testé. Les deux ajouts étaient quasi-instantanés, permettant de négliger les interactions entre l'enzyme et les conditions du milieu (tel que le pH, la température, les composés de la matrice étudiée).

Dans cette partie du projet de recherche, des tests en eau usée et en eau synthétique ont été menés en parallèle sous des conditions expérimentales identiques. Pour les deux systèmes (eau usée municipale vs. eau synthétique), la faisabilité du traitement enzymatique (HRP et laccase) a été évaluée pour des concentrations environnementales en estrogènes (~ 100 ng/L). L'eau synthétique était préparée en dissolvant une quantité mesurée d'une mixture d'estrogènes (E1, E2, E3 et EE2) pour une concentration initiale de 0.4 nM de chaque estrogène dans une eau déionisée et purifiée tamponnée au phosphate de sodium (0.1 M), avec un ajustement du pH à 7.0 pour le système laccase et 8.0 pour le système HRP. Les concentrations en estrogènes de l'eau usée municipale ont été ramenées à 0.4 nM en ajoutant des quantités mesurées d'estrogènes.

Les expériences ont été menées dans des réacteurs batch, en verre ambré, contenant 1 litre d'eau synthétique ou usée. Après une heure de traitement, la réaction a été stoppée par l'ajout d'une quantité suffisante de catalase pour le système HRP, et d'une solution concentrée en HCl pour le système laccase. Ensuite, après avoir ajouter le standard interne (17 β -estradiol-2,4,16,16-d4), la solution a été filtrée à travers des filtres de 0.45 μ m (Millipore Durapore® Membrane Filters), puis une extraction en phase solide (SPE) a été accomplie.

La SPE était composée de deux cartouches (Waters Corporation, Massachusetts, USA) utilisées en série pour extraire les estrogènes étudiés. La première était une C18 (Vac 6 cc, 500 mg) servant à retenir les estrogènes dans la cartouche, la seconde était une cartouche aminopropyl

(NH₂) (Vac 3 cc, 500 mg) laissant passer les estrogènes et permettant leur récupération. Les cartouches C18 étaient tout d'abord placées sur un collecteur sous vide (Supelco, Pennsylvania, USA) connecté à une pompe à vide. Les cartouches étaient alors rincées successivement avec 2 mL d'eau déionisée, 2 mL de méthanol, 2 mL de dichlorométhane, 2 mL de méthanol, et 2 mL d'eau déionisée. Les solutions préfiltrées issues des expériences étaient alors acheminées à travers les cartouches C18, qui étaient ensuite lavées avec 5 mL d'eau déionisée, puis séchées par succion pendant 1 min, et enfin lavées une nouvelle fois avec 5 mL d'hexane. Les composés étaient récupérés dans des tubes à essai en passant deux fois 4 mL de dichlorométhane. Le solvant ainsi récupéré était évaporé à sec dans un TurboVap sous un flux d'azote. Puis, les échantillons secs étaient reconstitués par ajout de 3 mL de méthanol, et mélangés pendant 5 s. Avant d'être utilisées, les cartouches NH₂ étaient rincées avec 5 mL de méthanol, et les échantillons reconstitués étaient alors extraits à travers les cartouches NH₂. Pour récupérer, finalement, les estrogènes, les cartouches NH₂ étaient éluées avec 5 mL de méthanol. Le solvant récupéré était une nouvelle fois évaporé à sec, et reconstitué avec 1 mL de méthanol, puis mélangé. Finalement, les échantillons (méthanol) étaient gardés dans des fioles ambrées à -25 °C jusqu'à l'analyse au LCMS.

Enfin, pour le système laccase, des tests supplémentaires en eau usée ont été réalisés afin d'améliorer le procédé mis en place, d'un point de vue économique. En effet, l'ajout d'un médiateur (HBT) ou d'un additif chimique (PEG) a été évalué. L'HBT a été expérimenté puisque c'est le médiateur synthétique le plus étudié et le plus efficace pour le traitement de composés phénoliques par la laccase (Cantarella et al., 2003; Suzuki et al., 2003; Tamagawa et al., 2006). Le PEG en tant qu'additif chimique a été choisi aux vues de son efficacité par rapport aux autres additifs chimiques (borate de sodium, chitosane, talc, et gélatine) pour le traitement de composés phénoliques par la HRP (Wu et al., 1997 ; Wagner et Nicell, 2002 ; Kim et Nicell, 2006b ; Modaressi et al., 2005) et parce qu'il a été déclaré comme composé non toxique pour la consommation humaine (Harris, 1992). Le principal objectif de ces expériences était de réduire le coût global associé au procédé enzymatique, provenant essentiellement de l'enzyme elle-même. Toutes ces expériences ont été menées à pH 7.0 et 25±1 °C, avec une activité initiale en laccase de 5 et 10 U/mL. Des concentrations en HBT de 100 µM et en PEG de 50 mg/L ont été utilisées.

2.3.5 Bio essais pour l'évaluation de l'estrogénicité

Le plus grand intérêt dans l'enlèvement des composés estrogéniques des eaux usées devrait résider dans l'activité estrogénique résiduelle après un procédé de traitement. Ainsi, l'un des objectifs de ce projet de recherche était de caractériser l'efficacité du traitement enzymatique (HRP et laccase) pour la réduction de l'activité estrogénique de l'eau usée traitée.

Pour se faire, des expériences en eau synthétique et en eau usée ont été développées. Le protocole expérimental était exactement identique à celui décrit précédemment (paragraphe 2.3.4), excepté qu'aucun standard interne n'a été ajouté aux solutions avant SPE. Les concentrations initiales en estrogènes correspondaient aux concentrations environnementales (~ 100 ng/L). Dans le cas du système laccase, les expériences ont été réalisées à pH 7.0, 25 ± 1 °C et avec une activité initiale en laccase de 20 U/mL. Dans le cas du système HRP, les expériences ont été menées à pH 8.0, 25 ± 1 °C, avec un rapport molaire H_2O_2 /substrat de 0.5, et une activité initiale en HRP de 0.032 U/mL pour le traitement de l'eau synthétique, et de 10 U/mL pour le traitement de l'eau usée. Différents de temps de réaction (1, 3, 5 et 8 h) ont été évalués afin d'observer l'enlèvement de l'activité estrogénique au cours du temps.

Les tests d'estrogénicité ont été effectués par l'équipe du Dr. Benjamin Piña de l'Institut de Biologie Moléculaire de Barcelone (IBMB-CSIC) (Espagne). Pour établir l'estrogénicité avant et après traitement enzymatique, le choix s'est porté sur les tests *in vitro* : le bio essai aux levures recombinantes (RYA), développé par l'équipe du Dr. Piña (Garcia-Reyero et *al.*, 2001).

2.3.5.1 Plasmides et souches de levure

La souche de levure BY4741 (MATa *ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 his3 Δ 1 met15 Δ 0*) (EUROSCARF, Frankfort, Allemagne) a été transformée avec des plasmides pH5HE0 et pVitBX2, comme il a été décrit dans une précédente étude (Garcia-Reyero et *al.*, 2001). L'expression du plasmide pH5HE0 contient le récepteur estrogène humain HE0 (Green et Chambon, 1991), qui a été cloné dans le PAAH5, un vecteur permettant une forte expression chez la levure (Schneider et Guarente, 1991). Le plasmide rapporteur pVITB2x contient deux copies d'éléments de réponse aux estrogènes pseudo palindromiques ERE2 du gène B1 VTG *X. laevis* (5'-AGTCACTGTGACC-3') inséré dans un unique site *KpnI* site du pSFLA-178K (Garcia-Reyero et *al.*, 2001).

2.3.5.2 Test de l'activité estrogénique

Les clones transformés étaient germés tout d'abord dans 2 mL d'un média enrichi (YPD) à 30°C. Puis, ils étaient germés pendant la nuit dans un milieu minimum (6.7 g/L de base d'azote de levure sans acide aminé, DIFCO, Bessel, Suisse ; 20 g/L de glucose, avec un supplément de 0.1 g/L de marqueurs prototrophes comme nécessaire). La culture finale était ajustée à une densité optique (OD) de 0.1 et séparée en volumes de 75 µL dans la première rangée et 50 µL dans les autres puits de la plaque à micro-titration en polypropylène de 96 puits siliconés (NUNCTM, Roskilde, Danemark).

Une série de dilutions a été réalisée en distribuant chaque échantillon dans les puits de la première rangée (qui contient déjà 75 µL de culture). Des dilutions en série ont été effectuées en transférant successivement 25 µL du puit précédent dans le puit à côté ; ainsi tous les puits contenaient 50 µL et différentes dilutions de l'échantillon, avec des facteurs de dilution de 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 et 1:810. Des contrôles positifs ont été faits en ajoutant du E2 de concentration finale de 10 nM. De plus, un contrôle de toxicité a été inclus par ajout de 10 nM de E2 à l'échantillon avec un facteur de dilution de 1:30. Les plaques ont été alors placées, et légèrement mélangées, dans une étuve pendant 6 h à 30 °C en étant légèrement mélangées. Après incubation, 50 µL du Y-PERTM (PIERCETM, Rockford, IL, USA) ont été ajoutés à chaque puit et ensuite les plaques ont de nouveau été placées dans l'étuve pour 30 min à 30 °C. Par la suite, 50 µL de solution tamponnée ont été ajoutés dans les cellules lysées. La solution tamponnée était préparée en mélangeant 100 mL de tampon-Z, 1 mL de Triton X-100 (Sigma), 1 mL de SDS à 10%, 70 µL de 2-mercaptoéthanol (Fluka) et 21 mg de 4-méthylumbelliferyl β-D-Galactoside (Sigma). Le tampon-Z est un mélange de 60 mM de Na₂HPO₄, 40 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de KCl et 1mM de MgSO₄, à pH 7.0. Après une brève centrifugation, les plaques sont lues avec un spectrofluoromètre Victor3 Wallac (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA), avec une longueur d'onde d'excitation de 355 nm et d'émission de 460 nm. La fluorescence était enregistrée pendant 15–20 min (une mesure par min) ; les valeurs de l'activité en β-galactosidase étaient calculées en tant que vitesse de l'augmentation des unités arbitraires de fluorescence avec le temps, en utilisant des méthodes standard de régression linéaire. Les valeurs en estrogénicité sont reportées en ng/L équivalent en estradiol (EEQ). Ces valeurs ont été calculées en ajustant les valeurs en β-galactosidase avec l'équation de Hill par des méthodes non-linéaires (Quirós et al.,

2005 ; Noguerol et al., 2006). La limite de détection (LOD) de ce bio essai (sans considérer le facteur de dilution) a été déterminée à 34 pM en équivalent E2 (Noguerol et al., 2006).

CHAPITRE III

3 QUANTIFICATION OF STEROID SEX HORMONES USING SOLID - PHASE EXTRACTION FOLLOWED BY LIQUID CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY

Le Chapitre 3 est constitué de l'article suivant : Filali-Meknassi Y., Auriol M., Adams C.D., Surampalli R.Y. (2007). **Quantification of steroid sex hormones using solid -phase extraction followed by liquid chromatography - mass spectrometry.** *Water Environment Research*, 79 (doi: 10.2175/106143007X156781).

L'INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l'article. Vous pouvez le consulter à l'adresse suivante :

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 Environ. Res.* 79(6): 687-696.

<http://dx.doi.org/10.2175/106143007X156781>

CHAPITRE IV

4 NATURAL AND SYNTHETIC HORMONES REMOVAL USING HORSERADISH PEROXIDASE ENZYME: TEMPERATURE AND PH INFLUENCE

Le Chapitre 4 est constitué de l'article suivant : Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C., Tyagi R.D., (2006). **Natural and synthetic hormones removal using horseradish peroxidase enzyme: temperature and pH influence.** *Water Research*, 40(15), 2847-2856.

4.1 Résumé

Le premier objectif de notre recherche était d'établir la faisabilité technique d'utiliser l'enzyme HRP pour l'enlèvement des estrogènes naturels et synthétiques –estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), et 17 α -éthinyloestradiol (EE2). Les effets du pH et de la température sur la cinétique du procédé enzymatique ont été évalués. Les concentrations résiduelles en estrogènes ont été quantifiées par une analyse en chromatographie liquide, couplée à une spectrométrie de masse. En solution synthétique, à pH 7.0 et 25 $\pm$ 1 °C, le procédé enzymatique HRP a été capable d'atteindre des taux d'enlèvement de 92–100% en E1, E2, E3 et EE2 en une heure de traitement, avec une activité initiale en HRP de 0.017 U/mL. L'influence du pH (5–9) et de la température (5–35 °C) sur l'enlèvement des estrogènes était significative, avec un pH optimum près des conditions neutres. Les résultats ont aussi montré que les constituants de l'eau usée ont un impact significatif sur le traitement enzymatique pour l'enlèvement des estrogènes. La recherche expérimentale a prouvé que le système enzymatique HRP est techniquement faisable pour l'enlèvement des principaux estrogènes présents dans l'environnement à faibles concentrations.

Mots clés : HRP, enzyme, estrogens, eau usée, cinétique.

4.2 Abstract

The primary objective of our research was to establish the technical feasibility of using the horseradish peroxidase (HRP) enzyme for natural and synthetic estrogens—estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), and 17 α -ethinylestradiol (EE2)—removal. The effects of temperature and pH on enzymatic treatment kinetics were investigated. Residual estrogen concentrations were quantified by liquid chromatography, coupled with mass spectrometry analysis. In a synthetic solution at pH 7.0 and 25 $\pm$ 1 °C, the HRP enzyme-catalyzed process was capable of achieving 92–100% removal of E1, E2, E3, and EE2 within 1 h of treatment with an HRP activity of 0.017U/ml. The influence of the pH (5–9) and temperature (5–35 °C) on estrogen removal was observed to be significant, with the optimum pH near neutral conditions. The results also showed that wastewater constituents significantly impact the HRP-catalyzed estrogen removal. The experimental research proved that the HRP-catalyzed system is technically feasible for the removal of the main estrogens present in the environment at low concentrations.

Keywords: HRP, enzyme, estrogens, wastewater, kinetic.

4.3 Introduction

It has been well established that the endocrine system can be disturbed by various substances (Colborn *et al.*, 1993). These endocrine disrupting compounds (EDCs) may potentially cause adverse effects on human health and wildlife (Environment Canada, 1999). Thus, since 1996, the US Environmental Protection Agency's (USEPA) Office of Research and Development has considered endocrine disruption as one of its top six research priorities (USEPA, 2003). As a result, one of the USEPA's objectives is to improve the removal of EDCs in a cost-effective manner.

The presence of EDCs in surface waters and sediment has primarily been attributed to the release of human waste and its incomplete removal in the sewage treatment plants (STP) (Filali-Meknassi *et al.*, 2004a). Conventional STPs are not designed to remove trace elements such as EDCs. Studies have determined that natural estrogens—e.g., estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), and estriol (E3)—and synthetic estrogen (17 α -ethinylestradiol (EE2)) are the major contributors to the estrogenic activity observed in sewage effluents. Concentrations as low as 0.1 ng/l of an estrogen are needed for significant estrogenic effects (Aerni *et al.*, 2004). Indeed, the phyto- and xeno-estrogens exhibit relatively minor estrogenic activity, even if their aqueous concentration is often higher than that of mammalian estrogens (Gutendorf and Westendorf, 2001; Fig. 4.1).

Several STP processes have been evaluated in the last several years for steroid hormone removal. This work has shown that during activated sludge treatment, some steroid hormones are biodegraded and/or adsorbed to the sludge (Johnson and Sumpter, 2001; DEPA, 2004). However, research also has shown that a considerable amount of the hormones may remain soluble in the sewage effluent (Mastrup *et al.*, 2001). Furthermore, dissolved contaminants, associated with dissolved natural organics (DOM), are often easily transported through a STP (Schäfer *et al.*, 2002). Thus, these constituents may be found in the sewage effluent and pose a threat to both surface water and ground water. Some physicochemical treatments—especially ozone—have been shown to be highly effective in the removal of steroid hormones. However, both ozone and chlorine produce by-products whose estrogenicity is unknown, and in some cases, may be higher than or similar to the original product (Hu and Aizawa, 2003; Moriyama *et al.*, 2004). Although the conventional biological and physicochemical wastewater treatment processes can exhibit significant estrogen removal, effluent concentrations of estrogens (as well

as byproducts) are still often above an acceptable level with respect to estrogenicity (<0.1 ng/l) (Auriol *et al.*, 2005).

Enzymatic degradation has already shown potential for removing aromatic compounds (e.g., phenols) and their estrogenic activities in wastewater (Karam and Nicell, 1997). Our hypothesis is that since natural and synthetic estrogens include a phenolic ring in their chemical structure (Table 4.1), enzymatic treatment should be a possible solution and a potentially effective treatment for estrogen removal from sewage effluents. Specifically, once activated by H₂O₂, horseradish peroxidase (HRP) catalyzes the oxidation of aqueous aromatic compounds—such as estrogens—and may be a viable treatment alternative. The by-products of HRP treatment are polymerized through a non-enzymatic process which leads to the formation of high molecular weight polymers of low solubility that can be easily removed from wastewater by co-precipitation, sorption to solids, sedimentation or filtration (Karam and Nicell, 1997). Moreover, numerous reports have been published recently on the improvements in enzyme manufacturing, such as the use of less costly growth substrates (e.g., sludge) that provide lowcost sources of enzymes (Ikehata *et al.*, 2004).

The purpose of this research was to conduct a preliminary assessment of a novel process to remove the primary natural and synthetic steroid hormones found in sewage effluents by an innovative and cost-effective enzymatic treatment. The key objective of this study was to establish the technical feasibility of using the HRP enzyme to remove estrogen. A second objective was to determine the effect of temperature and pH on the kinetics removal of the main estrogens using an HRP enzymatic treatment.

4.4 Experimental section

4.4.1 Chemicals

HRP (enzyme number EC 1.11.1.7), catalase-agarose (enzyme number EC 1.11.1.6), and hydrogen peroxide solution (H₂O₂, 30%, CAS 7722-84-1) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

Hormone compounds for study were selected based on three criteria: (1) abundance in municipal wastewaters, (2) persistence in the environment, and (3) toxicity or endocrinological potency (Fig. 4.1). These criteria led to the selection of natural hormones (estrone (E1), 17-beta-estradiol

(E2), estriol (E3)) and a synthetic hormone (17- α -ethinylestradiol (EE2)) as the study compounds. These compounds E1 (CAS 53-16-7), E2 (CAS 50-28-2), E3 (CAS 50-27-1), and EE2 (CAS 57-63-6) were also purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Zearalanone (ZAN, CAS 5975-78-0), which was used as the internal standard for liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) analysis, based on work by Lagana *et al.* (2004), was also purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Reagent-grade acetonitrile and methanol were supplied by Fisher Scientific (USA). Distilled water was further purified in a Milli-Q RG system (Millipore, Billerica, MA, USA).

4.4.2 Enzyme assay

A colorimetric assay, that was used to measure the activity/concentration of the HRP enzyme, required phenol, 4-aminoantipyrine (AAP), and hydrogen peroxide. Phenol was selected because current studies are focused on characterizing the kinetics and mechanisms of phenol polymerization by peroxidase. Enzyme activity is proportional to the rate of production of the non-precipitating product that absorbs light at a peak wavelength of 510nm, with an extinction coefficient (ϵ) of 7100/M cm. One unit of activity (U) is defined as the number of micromoles of hydrogen peroxide utilized per minute at pH 7.4 and 25 °C (Wagner and Nicell, 2002). The assay mixture consisted of 10mM phenol, 2.4mM AAP, and 0.2mM H₂O₂. Solid phenol (purity >99%) and AAP (purity 98%) were purchased from Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI. Absorbance at 510nm was monitored every second for 1 min following a reaction initiation. All enzymatic assays were performed in triplicate. Relative standard deviations (RSD) of triplicate measurements were always less than 5%.

4.4.3 Estrogens analysis

Estrogen concentrations were determined by single-quad LC-MS. LC was carried out using an Agilent LC pump Series 1100 (Agilent, CA, USA) equipped with a standard autosampler injector (G1313). The analytes were chromatographically separated on a 150x4.6mm i.d. column filled with 5 mm (average particle size) C18 (2) packing (Luna Phenomenex, MO, USA) and a precolumn Securityguard 4x3mm i.d. supplied by Phenomenex. Analysis was carried out using acetonitrile as the mobile phase. Analysis of the estrogens was performed by using an electrospray interface (ESI) in negative ion mode with an Agilent Model 1100 mass spectrometer (Agilent, CA, USA). Data processing was performed with the Target 4.1 software on a Windows

workstation (ThermoQuest Thru-Put Software, FL, USA). The analysis was based on the work presented by Filali-Meknassi *et al.* (2004b), with the exception of the pre-treatment procedure that was modified for this work. Specifically, the solid phase extraction (SPE), described by Filali-Meknassi *et al.* (2004b), was replaced by a liquid–liquid extraction (LLE) of a 0.5-ml water sample in 1.0 ml of methylene chloride. This was followed by evaporation and reconstitution in 1 ml of methanol and then directly injected into the LC-MS instrument.

The analytical performance of the LLE/LC-MS method was evaluated by using various methods, including estimation of the recovery and the RSD of replicate analyses, and determination of method detection limits (MDL). Five-point calibration curves, ranging from 0 to 150 µg/l, were developed for each compound using linear regression. Linearity was strong for all compounds, with regression coefficients (R^2) of 0.990–0.999 achieved. Analyte recoveries were determined by adding known and appropriate volumes of the working standard mixture to paired unspiked samples. Analyte recoveries ranged from 91% to 104% in all cases. The RSD was determined from a set of two water samples, each spiked at 30 mg/l of estrogen and analyzed seven times. For all compounds, the RSD was lower than 9%. MDLs were determined to be 0.21, 0.25, 0.14, and 0.19 µg/l for E1, E2, E3, and EE2, respectively.

4.4.4 Experimental protocol

The reaction mixture was prepared by diluting a stock solution of a single estrogen to a concentration of 400 nM, in a 0.1 M sodium phosphate buffer, with a pH adjustment to 4–10. Batch reactors, containing 35ml of the buffered reaction mixture and 0.017 U/ml HRP, were prepared. A reaction was initiated by addition of 800 nM of H₂O₂. A peroxide-to-substrate ratio of 2.0 was selected, based on studies by Kinsley and Nicell (2000) and Sakurai *et al.* (2001), that showed this ratio to be optimum for avoiding the inhibitory effects of H₂O₂ on the enzyme.

The reactors were mixed using magnetic stirrers. Temperature control was maintained at 25±1 °C using a water bath (Compact Low Temperature Circulator, RM6-S, LAUDA). The solution was allowed to achieve thermal equilibrium, prior to reaction initiation. Aliquots of 0.5 ml were taken into centrifuge tubes, at specific times, and immediately mixed with catalase to stop the reaction. Immediately after all samples were collected, the estrogen mixtures were extracted by a LLE and analyzed with LC-MS. Before processing each sample through the LLE, the internal standard (ZAN–4.5 µg/l) was added to the aliquot. Subsequently, 1 ml of methylene chloride was mixed

in the sample to recover the analyte and the internal standard. The sample was then evaporated, until dry, in the TurboVap under nitrogen steam. Finally, the dry samples were reconstituted with 1ml of methanol and vortexed for 5 s. The samples were kept in glass amber vials at -25 °C until LC-MS analysis. All experiments were conducted in duplicate. For these experiments, the pH and the temperature were varied from 5 to 9 and from 5 to 35 °C, respectively, to assess the influence of both of these factors on the enzymatic treatment of estrogens.

4.5 Results and discussion

4.5.1 HRP initial activity determination

Preliminary experiments were conducted which showed that 0.017 U/ml was sufficient to achieve 90% or higher removal of each compound (i.e., E1, E2, E3, and EE2) at a pH of 7.0 and a temperature of 25 ± 1 °C, within 1 h of treatment. With this HRP addition, the results showed that the enzyme-catalyzed process at a pH of 7.0 and a temperature of 25 ± 1 °C was capable of achieving 92–93% removal of E1, E2, and E3, and 100% removal of EE2 within 1h of treatment. By comparison, other enzymes (i.e., manganese peroxidase and laccase) have been shown to cause E2 and EE2 to “almost completely disappear” at 0.01 mM with 0.6 U/ml of enzyme activity and a 1-h treatment (Suzuki et al., 2003).

4.5.2 pH influence

HRP activity at a pH below 4 and above 11 has been previously observed to be very low (Wu *et al.*, 1997). In our work, HRP activities over a pH range from 5 to 9 were studied for E1, E2, and E3, and from 4.5 to 9.5 for EE2. Experimental results are shown in Figs. 4.2 and 4.3 and show that optimum pH for HRP catalyzed treatment was at near neutral conditions for each estrogen. Specifically, a pH range of 6–8 allowed the highest removal (76–100%) of estrogen (Fig. 4.2). For all of the experiments, at all pH values, the RSD for replicate experiments was less than 11%.

4.5.3 Temperature influence

The influence of temperature on estrogen removal was investigated at a pH of 7.0 over a temperature range of 5–35 °C. The removal rates of the enzymatic reaction depended on the temperature (Figs. 4.4 and 4.5). However, the temperature did not appear to have the same degree of effect on each estrogen (Fig. 4.4). The decrease in the removal efficiency at temperatures between 5 and 25 °C was two to three times greater for E1, E2, and E3 than for

EE2. Overall, the influence of temperature on estrogen removal was $E3 < E1 < E2 < EE2$. For all experiments, at all temperatures, the RSD for replicate experiments was less than 7%.

4.5.4 Kinetic study

The initial reaction velocities (v_a ; $\mu\text{g/l s}$) were determined as a function of pH and temperature (Figs. 4.6 and 4.7). The absolute value of the slope of the curve (reaction time vs. estrogen concentration) at $t = 0$, $|(d[\text{estrogen}]/dt)_0|$, corresponds to the initial velocity of the reaction (Marangoni, 2002).

For all of the pH experiments, the initial reaction velocities ranged from 0.03–0.17 $\mu\text{g/l s}$, with the maximum velocity observed at pH 7.0 for each estrogen (with the exception of E2 where the maximum occurred over a pH range of 6–8) (Fig. 4.6). For all of the temperature experiments, the initial reaction velocities ranged from 0.03 to 0.30 $\mu\text{g/l s}$ (Fig. 4.7). A comprehensive kinetic study is ongoing to define the reaction orders and the reaction rate constants.

4.5.5 Enzymatic treatment in Milli-Q water and wastewater from activated sludge

To examine the impact of wastewater constituents on estrogen removal during enzymatic oxidation, experiments were conducted on mixtures of E1, E2, EE2, and E3 in both buffered Milli-Q solutions and in filtered wastewater solutions. The wastewater was 0.45-mm filtered post-secondary treatment samples collected from an activated sludge STP in Rolla, MO (USA).

The average water inflow to the STP was 13,250 m^3/d . The wastewater characterization, conducted at the STP, showed a 5-d biochemical oxygen demand (BOD_5) of 120 mg/l , and total suspended solids (TSS) of 100 mg/l for the raw influent. For the treated effluent, the BOD_5 was 10 mg/l , and the TSS was 3 mg/l .

Prior to the enzymatic experiments, the wastewater was filtered through a 0.45-mm filter (Millipore Durapore Membrane Filters) to remove particulate matter, and then stored at 4 °C. The Milli-Q water and wastewater samples were spiked with an estrogen mixture containing E1, E2, E3, and EE2 (400 nM each). All experiments were conducted at pH 8.0 and 25 °C, with a concentration of 0.068 U/ml HRP and 3200 nM H_2O_2 . Following the batch reactions, samples were filtered again through a 0.45-mm filter and extracted by SPE with C18- and NH₂-cartridges, as described by Filali-Meknassi *et al.* (2004b). SPE was required rather than LLE for the wastewater cleanup to provide additional sample cleanup prior to LC-MS analysis.

All reactions were nearly complete after 20min (Fig. 4.8). For a 1-h treatment time, a removal of 96–100% was achieved for E2, E3, and EE2 in the Milli-Q water, whereas the E1 removal was only 73% (Fig. 4.8). Furthermore, Fig. 4.8 shows that EE2 reacts faster with HRP than E2, E3, and E1 in this order. Thus, based on this observation (Fig. 4.8) HRP would have an increasing affinity for E1, E3, E2, and EE2 in this order. These results are verified by Colosi *et al.* (2006) study. Indeed, the authors gave the Michaelis–Menten coefficient (K_M) for EE2 and E2, and according to their values EE2 has more affinity with the HRP than E2.

For wastewater samples lower removals were achieved for E1, E2, E3, and EE2, specifically 29%, 19%, 28%, and 37%, respectively. These results showed that the HRP-catalyzed removal of estrogens from a wastewater matrix is feasible, although process optimization is clearly required. We hypothesize that the decrease in the removal of estrogens from wastewater samples is due to the effects of other organic compounds in solution that may be inhibiting the HRP enzyme (or possibly consuming oxidant). For example, the HRP enzyme may be interacting with other organic compounds and is not as available to catalyze HRP-based reactions. Similarly in previous work (Cooper and Nicell, 1996), a 40% greater initial HRP activity was required to obtain equivalent phenol removal from a foundry wastewater, as compared to removal from synthetic water.

4.5.6 Estrogens at environmental concentrations

In order to verify if the developed enzymatic system is still feasible and effective at environmental estrogen concentration, several experiments were carried out. All tests were conducted at pH 8.0 and at 25 ± 1 °C, with a concentration of 0.72 nM H_2O_2 and within 1-h treatment. The batch reactors contained 1000ml of the buffered Milli-Q reaction mixture (synthetic water) or wastewater sample spiked with the four studied estrogens at a final concentration of 0.36 nM each. Following the batch reactions, water samples were filtered through a 0.45-mm filter and extracted by SPE, allowing to preconcentrate the samples prior to LC-MS analysis. MDLs in Milli-Q samples were determined to be 0.59, 0.99, 0.99, and 1.32 ng/l for E1, E2, E3, and EE2, respectively. In wastewater samples MDLs were 3.00, 2.58, 1.74, and 2.69 ng/l for E1, E2, E3, and EE2, respectively.

Different initial HRP activities were tested and initial HRP activities of 0.032 and 8 U/ml were sufficient to remove completely the four studied estrogens (E1, E2, E3, and EE2) in synthetic

water and in wastewater sample, respectively (Fig. 4.9). These results established that the HRP-catalyzed removal of estrogens at environmental concentrations is clearly feasible, reliable, and effective. Thus, the developed process could be an additional treatment process of the conventional STPs to remove completely estrogens from the effluents. Moreover, the previous assumption regarding the use of HRP by other organic compounds present in wastewater is still accurate, since 8-U/ml HRP was required in wastewater sample although only 0.032 U/ml-HRP was used in synthetic water to remove the same amount of estrogens (Fig. 4.9).

Therefore, additional testing and development could be carried out to improve the HRP-catalyzed removal of estrogens, such as the use of a protective additive (e.g. polyethylene glycol), the immobilization of the enzyme or utilization of a plug-flow reactor instead of a batch reactor.

4.6 Conclusions

This work demonstrates that HRP-catalyzed estrogen treatment is potentially viable in wastewater, though the efficiency may be negatively impacted to varying degrees by wastewater constituents. The results of this study show that pH, temperature and wastewater constituents all exert a significant effect on the HRP-catalyzed estrogen (E1, E2, E3, and EE2) removal. At typical environmental estrogen concentrations, the HRP-catalyzed treatment process was observed to be effective.

4.7 Acknowledgments

The authors thank Ms. Evelyn Chamberlain for useful discussions for assistance with LC-MS analysis. The authors also acknowledge and thank the International Council for Canadian Studies and “Fonds Quebecois de la Recherche sur la Nature et les Technologies” (FCAR) for their financial support. Additional support was provided by the Environmental Research Center for Emerging Contaminants (UMR), and the John and Susan Mathes Professorship.

4.8 References

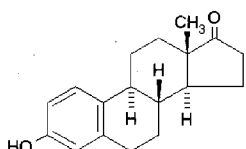
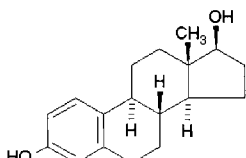
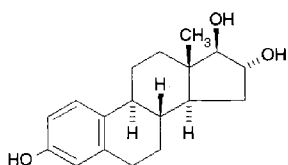
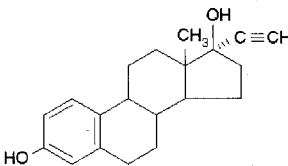
- Aerni, H.-R., Kobler, B., Rutishauser, B.V., Wettstein, F.E., Fischer, R., Giger, W., Hungerbühler, A., Marazuela, M.D., Peter, A., Schonenberger, R., Vogeli, A.C., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 378(3), 688–696.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C., Surampalli, R.Y., 2005. Endocrine disrupting compounds removal from the wastewater treatment plant, a new challenge. Accepted for publication by *Process Biochemistry*.
- Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspective* 101, 378–384.
- Colisi L.M., Huang Q., Weber W.J., Jr., 2006. Quantitative structure–activity relationship based quantification of the impacts of enzyme–substrate binding on rates of peroxidase-mediated reactions of estrogenic phenolic chemicals. *Journal of the American Chemical Society* 128(12), 4041–4047.
- Cooper, V.A., Nicell, J.A., 1996. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Research* 30(4), 954–964.
- Danish Environmental Protection Agency (DEPA), 2004. Degradation of Estrogens in Sewage Treatment Processes. Environmental Project N° 899, Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment, pp. 61.
- Environment Canada, 1999. Endocrine Disrupting Substances in the environment. http://www.ec.gc.ca/eds/fact/eds_e.pdf (July 19, 2003).
- Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Barata, C., Riva, M.C., 2004a. Endocrine Disrupting Compounds in wastewater, sludge Treatment Processes and Receiving Waters: Overview. *The Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management* 8(1), 1–18.
- Filali-Meknassi, Y., Auriol, M., Adams, C., Surampalli, R.Y., 2004b. Endocrine Disrupters Compounds in the Livestock Dejections and Slaughterhouses Effluent. *Proceedings of*

- the International Water Association (IWA), Biennial World Water Congress, 19-24 September 2004, Marrakech, Maroc.
- Gutendorf, B., Westendorf, J., 2001. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166(1-2), 79–89.
- Hanselman, T., Graetz, D. A., Wilkie, A.C., 2003. Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review. *Environmental Science and Technology* 37(24), 5471–5478.
- Hu, J.-Y., Aizawa, T., 2003. Quantitative structure–activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic chemicals. *Water Research* 37(6), 1213–1222.
- Huber, M.M., Canonica, S., Park, G.-Y., von Gunten, U., 2003. Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes. *Environmental Science and Technology* 37(5), 1016–1024.
- Ikehata, K., Buchanan, I.D., Smith, D.W., 2004. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal Environmental Engineering and Science* 3(1), 1–19.
- Johnson, A.C., Sumpter, J.P., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environmental Science and Technology* 35(24), 4697–4703.
- Karam, J., Nicell, J.A., 1997. Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 69(2), 141–153.
- Kinsley, C., Nicell, J.A., 2000. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Bioresource Technology* 73, 139–146.
- Lagana, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G., Marinob, 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.
- Lai, K.M., Johnson, K.K., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2000. Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. *Environmental Science and Technology* 34(18), 3890–3894.

- Lee, L.S., Strock, T.J., Sarmah, A.K., Rao, P.S.C., 2003. Sorption and Dissipation of Testosterone, Estrogens, and Their Primary Transformation Products in Soils and Sediment. *Environmental Science and Technology* 37(18), 4098–4105.
- Marangoni, A.G., 2002. *Enzyme Kinetics – A modern approach*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 248, Wiley-Interscience, Chichester.
- Mastrup, M., Jensen, R.L., Schäfer, A.I., Khan, S., in *Recent Advances in Water Recycling Technologies*; (eds. A. I. Schäfer, P. Sherman, T. D. Waite) 103-112 Brisbane, Australia, 2001.
- Moriyama, K., Matsufuji, H., Chino, M., Takeda, M., 2004. Identification and behavior of reaction products formed by chlorination of ethynylestradiol. *Chemosphere* 55(6), 839–847.
- Nicell, J.A., 2003. Enzymatic treatment of waters and wastes. In *Chemical Degradation Methods for Wastes and Pollutants: Environmental and Industrial Applications*. M.A. Tarr (eds), Marcel Dekker Inc., pp. 423-475, New York, NY.
- Sakurai, A., Toyoda, S., Sakakibara, M., 2001. Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *Coprinus cinereus* peroxidase. *Biotechnology Letters* 23(12), 995–998.
- Sayles, G., 2001. Biological fate of estrogenic compounds associated with sewage treatment: a review. *Effective Risk Management of Endocrine Disrupting Chemicals Workshop*, 18-19 September 2001, Cincinnati, OH.
- Schäfer, A. I., Mastrup, M., Jensen, R.L., 2002. Enhancing particle interactions and removal of trace contaminants from water and wastewaters. *Desalination* 147(1-3), 243–250.
- Suzuki, K., Hirai, H., Murata, H., Nishida, T., 2003. Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethynylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Research* 37(8), 1972–1975.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science Total Environment* 225(1-2), 81–90.

- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 2003. Endocrine Disruptors Research Initiative. <http://www.epa.gov/endocrine/> (May 5, 2004).
- Wagner, M., Nicell, J.A., 2002. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research* 36(16), 4041–4052.
- Wu, Y., Taylor, K.E., Biswas, N., Bewtra, J.K., 1997. Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. *Water Research* 31(11), 2699–2704.
- Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S.A., Esparza, M., 2003. HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17-estradiol, and 17-ethynyl estradiol on powdered activated carbon. *Water Research* 37(14), 3530–3537.

Table 4.1 Physico-chemical properties of main natural and synthetic estrogens

Estrogens	Structure	Formula	Molar mass (g/mol)	Water solubility (mg/L)	pK _a	Log (K _{ow})
Natural	E1 	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.37	0.8-13 ^(a, c)	10.3-10.8 ^(a)	2.45-3.43 ^(c, e)
	E2 	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38	3.9-13.3 ^(a, c)	10.5-10.7 ^(a)	3.10-4.01 ^(c, e, g)
	E3 	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288.38	3.2-13.3 ^(a)	10.4 ^(a)	2.55-2.81 ^(c, e)
Synthetic	EE2 	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296.41	4.8 ^(c, d)	10.4 ^(b)	3.67-4.15 ^(c, e, f, g)

a) Hanselman et al. (2003)

b) Huber, et al. (2003)

c) Lai et al. (2000)

d) Lee et al. (2003)

e) Sayles (2001)

f) Ternes et al. (1999)

g) Yoon et al. (2003)

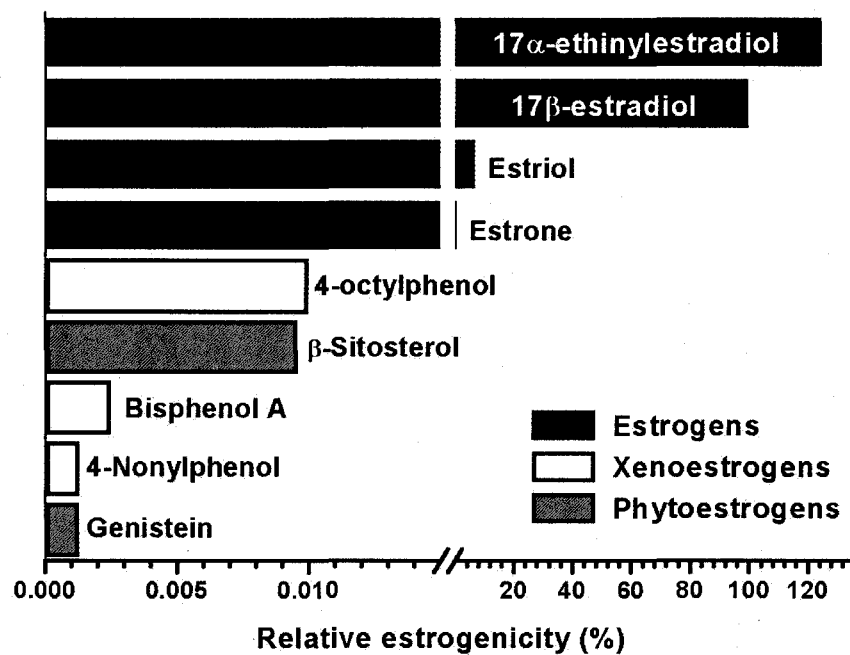


Figure 4.1 Relative estrogenic activity of some EDCs obtained by a proliferation assay with MCF7-cells (E-Screen)
(compiled from Gutendorf and Westendorf, 2001)

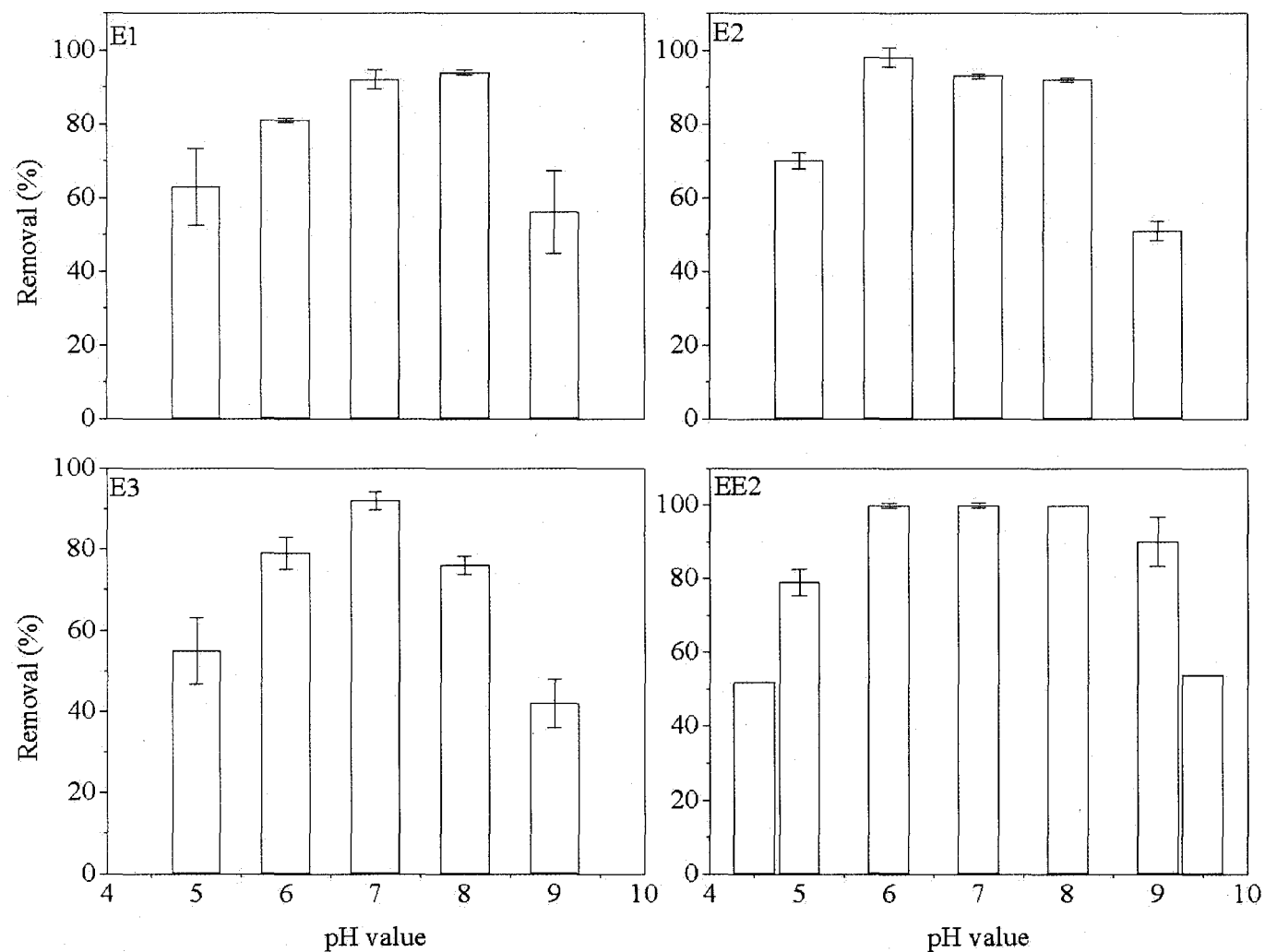


Figure 4.2 HRP-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a function of pH at 25 ± 1 °C for pH 4.5–9.5. Error bars represent the standard deviation

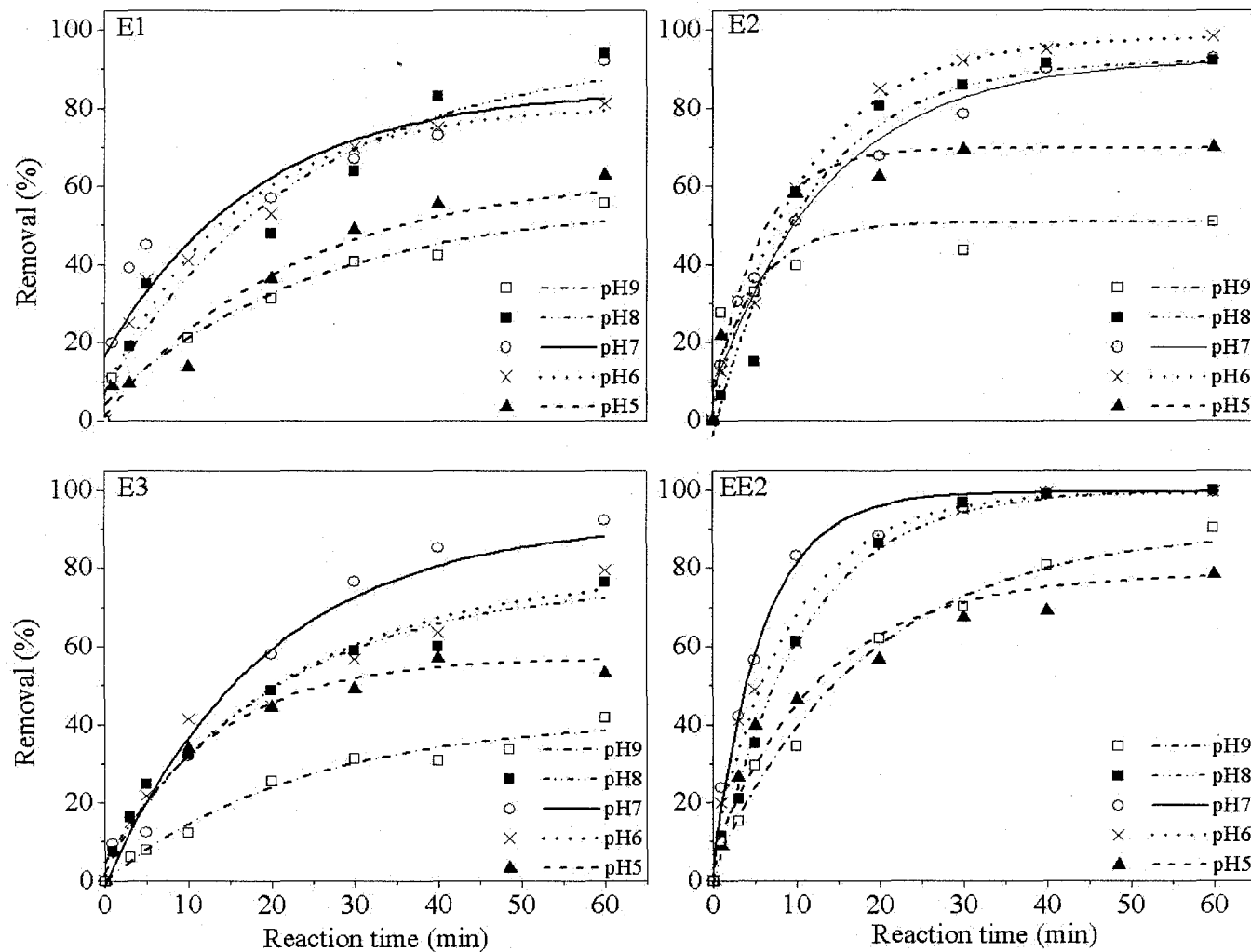


Figure 4.3 HRP-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a function of pH at 25 ± 1 °C for pH 5–9

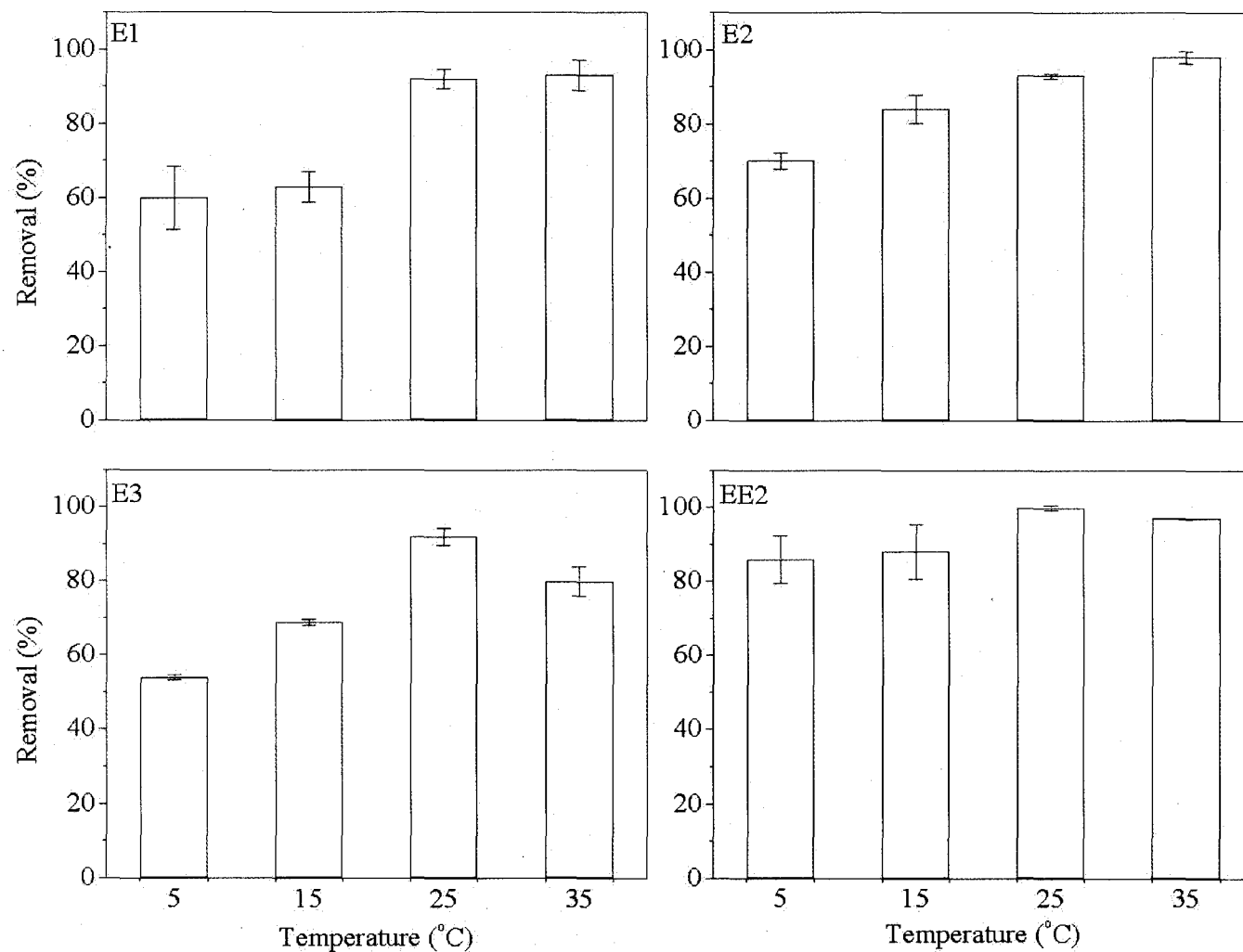


Figure 4.4 HRP-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a function of temperature at pH 7.0 and temperature of 5–35 °C. Error bars represent the standard deviation

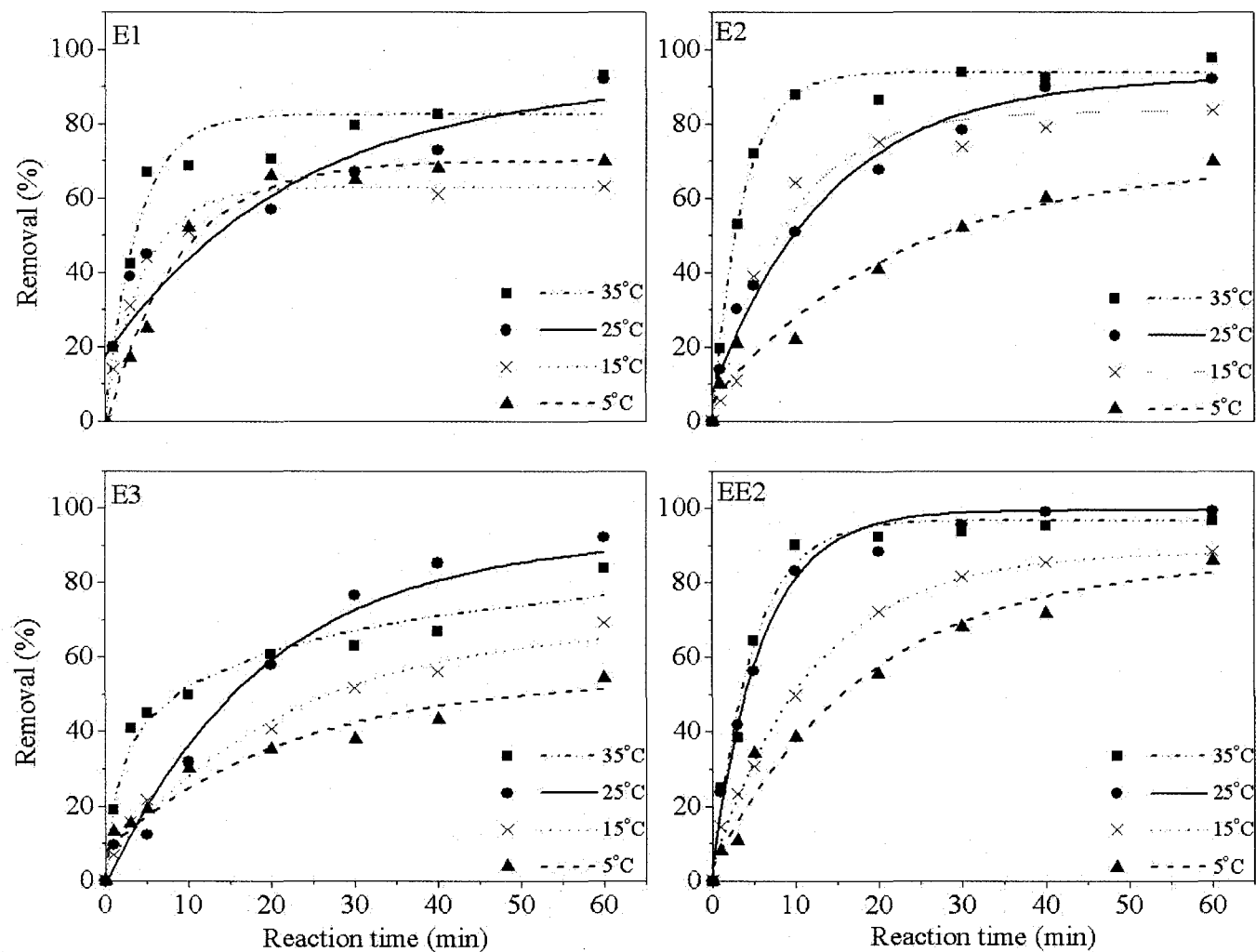


Figure 4.5 HRP-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a function of temperature at pH 7.0 and temperature of 5–35 °C

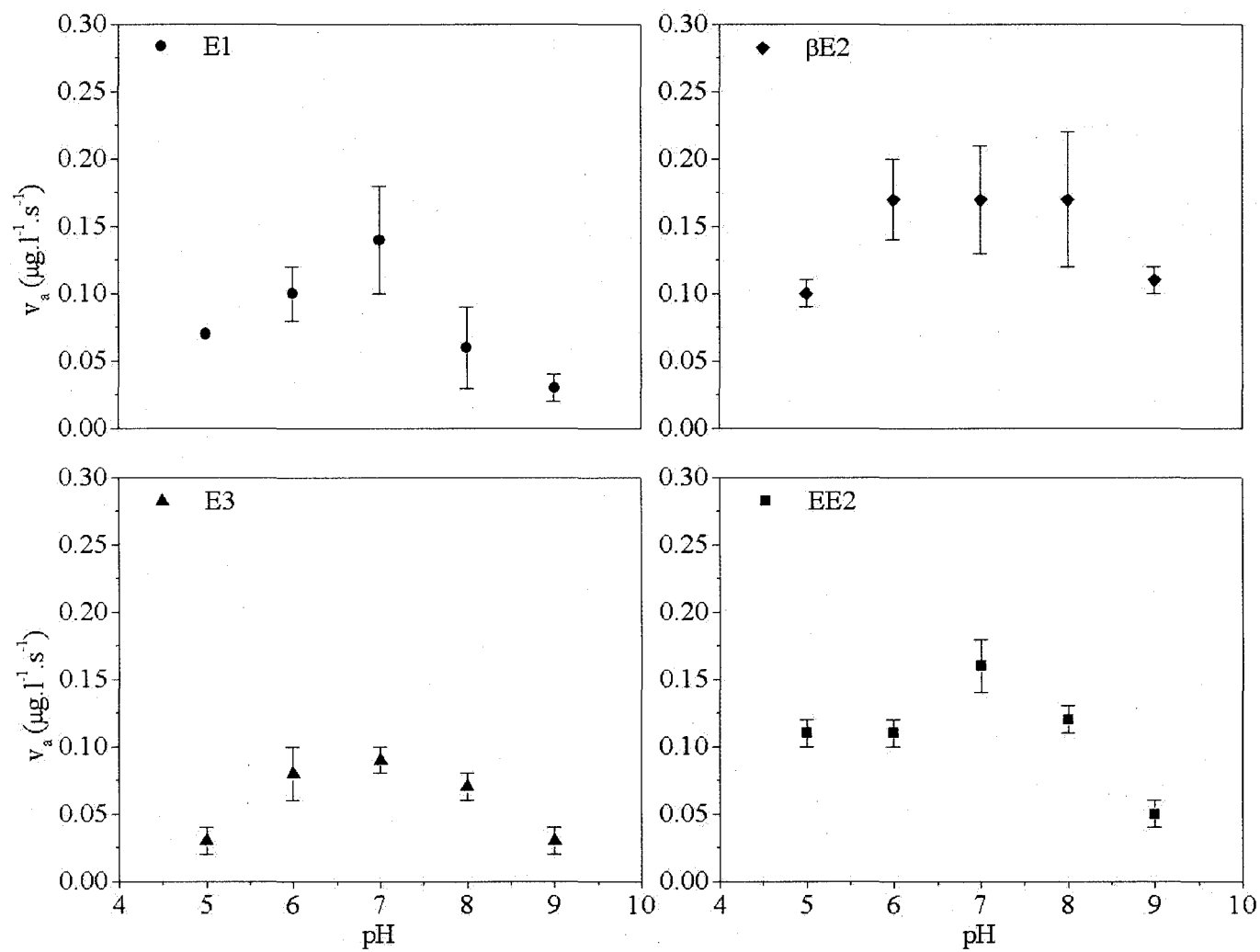


Figure 4.6 Initial reaction velocity as a function of pH at 25 ± 1 °C. Error bars represent the standard deviation

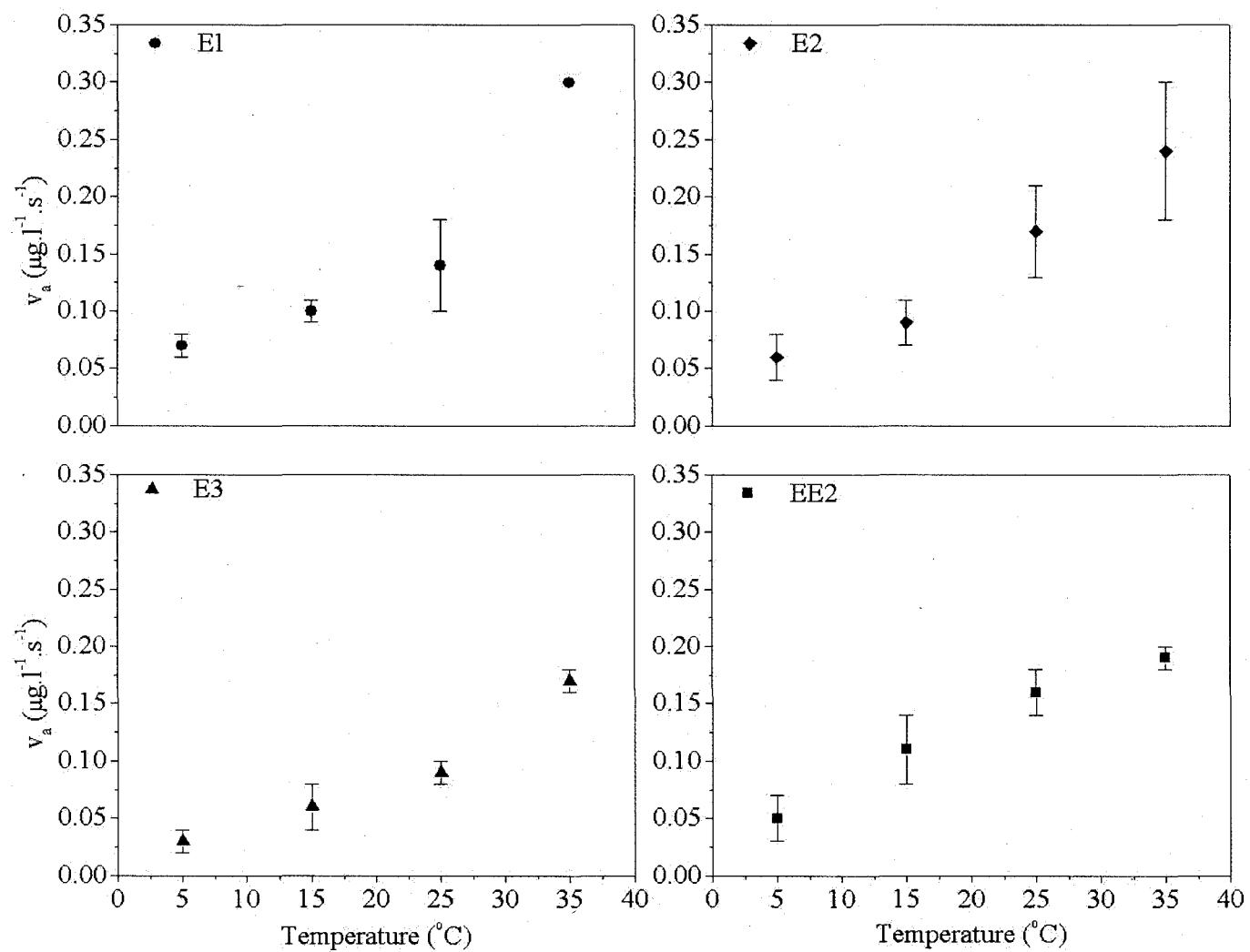


Figure 4.7 Initial reaction velocity as a function of temperature at pH 7.0. Error bars represent the standard deviation

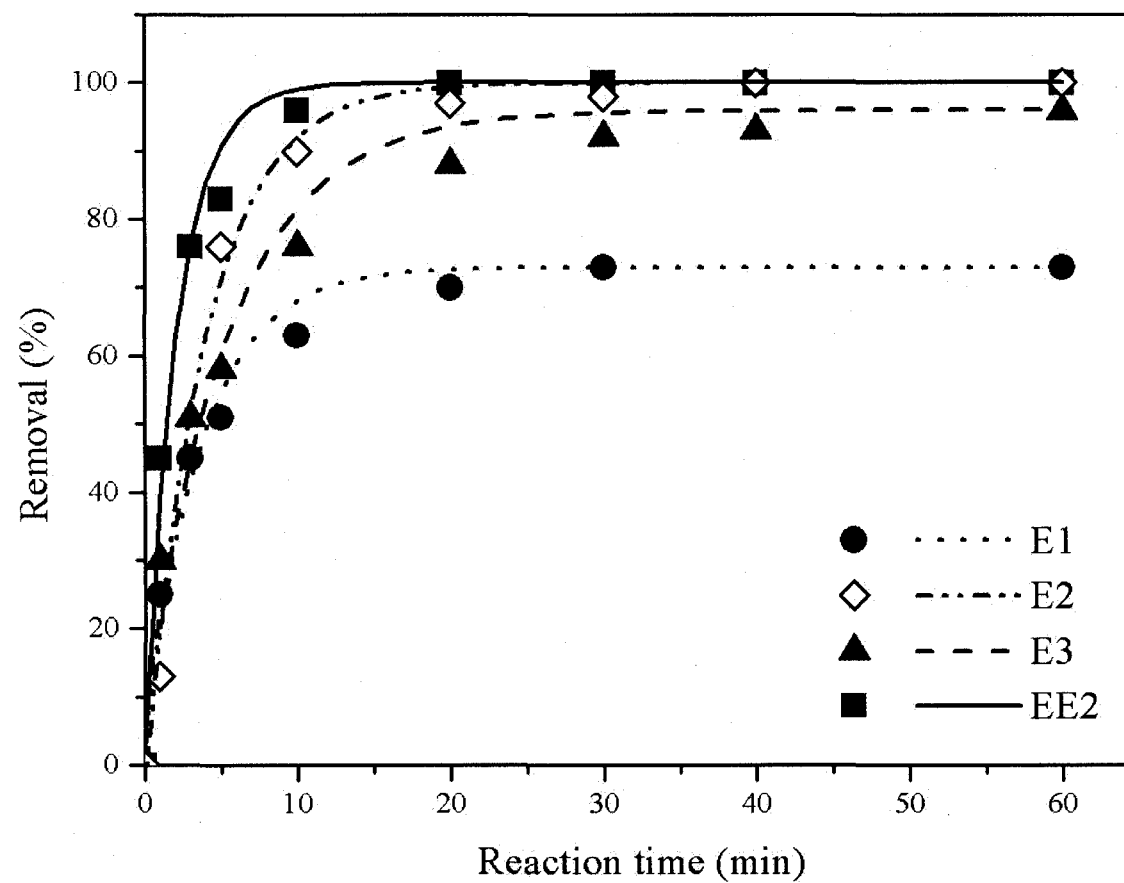


Figure 4.8 HRP-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a mixed solution in Milli-Q water at pH 8.0 and at 25 °C

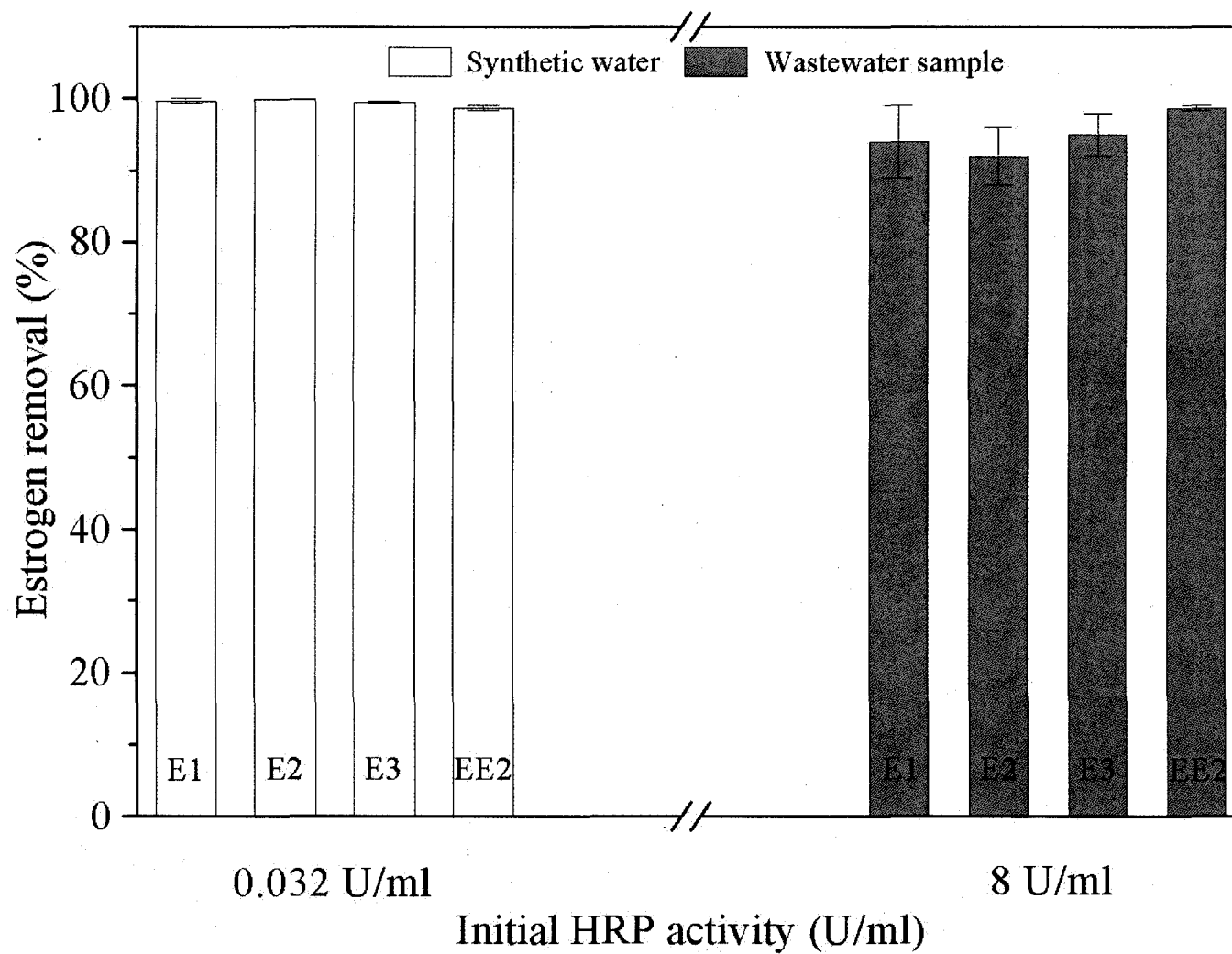


Figure 4.9 Initial HRP activity required to completely oxidize a mixture of E1, E2, E3, and EE2 in synthetic water and wastewater sample at pH 8.0 and at 25 °C

CHAPITRE V

5 OXIDATION OF NATURAL AND SYNTHETIC HORMONES BY THE HORSERADISH PEROXIDASE ENZYME IN A WASTEWATER

Le Chapitre 5 est constitué de l'article suivant : Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C. (2007). **Oxidation of natural and synthetic hormones by the horseradish peroxidase enzyme in a wastewater.** *Chemosphere* (doi : 10.1016/j.chemosphere.2007.03.045).

5.1 Résumé

Les estrogènes stéroïdiens, incluant les estrogènes naturels (e.g., estrone – E1 ; 17 β -estradiol – E2 ; et estriol – E3) et synthétique (e.g., 17 α -éthynylestradiol – EE2), sont connus comme perturbateurs endocriniens. L'objectif de cette recherche est d'évaluer la faisabilité de l'oxydation enzymatique des estrogènes et d'optimiser ce procédé pour le traitement d'une eau usée municipale contaminée par des estrogènes stéroïdiens en utilisant la peroxydase de raifort (HRP) et le peroxyde d'hydrogène. Une activité initiale en HRP de 0.02 U ml⁻¹ était suffisante pour enlever complètement EE2 d'une solution synthétique, alors que des doses supérieures (jusqu'à 0.06 U ml⁻¹) ont été nécessaires pour enlever E1, E2 et E3. Le rapport molaire peroxyde-substrat optimal a été déterminé égal à approximativement 0.45. Basé sur la cinétique de Michaelis-Menten, l'enzyme HRP avait une réactivité croissante envers E1, E3, E2, et EE2, dans cet ordre. Pour le traitement de l'effluent du procédé de boue activée d'une station de traitement d'eau usée municipale, une activité initiale en HRP de 8–10 U ml⁻¹ a été requise pour enlever complètement les estrogènes étudiés, tandis que seulement 0.032 U ml⁻¹ de HRP a été nécessaire pour traiter une eau synthétique contenant les mêmes concentrations en estrogènes.

Mots clés : estrogènes, perturbateurs endocriniens, oxydation enzymatique, eau usée, HRP, cinétique de Michaelis-Menten, boue activée.

5.2 Abstract

Steroid estrogens, including both natural estrogens (e.g., estrone – E1; 17 β -estradiol – E2; and estriol – E3) and synthetic estrogens (e.g., 17 α -ethinylestradiol – EE2), are known as endocrine disrupting compounds. The objective of this research was to evaluate the feasibility of the enzymatic oxidation of estrogens and to optimize this process in a municipal wastewater contaminated with steroid estrogens using horseradish peroxidase (HRP) and hydrogen peroxide. An initial HRP activity of 0.02 U ml⁻¹ was sufficient to completely remove EE2 from the synthetic solution, although greater HRP doses (up to 0.06 U ml⁻¹) were required to remove E1, E2 and E3. The optimal molar peroxide-to-substrate ratio was determined to be approximately 0.45. Based on the Michaelis-Menten kinetics, the HRP had an increasing reactivity with E1, E3, E2, and EE2, in increasing order. In real activated sludge process effluent, an HRP dose of 8–10 U ml⁻¹ was required to completely remove all of the studied estrogens, while only 0.032 U ml⁻¹ of HRP was necessary to treat synthetic water containing the same estrogen concentrations.

Keyword: steroid estrogen, endocrine disrupting compounds, enzymatic oxidation, wastewater, horseradish peroxidase (HRP), Michaelis-Menten kinetics, activated sludge

5.3 Introduction

Endocrine disrupting compounds (EDCs) potentially adversely affects on animal and human health (Colborn et al. 1993). The presence of these compounds in the environment has been mainly attributed to their incomplete removal in wastewater treatment plant (WWTP) processes (DEPA, 2002; Filali-Meknassi et al., 2004, 2007; Sumpter, 2005; Auriol et al., 2006a). As a result, an objective of the U.S. EPA is to improve the removal of EDCs from wastewater (U.S. EPA, 2003). Further studies (Aerni et al., 2004; Leusch et al., 2005; Auriol et al., 2006b) reported that natural steroid estrogens (e.g., estrone – E1; 17 β -estradiol – E2; and estriol – E3) and synthetic steroid estrogen (17 α -ethinylestradiol – EE2) are the major contributors to the estrogenic activity associated with WWTP effluents. Moreover, steroid estrogens have been found to be biologically active at concentrations as low as 0.1 ng l⁻¹ (Auriol et al., 2006a).

Researchers have recently focused their investigations on the development of treatment processes based on the catalytic actions of enzymes (Nicell, 2003). Peroxidase enzymes, especially horseradish peroxidase (HRP), have been shown to be effective for the removal of aromatic compounds, such as phenols, alkylphenol, and bisphenol A (BPA) (Wagner and Nicell, 2003; Sakuyama et al., 2003; Huang and Weber, 2005; Bódalo et al., 2006). Specifically, once activated by hydrogen peroxide, HRP catalyzes the oxidation of aqueous aromatic compounds and the by-products formed are polymerized through a non-enzymatic process which leads to the formation of high molecular weight polymers. These low-solubility polymers can be easily removed from wastewater by co-precipitation, sorption to solids, sedimentation or filtration (Nicell, 2003). Furthermore, several laboratory-scale studies (Cooper and Nicell, 1996; Wagner and Nicell, 2001) demonstrated that HRP can catalyze the transformation of contaminants in a real wastewater matrix. However, it is very likely that each specific application of enzymes will require adapted studies to determine if enzymatic treatment is a feasible option for a given waste (Nicell, 2003). A previous study (Auriol et al., 2006b) showed that steroid estrogens (E1, E2, E3, and EE2) can be effectively oxidized by HRP and H₂O₂ at pH 7 and 25 $\pm$ 1 °C. In order to reduce the operating costs associated with HRP treatment, further experiments, of which a kinetic study, are necessary to minimize enzyme requirements through optimization of reaction conditions.

Thus, the purpose of this research was to optimize the HRP enzyme-catalyzed process for removal of steroid estrogens (E1, E2, E3, and EE2) from synthetic water (purified deionized

water) and, subsequently, in a real wastewater matrix from a municipal WWTP (at Rolla, MO). The three key objectives were: (1) to determine HRP's affinity to different substrates (E1, E2, E3, and EE2); (2) to find the optimum HRP and H₂O₂ doses for removal of steroid estrogens from a municipal wastewater; and (3) to evaluate the impact of the wastewater matrix on the enzymatic process by comparing real wastewater and synthetic water (estrogens in purified deionized water) treatment. Steroid hormone compounds were selected for study because of their persistence in the environment and their estrogenic potency.

5.4 Experimental

5.4.1 Chemicals

HRP (enzyme number EC 1.11.1.7), catalase-agarose (enzyme number EC 1.11.1.6) and hydrogen peroxide solution (H₂O₂, 30%) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Steroid hormone (E1, E2, E3, and EE2) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The internal standard 17 β -E2-d4 (17 β -estradiol-2,4,16,16-d4) was purchased from C/D/N Isotopes (Quebec, Canada). Acetonitrile and methanol were reagent grade solvents and were supplied by Fisher Scientific (USA). Distilled water was further purified in a Milli-Q RG system (Millipore, Billerica, MA USA,).

5.4.2 Methodology

Purified deionized water, containing specific estrogen concentrations, was prepared as needed by diluting the concentrate estrogen stock solution with an appropriate amount of phosphate buffer (0.1 M).

The wastewater effluent used in the study was sampled from a settling basin effluent of an activated sludge process at a municipal WWTP at Rolla, Missouri (USA) (Auriol et al., 2006b). The collection and process of wastewater samples were as described by Auriol et al (2006b). Wastewater characteristics for collected samples are listed in Table 5.1.

A colorimetric assay was used to quantify the HRP enzyme activity (Auriol et al., 2006b). The assay mixture consisted of 10 mM phenol (purity > 99%), 2.4 mM 4-aminoantipyrine (AAP - purity 98%), and 0.2 mM H₂O₂. Enzyme activity is proportional to the rate of production of the non-precipitating product that absorbs light at a peak wavelength of 510 nm, with an extinction

coefficient (ϵ) of $7100 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. One unit of activity (U) is defined as the number of micromoles of hydrogen peroxide utilized per minute at pH 7.4 and 25 °C.

5.4.3 Experimental protocol

All experiments were performed in duplicate. All data in figures and tables are expressed as averages of the replicate data.

The amber-glass reactors were placed in a constant temperature water bath (Compact Low Temperature Circulator, RM6-S, LAUDA) maintained at 25 ± 1 °C with complete mixing accomplished using stir bars propelled by a magnetic stirrer (Fig. 5.1). The solution was allowed to achieve thermal equilibrium with the water bath prior to reaction initiation.

5.4.3.1 Experiments conducted with synthetic water

The reaction mixture was prepared by dissolving stock solution of a single steroid estrogen to a concentration of 400 nM, in 0.1 M sodium phosphate buffer, with an adjustment at pH 7.0. In previous work, Auriol et al. (2006b) reported that the optimum pH for HRP-catalyzed treatment was at near neutral conditions for each steroid estrogen. Batch reactors (5.2 cm long and 3.5 cm in diameter), containing 35 ml of the buffered reaction mixture, were prepared and an initial HRP activity of 0.017 U ml^{-1} was used (except where cited in the text). The initial HRP activity of 0.017 U ml^{-1} was chosen based on results obtained by Auriol et al. (2006b). The reaction was initiated by addition of 800 nM of H_2O_2 (except where cited in the text). A molar peroxide-to-substrate ratio of 2.0 was first selected based on work by Kinsley and Nicell (2000) and Sakurai et al. (2001) that showed this ratio to be optimum for avoiding inhibitory effects of H_2O_2 on the enzyme.

Aliquots of 0.5 ml were taken from the reactor into centrifuge tubes at specific times, and immediately mixed with a high concentration of catalase to stop the reaction. Before processing each sample through the liquid-liquid extraction (LLE), the internal standard was added to each aliquot. Subsequently, 1 ml of methylene chloride was mixed in the sample to extract the analyte and the internal standard. The sample was then evaporated until dry in the TurboVap under nitrogen steam. Finally, the dry samples were reconstituted with 1 ml of MeOH and vortexed for 5 s. The samples were kept in labelled glass amber vials under -25 °C until liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis. For these experiments, the influence of

the initial HRP activity and the peroxide-to-substrate ratio on the enzymatic treatment of each steroid estrogen was investigated. Additionally, a kinetic study was conducted to determine the HRP affinity to each steroid estrogen.

Regarding the kinetic study, and thus for the initial reaction velocities determination, the experimental procedure was exactly the same as described previously, except that the 0.5-ml aliquots were taken at 10 s intervals over the first min of reaction. To calculate the initial reaction velocity, a maximum of 20% conversion of substrate to product was considered (Marangoni, 2002).

5.4.3.2 Experiments conducted with wastewater samples

In order to assess differences in treatment efficiency between synthetic water and municipal wastewater, parallel tests were performed with the same steroid estrogen concentration in each water. For both sets of experiments (municipal wastewater vs. synthetic water), the feasibility of the HRP-catalyzed process was investigated at an environmentally-relevant concentration (i.e., ca. 100 ng l⁻¹) (Auriol et al., 2006a).

Municipal wastewater was characterized in terms of pH, chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC), turbidity, and the main metals content (Table 5.1). The pH was measured using a Corning 430 pH meter. COD was obtained using Hach Method 8000 (Hach, 1997). TOC was measured using a 5000A TOC Analyzer (Shimadzu, MD, USA). Turbidity was measured using a Hach model 2100P turbidimeter. Metal concentrations were measured using a Model Elan DRC-e Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Perkin Elmer SCIEX, Concord, Ontario, Canada). The samples were prepared following EPA Standard Method 200.8. Municipal wastewater was also analyzed for steroid estrogens by LC-MS.

The synthetic-water reaction mixture was prepared by diluting a stock solution of mixed steroid estrogens (E1, E2, E3, and EE2) to a concentration of 0.4 nM (~100 ng l⁻¹) in 0.1 M sodium phosphate buffer with an adjustment of pH to 8.0. The wastewater reaction mixture was prepared by spiking the wastewater with appropriate amounts of estrogens to provide a final concentration of 0.4 nM each estrogen. Experiments were conducted in batch reactors (16 cm long and 9 cm in diameter) containing 1 l of the buffered reaction mixture or wastewater. The reaction was initiated by addition of 0.8 nM of H₂O₂ (except where cited in the text).

After a 1-h treatment, the enzymatic reaction was stopped through the addition of a catalase enzyme. The reaction samples were then filtered through a 0.45- μm filter and processed through the solid phase extraction (SPE). The samples were kept in amber glass vials under -25 °C until LC-MS analysis.

5.4.4 Estrogen analysis

Estrogen concentrations were quantified by single-quad LC-MS. Descriptions of the analytical methods are provided by Auriol et al. (2006b).

5.4.4.1 Experiments conducted with synthetic water

The LC-MS method used was based on work by Filali-Meknassi et al. (2007) with the exception of the pre-treatment procedure. In this study, the SPE described by Filali-Meknassi et al. (2007) was replaced by a LLE. The analytical performance of the LLE/LC-MS method was evaluated through various methods, including estimation of the recovery and the relative standard deviation (RSD) of replicate analyses, as well as determination of method detection limits (MDL). Five-point calibration curves, ranging from 0–150 $\mu\text{g l}^{-1}$, were carried out for each compound using linear regression. Linearity was strong for all compounds with regression coefficients (R^2) of 0.990–0.999 achieved. Analyte recoveries were determined by adding known and appropriate volumes of the working standard mixture to paired unspiked samples. Analyte recoveries ranged from 91–104% in all cases. The RSD was determined from a set of two water samples, each spiked at 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ of estrogen and analyzed seven times. For all of the compounds, RSD was lower than 9%. Method detection limits (MDLs) were determined to be 0.21, 0.25, 0.14, and 0.19 $\mu\text{g l}^{-1}$ for E1, E2, E3, and EE2, respectively.

5.4.4.2 Experiments conducted with wastewater samples

The LC-MS analysis preceded by SPE was also based on the work of Filali-Meknassi et al. (2007). Synthetic water and wastewater samples were extracted using C18- and NH2-cartridges. The analytical performance of the SPE/LC-MS method was evaluated by using various other methods, including estimation of the recovery and RSD of replicate analyses, and determination of MDL. Five-point calibration curves, ranging from 0–160 ng l^{-1} , were developed for each compound using linear regression. Linearity was strong for all compounds with R^2 of 0.990–0.999. Analyte recoveries for the SPE/LC-MS method in the WWTP matrix ranged from 91 to

101%. For all of the compounds, RSD was lower than 12%. MDLs in Milli-Q samples were determined to be 0.59, 0.99, 0.99, and 1.32 ng l⁻¹ for E1, E2, E3, and EE2, respectively. In wastewater samples, the MDLs were 3.00, 2.58, 1.74, and 2.69 ng l⁻¹ for E1, E2, E3, and EE2, respectively.

5.5 Results and Discussion

No removal of steroid estrogens was observed in the presence of either H₂O₂ alone or HRP alone (results not shown). Therefore, the removal of steroid estrogens must be attributed to the combined action of HRP and H₂O₂.

5.5.1 Experiments conducted with synthetic water

5.5.1.1 Initial HRP activity influence

An initial steroid estrogen concentration of 400 nM (~100 µg l⁻¹) and an excess of H₂O₂ (molar peroxide-to-substrate ratio of 2.0) were used to study enzymatic removal using HRP over a 1-h treatment. All experiments were conducted at pH 7.0 and 25±1 °C. The objective of these experiments was to determine the initial HRP activity necessary to individually remove 400 nM of each steroid estrogen (E1, E2, E3, or EE2). Thus, sufficiently increasing doses of HRP were added so that no more removal was observed at the highest dosages. Enzyme doses required to accomplish complete removal of each studied steroid estrogen are presented in Fig. 5.2. The results showed that the necessary initial HRP activity was different for each studied compound (present at the same molar concentration). Indeed, an initial HRP activity of 0.02 U ml⁻¹ was sufficient to completely remove EE2 from the synthetic solution, although greater HRP doses (up to 0.06 U ml⁻¹) were required for the removal of E1, E2, and E3 (Fig. 5.2). Thus, under the experimental conditions, and based on the efficiency of elimination, the HRP had an increasing affinity for E1, E3, E2, and EE2, in increasing order. A kinetic study will be discussed later to verify this hypothesis.

5.5.1.2 [H₂O₂] influence

During the enzymatic treatment, HRP was prone to inactivation due to the presence of excess H₂O₂, which can inhibit the catalytic activity through conversion of HRP to inactive form (Nicell and Wright, 1997). However, it should be noted that if the H₂O₂ concentration is too low, then the rate of substrate oxidation would be limited by the availability of H₂O₂. Thus, the HRP-

catalyzed system must be optimized to maximize the reaction rate, thereby minimizing capital costs, while also minimizing enzyme losses and reagent costs through inhibition by H₂O₂ (Nicell, 2003).

The molar peroxide-to-substrate ratio corresponds to the ratio between the added molar quantity of H₂O₂ and the initial molar concentration of the considered steroid estrogen (E1, E2, E3, or EE2). Thus, experiments were conducted involving a range of H₂O₂ concentrations (from limited to excess quantities). The results are shown in Fig. 5.3. Since the extent of estrogen transformation is proportional to the H₂O₂ supplied when H₂O₂ is limiting (linear portion of the plots of Fig. 5.3), the stoichiometry between H₂O₂ and estrogen can be calculated from the slope in the linear portion of the plots of Fig. 5.3. The molar ratios of peroxide to substrate were calculated for each estrogen (E1, E2, E3, and EE2) in synthetic water. Linearity for each calculation was strong for all compounds with R² of 0.964-0.997. The molar H₂O₂/estrogen ratios ranged from 0.44–0.45 (E1 – 0.44, E2 – 0.44, E3 – 0.45, EE2 – 0.44), corresponding to the theoretical molar stoichiometry of peroxide to substrate represented by the following reaction, as described by (Nicell, 2003):



where AH₂ represents the steroid estrogen and AH• is the free radical product.

These molar peroxide-to-substrate ratios are lower than those reported in previous studies on the peroxidase-catalyzed reaction of phenol or BPA (Kinsley and Nicell, 2000; Sakurai et al., 2001; Sakuyama et al., 2003). However, Zhang and Nicell (2000) noticed a similar molar ratio for the treatment of pentachlorophenol (PCP) by HRP and H₂O₂. The deviations between measured and theoretical stoichiometries for aromatic substrates, other than PCP and estrogens, have been postulated to be the result of several mechanisms in which the products of the catalytic process are polymers larger than dimers (Zhang and Nicell, 2000). Thus, Zhang and Nicell (2000) postulated, in the case of PCP, that dimers are the main products of the reaction and, due to the formation of a significant quantity of precipitate, the solubility of the dimers is very low. Moreover, the removal of steroid estrogen by HRP seems to be possible over a large range of molar peroxide-to-substrate ratio (from 0.5 to 2). Furthermore, experiments with a molar peroxide-to-substrate ratio of 6 for EE2 removal did not show a decrease in the removal percentage indicating no apparent inhibition due to excess H₂O₂ (results not shown).

5.5.1.3 Kinetic study

The purpose of this kinetic research was to identify the reaction order of the HRP reaction with each studied steroid estrogen, and to determine the affinity of the HRP to these compounds. Thus, while the initial HRP activity (corresponding to the optimal initial activity for each compound, see section 3.1.1.) and the H₂O₂ dose (in excess: molar peroxide-to-substrate ratio of 2) were the same for each experiment, the initial substrate concentration varied from 100 to 500 nM (~30 to 150 µg l⁻¹). The value of the initial rate of the reaction at different initial substrate concentrations allowed determination of the rate and order reaction of the HRP-catalyzed reaction. Indeed, the initial reaction rate (v_A) is related to substrate concentration, as shown in the following equation:

$$v_A = \left| \frac{d[A]}{dt} \right| = k_r [A]^n \quad (2)$$

where A represents the substrate (in our case, one of the studied steroid estrogens), k_r is the reaction rate constant, and n corresponds to the reaction order.

Taking logarithms on both sides of Eq. 2 results allow a graphical determination of the order of the reaction catalyzed by HRP and the value of the rate constant. For more accurate determinations, changes in the substrate concentration were measured over a short time period of 60 s, at 10-s intervals.

Based on the results of these experiments, the HRP-catalyzed experiments exhibited a pseudo-first-order dependence on the steroid estrogen concentration, as demonstrated by the linear plot of $\log(v_A) = f(\log[A])$. For all reaction compounds, R^2 were greater than 0.96 (Table 5.2). The same plot allowed estimation of the rate constant of the enzymatic reaction. The different values are reported in Table 5.2.

Furthermore, the oxidation of the studied steroid estrogens catalyzed by HRP exhibited the Michaelis-Menten kinetics in the substrate concentration ranged studied. Specifically, the experimental data was well characterized by the Michaelis-Menten equation.

At optimal pH (7.0) and 25±1 °C, the Michaelis constant (K_M) values are reported in Table 5.2 as well as V_{MAX} . V_{MAX} corresponds to the maximum reaction velocity which the reaction can

achieve when the enzyme is saturated in substrate. These values could be determined graphically by the Lineweaver-Burk analysis.

K_M represents the affinity of the enzyme for its substrate and when the K_M value is low, the affinity is high. Based on the Michaelis-Menten kinetic analysis (Table 5.2), the HRP had an increasing affinity for E1, E3, E2, and EE2 (in that order) under the experimental conditions of the study. This observation is in accordance with the hypothesis stated previously and is supported by the efficiency of elimination of the estrogens. Colosi et al. (2006) found the same affinity order between EE2 and E2. However, their K_M values (2.6 μM for EE2 and 12.9 μM for E2) were higher than those determined in this study (1.3 μM for EE2 and 1.4 μM for E2) (Table 5.2). This difference in K_M between studies could be due to the experimental procedure used. In fact, Colosi et al. (2006) measured the initial reaction velocities from only two reaction points (time zero and 20 s). Additionally, Colosi et al. (2006) did not specify the molar H_2O_2 /estrogen ratio used for these experiments.

5.5.2 Experiments conducted with wastewater samples

5.5.2.1 Municipal wastewater treatment

For these experiments the treatment efficiency between synthetic water and municipal wastewater was evaluated at environmentally-relevant concentrations of approximately 100 ng l^{-1} . All experiments were carried out at pH 8.0, 25 ± 1 °C, and with a molar H_2O_2 /estrogen ratio of 0.5. Preliminary studies were performed to determine the optimal initial HRP activity required to achieve 100% removal of the four studied estrogens from synthetic water within a 1-h treatment period. The optimal initial HRP activity was then used to treat the wastewater containing the four studied estrogens to determine the influence of the matrix on the enzymatic treatment.

Based on the experimental results, only 0.032 U ml^{-1} of initial HRP activity was required to completely remove the estrogen mixture from synthetic water within a 1-h treatment period (Fig. 5.4a). When this same initial HRP activity was tested for estrogen removal from the WWTP matrix (Fig. 5.4b), no removal was observed. Subsequently, the HRP dose was increased until no additional removal was observed from the WWTP matrix (Fig. 5.4b). An initial HRP activity of 8–10 U ml^{-1} was found to be optimal to completely treat the WWTP water containing a mixture of estrogens (0.4 nM of each).

5.5.2.2 *H₂O₂ dose influence*

The objective of these experiments was to verify that the hydrogen peroxide dose was sufficient to effectively treat the municipal wastewater. The molar H₂O₂/estrogen ratio of 0.5 was found to be optimal in synthetic water. In fact, it is hypothesized that the hydrogen peroxide was consumed by other organic compounds present in the wastewater.

The extent of steroid estrogen removal (as a function of hydrogen peroxide dose) during the treatment of municipal wastewater is shown in Fig. 5.5. Experiments were carried out at pH 8.0, 25±1 °C, with 5-U ml⁻¹ HRP, in municipal wastewater. The results showed that no better removal was achieved using the greater molar H₂O₂/estrogen ratios of 1 and 2 (Fig. 5.5). Consequently, the previous hypothesis was not verified. In fact, when a larger H₂O₂ dose (molar ratio ≥ 1) was added to the reaction solution, the HRP appeared to be inactivated by by-products produced from the reaction of H₂O₂ excess with other wastewater compounds. However, this hypothesis needs to be verified in further studies.

Thus, the molar H₂O₂/estrogen ratio of 0.5 was the optimal ratio observed for treating municipal wastewater.

5.5.2.3 *Wastewater matrix influence*

This research showed a significant impact of the wastewater matrix constituents on the HRP-catalyzed removal of estrogens. Specifically, larger initial HRP dosages were required to remove the same amount of estrogens from municipal wastewater as from synthetic water (Fig. 5.4). The results also showed that the hydrogen peroxide was not consumed by chemical pathways other than the HRP catalysis and that a ratio of 0.5 was optimal for estrogen removal (Fig. 5.5).

However, other organic compounds (such as phenols, nonylphenol, octylphenol, and BPA) may also react with HRP before oxidizing the studied steroid estrogens compounds. Indeed, several studies reported that HRP is very effective to remove such compounds (Wagner and Nicell, 2002; Sakuyama et al., 2003; Wagner and Nicell, 2003). These compounds are commonly present in municipal wastewater at µg l⁻¹ concentrations (Isobe et al., 2001; Kuch and Ballschmiter, 2001; Vethaak et al., 2005).

5.6 Conclusion

In this study, the impacts of the reaction conditions (including enzyme and H_2O_2 doses) upon the oxidation of steroid estrogens catalyzed by HRP were investigated. It was found that the synthetic steroid estrogen (EE2) requires less initial HRP activity than the natural steroid estrogens (E2, E3, and E1, in this order). The optimum molar H_2O_2 /estrogens ratio in both synthetic water and actual wastewater was approximately equal to the theoretical ratio of 0.5.

A kinetic study showed that the oxidative conversion of steroid estrogens catalyzed by HRP followed Michaelis-Menten kinetics in the substrate concentration ranged studied. The determination of K_M for each estrogen showed that HRP had an increasing affinity for E1, E3, E2, and EE2 (in this order) under the experimental conditions.

This research also studied the influences of the wastewater matrix on steroid estrogens catalytic oxidative conversion. The treatment of municipal wastewater by HRP containing the studied steroid estrogens required more initial HRP activity than the treatment of the synthetic water. Several technical improvements (e.g., immobilization of enzyme, plug flow reactor, or protective additives) may allow decreased initial HRP activity, and thus reduced treatment costs.

Overall, the results of this study are encouraging in terms of establishing the technical feasibility of HRP-catalyzed treatment of wastewater contaminated by steroid estrogens.

5.7 Acknowledgments

The authors thank especially Pr. James Nicell for his advice and suggestions. The authors also acknowledge the International Council for Canadian Studies and “Fonds Quebecois de la Recherche sur la Nature et les Technologies” (FCAR) for their financial support. Additional support was provided by the Environmental Research Center for Emerging Contaminants (UMR) and the John and Susan Mathes Fellowship.

5.8 References

- Aerni, H.-R., Kobler, B., Rutishauser, B.V., Wettstein, F.E., Fischer, R., Giger, W., Hungerbuhler, A., Marazuela, M.D., Peter, A., Schonenberger, R., Vogeli, A.C., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 688-696.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C.D., Tyagi, R.D., 2006b. Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: temperature and pH effects. *Water Res.* 40, 2847-2856.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2006a. Endocrine disrupting compounds removal from the wastewater treatment plant, a new challenge. *Process Biochem.* 41, 525-539.
- Bódalo, A., Gómez, J.L., Gómez, E., Bastida, J., Máximo, M.F., 2006. Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. *Chemosphere* 63, 626-632.
- Colborn, T., Vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental Effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Persp.* 101, 378-384.
- Colosi, L.M., Huang, Q., Weber Jr., W.J., 2006. Quantitative structure-activity relationship based quantification of the impacts of enzyme-substrate binding on rates of peroxidase-mediated reactions of estrogenic phenolic chemicals., *J. Am. Chem. Soc.* 128, 4041-4047.
- Cooper, V.A., Nicell, J.A., 1996. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Res.* 30, 954-964.
- DEPA (Danish Environmental Protection Agency), 2002. Feminisation of fish - The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature. Environmental Project No 729, Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment.
- Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Barata, C., Riva, M.C., 2004. Endocrine disrupting compounds in wastewater, sludge treatment processes and receiving waters:

Overview. Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management 8, 1-18.

Filali-Meknassi, Y., Auriol, M., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2007. Quantification of steroid sex hormones using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. Water Environ. Res. Accepted for publication (doi: 10.2175/106143007X156781).

Hach, 1997. Water Analysis Handbook, Hach, Loveland, CO.

Huang, Q., Weber Jr., W.J., 2005. Transformation and Removal of Bisphenol A from Aqueous Phase via Peroxidase-Mediated Oxidative Coupling Reactions: Efficacy, Products, and Pathways. Environ. Sci. Technol. 39, 6029-6036.

Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A., Takada, H., 2001. Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. Environ. Sci. Technol. 35, 1041-1049.

Kinsley, C., Nicell, J.A., 2000. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. Bioresource Technol. 73, 139-146.

Kuch, H.M., Ballschmiter, K., 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the pictogram per liter range. Environ. Sci. Technol. 35, 3201-3206.

Leusch, F.D.L., Chapman, H.F., Körner, W., Gooneratne, S.R., Tremblay, L.A., 2005. Efficacy of an advanced sewage treatment plant in Southeast Queensland, Australia, to remove estrogenic chemicals. Environ. Sci. Technol. 39, 5781-5786.

Marangoni, A.G., 2002. Enzyme Kinetics – A Modern Approach. John Wiley & Sons, Ltd, Wiley-Interscience, Chichester.

Nicell, J.A., Wright, H., 1997. A model of peroxiades activity with inhibition by hydrogen peroxide. Enzyme Microb. Tech. 21, 302-310.

- Nicell, J.A., 2003. Enzymatic treatment of waters and wastes. In: Tarr, M.A. (Ed.). *Chemical Degradation Methods for Wastes and Pollutants: Environmental and Industrial Applications*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 423-475.
- Sakurai, A., Toyoda, S., Sakakibara, M., 2001. Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *Coprinus cinereus* peroxidase. *Biotechnol. Lett.* 23, 995-998.
- Sakuyama, H., Endo, Y., Fujimoto, K., Hatano, Y., 2003. Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 227-231.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2003. Endocrine disruptors research initiative. <http://www.epa.gov/endocrine/> (May 5, 2004).
- Sumpter, J.P., 2005. Endocrine disruptors in the aquatic environment: an overview. *Acta Hydroch. Hydrob.* 33, 9-16.
- 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., de Voogt, P., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59, 511-524.
- Wagner, M., Nicell, J.A., 2001. Treatment of a foul condensate from kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.* 35, 485-495.
- Wagner, M., Nicell, J.A., 2002. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.* 36, 4041-4052.
- Wagner, M., Nicell, J.A., 2003. Impact of the presence of solids on peroxidase-catalyzed treatment of aqueous phenol. *J. Chem. Technol. Biot.* 78, 694-702.
- Zhang, G., Nicell, J.A., 2000. Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.* 34, 1629-1637.

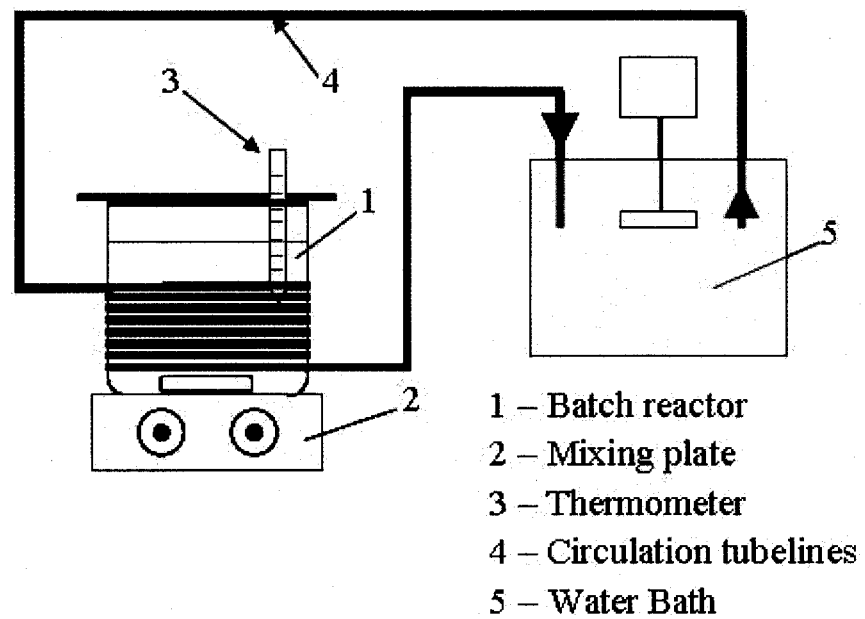


Figure 5.1 Schematic illustration of the batch reactor and experimental set-up.

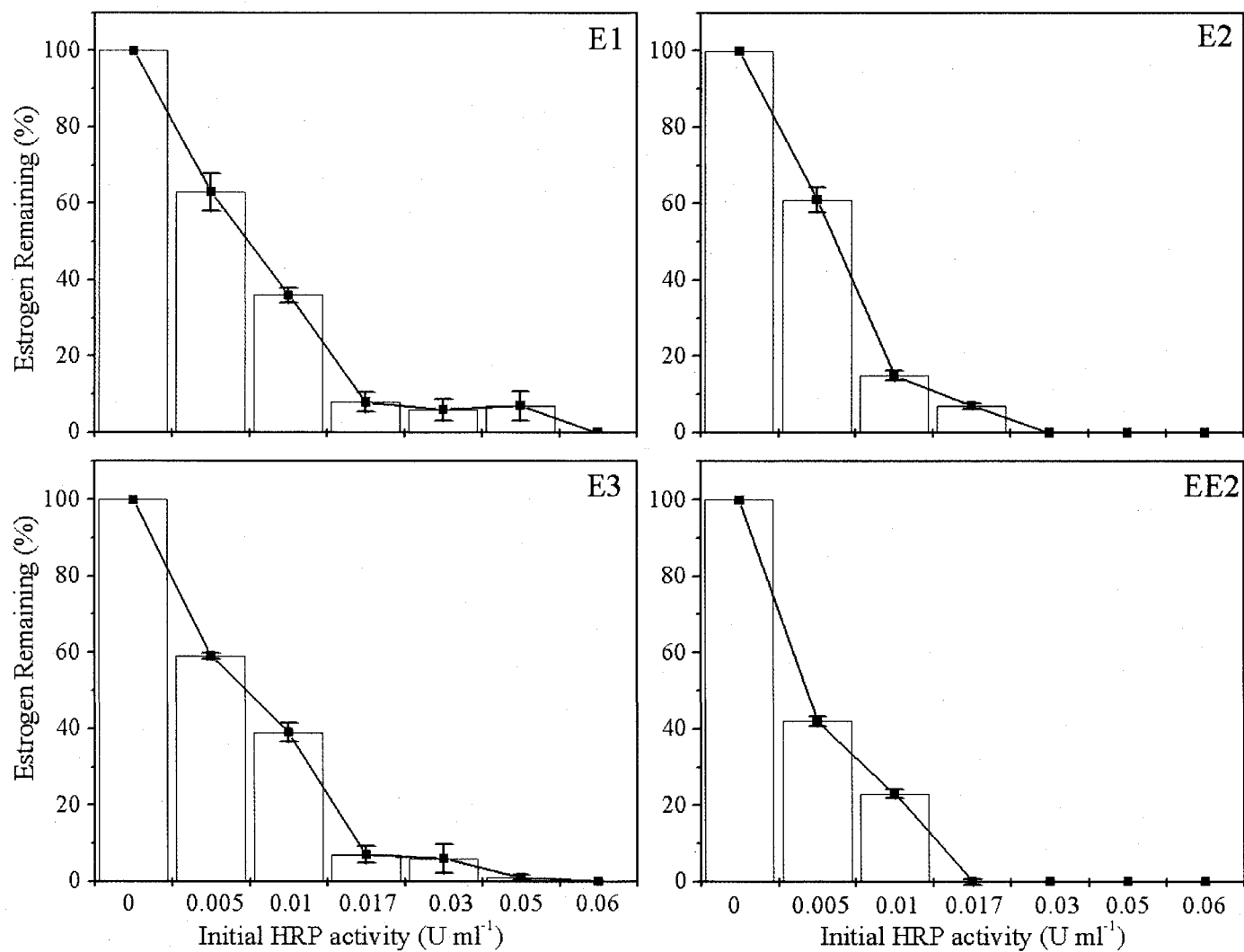


Figure 5.2 Initial HRP activity required for a complete removal of each studied steroid estrogen from synthetic water. Experimental conditions: 25±1 °C, pH 7.0, 400 nM estrogen, molar peroxide-to-substrate ratio of 2.0

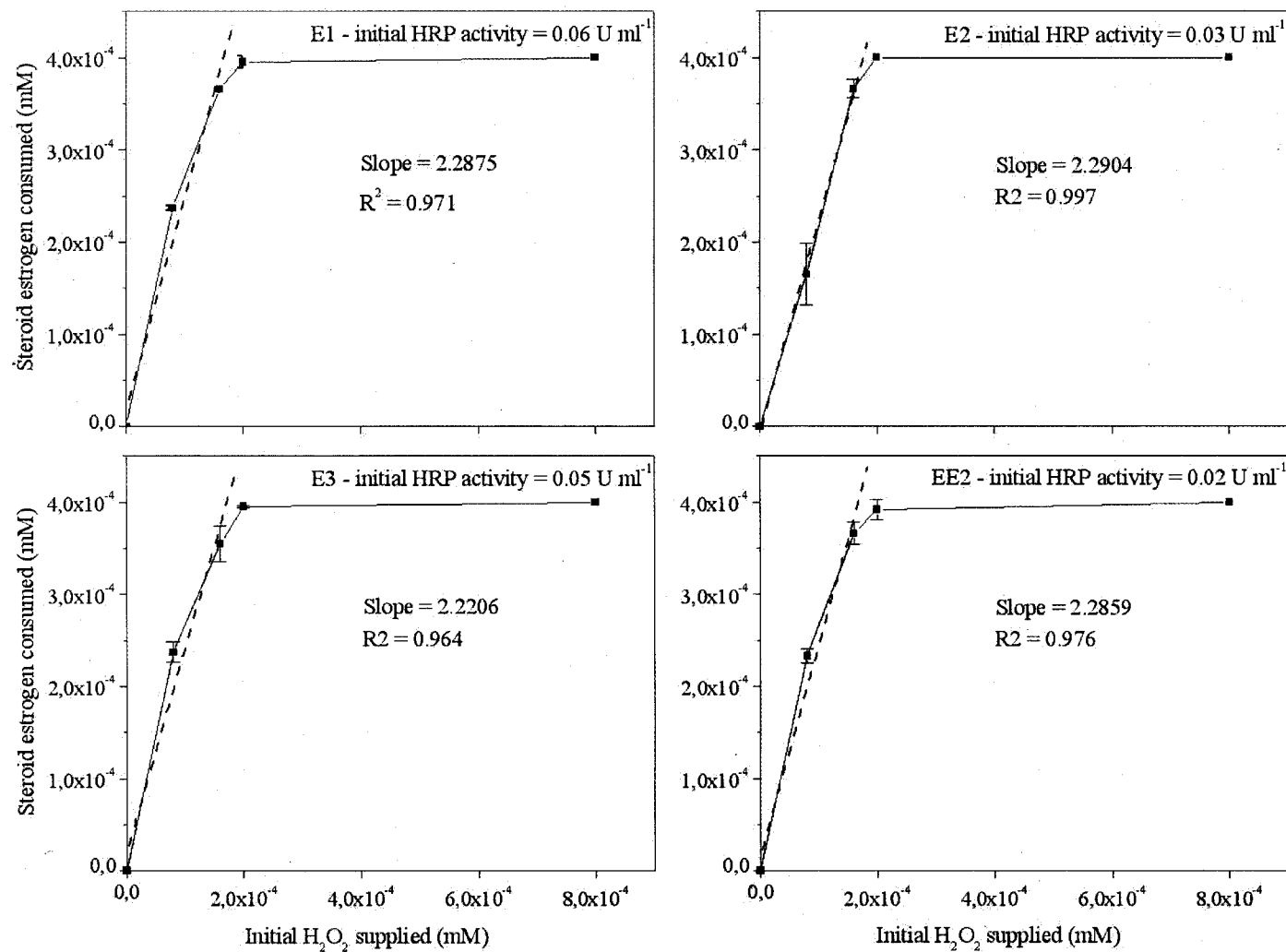


Figure 5.3 Effect of hydrogen peroxide on the oxidation by HRP of each steroid estrogen in synthetic water. Experimental conditions: 25±1 °C, pH 7.0, 400 nM estrogen.

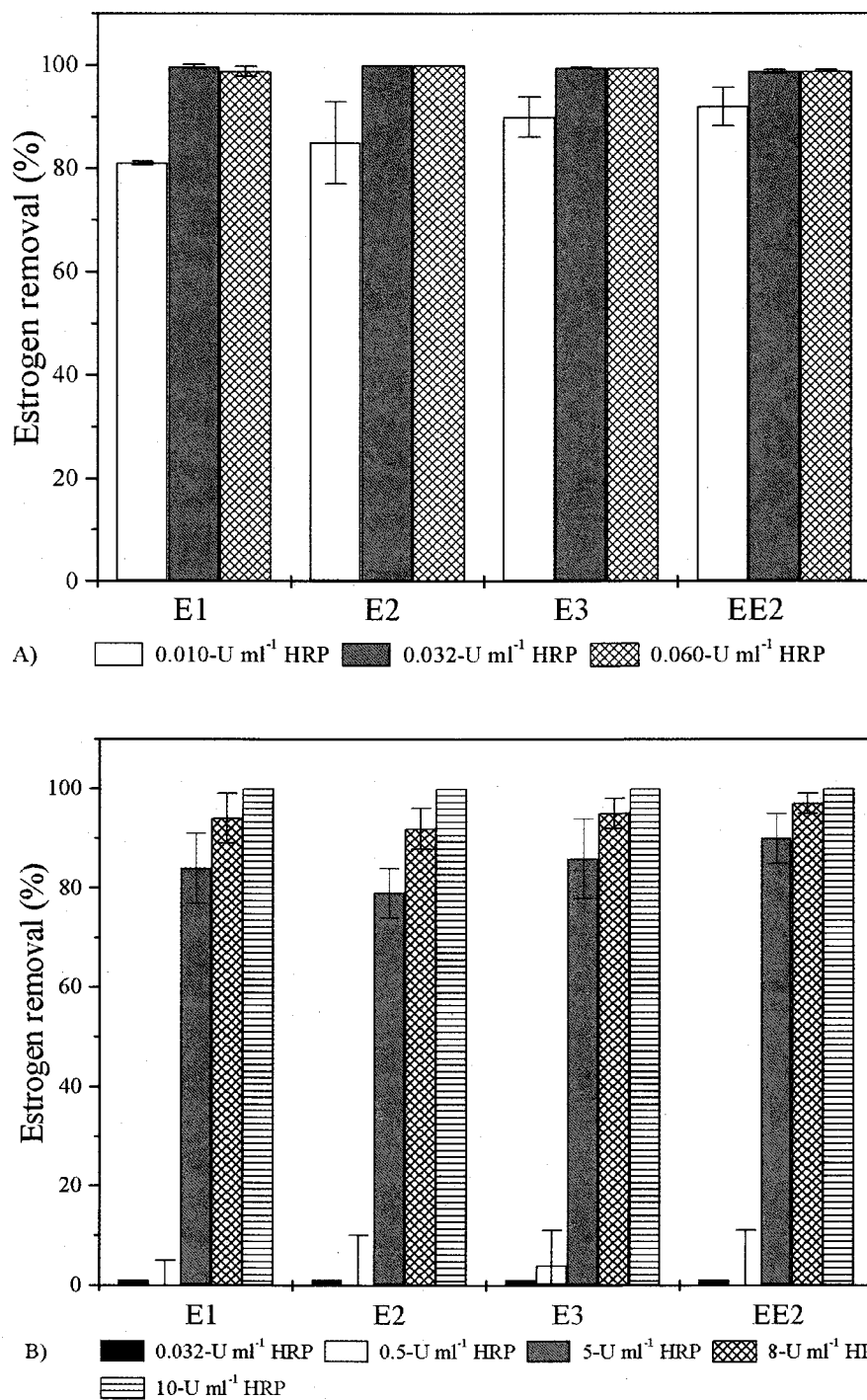


Figure 5.4 Steroid estrogens removed from synthetic water (A) and from municipal wastewater (B) as a function of initial HRP activity in 1-h batch treatment. Experimental conditions: 25±1 °C, pH 8.0, 0.4 nM estrogen, molar peroxide-to-substrate ratio of 0.5

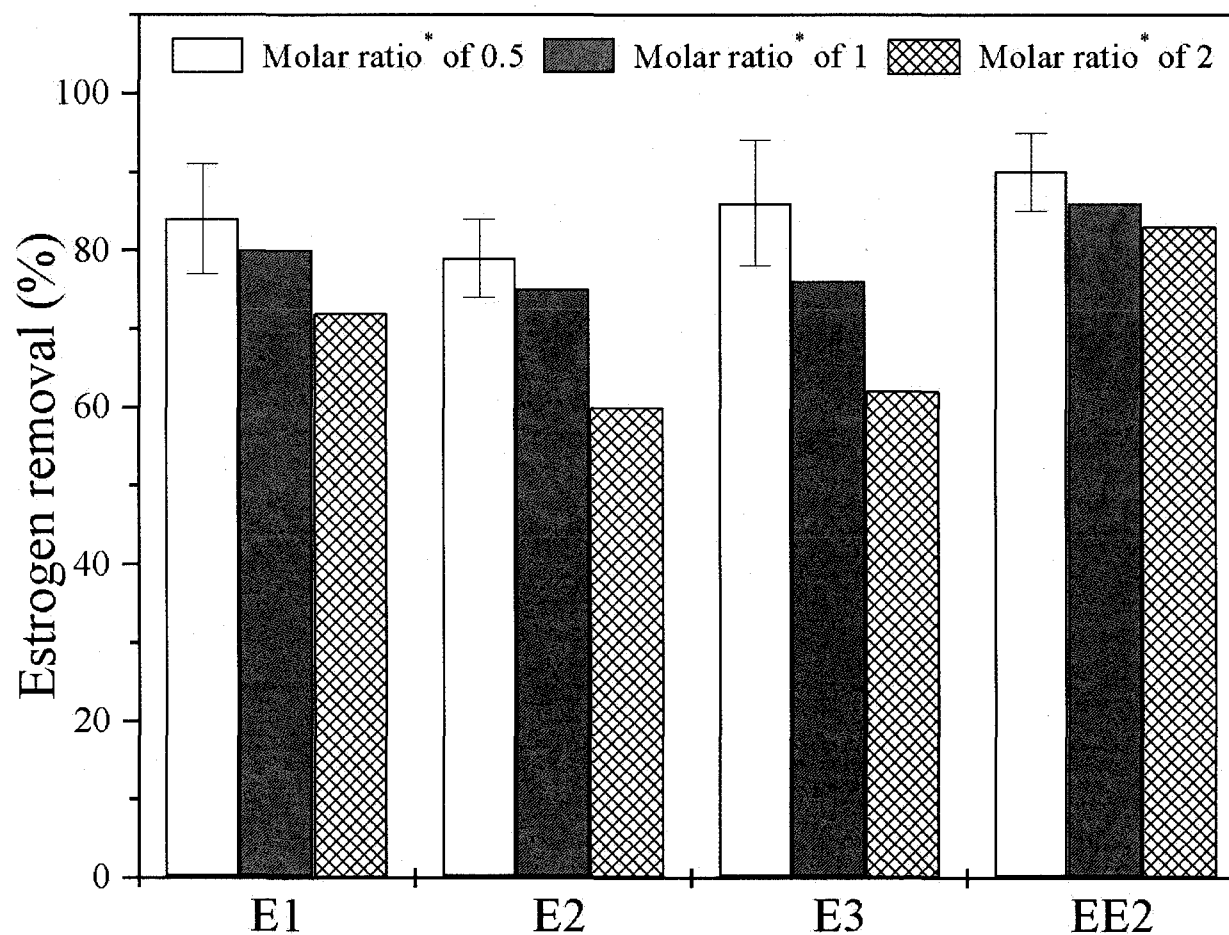


Figure 5.5 Steroid estrogens removed from municipal wastewater as a function of the hydrogen peroxide concentration in 1-h batch treatment with an initial HRP activity of 5 U ml⁻¹

Table 5.1 **Characteristics of filtered municipal wastewater used in the study**

Municipal wastewater	
Steroid estrogens	
E1 (ng l ⁻¹)	17.8
E2 (ng l ⁻¹)	15.8
E3 (ng l ⁻¹)	3.6
EE2 (ng l ⁻¹)	1.1
COD (mg l ⁻¹)	19.0
TOC (mg l ⁻¹)	10.5
pH	8.0 ± 0.5
Turbidity (NTU)	0.45
Metals	
Al (µg l ⁻¹)	13
Cu (µg l ⁻¹)	14.0
Zn (µg l ⁻¹)	65
Ba (µg l ⁻¹)	110.5
Fe (µg l ⁻¹)	180
Na (mg l ⁻¹)	117.1
Mg (mg l ⁻¹)	39.9
K (mg l ⁻¹)	7.8
Ca (mg l ⁻¹)	38.7

Table 5.2 **Experimental kinetics determination for the HRP-catalyzed reaction of each studied steroid estrogen at pH 7.0 and 25±1 °C**

	Reaction order (n)	Reaction rate constant (k_r) ($M^{-1} s^{-1}$)	Michaelis-Menten Model	
			K_M (μM)	V_{MAX} ($\mu g\ l^{-1}\ s^{-1}$)
E1	1.1357	1.56×10^6	7.47	20.08
E2	0.9000	2.80×10^6	1.44	3.19
E3	0.9929	2.40×10^6	5.25	13.00
EE2	0.9267	1.90×10^6	1.32	2.28

CHAPITRE VI

6 LACCASE-CATALYZED CONVERSION OF NATURAL AND SYNTHETIC HORMONES FROM A MUNICIPAL WASTEWATER

Le Chapitre 6 est constitué de l'article suivant : Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C. (2007). **Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater.** Accepted by *Water Research*.

6.1 Résumé

L'oxydation catalysée par l'enzyme laccase de *Trametes versicolor* des estrogènes naturels (estrone – E1 ; 17 β -estradiol – E2 ; et estriol – E3) et de l'estrogène synthétique (17 α -éthinyloestradiol – EE2) a été étudiée dans une solution synthétique et dans une eau usée municipale afin d'optimiser le procédé pour l'enlèvement des estrogènes stéroïdiens des eaux usées. Le pH optimal pour chaque estrogène étudié était approximativement égal à 6 en eau synthétique. Cette recherche s'est aussi focalisée sur l'effet de la matrice eau usée sur le traitement enzymatique développé. A pH 7.0 et 25 $\pm$ 1 °C, les expériences ont montré que le système enzymatique laccase pour l'enlèvement des estrogènes stéroïdiens n'était pas de façon significative affecté par la matrice d'eau usée municipale. L'activité en laccase de 20 U/mL était suffisante pour atteindre un enlèvement complet des estrogènes étudiés dans l'eau synthétique et l'eau usée. De plus, le produit chimique 1-hydroxy-benzotriazole (HBT), utilisé comme médiateur, a amélioré l'efficacité du traitement enzymatique, ainsi diminuant le coût global du traitement.

Mots clés : Estrogènes stéroïdiens, perturbateur endocrinien, laccase, étude cinétique, eau usée, HBT.

6.2 Abstract

The *Trametes versicolor*-derived laccase-catalyzed oxidation of natural estrogens (estrone – E1; 17 β -estradiol – E2; and estriol – E3) and the synthetic estrogen (17 α -ethinylestradiol – EE2) was studied in synthetic water and municipal wastewater to optimize the process for steroid estrogen removal in wastewater. The optimal pH for each studied steroid estrogen oxidation was approximately 6 in synthetic water. This research also focused on the wastewater matrix effect on the developed enzymatic treatment. At pH 7.0 and 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, the experiments showed that the laccase-catalyzed system for the removal of steroid estrogens was not significantly affected by the municipal wastewater matrix. Laccase activity of 20 U/ml was sufficient to achieve a complete removal of studied steroid estrogens in both synthetic water and municipal wastewater. Moreover, 1-hydroxy-benzotriazole (HBT), when used as mediator, improved the laccase-catalyzed system efficiency, thus decreasing the overall cost of the enzymatic system.

Keywords: steroid estrogen; endocrine disrupter; laccase; kinetic study; wastewater; HBT

6.3 Introduction

Public concern about the environmental impact of steroid estrogens has grown over the past decade due to their potential for disrupting endocrine systems of animals and humans (Colborn *et al.*, 1993; Auriol *et al.*, 2006a). These natural estrogens (estrone – E1; 17 β -estradiol – E2; and estriol – E3) and the synthetic estrogen (17 α -ethinylestradiol – EE2) have been frequently detected at various levels in surface waters due to their incomplete removal in municipal wastewater treatment plants (WWTP) (DEPA, 2002; Filali-Meknassi *et al.*, 2004). Moreover, they are considered as the major contributors to the estrogenic activity associated with wastewater treatment plant effluents (Gutendorf and Westendorf, 2001; Aerni *et al.*, 2004; Leusch *et al.*, 2005). In addition, steroid estrogens have been found to be biologically active at concentrations as low as 0.1 ng/l (Aerni *et al.*, 2004; Auriol *et al.*, 2006a).

In recent years, researchers have focused attention on the development of innovative treatment processes for estrogens. While removal of steroid estrogens from wastewater may be addressed by conventional treatment processes (e.g., chemical oxidation and adsorption on activated supports), these processes may generally present a number of disadvantages, such as high costs, time-consuming procedures, and formation of toxic residues (Nicell, 2003; Auriol *et al.*, 2006a). Biological technologies based on the catalytic actions of oxidoreductase enzymes may represent an efficient, alternative treatment process (Nicell and Wagner, 2003). Several oxidoreductase enzymes (e.g., peroxidases, polyphenol oxidases) have shown to be effective for the removal of aromatic compounds, such as phenols, nonylphenol, and bisphenol A (BPA). Although horseradish peroxidase (HRP) is one of the most studied and suitable enzymes in the relatively new area of enzymatic waste treatment (Nicell, 2003), the polyphenol oxidase enzyme, laccase, presents an important potential advantage over peroxidases. Specifically, laccase uses only dissolved molecular oxygen for catalytic activity, rather than hydrogen peroxide (H₂O₂) required for the HRP-catalyzed system. As H₂O₂ could cause inhibition and deactivation of the enzyme at large H₂O₂ doses, the use of laccase rather than HRP could offer advantages for the enzymatic oxidation of aromatic substrates (Aktas *et al.*, 2001). Several studies on the laccase-catalyzed treatment of phenolic compounds have been conducted that have demonstrated its efficiency (Fukuda *et al.*, 2001; Tsutsumi *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003; Tamagawa *et al.*, 2006; Kim and

Nicell, 2006a). Additionally, laccase might be produced via the use of less costly growth substrates (e.g., wastewater) that provide low-cost sources of enzymes (Ikehata *et al.*, 2004).

The primary purpose of this research was to establish the technical feasibility of laccase-catalyzed treatment of municipal wastewater contaminated by steroid estrogens (E1, E2, E3, and EE2). The six key objectives were: (1) to characterize, in synthetic water (purified deionized water), the effect of pH on laccase-catalyzed treatment efficiency; (2) to determine the affinity of laccase toward the different substrates (E1, E2, E3, and EE2); (3) to investigate steroid estrogens removal from a municipal wastewater with laccase; (4) to evaluate the impact of the wastewater matrix on the enzymatic system by comparing the treatment of real wastewater and synthetic water; (5) to study the mediator, 1-hydroxy-benzotriazole (HBT), to improve the enzymatic efficiency; (6) and to investigate the effect of the polyethylene glycol (PEG) as protective additive to minimize the potential inactivation of laccase by the formed polymers during enzymatic reaction.

The use of a mediator allows to maximize the efficacy of the enzyme by enhanced electrons transfer. In such a process, the enzymatic reaction becomes a two-step process, where the redox mediator first reacts with the laccase, generating a strongly oxidizing intermediate, followed by the oxidized mediator reacting with the substrate (Burton, 2003). Then, the mediator is returned to its original form. Furthermore, the use of protective additives has also been shown to be effective to minimize enzyme requirements in some studies (Kulys *et al.*, 2003; Kim and Nicell, 2006b). The main mechanism of enzyme inactivation corresponds to the entrapment of the enzyme by formed polymers. In the presence of highly hydrophilic additives, such as PEG, enzyme lifetime can be significantly improved. Specifically, protective additive may present a greater affinity than the enzyme for the hydroxyl groups on the growing polymers, and thus allowing the enzyme to remain in solution to catalyze further reactions (Cooper and Nicell, 1996).

6.4 Experimental section

6.4.1 Chemicals

Steroid hormone – E1 (CAS 53-16-7), E2 (CAS 50-28-2), E3 (CAS 50-27-1), and EE2 (CAS 57-63-6) – were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The internal standard 17 β -E2-d4 (17 β -estradiol-2,4,16,16-d4 – CAS 66789-03-5) was purchased from C/D/N Isotopes

(Quebec, Canada). Laccase (enzyme number EC 1.10.3.2) from *Trametes versicolor*, PEG with average molecular weight of 35k, and 2,2'-azinobis-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The mediator HBT (CAS 2592-95-2) was purchased from Sciencelab.com (Houston, TX, USA). Acetonitrile and methanol were reagent grade solvents and were supplied by Fisher Scientific (USA). Distilled water was further purified in a Milli-Q RG system (Millipore, Billerica, MA USA).

6.4.2 Synthetic water

Purified deionized water, containing specific estrogen concentrations, was prepared as needed by diluting the concentrated steroid estrogen stock solution with an appropriate amount of phosphate buffer (0.1 M).

6.4.3 Sampling site and collection

The wastewater effluent used in the study was collected from a settling basin effluent of an activated sludge process at a municipal WWTP at Rolla, Missouri (USA). The WWTP consisted of conventional treatment processes, including both activated-sludge and tricking-filter processes. The data on treatment processes and operations were as follow: average water inflow of 11,920 m³/d; an influent 5-day biochemical oxygen demand (BOD₅) of 120 mg/l; and an influent total suspended solids (TSS) of 100 mg/l. In the treated effluent, the BOD₅ and TSS were 6 and 5 mg/l, respectively. The pH value of the wastewater was 8.0 ± 0.5.

Wastewater samples were collected in amber glass bottles after field filtration with a 0.7-micrometer filter (Glass Microfibre filters (GF/C), Whatman). Samples were subsequently further filtered in the laboratory with a 0.45-micrometer filter (Millipore Durapore[®] Membrane Filters). The filtrate was stored at 4 °C until use within 48 h of collection. Wastewater characteristics for collected samples are listed in Table 6.1.

6.4.4 Enzyme assay

A colorimetric assay was used to quantify the activity of the laccase enzyme. This assay uses ABTS and was in accordance with the method of Fukuda *et al.* (2001). The reaction mixture consisting of 5.0-mM ABTS, 0.1-M oxygen-saturated sodium acetate buffer, pH 5.0, and a suitable amount of enzyme in a total volume of 1.0 ml was incubated at 37 °C. Oxidation of ABTS was followed by increase in absorbance at 420 nm with an extinction coefficient (ϵ) of

$3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme, which catalyzes the oxidation of 1 μmol of ABTS per min at 37 °C. To provide a measure of repeatability, the activity assay reactions were performed in triplicate and resulted in relative standard deviations (RSD) of triplicate measurements were always less than 3%.

6.4.5 Experimental protocol

The reactors were placed in a constant temperature water bath (Compact Low Temperature Circulator, RM6-S, LAUDA) maintained at 25 ± 1 °C with complete mixing accomplished using stir bars propelled by a magnetic stirrer. The solution was allowed to achieve thermal equilibrium with the water bath prior to reaction initiation. Moreover, the initial oxygen concentration was set to the saturation concentration by vigorously stirring the reaction mixture (i.e., steroid estrogen and buffer solution) before reaction initiation. The laccase stock solution was also stirred separately for a few minutes to allow the laccase solution to be fully-saturated with oxygen. Reactions were initiated by adding a measured aliquot of oxygen-saturated laccase stock solution. Tests were also conducted with samples without enzyme as controls.

6.4.5.1 Experiments conducted with synthetic water

The reaction mixture was prepared by dissolving stock solution of a single steroid estrogen to a concentration of 400 nM, in 0.1 M sodium phosphate buffer, with a pH adjustment from 5 to 9. Batch reactors, containing 35 ml of the buffered reaction mixture, were prepared at an initial laccase activity of 0.8 U/ml (except where other activities are cited in the text). This initial laccase activity was determined, at pH 7.0 and 25 ± 1 °C, to achieve a minimum removal of 90% for each steroid estrogen within 1-h treatment.

Aliquots of 0.5 ml were transferred into centrifuge tubes at preselected times, and immediately mixed with HCl solution to decrease the pH to 2, thereby stopping the reaction. Before processing each sample via the liquid-liquid extraction (LLE), the internal standard was added to each aliquot. Subsequently, 1 ml of methylene chloride was mixed in the sample to extract the analyte and the internal standard. The sample was then evaporated until dryness in a TurboVap under nitrogen stream. Finally, the dry samples were reconstituted with 1 ml of MeOH and vortexed for 5 s. The samples were kept in labeled glass amber vials under -25 °C until LC-MS analysis. For these experiments, the influence of the pH value (in the range 5–9) on the laccase-catalyzed treatment of each steroid estrogen was investigated. Additionally, a kinetic study was

conducted, at pH 7.0 and 25 ± 1 °C, to determine the affinity of the laccase to each studied compound.

Regarding the kinetic study, and, thus, for the determination of the initial reaction velocities, the experimental procedure was exactly the same as described previously, except that the 0.5-ml aliquots were taken at 10 s intervals over the first minute of reaction. To calculate the initial reaction velocity, a maximum of only 20-30% conversion of substrate to product was considered (Marangoni, 2002).

6.4.5.2 Experiments conducted with wastewater samples

In order to assess differences in treatment efficiency between synthetic water and municipal wastewater, parallel tests were performed with the same steroid estrogen concentration in each water. For both set of experiments (municipal wastewater vs. synthetic water), the feasibility of the laccase-catalyzed process was investigated at an environmentally-relevant estrogens concentration (i.e., ca. 100 ng/l).

Municipal wastewater was characterized in terms of pH, chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC), turbidity, and the main metals content (Table 6.1). The pH was measured using a Corning 430 pH meter. COD was measured using Hach Method 8000 (Hach, 1997). TOC was measured using a 5000A Total Organic Carbon Analyzer (Shimadzu, MD, USA). Turbidity was measured by a Hach model 2100P turbidimeter. A screening of possible laccase inhibitors was also conducted based on several studies that showed sulfide, nitrite, mercury, cyanide, chloride, and fluoride may inhibit the enzymatic reactions with laccase (Kim and Nicell, 2006a, 2006b). Metal concentrations were measured using a Model Elan DRC-e Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Perkin Elmer SCIEX, Concord, Ontario, Canada). The samples were prepared following EPA Standard Method 200.8. Chloride was measured using a DX-120 Ion Chromatograph with AS40 Auto-sampler. Sulfide, nitrite, cyanide, and fluoride were analyzed using Hach Method 8131, 8507, 8027, and 8029, respectively (Hach, 1997). Mercury was acquired with a Tekran Series 2600 Cold Vapor Atomic Florescence spectrophotometry (CVAFS). Municipal wastewater was also analyzed for steroid estrogens by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

The synthetic-water reaction mixture was prepared by dissolving stock solution of mixed steroid estrogens (E1, E2, E3, and EE2) to a concentration of 0.4 nM (~100 ng/l) in 0.1-M sodium

phosphate buffer, with a pH adjustment at pH 7.0. The wastewater reaction mixture was prepared by spiking the wastewater with an appropriate amount of steroid estrogens to provide a final concentration of 0.4 nM each estrogen. Experiments were conducted in batch reactors containing 1 liter of the buffered reaction mixture or wastewater. The reaction was initiated by addition of a measured aliquot of oxygen-saturated laccase stock solution.

After a 1-h treatment, the reaction solution was stopped through the addition of HCl solution. The reaction samples were then filtered through a 0.45- μ m filter and processed through the solid phase extraction (SPE), previously described by Filali-Meknassi *et al.* (2007). Then, the samples were kept in amber glass vials under -25 °C until LC-MS analysis.

Finally, the impact of the addition of a mediator (HBT) or a protective additive (PEG) on the developed enzymatic treatment was also investigated in wastewater samples. The purpose of these experiments was to enhance the enzymatic reaction, and thus leading to a potential reduction in the quantity of enzyme required. All experiments were conducted at pH 7.0 and 25 $\pm$ 1 °C. The impact of mediator was evaluated at HBT concentrations of 100 μ M. Concerning the effect of protective additive the experiments were performed with an initial PEG concentration of 50 mg/l.

6.4.6 Estrogen analysis

Estrogen concentrations were determined by single-quad LC-MS based on work from Filali-Meknassi *et al.* (2007). Liquid chromatography was carried out using an Agilent LC pump Series 1100 (Agilent, CA, USA) equipped with a standard autosampler injector (G1313). The analytes were chromatographically separated on a 150 $\times$ 4.6 mm i.d. column filled with 5 μ m (average particle size) C18(2) packing (Luna Phenomenex, MO, U.S.A.) and a precolumn Securityguard 4 $\times$ 3 mm i.d. supplied by Phenomenex. Analysis was carried out using acetonitrile as the mobile phase. Steroid estrogens analyses were performed by using an electrospray interface (ESI) in negative ion mode with an Agilent Model 1100 mass spectrometer (Agilent, CA, USA). Data processing was performed with the Target 4.1 software on a Windows workstation (ThermoQuest Thru-Put Software, FL, USA).

6.4.6.1 Estrogen analysis in synthetic water

The LC-MS method was based on work from Filali-Meknassi *et al.* (2007), with the exception of the pre-treatment procedure. In this study, the SPE described by Filali-Meknassi *et al.* (2007) was replaced by a liquid-liquid extraction (LLE), which has been detailed previously (Auriol *et al.*, 2007). The analytical performance of the LLE/LC-MS method was evaluated through various methods, including estimation of the recovery and the RSD of replicate analyses, as well as determination of method detection limits (MDL). Five-point calibration curves, ranging from 0–150 µg/l, were carried out for each compound using linear regression. Linearity was strong for all compounds with regression coefficients (R^2) of 0.990–0.999 achieved. Analyte recoveries were determined by adding known volumes of the working standard mixture to paired unspiked samples. Analyte recoveries ranged from 91–104% in all cases. The RSD was determined from a set of two water samples, each spiked at 30 µg/l of estrogen and analyzed seven times. For all the compounds, RSD was lower than 9%. MDLs were determined to be 0.21, 0.25, 0.14, and 0.19 µg/l for E1, E2, E3, and EE2, respectively.

6.4.6.2 Estrogen analysis in wastewater samples

The LC-MS analysis preceded by SPE was based on the work of Filali-Meknassi *et al.* (2007). Synthetic water and wastewater samples were extracted using C18- and NH2-cartridges. The analytical performance of the SPE/LC-MS method was evaluated by using determination of the recovery, the RSD of replicate analyses, and the MDL. Five-point calibration curves, ranging from 0–160 ng/l, were developed for each compound using linear regression. Linearity was strong for all compounds with R^2 of 0.990–0.999. Analyte recoveries for the SPE/LC-MS method in the WWTP matrix ranged from 91 to 101%. For all the compounds, RSD was lower than 12%. MDLs in Milli-Q samples were determined to be 0.59, 0.99, 0.99, and 1.32 ng/l for E1, E2, E3, and EE2, respectively. In wastewater samples, the MDLs were 3.00, 2.58, 1.74, and 2.69 ng/l for E1, E2, E3, and EE2, respectively.

6.5 Results and Discussion

6.5.1 Experiments conducted with synthetic water

Preliminary experiments showed that an initial laccase activity of 0.8 U/ml was sufficient to achieve 90% or higher removal of each compound (i.e., E1, E2, E3, and EE2) at a pH of 7.0 and

a temperature of 25 ± 1 °C, within 1 h of treatment. Thus, all further experiments described below were conducted with an initial enzyme activity of 0.8 U/ml, except where otherwise noted.

6.5.1.1 pH influence

In our work, the efficiency of the laccase-catalyzed system over a pH range from 5–9 was studied for E1, E2, E3, and EE2 removal at 25 ± 1 °C. The reaction time of all experiments was 1 h. Experimental results are shown in Fig. 6.1. All experiments were performed in duplicate at all pH values, with the resulting RSD for replicate experiments of less than 8%. From these results, it can be concluded that the optimum pH for laccase-catalyzed treatment was approximately 6 for each estrogen (Fig. 6.1). Moreover, the laccase-catalyzed reactions seem to be strongly pH-dependent as reported by Burton (2003). In fact, the laccase-catalyzed system has a stronger pH dependency than the HRP-catalyzed system for the oxidation of steroid estrogens (Auriol *et al.*, 2006b).

6.5.1.2 Kinetic study

A kinetic study was performed for each studied estrogen to determine essentially the affinity of the laccase to each compound. The experiments were conducted at pH 7.0 and 25 ± 1 °C.

Initial reaction rates (v_A) were estimated for initial estrogen concentrations varied from 100 to 500 nM (~30 to 150 µg/l), and were described by:

$$v_A = \left| \frac{d[A]}{dt} \right| = k_r [A]^n \quad (1)$$

where A represents an estrogen, k_r is the reaction rate constant, and n corresponds to the reaction order. For more accurate kinetic values, changes in the substrate concentration during the enzymatic reaction were measured over a short time period (60 s) at 10-s intervals.

Based on the results of these experiments, the laccase-catalyzed experiments exhibited a pseudo-first-order dependence on the steroid estrogen concentration, as demonstrated by the linear plot of $\log(v_A) = f(\log[A])$:

$$\log v_A = \log k_r + n \log [A] \quad (2)$$

All calculated reaction orders were nearly unity ($1.02 < n < 1.16$), and all R^2 values were greater than 0.90 (Table 6.2). The same plot allowed the estimation of the rate constant of the enzymatic reaction which ranged from $1.0(10^6)$ – $9.3(10^6)$ $M^{-1} s^{-1}$ (Table 6.2).

The kinetic study also showed that the experimental data was well characterized by the Michaelis-Menten equation:

$$v_A = \frac{V_{MAX}[A]}{K_M + [A]} \quad (3)$$

where v_A is the initial rate of conversion ($\mu g/l/s$) for each initial substrate concentration, V_{MAX} corresponds to the maximum reaction velocity which the reaction can achieve when the enzyme is saturated in substrate, and K_M is the Michaelis constant under the conditions used. A lower K_M value corresponds to a higher affinity of the enzyme for a substrate.

At pH 7.0 and 25 ± 1 °C, the K_M and V_{MAX} values were determined graphically using the Lineweaver-Burk method (Marangoni, 2002):

$$\frac{1}{v_A} = \frac{1}{V_{MAX}} + \left(\frac{K_M}{V_{MAX} \cdot [A]} \right) \quad (4)$$

Fig. 6.2 presents the Lineweaver-Burk plot of laccase-catalyzed reaction of each studied steroid estrogen at pH 7.0 and 25 ± 1 °C. The resulting K_M and V_{MAX} values for each estrogen are tabulated in Table 6.2. Based on the Michaelis-Menten kinetic analysis, the laccase seems to have approximately the same affinity for all the studied estrogens under the experimental conditions of the study (Table 6.2). Kim and Nicell (2006b) determined the K_M value for the laccase-catalyzed conversion of BPA. They reported a value of 690 μM for a laccase from *Trametes versicolor*, which indicates that laccase has a much greater affinity to react with the studied steroid estrogens than with BPA.

6.5.2 Experiments conducted with wastewater samples

Laccase from *Trametes versicolor* has a high redox potential (Kim and Nicell, 2006a), which makes it particularly attractive for wastewater treatment applications. The purpose of these experiments was to optimize the laccase-catalyzed system in a real municipal wastewater matrix.

6.5.2.1 *Municipal wastewater treatment*

For these experiments, the treatment efficiency between synthetic water and municipal wastewater was evaluated at environmentally-relevant concentrations of approximately 100 ng/l. All experiments were carried out at pH 7.0 and 25 ± 1 °C. Overall, 50% of the experiments were replicated to assess reproducibility. Preliminary studies were performed to determine the optimal initial laccase activity required to achieve nearly 100% removal of the four studied steroid estrogens from synthetic water within a 1-h treatment period. Thus, enzymatic treatment of a municipal wastewater was conducted at the same laccase doses in order to compare enzyme activity requirements, and also to evaluate the matrix effects. The results are reported in Fig. 6.3.

The experimental results showed that 20 U/ml of initial laccase activity was required to completely remove each estrogen from synthetic water within a 1-h treatment period (Fig. 6.3). In the case of EE2, only 15 U/ml of initial laccase activity was required to achieve 100% removal of EE2 (Fig. 6.3).

Despite the presence of organic compounds other than steroid estrogens and possible inhibitors, a complete removal of steroid estrogens mixture from the municipal wastewater sample was also achieved with an initial laccase activity of 20 U/ml (Fig. 6.3). Thus, these results suggest that the wastewater matrix constituents did not have a significant impact on the laccase-catalyzed treatment for the conversion of steroid estrogens (Fig. 6.3). Specifically, no larger initial laccase dosage was required to remove the same amount of estrogens from municipal wastewater as from synthetic water (Fig. 6.3). Therefore, the degree of reactivity toward laccase in wastewater matrix does not seem to be reduced. Furthermore, the potential laccase inhibitors (e.g., sulfide, nitrite, mercury, cyanide, chloride, and fluoride) in the wastewater were less than those suggested by Kim and Nicell (2006a and 2006b) to be inhibiting (Tables 6.1 and 6.3).

The laccase-catalyzed polymerization process proved to be very effective in eliminating the studied steroid estrogens from municipal wastewater. However, the absence of residual estrogenicity should be verified on the treated effluent even if similar studies demonstrated the removal of estrogenic activity of BPA and nonylphenol by laccase (Tsutsumi et al., 2001; Tanaka et al., 2003).

6.5.2.2 Performance with a mediator or a protective additive

Batch experiments were performed in wastewater matrix to verify the effect of HBT, as a mediator, and of PEG, as a protective additive. The conversion of the studied steroid estrogens in presence of HBT or PEG was compared to the conversion achieved when no mediator or protective additive was present. Consistent concentrations of 100 μ M for HBT and 50 mg/l for PEG were used.

As shown in Table 6.4, HBT improved the laccase-catalyzed treatment efficiency for the removal of steroid estrogens. The use of 100 μ M HBT allowed to achieve 93-100% conversion of steroid estrogens mixture within a 1-h treatment period using 2-4 times less initial laccase activity than when no HBT is present (Table 6.4). This shows the use of HBT as a mediator might allow a reduced initial laccase activity required to treat wastewater containing steroid estrogens, and, thus, a potential reduction in the treatment costs associated with the enzyme. Otherwise, with a same initial laccase activity lower retention time could be used when HBT is added, and thus the costs associated with reactor design could be reduced. However, HBT, as synthetic mediator, can present disadvantages in terms of toxicity (Johannes and Majcherczyk, 2000; Saba and Nakano, 2003). To avoid this probable inconvenient natural mediators and mediators derived from natural compounds could be used.

Concerning the PEG addition, a high concentration of 50 mg/l (Kim and Nicell, 2006b) was used to verify if PEG may protect laccase against inactivation occurring by the by-products during the catalytic treatment. The experimental results summarized in Table 6.4 show that no better removal was achieved in the presence of PEG. Thus, under the experimental conditions PEG appears not to enhance the laccase-catalyzed system for the conversion of the studied steroid estrogens, although some studies reported that PEG presents some protective effect for laccase-catalyzed system treating aqueous solution of BPA (Modaressi *et al.*, 2005; Kim and Nicell, 2006b). This difference could be explained by the fact that the PEG impact would be much more effective when treating high concentrations of contaminants, which is not the case in our study. Indeed, at high contaminants concentration the amount of formed polymeric precipitates and the tendency to interact with the enzyme are higher (Kim and Nicell, 2006b).

6.6 Conclusion

This study demonstrated that the removal of steroid estrogens from municipal wastewater is technically feasible by a catalyzed system with laccase from *Trametes versicolor*. The results showed that pH has a significant influence on the laccase-catalyzed treatment efficiency. The conversion of the studied estrogens (E1, E2, E3, and EE2) by laccase seemed to follow the Michaelis-Menten kinetics, and laccase appeared to have the same approximate affinity towards each steroid estrogen. Moreover, the experiments at typical environmental steroid estrogen concentrations showed that wastewater constituents did not exert a significant effect on the laccase-catalyzed estrogen removal. Finally, the addition of HBT improves significantly the efficiency of laccase-catalyzed system for steroid estrogens removal and thus reduces the treatment cost.

6.7 Acknowledgments

The authors thank especially Pr. James Nicell for his advice and suggestions. Financial support was provided by a grant from the “Institut national de la recherche scientifique” (INRS), by the Environmental Research Center for Emerging Contaminants (UMR), and the John and Susan Mathes Chair Fellowship.

6.8 References

- Aerni, H.-R., Kobler, B., Rutishauser, B.V., Wettstein, F.E., Fischer, R., Giger, W., Hungerbühler, A., Marazuela, M.D., Peter, A., Schönenberger, R., Vogeli, A.C., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (3), 688–696.
- Aktas, N., Cicek, H., Ünal, A.T., Kibarar, G., Kolankaya, N., Tanyolaç, A., 2001. Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphtol. *Bioresource Technol.* 80 (1), 29-36.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2006a. Endocrine disrupting compounds removal from the wastewater treatment plant, a new challenge. *Process Biochem.* 41(3), 525-539.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C.D., Tyagi, R.D., 2006b. Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: temperature and pH effects. *Water Res.* 40 (15), 2847-2856.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., 2007. Oxidation of natural and synthetic hormones by the horseradish peroxidase enzyme in wastewater. *Chemosphere* (doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.03.045).
- Burton, S.G., 2003. Laccases and phenol oxidases in organic synthesis – a Review. *Current Organic Chem.* 7, 1-15.
- Colborn, T., Vom Saal, F.S., and Soto, A.M., 1993. Developmental Effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Persp.* 101 (5), 378-384.
- Cooper, V.A., Nicell, J.A., 1996. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Res.* 30, 954-964.
- Danish Environmental Protection Agency (DEPA), 2002. Feminisation of Fish - The Effect of Estrogenic Compounds and their Fate in Sewage Treatment Plants and Nature. Danish Environmental Protection Agency, Environment Minister, Denmark, Environmental project no 729. 184.

- Filali-Meknassi, Y., Auriol, M., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2007. Quantification of steroid sex hormones using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Water Environ. Res.* 79 (doi: 10.2175/106143007X156781).
- Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Barata, C., Riva, M.C., 2004. Endocrine disrupting compounds in wastewater, sludge treatment processes and receiving waters: overview. *Practice Period. Hazard. Toxic Radioact. Waste Manage.* 8 (1), 1–18.
- Fukuda, T., Uchida, H., Takashima, Y., Uwajima, T., Kawabata, T., Suzuki, M., 2001. Degradation of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*. *Biochemical Biophysical Res. Communications* 284 (3), 704-706.
- Gutendorf, B., Westendorf, J., 2001. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166 (1&2), 79–89.
- Ikehata, K., Buchanan, I.D., Smith, D.W., 2004. Recent developments in the production of extracellular fangal peroxidases and laccases for waste treatment. *J. Environ. Eng. Sci.* 3 (1), 1-19.
- Johannes, C., Majcherczyk, A., 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied Environ. Microbiol.* 66 (2), 524-528.
- Kim, Y.-J., Nicell, J.A., 2006a. Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. *Bioresource Technol.* 97 (12), 1431-1442.
- Kim, Y.-J., Nicell, J.A., 2006b. Laccase-catalyzed oxidation of bisphenol A with the aid of additives. *Process Biochem.* 41 (5), 1029-1037.
- Kulys, J., Vidziunaite, R., Schneider, P., 2003. Laccase-catalyzed oxidation of naphthol in the presence of soluble polymers. *Enzyme Microbial Technol.* 32 (3-4), 455-463.
- Leusch, F.D.L., Chapman, H.F., Körner, W., Gooneratne, S.R., Tremblay, L.A., 2005. Efficacy of an Advanced Sewage Treatment Plant in Southeast Queensland, Australia, to Remove Estrogenic Chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 39 (15), 5781-5786.
- Marangoni, A.G., 2002. *Enzyme Kinetics—a Modern Approach*. Wiley, Wiley-Interscience, Chichester, p. 248.

- Modaressi, K., Taylor, K.E., Bewtra, J.K., Biswas, N., 2005. Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: Protective effect of PEG on enzyme activity. *Water Res.* 39 (18), 4309-4316
- Nicell and Wagner, 2003. Peroxidase-catalyzed oxidation of phenols in industrial wastewaters. In: A. Sakurai (Ed). *Wastewater Treatment Using Enzymes*. Kerala, India: Research Signpost pp. 93-124.
- Nicell, J.A., 2003. Enzymatic treatment of waters and wastes. In: M.A. Tarr (Ed). *Chemical Degradation Methods for Wastes and Pollutants: Environmental and Industrial Applications*. New York, NY: Marcel Dekker Inc. pp. 423-475.
- Saba, H., Nakano, M., 2003. Oxidation of triacylglycerol by laccase-natural mediator and laccase-mediator derived from natural compound systems. *J. Oleo Sci.* 52 (3), 159-166.
- Suzuki, K., Hirai, H., Murata, H., Nishida, T., 2003. Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res.* 37 (8), 1972–1975.
- Tamagawa, Y., Yamaki, R., Hirai, H., Kawai, S., Nishida, T., 2006. Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* 65 (1), 97-101.
- Tanaka, T., Nose, M., Endo, A., Fujii, T., Taniguchi, M., 2003. Treatment of Nonylphenol with Laccase in a Rotating Reactor. *J. Biosci. Bioeng.* 96 (6), 541-546.
- Tsutsumi, Y., Haneda, T., Nishida, T., 2001. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42 (3), 271-276.

Table 6.1 **Characteristics of filtered municipal wastewater used in the study**

Compound	Municipal wastewater
Steroid estrogens	
E1 (ng/l)	33.15
E2 (ng/l)	25.3
E3 (ng/l)	6.2
EE2 (ng/l)	6.25
COD (mgO ₂ /l)	39
TOC (mgC/l)	15.5
pH	8.0± 0.5
Turbidity (NTU)	1.2
Metals	
Cu (µg/l)	19.85
Cd (µg/l)	3.51
Fe (µg/l)	179.15
Na (mg/l)	167.98
Ca (mg/l)	31.44
Mercury (Hg – ng/l)	15
Sulfide	ND ^a
Nitrite (mg/l NO ₂ -N)	0.393
Chloride (mM Cl)	7.13
Fluoride (mM F ⁻)	0.05
Cyanide (mg/l CN ⁻)	0.002

^aND: Not detectable, concentration bellow detection limit.

Table 6.2 **Experimental kinetics determination for the laccase-catalyzed reaction of each studied steroid estrogen at pH 7.0 and 25±1 °C**

Compound	Reaction	Reaction Rate	Michaelis-Menten Model	
	Order (n)	Constant (k_r) ($M^{-1} s^{-1}$)	K_M (μM)	V_{MAX} ($\mu M/s$)
E1	1.0749	1.00×10^6	3.4	1.08
E2	1.1602	1.87×10^6	3.99	3.26
E3	1.0227	1.29×10^6	2.65	0.85
EE2	1.041	9.28×10^6	3.78	0.89

Reaction conditions: 25±1 °C, pH 7.0, 100-500 nM estrogen, 0.8 U/ml laccase.

Table 6.3 **Chemical concentrations reported as inhibiting the laccase-catalyzed conversion of BPA (Adapted from Kim and Nicell, 2006a)**

Chemical	Concentration
Sulfide (mg/l)	20
Nitrite (mg/l NO ₂ -N)	>100
Chloride (mM Cl)	200
Fluoride (mM F ⁻)	25
Cyanide (mg/l CN ⁻)	0.7
Reaction conditions: 25±1 °C, pH 5.0, 120 µM BPA 0.15 U/ml laccase from <i>Trametes versicolor</i> .	

Table 6.4 The effect of HBT or PEG presence on steroid estrogens conversion (%) in wastewater matrix

	Estrogen Conversion (%)						
	Init. laccase = 5 U/ml			Init. laccase = 10 U/ml			Init. laccase = 20 U/ml
	None	PEG	HBT	None	PEG	HBT	None
E1	77	72	94	90	87	100	100
E2	59	52	94	67	74	100	100
E3	88	85	95	91	90	100	100
EE2	82	78	93	84	95	100	100

Reaction conditions: 25±1 °C, pH 7.0, 0.4 nM estrogen.
100 µM HBT or 50 mg/l PEG, with a reaction time of 1 h.

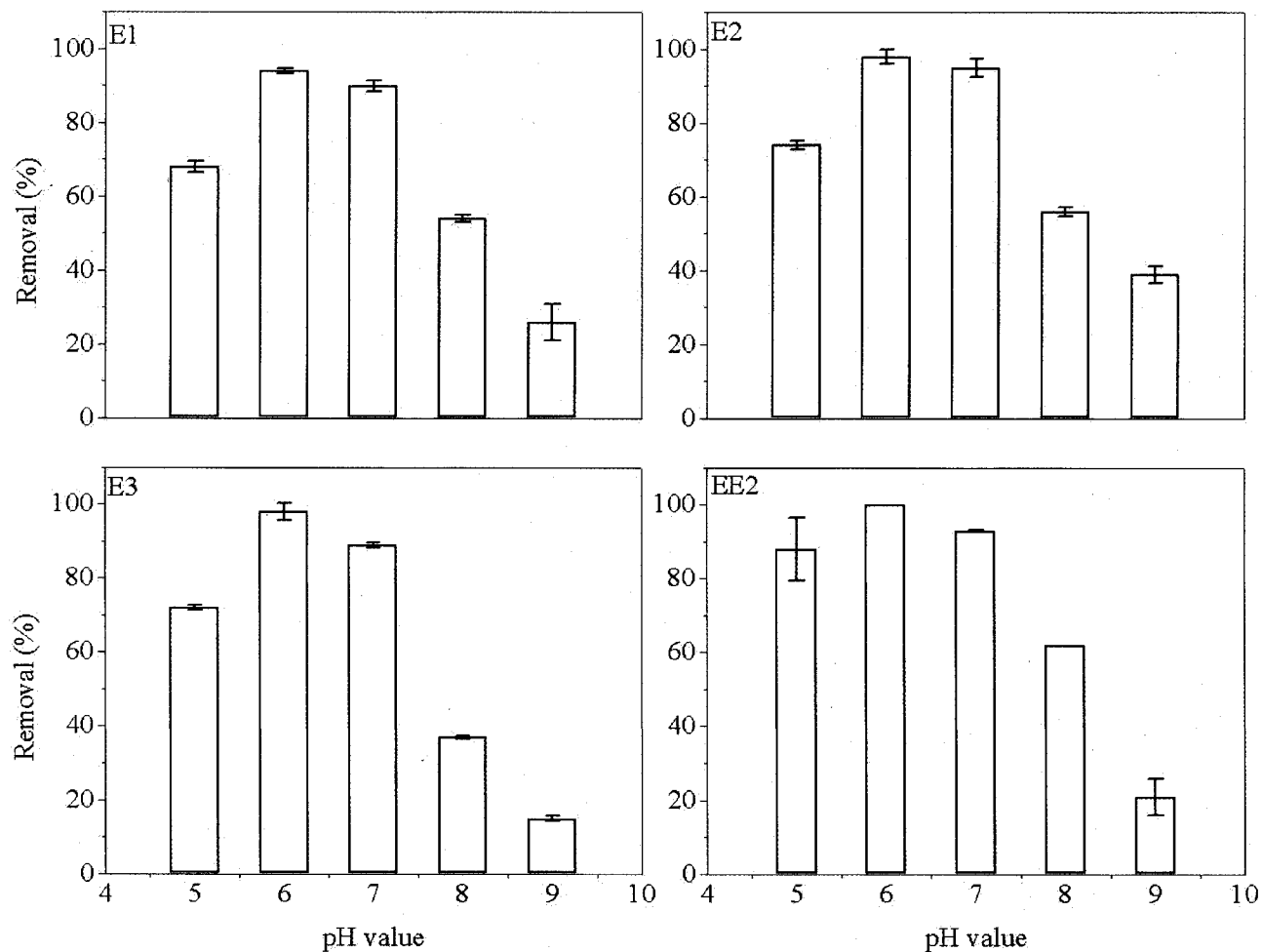


Figure 6.1 Laccase-catalyzed removal of E1, E2, E3, and EE2 as a function of pH at 25 ± 1 °C for pH 4–9. Error bars represent the standard deviation, if no error bars are represented thus the standard deviation was null. Reaction conditions: initial laccase activity of 0.8 U/ml, 1-h reaction time

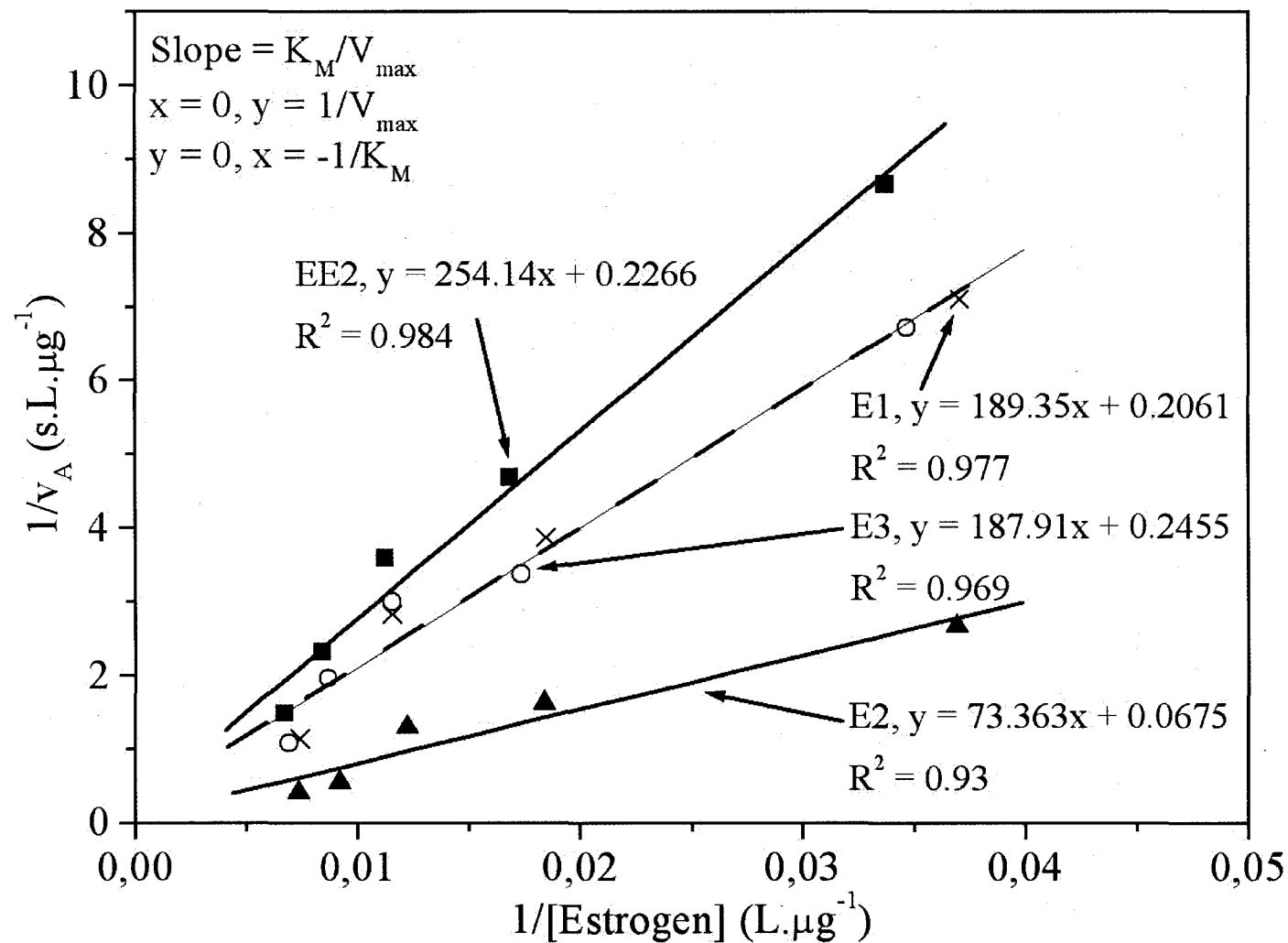
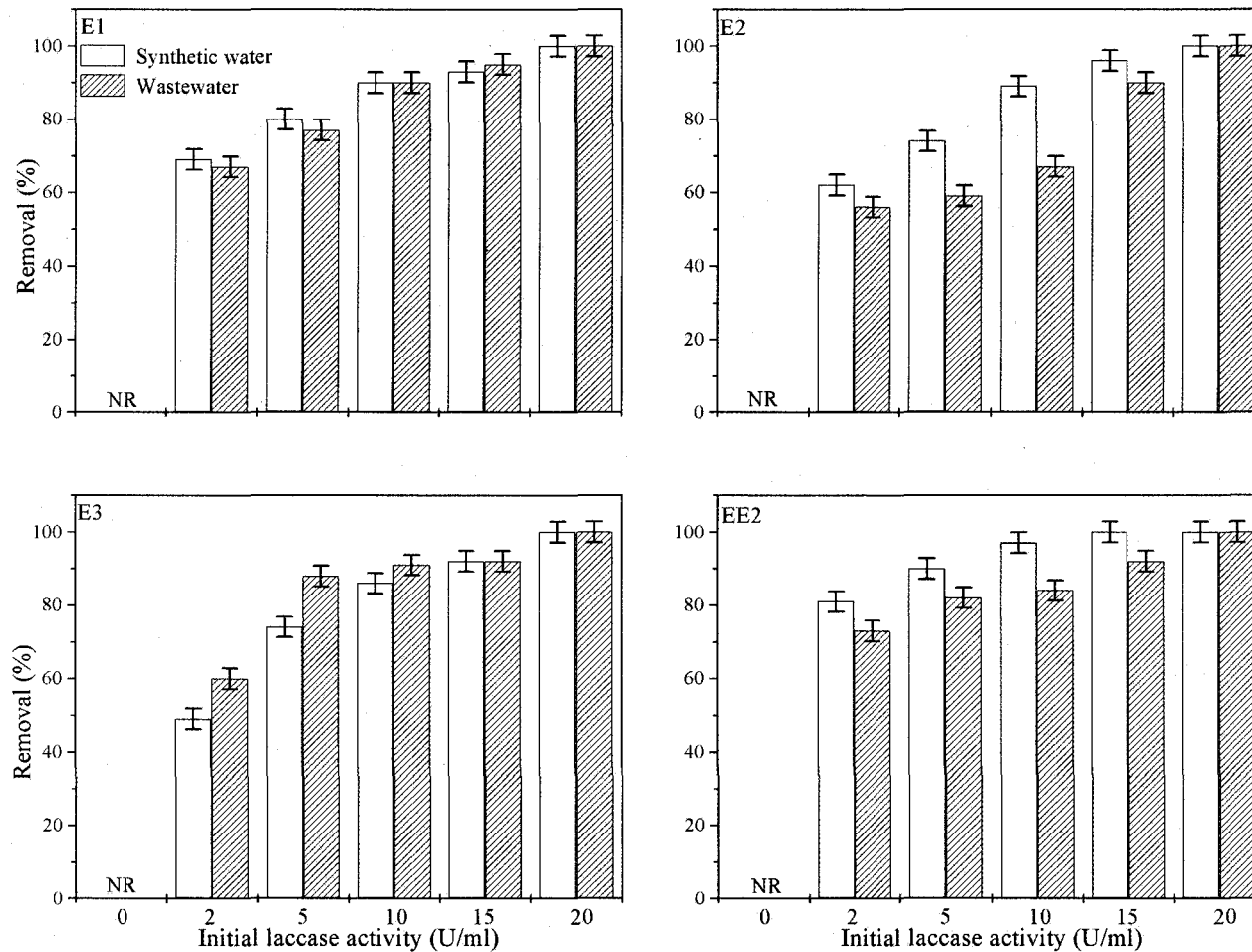


Figure 6.2 Linear plot used in determining the catalytic parameters $V_{\max}$ and K_M of the laccase-catalyzed system of EE2 at pH 7.0 and 25 ± 1 °C (Initial laccase activity of 0.8 U/ml)



NR = No Removal

Figure 6.3 Initial laccase activity required to completely oxidize a mixture of E1, E2, E3, and EE2 in synthetic water and wastewater at pH 7.0 and at 25 ± 1 °C. 50% of experiments were replicated and error bars represent the average RSD of the replicated experiments

CHAPITRE VII

7 REMOVAL OF ESTROGENIC ACTIVITY OF NATURAL AND SYNTHETIC HORMONES FROM A MUNICIPAL WASTEWATER: EFFICIENCY OF HORSERADISH PEROXIDASE AND LACCASE FROM *TRAMETES VERSICOLOR*

Le Chapitre 3 est constitué de l'article suivant : Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C., Noguerol T.-N., Piña, B. (2007). **Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *trametes versicolor*.** Submitted for publication to *Chemosphere*.

7.1 Résumé

Les activités estrogéniques résiduelles ont été étudiées après l'oxydation enzymatique par la peroxydase de raifort (HRP) et la laccase de *Trametes versicolor* des principaux estrogènes synthétiques et naturels. Une eau synthétique et une eau usée municipale contaminées par l'estrone (E1), le 17 β -estradiol (E2), l'estriol (E3) et le 17 α -éthinyloestradiol (EE2) à des concentrations environnementales ont été traitées. Les analyses à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) ont démontré que les estrogènes étudiés ont été complètement enlevés de l'eau usée en une heure de traitement avec la HRP (8-10 U/mL) ou la laccase (20 U/mL). Utilisant les essais aux levures recombinantes (RYA), il a aussi été confirmé que les deux systèmes enzymatiques étudiés ont été très efficaces pour enlever les activités estrogéniques associées aux estrogènes étudiés. Comparé au système de la HRP, le procédé catalytique avec la laccase semble présenter de plus grands avantages pour les applications dans le traitement de l'eau usée municipale.

Mots clés : perturbateur endocrinien, laccase, HRP, estrogénicité, eau usée

7.2 Abstract

The residual estrogenic activities of the key natural and synthetic steroid estrogens were investigated following enzymatic treatment with horseradish peroxidase (HRP) and laccase from *Trametes versicolor*. Synthetic water and municipal wastewater containing environmental concentrations of estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), and 17 α -ethinylestradiol (EE2) were treated. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) analysis demonstrated that the studied steroid estrogens were completely oxidized in the wastewater reaction mixture after a 1-h treatment with either HRP (8–10 U ml⁻¹) or laccase (20 U ml⁻¹). Using the recombinant yeast assay (RYA), it was also confirmed that both enzymatic treatments were very efficient in removing the estrogenic activity of the studied steroid estrogens. In comparison with HRP-catalyzed system, laccase-catalyzed process seemed to present great advantages over HRP-catalyzed system for applications in municipal wastewater treatment.

Keywords: endocrine disrupter; laccase; HRP; estrogenicity; wastewater

7.3 Introduction

A frequent source of known endocrine disrupting chemicals (EDC), such as natural and synthetic steroid estrogens (e.g., estrone – E1; 17 β -estradiol – E2; estriol – E3; and 17 α -ethinylestradiol – EE2) has been shown to be wastewater treatment plants (Körner *et al.*, 2000; Layton *et al.*, 2000; Kolpin *et al.*, 2002; DEPA, 2002; Auriol *et al.*, 2006a). Thus, their release into the environment can be harmful to aquatic organisms, even if present at concentrations as low as 0.1 ng l⁻¹ (DEPA, 2003; Auriol *et al.*, 2006a). There is recent interest in the enzymatic treatment process, especially horseradish peroxidase (HRP) and fungal laccase, due to their recognized potential for oxidizing recalcitrant environmental pollutants such as phenols (Wagner and Nicell, 2003; Gianfreda *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005), alkylphenols (Sakuyama *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003; Wagner and Nicell, 2005), bisphenol A (BPA) (Huang and Weber, 2005; Kim and Nicell, 2006a,b), and steroid estrogens (Suzuki *et al.*, 2003; Auriol *et al.*, 2006b,c; Filali-Meknassi *et al.*, 2006; Tamagawa *et al.*, 2006).

Once oxidized by hydrogen peroxide (H₂O₂), HRP goes from its native state through two catalytically active forms, before returning to the native form. During this catalytic cycle, HRP can oxidize two hazardous phenolic substrates. Laccase, a multicopper oxidase, catalyzes the one electron oxidation of four aqueous phenolic compounds by reducing molecular oxygen into water. The use of dissolved molecular oxygen in support of laccase's catalytic activity is an important advantage over HRP, which use hydrogen peroxide as an oxidant (Akatas *et al.*, 2001).

The by-products of both HRP and laccase treatment are polymerized through a non-enzymatic process which can lead, depending on substrate concentration, to the formation of high molecular weight polymers of low solubility, that can be easily removed from wastewater by co-precipitation, sorption to solids, sedimentation or filtration (Nicell, 2003).

Little data are available in the literature on the removal of steroid estrogens from real wastewater treatment by enzymatic systems, combined with the disappearance of their corresponding estrogenicity. Therefore, the objective of this study was to look at the removal of estrogenicity associated with the studied steroid estrogens (E1, E2, E3, and EE2) from a municipal wastewater (at Rolla, MO, USA) by HRP- and laccase-catalyzed processes. In this study, the assessment of estrogenicity, before and after enzymatic treatment, was carried out using the functional recombinant yeast assay (RYA). RYA consists of an engineered yeast strain in which the

transcription of a reporter gene depends upon the presence in the medium of compounds capable of binding to the human estrogen receptor (ER) (Garcia-Reyero et al., 2001). This is a simplified version of the mechanism by which natural estrogens operate in vertebrates; the fundamental similarity of all eukaryotes ensures that it also works in yeast in a similar way. Moreover, a kinetic study was carried out to compare the affinity of both enzymes towards studied estrogens and to determine their efficiency to remove the studied compounds.

7.4 Experimental section

7.4.1 Chemicals

Steroid hormone (E1, E2, E3, and EE2) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The internal standard 17β -E2-d4 (17β -estradiol-2,4,16,16-d4) was purchased from C/D/N Isotopes (Quebec, Canada). Laccase (enzyme number EC 1.10.3.2) from *Trametes versicolor*, HRP (enzyme number EC 1.11.1.7), catalase-agarose (enzyme number EC 1.11.1.6), and hydrogen peroxide solution (H_2O_2 , 30%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chemicals for colorimetric enzyme assay, 2,2'-azinobis-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), phenol (purity >99.5%), and 4-Aminoantipyrine (AAP, purity 98%), were also purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile and methanol were reagent grade solvents and were supplied by Fisher Scientific (USA). Distilled water was further purified in a Milli-Q RG system (Millipore, Billerica, MA USA).

7.4.2 Synthetic water and wastewater

Purified deionized water, containing specific estrogen concentrations ($\sim 100 \text{ ng l}^{-1}$), was prepared as needed by diluting the concentrate estrogen stock solution with an appropriate amount of phosphate buffer (0.1 M).

The wastewater effluent used in the study was sampled from a settling reactor effluent of an activated sludge process at a municipal WWTP at Rolla, Missouri (USA). The collection and process steps of wastewater samples were as described by Auriol et al (2006b). Municipal wastewater was characterized in terms of pH, chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC), turbidity, and the main metals content, and it was also analyzed for steroid estrogens by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (Table 1). The specific analytical methods used were detailed in a previous study (Auriol et al., 2006c). The wastewater

reaction mixture was prepared by spiking the wastewater with appropriate amounts of estrogens mixture to provide a final concentration of 0.4 nM each estrogen ($\sim 100 \text{ ng l}^{-1}$).

7.4.3 Enzyme assay

Colorimetric assays were used to quantify the activity of both enzymes: the assay with AAP was used to determine the HRP activity (Auriol et al., 2006b) and the assay based on the oxidation of ABTS to establish the laccase activity (Auriol et al., 2006c). To provide a measure of repeatability, the activity assay reactions were performed in triplicate. Relative standard deviations (RSD) of triplicate measurements were always less than 5% for laccase assay and less than 6% for HRP assay.

7.4.4 Experimental protocol

Experiments were conducted in batch amber-glass reactors containing 1 liter of the buffered reaction mixture or wastewater. The batch reactors were placed in a constant temperature water bath (Compact Low Temperature Circulator, RM6-S, LAUDA) maintained at $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ with complete mixing accomplished using stir bars propelled by a magnetic stirrer. The solution was allowed to achieve thermal equilibrium with the water bath, prior to reaction initiation.

In the case of the laccase-catalyzed system, the initial oxygen concentration in the reactor was set to the saturation concentration by vigorously stirring the reaction mixture (i.e., steroid estrogen and buffer solution or wastewater) before reaction initiation. The laccase stock solution was also stirred separately for a few minutes to allow the laccase solution to be fully-saturated with oxygen. Reactions were initiated by adding a measured aliquot of oxygen-saturated laccase stock solution. All experiments performed with laccase were carried out at pH 7.0. Concerning the HRP-catalyzed system, the reaction was initiated by the addition of 0.8 nM of H_2O_2 , corresponding to a molar peroxide-to-substrate ratio of 0.5, based on results obtained by Auriol et al. (2006c) and Filali-Meknassi et al. (2006). The oxidation of steroid estrogens by HRP was conducted at pH 8.0.

In order to assess differences in treatment efficiency between synthetic water and municipal wastewater, parallel tests were performed with the same steroid estrogen concentration in each water and for both enzymes. For all experiments (municipal wastewater vs. synthetic water), the

feasibility of the enzymatic process was investigated at an environmentally-relevant steroid estrogen concentration (i.e., ca. 100 ng l⁻¹).

After reaching the target reaction time, the enzymatic reaction was stopped through the addition of HCl solution for the laccase-catalyzed system, or catalase for the HRP-catalyzed system. The reaction samples were then filtered through a 0.45-μm filter and processed through the solid phase extraction (SPE), previously described by Filali-Meknassi et al. (2007). Then, the samples were kept in amber glass vials, under -25 °C, until LC-MS or RYA analysis. In the case of chemical analysis, the internal standard (17β-E2-d4) was added before SPE procedure. No internal standard was included for estrogenic activity tests.

For the kinetic study, the reaction mixture was prepared by dissolving stock solution of a single steroid estrogen to an initial concentration that varied from 100 to 500 nM (~30 to 150 μg l⁻¹) in 0.1 M sodium phosphate buffer, with an adjustment at pH 7. Experiments were conducted in batch reactors containing 35 ml of the buffered solution. Aliquots of 0.5 ml were taken from the reactor into centrifuge tubes at 10 s intervals over a short time period of 60 s for more accurate determinations. To calculate the initial reaction velocity, a maximum of 20–30% conversion of the substrate to the product was considered (Marangoni, 2002). All these kinetic experiments were performed in duplicate.

7.4.5 Estrogens analysis

Detailed descriptions of the analytical method used for analysis of estrogens have been illustrated elsewhere (Auriol et al., 2006b; Filali-Meknassi et al., 2007). Analysis of the extracts from SPE was carried out by LC-MS. Recovery was better than 91% in wastewater samples and 99–104% in purified water (DI) (Filali-Meknassi et al., 2007).

7.4.6 Yeast strains and plasmids

Yeast strain BY4741 (MATa *ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0*) –from EUROSCARF, Frankfurt, Germany– was transformed with plasmids pH5HE0 and pVitBX2 as described elsewhere (Garcia-Reyero et al., 2001). Expression plasmid pH5HE0 contains the human estrogen hormone receptor HE0 (Green and Chambon, 1991) cloned into the constitutive yeast expression vector pAAH5 (Schneider and Guarente, 1991). The reporter plasmid pVITB2x contains two copies of the pseudo-palindromic estrogen responsive element ERE2 from *X. laevis* vitellogenin B1 gene

(5'-AGTCACTGTGACC-3') inserted into the unique *KpnI* site of pSFLΔ-178K (Garcia-Reyero et al., 2001).

7.4.7 Estrogenic activity test

Transformed clones were first grown in 2 ml of rich media (YPD) o/n at 30 °C. Then, they were grown overnight in minimal medium (6.7 g l⁻¹ yeast nitrogen base without amino acids, DIFCO, Basel, Switzerland; 20 g l⁻¹ glucose, supplemented with 0.1 g l⁻¹ of prototrophic markers as required). The final culture was adjusted to an optical density (OD) of 0.1 and split into 75 µl in the first row and 50 µl in the other wells of a siliconized 96-well polypropylene microtiter plate (NUNCTM, Roskilde, Denmark).

A serial dilution scheme was performed by dispensing each sample into wells on the first row (which contained 75 µl of culture). Serial dilutions were made by sequentially transferring 25 µl from the previous well to the next one; at the end, all wells contained 50 µl and different dilutions of the samples, with dilution factors 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 and 1:810. Positive controls were made by adding 17β-estradiol at a final concentration of 10 nM. Moreover, a toxicity control was included by adding 10 nM of 17β-estradiol to a sample with a dilution factor of 1:30. Plates were incubated for 6 h at 30 °C under mild shaking. After incubation, 50 µl of Y-PERTM (PIERCETM, Rockford, IL, USA) were added to each well and further incubated at 30°C for 30 min. Afterwards, 50 µl of assay buffer were added to the lysed cells. The assay buffer was prepared by mixing 100 ml Z-buffer, 1 ml Triton X-100 (Sigma), 1 ml SDS 10%, 70 µl 2-mercaptoethanol (Fluka) and 21 mg of 4-methylumbelliferyl β-D-Galactoside (Sigma). Z-Buffer is a mix of: 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl and 1mM MgSO₄, pH 7.0. After brief centrifugation, plates were read in a Victor3 Wallac spectrofluorometer (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA), at 355 nm excitation and 460 nm emission wavelengths. Fluorescence was recorded for 15–20 min (one measurement per min); β-galactosidase activity values were calculated as rates of the increment of arbitrary fluorescence units with time, using standard linear regression methods. Estrogenicity values are reported as ng l⁻¹ estradiol equivalents (EEQ). These values were calculated by adjusting β-galactosidase values from serial dilutions of each sample to the Hill equation by non-linear methods, as previously described (Quirós et al., 2005; Noguerol et al., 2006). The limit of detection (LOD) of this bioassay (without considering SPE preconcentration factor) was determined to be 34 pM (9 ng l⁻¹) EEQ (Noguerol et al., 2006).

7.5 Results and Discussion

Several tests were conducted to verify the possible substrate volatilization and its spontaneous conversion. No removal of steroid estrogens was observed without an enzyme (laccase or HRP). Moreover, no removal of steroid estrogens was achieved in the presence of either H_2O_2 alone or HRP alone (results not shown). Therefore, in the case of the HRP-catalyzed system, the removal of steroid estrogens can be attributed to the combined action of HRP and H_2O_2 .

7.5.1 Analytical results

Two enzymatic treatments, HRP and laccase, were applied in order to remove steroid estrogens from municipal wastewater effluent. Experiments were conducted in parallel in synthetic water and municipal wastewater. All enzymatic reactions were stopped after a 1-h treatment period. The results are reported in Figures 1 and 2. The following observations were made based on the experimental results (Auriol et al., 2007a, 2007b):

- No larger initial laccase dosage was required to remove the same amounts of steroid estrogens from municipal wastewater as from synthetic water;
- 20 U ml^{-1} of initial laccase activity was required to completely remove the steroid estrogen mixture from both synthetic water and wastewater within a 1-h treatment period;
- The treatment of municipal wastewater by HRP, containing the studied steroid estrogens mixture, required more initial HRP activity than the treatment of the synthetic water did;
- An HRP dose of $8\text{--}10 \text{ U ml}^{-1}$ was required to completely remove all of the studied estrogens, while only 0.032 U ml^{-1} of HRP was necessary to treat synthetic water containing the same estrogen concentrations (Figure 2).

Thus, the LC-MS analytical results showed that both enzymatic processes allow the complete removal of the steroid estrogens mixture (E1, E2, E3, and EE2) from municipal wastewater, although HRP-catalyzed system did clearly seem to be more affected by the matrix nature for the estrogens removal than did the laccase-catalyzed system. The difference on the efficiency obtained for the treatment of wastewater vs. synthetic water for the HRP system could be explained by the fact that HRP firstly oxidises other organic compounds (such as phenols, alkylphenols, BPA) present in wastewater before oxidising estrogens, which are present in wastewater at lower

concentrations than the above mentioned compounds. Indeed, HRP is known to be very effective to remove such aromatic compounds (Wagner and Nicell, 2003; Huang et al., 2005; Wagner and Nicell, 2005; Huang and Weber, 2005). In the case of the laccase system, the enzyme may present more affinity for estrogen than other aromatic compounds. For example, Kim and Nicell (2006b) reported, for BPA oxidation by laccase, a Michaelis coefficient (K_M) of 690 μM , whereas Auriol et al. (2007) reported values between 2.65–3.99 μM for estrogens oxidation. However, these hypotheses have to be verified in further studies.

7.5.2 Estrogenicity experiments

Both catalyzed polymerization processes proved to be very effective in eliminating the studied steroid estrogens from municipal wastewater. However, the greatest focus concerning the removal of estrogenic EDCs from wastewater should be the residual estrogenicity after any treatment process. Thus, the main purpose of this research was to address this issue by characterizing the treated effluent in terms of its acute estrogenic toxicity.

For the estrogenic activity tests, the initial laccase activity was 20 U ml^{-1} for the treatment of both synthetic water and wastewater samples, and the initial HRP activity was 0.032 U ml^{-1} and 10 U ml^{-1} for the treatment of synthetic water and of wastewater samples, respectively. According to the LC-MS results (Figures 1 and 2), these initial activities of enzymes correspond to the optimal activities required to achieve a complete removal of each steroid estrogen (i.e. final concentrations below detection limits) within a 1-h treatment. In the case of HRP-catalyzed system, the experiments were performed with a molar peroxide-to-substrate ratio of 0.5.

Figure 3 shows the residual estrogenic activity in the samples after laccase- and HRP-catalyzed treatment as a function of time. Synthetic water samples proved to be very sensitive to both treatments: a 1-h treatment with laccase completely eliminated the estrogenic activity of the sample, while HRP treatment reduced estrogenicity by 98% in the same period of time; this figure increased to more than 99% after 5 hours of treatment (Figure 3). LC-MS analysis showed that, after a 1-h HRP-catalyzed process, the residual estrogens concentrations were below the detection limits (0.59–1.32 ng l^{-1}). Thus, the fact that 2% of the estrogenic activity remained after a 1-h treatment may be due to residual traces of estrogens and the synergic phenomena between the four estrogens that remained in solution. This finding is consistent with previous studies (Suzuki et al., 2003; Tamagawa et al., 2006), which reported good removal of

estrogenicity associated with E1, E2 and EE2 by MnP- and laccase-catalyzed treatment (Table 2).

Regarding the treatment of wastewater samples, laccase- and HRP-catalyzed systems reduced the estrogenic activity by 97% and 88%, respectively, after a 1-h treatment. The laccase-catalyzed treatment completely removed the estrogenic activity after an 8-h treatment, while some activity remained in the HRP-treated sample after a 5-h treatment (Figure 3). The residual estrogenic activity after treatment could be attributed either to residual estrogens concentration or, more likely, to unidentified estrogenic compounds present in the wastewater itself (such as pesticides, phenols, alkylphenols, BPA) (Céspedes, 2004). These results corroborate the feasibility of removal of estrogenic activity by both laccase and HRP treatments, although they suggest that laccase has higher efficiency both in clean (synthetic water) and complex (wastewater) samples.

7.5.3 Kinetic study

The purpose of the kinetic research was to evaluate and compare the affinity of both enzymes (Laccase and HRP) towards steroid estrogens as well as their substrate specificity. All experiments were performed at pH 7 and 25 ± 1 °C. The main parameters of these experiments (initial enzyme activity, H_2O_2 dose, estrogen concentrations) are shown in Table 3. The order reaction of both enzymatic reactions was reported elsewhere (Auriol et al., 2006c; Filali-Meknassi et al., 2006). Based on experimental results, both catalyzed systems exhibited a pseudo-first-order dependence on the steroid estrogen concentration. For all reaction compounds, regression coefficients (R^2) were greater than 0.96. Furthermore, the experimental data obtained with HRP and laccase was well characterized by the Michaelis-Menten equation, and thus the Michaelis constant (K_M) values could be determined graphically for both enzymatic systems by the Lineweaver-Burk analysis (Table 4).

K_M represents the affinity of the enzyme to its substrate and when the K_M value is low, the affinity is high. Based on the Michaelis-Menten kinetic analysis (Table 4), the enzyme HRP shows more affinity for E2 and EE2, than laccase, at optimal pH (7.0) and 25 ± 1 °C. However, laccase seems to have more affinity towards the substrate E1 and E3 than HRP. Globally, both enzymes present the same order of magnitude as for K_M values (1.32–7.47).

Another kinetic parameter, k_{cat} , can be determined from these experiments (Table 4). k_{cat} corresponds to the oxidation rate, i.e. the effective first-order rate constant for the breakdown of the enzyme-substrate complex of free by-product and free enzyme (Marangoni, 2002). The k_{cat} -to- K_M ratio represents the catalytic efficiency (Table 4). Thus, if an enzyme A for a same substrate S presents a higher ratio than an enzyme B, then the substrate S is more specific for the enzyme A than for the enzyme B. At pH 7.0 and 25 ± 1 °C the enzyme HRP present higher ratios for each studied estrogen. Thus, HRP seems to be more efficient for removing estrogens than laccase (Table 4).

These experiments were performed in purified water (synthetic water). Since the wastewater compounds had a significant effect on the removal of estrogens and their associated estrogenicity for HRP-catalyzed process (Figure 2), and had no effect for laccase-catalyzed system (Figure 1), the comparative kinetic study should be performed in a real wastewater to consider this catalytic difference. This study was beyond the scope of the research.

7.6 Conclusion

The HRP- and laccase-catalyzed polymerization processes have proven to be very effective at reducing estrogen concentrations from municipal wastewater. Furthermore, estrogenicity measurements, after reaching the target reaction time, showed that both HRP and laccase cause the detoxification of wastewater contaminated by estrogens to a relevant level with regard to the endocrine effects on aquatic organisms. A low estrogenic activity, which could be still present in treated aqueous solutions, depending on reaction time, may be attributed to residual estrogen concentrations in solution (below LC-MS detection limits), synergic effects, and also to the estrogenic activity of the wastewater compounds (other than estrogens).

Using laccase, the residual estrogenic activity was slightly lower compared to the same experiments using HRP. In addition, laccase required oxygen as an oxidant, which is comparatively much less expensive than the hydrogen peroxide required by peroxidase enzymes. The kinetic study showed that HRP and laccase present the same kind of affinity for the studied estrogens, even though, in synthetic water, the HRP-catalyzed system seemed to be more efficient in removing estrogens than did the laccase-catalyzed system. Moreover, laccase did not seem to be affected by the wastewater constituents although the estrogen removal by HRP was

significantly affected by these constituents. From a point of view of cost effectiveness, laccase may present important advantages over HRP for applications in municipal wastewater treatment.

7.7 Acknowledgments

Financial support was provided by the Environmental Research Center for Emerging Contaminants (UMR), and the John and Susan Mathes Fellowship. The support by the Spanish Ministry for Science and Technology (BIO2005-00840) is also acknowledged.

7.8 References

- Aktas, N., Cicek, H., Ünal, A.T., Kibarar, G., Kolankaya, N., Tanyolaç, A., 2001. Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphtol. *Bioresource Technol.* 80, 29-36.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2006a. Endocrine disrupting compounds removal from the wastewater treatment plant, a new challenge. *Process Biochem.* 41, 525-539.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C.D., Tyagi, R.D., 2006b. Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: temperature and pH effects. *Water Res.* 40, 2847-2856.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C.D., Tyagi R.D., 2006c. Laccase and Horseradish Peroxidase in Oxidation Of The Synthetic Steroid Estrogen. 17 α -ethinylestradiol. In: *Proceedings of the International Water Association (IWA). Biennial World Water Congress, Beijing, China, September 9-14, 2006.*
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., 2007a. Oxidation of natural and synthetic hormones by the horseradish peroxidase enzyme in a wastewater. *Chemosphere* (doi. 10.1016/j.chemosphere.2007.03.045).
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., 2007b. Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. Accepted by *Water Research*.
- Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, U., Piña, B., Lacorte, S., Viana, P., and Barceló, D., 2004. Integrated protocol for the determination of endocrine disrupting activity in the surface waters and sediments using biological techniques by recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 687-708.
- DEPA (Danish Environmental Protection Agency), 2002. *Feminisation of Fish - The Effect of Estrogenic Compounds and their Fate in Sewage Treatment Plants and Nature.* Environmental Project No 729, Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment.

- DEPA (Danish Environmental Protection Agency), 2003. Evaluation of Analytical Chemical Methods for Detection of Estrogens in the Environment. Working Report No. 44, Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment.
- Filali-Meknassi, Y., Auriol, M., Adams, C.D., Tyagi, R.D., 2006. Removal of steroid Estrogens From a municipal wastewater by the enzyme horseradish peroxidase. In: Proceedings of the International Water Association (IWA). Biennial World Water Congress, Beijing, China, September 9-14, 2006.
- Filali-Meknassi, Y., Auriol, M., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2007. Quantification of steroid sex hormones using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Water Environ. Res.* 79 (doi. 10.2175/106143007X156781).
- Garcia-Reyero, N., Grau, E., Castillo, M., López de Alda, M., Barceló, D., Piña, B., 2001. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1152–1158.
- Gianfreda, L., Sannino, F., Rao, M.A., Bollag, J.-M., 2003. Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. *Water Res.* 37, 3205-3215.
- Green, S., Chambon, P., 1991. The oestrogen receptor: From perception to mechanism. In Parker, M.G., ed, *Nuclear Hormone Receptors*. Academic, London, UK, pp 15-38.
- Huang, Q., Tang, J., Weber Jr, W.J., 2005. Precipitation of enzyme-catalyzed phenol oxidative coupling products: Background ion and pH effects. *Water Res.* 39, 3021-3027.
- Huang, Q., Weber Jr, W.J., 2005. Transformation and removal of bisphenol a from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions: Efficacy, products, and pathways. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6029-6036.
- Kim, Y.-J., Nicell, J.A., 2006a. Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. *Bioresource Technol.* 97, 1431-1442.
- Kim, Y.-J., Nicell, J.A., 2006b. Laccase-catalyzed oxidation of bisphenol A with the aid of additives. *Process Biochem.* 41, 1029-1037.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in

- US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202-1211.
- Körner, W., Bolz, U., Süßmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V., Hagenmaier, H., (2000). Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 40, 1131-1142.
- Layton, A.C., Gregory, B.W., Seward, J.R., Schultz, T.W., Sayler, G.S., 2000. Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee USA. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3925-3931.
- Marangoni, A.G., 2002. *Enzyme Kinetics – A Modern Approach*. John Wiley & Sons, Ltd, Wiley-Interscience, Chichester.
- Nicell, J.A., 2003. Enzymatic treatment of waters and wastes. In: Tarr, M.A. (Ed.). *Chemical Degradation Methods for Wastes and Pollutants: Environmental and Industrial Applications*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 423-475.
- Noguerol, T.-N., Boronat, S., Jarque, S., Barceló, D., Piña, B., 2006. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta*, 69, 351-358.
- Quirós, L., Céspedes, R., Lacorte, S., Viana, P., Raldúa, D., Barceló, D., Piña, B., 2005. Detection and evaluation of endocrine-disruption activity in water samples from Portuguese rivers. *Environ. Tox. Chem.* 24, 389-395.
- Sakuyama, H., Endo, Y., Fujimoto, K. and Hatano, Y., 2003. Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase. *J. Bioscience Bioeng.* 96, 227-231.
- Schneider, J.C., Guarente L., 1991. Vectors for expression of cloned genes in yeast: Regulation, overproduction, and underproduction. *Methods in Enzymology* 194, 373-388.
- Suzuki, K., Hirai, H., Murata, H., Nishida, T., 2003. Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res.* 37, 1972-1975.
- Tamagawa, Y., Yamaki, R., Hirai, H., Kawai, S., Nishida, T., 2006. Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* 65, 97-101.

- Tanaka, T., Nose, M., Endo, A., Fujii, T., Taniguchi, M., 2003. Treatment of Nonylphenol with Laccase in a Rotating Reactor. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 541–546.
- Vandertol-Vanier, H.A., 2000. The role of laccase from *coriolopsis gallica* in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. Master Thesis, University of Alberta, Department of Biological Sciences, pp. 193.
- Wagner, M., Nicell, J.A., 2003. Impact of the presence of solids on peroxidase-catalyzed treatment of aqueous phenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 694-702.
- Wagner, M., Nicell, J.A., 2005. Evaluation of horseradish peroxidase for the treatment of estrogenic alkylphenols. *Water Qual. Res. J. Canada* 40, 145-154.

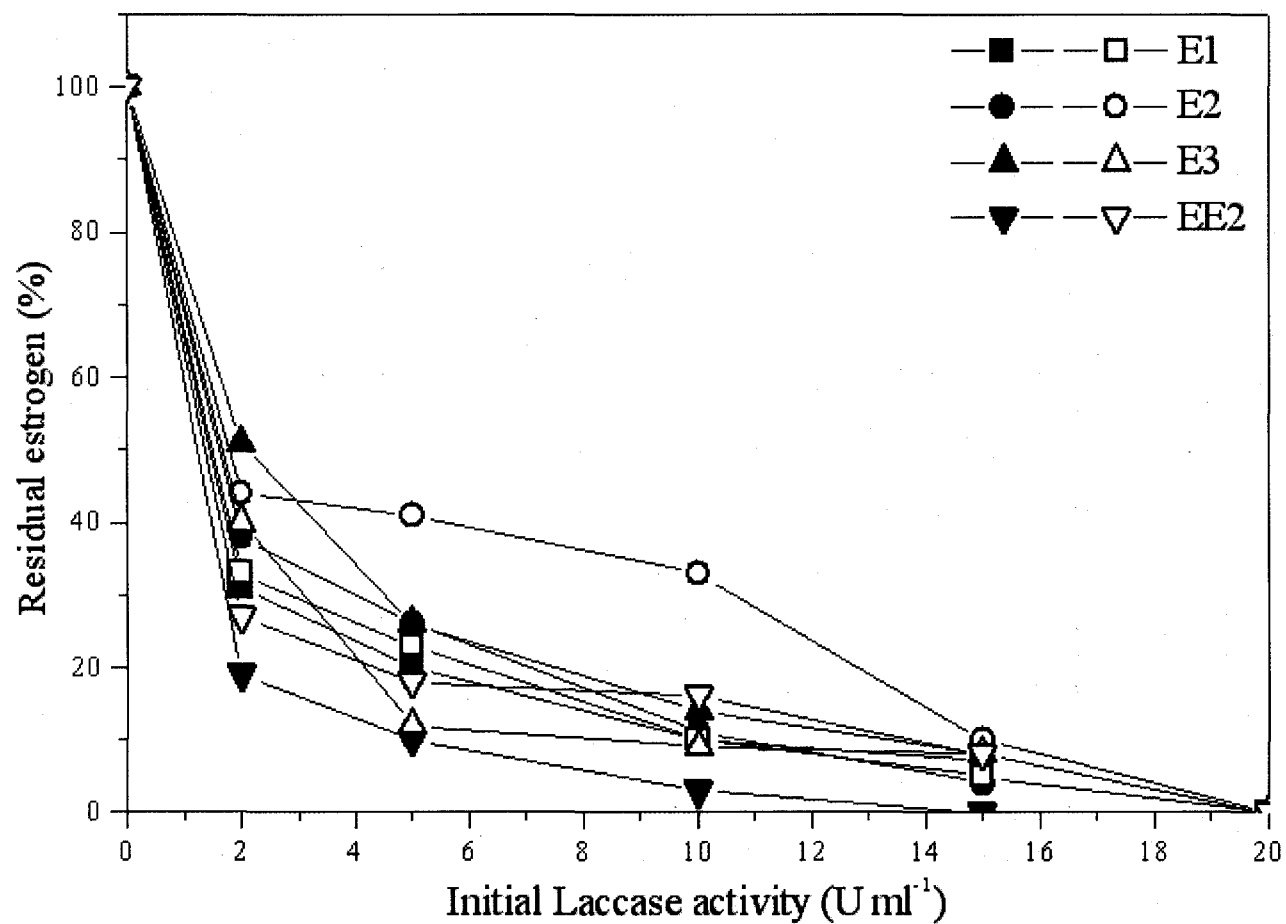


Figure 7.1 Decrease in estrogen concentration by laccase-catalyzed process. Solid symbols correspond to synthetic water treatment, and open symbols to wastewater treatment. Reaction conditions: pH 7.0, 25±1 °C, initial estrogen concentration of 0.4 nM, reaction time of 1 h

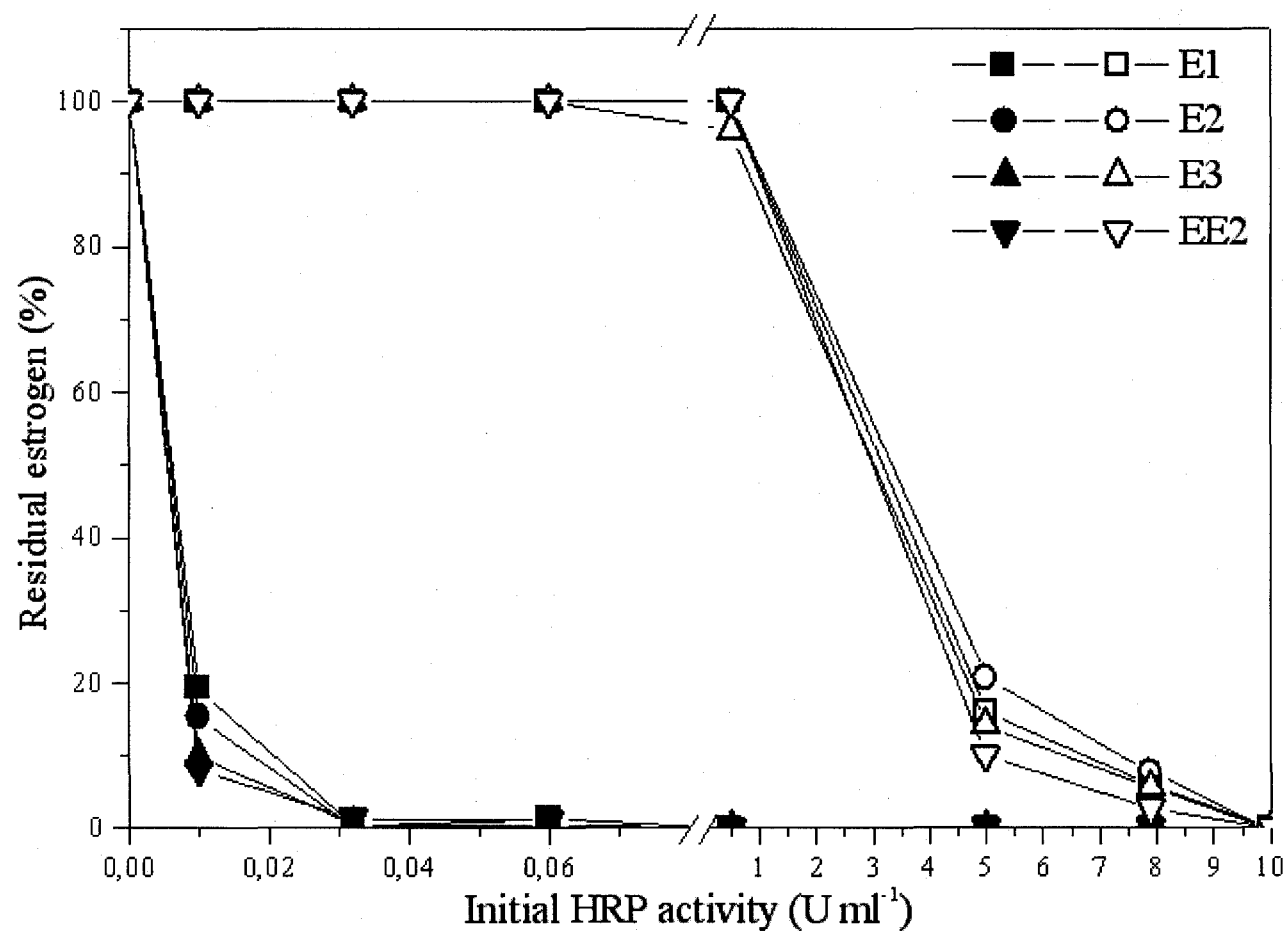


Figure 7.2 Decrease in estrogen concentration by HRP-catalyzed process. Solid symbols correspond to synthetic water treatment, and open symbols to wastewater treatment. Reaction conditions: pH 8.0, 25±1 °C, initial estrogen concentration of 0.4 nM, molar peroxide-to-substrate ratio of 0.5, reaction time of 1 h

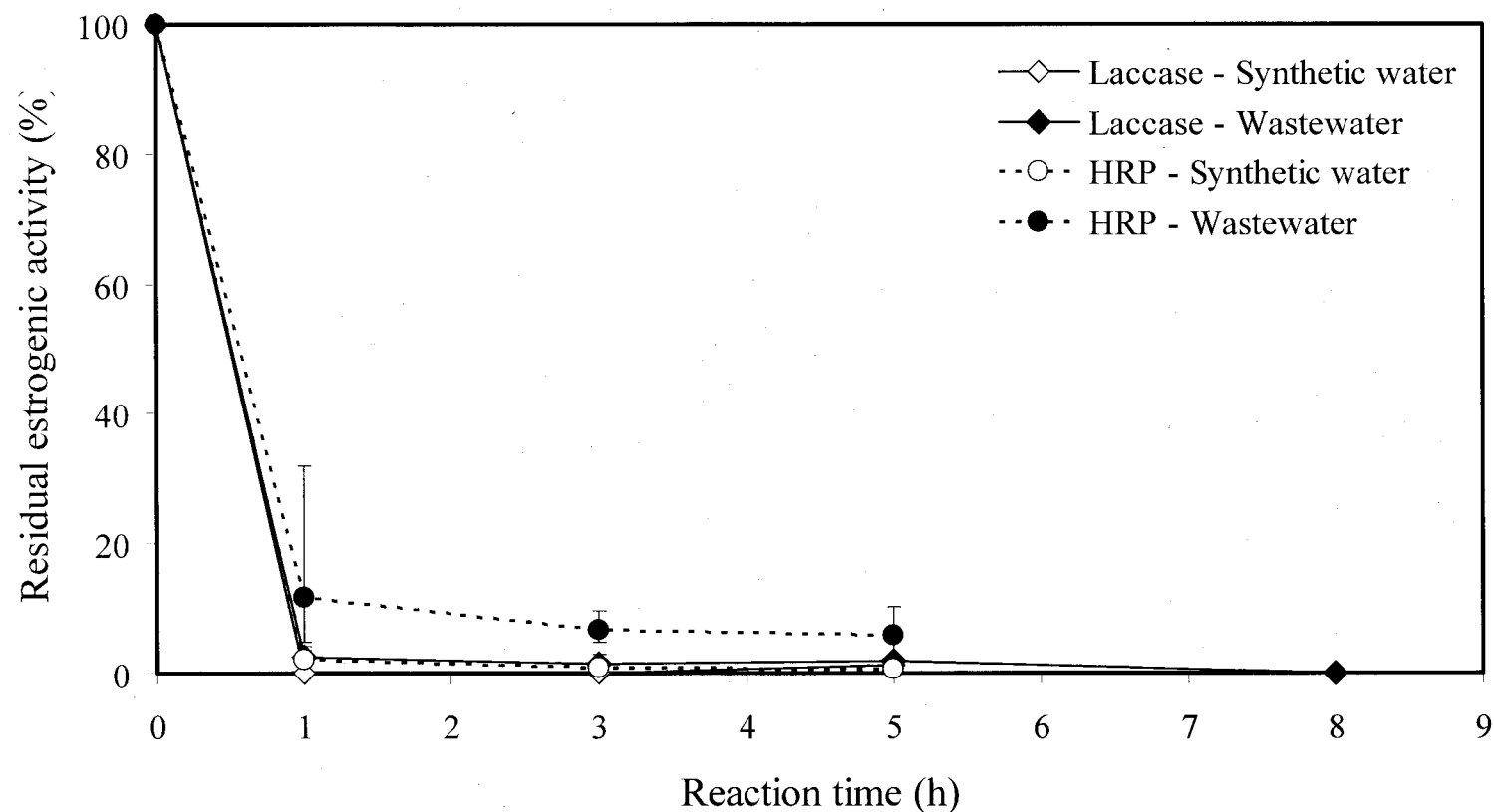


Figure 7.3 Residual estrogenic activity (%) after laccase (diamonds) and HRP (circles) treatment of synthetic water (open symbols) and wastewater (solid symbols). Bars represent 95% confidence limits. Reaction conditions for laccase-catalyzed system: pH 7.0, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, initial estrogen concentration of 0.4 nM, initial laccase activity of 20 U ml⁻¹. Reaction conditions for HRP-catalyzed system: pH 8.0, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, initial estrogen concentration of 0.4 nM, molar peroxide-to-substrate ratio of 0.5, initial HRP activity of 0.032 U ml⁻¹ in synthetic water and 10 U ml⁻¹ in wastewater samples.

Table 7.1 Characteristics of filtered municipal wastewater used in the study

Municipal wastewater	
Steroid estrogens	
E1 (ng l ⁻¹)	33.15
E2 (ng l ⁻¹)	25.30
E3 (ng l ⁻¹)	6.20
EE2 (ng l ⁻¹)	6.25
COD (mg l ⁻¹)	39.0
TOC (mg l ⁻¹)	15.5
pH	8.0 ± 0.5
Turbidity (NTU)	1.2
Metals	
Cu (µg l ⁻¹)	19.85
Cd (µg l ⁻¹)	3.51
Fe (µg l ⁻¹)	179.15
Na (mg l ⁻¹)	167.98
Ca (mg l ⁻¹)	31.44

Table 7.2 Estrogenic activity removal by enzymatic treatment of aqueous estrogens

Estrogen		Enzyme		Removal of estrogenic activity (%)	Reaction time (h)	Matrix	Reference
Type	Concentration (mM)	Type	Activity (U ml ⁻¹)				
E2, EE2	0.01	MnP	0.6	>80	1	Synthetic water	Suzuki <i>et al.</i> , 2003
E2, EE2	0.01	MnP	0.6	100	8	Synthetic water	Suzuki <i>et al.</i> , 2003
E1	0.01	MnP	0.6	99	1	Synthetic water	Tamagawa <i>et al.</i> , 2006
E1	0.01	MnP	0.6	100	2	Synthetic water	Tamagawa <i>et al.</i> , 2006
E2, EE2	0.01	Laccase*	0.6	>80	1	Synthetic water	Suzuki <i>et al.</i> , 2003
E2, EE2	0.01	Laccase*	0.6	100	8	Synthetic water	Suzuki <i>et al.</i> , 2003
E1	0.01	Laccase	0.6	97	1	Synthetic water	Tamagawa <i>et al.</i> , 2006
E1	0.01	Laccase	0.6	100	2	Synthetic water	Tamagawa <i>et al.</i> , 2006
E1, E2, E3, EE2	0.4x10 ⁻⁶	HRP	0.032	97	1	Synthetic water	This study
E1, E2, E3, EE2	0.4x10 ⁻⁶	HRP	0.032	99	5	Synthetic water	This study
E1, E2, E3, EE2	0.4x10 ⁻⁶	HRP	10	88	1	Wastewater	This study
E1, E2, E3, EE2	0.4x10 ⁻⁶	HRP	10	100	8	Wastewater	This study
E1, E2, E3, EE2	0.4x10 ⁻⁶	Laccase	20	100	1	Synthetic water	This study
E1, E2, E3, EE2	0.4x10 ⁻⁶	Laccase	20	97	1	Wastewater	This study
E1, E2, E3, EE2	0.4x10 ⁻⁶	Laccase	20	100	8	Wastewater	This study

*Use of a mediator

Table 7.3 **Main parameters of the kinetic experiments**

Substrate	Initial HRP activity (U ml ⁻¹) ^a	Molar peroxide-to-substrate ratio ^b	Initial laccase activity (U ml ⁻¹) ^c
E1	0.06	2	0.8
E2	0.03	2	0.8
E3	0.05	2	0.8
EE2	0.02	2	0.8

^a Optimal HRP activity necessary to remove completely the considered estrogen at pH 7.0 and 25±1°C within 1-h treatment

^b H₂O₂ in excess

^c Initial laccase activity necessary to achieve a minimum removal of 90% for each steroid estrogen at pH 7.0 and 25±1 °C within 1-h treatment

Table 7.4 Experimental kinetics determination for both enzyme-catalyzed reaction of each studied steroid estrogen at pH 7.0 and 25±1 °C

	Laccase-catalyzed process			HRP-catalyzed process		
	K_M (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)
E1	3.40	0.01	2.99x10 ³	7.47	4.84	6.47x10 ⁵
E2	3.99	0.03	7.71x10 ³	1.44	1.49	1.04x10 ⁶
E3	2.65	0.01	3.01x10 ³	5.25	5.25	6.68x10 ⁵
EE2	3.78	0.01	2.23x10 ³	1.32	1.49	1.13x10 ⁶

The enzyme molecular weight was used to evaluate the k_{cat} value. For laccase the molecular weight was supposed to be 65 kDa (Vandertol-Vanier, 2000); in the case of HRP, the molecular weight was equal to 40 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

CHAPITRE VIII : SYNTHÈSE

CHAPITRE VIII

8 SYNTHÈSE

La principale source d'EDCs dans l'environnement aquatique est la décharge des effluents municipaux et/ou industriels. Les hormones stéroïdiennes naturelles (estrone – E1, 17 β -estradiol – β E2, estriol – E3) et synthétiques (17 α -éthinyloestradiol – EE2) sont les EDCs qui contribuent le plus à l'activité estrogénique observée dans les effluents domestiques et les eaux de surface. Des études sur les systèmes conventionnels de traitement ont montré que ces procédés ne permettent pas un enlèvement efficace des hormones stéroïdiennes et/ou de leur estrogénicité. Ces composés se retrouvent alors dans les eaux réceptrices et peuvent, même à des concentrations de l'ordre du ng/L, perturber le système endocrinien des organismes aquatiques.

L'objectif principal de ce projet de recherche a été de développer un système de traitement enzymatique pour l'enlèvement des hormones stéroïdiennes dans le but de solutionner la problématique actuelle liée à la contamination des eaux de surface en composés fortement estrogéniques. Pour cela, deux enzymes ont été étudiées : l'enzyme HRP du groupe POD, sélectionnée comme enzyme de référence aux vues de la littérature, et l'enzyme laccase du groupe PPO, choisie comme enzyme pouvant être produite à faible coût, via l'utilisation de boues comme substrat de croissance. Plusieurs expériences en laboratoire ont été menées dans des réacteurs en batch afin d'évaluer l'efficacité du traitement et d'optimiser les conditions opératoires.

La première étape de ce projet de recherche a été de mettre en place une méthode d'analyse fiable et sensible, afin de l'utiliser pour évaluer le taux d'enlèvement en estrogènes atteint lors du traitement enzymatique étudié. L'analyse au LC-MS précédée d'une SPE a été retenue après plusieurs tests de comparaison sur les performances analytiques avec le GC-MS. Au LC-MS, 91–101% des estrogènes étudiés étaient récupérés lors de l'analyse d'eaux usées et les limites de détection (LOD) étaient de 0.59–1.32 ng/L et 1.74–3.00 ng/L dans l'eau pure et l'eau usée, respectivement. La méthode analytique ainsi développée a été utilisée pour quantifier la contamination en estrogènes d'une petite ville du Middle-west des États-Unis (Rolla, Missouri). Les concentrations en β E2, α E2, et E3 atteignaient 72.6 ng/L à l'affluent et 16 ng/L à l'effluent

de la STEP municipale de la ville. Le composé E1 n'a pas été détecté à l'affluent (<LOD), alors qu'à l'effluent sa concentration pouvait atteindre 12.3 ng/L. Les pourcentages d'enlèvement moyen de E2 et E3 à travers la STEP municipale se situaient entre 72 et 85%, alors que seulement 37% d'enlèvement de α E2 et 36% de EE2 ont été obtenus. L'analyse de la rivière en amont de la STEP municipale montrait la présence des 5 estrogènes (E1, β E2, α E2, E3 et EE2) jusqu'à des concentrations de 19.8 ng/L. Ces concentrations observées dans la rivière ont démontré que les petites communautés sont aussi touchées par la problématique des composés fortement estrogéniques contaminant les eaux de surface.

Les premières expériences réalisées pour l'optimisation du procédé enzymatique ont été accomplies dans des solutions aqueuses purifiées (appelées « eau synthétique ») et à des concentrations initiales en estrogènes de l'ordre du 100 μ g/L. La seconde partie du projet s'est portée sur le développement du procédé enzymatique dans une eau usée réelle contenant tous les estrogènes étudiés, à des concentrations environnementales.

L'étude sur le pH a montré que pour les conditions expérimentales utilisées le pH optimum pour l'enlèvement de chaque estrogène (E1, E2, E3 et EE2) était aux alentours de 6 pour la laccase et de 7 pour la HRP. L'oxydation des estrogènes est fonction de la valeur du pH du milieu considéré et représentée par une courbe en forme de cloche, typique des réactions enzymatiques. Cette tendance peut s'expliquer d'une part par la stabilité de l'enzyme en fonction du pH et d'autre part par le fait que l'enzyme est active ou non suivant la valeur du pH. Après une heure de traitement, des pourcentages d'enlèvement élevés d'estrogènes (76–100%) ont pu être atteints avec la HRP sur une échelle de pHs de 6–8. La laccase présentait une plus forte dépendance envers le pH que la HRP pour l'oxydation des estrogènes étudiés. Cependant, les valeurs optimales pour les deux systèmes enzymatiques sont comprises dans l'intervalle des pHs retrouvés dans les STEPs municipales. Les résultats expérimentaux obtenus concordent avec les précédentes études effectuées avec la HRP et la laccase pour le traitement de composés phénoliques (Wu et al., 1997; Wagner et Nicell, 2001; Fukuda et al., 2001; Modaressi et al., 2005; Kim et Nicell, 2006b).

Dans le cas du traitement par HRP, une étude sur l'optimisation du rapport molaire dioxyde d'hydrogène (H_2O_2)/substrat a été menée en laboratoire. Ainsi, pour chaque estrogène étudié, le rapport molaire optimal a été déterminé afin de maximiser la vitesse de réaction tout en

diminuant les coûts de traitement (tels que les coûts associés à l'ajout de H_2O_2 et à la possible inactivation de l'enzyme). Pour chaque estrogène étudié, le rapport molaire H_2O_2 /substrat optimal (0.44–0.45) correspondait approximativement au rapport stoechiométrique théorique, soit 0.5. La différence pourrait être expliquée par les incertitudes et erreurs expérimentales (telles que le temps de réaction, la température, le procédé LLE, le délai pour arrêter la réaction). Par ailleurs, les résultats expérimentaux ont aussi montré que pour des rapports molaires entre 0.5 et 2, un enlèvement complet de chaque estrogène a toujours été possible. Le système laccase semble par ailleurs plus attrayant d'un point de vue économique par rapport au système HRP étant donné que l'oxydation des estrogènes par la laccase se fait en présence d'oxygène et donc l'ajout de H_2O_2 n'est pas nécessaire.

Une étude cinétique a été réalisée afin de déterminer l'affinité de chaque enzyme (HRP et laccase) envers chacun des substrats étudiés (E1, bE2, E3 et EE2) et d'évaluer l'efficacité catalytique de ces enzymes. Cette étude a été menée en eau synthétique à pH 7 et 25 ± 1 °C pour des concentrations initiales en estrogènes de l'ordre du $\mu\text{g/L}$. Dans le cas de la HRP, le dioxyde d'hydrogène était en excès dans le système, afin d'éviter qu'il soit un facteur limitant. Les résultats expérimentaux ont montré que l'oxydation par HRP et laccase des estrogènes étudiés correspond à une réaction du pseudo premier ordre et suit le modèle cinétique de Michaelis-Menten (Appendice C). Par l'utilisation du modèle de Michaelis-Menten, il a été possible de déterminer l'affinité (constante K_M) et la spécificité (rapport k_{cat}/K_M) des enzymes envers le substrat considéré. Les résultats expérimentaux ont montré que les deux enzymes présentent une même affinité pour les estrogènes étudiés sous les conditions expérimentales utilisées. Des valeurs de K_M entre 1.32–7.47 μM ont été relevées pour la HRP et la laccase. Concernant le rapport k_{cat}/K_M , l'enzyme HRP présente des valeurs de l'ordre de 10^5 – 10^6 $1/\text{M.s}$, comparées à 10^3 $1/\text{M.s}$ dans le cas de la laccase. Ainsi, le procédé de traitement par la HRP semble plus efficace que le procédé de traitement par la laccase, pour l'enlèvement des estrogènes étudiés dans une eau synthétique.

Le but principal de cette étude cinétique était de comparer l'efficacité des deux enzymes étudiées pour l'oxydation des estrogènes. Cependant, généralement, la détermination des paramètres cinétiques d'un système enzymatique permet aussi d'aider à la conception du réacteur. Bien que l'application du modèle de Michaelis-Menten a été largement utilisée pour représenter les

oxydations enzymatiques, entre autre pour déterminer les vitesses de réaction initiales, l'approche du modèle de Michaelis-Menten n'est valable que pour une période succincte, pendant laquelle la disponibilité en substrat n'est pas limitée et la désactivation de l'enzyme peut être négligée (Kurniawati et Nicell, 2005). Plusieurs modèles cinétiques, basés sur une approche similaire au modèle de Michaelis-Menten, ont été développés pour l'oxydation enzymatique par la HRP (Buchanan et Nicell, 1997; Buchanan et al., 1998; Wu et al., 1999; et la laccase (Kurniawati et Nicell, 2005). Ces modèles prennent en compte les mécanismes de désactivation de l'enzyme qui peuvent survenir au cours de la réaction, permettant de décrire la complexité des systèmes enzymatiques.

Suite à ces études, plusieurs expériences ont été réalisées dans une eau usée, provenant de la STEP municipale de Rolla (Missouri, USA). Spécifiquement, l'eau a été échantillonnée à la sortie du procédé à boues activées de la STEP municipale. Basés sur les résultats expérimentaux, en 1 heure de traitement et à 25 ± 1 °C, un enlèvement complet (concentrations finales inférieures aux LODs) des 4 estrogènes (concentrations initiales de 0.4 nM) de l'eau usée a été atteint avec 10 U/mL de HRP à pH 8.0 (rapport molaire H_2O_2 /substrat de 0.5) et avec 20 U/mL de laccase à pH 7. Les tests réalisés en parallèle dans l'eau synthétique et l'eau usée municipale ont montré que l'enzyme HRP est fortement affectée par la matrice eau usée. Par contre, l'enzyme laccase ne semblait pas être affectée par les constituants présents dans l'eau usée, vu que pour le traitement de l'eau synthétique et de l'eau usée, la même activité initiale en laccase a été nécessaire (20 U/mL). Des tests supplémentaires en eau usée pour le procédé de traitement par la HRP ont été menés pour vérifier si l'apport de H_2O_2 n'était pas le facteur limitant pour le traitement de l'eau usée. Le rapport molaire H_2O_2 /substrat optimal en eau synthétique a été déterminé à 0.5. Un apport supplémentaire de H_2O_2 (rapports molaires de 1 et 2) a été expérimenté en eau usée. Aucune amélioration de l'enlèvement en estrogènes n'a été observée avec un apport supplémentaire en H_2O_2 . Ainsi, l' H_2O_2 n'était pas le facteur limitant pour le traitement de l'eau usée, comparé au traitement de l'eau synthétique. Cependant, les tests effectués avec les rapports molaires H_2O_2 /substrat de 1 et 2 ont montré des taux d'enlèvement des estrogènes étudiés inférieurs aux taux d'enlèvement obtenus avec un rapport molaire de 0.5. L'hypothèse retenue pour expliquer ces observations serait que l'enzyme HRP a pu être inactivée par des sous-produits formés lors de réactions enzymatiques avec d'autres composés de l'eau usée (autres que les estrogènes) et le H_2O_2 en excès. Cependant, cette hypothèse reste à être

vérifiée. Les autres composés phénoliques qui peuvent être potentiellement présents dans l'eau usée municipale seraient les phénols, les alkyphénols et le BPA, qui peuvent réagir avec la HRP avant que l'enzyme puisse oxyder les estrogènes étudiés. En effet, d'après la littérature, la HRP a été rapportée comme étant très efficace pour oxyder ces composés, qui sont généralement présents dans les eaux usées municipales à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/L}$, soit 1000 fois plus concentrés que les estrogènes (ng/L).

Dans un traitement enzymatique, le coût associé à l'enzyme représente le plus gros investissement. Ainsi, l'optimisation du traitement s'avère nécessaire avant l'implantation du procédé dans une chaîne de traitement. L'optimisation passe d'une part par l'étude des conditions opératoires, et d'autre part par l'ajout de produits chimiques, qui peuvent améliorer l'efficacité catalytique de l'enzyme. Ainsi, des expériences ont été réalisées pour le traitement de l'eau usée par la laccase avec un apport de HBT (concentration de $100 \mu\text{M}$), en tant que médiateur, ou de PEG (concentration de 50 mg/L), comme additif protecteur. Les résultats expérimentaux ont montré que l'ajout de HBT a permis d'améliorer l'efficacité du traitement par la laccase pour l'oxydation des estrogènes étudiés. En effet, en 1 heure de traitement, à pH 7.0 et $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, l'ajout de HBT a permis de diminuer de 2–4 fois l'activité initiale en laccase nécessaire. Ainsi, l'ajout de HBT permet de diminuer les coûts liés au traitement enzymatique en réduisant l'apport initial en laccase, ou en réduisant, tout en gardant la même activité initiale en laccase, le temps de rétention du procédé, permettant de réduire les coûts associés à la conception du réacteur. Le choix du HBT en tant que médiateur a été fait aux vues de la littérature, cependant ce type de médiateur synthétique peut présenter des désavantages en terme de toxicité (Johannes et Majcherczyk, 2000; Saba et Nakano, 2003). Ainsi, des expériences ultérieures devraient tout d'abord déterminer si aux concentrations utilisées ($100 \mu\text{M}$) l'HBT présente une toxicité pour le système. Ensuite, si les résultats de toxicité sont positifs, une étude sur l'utilisation de médiateurs naturels ou dérivés de composés naturels pourrait être conduite.

Dans le cas du PEG, par contre, son ajout, bien qu'une forte concentration en PEG a été utilisée, n'a permis aucune amélioration de l'efficacité du traitement enzymatique. L'hypothèse plausible pour expliquer ces observations serait que l'effet protecteur du PEG serait plus important lorsque des concentrations élevées en contaminants sont considérées. En effet, à fortes concentrations de

contaminants, la quantité de précipités polymériques formés, et leur tendance à interagir avec la laccase, seraient plus élevées.

Jusque-là, ce projet de recherche a montré que les procédés de polymérisation catalysés par la HRP et la laccase sont très efficaces pour l'oxydation des estrogènes étudiés en eau usée municipale. Cependant, le plus grand intérêt dans l'enlèvement d'EDCs estrogéniques des eaux usées porte sur l'estrogénicité résiduelle en aval de n'importe quel procédé de traitement. Plusieurs tests ont alors été menés afin de déterminer l'activité estrogénique résiduelle après une oxydation par la HRP ou la laccase d'une eau usée municipale contaminée en estrogènes (E1, β E2, E3 et EE2). Les résultats obtenus par le bio essai RYA ont montré qu'après une heure de traitement enzymatique de l'eau usée municipale, l'activité estrogénique avait pu être réduite de 97% par la laccase et 88% par la HRP, et que le système laccase a permis une réduction complète de l'estrogénicité de l'eau usée après 8 heures de traitement. L'activité estrogénique résiduelle après traitement pourrait être attribuée aux concentrations résiduelles en estrogènes (correspondant aux LODs de la méthode analytique au LC-MS), aux effets synergiques des estrogènes, ainsi qu'à l'activité estrogénique de l'eau usée elle-même.

Ce projet de recherche confirme que l'oxydation enzymatique (par HRP ou laccase) est un procédé de traitement efficace pour enlever les estrogènes (E1, β E2, E3 et EE2), et leurs activités estrogéniques associées, des effluents des STEP's municipales. Donc, le rejet de ces composés fortement estrogéniques dans l'environnement aquatique pourrait être évité, ainsi que la perturbation endocrinienne des organismes aquatiques. Ce procédé de traitement pourrait donc servir comme traitement additionnel aux procédés déjà en place dans les stations de traitement des eaux usées.

Afin de pouvoir comparer l'efficacité relative des procédés de traitement (HRP et laccase) étudiés lors ce projet de recherche, une analyse économique préliminaire a été effectuée. Tout d'abord, l'étude des coûts a portée sur l'utilisation des deux enzymes de ce projet produites industriellement ; puis afin de considérer l'avantage potentiel que présente la laccase, qui peut être produite à faible coût par l'utilisation de déchets biosolides comme substrat de croissance, de nouveaux calculs ont été menés. L'analyse des coûts (Tableau 8.1) est basée d'une part sur les expériences effectuées en laboratoire dans l'eau usée contenant les 4 estrogènes étudiés (de concentrations initiales de 0.4 nM), d'autre part sur l'achat de petites quantités d'enzymes. Pour

un traitement à échelle réelle, l'enzyme serait achetée en grande quantité, et donc le coût total (US\$/ng E2) serait moins élevé. Dans le cas de la HRP, le coût relatif à l'ajout de H₂O₂ a été négligé dans les calculs, puisque la dose apportée en H₂O₂, correspondant au rapport molaire H₂O₂/substrat de 0.5, est seulement de 0.72 nM. Concernant l'analyse économique réalisée pour la laccase produite à faible coût, l'hypothèse de départ a été que cette enzyme aurait la même efficacité catalytique que la laccase industrielle étudiée dans ce projet de recherche. Par l'analyse des coûts présentée dans le tableau 8.1, plusieurs observations ont pu être effectuées :

- Pour le traitement d'une eau usée municipale, la laccase semble être la solution à favoriser comparée à la HRP. En effet, les coûts de traitement avec le procédé laccase sont approximativement 4 fois moins importants qu'avec le procédé HRP.
- L'utilisation de la laccase produite à faible coût permettrait une réduction du coût de traitement de plus de 1060 fois par rapport au traitement par la laccase industrielle.

Tableau 8.1 Coûts associés au traitement enzymatique d'une eau usée municipale contaminée par E1, β E2, E3 et EE2

Enzyme	Coûts		
	Achat (US\$/U)	Traitement enzymatique (US\$/ng E2 traité)	Traitement d'une eau usée contaminée par 50 ng E2/l* (US\$/m ³)
HRP	0.073	1.87	93324
Laccase	0.0085	0.43	21700
Laccase à faible coût	0.000008	0.00041	20.46

**Contamination équivalente à celle retrouvée dans l'eau usée municipale échantillonnée lors de ce projet de recherche*

Recommandations pratiques

Suite à ce projet de recherche, il est possible de suggérer un mode d'implantation du traitement enzymatique développé. Considérant une STEP municipale présentant une chaîne conventionnelle de traitements :

- un dégrillage et/ou un dessablage,

- un décanteur primaire,
- un traitement biologique, tel qu'un procédé à boues activées,
- et enfin un traitement tertiaire, tel que les filtres à sable,

le procédé enzymatique, dans un réacteur en batch, développé dans ce projet de recherche pourrait être introduit après le traitement secondaire biologique. Le traitement biologique, en particulier le procédé à boues activées permet d'une part un enlèvement partiel des estrogènes présents dans l'eau usée, et d'autre part un enlèvement des autres composés de l'eau usée qui pourraient interagir avec l'enzyme considérée (inhibitions et autres réactions enzymatiques). De plus, le traitement tertiaire (filtres à sable), venant après le procédé enzymatique, permettrait de retenir l'enzyme utilisée, qui est libre dans le système de traitement, ainsi que d'enlever les polymères formés pendant la réaction enzymatique.

Dans le cas de la laccase, l'ajout d'HBT, comme médiateur, est très intéressant, puisqu'il permettrait de diminuer le coût global associé au traitement enzymatique, soit en diminuant l'apport initial en laccase, soit en réduisant le temps de rétention du procédé.

Afin de diminuer les coûts associés au traitement et augmenter l'efficacité du procédé, l'immobilisation de l'enzyme pourrait être envisagée. L'immobilisation de l'enzyme est un procédé où le mouvement de l'enzyme est sévèrement restreint dans l'espace, sans en altérer son activité catalytique. Trois configurations de réacteur pourraient être alors envisageables : le réacteur en batch, le réacteur à piston et le réacteur en mode continu. Ainsi, l'immobilisation de l'enzyme permettrait l'utilisation du traitement à flux continu et la réutilisation du catalyseur. Cependant, le procédé d'immobilisation requière un investissement initial élevé.

CONCLUSIONS & RECOMMANDATIONS

Cette thèse a donc permis de réaliser différentes observations et généralisations concernant l'oxydation enzymatique des principaux estrogènes naturels et synthétiques (E1, β E2, E3 et EE2) présents dans les eaux usées municipales, et plus spécifiquement des observations sur l'efficacité du traitement par la HRP et par la laccase.

- En eau synthétique, le pH optimal pour l'oxydation des estrogènes étudiés est approximativement de 6 pour la laccase et de 7 pour la HRP. Ces valeurs sont comprises dans l'intervalle des pHs retrouvés dans les STEP's municipales.
- Le procédé par la HRP requière l'apport de H_2O_2 pour être activée et pouvoir oxyder le substrat considéré (dans notre cas les estrogènes). En eau synthétique et à des concentrations initiales en estrogènes de l'ordre du $\mu\text{g/L}$, un rapport molaire H_2O_2 /substrat optimal d'environ 0.5 a été déterminé à pH 7.0 et à 25 ± 1 °C.
- L'oxydation enzymatique par la HRP et la Laccase est un traitement efficace pour l'enlèvement des estrogènes naturels et synthétique des eaux usées municipales.
- En 1 heure de traitement, à pH 7.0 et 25 ± 1 °C, un enlèvement complet des 4 estrogènes (concentrations initiales de l'ordre du ng/L) de l'eau usée a été atteint en utilisant 20 U/mL de laccase. En 1 heure de traitement, à pH 8.0 et 25 ± 1 °C, un enlèvement complet des 4 estrogènes (concentrations initiales de l'ordre du ng/L) de l'eau usée a été atteint en utilisant 10 U/mL de HRP et un rapport molaire H_2O_2 /substrat de 0.5.
- Lors de l'oxydation des estrogènes étudiés, la laccase ne semble pas être affectée par les constituants présents dans l'eau usée municipale, alors que la HRP est fortement affectée par ces composés.
- En eau usée, à pH 7.0 et 25 ± 1 °C, l'ajout de HBT, comme médiateur, permet d'améliorer l'efficacité de l'oxydation par la laccase des estrogènes étudiés (concentrations initiales de l'ordre du ng/L).

- Aucun effet n'a été relevé lors de l'ajout de PEG, comme additif protecteur, sur l'efficacité de l'oxydation des estrogènes étudiés (concentrations initiales de l'ordre du ng/L) par la laccase.
- L'oxydation enzymatique par la HRP et la laccase permet aussi de réduire complètement l'activité estrogénique.
- Après une heure de traitement enzymatique de l'eau usée municipale, l'activité estrogénique a pu être réduite de 97% par la laccase et 88% par la HRP, et que le système laccase a permis une réduction complète de l'estrogénicité de l'eau usée après 8 heures de traitement.
- En eau synthétique, à pH 7.0 et 25 ± 1 °C, l'oxydation par la HRP et la laccase des estrogènes étudiés (concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/L}$) correspond à une réaction du pseudo premier ordre.
- En eau synthétique, à pH 7.0 et 25 ± 1 °C, l'oxydation par la HRP et la laccase des estrogènes étudiés (concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/L}$) peut être décrite par le modèle cinétique de Michaelis-Menten.
- Le modèle cinétique de Michaelis-Menten permet de rapporter que sous les conditions expérimentales utilisées, la HRP et la laccase présentent une même affinité pour les estrogènes étudiés, et que le procédé de traitement par la HRP semble plus efficace que le procédé de traitement par la laccase, pour l'enlèvement des estrogènes étudiés dans une eau synthétique.

Cependant, le procédé d'oxydation enzymatique des estrogènes développé au cours de cette recherche pourrait être amélioré afin de minimiser les coûts globaux de traitement associés à l'enzyme. Ainsi, les aspects que devraient couvrir les études ultérieures à cette thèse seraient :

- Dans un premier temps, d'optimiser la configuration du procédé enzymatique afin d'utiliser la plus petite quantité d'enzyme possible. L'immobilisation de l'enzyme devrait être considérée, ainsi que l'utilisation d'un réacteur piston au lieu du réacteur en batch.
- Afin de proposer un procédé économiquement viable, il faudrait tester des enzymes produites à faible coût. En effet, des enzymes (telles que la laccase) peuvent être produite

par l'utilisation de biosolides comme substrat de croissance. Dans ce projet de recherche, la laccase employée était une laccase produite industriellement. Il serait donc intéressant de tester l'efficacité de la laccase produite par l'intermédiaire des biosolides pour l'oxydation des estrogènes présents dans les eaux usées.

- Et finalement, de mener une étude à échelle pilote et réelle pour éprouver la configuration du traitement enzymatique sélectionnée.

APPENDICE A

ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS REMOVAL FROM THE WASTEWATER TREATMENT PLANT, A NEW CHALLENGE

L'appendice A est constituée de la revue suivante : Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C., Surampalli R.Y., (2006). **Endocrine disrupting compounds removal from the wastewater treatment plant, a new challenge**. Process Biochemistry, 41(3), 525-539.

Abstract

Various natural chemicals and some contaminants of industrial source present an endocrine activity. Nowadays, many questions related to these compounds are not resolved and the persistent character of these compounds makes it a major problem for future generations. This study concentrated on some specific groups of endocrine disrupting chemicals (estrogens and alkylphenols). In this review, a number of treatment processes will be discussed with regard to their potential on endocrine disrupting chemicals removal.

1. Introduction

The human growth, development coordination and maturation imply a complex interaction of hormonal signals whose chronology and dose can have permanent consequences on the future form and function of many tissues [1,2]. Human exposure to very low doses during critical periods, for example at the cellular differentiation period, can alter the development course of these tissues and this may result in permanent character changes in the mature living beings [1,2].

Considering the complexity of endocrine systems, it is not surprising that a wide range and varied substances cause endocrine disruption and these include both natural and synthetic chemicals [3,4]. Indeed, according to an European Union study, 118 substances were classified as potential endocrine disrupters (EDCs); and a peculiar priority was assigned to the carbon disulfide, o-phenylphenol, tetrabrominated diphenyl ether, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4-dichlorophenol, resorcinol, 4-nitrotoluene, 2,20-bis(4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl)propane, 4-octylphenol, estrone (E1), 17 α -ethinylestradiol (EE2), and 17 β -estradiol (E2) [5].

EDCs are often dominant and can disperse quickly in the environment. EDCs are released to the atmosphere as a result of combustion and incineration activities (polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), dioxins) [6], but the principal sinks for EDCs are groundwater, river, and lakes [7]. The four main classes of EDCs (natural steroidal estrogens, synthetic estrogens, phytoestrogens, and various industrial chemicals) are generally represented with respect to their estrogenic potency [8]. The natural and synthetic estrogens generally display much stronger estrogenic effects than the phyto- and xenoestrogens. However, the concentrations of phyto- and xenoestrogens in the aquatic environment are usually higher [9].

The list of trace contaminants or EDCs, resulting from human activities and found in wastewater, is long [10–12]. However, in general natural (E1, bE2, estriol [E3]) and synthetic (EE2, mestranol) hormones are the major contributors to the estrogenic activity observed in sewage effluents [13–15] and the receiving water. Recent research showed that several sewage treatment plant (STP) effluents and rivers in the United Kingdom [14,16–20] and in the United States [21,22] contain sufficient amount of estrogenic compounds to induce harmful effects on fish (Tables 1–3). Field studies using caged trout (*Oncorhynchus mykiss*), wild cyprinid roach (*Rutilus rutilus*) [40], and estuarine flounder (*Platichthys flesus*) [41,42] showed that the estrogenicity persists in receiving water and that the concentration of these compounds present in the rivers and the estuaries are high enough to induce deleterious reproductive consequences.

The incidence of hermaphroditic wild fish near STPs initiated an investigation on STPs effluent estrogenicity. Caged fish held downstream of some STPs produced vitellogenin (VTG), indicating the presence of estrogenic substances [17,18,43]. In 1990, British scientists showed that male rainbow trout produced the yolk precursor protein VTG when they were exposed to sewage effluents or contaminated surface water [44]. Other studies have also shown that birds, reptiles, and mammals in polluted areas undergo alterations of the endocrine reproductive system [45].

Natural and synthetic estrogen hormones (such as bE2, E3, E1, and EE2) seem to be responsible for endocrine disruption in fish [13,28,46]. Indeed, several studies showed that even low concentrations (ng/L) of bE2 can induce VTG in male species and rainbow trout (*O. mykiss*) experimentally exposed to these chemicals [46,47]. Purdom et al. [16] and Hansen et al. [48] noticed that concentrations of bE2 as low as 1 ng/L induces VTG in male trout. In addition, Routledge et al. [46] and Larsson et al. [32] noted that EE2 can be a potential danger to fish and other aquatic organisms, even present at concentrations of 0.1–10 ng/L. In the study carried out by Purdom et al. [16], EE2 could induce VTG in male fish for a concentration as low as 0.1 ng/L.

The alkylphenol polyethoxylates (APEOs) group and their breakdown products, alkylphenols (APs) and alkylphenol carboxylates (APECs), have been shown to be estrogenic as well [46,49]. However, NP and OP are known to be more toxic than their EO precursors [50].

Its frequent use and its stability have as a consequence increased rivers contamination and bioaccumulation risk in the trophic chain [51]. Moreover, NP is present in large amount in STPs sludge and would have as a consequence a diminution of fish reproduction in subsequent receiving water [52]. Several studies proved that NP causes production of vitellogenin in male fish [8,28,53]. Indeed, alkylphenols can have estrogenic effects in fish at concentrations from 1 to 10 mg/L [46,54].

Although nonylphenol polyethoxylates (NPnEO) have been removed from household detergents since 1986, river water quality measurements indicate that there is still NP, nonylphenol ethoxylate (NP1EO) and nonylphenol diethoxylate (NP2EO) concentrations that are as high as 0.571, 0.710, and 0.106 mg/L, respectively [55]. Moreover, Ahel et al. [56] found in Swiss rivers, concentrations in NP2EO above 2.550 mg/L. Several studies have also confirmed the presence of NPnEOs and octylphenol polyethoxylates (OPnEO) in raw sewage, final effluents, sediments, fish, mussels, and even in surface and drinking water, at concentrations ranging from ng/L to mg/L (Tables 4 and 5). Although these values were below acute and chronic toxicity levels, some studies have shown that they individually could be sufficient to produce estrogenic effects [8,46].

Some studies confirmed also the presence of alkylphenol polyethoxylates (APnEOs) in Canadian surface water, sediments, sludge, and sewage treatment plants [60,63,66–68] and St. Lawrence River downstream of the Montreal region. Sabik et al. [69] evaluated the types and levels of APnEO and their metabolites in the municipal effluent of Montreal treatment plant, in surface water, and sediments downstream from the STP. They further studied whether APnEOs were bioconcentrated by mussels (*Elliptio complanata*) caged and introduced into the St Lawrence River downstream of the major urban zone of Montreal. The analyses were performed on 4-tert-octylphenol (4-t-OP), 4-n-nonylphenol (4-n-NP), nonylphenol polyethoxylates (NP1–16EO), nonylphenoxycetic acid and nonylphenoxyethoxycetic acid (NP1EC and NP2EC), and octylphenol-mono and di-ethoxycarboxylic acids (OP1EC and OP2EC). The results showed that many of the target chemicals were present in all the studied matrices (in water from ng/L to mg/L reaching ppm levels in sediments and mussels).

2. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater

The EDCs presence in the environment is likely to disturb the ecosystems and to affect human health. Thus, the need for developing reliable detection methods, analysis tools, and adapted wastewater treatment processes is now the subject of a quasi-consensus between the scientific communities.

2.1. Conventional treatment processes

Municipal and industrial wastewaters contain a multitude of persistent organic compounds derived from domestic and industrial applications. These compounds pass through wastewater treatment systems without being totally intercepted (Table 6) and are continuously discharged into the environment and mainly into surface water and/or groundwater. Although APEOs are highly treatable in conventional biological treatment facilities, effluent from wastewater removed plants is still one of the major sources of APs and APEOs due to incomplete removal and degradation of these surfactants. The concentrations of these APEO metabolites varied among different treatment plants depending on the plant design and efficiency [6]. Many communities in worldwide, such as Europe, use surface or groundwater resources for drinking water production, which contain a significant portion of this wastewater effluent [4]. Svenson et al. [76] detected low but significant levels of estrogenicity in the Swedish rivers estuary, downstream of the STPs. Several studies showed that male fish feminization is linked to the estrogenic compounds occurrence in the STP effluents [9,31,32,34,40].

Current wastewater treatment plants were normally, and in the best cases, designed for carbon, nitrogen, and phosphorus (CNP) removal but a partial EDCs removal is often achieved simultaneously. However, a very few data on the EDCs, and in particular on estrogens, fate in STPs processes are available in the literature [71,77,78]. Indeed, although transformation or degradation processes may eliminate some EDCs from wastewater at variable levels, a large ambiguity persists on the occurred EDCs removal processes mechanism (Table 7). For example, removal pathways for organic pollutants during secondary biological treatment include adsorption onto microbial flocs and removal through the waste sludge, biological or chemical degradation, transformation, and volatilization during aeration [83].

However, Mastrup et al. [82] estimated that less than 10% of natural and synthetic estrogens are removed via biodegradation process, and although a considerable amount is adsorbed to the

sludge, the majority of the compounds remain soluble in the effluent. Whereas Johnson et al. [25] could not determine whether biodegradation or sorption is the most important removal mechanisms of these compounds. Thus, it is necessary to look further on the removal mechanisms to improve the existing treatment systems effectiveness and to develop new treatment strategies to remove EDCs from wastewater and sludge.

2.1.1. Physical treatments

The nonpolar and hydrophobic nature of many EDCs makes them sorb onto particulates. This suggests that the general effect of wastewater treatment processes would be to concentrate organic pollutants, including EDCs, in the sewage sludge. Mechanical separation techniques, such as sedimentation, would result in significant removal from the aqueous phase to primary and secondary sludges [83].

In conventional treatment system, most of compounds remain in aqueous phase in the effluent, whereas a considerable amount is adsorbed onto sludge during the treatment [81,82]. Concerning estrogens, the log Kow values of estrogens (Table 8) indicate that these compounds should appreciably adsorb onto sediment and sludge [88]. This assumption is emphasized by the detection of high concentrations of estrogens in water released by dewatering sewage sludge [89] and in digested sewage sludge (49 ng/g of bE2 and 37 ng/g of E1) [88]. In the same way, log Kow were between 4.00 and 6.19 for the APE metabolites (Table 8), suggesting that these substances are hydrophobic substances and may become associated with organic matter [6].

Other researches also studied the estrogens interactions with natural particles at expected environmental levels, or those of the activated sludge treatment. Most results proved that the adsorbed contaminants amount depends on particulate size and roughness, hence depends on the available particle surface as well as material characteristics. Whereas Schäfer and Waite [12] results showed that the adsorbed amount of a chemical is a function of particle mass. This was reflected in the results with activated sludge, where large particles of about 100 μ m showed the lowest adsorption. When the particle surface area was considered, the estrogens adsorption on activated sludge was the highest of all the compounds studied [12].

However, if contaminants are adsorbed on activated sludge particles, they accumulate in the wastewater treatment plants sludge. In this case, the application of digested sludge, as fertilizer, on agricultural fields may cause a potential contamination of soil and ground water [34]. If

contaminants are dissolved or associated with dissolved natural organics or even stable and unstable colloids, then they get transported easily through wastewater treatment plant [90].

Domestic sewage generally contains fats, mineral oils, greases, and surfactants [83] and so, in addition to sorption onto suspended solids as a removal mechanism, it is possible that compounds may partition onto the nonpolar fat and lipid material in raw sewage.

Trace organic compounds, such as natural hormones [91], a wide range of pesticides [92], alkyl phthalates [93], and personal care and pharmaceutically active products (PPCPs) [90] can be removed using nanofiltration (NF) or reverse osmosis (RO) and subsequently accumulate in the concentrate [90]. Schäfer et al. [91] observed that some NF membranes remove E1 by size exclusion and others by adsorption. These adsorptive effects may be driven by hydrogen bonding between E1 and the membrane [91]. Schäfer et al. [90] showed also that the presence of natural or chemical particulates, which adsorb such contaminants, could significantly increase the potential of MF, UF, and NF to remove trace contaminants.

Although MF and UF were not expected to remove such small and polar compounds, Schäfer and Waite [12] observed that trace contaminants removal using submerged MF (Memcor) and UF (Zenon) membranes was as high as during powdered activated carbon (PAC) treatment. This removal was high at low and neutral pH, while it decreased substantially at a pH higher than 10.5. Schäfer and Waite [12] attributed this to adsorption effects, comparable to hydrogen bonding and hydrophobic sorption. Indeed, the contaminants adsorption on hydrophobic membranes is expected to be higher than on hydrophilic materials. Chang et al. [94] studies on microfiltration confirmed that significant concentrations of natural hormones, such as E1, could accumulate on hydrophobic hollow fibre membranes as a result of sorption processes. However, they also noticed that the membrane retention decreases with increase in the amount of E1 accumulated on the membrane surface.

According to Schäfer et al. [90], an appropriate wastewater pre-treatment followed by a hybrid process: MF or UF, combined with, for example, PAC, coagulation or magnetic ion exchange (MIEX), could remove a considerable amount of small-sized contaminants. These contaminants could be pharmaceuticals, EDCs, including hormones, some agrochemicals, viruses, etc.

It is important to understand such retention and adsorption effects prior to membrane selection if the membrane is expected to act as a reliable barrier to contaminants. Such adsorption effects are also very important for the understanding of the pollutants fate in treatment systems and possible contaminants desorption during feed quality changes or cleaning operations [12]. Thus, investigations of both fundamental and applied aspects of membrane operation and performance must be carried out to optimize its effectiveness and to contribute to improve treatments strategies.

2.1.2. Chemical treatments

Preliminary results indicate that activated carbon is effective for removing some EDCs and PPCPs. In addition, coagulants, such as aluminium and ferric salts, have been used to remove organic matter, although their use is often deemed impractical due to the high costs [95]. However, studies have done a comparative investigation of common adsorbents used in the water and wastewater treatment industry, including PAC, ferric chloride coagulant (FeCl_3), and MIEX, that generally allow to remove small-sized contaminants (such as EDCs, including hormones and some agrochemicals) [12]. Results showed that both FeCl_3 and MIEX[®] are not very suitable to remove the majority of trace contaminants (EDCs and PPCPs). In contrast, Schäfer and Waite [12] showed that PAC is more adequate and appears to be the preferential choice for E1 removal, when PAC is added in a sufficiently high dosage. The EDCs and PPCPs removal is minimal during coagulation since the previous process tends to favour the removal of large and hydrophobic compounds. Indeed, the latter are generally responsible for subsequent adsorption and decantation processes of small-sized contaminants, such as EDCs [12].

2.1.3. Biological treatments

Biological degradation and transformation occur aerobically by biological oxidation in activated sludge, trickling filters, or anaerobically in the sewage system or anaerobic sludge digesters. However, in a study on the distribution of natural estrogens (E1 and bE2) in 18 municipal treatment plants across Canada, Servos et al. [96] noticed that the trickling filter could not reach any removal of bE2. Moreover, Svenson et al. [76] reported that trickling filters were less effective than activated sludge systems (Table 9) to eliminate estrogenic activity, and the highest removal rates were obtained at plants with comprehensive treatment technologies, i.e. combined biological and chemical removal of organic matter, nitrogen, and phosphorus.

The activated sludge process is commonly used to treat wastewater in large cities and mainly to remove organic compounds present in STP influent [80]. However, not all compounds are completely broken down or converted to biomass. Indeed, estrogenic alkylphenols and steroid estrogens, for example, found in STP effluent are the breakdown products of incomplete biodegradation of their respective parent compounds [80]. Batch studies realized by Johnson and Sumpter [80] have indicated that E1, EE2, and alkylphenols will not be completely eliminated in activated sludge, in the current configurations of the process. Field data suggested that the activated sludge process can remove over 85% of bE2, E3, and EE2, while the removal performance for E1 appears to be less and more variable [80]. Indeed, in a review on steroid estrogens removal effectiveness, Johnson et al. [25] reported that the activated sludge process could remove 88% of bE2 and 74% of E1. Moreover, Baronti et al. [26] listed six STPs using activated sludge system close to Rome. They reported average removals of 87% of bE2, 61% of E1, 85% of EE2, and 95% of E3 [26]. Ternes et al. [34] studied a number of natural and synthetic estrogens in sewage at a municipal STP near Frankfurt/Main and found that about 2/3 of the incoming bE2 and 16 α -hydroxyestrone was eliminated in the STP whereas the elimination efficiencies for E1 and EE2 were low (<10%). In subsequent laboratory experiments with activated sludge from the same plants, Ternes et al. [71] confirmed the persistence of EE2 under aerobic conditions while both E1 and bE2 were degraded fairly rapidly under these conditions (bE2 via E1). In the same way, Esperanza et al. [7] reported that removal efficiencies for E1 and EE2 were around 60% and 65%, respectively, in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants, although more than 94% of bE2 entering in the aeration tank was eliminated.

Whereas high removals of E3, bE2 [26,70], and EE2 [26] were achieved, no more than 69% of E1 were removed by activated sludge treatment [26,70], and in 4 out of 30 events, E1 outlet levels were even larger than inlet levels [26]. Onda et al. [70] and Johnson and Sumpter [80] concluded that it is necessary to consider bE2 conversion to E1, in E1 effluent concentration. Indeed, batch results obtained by Onda et al. [70] and Esperanza et al. [7] indicated that bE2 was transformed to E1, such as intermediate product. Lee and Liu [97] examined the fate of bE2 in aerobic and anaerobic reactors with activated sludge and observed the rapid degradation of bE2 to E1 but did not observe any other stable major metabolites. Furthermore, Estrogens are either excreted in urine as glucuronide or sulphated conjugates in both humans and animals [98,99]. Indeed, Andreolini et al. [100] observed that E1 is excreted in latepregnancy urine preferentially

in conjugated form, estrone-3-sulfate (E1-3S). Adler et al. (2001, quoted by Servos et al. [96]) reported that 50% of bE2 and 58% of E1 were conjugated in raw sewage. On this basis, Johnson and Sumpter [80] supposed that the anomalous behaviour of free E1 observed in their study, in those of Shore et al. [101] and Baronti et al. [26], was the result of the microbial deconjugation of E1-3S in the sewer system during the activated sludge STP treatment. Indeed, several studies suggested that the deconjugation could occur during STPs process through microbial processes in the sewage treatment plants [13,41,71,98,99,102], and in rivers [41]. Ternes et al. [71] reported during batch reactor studies that the glucuronides of bE2 (17 β -estradiol-(17 or 3)- β -D-glucuronide) were rapidly cleaved in contact with diluted activated sludge resulting in the release of bE2. After less than 15 min, the 17 β -estradiol-glucuronide was cleaved and both bE2 and E1 could be detected. Carballa et al. [103] investigated the behavior of natural estrogens (E1 and bE2) along the different units of a municipal STP located in Galicia (Spain). During the secondary treatment (conventional activated sludge), the increase of E1 concentration in the effluent could be explained by the oxidation of bE2 in the aeration tank and by the cleavage of the conjugates.

Furthermore, D'Ascenzo et al. [27] investigated the fate of the conjugated forms of the three most common natural estrogens occurring in the municipal aqueous environment. Levels of conjugated and free E3, bE2, and E1 were studied considering three scenarios: (1) female urine, (2) a septic tank collecting domestic wastewater, and (3) influents and effluents of six activated sludge sewage treatment plants. They confirmed through laboratory biodegradation tests that glucuronated estrogens are readily deconjugated in domestic wastewater, presumably due to the large amount of the β -glucuronidase enzyme [104] produced by fecal bacteria (*Escherichia coli*). Since most of estrogens and androgens are mainly excreted in conjugated form, the occurrence of these free hormones in the aquatic environment (e.g., STP effluents and rivers) is probably due to their deconjugation by bacteria in situ [13,26,31,34,53,79,80,101,105]. According to D'Ascenzo et al. [27] study, the sewage treatment completely removed residues of estrogen glucuronates and with good efficiency (84–97%) the other analytes, but not E1 (61%) and E1-3S (64%). Therefore, D'Ascenzo et al. [27] concluded following this study, that E1 appears to be the most important natural EDC, considering that (1) the amount of the E1 species discharged from STPs into the receiving water was more than ten times larger than bE2 species, (2) E1 has

half the estrogenic potency of bE2, and (3) some E1-3S fraction could be converted to E1 in the aquatic environment.

Moreover, the estrogens form greatly influences their estrogenic potency. Matsui et al. [89] compared the estrogenic activity of various substances using the EC50 of the YES response. For instance, the conjugated form 17b-estradiol 3-sulfate was 5.3×10^{-5} and 17b-estradiol 17-b-D-glucuronide and 17b-estradiol 3-b-D-glucuronide were only 5.9×10^{-7} and 3.1×10^{-5} , respectively, relative to the activity of bE2 [89]. The estrogenic potentials of the conjugated forms of estrogens are clearly much lower. The cleavage of glucuronide during treatment or in the collection system may therefore greatly increase the estrogenicity of the effluent [96].

Like natural hormones (such as bE2), synthetic hormone, EE2, used as estrogenic compound in contraceptives, is metabolized in human body before its excretion. It is found then especially in conjugated forms [99,106]. This conjugation, which inactivate hormonal action of these compounds (e.g., glucuronated and sulphates), increases its water solubility, and thus these compounds become more mobile in environment than free hormones [81]. Indeed, Carr and Griffin [106] noticed that after 24 h, only 3% of EE2 amount (20–50 mg/day) contained in contraceptives remain in plasma, whereas over 60% are excreted in urine. In activated sludge, Turan [107] reported no change in EE2 concentration over 120 h of treatment. However, when Vader et al. [108] added hydrazine as an external electron donor to provide unlimited reducing energy, EE2 degradation increases slightly. This demonstrated that EE2 degradation is mediated by monooxygenase activity. Moreover, Vader et al. [108] found that under non-nitrifying conditions, there was no degradation of EE2, while nitrifying sludge oxidized EE2 to more hydrophobic compounds. Layton et al. [98] also found in laboratory experiments that sludges, which failed to nitrify, also failed to degrade EE2. Vader et al. [108] suggested that the seasonal and temperature effects on nitrification may therefore result in changes in the ability of treatment systems to remove EE2 and related compounds. In addition, Lee and Liu [97] showed in batch experiments that bE2 was more persistent under anaerobic conditions than under aerobic conditions but was still biodegradable by the culture. In addition, Shi et al. [109] investigated the biodegradability of natural and synthetic estrogens using nitrifying activated sludge (NAS) and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. The results confirmed that NAS significantly degrades both natural and synthetic estrogens. Among the four estrogens, bE2 was most easily degraded. NAS degraded 98% of bE2 at 1 mg/L within 2 h, which indicates that

NAS also has excellent bE2-degradation ability. Regarding EE2, Shi et al. [109] found a similar trend to Vader et al. [108]. Shi et al. [109] showed also that ammonia-oxidizing bacteria such as *N. europaea* can contribute to the estrogen degradation by NAS. However, NAS degrades estrogens and their degradation intermediates, while *N. europaea* only degrades estrogens with no further degradation of their intermediates. Thus, other microorganisms could exist in NAS which are not ammonia-oxidizing bacteria, and are responsible for intermediates degradation. Indeed, E1 was generated when NAS degraded bE2, whereas E1 was not generated when *N. europaea* degraded bE2. Obviously, bE2 degradation via E1 by NAS is considered to be caused by other heterotrophic bacteria and not by nitrifying bacterium such as *N. europaea*.

On the other hand, since estrogens are hydrophobic organic compounds with low volatility, sorption to sludge could play an important role in removal of these compounds during the waste treatment process. Johnson and Sumpter [80] suggested that the principal mechanisms for steroid estrogens removal in activated sludge processes could be sorption and biodegradation. In general, for more hydrophobic compounds, such as EE2, sorption to sludge is likely to play a significant role in removal of these compounds from solution, while for relatively weakly hydrophobic compounds, such as E3, biodegradation would be a privileged factor [80]. In a recent Danish study on removal processes in activated sludge [30], the results indicated that at common sludge densities in Danish STPs about 35–45% of E1, 55–65% of bE2 and EE2 can be expected to be sorbed to the sludge. The degradation of these compounds was studied under aerobic and anaerobic conditions in a simulated activated sludge system. It is concluded that under anaerobic conditions, the degradation rates for E1 and EE2 were considerably (10–20 times) lower than under aerobic conditions while the degradation of bE2 was not significantly different [30]. Moreover, steroids removal can be influenced by hydraulic retention time (HRT) and high sludge retention time (SRT) used by STPs [83]. Indeed, in another Danish literature review on substances causing feminization of fish [77], it was concluded that a high HRT and SRT in the activated sludge treatment process have a positive influence on the ability of an STP to remove estrogen.

However, a study of mass balance of estrogens in STP in Germany [75] demonstrated that most of the estrogenic activity in the wastewater was biodegraded during treatment rather than adsorbed onto suspended solids. There was a 90% reduction in estrogenic load, and less than 3% of the estrogenic activity was found in the sludge (Table 7). Moreover, radiolabelled bE2 was

used in a study of estrogen fate in STP [110]. Fuerhacker et al. [110] concluded that at low concentration, the majority of radiolabelled bE2 remained in the liquid phase, and thus the physical-chemical properties, such as the octanol/water partition coefficient, did not reflect the situation at nanogram range [110].

In another study (Johnson, 1999, quoted by Birkett and Lester [83]), suspended solids content was an important factor. A higher suspended solids content resulted in a higher removal of estrogens, while an increase in influent estrogen concentration caused a decrease in removal, probably due to the EDCs sorption on the suspended solids.

In the case of the surfactants group, the oxidative shortening of the polyethoxylate chain occurs easily and rapidly in aerobic conditions. However, complete mineralization is poor due to the presence of the highly branched alkyl group on the phenolic ring. The hydrophilic group in ethoxylated compounds contains more abundant carbon than the hydrophobic alkyl group. These moieties (available by the successive removal of ethoxy groups) are therefore potential sources of bacterial nutrients. This chain shortening results in the formation of recalcitrant intermediates such as nonylphenol (NP), octylphenol (OP), and mono to triethoxylate alkylphenols (NP1EO, NP2EO, and NP3EO) [6]. Ultimate biodegradation of these metabolites occurs more slowly, due to the presence of the benzene ring and their limited water solubility [83]. Moreover, since APs are high lipophilic, in particular 4NP, sorb onto the solid phase making them more resistant to biodegradation [7,58,111,112], whereas APECs are more water-soluble and have a very limited tendency to be found in the solid phase. However, Ying et al. [6] reported that aerobic conditions facilitate further biotransformation of APE metabolites than anaerobic conditions.

In STP, bisphenol A is easily removed by biodegradation mechanisms (Matsui et al., 1988, quoted by Birkett and Lester [83,113]). Polychlorinated biphenyls (PCBs) are stable molecules with low aqueous solubility and biological, chemical, and physical recalcitrance. As a result, they exhibit minimal degradation in the STP [114], and according to McIntyre and Lester (1981, quoted by Birkett and Lester [83]), the major removal mechanism of PCB, such as organotins [115,116], is via adsorption to suspended matter and sludge flocs. Air stripping has been also noted as an important factor for compounds with HC greater than $100 \text{ Pa m}^3 \text{ h}^{-1}$ [83]. For polyaromatic hydrocarbon compounds, degradation times could be as long as 80–600 h in a conventional STP, since the experiments were run in ideal conditions with a temperature of 20

°C and pre-adapted bacteria. During volatilization, significant removal was seen, and during photodegradation some compounds demonstrated significant losses in settled sewage. In accordance with Melcer et al. [117], Hegeman et al. [118], and Chiou et al. [119], PAH's removal during primary sedimentation is a function of molecular weight and suspended solids removal efficiency, since they tend to partition onto the solid phase.

In conclusion, activated sludge processes allow a relatively high EDCs removal [26,27,70,76,80], however it does not permit to reach lower estrogens, alkylphenols, and BPA effluent concentrations, than the maximum limit levels reported as producing estrogenic effects in fish and other aquatic organisms (Tables 6 and 9). For example, Servos et al. [96] reported that the degradation of estrogens in aerobic batch reactors with a sewage sludge was very rapid, with bE2 and E1 being reduced by >95% in less than 24 h. However, even after 120 h, traces of E1 and estrogenicity could be detected [96]. In addition, it is necessary to notice that the concentration and the removal rates obtained in different studies are not easily comparable, since the treatment conditions at the studied wastewater treatment plants are different or sometimes not clearly described. Moreover, the sampling strategy and the analytical methods vary from a study to another [80].

Membrane bioreactors can be defined as systems integrating biological degradation of waste products with membrane filtration [120]. These treatment systems proved a quite effective removal of organic and inorganic contaminants as well as biological entities from wastewater [121]. Indeed, since estrogens bind readily to organic matter, membrane bioreactor could provide a suitable environment for EDCs removal due to the high organic content in the mixed liquor, and the retention of all particular and colloidal matter before the draw phase. In addition, the possibility of maintaining high SRT in the membrane bioreactor leads to a diverse microbial culture, including slow growing organisms, capable of breaking down complex organic compounds [122]. Thus, compared to other biological treatment, Buenrostro-Zagal et al. (2000, quoted by Cicek [121]) found a better removal effectiveness of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a selective extractive membrane bioreactor. Furthermore, Wintgens et al. [123] investigated membrane bioreactors application and nanofiltration with the aim of evaluating the potential of EDC removal. It was obvious throughout the results, that most of the load was reduced in the membrane bioreactor, while granulated activated carbon treatment, applied downstream, was only a further polishing stage. Indeed, some membrane bioreactors

configurations allow the retention, and consequently break down of many EDCs without requiring sophisticated tertiary treatment processes [121].

2.2. Advanced treatment processes

2.2.1. Chlorination process

Several studies Hu et al. [124] and Moriyama et al. [125] showed that bE2 and EE2, respectively, reacted rapidly with HOCl and are completely removed (Table 10). However, several chlorinated by-products formed. Moreover, it has been reported that some of chlorinated products have carcinogenicity and/or mutagenicity [125]. Thus, it is important to identify the products from the reaction of EDCs with available chlorine and their estrogenic activities associated [124,125]. Indeed, Hu et al. [124] could determine mainly the formation of 4-chloro-E2, 2,4-dichloro-E2, and 2,4-dichloro-E1, and others compounds non-identified. Hu et al. [124] concluded that the products in aqueous chlorinated bE2 solution elicited estrogenic activity. Moreover, Moriyama et al. [125] confirmed the formation of two products in highly chlorinated solutions after 60 min (4-chloro-EE2, 1–6 mol%; 2,4-dichloro-EE2, 3–25 mol%). The estrogenic activities of 4-chloro-EE2 were similar to those of the parent EE2.

2.2.2. Ozonation and advanced oxidation processes

Ternes et al. [126], Nakagawa et al. [127], and Kosaka et al. [132] could remove considerably various estrogens during ozonation treatment (Table 10). Huber et al. [133] determined, in bench-scale experiments, the rate constants of EE2 for ozonation ($k_{O_3} = 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and AOP ($k_{OH} = 9.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). However, EDCs co-exist with other organic and inorganic compounds, whose concentrations are relatively high in environmental water. The reaction of $HO\cdot$ is less selective, and thus the generated $HO\cdot$ is ineffectively consumed by the coexisting compounds. It is assumed that EDCs removal efficiencies are dependent on the initial concentrations of EDCs, co-existing compounds and their reactivities toward ozone and $HO\cdot$.

Furthermore, the ozonation products formed are currently unknown [126]. However, hydroxylated estrogens should lose their affinity for the estrogen receptor to greatly reduce the known estrogenic activities of wastewater, but this assumption has not been proved [126]. Moreover, Huber et al. [133] concluded that modifications caused by ozonation or AOPs should

be sufficient to eliminate the estrogenic effects of EE2. However, the reactions with ozone and OH radicals during an ozonation process will not result in the complete mineralization of EE2.

2.2.3. Treatment with manganese oxide

Rudder et al. [129] obtained an EE2 removal of 81.7% using manganese oxide (MnO_2) (Table 10). Moreover, since the MnO_2 reactor was not yet saturated after 40 days of treatment, they concluded that EE2 was not only adsorbed to the MnO_2 granules, but most probably also degraded into others compounds. Thus, the self-regenerating cycle of MnO_2 seems possible. This can make this treatment cost-effective, because the matrix does not have to be replaced [129]. However, Rudder et al. [129] did not identify the EE2 metabolites and neither their estrogenic activity.

2.2.4. Photolysis reactions

Photolysis reactions have been extensively studied for estrogens removal from aqueous environment [130,131,134,135] (Table 10). Liu and Liu [135] examined the UV-light and UV-vis-light (high-pressure mercury lamp) direct photolysis of two estrogens, bE2 and E1, in aqueous solution at high concentrations. They could show that the photolysis of both the estrogens causes the breakage and oxidation of benzene rings to produce compounds containing carbonyl groups. Moreover, Ohko et al. [131] concluded in his study on the bE2 degradation by titanium dioxide (TiO_2) photocatalysis, that the phenol moiety of the bE2 molecule should be the starting point of the photocatalytic oxidation. In addition, since the intermediate products do not have a phenol ring, Ohko et al. [131] presumed that their estrogenic activities are negligible.

3. Discussion and conclusion

It has generally been observed that primary treatment alone results in no or only limited removal of estrogens from sewage, while secondary treatment involving activated sludge reduces significantly all estrogens concentrations. Moreover, a long SRT appears to have a positive influence on the activated sludge system ability to eliminate estrogens. It appears also that bE2 and E3 are very efficiently removed in the latter systems while the removal rate of E1 and EE2 is somewhat lower. It seems also that EE2 only undergoes significant removal degradation when nitrification steps are present. On the other hand, according to the literature, the main estrogens removal mechanism in the activated sludge system seems to be sorption to sludge particles

and/or microbiological degradation. However, due essentially to issues met during estrogens sludge analysis; there is no publication to date which could prove it.

Indeed, almost all the studies only analyzed the estrogens in the STP influent and effluent, and so assumed that the difference was adsorbed in STP sludge.

Moreover, the highest EDCs removal achieved with the different above exposed treatment processes does not allow generally to reach effluent concentrations, which respect the maximum limit levels determined as producing estrogenic effects in fish and other aquatic organisms (Tables 6 and 9). So, it would be interesting to look further into investigation on treatment processes to achieve concentrations in effluent below estrogenic limits. Indeed, Donova et al. [136] reported that a wide variety of microorganisms of different taxonomy could have the ability of steroids biotransformation. The use of these microorganisms in STP would be interesting to evaluate.

The decomposition processes (such as ozonation and chlorination processes) display a high potential for removing recalcitrant compounds (e.g., estrogens). However, little data exists, and most of researchers used synthetic water with estrogens concentrations over environmental relevant concentrations (Table 10). Therefore, it should be investigated whether these techniques are also feasible for estrogens removal at ng/L levels and from water containing others particles, such as wastewater. Moreover, the majority of advanced treatments produce by-products whose estrogenicity is unknown or in some cases higher or similar to their precursors [124,125].

Treatment of wastewater and sludge contaminated with phenols and other aromatic compounds (e.g., BPA, bE2, and EE2) with enzymes such as peroxidases [137–140] or polyphenol oxidases [139,141,142] is a new and interesting strategy. Since current researches develop the production of enzymes by using municipal and industrial wastewater and sludge, as basic substrate, the overall costs of enzyme production would be reduced [143]. Therefore, the enzymatic treatment process would be a cost-effective alternative for removing EDCs from municipal and/or industrial wastewater.

Finally, regarding to treatment processes advantages and disadvantages with respect to the EDCs removal, we could observe through this review that:

- Coagulation processes using iron or aluminium salts do not allow any EDCs removal and it is an expensive treatment process.
- PAC coagulation could remove a considerable amount of small-sized contaminants such as EDCs including hormones.
- Filtration processes (UF, MF, NF), used as hybrid process or not, can allow relatively high EDCs removal, however they are also expensive, require a significant maintenance to avoid membranes clogging.
- Membrane bioreactor combines the adsorption and biodegradation processes, and thus would be a good compromise for simultaneous CNP and EDCs removal.
- Advanced processes allow a high removal of recalcitrant compounds, however many by-products are released and could have an estrogenic activity higher than their precursors.

In conclusion, EDCs are of a general concern and are significant research subject. The epidemiological data gives evidence of a possible relationship between chemical exposure and harmful observed effects of endocrine disruption in the living beings.

Recent studies on the conventional wastewater treatment processes effectiveness show that the STPs are a significant EDCs point source, particularly for surface water and under ground water. Therefore, future research priorities should include wastewater treatment plant optimization to increase EDCs removal.

Acknowledgments

The authors are sincerely thankful the “Natural Sciences and Engineering Council of Canada (Grant A4984)” and “Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies” (Que., Canada), and to the “Generalitat of Catalunya” (Spain) for financial assistance.

References

- [1] Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrinedisrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993;101:378–84.
- [2] Health Canada. Human health and exposure to chemicals which disrupt estrogen, androgen and thyroid hormone physiology. Environmental and Occupational Toxicology Division, Environmental Health Directorate, HPB. Tunney’s Pasture, P.L., Canada; 1999.

- [3] Environment Canada. Endocrine disrupting substances in the environment.; 1999, http://www.ec.gc.ca/eds/fact/eds_e.pdf [July 19, 2003].
- [4] Filali-Meknassi Y, Tyagi RD, Surampalli RY, Barata C, Riva MC. Endocrine disrupting compounds in wastewater, sludge treatment processes and receiving waters: overview. *Pract Period Hazard Tox Radioact Waste Manag* 2004;8:1–18.
- [5] Commission of the European Communities. The implementation of the Community strategy for endocrine disrupters: A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. COM [1999], vol. 706.; 2001. p. 45.
- [6] Ying G-G, Williams B, Kookana R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environ Int* 2002;28:215–26.
- [7] Esperanza M, Suidan MT, Nishimura F, Wang Z-M, Sorial GA, Zafiro A, et al. Determination of sex hormones and nonylphenol ethoxylates in the aqueous matrixes of two pilot-scale municipal wastewater treatment plants. *Environ Sci Technol* 2004;38:3028–35.
- [8] Servos MR. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual Res J Can* 1999;34:123–77.
- [9] Spengler P, Köhner W, Metzger JW. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:2133–41.
- [10] USEPA, Report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Report No. EPA/630/R-96/012, Washington, DC, USA, 1997.
- [11] Council NR. Hormonally active agents in the environment. Committee on hormonally active agents in the environment. Washington, DC: National Research Council, 1999.
- [12] Schäfer AI, Waite TD. Removal of endocrine disrupters in advanced treatment—the Australian approach. In: *Proceedings of the IWA World Water Congress, Workshop Endocrine Disruptors*, IWA Specialist Group on assessment and control of hazardous substances in water (ACHSW); 2002. p. 37–51.

- [13] Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 1998;32:1549–58.
- [14] Rodgers-Gray TP, Jobling S, Morris S, Kelly C, Kirby S, Janbakhsh A, et al. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Environ Sci Technol* 2000;34:1521–8.
- [15] Aerni H-R, Kobler B, Rutishauser BV, Wettstein FE, Fischer R, Giger W, et al. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal Bioanal Chem* 2004;378:688–96.
- [16] Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter J. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 1994;8:275–85.
- [17] Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Routledge EJ, et al. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ Toxicol Chem* 1996;15:1993–2002.
- [18] Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Sumpter JP, et al. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by vitellogenesis in caged male trout. *Environ Toxicol Chem* 1997;16:534–42.
- [19] Nichols KM, Miles-Richardson SR, Snyder EM, Giesy JP. Effects of exposure to municipal wastewater in situ on the reproductive physiology of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 1999;18:2001–12.
- [20] Harries JE, Janbakhsh A, Jobling S, Matthiessen P, Sumpter JP, Tyler CR. Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. *Environ Toxicol Chem* 1999;18:932–7.
- [21] Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, et al. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 1996;104:1096–101.
- [22] USEPA, Draft detailed review paper on a fish two-generation toxicity test. EPA contract number 68-W-01-023, Washington, DC, USA, 2002.

- [23] Cargouët M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak S, Levi Y. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci Total Environ* 2004;324:55–66.
- [24] Fawell JK, Sheahan D, James HA, Hurst M, Scott S. Oestrogens and oestrogenic activity in raw and treated water in severn trent water. *Water Res* 2001;35:1240–4.
- [25] Johnson AC, Belfroid A, Di Corcia A. Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci Total Environ* 2000;256:163–73.
- [26] 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 receiving river water. *Environ Sci Technol* 2000;34:5059–66.
- [27] D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, et al. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci Total Environ* 2003;302:199–209.
- [28] Petrovic M, Solé M, López de Alda MJ, Barceló D. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ Toxicol Chem* 2002;21:2146–56.
- [29] Behnisch PA, Fujii K, Shiozaki K, Kawakami I, Sakai S. Estrogenic and dioxin-like potency in each step of a controlled landfill leachate treatment plant in Japan. *Chemosphere* 2001;43:977–84.
- [30] Danish Environmental Protection Agency (DEPA). Degradation of estrogens in sewage treatment processes. Environmental Project No. 899. Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment; 2004.
- [31] Belfroid AC, Van der Horst A, Vethaak AD, Schafer AJ, Rijs GBJ, Wegener J, et al. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and wastewater in Netherlands. *Sci Total Environ* 1999;225:101–8.
- [32] Larsson DGJ, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Petterson M, Berg AH, Olsson P-E, et al. Ethinyloestradiol—an undesired fish contraceptives? *Aquat Toxicol* 1999;42:91–7.

- [33] Xiao X-Y, McCalley DV, Mcevoy J. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *J Chromatogr A* 2001;923:195–204.
- [34] Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ* 1999;225:81–90.
- [35] Kuch HM, Ballschmiter K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the pictogram per liter range. *Environ Sci Technol* 2001;35:3201–6.
- [36] Laganà A, Bacaloni A, De Leva I, Faberi A, Fago G, Marinob A. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal Chim Acta* 2004;501:79–88.
- [37] Isobe T, Shiraishi H, Yasuda M, Shinoda A, Suzuki H, Morita M. Determination of estrogens and their conjugates in water using solidphase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003;984:195–202.
- [38] Huang C-H, Sedlak DL. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:133–9.
- [39] Majima K, Fukui T, Yuan J, Wang G, Matsumoto K. Quantitative measurement of 17 β -estradiol and estriol in river water by time-resolved fluoroimmunoassay. *Anal Sci* 2002;18:869–74.
- [40] Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol* 1998;32:2498–506.
- [41] Allen Y, Matthiesen P, Scott AP, Haworth S, Feist S, Thain JE. The extent of estrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments-further survey of flounder. *Sci Total Environ* 1999;233:5–20.
- [42] Lye CM, Frid CLJ, Gill ME, McCormick D. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Mar Pollut Bull* 1997;34:34–41.

- [43] White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 1994;135:175–82.
- [44] Fent K. *Ökotoxikologie: Umweltchemie – Toxikologie – Ökologie*, vol. 21. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag, 1998.
- [45] Preziosi P. Endocrine disrupters as environmental signallers: an introduction. *Pure Appl Chem* 1998;70:1617–31.
- [46] Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter JP. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ Sci Technol* 1998;32:1559–65.
- [47] Sumpter JP, Jobling S, Tyler CR. Oestrogenic substances in the aquatic environment and their potential impact on animals, particularly fish. In: Taylor EW, editor. *Toxicology of aquatic pollution: physiological, molecular and cellular approaches*. Cambridge University Press; 1996. p. 205–24.
- [48] Hansen P-D, Dizer H, Hock B, Marx A, Sherry J, McMaster M, et al. Vitellogenin—a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal Chem* 1998;17:448–51.
- [49] Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 1995;103:582–7.
- [50] Renner R. European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environ Sci Technol* 1997;31:316A–20A.
- [51] Cravedi J-P, Les xéno-estrogènes, perturbateurs endocriniens potentiels. Laboratoire des Xénobiotiques, Centre INRA de Toulouse, 1999. <http://www.inra.fr/PRESSE/COMMUNIQUE/nhsa99/dp7.htm> [Sept. 15, 2003].
- [52] Sea-River Magazine, Le nonylphénol: un “perturbateur endocrinien” pour les poissons. 2001. http://www.sea-river-news.com/06_1.htm [Sept. 15, 2003].
- [53] Kirk LA, Tyler CR, Lye CM, Sumpter JP. Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works. *Environ Toxicol Chem* 2002;21:972–9.

- [54] Jobling S, Sumpter JP. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol* 1993;27:361–72.
- [55] Fuerhacker M, Scharf S, Pichler W, Ertl T, Haberl R. Sources and behaviour of bismuth active substances (BiAS) in a municipal sewage treatment plant. *Sci Total Environ* 2001;277:95–100.
- [56] Ahel M, Molnar E, Ibric S, Giger W. Estrogenic metabolites of alkylphenol polyethoxylates in secondary sewage effluents and rivers. In: Proceedings of the third IWA specialized conference, hazard assessment and control of environmental contaminants—ECOHAZARD'99; 1999. p. 25–32.
- [57] Solé M, de Alda LMJ, Castillo M, Porte C, Ladegaard-Pedersen K, Barcelo D. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). *Environ Sci Technol* 2000;34:5076–83.
- [58] Isobe T, Nishiyama H, Nakashima A, Takada H. Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environ Sci Technol* 2001;35:1041–9.
- [59] Ahel M, Giger W. Determination of alkylphenols and alkylphenol monoand diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* 1985;57:1577–83.
- [60] Lee HB, Peart TE. Determination of 4-nonylphenol in effluent and sludge from sewage treatment plants. *Anal Chem* 1995;67:1976–80.
- [61] Snyder SA, Keith TL, Verbrugge DA, Snyder EM, Gross TS, Kannan K, et al. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environ Sci Technol* 1999;33:2814–20.
- [62] Ding W-H, Tzing S-H, Lo J-H. Occurrence and concentrations of aromatic surfactants and their degradation products in river waters of Taiwan. *Chemosphere* 1999;38:2597–606.
- [63] Bennie DT, Sullivan CA, Lee HB, Peart TE, Maguire RJ. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural water of the Laurentian Great Lakes Basin and the upper St. Lawrence River. *Sci Total Environ* 1997;193:263–75.

- [64] Dachs J, van Ry DA, Eisenreich SJ. Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of the lower Hudson river estuary. *Environ Sci Technol* 1999;33:266–2679.
- [65] Ferguson PL, Iden CR, Brownawell BJ. Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary. *Environ Sci Technol* 2001;35:2428–35.
- [66] Metcalfe CD, Hoover L, Sang S. Nonylphenol ethoxylates and their use in Canada, vol. 3. World Wildlife Fund Canada Report, 1996.
- [67] Bennie DT, Sullivan CA, Lee HB. Alkylphenol polyethoxylate metabolites in Canadian sewage treatment plant waste streams. In: *Proceedings of the SETAC 18th Annual Meeting, Society of Environmental Toxicology and Chemistry*; 1997.
- [68] Lee HB, Peart TE, Bennie DT, Maguire RJ. Determination of nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic acid metabolites in sewage treatment plant sludge by supercritical carbon dioxide extraction. *J Chromatogr A* 1997;785:385–94.
- [69] Sabik H, Gagné F, Blaise C, Marcogliese DJ, Jeannot R. Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence river and their bioconcentration by mussels (*Elliptio complanata*). *Chemosphere* 2003;51:349–56.
- [70] Onda K, Nakamura Y, Miya A, Katsu Y. The behavior of estrogenic substances in the biological treatment process of sewage. *Water Sci Technol* 2003;47:109–16.
- [71] Ternes TA, Kreckel P, Mueller J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci Total Environ* 1999;225:91–9.
- [72] Farré M, Klöter G, Petrovic M, Alonso MC, de Alda LMJ, Barceló D. Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment. *Anal Chim Acta* 2002;456:19–30.
- [73] Planas C, Guadayol JM, Droguet M, Escalas A, Rivera J, Caixach J. Degradation of polyethoxylated nonylphenols in a sewage treatment plant. Quantitative analysis by isotopic dilution-HRGC/MS. *Water Res* 2002;36:982–8.

- [74] Sheahan DA, Brighty GC, Daniel M, Kirby SJ, Hurst MR, Kennedy J, et al. Estrogenic activity measured in a sewage treatment works treating industrial inputs containing high concentrations of alkylphenolic compounds—a case study. *Environ Toxicol Chem* 2002;21:507–14.
- [75] Körner W, Bolz U, Sußmuth W, Hiller G, Schuller W, Hanf V, et al. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 2000;40:1131–42.
- [76] Svenson A, Allard A-S, Ek M. Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Res* 2003;37:4433–43.
- [77] Danish Environmental Protection Agency (DEPA). Feminisation of fish—the effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature. Environmental Project No. 729. Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment; 2002.
- [78] Danish Environmental Protection Agency (DEPA). Evaluation of analytical chemical methods for detection of estrogens in the environment. Working Report No. 44. Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment; 2003.
- [79] Lee H, Peart T. Determination of 17 β -estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. *J AOAC Int* 1998;81:1209–16.
- [80] Johnson AC, Sumpter JP. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ Sci Technol* 2001;35:4697–703.
- [81] Kozak RG, D’Haese I, Verstraete W. Pharmaceuticals in the environment: focus on 17 α -ethinyloestradiol. In: Kümmerer K, editor. *Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risk*. Heidelberg, Germany: Springer Verlag; 2001. p. 49–65.
- [82] Mastrup M, Jensen RL, Schäfer AI, Khan S. Fate modeling—an important tool for water recycling. In: Schäfer AI, Sherman P, Waite TD, editors. *Recent advances in water recycling technologies*. Australia: Brisbane; 2001. p. 103–12.
- [83] Birkett JW, Lester JN. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*. London, UK: IWA Publishing, 2003.

- [84] Lai KM, Johnson KK, Scrimshaw MD, Lester JN. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environ Sci Technol* 2000;34:3890–4.
- [85] Sayles G. Biological fate of estrogenic compounds associated with sewage treatment: a review. Cincinnati, OH: Effective Risk Management of Endocrine Disrupting Chemicals Workshop, 2001.
- [86] Hu J-Y, Aizawa T. Quantitative structure–activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic chemicals. *Water Res* 2003;37:1213–22.
- [87] Ahel M, Giger W. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 1993;26:1471–8.
- [88] Ternes TA, Andersen H, Gilberg D, Bonerz M. Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Anal Chem* 2002;74:3498–504.
- [89] Matsui S, Takigami H, Matsuda T, Taniguchi N, Adachi J, Kawami H, et al. Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment. *Water Sci Technol* 2000;42:173–9.
- [90] Schäfer AI, Mastrup M, Jensen RL. Enhancing particle interactions and removal of trace contaminants from water and wastewaters. *Desalination* 2002;147:243–50.
- [91] Schäfer AI, Nghiem DL, Waite TD. Removal of natural hormone estrone from water and wastewater using nanofiltration and reverse osmosis. *Environ Sci Technol* 2004;38:1888–96.
- [92] Kiso Y, Nishimura Y, Kitao T, Nishimura K. Rejection properties of nonphenylic pesticides with nanofiltration membranes. *J Membr Sci* 2000; 171:229–37.
- [93] Kiso Y, Kon T, Kitao T, Nishimura K. Rejection properties of alkyl phthalates with nanofiltration membranes. *J Membr Sci* 2001;182:205–14.
- [94] Chang S, Waite TD, Schäfer AI, Faneb AG. Adsorption of trace steroid estrogens to hollow fibre membranes hydrophobic. *Desalination* 2002; 146:381–6.
- [95] European Commission. Pollutants in urban wastewater and sewage sludge. London: European Commission, 2001.

- [96] Servos MR, Bennie DT, Burnison BK, Jurkovic A, McInnis R, Neheli T, et al. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* 2005;336:155–70.
- [97] Lee HB, Liu D. Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water Air Soil Pollut* 2002;134:353–68.
- [98] Layton AC, Gregory BW, Seward JR, Schultz TW, Sayler GS. Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee, USA. *Environ Sci Technol* 2000;34:3925–31.
- [99] Jürgens MD, Holthaus KIE, Johnson AC, Smith JJJ. The potential for estradiol and ethynilestradiol degradation in English rivers. *Environ Toxicol Chem* 2002;21:480–8.
- [100] Andreolini F, Borra C, Caccamo F, Di Corcia A, Samperi R. Estrogen conjugates in late-pregnancy fluids—extraction and group separation by a graphitized carbon-black cartridge and quantification by high-performance liquid-chromatography. *Anal Chem* 1987;59:1720–5.
- [101] Shore LS, Gurevitz M, Shemesh M. Estrogen as an environmental pollutant. *Bull Environ Contam Toxicol* 1993;51:361–6.
- [102] Tyler CR, Routledge EJ. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl Chem* 1998;70:1795–804.
- [103] Carballa M, Omil F, Lema JM, Llompart M, Garcia-Jares C, Rodriguez I, et al. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res* 2004;38:2918–26.
- [104] Dray J, Dray TF, Ullmann A. Hydrolysis of urinary metabolites of different steroid hormones by glucuronidase from *Escherichia coli*. *Ann Inst Pasteur* 1972;123:853–7.
- [105] Tyler C, Jobling RS, Sumpter JP. Endocrine disrupting in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol* 1998;28:319–61.
- [106] Carr BR, Griffin JE. Fertility controls and its complications. In: Wilson JD, Foester DW, Kronenberg HM, Reed LP, editors. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998. p. 901–25.

- [107] Turan A. Excretion of natural and synthetic estrogens and their metabolites: occurrence and behaviour. Endocrinically active chemicals in the environment. Berlin: German Federal Environment Agency, 1995.
- [108] Vader JS, van Ginkel CG, Sperling FMGM, de Jong J, de Boer W, de Graaf JS, et al. Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosphere* 2000;41:1239–43.
- [109] Shi J, Fujisawa S, Nakai S, Hosomi M. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Res* 2004;38:2323–30.
- [110] Fuerhacker M, Breithofer A, Jungbauer A. 17 β -Estradiol: behaviour during waste water treatment. *Chemosphere* 1999;39:1903–9.
- [111] Tanghe T, Devriese G, Verstraete W. Nonylphenol degradation in lab scale activated sludge units is temperature dependent. *Water Res* 1998;32:2889–96.
- [112] John DM, House WA, White GF. Environmental fate of nonylphenol ethoxylates: differential adsorption of homologs to components of river sediment. *Environ Toxicol Chem* 2000;19:293–300.
- [113] Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 1998;36:2149–73.
- [114] Morris SL, Lester JN. Behaviour and fate of polychlorinated biphenyls in a pilot wastewater treatment plant. *Water Res* 1994;28:1553–61.
- [115] Chau YK, Zhang S, Maguire RJ. Occurrence of butyltin species in sewage and sludge in Canada. *Sci Total Environ* 1992;121:271–81.
- [116] Fent K. Organotin compounds in municipal wastewater and sewage sludge: contamination, fate in treatment processes and ecotoxicological consequences. *Sci Total Environ* 1996;185:151–9.
- [117] Melcer H, Steel P, Bedford WK. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic nitrogen compounds in a municipal treatment plant. *Water Environ Res* 1995;67:926–34.

- [118] Hegeman MJM, van der Weijden C, Loch FG. Sorption of benzo(a)pyrene and phenanthrene on suspended harbour sediment as a function of sediment concentration and salinity, a laboratory study using solvent partition coefficient. *Environ Sci Technol* 1995;29:363–71.
- [119] Chiou CT, McGroddy SE, Kile DE. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environ Sci Technol* 1998;32:264–9.
- [120] Cicek N, Winnen H, Suidan MT, Wrenn BE, Urbain V, Manem J. Effectiveness of the membrane bioreactor in the biodegradation of high molecular weight compounds. *Water Res* 1998;32:1553–63.
- [121] Cicek N. Membrane bioreactors in the treatment of wastewater generated from agricultural industries and activities. In: *Proceedings of the AIC 2002 Meeting CSAE/SCGR Program Saskatoon*; 2002.
- [122] Cicek N, Franco JP, Suidan MT, Urbain V, Manem J. Characterization and comparison of a membrane bioreactor and a conventional activatedsludge system in the treatment of wastewater containing high-molecularweight compounds. *Water Environ Res* 1999;71:64–70.
- [123] Wintgens T, Gallenkemper M, Melin T. Endocrine disrupter removal from wastewater using membrane bioreactor and nanofiltration technology. *Desalination* 2002;146:387–91.
- [124] Hu J-Y, Cheng S, Aizawa T, Terao Y, Kunikane S. Products of aqueous chlorination of 17b-estradiol and their estrogenic activities. *Environ Sci Technol* 2003;37:5665–70.
- [125] Moriyama K, Matsufuji H, Chino M, Takeda M. Identification and behavior of reaction products formed by chlorination of ethynylestradiol. *Chemosphere* 2004;55:839–47.
- [126] Ternes TA, Stuber J, Herrmann N, McDowell D, Ried A, Kampmann M, et al. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Res* 2003;37:1976–82.
- [127] Nakagawa S, Kenmochi Y, Tutumi K, Tanaka T, Hirasawa I. A study on the degradation of endocrine disruptors and dioxins by ozonation and advanced oxidation processes. *J Chem Eng Jpn* 2002;35:840–7.

- [128] Lee B-C, Kamata M, Akatsuka Y, Takeda M, Ohno K, Kamei T, et al. Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. *Water Res* 2004;38:733–9.
- [129] Rudder JD, Wiele TVD, Dhooge W, Comhaire F, Verstraete W. Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17 α -ethynylestradiol (EE2). *Water Res* 2004;38:184–92.
- [130] Coleman HM, Eggins BR, Byrne JA, Palmer FL, King E. Photocatalytic degradation of 17-[beta]-oestradiol on immobilised TiO₂. *Appl Catal B Environ* 2000;24:L1–5.
- [131] Ohko Y, Iuchi K-I, Niwa C, Tatsuma T, Nakashima T, Iguchi T, et al. 17Beta-estradiol degradation by TiO₂ photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity. *Environ Sci Technol* 2002;36:4175–81.
- [132] Kosaka K, Yamada H, Matsui S, Shishida K. The effects of the coexisting compounds on the decomposition of micropollutants using the ozone/hydrogen peroxide process. *Water Sci Technol* 2000;42:353–61.
- [133] Huber MM, Canonica S, Park G-Y, von Gunten U. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. *Environ Sci Technol* 2003;37:1016–24.
- [134] Segmuller BE, Armstrong BL, Dunphy R, Oyler AR. Identification of autoxidation and photodegradation products of ethynylestradiol by online HPLC–NMR and HPLC–MS. *J Pharm Biomed* 2000;23:927–37.
- [135] Liu B, Liu X. Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions. *Sci Total Environ* 2004;320:269–74.
- [136] Donova MV, Egorova OV, Nikolayeva VM. Steroid 17 β -reduction by microorganisms—a review. *Process Biochem* 2005;40:2253–62.
- [137] Wagner M, Nicell JA. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res* 2002;36:4041–52.
- [138] Sakuyama H, Endo Y, Fujimoto K, Hatano Y. Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase. *J Biosci Bioeng* 2003;96:227–31.
- [139] Suzuki K, Hirai H, Murata H, Nishida T. Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethynylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res* 2003;37:1972–5.

[140] Filali-Meknassi Y, Auriol M, Adams C, Tyagi RD. Natural and synthetic hormones removal by enzymatic degradation. In: Proceedings of 20th Canadian Association on water quality (CAWQ); 2004.

[141] Ikehata K, Nicell JA. Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresour Technol* 2000;74:191–9.

[142] Bevilaqua JV, Cammarota MC, Freire DMG, Sant’Anna Jr GL. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatment. *Bras J Chem Eng* 2002;19:151–8.

[143] Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *J Environ Eng Sci* 2004;3:1–19.

Table 1: Estrogens concentrations in STP influent

Sampling site	Influent concentrations (ng/L)				Analysis Method	Reference
	Estrone	17 β -estradiol	Estriol	17 α -ethinylestradiol		
Paris, France	9.6-17.6	11.1-17.4	11.4-15.2	4.9-7.1	SPE/GC-MS	[23]
England	1.8-4.1	<0.3	-	<LOD ^a	SPE/GC-MS-MS	[24]
Germany	66	22.7	-	-	SPE/LC-ESI-MS-MS	[25]
Italy	52	12	80	3	SPE/LC-MS-MS	[26]
Rome, Italy	31	9.7	57	4.8	SPE/LC-MS-MS	[25]
Rome, Italy	44	11	72	-	SPE/LC-ESI-MS-MS	[27]
Barcelona, Spain	<2.5-115	<5-30.4	<0.25-70.7	<5	SPE/LC-MS	[28]
Japan	-	5	-	-	SPE/ELISA	[29]

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ESI: Interface electrospray

GC-MS: Gas chromatography-Mass spectrometry

GC-MS-MS: Gas chromatography-Tandem Mass spectrometry

LC-MS: Liquid chromatography-Mass spectrometry

LC-MS-MS: Liquid chromatography-Tandem Mass spectrometry

LOD: Limite of detection

SPE: Solid phase extraction

^a0.3 ng/L

Table 2 Estrogens concentrations in STP effluent

Sampling site	Effluent concentration (ng/L)						Analysis method	Reference
	Estrone	17 β -estradiol	17 α -estradiol	Estriol	17 α -ethinylestradiol	Mestranol		
Paris, France	6.2-7.2	4.5-8.6	-	5.0-7.3	2.7-4.5	-	SPE/GC-MS	[23]
Denmark	<2-11	<1-4.5	-	-	<1-5.2	-	-	[30]
Netherlands	<0.4-47	<0.6-12	<0.1-5	-	<0.2-7.5	-	SPE/GC-MS-MS	[31]
Sweden	5.8	1.1	-	-	4.5	-	SPE/GC-MS	[32]
England	1.4-76	2.7-48	-	-	<LOD ^a -4.3	-	SPE/GC-MS	[13]
England	<LOD ^b	<LOD ^b	-	-	<LOD ^b	-	SPE/GC-MS-MS	[24]
England	6.4-29	1.6-7.4	-	2-4	<LOD ^c	-	SPE/GC-NCI-MS	[33]
Germany	9	<LOD ^d	-	-	1	<LOD ^d	SPE/GC-MS-MS	[34]
Germany	14.6	4.6	-	-	-	-	SPE/LC-MS-MS	[25]
Germany	7	6	-	3	3	4	SPE/HRGC-MS	[35]
Germany (SW)	<LOD ^e -18	<LOD ^f -15	-	-	<LOD ^f -12	<LOD ^g -2.7	SPE/GC-MS	[9]
Italy	3	1.4	-	20.4	0.6	-	SPE/LC-ESI-MS-MS	[26]
Rome, Italy	24	4	-	11.7	1.4	-	SPE/LC-MS-MS	[25]
Rome, Italy	17	1.6	-	2.3	-	-	SPE/LC-ESI-MS-MS	[27]
Centre Italy	5-30	3-8	-	n.d.-1	n.d.	-	SPE/LC-ESI-MS-MS	[36]
Barcelona, Spain	<2.5-8.1	<5-14.5	-	<0.25-21.5	<5	-	SPE/LC-MS	[28]
Japan	-	<LOD ^d	-	-	-	-	SPE/ELISA	[29]
Japan	2.5-34	0.3-2.5	-	-	-	-	SPE/LC-MS-MS	[37]
Canada	3	6	-	-	9	<LOD ^d	SPE/GC-MS-MS	[34]
California, USA	-	0.2-4.1	-	-	0.2-2.4	-	SPE/ELISA	[38]

HRGC-MS: High Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry

NCI: Negative chemical ionisation

^b0.3 ng/L

^a0.2 ng/L

^c0.05 ng/L

^d1 ng/L

^f0.4 ng/L

^e0.7 ng/L

^g0.6 ng/L

Table 3: Concentrations of estrogens present in river water

Sampling site	Concentration (ng/L)						Analysis method	Reference
	Estrone	17 β -estradiol	17 α -estradiol	Estriol	17 α -ethinylestradiol	Mestranol		
France	1.1-3.0	1.4-3.2	-	1.0-2.5	1.1-2.9	-	SPE/GC-MS	[23]
Netherlands	<0.1-3.4	<0.3-5.5	<0.1-3	-	<0.1-4.3	-	SPE/GC-MS-MS	[31]
England	0.2-10	<LOD ^a -7.1	-	<LOD ^b -3.1	<LOD ^c	-	SPE/GC-NCI-MS	[33]
Germany	<LOD ^d	<LOD ^d	-	-	<LOD ^d	<LOD ^d	SPE/GC-MS-MS	[34]
Italy	1.5	0.11	-	0.33	0.04	-	SPE/LC-ESI-MS-MS	[26]
Spain (NE)	4.3	6.3	-	8	-	-	SPE/LC-MS	[28]
Japan	-	<LOD ^e	-	-	-	-	SPE/ELISA	[29]
Tokyo, Japan	-	32	-	5.5	-	-	SPE/TR-FIA	[39]
Japan	0.2-6.6	0.6-1.0	-	-	-	-	SPE/LC-MS-MS	[37]
California, USA	-	0.05-0.8	-	-	<0.05-0.07	-	SPE/ELISA	[38]

TR-FIA: Time-Resolved Fluoroimmunoassay

^a0.03 ng/L,

^b0.06 ng/L,

^c0.05 ng/L,

^d0.5 ng/L

^e1 ng/L.

Table 4: Concentrations of alkylphenols and their ethoxylates in STP effluent

Sampling site	Concentration (µg/L)				Analysis method	Reference
	NP	NP1EO	NP2EO	OP		
Germany	0.025-0.77	-	-	0.002-0.673	SPE/HRGC-MS	[35]
Spain	6-289	-	-	-	SPE/LC-MS	[57]
Japan	0.08-1.24	0.21-2.96	-	0.02-0.48	SPE/GC-MS	[58]
Switzerland	8	49	44	-	LLE/HPLC	[59]
Canada	0.8-15	-	-	0.17-1.7	GC-MS	[60]
USA	LOD ^a -37	-	-	LOD ^b -0.673	SPE/HPLC	[61]

HPLC: High-performance liquid chromatography

^a11 ng/L

^b2 ng/L

Table 5: Concentrations of alkylphenols and their ethoxylates in river water

Sampling site	Concentration (µg/L)				Analysis method	Reference
	NP	NP1EO	NP2EO	OP		
Germany	0.0067-0.134	-	-	0.0008-0.054	SPE/HRGC-MS	[35]
Spain	LOD ^a -644	-	-	-	SPE/LC-MS	[57]
Japan	0.05-1.08	0.04-0.81	-	0.01-0.18	SPE/GC-MS	[58]
Taiwan	1.8-10	-	-	-	SPE/GC-MS	[62]
Canada	<0.01-0.92	-	-	<0.005-0.084	GC-MS	[63]
	-	<0.02-7.8	<0.02-10	-	SPE/HPLC	
USA	LOD ^b -1.19	-	-	LOD ^c -0.081	SPE/HPLC	[61]
	12-95	-	-	-	SPE/GCMS	[64]
	0.077-0.416	0.056-0.326	0.038-0.398	0.00156-0.007	SPE/LC-MS	[65]

^a0.15 µg/L

^b11 ng/L

^c2 ng/L

Table 6: EDCs removal during various STPs treatment process

Compound	Concentration		Removal efficacy (%)	Treatment process	Matrix type	Reference
	Influent	Effluent				
17 β -estradiol	5 ng/L	<1 ng/L	>80	1	Municipal waste landfill	[29]
	11 ng/L	1.6 ng/L	86	2	Municipal STP	[27]
	9.69 ng/L	4 ng/L	59	2	Domestic STP	[25]
	28.1 ng/L	1.2 ng/L	96	2	Domestic STP	[70]
	-	-	100	2	Municipal STP	[71]
Estrone	44 ng/L	17 ng/L	61	2	Municipal STP	[27]
	31 ng/L	24 ng/L	23	2	Domestic STP	[25]
	43.1 ng/L	12.3 ng/L	69	2	Domestic STP	[70]
	-	-	83	2	Municipal STP	[71]
Estriol	72 ng/L	2.3 ng/L	97	2	Municipal STP	[27]
	57.29 ng/L	11.71 ng/L	80	2	Domestic STP	[25]
	381.5 ng/L	5.6 ng/L	99	2	Domestic STP	[70]
17 α -ethinylestradiol	4.84 ng/L	1.40 ng/L	71	2	Domestic STP	[25]
	-	-	78	2	Municipal STP	[71]
Phenol	6 mg/L	No detected	-	3	Municipal + tannery industry STP	[72]
Nitrophenol	11 mg/L	No detected	-	3	Municipal + tannery industry STP	[72]
2,4-dichlorophenol	83 mg/L	16 mg/L	81	3	Municipal + tannery industry STP	[72]
NP1EO	140.03 mg/L	1.99 mg/L	99	4	Industrial + domestic STP	[73]
NP2EO	140.03 mg/L	1.99 mg/L	99	4	Industrial + domestic STP	[73]

NP	2.8 mg/L	<0.05 mg/L	>98	1	Municipal waste landfill	[29]
	1.5 mg/L	6.6 mg/L	-	3	Municipal + tannery industry STP	[72]
	57.64 mg/L	0.65 mg/L	99	4	Industrial + domestic STP	[73]
	10 mg/L	1 mg/L	90	2	Domestic STP	[70]
4-NP	73 mg/L	47.5 mg/L	35	5	Industrial STP	[74]
	2.37 mg/L	0.95 mg/L	60	6	Municipal STP	[75]
	0.88 mg/L	0.32 mg/L	64	6	Municipal STP	[75]
4-t-OP	0.88 mg/L	0.32 mg/L	64	6	Municipal STP	[75]
PCBs	46 ng/L	1.2 ng/L	97	1	Municipal waste landfill	[29]
BPA	0.13 mg/L	<0.005 mg/L	>96	1	Municipal waste landfill	[29]
	7.1 mg/L	No detected	-	3	Municipal + tannery industry STP	[72]
	2.5 mg/L	No detected	-	3	Municipal STP	[72]
	1.776 mg/L	0.210 mg/L	88	6	Municipal STP	[75]
	0.55 mg/L	0.14 mg/L	75	2	Domestic STP	[70]
	21 pg/L	5.2 pg/L	75	1	Municipal waste landfill	[29]
PCDD	21 pg/L	5.2 pg/L	75	1	Municipal waste landfill	[29]
PCDF	8.7 pg/L	3.3 pg/L	62	1	Municipal waste landfill	[29]

1 Biodegradation/sedimentation + additional treatment with charcoal

2 Activated sludge

3 Physicochemical treatment + biological processes

4 Pretreatment + primary clarifier + aeration tanks + secondary clarifier

5 Pretreatment + primary settling + biofilters

6 Primary clarifier + activated sludge + biological nitrogen removal + biological phosphorus removal + settle tank

Table 7: Ambiguity on the occurred estrogens removal processes mechanism

Coumpond	Sorption	Biodegradation	Soluble	Reference
Estriol	-	80-95%	-	[79]
	-	95%	-	[26]
Estrone	-	a	-	[80]
17 β -estradiol	a	-	-	
	-	90%	-	[34]
	28%	-	-	[81]
17 α -ethinylestradiol	68%	-	-	
	-	20%	-	[78]
17 β -estradiol equivalent	3% ^b	87% ^b	-	[75]
Estrogen	Great amount	10%	Majority	[82]

^aJohnson and Sumpter [80] do not give a precise percentage but support that 17 β -estradiol is adsorbed whereas estrone is biodegradable.

^bOn the basis of estrogenic activity.

Table 8: Log octanol/water partition coefficients of estrogens and xeno-estrogens

Compound	Log (Kow)	Reference
17 α -ethinylestradiol	3.67-4.15	[71, 84, 85]
17 β -estradiol	3.94-4.01	[84, 85]
Estrone	2.45-3.43	[84, 85]
Estriol	2.55-2.81	[84, 85]
BPA	3.32, 3.43	[86]
Phenol	1.48	[86]
4-n-NP	4.48, 6.19	[86, 87]
4-t-OP	4.12, 5.66	[86, 87]
NP1EO	4.17	[87]
NP2EO	4.21	[87]
OP1EO	4.10	[6]
OP2EO	4.00	[6]

Table 9: Estrogenic activity evaluation during various municipal STPs treatment process

Treatment process		Concentration (ng estradiol equivalent /L)		Removal efficacy (%)
Biological treatment	Precipitation	Influent	Effluent	
-	Direct, Al	11.9	12.4	-
-	Direct, Al	10.8	12.7	-
-	Direct, Fe(III)	5.45	5.9	-
-	Direct, lime	4.15	1.1	73.5
AS	Pre, Fe(III)	29.8	12.3	58.7
AS	Simultaneous, Al	5	0.3	94
AS	Simultaneous, Al	10.2	4.3	57.8
AS	Simultaneous, Fe(III)	5	1.6	68
AS	Simultaneous + post, Fe(III)	12.5	1.45	88.4
AS	Pre + post, Al	8	2.55	68.1
AS biosorption	Post, Al	6.05	1.2	80.2
AS + Nitrogen removal	Post, Al	3.85	<0.1	>97.4
AS + Nitrogen removal	Pre, Fe(II)	19.5	<0.1	>99.5
Trickling filter/AS	Pre + post, Al	6.95	<0.1	>98.5
Trickling filter	Pre, Al	6.75	1.7	74.8
Trickling filter	Post, Al	22.35	14.85	33.6
Trickling filter	Post, Al	3.05	10.75	-
Biorotor	Post, Fe(III)	1.6	5.25	-

AS: Activated sludge

Table 10: Removal of estrogens by advanced treatment processes

	Compound	Concentration	Removal (%)	Reaction time	Added dose	Reference
Ozonation	Estrone	0.015 µg/L ⁽¹⁾	>80	18 min	5 mg O ₃ /L	[126]
	Estrone, 17β-estradiol	9.7-28 ng/L ⁽²⁾ 3.0-21 ng/L ⁽²⁾	95	10 min	5 mg O ₃ /L	[127]
Chlorination	17β-estradiol	50 µg/L ⁽³⁾	100	10 min	1.46 mg/L of sodium hypochlorite	[124]
	17β-estradiol	10 ⁻⁷ M ⁽³⁾	(a)	36 H	1.5 mg/L of chlorine	[128]
	17α-ethinylestradiol	0.2 mmol/L ⁽³⁾	100	5 min	1mmol/L of chlorine	[125]
MnO	17α-ethinylestradiol	15 µg/L ⁽³⁾	81.7	1.12 H	-	[129]
TiO ₂	17β-estradiol	0.05-3 µmol/L ⁽³⁾	98	3.5 H	-	[130]
TiO ₂ + UV	17β-estradiol	10 ⁻⁶ M ⁽³⁾	99	30 min	1.0 g/L of TiO ₂ in suspension	[131]
			100 ^(b)	3 H		

^(a) Complete removal of estrogenic activity

^(b) Decomposed completely into CO₂

⁽¹⁾ Municipal STP effluent

⁽²⁾ Wastewater from secondary treatment

⁽³⁾ Synthetic water

APPENDICE B

PRÉSENCE ET DEVENIR DES HORMONES STÉROÏDIENNES DANS LES STATIONS DE TRAITEMENT DES EAUX USÉES

L'appendice B est constituée de la revue suivante : Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., (2007). **Présence et devenir des hormones stéroïdiennes dans les stations de traitement des eaux usées.** *Revue des Sciences de l'Eau*, 20(1), 89-108.

RÉSUMÉ

Différents produits chimiques naturels et d'origine industrielle présentent une activité endocrinienne. Ces composés sont susceptibles d'agir sur le système endocrinien des animaux et des êtres humains (altération ou déficiences des fonctions reproductrices, occurrence de tumeurs malignes, etc.). De nos jours, il reste de nombreuses questions en suspens (ampleur de la contamination, devenir dans l'environnement, etc.) et le caractère persistant de ces substances en fait un problème majeur pour les générations futures. De plus, plusieurs études ont montré que les estrogènes naturels (tels que l'estrone, le 17β -estradiol et l'estriol) et l'estrogène synthétique (17α -éthynylestradiol) sont les composés les plus estrogéniques, présents dans les effluents de stations de traitement des eaux usées. En conséquence, ces estrogènes peuvent rejoindre les eaux de surfaces et les contaminer. En effet, des concentrations aussi faibles que 0.1 ng/L peuvent provoquer des effets estrogéniques chez les organismes aquatiques exposés. Cette revue s'est donc concentrée sur la présence de ce type de composés dans les eaux de surface et usées, et plusieurs procédés de traitement sont discutés par rapport à leurs capacités d'enlèvement des estrogènes. Ainsi, le traitement primaire seul ne permet pas l'enlèvement des estrogènes des eaux usées, alors qu'un traitement secondaire à boue activée réduit généralement les quantités d'estrogènes. Les procédés dits avancés montrent un potentiel élevé pour l'enlèvement des estrogènes, bien qu'ils peuvent former des sous-produits estrogéniques et/ou cancérigènes. Finalement, les systèmes enzymatiques pourraient être des procédés innovateurs pour le traitement des estrogènes, puisqu'ils montrent un potentiel élevé pour l'enlèvement des composés aromatiques dans les eaux usées.

Mots clés: Perturbateur endocrinien; Estrogènes; Hormones stéroïdiennes; Eaux usées; Eaux de surface

ABSTRACT

Various natural chemicals and certain contaminants from industries present an endocrine activity. These substances are likely to act on animal and human endocrine system (deterioration or reproductive functions deficiencies, malignant tumors occurrence, etc). Nowadays, many questions related to these compounds are not resolved and the persistent character of these compounds makes it a major problem for future generations. Furthermore, diverse studies determined that natural estrogens (e.g., estrone, 17β -estradiol and estriol) and synthetic estrogen (17α -ethinylestradiol) are the most estrogenic compounds in wastewater treatment plant effluents. Thus, these estrogens can reach surface water and contaminate it. Indeed, concentrations as low as 0.1 ng/L can induce estrogenic effects in exposed aquatic organisms. This review concentrated on this type of compounds in surface water and wastewater, and a number of treatment processes are discussed with regard to their potential on endocrine disrupting chemicals removal. In the primary treatment effluent, limited removal of estrogens has been observed, while secondary treatment involving activated sludge generally reduces all estrogens effluents concentrations. The advanced processes display a high potential for removing estrogens, although they may produce estrogenic and/or carcinogenic by-products. Enzymatic processes could be an innovative strategy for estrogens removal since they show a high potential to remove aromatic compounds from wastewater.

Keywords: Endocrine Disrupting Chemicals; Estrogens; Steroid hormones; Wastewater; Surface water

1. INTRODUCTION

Les systèmes endocriniens jouent un rôle essentiel dans la régulation des procédés métaboliques. Une perturbation de n'importe quel de ces systèmes peut provoquer des effets néfastes sur différents organes et fonctions de l'organisme (WHO, 2002). L'agence de la protection de l'environnement des États-Unis (U.S. EPA) a proposé une définition détaillée d'un perturbateur endocrinien (EDC) : « un perturbateur endocrinien est un agent exogène, qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles présentes dans l'organisme, qui sont responsables de la maintenance de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et/ou du comportement. » (U.S. EPA, 1997).

Les hormones stéroïdiennes naturelles (estrone – E1, 17 β -estradiol – β E2, estriol – E3) et synthétiques (17 α -éthynylestradiol – EE2) (Tableau 1) correspondent aux EDCs, qui contribuent le plus à l'activité estrogénique observée dans les effluents domestiques (AERNI *et al.*, 2004; LEUSCH *et al.*, 2005; RODGERS-GRAY *et al.*, 2000) et les eaux réceptrices (BELFROID *et al.*, 1999; TERNES *et al.*, 1999a). Généralement, les xéno-estrogènes, tels que les alkylphénols, exhibent une activité estrogénique plus faible que les hormones stéroïdiennes (Figure 1), même si leur concentration dans les eaux est normalement plus élevée (GUTENDORF ET WESTENDORF, 2001; SPENGLER *et al.*, 2001). Par ailleurs, récemment il a été montré que les estrogènes sécrétés par les humains, via les systèmes d'eaux usées, sont les principaux composés causant la féminisation des poissons (DEPA, 2003). La source la plus susceptible des estrogènes dans l'environnement aquatique est la décharge des effluents municipaux (JÜRGENS *et al.*, 2002), ainsi que le ruissellement urbain et agricole (LAYTON *et al.*, 2000).

Les êtres humains sécrètent des hormones stéroïdiennes, principalement via les urines (JÜRGENS *et al.*, 2002; YING *et al.*, 2002). Les trois estrogènes naturels (E1, β E2, E3) sont des hormones stéroïdiennes femelles, qui sont produites naturellement par les êtres humains femelles et mâles (Tableau 2). De plus, les estrogènes naturels et synthétiques sont utilisés en large quantité dans les médicaments, comme les contraceptifs. Approximativement 65% du β E2 ou du E1 (DEPA, 2002) et 26% du EE2 (REED *et al.*, 1972, cité par JOHNSON *et al.*, 2000) administrés oralement sont sécrétés dans les urines. D'ailleurs, les contraceptifs oraux sont les produits pharmaceutiques les plus vendus dans le monde. Il est évalué que plus de 100 millions de femmes dans le monde (POPULATION REPORTS, 2000), dont plus de 10 millions aux

Etats-Unis (ARCAND-HOY *et al.*, 1998), ont recourt aux pilules contraceptives.

En outre, la sécrétion des estrogènes naturels (E1, β E2 et le 17 α -estradiol – α E2 (Tableau 1), ainsi que leurs conjugués) par les animaux de ferme représente potentiellement une source importante de pollution de l'environnement (DEPA, 2003; HANSELMAN *et al.*, 2003; KOLODZIEJ *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2003; SARMAH *et al.*, 2005; YING *et al.*, 2002). De plus, l'engrais de bétail contient des quantités significatives en β E2, en E1 et en E3, qui peut, par épandage agricole, potentiellement contaminer les eaux de surface et souterraines (HANSELMAN *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003).

Les quantités d'estrogènes sécrétées par les animaux de fermes dépendent de l'espèce et du type de production animale (Tableau 3). Par conséquent, les évaluations des quantités totales sécrétées sont entourées d'incertitudes, de plus que les différences régionales dans la pratique agricole animale doivent être considérées (DEPA, 2003). Par ailleurs, en raison de la nature de la matrice et de la difficulté qui en résulte pour détecter les estrogènes, très peu d'investigations sont effectuées sur la détermination des concentrations en estrogènes d'origine animale dans le fumier et le sol.

D'autre part, le traitement des bétails avec des hormones naturelles ou synthétiques est un procédé fréquemment employé dans certains pays pour production animale, afin de contrôler le cycle œstral, de traiter les problèmes de reproduction et provoquer l'avortement (REFSDAL, 2000). Cependant, cette pratique pourrait considérablement augmenter la génération des hormones stéroïdiennes dans les urines des bétails (YING *et al.*, 2002).

L'aquaculture représente une autre source d'hormones stéroïdiennes pour les eaux de surface (KOLODZIEJ *et al.*, 2004). En effet, KOLODZIEJ *et al.* (2004) ont noté que les concentrations en β E2 et E1 observées au niveau des effluents des industries d'aquaculture sont comparables aux concentrations typiquement observées dans les effluents des stations de traitement des eaux usées (STEPS) municipales.

2. LES TRAITEMENTS DES STATIONS D'ÉPURATION

La présence des estrogènes dans les eaux de surface a été principalement allouée à leur enlèvement incomplet dans les procédés de traitement des eaux usées (DEPA, 2002; KÖRNER *et al.*, 2000; LAYTON *et al.*, 2000). En effet, bien qu'un enlèvement partiel des estrogènes a

lieu, les systèmes conventionnels de traitement des eaux usées ne sont pas généralement conçus pour enlever ce type de composés (FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004a; JÜRGENS *et al.*, 2002).

De récentes recherches ont donc montré que plusieurs affluents et effluents de STEP (Tableaux 4 et 5) et plusieurs rivières (Tableau 6) à travers le monde contiennent des quantités en estrogènes suffisantes pour induire des effets néfastes chez les poissons. Plusieurs études (HARRIES *et al.*, 1997; WHITE *et al.*, 1994) ont montré que des poissons mâles de rivière produisent de la vitellogénine (VTG), une protéine précurseur du vitellus, quand ils sont exposés à des effluents d'eaux usées ou à des eaux de surface souillées. La VTG est une protéine seulement présente chez les poissons femelles, qui est induite par une activité estrogénique. Ainsi, sa présence chez les poissons mâles suggère une exposition à des produits chimiques estrogéniques (JOHNSON ET SUMPTER, 2001). Des études sur le terrain employant des cages contenant des truites (*Oncorhynchus mykiss*), des gardons cyprinicoles sauvages (*Rutilus rutilus*) (JOBLING *et al.*, 1998) et des flets marins (*Platichthys flesus*) (ALLEN *et al.*, 1999) ont démontré que l'estrogénicité persiste dans les eaux réceptrices, et les niveaux présents dans les rivières sont assez élevés pour induire des conséquences sérieuses sur la reproduction des espèces. De plus, les estrogènes naturels et synthétiques semblent être les principaux responsables de la perturbation endocrinienne chez les poissons (DESBROW *et al.*, 1998; ROUTLEDGE *et al.*, 1998). En effet, HANSEN *et al.* (1998) et PURDOM *et al.* (1994) ont remarqué que des concentrations en β E2 aussi faibles que 1 ng/l induisent de la VTG chez les truites mâles. Dans l'étude réalisée par PURDOM *et al.* (1994), le composé EE2 a pu induire de la VTG chez les poissons mâles à partir d'une concentration de 0.1 ng/l. Les différentes limites estrogéniques pouvant induire de la VTG chez un organisme sont synthétisées dans le Tableau 7. Ainsi, les concentrations des estrogènes relevées dans les rivières (Tableau 6) sont généralement supérieures à la plus faible concentration pouvant induire un effet estrogénique chez les organismes aquatiques exposés (Tableau 7). De plus, beaucoup de communautés mondiales, dont l'Europe, utilisent, pour leur production d'eau potable, des ressources en eau provenant, en grande partie, des rivières et des nappes phréatiques (FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004a).

2.1. Les traitements conventionnels

Très peu de données existent sur le devenir des estrogènes le long des procédés des STEPs (DEPA, 2003; TERNES *et al.*, 1999b). De plus, une grande ambiguïté persiste sur les processus d'enlèvement mis en jeu (Tableau 8), et selon les auteurs les proportions d'enlèvement entre la sorption et la biodégradation sont variables. Il est donc nécessaire d'approfondir les connaissances concernant les mécanismes d'enlèvement afin d'améliorer les efficacités des systèmes de traitement existants.

2.1.1. Traitements physiques

Les techniques mécaniques de séparation, comme la sédimentation, provoqueraient un enlèvement significatif des estrogènes de la phase aqueuse vers les boues primaires et secondaires (BIRKETT ET LESTER, 2003). La caractéristique principale, qui détermine le devenir d'un contaminant donné dans l'eau, est sa capacité à réagir avec des substances particulières. Ces substances particulières peuvent être naturelles (argile, sédiments, micro-organismes) ou ajoutées pendant le traitement (boues activées, charbon actif en poudre, résine échangeuse d'ions, coagulants) (SCHÄFER ET WAITE, 2002). La solubilité aqueuse, le coefficient de partage organique carbone/eau (K_{OC}) et le coefficient de partage octanol-eau (K_{OW} , Tableau 1) influencent la sorption d'un composé pendant le traitement (BIRKETT ET LESTER, 2003). Les valeurs du $\log(K_{OW})$ des estrogènes indiquent que ces composés devraient sensiblement s'adsorber sur les sédiments et les boues (TERNES *et al.*, 2002). Cette hypothèse est confortée par la détection de concentrations élevées en estrogènes dans l'eau provenant de la déshydratation des boues d'épuration (MATSUI *et al.*, 2000) et dans les boues d'épuration digérées (TERNES *et al.*, 2002). En plus de la sorption sur les solides en suspension comme mécanisme d'enlèvement, il est possible que les composés puissent être adsorbés sur des corps gras non polaires ainsi que des lipides présents dans les eaux usées brutes (BIRKETT ET LESTER, 2003).

Les composés organiques à l'état de trace, tels que les hormones stéroïdiennes naturelles, peuvent être également enlevés en utilisant la nanofiltration (NF) ou l'osmose inverse (RO) et peuvent ainsi s'accumuler dans le résidu solide concentré (SCHÄFER *et al.*, 2003). La microfiltration (MF) et l'ultrafiltration (UF) n'enlèvent pas normalement les petits composés polaires, cependant SCHÄFER ET WAITE (2002) ont observé que l'enlèvement des

contaminants à l'état de trace par des membranes submergées de MF et d'UF était aussi élevé que lors d'un traitement avec du charbon actif en poudre (PAC). Cet enlèvement était élevé pour des valeurs de pH faibles et neutres, alors qu'il était sensiblement plus faible à un pH supérieur à 10.5. Les études de CHANG *et al.* (2002) sur la MF ont confirmé que des concentrations significatives d'hormones stéroïdiennes naturelles, telles que E1, pouvaient s'accumuler sur les membranes hydrophobes à fibres creuses grâce à la sorption. Par ailleurs, SNYDER (2002) a observé que quand les molécules prennent une charge négative à pH élevé, une répulsion entre la membrane chargée négativement et les anions organiques cause la réduction de l'adsorption lors d'un procédé de NF, et le transport des particules est alors facilité par les membranes. Cependant, il n'y a aucun effet du pH sur la rétention quand les pores sont plus petits que les contaminants, et dans ce cas la membrane est une barrière efficace indépendamment des interactions chimiques (SNYDER, 2002).

SCHÄFER *et al.* (2002) ont également montré que la présence de substances particulières, qui adsorbent de tels contaminants, peut de manière significative augmenter la capacité d'une MF, d'une UF, et d'une NF, pour enlever les contaminants à l'état de trace. Ainsi, un prétraitement approprié des eaux usées suivi d'un procédé hybride – MF ou UF combiné avec, par exemple, du PAC, un coagulant ou une résine échangeuse d'ion (MIEX) – pourrait enlever une quantité considérable de contaminants de petite taille, tels que les hormones stéroïdiennes (SCHÄFER *et al.*, 2002). En effet, SCHÄFER *et al.* (2001) ont montré qu'un procédé hybride couplant une MIEX à une MF a permis une adsorption jusqu'à 70% de E1. Par ailleurs, ONG *et al.* (2001) ont signalé que le procédé hybride, PAC couplé à une MF, s'est avéré très efficace pour l'enlèvement de E1 (jusqu'à 90%) pour les conditions étudiées.

Il est donc important de comprendre les effets de rétention, d'adsorption et de désorption avant de choisir la membrane, qui doit agir comme une barrière fiable aux contaminants (SCHÄFER ET WAITE, 2002). De ce fait, des recherches sur les aspects fondamentaux et appliqués du procédé membranaire pourront mener à une optimisation de son efficacité et contribuer à l'amélioration des stratégies des traitements (FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004a).

2.1.2. Traitements chimiques

Des recherches comparatives ont été menées sur les adsorbants utilisés communément dans l'industrie de traitement des eaux, incluant le PAC, le chlorure ferrique (FeCl_3) et le MIEX, qui permettent généralement d'enlever des contaminants de petite taille, tels que les hormones stéroïdiennes (SCHÄFER ET WAITE, 2002). De plus, Les résultats ont démontré que le FeCl_3 et le MIEX ne sont pas très adéquats pour enlever les estrogènes. Par contre, ONG *et al.* (2001) et SCHÄFER ET WAITE (2002) ont montré que le PAC est très efficace vis à vis de l'enlèvement de E1. Par ailleurs, ZHANG ET ZHOU (2005) ont remarqué que la capacité d'adsorption du charbon actif, pour l'enlèvement de E1 et βE2 , décroît lorsque que des surfactants et/ou de l'acide humique sont présents.

2.1.3. Traitements biologiques

Dans une étude sur la distribution en E1 et en βE2 dans 18 stations municipales de traitement d'eaux usées à travers le Canada, SERVOS *et al.* (2005) ont noté que le lit bactérien n'a permis aucun enlèvement significatif du βE2 . De plus, SVENSON *et al.* (2003) ont rapporté que les lits bactériens étaient moins efficaces que les systèmes à boues activées pour l'enlèvement de l'activité estrogénique, et les taux d'enlèvement les plus élevés ont été obtenus dans les stations de traitement utilisant des procédés combinant des traitements biologique et chimique de la matière organique, de l'azote et du phosphore. Par ailleurs, SERVOS *et al.* (2005) ont rapporté que les lagunes étaient généralement très efficaces pour l'enlèvement du βE2 (80% à 98% d'enlèvement), et que les stations avec un procédé de nitrification avaient permis une augmentation du taux d'enlèvement des hormones et de leur activité estrogénique.

Cependant, le procédé à boue activée ne permet pas une complète biodégradation ou conversion en biomasse des composés organiques présents à l'affluent des STEP. En effet, les estrogènes retrouvés dans les effluents des STEP sont des sous-produits d'une décomposition incomplète (JOHNSON ET SUMPTER, 2001). Les études en batch réalisées par JOHNSON ET SUMPTER (2001) ont indiqué que E1 et EE2 ne sont pas complètement éliminés dans un traitement à boue activée, dans les configurations actuelles du procédé. Les données recueillies (Tableaux 9 et 10) suggèrent que les procédés à boue activée peuvent enlever plus de 60% de βE2 , de E3 et de EE2, tandis que les performances d'enlèvement pour E1 apparaissent être plus faibles et beaucoup plus variables. De plus, BARONTI *et al.* (2000) ont relevé, dans six STEP employant un

système à boues activées, que dans quatre tests sur trente, les concentrations à l'effluent en E1 étaient encore plus élevées que les concentrations à l'affluent.

JOHNSON ET SUMPTER (2001) et ONDA *et al.* (2003) ont conclu qu'il est nécessaire de considérer le procédé de conversion du β E2 en E1. En effet, les résultats en batch obtenus par ESPERANZA *et al.* (2004) et ONDA *et al.* (2003) ont indiqué que β E2 était transformé en E1, comme produit intermédiaire. LEE ET LIU (2002) ont examiné le devenir du β E2 dans des réacteurs à boues activées aérobies et anaérobies, et ont observé une rapide dégradation du β E2 en E1, mais n'ont pas observé la formation d'autres métabolites majeurs et/ou stables. De plus, chez les humains et les animaux, les estrogènes sont sécrétés dans les urines comme glucuroconjugués ou conjugués sulfatés (JÜRGENS *et al.*, 2002; LAYTON *et al.*, 2000). Sur cette base, JOHNSON ET SUMPTER (2001) ont présumé que le comportement anormal du composé E1 libre observé dans leur étude et dans celles de BARONTI *et al.* (2000) et SHORE *et al.* (1993), était le résultat d'une déconjugaison microbienne du conjugué E1 – estrone-3-sulfate (E1-3S) – pendant le traitement à boues activées de la STEP. En effet, un certain nombre d'études ont suggéré que la déconjugaison pourrait se produire à travers les procédés microbiens dans les STEPs (ALLEN *et al.*, 1999; DESBROW *et al.*, 1998; JÜRGENS *et al.*, 2002; LAYTON *et al.*, 2000; TERNES *et al.*, 1999b; TYLER ET ROUTLEDGE, 1998) et dans les rivières (ALLEN *et al.*, 1999). La Figure 2 représente une schématisation simplifiée du cheminement du β E2 et de E1 durant un procédé biologique.

Par ailleurs, la forme des estrogènes influence considérablement le pouvoir estrogénique du composé. MATSUI *et al.* (2000) ont comparé l'activité estrogénique de divers estrogènes. Les auteurs ont conclu que les potentiels estrogéniques des formes conjuguées des estrogènes sont visiblement très inférieurs aux activités estrogéniques des formes non-conjuguées. Le clivage du glucuroconjugué pendant le traitement peut donc considérablement augmenter l'activité estrogénique de l'effluent (SERVOS *et al.*, 2005). Cependant, la conjugaison augmente sa solubilité dans l'eau et ainsi ces composés deviennent plus mobiles dans l'environnement que les hormones libres correspondantes (KOZAK *et al.*, 2001).

De même, l'hormone synthétique EE2 est métabolisée dans le corps humain avant sa sécrétion. Elle se retrouve alors surtout sous la forme conjuguée (CARR *et al.*, 1998; JÜRGENS *et al.*, 2002). Dans un système à boues activées, TURAN (1995) n'a rapporté aucun changement dans la

concentration en EE2 après plus de 120 heures de traitement. D'autre part, dans des expériences en laboratoire avec des boues activées provenant de STEP's municipales, TERNES *et al.* (1999b) ont confirmé, sous condition aérobie, la persistance du EE2. Cependant, quand VADER *et al.* (2000) ont ajouté de l'hydrazine, en tant que donneur externe d'électrons pour fournir de l'énergie réductrice illimitée, la dégradation du EE2 était alors légèrement plus importante. De plus, LAYTON *et al.* (2000) et VADER *et al.* (2000) ont constaté que sous des conditions de dénitrification, il n'y avait aucune dégradation du EE2, tandis que des boues nitrifiées oxydaient le EE2 en composés plus hydrophobes (VADER *et al.*, 2000). Par contre, LEE ET LIU (2002) ont prouvé, à la suite d'expériences en batch, que le β EE2 était sous des conditions anaérobies plus persistant que sous des conditions aérobies, mais restait toujours biodégradable. Cependant, DEPA (2004) ont observé que dans un système de boue activée sous conditions anaérobies, les taux de dégradation en E1 et EE2 étaient 10 à 20 fois inférieurs que sous conditions aérobies, alors que la dégradation du β EE2 n'était sensiblement pas changée. Par ailleurs, l'enlèvement des estrogènes peut être influencé par le temps de rétention hydraulique (TRH) et l'âge de boues (TRS) employés par les STEP's (BIRKETT ET LESTER, 2003; DEPA, 2002). Par ailleurs, SHI *et al.* (2004) ont étudié la biodégradabilité des estrogènes naturels et synthétiques en employant des boues activées nitrifiées (NAS). Les résultats ont confirmé que le NAS dégrade de manière significative les estrogènes naturels et synthétiques. Parmi les quatre estrogènes, le β EE2 a été le plus facilement dégradé et il est clair que E1 n'ait été seulement qu'un sous-produit transitoire et consécutivement dégradé en d'autres composés par le NAS. Concernant le EE2, SHI *et al.* (2004) ont trouvé le même comportement que rapporté par VADER *et al.* (2000). SHI *et al.* (2004) ont aussi montré que les bactéries capables d'oxyder l'ammonium, telle que *Nitrosomonas europaea*, peut contribuer à la dégradation des estrogènes par le NAS. Toutefois, le NAS dégrade les estrogènes et leurs sous-produits, alors que *Nitrosomonas europaea* ne dégrade que les estrogènes. Ainsi, d'autres micro-organismes pourraient être responsables de la dégradation des sous-produits. En effet, E1 a été produit quand le NAS a dégradé le β EE2, alors que E1 n'a pas été produit durant la dégradation du β EE2 par *Nitrosomonas europaea*. Ainsi, la dégradation du β EE2 par la formation intermédiaire de E1 est considérée être provoquée par d'autres bactéries hétérotrophes et non pas par des bactéries nitrifiantes, telle que *Nitrosomonas europaea*.

D'autre part, comme les estrogènes sont des composés organiques hydrophobes de faible volatilité (Tableau 1), la sorption dans les boues pourrait jouer un rôle important dans

l'enlèvement de ces composés durant le traitement biologique. En général, pour les composés les plus hydrophobes, comme le EE2, la sorption dans les boues semble jouer un rôle important dans l'enlèvement de ces composés présents en solution, tandis que pour les composés relativement faiblement hydrophobes, comme E3, la biodégradation serait le facteur privilégié (JOHNSON ET SUMPTER, 2001). Dans une récente étude danoise sur les procédés d'enlèvement des estrogènes dans les boues activées (DEPA, 2004), les résultats ont indiqué qu'environ 35-45% de E1 et 55-65% du β E2 et EE2 peuvent être absorbées sur les boues. Cependant, lorsque FUERHACKER *et al.* (1999) ont employé du β E2 marqué pour étudier le devenir de ce composé dans les STEPs, ils ont conclu qu'à de faibles concentrations, la majorité du β E2 marqué est restée dans la phase liquide, et ainsi les propriétés physico-chimiques, telles que le k_{ow} , n'ont pas reflété la situation pour des concentrations de l'ordre du ng (FUERHACKER *et al.*, 1999).

Le bioréacteur membranaire a prouvé son efficacité pour enlever les contaminants organiques et inorganiques, ainsi que des entités biologiques provenant des eaux usées (CICEK, 2002). Comme les estrogènes se lient rapidement à la matière organique, le bioréacteur à membrane peut fournir un environnement approprié à la biodégradation des estrogènes. En effet, le bioréacteur membranaire contient une quantité élevée en matière organique et en matières particulaires et colloïdales, ainsi que des concentrations élevées en biomasse. En outre, la possibilité de maintenir des TRS élevés dans le bioréacteur membranaire permet d'avoir une culture bactérienne diverse, incluant des organismes à croissance lente, capable de briser les molécules organiques complexes (CICEK *et al.*, 1999). Ainsi, certaines configurations du bioréacteur membranaire permettraient donc de retenir et de biodégrader les estrogènes naturelles et synthétiques (CICEK, 2002).

2.2. Les traitements dits avancés

Plusieurs études ont aussi évalué le potentiel des traitements dits avancés (tels que la chloration, l'ozonation) pour enlever les estrogènes des effluents de STEPs. Ces procédés de décomposition devraient être plus favorisés que les procédés de séparation (tels que l'adsorption sur charbon actif, la sédimentation et la filtration sur membrane), qui concentrent les estrogènes dans les boues (NAKAGAWA *et al.*, 2002).

2.2.1. Procédé de chloration

HU *et al.* (2003) et MORIYAMA *et al.* (2004) ont prouvé que le β E2 et le EE2, respectivement, réagissent rapidement avec le HOCl et sont complètement enlevés (Tableau 11). De plus, KOBUE *et al.* (2002) ont rapporté que l'activité estrogénique diminuait en raison de la chloration. Cependant, plusieurs produits chlorés sont formés, et certains produits chlorés sont cancérigènes et/ou mutagènes (MORIYAMA *et al.*, 2004). HU *et al.* (2003) ont principalement observé la formation du 4-chloro-E2, 2,4-dichloro-E2 et 2,4-dichloro-E1, et d'autres composés non identifiés durant le traitement du β E2 avec le chlore. Les auteurs ont conclu que les sous-produits de la réaction présentaient une activité estrogénique. D'ailleurs, MORIYAMA *et al.* (2004) ont confirmé la formation de deux sous-produits dans les solutions fortement chlorées après 60 minutes de traitement d'une solution de EE2 (4Cl-EE2, 1-6 mol% ; 2,4-diCl-EE2, 3-25 mol%). L'activité estrogénique du 4-Cl-EE2 était semblable à celle du EE2, et l'activité du 2,4-diCl-EE2 était d'environ 10 fois inférieure.

2.2.2. Procédé d'ozonation et les procédés d'oxydation dits avancés (AOPs)

KOSAKA *et al.* (2000), NAKAGAWA *et al.* (2002) et TERNES *et al.* (2003) ont pu considérablement éliminer divers estrogènes pendant un traitement à ozonation (Tableau 11). De plus, HUBER *et al.* (2003) ont déterminé, durant des expériences en laboratoire, les constantes de vitesse du EE2 pour le procédé d'ozonation ($k_{O_3} = 7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) et pour l'AOP ($K_{OH} = 9.8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Cependant, les estrogènes co-existent avec d'autres composés organiques et inorganiques, dont les concentrations sont relativement élevées dans les eaux. La réaction avec le radical hydroxyle ($HO^\bullet$) est moins sélective, puisque le $HO^\bullet$ est inefficacement consommé par les composés organiques et inorganiques. Ainsi, les efficacités d'enlèvement des estrogènes dépendent des concentrations en estrogènes, des composés co-existants et de leurs réactivités avec l'ozone et le $HO^\bullet$. Dans son étude, KOSAKA *et al.* (2000) ont prouvé que le β E2 est fortement réactif avec l'ozone, puisque ce composé a deux groupes hydroxyles, groupes fonctionnels réactifs envers l'ozone. De plus, KOSAKA *et al.* (2000) ont également conclu que la décomposition du β E2 a été peu affectée par la présence de l'acide humique.

En outre, les sous-produits d'ozonation sont encore inconnus (TERNES *et al.*, 2003). Cependant, TERNES *et al.* (2003) ont rapporté que l'ozonation augmente généralement le nombre de groupes fonctionnels et la polarité de la molécule. En effet, les estrogènes hydroxylés devraient ainsi perdre leur affinité avec le récepteur d'estrogène, et donc réduire considérablement les

activités estrogéniques des eaux usées, mais cette supposition reste à être prouvée (TERNES *et al.*, 2003). Dans l'étude de HUBER *et al.* (2003) sur les cheminements de dégradation, il est accepté qu'une majeure partie des réactions avec les radicaux OH aurait lieu sur les cycles benzène, ayant pour résultat le clivage des cycles phénoliques. Sur la base de cette information, HUBER *et al.* (2003) ont pu conclure que les modifications provoquées par l'ozonation ou les AOPs devraient être suffisantes pour éliminer les effets estrogéniques du EE2. Cependant, les réactions avec l'ozone et les radicaux OH pendant un procédé d'ozonation n'auront pas comme conséquence la minéralisation complète du EE2 (HUBER *et al.*, 2003).

2.2.3. Réactions de photolyse

Des réactions de photolyse ont été intensivement étudiées pour éliminer les estrogènes de l'environnement aqueux (COLEMAN *et al.*, 2000; LIU ET LIU, 2004; OHKO *et al.*, 2002; SEGMULLER *et al.*, 2000, Tableau 11). LIU ET LIU (2004) ont examiné la photolyse directe, par une lampe à ultraviolet et une lampe à mercure à haute pression (UV-Vis), du β E2 et du E1 à des concentrations de l'ordre du mg/L. Cependant, ces concentrations ne représentent pas les concentrations environnementales de ces composés (ng/L). Ils ont pu prouver que la photolyse des estrogènes cause le clivage et l'oxydation des cycles benzènes formant ainsi des composés contenant des groupes carbonyles. D'ailleurs, OHKO *et al.* (2002), dans son étude sur la dégradation du β E2 par photolyse au bioxyde de titane (TiO_2), ont montré que le cycle phénol de la molécule β E2 devrait être le point de départ de l'oxydation photocatalytique du β E2. De plus, puisque les produits intermédiaires n'ont pas de cycle phénol, OHKO *et al.* (2002) ont conclu que leurs activités estrogéniques sont négligeables.

2.3. Les traitements enzymatiques

Le traitement des déchets industriels, des eaux usées, des boues et des sols, contaminés par des phénols et d'autres composés aromatiques, par des enzymes telles que des peroxydases (POD, AURIOL *et al.*, 2005; FILALI-MEKNASSI *et al.*, 2004b; KINSLEY ET NICELL, 2000; SAKUYAMA *et al.*, 2003; SUZUKI *et al.*, 2003; WAGNER ET NICELL, 2002) ou des oxydases polyphénoliques (PPO, BEVILAQUA *et al.*, 2002; FUKUDA *et al.*, 2001; IKEHATA ET NICELL, 2000; SUZUKI *et al.*, 2003; TSUTSUMI *et al.*, 2001) est une nouvelle et intéressante stratégie. De plus, ce procédé de traitement a été efficacement appliqué pour l'enlèvement de phénols et produits phénoliques dans les eaux usées (COOPER ET NICELL,

1996; EDWARDS *et al.*, 1999; WADA *et al.*, 1995). Les enzymes peuvent agir avec une grande spécificité sur les composés aromatiques, qui peuvent être ensuite enlever par précipitation ou transformer en d'autres produits (CAZA *et al.*, 1999; KARAM ET NICELL, 1997). Cependant, peu de données existent sur l'oxydation enzymatique des estrogènes.

SUZUKI *et al.* (2003) ont rapporté l'application de l'enzyme peroxydase de manganèse (MnP) et du système laccase (enzyme oxydase poly-phénolique)-médiateur pour le traitement du β E2 et du EE2. Ils ont pu considérablement réduire la concentration en β E2 et EE2 et leur activité estrogénique, après une heure de traitement. De plus, comme aucun métabolite dans le mélange n'a été trouvé, SUZUKI *et al.* (2003) ont suggéré que la réduction des activités estrogéniques du β E2 et EE2 pourrait être due au clivage du cycle aromatique de ces composés (SUZUKI *et al.*, 2003). Cependant, comme l'utilisation de l'enzyme MnP demande des concentrations élevées en Mn(III), son application dans le traitement des eaux usées semble irréalisable (KARAM ET NICELL, 1997). Par ailleurs, AURIOL *et al.* (2005) ont montré que dans une eau synthétique à pH 7 et à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, l'enzyme peroxydase de raifort (HRP - initiale activité de 0.02 U/ml) a permis d'atteindre 92-100% d'enlèvement en E1, β E2, E3 et EE2 en une heure de traitement. En outre, les expériences en eaux usées ont montré que le procédé de traitement enzymatique semble réalisable, cependant pour une même activité initiale en HRP, l'enlèvement des 4 estrogènes était considérablement plus faible (19-37%) dans l'eau usée que dans l'eau synthétique (AURIOL *et al.*, 2005). Les auteurs ont supposé que cette diminution dans l'enlèvement des estrogènes pourrait être due à l'inhibition de l'enzyme ou à la consommation de l'oxydant par des composés organiques présents dans l'eau usée.

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Ainsi, il est généralement observé qu'un traitement primaire seul ne permet pas, ou très peu, l'enlèvement des estrogènes des eaux usées, tandis qu'un traitement secondaire à boue activée réduit de manière significative les quantités d'estrogènes (BARONTI *et al.*, 2000; D'ASCENZO *et al.*, 2003; JOHNSON ET SUMPTER, 2001; ONDA *et al.*, 2003; SVENSON *et al.*, 2003). D'ailleurs, le TRS semble avoir une influence positive sur la capacité du système à boues activées à éliminer les estrogènes. Il s'avère que le β E2 et le E3 sont très efficacement enlevés dans les boues activées, alors que le taux d'enlèvement en E1 et en EE2 est plus faible et variable. Cependant, le procédé à boue activée ne permet pas d'atteindre des concentrations à

l'effluent en estrogènes, qui respectent les niveaux seuils (0.1 ng/L) déterminés comme produisant des effets estrogéniques chez les organismes aquatiques (Tableaux 9 et 10). Par exemple, SERVOS *et al.* (2005) ont rapporté que la dégradation des estrogènes dans des réacteurs aérobies en batch contenant une boue d'épuration était très rapide (95% d'enlèvement en β E2 et E1, en moins de 24 heures), cependant, même après 120 heures de traitement, une activité estrogénique a pu être détectée.

Par ailleurs, basés sur la littérature, les deux principaux procédés d'enlèvement des estrogènes des eaux usées sont la sorption et la dégradation dans un système à boues activées. Dans le cas où les contaminants sont adsorbés sur les boues activées, ils s'accumulent dans les déchets solides des STEPs. Et ainsi, l'application des boues sur les champs agricoles peut causer une contamination potentielle des sols et des eaux souterraines (TERNES *et al.*, 1999a). En effet, MATSUI *et al.* (2000) ont trouvé que pendant la déshydratation des boues de différentes STEPs au Japon, de grandes quantités d'estrogènes ont été libérées dans la phase aqueuse. Dans d'autres cas, ces contaminants, dissous ou liés aux composés organiques naturels dissous, sont facilement transportés par la STEP (SCHÄFER *et al.*, 2002) et se retrouvent ainsi dans les effluents de STEPs et polluent les eaux de surface.

Incontestablement, vu que les estrogènes présentent une activité estrogénique à très faible concentration (0.1 ng/l), les techniques actuellement appliquées dans le traitement des eaux usées sont inadéquates pour enlever de manière significative les estrogènes (COLEMAN *et al.*, 2000; JIANG *et al.*, 2005; TERNES *et al.*, 2003). Par conséquent, des technologies plus évoluées, tels que les procédés de chloration, d'ozonation, les procédés de décomposition ont été développés. En effet, ces procédés montrent un potentiel élevé pour l'enlèvement des estrogènes. Cependant, peu de données existent et la plupart des études ont été effectuées avec des eaux synthétiques, contenant des concentrations en estrogènes largement supérieures aux concentrations trouvées dans l'environnement (Tableau 11). Ainsi, d'autres investigations devraient être menées pour déterminer si ces techniques sont également efficaces pour l'enlèvement d'estrogènes, à des concentrations de l'ordre du ng/L et en utilisant des eaux contenant d'autres particules, telles que dans le cas des eaux usées. De plus, la majorité des traitements dits avancés forment des sous-produits cancérogènes ou dont leur activité estrogénique est soit inconnue, soit identique ou plus élevée que l'activité du composé mère (HU *et al.*, 2003; MORIYAMA *et al.*, 2004). Ainsi, des

procédés de traitement plus efficaces, tout en intégrant le concept du « low-cost », devraient être développés pour réduire le rejet des estrogènes et de leurs sous-produits dans l'environnement.

Un nouveau procédé de traitement pour les estrogènes à considérer serait les systèmes enzymatiques. Ces procédés montrent un potentiel pour l'enlèvement des composés aromatiques, tels que les estrogènes, dans les eaux usées. De plus, les systèmes de traitement enzymatique ont de nombreux avantages par rapport aux autres traitements dits conventionnels (KARAM ET NICELL, 1997; FLOCK *et al.*, 1999). Entre autre, ces procédés requièrent un faible besoin d'énergie et ne présentent aucun danger pour l'environnement. Cependant, KARAM ET NICELL (1997) ont rapporté que l'utilisation de certaines enzymes, comme traitement additionnel, peut considérablement augmenter le coût global du traitement. Toutefois, plusieurs recherches actuelles développent la production d'enzymes en utilisant des eaux usées, des boues et d'autres biomasses municipales et industrielles, comme substrat de base (IKEHATA *et al.*, 2004; TYAGI *et al.*, 2002). Le développement de ces techniques de production d'enzymes permettra de réduire le coût global du traitement enzymatique, et rendre ainsi ce procédé de traitement rentable pour l'enlèvement des estrogènes des eaux usées. Par ailleurs, très peu de données existent sur la dégradation enzymatique des estrogènes naturels et synthétiques. Ainsi, d'autres recherches dans ce domaine sont nécessaires.

RÉFÉRENCES

- AERNI H.-R., KOBLE B., RUTISHAUSER B.V., WETTSTEIN F.E., FISCHER R., GIGER, W., HUNGERBUHLER A., MARAZUELA M.D., PETER A., SCHONENBERGER R., VOGELI A.C., SUTER M.J.-F., EGGEN R.I.L., 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 688-696.
- ALLEN Y., MATTHIESEN P., SCOTT A.P., HAWORTH S., FEIST S., THAIN J.E., 1999. The extent of estrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments-further survey of flounder. *Sci. Total Environ.*, 233, 5-20.
- ARCAND-HOY L.D., NIMROD A.C., BENSON W.H., 1998. Endocrine modulating substances in the environment: estrogenic effects of pharmaceutical products. *Inter. J. Toxicol.*, 17, 139-158.
- AURIOL M., FILALI-MEKNASSI Y., ADAMS C. TYAGI R.D., 2005. HRP-catalyzed oxidation of steroid estrogens in synthetic water vs. wastewater effluent. *Compte rendu du 21^{ème} Congrès du Canada sur la Qualité de l'Eau (ACQE)*. Québec, Canada, 4 novembre 2005.
- BARONTI C., CURINI R., D'ASCENZO G., DI CORCIA A., GENTILI A., SAMPERI R., 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water. *Envir. Sci. Technol.*, 34, 5059-5066.
- BEHNISCH P.A., FUJII K., SHIOZAKI K., KAWAKAMI I., SAKAI S., 2001. Estrogenic and dioxin-like potency in each step of a controlled landfill leachate treatment plant in Japan. *Chemosphere*, 43, 977-984.
- BELFROID A.C., VAN DER HORST A., VETHAAK A.D., SCHAFER A.J., RIJS G.B.J., WEGENER J., COFINO W.P., 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and wastewater in Netherlands. *Sci. Total Environ.*, 225, 101-108.
- BEVILAQUA J.V., CAMMAROTA M.C., FREIRE D.M.G., SANT'ANNA Jr.G.L., 2002. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatment. *Brazilian J. Chem. Eng.*, 19, 151-158.

- BIRKETT J.W., LESTER J.N., 2003. Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes, IWA Publishing, London, UK.
- CARGOUËT M., PERDIZ D., MOUATASSIM-SOUALI A., TAMISIER-KAROLAK S., LEVI Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci. Total Environ.*, 324, 55-66.
- CARR B.R., GRIFFIN J.E., WILSON J.D., 1998. Fertility controls and its complications. In « Williams Textbook of Endocrinology, 9th Edition », FOSTER D.W., KRONENBERG H.M. and LARSEN P.R. [Ed.], pp. 901-925.
- CAZA N., BEWTRA J.K., BISWAS N., TAYLOR K.E., 1999. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Res.*, 37, 3012-3018.
- CHANG S., WAITE T.D., SCHÄFER A.I., FANE A.G., 2002. Adsorption of trace steroid estrogens to hollow fibre membranes hydrophobic. *Desalination*, 146, 381-386.
- CICEK N., 2002. Membrane bioreactors in the treatment of wastewater generated from agricultural industries and activities. *Compte rendu de la conférence AIC 2002*, Programme CSAE/SCGR, Saskatoon, Saskatchewan, 14-17 Juillet 2002.
- CICEK N., FRANCO J.P., SUIDAN M.T., URBAIN V., MANEM J., 1999. Characterization and comparison of a membrane bioreactor and a conventional activated-sludge system in the treatment of wastewater containing high-molecular-weight compounds. *Water Environ. Res.*, 71, 64-70.
- COLEMAN H.M., EGGINS B.R., BYRNE J.A., PALMER F.L., KING E., 2000. Photocatalytic degradation of 17-[beta]-oestradiol on immobilised TiO₂. *Applied Catalysis B: Environ.*, 24, L1-L5.
- COOPER V.A., NICELL J.A., 1996. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Res.*, 30, 954-964.
- D'ASCENZO G., DI CORCIA A., GENTILI A., MANCINI R., MASTROPASQUA R., NAZZARI M., SAMPERI R., 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci. Total Environ.*, 302, 199-209.

- DEPA (DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2002. Feminisation of fish - The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature. Agence de la protection de l'environnement danoise, Ministère danois de l'environnement, Danemark, *Projet environnemental n° 729*, 184 p.
- DEPA (DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2003. Evaluation of Analytical Chemical Methods for Detection of Estrogens in the Environment. Agence de la protection de l'environnement danoise, Ministère danois de l'environnement, Danemark, *Rapport scientifique n° 44*, 69 p.
- DEPA (DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2004. Degradation of Estrogens in Sewage Treatment Processes. Agence de la protection de l'environnement danoise, Ministère danois de l'environnement, Danemark, *Projet environnemental n° 899*, 61 p.
- DESBROW C., ROUTLEDGE E.J., BRIGHTY G.C., SUMPTER J.P., WALDOCK M., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1549-1558.
- EDWARDS W., BOWES R., LEUKES W.D., JACOBS E.P., SANDERSON R., ROSE P.D., BURTON S.G., 1999. A capillarity membrane bioreactor using immobilized polyphenol oxidase for the removal of phenols from industrial effluents. *Enzyme Microb. Tech.*, 24, 209-217.
- ESPERANZA M., SUIDAN M.T., NISHIMURA F., WANG Z.-M., SORIAL G.A., ZAFFIRO A., MCCAULEY P., BRENNER R., SAYLES G., 2004. Determination of Sex Hormones and Nonylphenol Ethoxylates in the Aqueous Matrixes of Two Pilot-Scale Municipal Wastewater Treatment Plants. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 3028-3035.
- FAWELL J.K., SHEAHAN D., JAMES H.A., HURST M., SCOTT S., 2001. Oestrogens and oestrogenic activity in raw and treated water in severn trent water. *Water Res.*, 35, 1240-1244.
- FILALI-MEKNASSI Y., TYAGI R.D., SURAMPALLI R.Y., BARATA C., RIVA M.C., 2004a. Endocrine Disrupting Compounds in wastewater, sludge Treatment Processes and

- Receiving Waters: Overview. *The Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management.*, 8, 1-18.
- FILALI-MEKNASSI Y., AURIOL M., ADAMS C. TYAGI R.D., 2004b. Natural and synthetic hormones removal by enzymatic degradation. *Compte rendu du 20^{ème} Congrès du Canada sur la Qualité de l'Eau (ACQE)*. Ottawa, Canada, 29 octobre 2004, 15-16.
- FLOCK C., BASSI A., GIJZEN M., 1999. Removal of aqueous phenol and 2-chlorophenol with purified soybean peroxidase and raw soybean hulls. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74, 303-309.
- FUERHACKER M., BREITHOFER A., JUNGBAUER A., 1999. 17 β -estradiol: behaviour during waste water treatment. *Chemosphere*, 39, 1903-1909.
- FUKUDA T., UCHIDA H., TAKASHIMA Y., UWAJIMA T., KAWABATA T., SUZUKI M., 2001. Degradation of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 284, 704-706.
- GUTENDROF B., WESTENDORF J., 2001. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicol.*, 166, 79-89.
- HANSELMAN T., GRAETZ D.A., WILKIE A.C., 2003. Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 5471-5478.
- HANSEN P.-D., DIZER H., HOCK B., MARX A., SHERRY J., MCMASTER M., BLAISE Ch., 1998. Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal. Chem.*, 17, 448-451.
- HARRIES J.E., SHEAHAN D.A., JOBLING S., MATTHIESSEN P., NEALL P., SUMPTER J.P., TYLOR T., ZAMAN N., 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 534-542.
- HU J., CHENG S., AIZAWA T., TERAOKA Y., KUNIKANE S., 2003. Products of Aqueous Chlorination of 17 β -Estradiol and Their Estrogenic Activities. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 5665-5670.

- HUANG C.-H., SEDLAK D.L., 2001. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 133-139.
- HUBER M.M., CANONICA S., PARK G.-Y., VON GUNTEN U., 2003. Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 1016-1024.
- IKEHATA K., BUCHANAN I.D., SMITH D.W., 2004 Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *J. Environ. Eng. Sci.*, 3, 1-19.
- IKEHATA K., NICELL J.A., 2000. Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technol.*, 74, 191-199.
- ISOBE T., SHIRAISHI H., YASUDA M., SHINODA A., SUZUKI H., MORITA M., 2003. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 984, 195-202.
- JIANG J.Q., YIN Q., ZHOU J.L., PEARCE P., 2005. Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters. *Chemosphere*, 61, 544-550.
- JOBLING S., NOLAN M., TYLER C.R., BRIGHTY G., SUMPTER J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Envir. Sci. Technol.*, 32, 2498-2506.
- JOHNSON A.C., BELFROID A., DI CORCIA A., 2000. Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.*, 256, 163-173.
- JOHNSON A.C., SUMPTER J.P., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Envir. Sci. Technol.*, 35, 4697-4703.
- JÜRGENS M.D., HOLTHAUS K.I.E., JOHNSON A.C., SMITH J.J.L., 2002. The potential for estradiol and ethynilestradiol degradation in English rivers. *Envir. Toxicol. Chem.*, 21, 480-488.

- KARAM J., NICELL J.A., 1997. Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 69, 141-153.
- KINSLEY C., NICELL J.A., 2000. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Bioresource Technol.*, 73, 139-146.
- KOBUKE Y., TANAKA H., MAGARA Y., 2002. Nationwide and Regional River Monitoring Studies as well as Bioassays and Treatment of EDs in Waterworks. *Workshop: Endocrine Disruptors*, IWA Specialist Group on Assessment and Control of Hazardous Substances in Water (ACHSW), Melbourne, Australia, 9 avril 2002.
- KOŁODZIEJ E.P., HARTE T., SEDLAK D.L., 2004 Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 6377-6384.
- KÖRNER W., BOLZ U., SÜßMUTH W., HILLER G., SCHULLER W., HANF V., HAGENMAIER H., 2000). Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere*, 40, 1131-1142.
- KOSAKA K., YAMADA H., MATSUI S., SHISHIDA K., 2000. The effects of the co-existing compounds on the decomposition of micropollutants using the ozone/hydrogen peroxide process. *Water Sci. Technol.*, 42, 353-361.
- KOZAK R.G., D'HAESE I., VERSTRAETE W., 2001. Pharmaceuticals in the environment: focus on 17 α -ethinyloestradiol. In « Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risk », KÜMMERER K. and VERLAG S. [Ed.], pp. 49-65.
- KUCH H.M., BALLSCHMITER K., 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the pictogram per liter range. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 3201-3206.
- LAGANÀ A., BACALONI A., DE LEVA I., FABERI A., FAGO G., MARINOB A., 2004. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 501, 79-88.

- LAI K.M., JOHNSON K.K., SCRIMSHAW M.D., LESTER J.N., 2000. Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 3890-3894.
- LANGE I.G., DAXENBERGER A., SCHIFFER B., WITTERS H., IBARRETA D., MEYER H.H.D., 2002. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Anal. Chim. Acta*, 473, 27-37.
- LARSSON D.G.J., ADOLFSSON-ERICI M., PARKKONEN J., PETTERSON M., BERG A.H., OLSSON P.-E., FÖRLIN L., 1999. Ethinyloestradiol —an undesired fish contraceptives? *Aquat. Toxicol.*, 45, 91-97.
- LAYTON A.C., GREGORY B.W., SEWARD J.R., SCHULTZ T.W., SAYLER G.S., 2000. Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee USA. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 3925-3931.
- LEE L.S., STROCK T.J., SARMAH A.K., RAO P.S.C., 2003. Sorption and Dissipation of Testosterone, Estrogens, and Their Primary Transformation Products in Soils and Sediment. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 4098-4105.
- LEE B.-C., KAMATA M., AKATSUKA Y., TAKEDA M., OHNO K., KAMEI T., MAGARA Y., 2004. Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. *Water Res.*, 38, 733-739.
- LEE H.B., LIU D., 2002. Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water Air Soil Poll.*, 134, 353-368.
- LEE H., PEART T., 1998. Determination of 17 β -estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. *J. AOAC Inter.*, 81, 1209-1216.
- LEUSCH F.D.L., CHAPMAN H.F., KÖRNER W., GOONERATNE S.R., TREMBLAY L.A., 2005. Efficacy of an advanced sewage treatment plant in Southeast Queensland, Australia, to remove estrogenic Chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 5781-5786.
- LIU B., LIU X., 2004. Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions. *Sci. Total Environ.*, 320, 269-274.

- MASTRUP M., JENSEN R.L., SCHÄFER A.I., KHAN S., 2001. Fate modeling - an important tool for water recycling. In « Recent Advances in Water Recycling Technologies », SCHÄFER A.I., SHERMAN P. and WAITE T.D. [Ed.], pp. 103-112.
- MATSUI S., TAKIGAMI H., MATSUDA T., TANIGUCHI N., ADACHI J., KAWAMI H., SHIMIZU Y., 2000 Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment. *Water Sci. Technol.*, 42, 173-179.
- METCALFE C.D., METCALFE T.L., KIPARISSIS Y., KOENIG B.G., KHAN C., HUGHES R.J., CROLEY T.R., MARCH R.E., POTTER T., 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with japanese medaka (*oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 297-308.
- MORIYAMA K., MATSUFUJI H., CHINO M., TAKEDA M., 2004. Identification and behavior of reaction products formed by chlorination of ethynylestradiol. *Chemosphere*, 55, 839-847.
- NAKAGAWA S., KENMOCHI Y., TUTUMI K., TANAKA T., HIRASAWA I., 2002. A Study on the Degradation of Endocrine Disruptors and Dioxins by Ozonation and Advanced Oxidation Processes. *J. Chem. Eng. Japan*, 35, 840-847.
- NASU M., GOTO M., KATO H., OSHIMA Y., TANAKA H., 2001. Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.*, 43, 101-108.
- NGHIEM L.G., SCHÄREF A.I., ELIMELECH M., 2004. Removal of Natural Hormones by Nanofiltration Membranes: Measurement, Modeling, and Mechanisms. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 1888-1896.
- OHKO Y., IUCHI K.-I., NIWA C., TATSUMA T., NAKASHIMA T., IGUCHI T., KUBOTA Y., FUJISHIMA A., 2002. 17beta-Estradiol Degradation by TiO₂ Photocatalysis as a Means of Reducing Estrogenic Activity. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 4175-4181.
- ONDA K., NAKAMURA Y., MIYA A., KATSU Y., 2003. The behavior of estrogenic substances in the biological treatment process of sewage. *Water Sci. Technol.*, 47, 109-116.
- ONG P.E.A., CHANG S., WAITE T.D., SCHÄFER A.I., FANE A.G., 2001. Removal of trace contaminants using coagulation, PAC and microfiltration hybrid processes. In « Recent

- Advances in Water Recycling Technologies », SCHÄFER A.I., SHERMAN P. and WAITE T.D., [Ed.], pp. 55-64.
- PAWLOWSKI S., VAN AERLE R., TYLER C.R., BRAUNBECK T., 2004. Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotox. Environ. Safe.*, 57, 330-345.
- PETROVIC M., SOLÉ M., DE ALDA L.M.J., BARCELÓ D., 2002. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 2146–2156.
- POPULATION REPORTS, 2000. Oral Contraceptives - An Update. Published by the Population Information Program, Center for Communication Programs, The Johns Hopkins School of Public Health, Baltimore, Maryland, USA. Vol. XXVIII (1), available at: <http://www.infoforhealth.org/pr/a9edsum.shtml#top>
- PURDOM C.E., HARDIMAN P.A., BYE V.J., ENO N.C., TYLER C.R., SUMPTER, J., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.*, 8, 275-285.
- REFSDAL A.O., 2000. To treat or not treat: a proper use of hormones and antibiotics. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 109-119.
- RODGERS-GRAY T.P., JOBLING S., MORRIS S., KELLY C., KIRBY S., JANBAKHSH A., HARRIES J.E., WALDOCK M.J., SUMPTER J.P., TYLER C.R., 2000. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 1521-1528.
- ROUTLEDGE E.J., SHEAHAN D., DESBROW C., BRIGHTY G.C., WALDOCK M., SUMPTER J.P., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1559-1565.
- SAKUYAMA H., ENDO Y., FUJIMOTO K., HATANO Y., 2003. Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase. *J. Bioscience Bioeng.*, 96, 227-231.
- SARMAH A.K., NORTHCOTT G.L., LEUSCH F.D.L., TREMBLAY L.A., 2005. A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand. *Sci. Total Environ.*, In Press.

- SAYLES G., 2001. Biological fate of estrogenic compounds associated with sewage treatment: a review. *Comptes rendus sur Effective Risk Management of Endocrine Disrupting Chemicals Workshop*. Cincinnati, OH, 18-19 septembre 2001.
- SCHÄFER A.I., MASTRUP M., VENKATESH S., 2001 Estrogen removal using the MIEX[®] and microfiltration hybrid process in water recycling. In « Recent Advances in Water Recycling Technologies », SCHÄFER A.I., SHERMAN P. and WAITE T.D., [Ed.], pp. 41-45.
- SCHÄFER A.I., MASTRUP M., JENSEN R.L., 2002. Enhancing particle interactions and removal of trace contaminants from water and wastewaters. *Desalination*, 147, 243-250.
- SCHÄFER A.I., NGHIEM D.L., WAITE T.D., 2003 Removal of natural hormone estrone from water and wastewater using nanofiltration and reverse osmosis. *Envir. Sci. Technol.*, 37, 182-188.
- SCHÄFER A.I., WAITE T.D., 2002. Removal of endocrine disrupters in advanced treatment – the Australian approach. *Compte rendu IWA World Water Congress, Workshop Endocrine Disruptors*. Melbourne, 9 avril 2002, 37-51.
- SEGMULLER B.E., ARMSTRONG B.L., DUNPHY R., OYLER A.R., 2000. Identification of autoxidation and photodegradation products of ethynylestradiol by on-line HPLC–NMR and HPLC–MS. *J. Pharmaceut. Biome.*, 23, 927-937.
- SERVOS M.R., BENNIE D.T., BURNISON B.K., JURKOVIC A., MCINNIS R., NEHELI T., SCHNELL A., SETO P., SMYTH S.A., TERNES T.A., 2005. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci. Total Env.*, 336, 155-170.
- SHI J., FUJISAWA S., NAKAI S., HOSOMI M., 2004. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Res.*, 38, 2323-2330.
- SHORE L.S., GUREVITZ M., SHEMESH M., 1993. Estrogen as an environmental pollutant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 361-366.

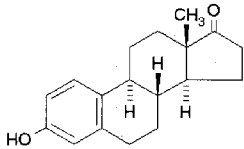
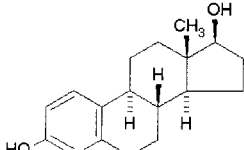
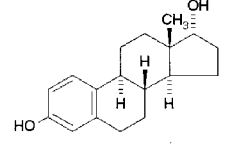
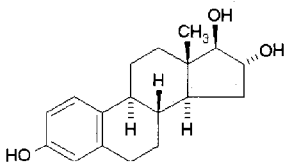
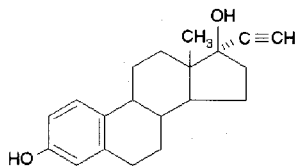
- SNYDER S.A., 2002. Endocrine disruptors and pharmaceutically active compounds: U.S. regulations and research. *Compte rendu IWA World Water Congress, Workshop Endocrine Disruptors*. Melbourne, 9 avril 2002, 1-10.
- SPENGLER P., KÖRNER W., METZGER J.W., 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 2133-2141.
- SUZUKI K., HIRAI H., MURATA H., NISHIDA T., 2003. Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res.*, 37, 1972-1975.
- SVENSON A., ALLARD A.-S., EK M., 2003. Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Res.*, 37, 4433-4443.
- TERNES T.A., STUBER J., HERRMANN N., MCDOWELL D., RIED A., KAMPMANN M., TEISER B., 2003. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Res.*, 37, 1976-82.
- TERNES T.A., ANDERSEN H., GILBERG D., BONERZ M., 2002. Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS. *Anal. Chem.*, 74(14), 3498-3504.
- TERNES T.A., KRECKEL P., MUELLER J., 1999b. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total Environ.*, 225, 91-99.
- TERNES T.A., STUMPF M., MUELLER J., HABERER K., WILKEN R.D., SERVOS M., 1999a. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.*, 225, 81-90.
- TSUTSUMI Y., HANEDA T., NISHIDA T., 2001. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere*, 42, 271-276.

- TURAN A., 1995. Excretion of natural and synthetic estrogens and their metabolites: occurrence and behaviour. In « Endocrinically Active Chemicals in the Environment », Agence fédérale allemande de l'environnement, Berlin.
- TYAGI R.D., FOKO V.S., BARNABÉ S., VIDYARTHI A.S., VALÉRO J.R., SURAMPALLI R.Y., 2002. Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. *Water Sci. Technol.*, 46, 247-254.
- TYLER C.R., ROUTLEDGE E.J., 1998). Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl. Chem.*, 70, 1795-1804.
- U.S. EPA., 1997. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. Washington D.C., *Rapport n° EPA/630/R-96/012*.
- VADER J.S., VAN GINKEL C.G., SPERLING F.M.G.M., DE JONG J., DE BOER W., DE GRAAF J.S., VAN DER MOST M., STOKMAN P.G.W., 2000. Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosphere*, 41, 1239-1243.
- 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., DE VOOGT P., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*, 59, 511-524.
- WADA S., ICHIKAWA H., TATSUMI K., 1995. Removal of phenols and aromatic amines from wastewaters by a combination treatment of tyrosinase and a coagulant. *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 304-309.
- WAGNER M., NICELL J.A., 2002. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.*, 36, 4041-4052.
- WHITE R., JOBLING S., HOARE S.A., SUMPTER J.P., PARKER M.G., 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135, 175-182.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2002. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors. Geneva, Switzerland, *Document WHO/PCS/EDC/02.2*.

- XIAO X.-Y., MCCALLEY D.V., MCEVOY J., 2001. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *J. Chromatogr. A*, 923, 195-204.
- YING G.-G., KOOKANA R.S., RU Y.-J., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Intern.*, 28, 545-551.
- YOON Y., WESTERHOFF P., SNYDER S.A., ESPARZA M., 2003. HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17-estradiol, and 17-ethynyl estradiol on powdered activated carbon. *Water Res.*, 37, 3530-3537.
- ZHANG Y., ZHOU J.L., 2005. Removal of estrone and 17 β -estradiol from water by adsorption. *Water Res.*, 39, 3991-4003.

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques des estrogènes naturels et synthétiques

Table 1. Physico-chemical properties of natural and synthetic estrogens

	Structure	Formule	Masse molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pKa	Log (Kow)
E1		C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.37	0.8-13 ^[1,2]	10.3-10.8 ^[1]	2.45-4.54 ^[2,5,6]
βE2		C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38	3.9-13.3 ^[1,2]	10.5-10.7 ^[1]	3.10-4.01 ^[2,5,7]
αE2		C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38	-	-	4.01 ^[9]
E3		C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288.38	3.2-13.3 ^[1]	10.4 ^[1]	2.55-2.81 ^[2,5]
EE2		C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296.41	4.8 ^[2,3]	10.4 ^[4]	3.67-4.15 ^[2,5,7,8]

[1] HANSELMAN et al., 2003

[5] SAYLES, 2001

[9] DEPA, 2003

[2] LAI et al., 2000

[6] Estimé par NGHIEM et al., 2004

[3] LEE et al., 2003

[7] YOON et al., 2003

[4] HUBER et al., 2003

[8] TERNES et al., 1999b

Tableau 2. Estrogènes sécrétés dans les urines de l'être humain (en µg/L)

Table 2. Estrogens excretion in human urines (in µg/L)

	Homme	Femme			
		Ménopausée	Pendant les menstruations		Enceinte
E1	3.9 ^[3]	4 ^[3]	8 ^[3]	10-100 ^[1]	600 ^[3]
βE2	1.6 ^[3]	2.3 ^[3]	3.5 ^[3]	10-100 ^[1]	259 ^[3]
E3	1.5 ^[3]	1 ^[3]	4.8 ^[3]	10-100 ^[1]	6000 ^[3]
EE2	-	-	-	10-100 ^[1]	-
Estrogène	2-25 ^[2]	5-10 ^[2]	-	-	30 mg/j ^[1] (principalement du E3)

[1] BARONTI *et al.*, 2000

[2] DEPA, 2003

[3] Estimé par JOHNSON *et al.*, 2000

Tableau 3. Estimation des concentrations en estrogènes sécrétés par des animaux de ferme

Table 3. Assessment of estrogens concentrations excreted by farm animals

		Estrogène			E1	βE2	αE2			
Animaux domestiques	Vache	Selles	30µg/kg ^[3]	299µg/j	-	-	-	-	-	
		Urine	15µg/L ^[3]	2.7mg/j* ^[2]	-	-	-	-	-	
		-	1.3mg/j ^[3]	-	-	-	13ng/L ^[1]	-	-	
	Truie	Selles	5.65-11.3µg/kg	120µg/j	-	-	-	-	-	
		Urine	1.13mg/kg* ^[3]	192µg/j* ^[2]	-	-	-	-	-	
	Brebis	Selles	-	23µg/j	-	-	-	-	-	
		Urine	-	52µg/j* ^[2]	-	-	-	-	-	
	Poule	Selles	-	20µg/j ^[2]	-	-	-	-	-	
		Urine	-		-	-	-	-	-	
		Déchets	-	-	14-533ng/g ^[4]	-	-	44ng/g ^[4]	-	-
	Animal	Fumier	-	-	-	28-72ng/g ^[5]	-	-	46-50ng/g ^[5]	120-190ng/g ^[5]
Pays de l'étude		Pays-Bas	Allemagne	Australie	Pays-Bas	-	Australie	Pays-Bas		

* Femelle en gestation [1] ERB et al., 1977, cité par YING et al., 2002, [2] LANGE et al., 2002, [3] OKKERMAN et al., 2003, cité par DEPA, 2003, [4] SHEMESH ET SHORE, 1994, cité par YING et al., 2002, [5] VETHAAK et al., 2002, cité par DEPA, 2003

Tableau 4. Concentrations en estrogènes à l'affluent des STEPs

Table 4. STEPs influent concentration of estrogens

Lieu d'échantillonnage	Concentrations à l'affluent (ng/L)					Méthode d'analyse	Référence
	E1	βE2	αE2	E3	EE2		
Paris, France	9.6-17.6	11.1-17.4	-	11.4-15.2	4.9-7.1	SPE/GC-MS	CARGOUËT <i>et al.</i> , 2004
Danemark	19-75	6.1-27	-	-	<1-4.8	-	DEPA, 2004
Pays-Bas	20-130	17-150	<0.7-15	-	<0.3-5.9	SPE/GC-MS-MS	VETHAAK <i>et al.</i> , 2005
Angleterre	1.8-4.1	<0.3	-	-	<LOD*	SPE/GC-MS-MS	FAWELL <i>et al.</i> , 2001
Allemagne	66	22.7	-	-	-	SPE/LC-MS-MS	JOHNSON <i>et al.</i> , 2000
Italie	52	12	-	80	3	SPE/LC-MS-MS	BARONTI <i>et al.</i> , 2000
Rome, Italie	31	9.7	-	57	4.8	SPE/LC-MS-MS	JOHNSON <i>et al.</i> , 2000
Rome, Italie	44	11	-	72	-	SPE/LC-MS-MS	D'ASCENZO <i>et al.</i> , 2003
Italie centrale	15-60	10-31	-	23-48	n.d.	SPE/LC-MS-MS	LAGANÀ <i>et al.</i> , 2004
Barcelone, Espagne	<2.5-115	<5-30.4	-	<0.25-70.7	<5	SPE/LC-MS	PETROVIC <i>et al.</i> , 2002
Japon	-	20-94	-	-	-	SPE/ELISA	NASU <i>et al.</i> , 2001
Japon	-	5	-	-	-	SPE/ELISA	BEHNISCH <i>et al.</i> , 2001
Canada	19-78	2.4-26	-	-	-	SPE/GC-MS	SERVOS <i>et al.</i> , 2005

n.d. : non détecté, * 0.3 ng/L

ELISA : « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay », *GC-MS* : Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse, *LC-MS* : Chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse, *LOD* : Limite de détection, *SPE* : extraction en phase solide.

Tableau 5. Concentrations en estrogènes à l'effluent des STEPs

Table 5. STEPs effluent concentration of estrogens

Lieu d'échantillonnage	Concentrations à l'effluent (ng/L)					Méthode d'analyse	Référence
	E1	β E2	α E2	E3	EE2		
Paris, France	6.2-7.2	4.5-8.6	-	5.0-7.3	2.7-4.5	SPE/GC-MS	CARGOUËT <i>et al.</i> , 2004
Pays-Bas	<0.4-47	<0.6-12	<0.1-5	-	<0.2-7.5	SPE/GC-MS-MS	BELFROID <i>et al.</i> , 1999
Suède	5.8	1.1	-	-	4.5	SPE/GC-MS	LARSSON <i>et al.</i> , 1999
Angleterre	1.4-76	2.7-48	-	-	<LOD[1]- 4.3	SPE/GC-MS	DESBROW <i>et al.</i> , 1998
Angleterre	6.4-29	1.6-7.4	-	2-4	<LOD[2]	SPE/GC-MS	XIAO <i>et al.</i> , 2001
Allemagne	7	6	-	3	3	SPE/HRGC-MS	KUCH ET BALLSCHMITER, 2001
Allemagne (SO)	<LOD[3]-18	<LOD[4]- 15	-	-	<LOD[4]-12	SPE/GC-MS	SPENGLER <i>et al.</i> , 2001
Rome, Italie	17	1.6	-	2.3	-	SPE/LC-MS-MS	D'ASCENZO <i>et al.</i> , 2003
Italie centrale	5-30	3-8	-	n.d.-1	n.d.	SPE/LC-MS-MS	LAGANÀ <i>et al.</i> , 2004
Barcelone, Espagne	<2.5-8.1	<5-14.5	-	<0.25- 21.5	<5	SPE/LC-MS	PETROVIC <i>et al.</i> , 2002

Japon	2.5-34	0.3-2.5	-	-	-	SPE/LC-MS-MS ISOBE <i>et al.</i> , 2003
Ontario, Canada	3*	6*	-	-	9*	SPE/GC-MS-MS TERNES <i>et al.</i> , 1999a
Canada	1-96	0.2-14.7	-	-	-	SPE/GC-MS SERVOS <i>et al.</i> , 2005

[1] 0.2 ng/L [2] 0.05 ng/L [3] 0.7 ng/L [4] 0.4 ng/L

HRGC-MS : Chromatographie en phase gazeuse à haute résolution- spectrométrie de masse.

* Valeurs médianes données par les auteurs.

Tableau 6. Concentrations en estrogènes présents dans les rivières

Table 6. River water concentration of estrogens

Lieu d'échantillonnage	Concentrations (ng/L)					Méthode d'analyse	Référence
	E1	β E2	α E2	E3	EE2		
Paris, France	1.1-3.0	1.4-3.2	-	1.0-2.5	1.1-2.9	SPE/GC-MS	CARGOUËT <i>et al.</i> , 2004
Pays-Bas	<0.1-3.4	<0.3-5.5	<0.1-3	-	<0.1-4.3	SPE/GC-MS-MS	BELFROID <i>et al.</i> , 1999
Angleterre	0.2-10	<LOD ^[1] -7.1	-	<LOD ^[2] -3.1	<LOD ^[3]	SPE/GC-MS	XIAO <i>et al.</i> , 2001
Allemagne	<LOD ^[4]	<LOD ^[4]	-	-	<LOD ^[4]	SPE/GC-MS-MS	TERNES <i>et al.</i> , 1999a
Rome, Italie	1.5	0.11	-	0.33	0.04	SPE/LC-MS-MS	BARONTI <i>et al.</i> , 2000
Italie centrale	5-12	2-6	-	2-5	n.d.-1	SPE/LC-MS-MS	LAGANÀ <i>et al.</i> , 2004
Espagne (NE)	4.3	6.3	-	8	-	SPE/LC-MS	PETROVIC <i>et al.</i> , 2002
Japon	-	<LOD ^[5]	-	-	-	SPE/ELISA	BEHNISCH <i>et al.</i> , 2001
Japon	0.2-6.6	0.6-1.0	-	-	-	SPE/LC-MS-MS	ISOBE <i>et al.</i> , 2003
USA	27*	9*	30*	19*	73*	LLE/GC-MS	KOLPIN <i>et al.</i> , 2002
California, USA	-	0.05-0.8	-	-	<0.05-0.07	SPE/ELISA	HUANG ET SEDLAK, 2001
California, USA	-	0.38	-	-	-	SPE/GC-MS-MS	HUANG ET SEDLAK, 2001

[1] 0.03 ng/L [2] 0.06 ng/L [3] 0.05 ng/L [4] 0.5 ng/L [5] 1 ng/L

LLE : extraction en phase liquide

* Valeurs médianes données par les auteurs.

Tableau 7. Les plus basses concentrations observées, induisant de la VTG chez les organismes aquatiques

Table 7. The lowest concentrations inducing VTG in aquatic organisms

	Niveau (ng/l)	Organismes étudiés	Référence
βE2	1	Truites mâles	PURDOM <i>et al.</i> , 1994; HANSEN <i>et al.</i> , 1998
	1-10	Poissons mâles	ROUTLEDGE <i>et al.</i> , 1998; PETROVIC <i>et al.</i> , 2002
EE2	1	Poissons tête-de-boule (<i>Pimephales promelas</i>)	PAWLOWSKI <i>et al.</i> , 2004
	0.1	Poissons mâles	PURDOM <i>et al.</i> , 1994; METCALFE <i>et al.</i> , 2001
	0.1-10	Poissons et organismes aquatiques	ROUTLEDGE <i>et al.</i> , 1998; LARSSON <i>et al.</i> , 1999
Estrogènes naturels et synthétiques	<0.1	Poissons mâles	DEPA, 2003

Tableau 8. Ambiguïté sur les processus d'enlèvement des estrogènes

Table 8. Issue concerning the removal process of estrogens

	Sorption	Biodégradation	Soluble	Référence
E3	-	80-95%	-	LEE ET PEART, 1998
	-	95%	-	BARONTI <i>et al.</i> , 2000
E1	-	(E1) ¹	-	JOHNSON ET SUMPTER, 2001
βE2	(βE2) ¹	-	-	JOHNSON ET SUMPTER, 2001
	-	90%	-	TERNES <i>et al.</i> , 1999a
	28%	-	-	KOZAK <i>et al.</i> , 2001
EE2	68%	-	-	KOZAK <i>et al.</i> , 2001
	-	20%	-	DEPA, 2003
	Quantité importante	10%	Majorité	MASTRUP <i>et al.</i> , 2001
Équivalent en βE2	3% ²	87% ²	-	KÖRNER <i>et al.</i> , 2000

¹Johnson et Sumpter (2001) ne donne pas un pourcentage précis mais rapporte que βE2 est adsorbé alors que E1 est biodégradé.

²Sur la base de l'activité estrogénique.

Tableau 9. Enlèvement des estrogènes durant un procédé à boue activée de STEP

Table 9. Estrogens removal during activated sludge process of STEP

	Concentrations (ng/L)		Enlèvement (%)	Type de matrice	Références
	Affluent	Effluent			
βE2	11	1.6	86	Eaux usées municipales	D'ASCENZO <i>et al.</i> , 2003
	9.7	4	59	Eaux usées domestiques	JOHNSON <i>et al.</i> , 2000
	28.1	1.2	96	Eaux usées domestiques	ONDA <i>et al.</i> , 2003
	-	-	100	Eaux usées municipales	TERNES <i>et al.</i> , 1999b
E1	44	17	61	Eaux usées municipales	D'ASCENZO <i>et al.</i> , 2003
	31	24	23	Eaux usées domestiques	JOHNSON <i>et al.</i> , 2000
	43.1	12.3	69	Eaux usées domestiques	ONDA <i>et al.</i> , 2003
	-	-	83	Eaux usées municipales	TERNES <i>et al.</i> , 1999b
E3	72	2.3	97	Eaux usées municipales	D'ASCENZO <i>et al.</i> , 2003
	57.3	11.7	80	Eaux usées domestiques	JOHNSON <i>et al.</i> , 2000
	381.5	5.6	99	Eaux usées domestiques	ONDA <i>et al.</i> , 2003
EE2	4.8	1.4	71	Eaux usées domestiques	JOHNSON <i>et al.</i> , 2000
	-	-	78	Eaux usées municipales	TERNES <i>et al.</i> , 1999b

Tableau 10. Évaluation de l'activité estrogénique durant différents procédés de traitement de STEPs (compilé de SVENSON *et al.*, 2003)

Table 10. Assessment of the estrogenic activity during different STEPs treatment processes (compiled from SVENSON *et al.*, 2003)

Procédé de traitement utilisé		Concentration en ng estradiol équivalent /l		Efficacité d'enlèvement (%)
Traitement biologique	Précipitation	Affluent	Effluent	
-	Directe, Al	11,9	12,4	-
-	Directe, Al	10,8	12,7	-
-	Directe, Fe(III)	5,45	5,9	-
-	Directe, chaux	4,15	1,1	74
Boue activée	Pré, Fe(III)	29,8	12,3	59
Boue activée	Simultanée, Al	5	0,3	94
Boue activée	Simultanée, Al	10,2	4,3	58
Boue activée	Simultanée, Fe(III)	5	1,6	68
Boue activée	Simultanée + post, Fe(III)	12,5	1,45	88
Boue activée	Pré + post, Al	8	2,55	68
Boue activée & biosorption	Post, Al	6,05	1,2	80
Boue activée & enlèvement de l'azote	Post, Al	3,85	<0,1	>97
Boue activée & enlèvement de l'azote	Pré, Fe(II)	19,5	<0,1	>99
Lit bactérien/ Boue activée	Pré + post, Al	6,95	<0,1	>99
Lit bactérien	Pré, Al	6,75	1,7	75
Lit bactérien	Post, Al	22,35	14,85	34
Lit bactérien	Post, Al	3,05	10,75	-
Bio rotor	Post, Fe(III)	1,6	5,25	-

Tableau 11. Enlèvement des estrogènes durant un traitement dit avancé

Table 11. Estrogens removal during advanced treatment processes

		Enlèvement (%)	τ	Dose ajoutée	[EDC]	Référence
Ozonation	E1	>80	18 min	5 mg O ₃ /l	0.015 µg E1/l ⁽¹⁾	TERNES <i>et al.</i> , 2003
	E1, β E2	95	10 min	5 mg O ₃ /l	9.7-28 ng E1/l ⁽²⁾ 3.0-21 ng β E2/l ⁽²⁾	NAKAGAWA <i>et al.</i> , 2002
Chloration	β E2	100	10 min	1.46 mg/l de sodium hypochlorite	50 µg β E2/l ⁽³⁾	HU <i>et al.</i> , 2003
	β E2	^(a)	36 H	1.5 mg/l de Chlore	10 ⁻⁷ M de β E2 ⁽³⁾	LEE <i>et al.</i> , 2004
	EE2	100	5 min	1mmol/l de Chlore	0.2 mmol EE2/l ⁽³⁾	MORIYAMA <i>et al.</i> , 2004
TiO ₂ + UV	β E2	98	3.5 H	TiO ₂ immobilisé	0.05-3 µmol β E2/l ⁽³⁾	COLEMAN <i>et al.</i> , 2000
	β E2	99	30 min	1.0 g/l de TiO ₂ en suspension	10 ⁻⁶ M de β E2 ⁽³⁾	OHKO <i>et al.</i> , 2002
		100 ^(b)	3 H			

τ : Temps de réaction, ^(a) Élimination complète de l'activité estrogénique, ^(b) Complètement décomposé en CO₂, ⁽¹⁾ Effluent d'une STEP municipale, ⁽²⁾ Eaux usées provenant d'un traitement secondaire, ⁽³⁾ Eau synthétique

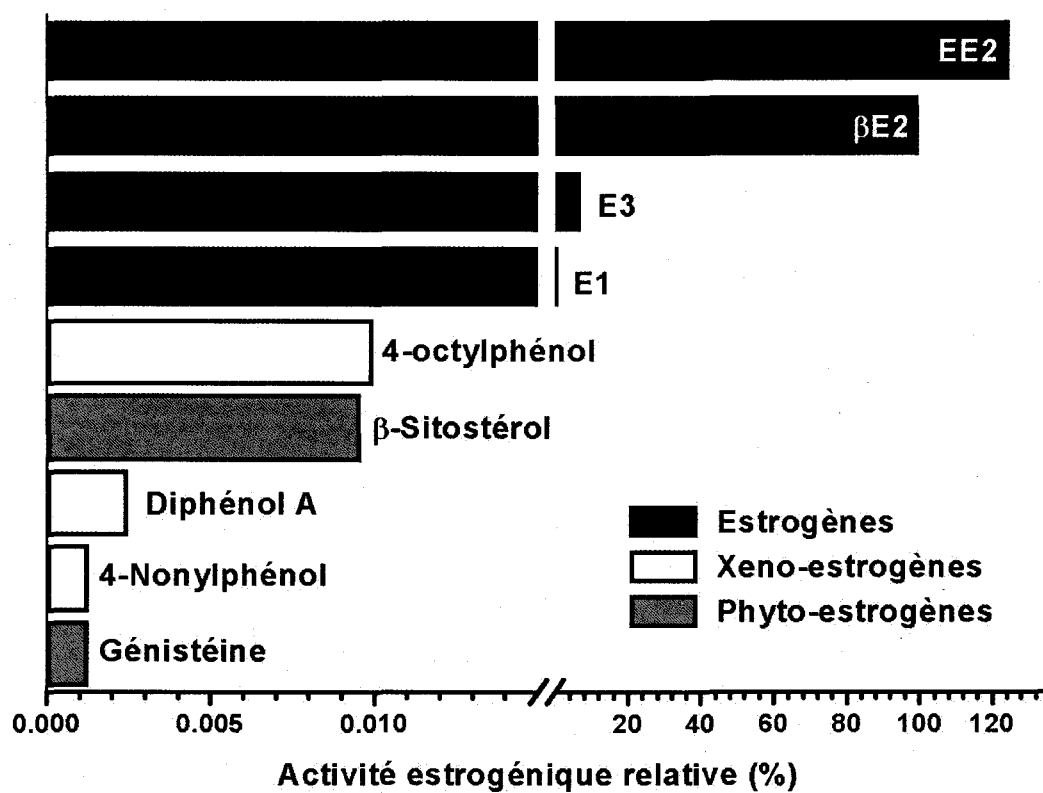


Figure 1. Relatives activités estrogéniques de quelques EDCs (compilé de GUTENDORF ET WESTENDORF, 2001)

Figure 1. Relative estrogenic activity of some EDCs (compiled from GUTENDORF ET WESTENDORF, 2001)

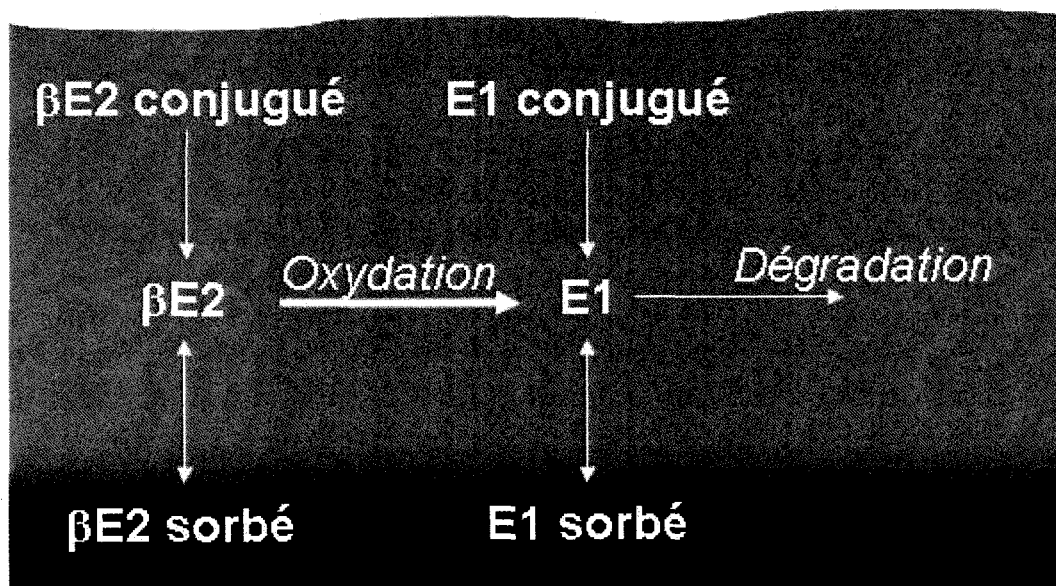


Figure 2. Biodégradation et sorption du 17β-estradiol et de l'estrone

Figure 2. Biodegradation and sorption of 17β-estradiol and estrone

APPENDICE C

ANALYSE CINÉTIQUE

L'appendice C est constituée des données expérimentales non introduites dans les articles publiés ou soumis qui peuvent apporter des informations nécessaires à la compréhension des résultats du projet de thèse.

1 DONNÉES OBTENUES POUR LE SYSTÈME HRP

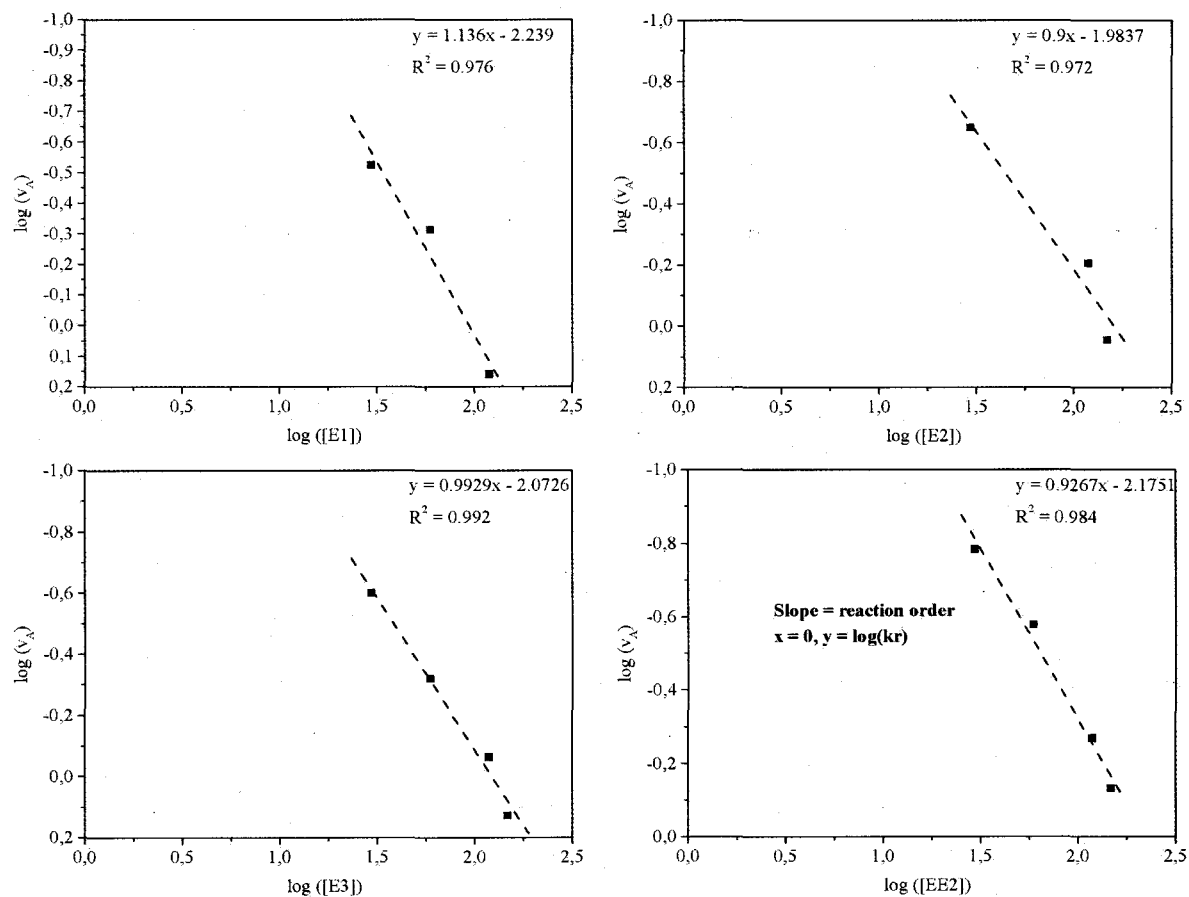


Figure 1. Représentation logarithmique de la vitesse initiale (v_A) en fonction de la concentration en substrat pour l'oxydation des estrogènes étudiés par l'enzyme HRP.

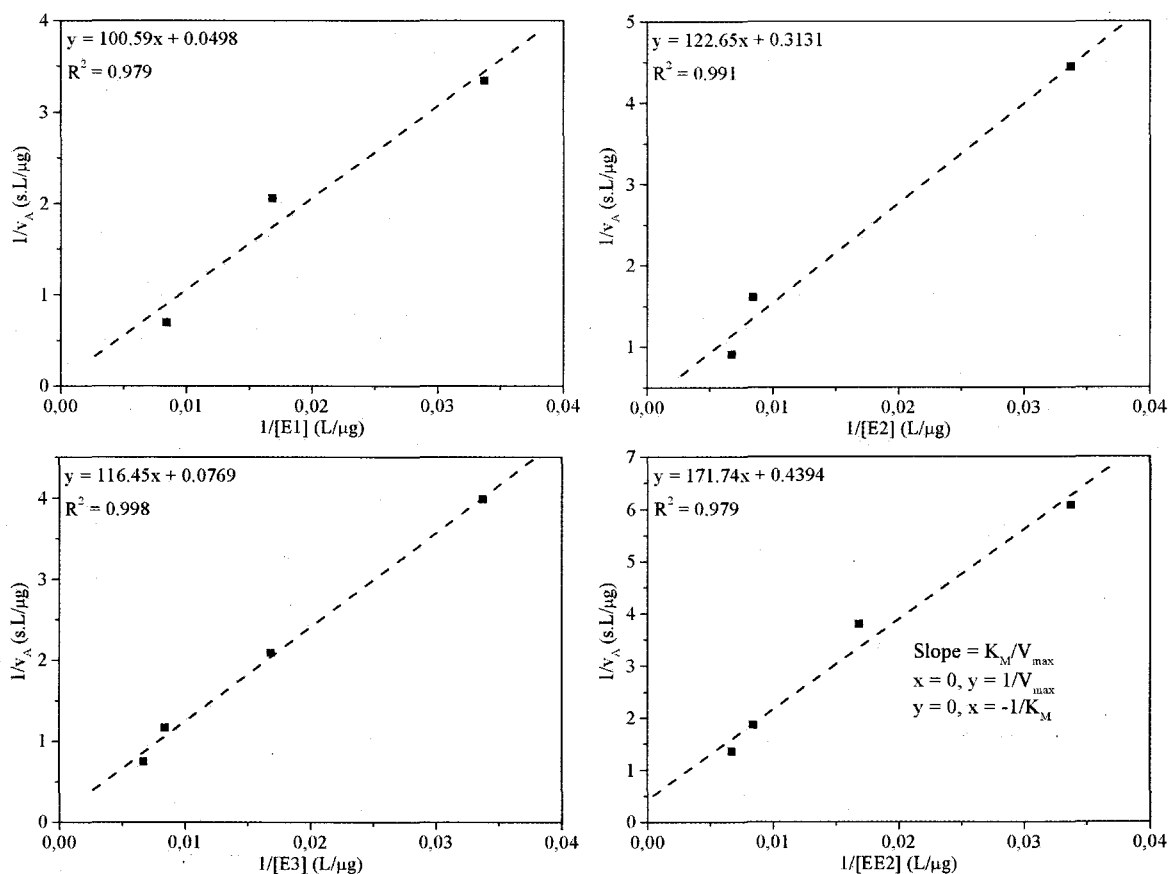


Figure 2. Représentation de Lineweaver-Burk du modèle cinétique de Michaelis-Menten pour l'oxydation des estrogènes étudiés par l'enzyme HRP.

Tableau 1. Détermination des paramètres cinétiques pour la réaction enzymatique avec l'enzyme HRP pour chacun des estrogènes étudiés à pH 7.0 et 25±1 °C.

Modèle cinétique empirique				Modèle de Michaelis-Menten*		
	Ordre de réaction (n)	Constante de vitesse de réaction (k_r) ($M^{-1} s^{-1}$)	R^2	K_M (μM)	V_{MAX} ($\mu g\ l^{-1}\ s^{-1}$)	R^2
E1	1.1357	1.56×10^6	0.976	7.47	20.08	0.979
E2	0.9000	2.80×10^6	0.972	1.44	3.19	0.991
E3	0.9929	2.40×10^6	0.992	5.25	13.00	0.998
EE2	0.9267	1.90×10^6	0.984	1.32	2.28	0.979

*Les paramètres du modèle cinétique de Michaelis-Menten, ainsi que le coefficient de régressions (R^2), ont été déterminé selon la représentation de Lineweaver-Burk.

2 DONNÉES OBTENUES POUR LE SYSTÈME LACCASE

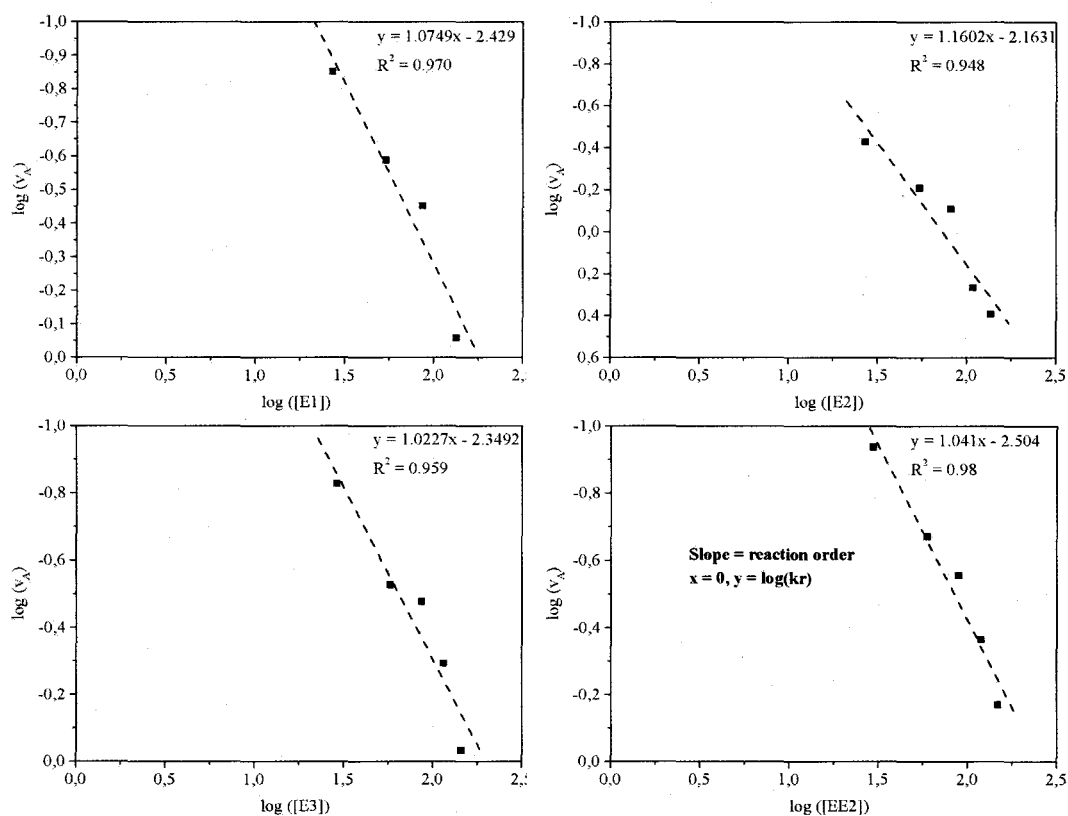


Figure 3. Représentation logarithmique de la vitesse initiale (v_A) en fonction de la concentration en substrat pour l'oxydation des estrogènes étudiés par l'enzyme laccase.

Tableau 2. Détermination des paramètres cinétiques pour la réaction enzymatique avec l'enzyme laccase pour chacun des estrogènes étudiés à pH 7.0 et 25 ± 1 °C.

Modèle cinétique empirique				Modèle de Michaelis-Menten*		
	Ordre de réaction (n)	Constante de vitesse de réaction (k_r) ($M^{-1} s^{-1}$)	R^2	K_M (μM)	V_{MAX} ($\mu g l^{-1} s^{-1}$)	R^2
E1	1.0749	1.00×10^6	0.970	3.4	1.08	0.977
E2	1.1602	1.87×10^6	0.948	3.99	3.26	0.929
E3	1.0227	1.29×10^6	0.959	2.65	0.85	0.969
EE2	1.041	9.28×10^6	0.980	3.78	0.89	0.984

*Les paramètres du modèle cinétique de Michaelis-Menten, ainsi que le coefficient de régressions (R^2), ont été déterminé selon la représentation de Lineweaver-Burk.

BIBLIOGRAPHIE

- Ackermann G.E., Schwaiger J., Negele R.D. et Fent K. (2002) Effects of long term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogen exposure in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, **60**(3-4): 203-221.
- Aerni H.-R., Kobler B., Rutishauser B.V., Wettstein F.E., Fischer R., Giger W., Hungerbühler A., Marazuela M. D., Peter A., Schönenberger R., Vogeli A.C., Suter M J.-F. et Eggen R.I.L. (2004) Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**(3): 688-696.
- Ahel M. et Giger W. (1985) Determination of alkylphenols and alkylphenol monoand diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **57**(8): 1577-1583.
- Ahel M. et Giger W. (1993) Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere*, **26**(8): 1471-1478.
- Ahel M., Molnar E., Ibric S. et Giger W. (1999) Estrogenic metabolites of alkylphenol polyethoxylates in secondary sewage effluents and rivers. Dans : *Proceedings of the third IWA specialized conference, hazard assessment and control of environmental contaminants - ECOHAZARD'99*, pp. 25-32.
- Aktas N., Cicek H., Ünal A.T., Kibarar G., Kolankaya N. et Tanyolaç A. (2001) Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphtol. *Bioresource Technol.*, **80**(1): 29-36.
- Allen Y., Matthiesen P., Scott A.P., Haworth S., Feist S. et Thain J.E. (1999) The extent of estrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments-further survey of flounder. *Sci. Total Environ.*, **233**(1-3): 5-20.
- 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. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**(4): 1303-1311.

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
- An L., Hu J., Zhu X., Deng B., Zhang Z. et Yang M. (2007) Crucian carp (*Carassius carassius*) VTG monoclonal antibody: Development and application. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **66** (2): 148-153.
- Andersen H.R., Andersson A.-M., Arnold S.F., Autrup H., Barfoed M., Beresford N.A., Bjerregaard P., Christiansen L.B., Gissel B., Hummel R., Jørgensen E.B., Korsgaard B., Le Guevel R., Leffers H., McLachlan J., Møller A., Nielsen J.B., Olea N., Oles-Karasko A., Pakdel F., Pedersen K L., Perez P., Skakkebaek N.E., Sonnenschein C., Soto A.M., Sumpter J.P., Thorpe S.M. et Grandjean P. (1999) Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.*, **107**(Suppl 1): 89-108.
- Andersen H.R., Hansen M., Kjølholt J., Stuer-Lauridsen F., Ternes T. et Halling-Sørensen B. (2005) Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere*, **61**(1): 139-146.
- Andersen H.R., Siegrist H., Halling-Sørensen B. et Ternes T. (2003) Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environ. Sci. Technol.*, **37**(18): 4021-4026.
- Andersson A.M. et Skakkebaek N.E. (1999) Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *Eur. J. Endocrinol.*, **140**(6): 477-485.
- Andreolini F., Borra C., Caccamo F., Di Corcia A. et Samperi R. (1987) Estrogen conjugates in late-pregnancy fluids—Extraction and group separation by a graphitized carbon-black cartridge and quantification by high-performance liquid-chromatography. *Anal. Chem.*, **59**(13): 1720-1725.
- Arcand-Hoy L.D., Nimrod A.C. et Benson W.H. (1998) Endocrine modulating substances in the environment: estrogenic effects of pharmaceutical products. *Int. J. Toxicol.*, **17**(2): 139-158.
- Arukwe A., Kullman S.W., Berg K., Goksøyr A. et Hinton D.E. (2002) Molecular cloning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggshell zona radiata protein complementary DNA:

- mRNA expression in 17 β -estradiol- and nonylphenol-treated fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **132(2)**: 315–326.
- Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C.D. et Tyagi R.D. (2005) HRP-catalyzed oxidation of steroid estrogens in synthetic water vs. wastewater effluent. Dans : *Proceedings of 21^{ème} Congrès du Canada sur la Qualité de l'Eau (ACQE)*. 4 novembre 2005, Québec, Canada.
- Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C.D. et Tyagi R.D. (2006b) Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: temperature and pH effects. *Water Res.*, **40(15)**: 2847-2856.
- Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C.D. et Tyagi R.D. (2006c) Laccase and Horseradish Peroxidase in Oxidation Of The Synthetic Steroid Estrogen 17 α -ethinylestradiol. Dans : *Proceedings of the International Water Association (IWA)*. 9-14 septembre 2006, Pékin, Chine, Biennial World Water Congress.
- Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C. et Surampalli R.Y. (2006) Endocrine disrupting compounds removal from the wastewater treatment plant, a new challenge. *Process Biochem.*, **41(3)**: 525–539.
- Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D. et Adams C.D. (2007a) Oxidation of natural and synthetic hormones by the horseradish peroxidase enzyme in a wastewater. *Chemosphere* (doi. 10.1016/j.chemosphere.2007.03.045).
- Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D. et Adams C.D. (2007b) Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. Accepté pour publication à *Water Res.*
- Bacaloni A., Cavaliere C., Faberi A., Foglia P., Samperi R. et Laganà A. (2005) Determination of isoflavones and coumestrol in river water and domestic wastewater sewage treatment plants. *Anal. Chim. Acta*, **531(2)**: 229–237.
- Baldwin W.S., Graham S.E., Shea D. et LeBlanc G.A. (1997) Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16(9)**: 1905–1911.
- Ballesteros O., Zafra A., Navalón A. et Vilchez J.L. (2006) Sensitive gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A

- and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *J. Chromato. A*, **1121(2)**: 154–162.
- 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 receiving river water. *Envir. Sci. Technol.*, **34(24)**: 5059-5066.
- Bassi A., Geng Z. et Gijzen M. (2004) Enzymatic removal of phenol and chlorophenols using soybean seed hulls. *Eng. Life Sci.*, **4(2)**: 125-130.
- 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. *J. Chromato. A*, **1090(1-2)**: 98–106.
- Behnisch P.A., Fujii K., Shiozaki K., Kawakami I. et Sakai S. (2001) Estrogenic and dioxin-like potency in each step of a controlled landfill leachate treatment plant in Japan. *Chemosphere*, **43(4-7)**: 977-984.
- Belfroid A.C., Van der Horst A., Vethaak A.D., Schäfer 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 wastewater in Netherlands. *Sci. Total Environ.*, **225(1-2)**: 101-108.
- Benijts T., Dams R., Gunther W., Lambert W. et de Leenheer A. (2002) Analysis of estrogenic contaminants in river water using liquid chromatography coupled to ion trap based mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **16(14)**: 1358-1364.
- Bennie D.T., Sullivan C.A. et Lee H.B. (1997) Alkylphenol polyethoxylate metabolites in Canadian sewage treatment plant waste streams. Dans : *Proceedings of the SETAC 18th Annual Meeting*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- Bennie D.T., Sullivan C.A., Lee H.B., Peart T.E. et Maguire R.J. (1997) Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural water of the Laurentian Great Lakes Basin and the upper St. Lawrence River. *Sci. Total Environ.*, **193(3)**: 263-275.
- Bevilaqua J.V., Cammarota M.C., Freire D.M.G. et Sant'Anna Jr. G.L. (2002) Phenol removal through combined biological and enzymatic treatment. *Brazilian J. Chemical Eng.*, **19(2)**: 151-158.

- Birkett J.W. et Lester J.N. (2003) *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*. IWA Publishing, London, UK, 295 p.
- Bistodeau T.J., Barber L.B., Bartell S.E., Cediell R.A., Grove K.J., Klaustermeier J., Woodard J.C., Lee K.E. et Schoenfuss H.L. (2006) Larval exposure to environmentally relevant mixtures of alkylphenolethoxylates reduces reproductive competence in male fathead minnows. *Aquatic Toxicol.*, **79(3)**: 268–277.
- Bódalo A., Gómez J.L., Gómez E., Bastida J. et Máximo M.F. (2006a) Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. *Chemosphere*, **63(4)**: 626-632.
- Bódalo A., Gómez J.L., Gómez E., Hidalgo A.M., Gómez M. et Yelo A.M. (2006b) Removal of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide in a discontinuous tank reactor. *Desalination*, **195(1-3)**: 51-59.
- Bodzek M. et Dudziak M. (2006) Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. *Desalination*, **198(1-3)**: 24-32.
- Braga O., Smythe G.A., Schäfer A.I., Feitz A.J. (2005) Fate of steroid estrogens in Australian Inland and coastal wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.*, **39(9)**: 3351-3358.
- Braun P., Moeder M., Schrader St., Popp P., Kusch P. et Engewald W. (2003) Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 α -ethinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chrom. A*, **988(1)**: 41-51.
- Brookbanks E.O., Welch R.A.H. et Coup M.R. (1969) Oestrogens in pasture and a possible link with mastitis. *New Zealand Veterinary Journal*, **17(8)**: 159-160.
- Buchanan I.D. et Nicell J.A. (1997) Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnol. Bioeng.*, **54(3)**: 251-261.
- Buchanan I.D. et Nicell J.A. (1998) Kinetics of peroxidase interactions in the presence of a protective additive. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **72(1)**: 23-32.
- Buchanan I.D. et Nicell J.A. (1999) A simplified model of peroxidase-catalyzed phenol removal from aqueous solution. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **74(7)**: 669-674.

- Buchanan I.D., Nicell J.A. et Wagner M. (1998) Reactor models for horseradish peroxidase-catalyzed aromatic removal. *J. Environ. Eng.*, **124(9)**: 794-802.
- Bursch W., Fuerhacker M., Gemeiner M., Grillitsch B., Jungbauer A., Kreuzinger N., Moestl E., Scharf S., Schmid E., Skutan S. et Walter I. (2004) Endocrine disrupters in the aquatic environment: the Austrian approach – ARCEM. *Water Sci. Technol.*, **50(5)**: 293-300.
- Burton S.G. (2003) Laccases and phenol oxidases in organic synthesis – a Review. *Current Organic Chem.*, **7(13)**: 1317-1331.
- Campbell C.G., Borglin S.E., Green F.B., Grayson A., Wozel E. et Stringfellow W.T. (2006) Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere*, **65(8)**:1265-1280.
- Canada Gazette (2001) Her Majesty the Queen in Right of Canada, represented by the Minister of Public Works and Government Services, Published by the Queen's Printer for Canada, 135-Part I (No. 25; 23 juin), 137 p.
- Cantarella G., Galli C. et Gentili P. (2003) Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems catalytic or stoichiometric procedures. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **22(3)**: 135-144.
- 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 Res.*, **38(12)**: 2918-2926.
- Cargouët M., Perdiz D. et Levi Y. (2006) Evaluation of the estrogenic potential of river and treated waters in the Paris area (France) using *in vivo* and *in vitro* assays. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, In Press.
- Cargouët M., Perdiz D., Mouatassim-Souali A., Tamisier-Karolak S. et Levi Y. (2004) Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci. Total Environ.*, **324(1-3)**: 55-66.
- Carr B.R. et Griffin J.E. (1998) Fertility controls and its complications. Dans : *Williams textbook of Endocrinology*. Wilson J. D., Foester D. W., Kronenberg H. M., Reed L. P. (Éditeurs), W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 901-925.

- Caza N., Bewtra J.K., Biswas N. et Taylor K.E. (1999) Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Res.*, **37(13)**: 3012-3018.
- CCE (2001) The implementation of the Community strategy for endocrine disrupters: A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Commission of the European Communities, COM(1999) 706 final, Bruxelles, Belgique, 45 p.
- Céspedes R., Petrovic M., Raldúa D., Saur, U., Piña B., Lacorte S., Viana P. et Barceló D. (2004) Integrated protocol for the determination of endocrine disrupting activity in the surface waters and sediments using biological techniques by recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378(3)**: 687-708.
- Chang S., Waite T.D., Schäfer A.I. et Fane A.G. (2002) Adsorption of trace steroid estrogens to hollow fibre membranes hydrophobic. *Desalination*, **146(1-3)**: 381-386.
- Chau Y.K., Zhang S. et Maguire R.J. (1992) Occurrence of butyltin species in sewage and sludge in Canada. *Sci. Total. Environ.*, **121**: 271-281.
- Cheng J., Yu S.M. et Zuo P. (2006). Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Res.*, **40(2)**: 283-290.
- Chiou C.T., McGroddy S.E. et Kile D.E. (1998) Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.*, **32(2)**: 264-269.
- Cicek N. (2002) Membrane bioreactors in the treatment of wastewater generated from agricultural industries and activities. Dans : *Proceedings of the AIC 2002 Meeting CSAE/SCGR Program*, Saskatoon, Saskatchewan, 14 au 17 juillet 2002.
- Cicek N., Franco J.P., Suidan M.T., Urbain V. et Manem J. (1999) Characterization and comparison of a membrane bioreactor and a conventional activated-sludge system in the treatment of wastewater containing high-molecular-weight compounds. *Water Environ. Res.*, **71(1)**: 64-70.
- Cicek N., Winnen H., Suidan M.T., Wrenn B.E., Urbain V. et Manem J. (1998) Effectiveness of the membrane bioreactor in the biodegradation of high molecular weight compounds. *Water Res.*, **32(5)**: 1553-1563.

- Clara M., Kreuzinger N., Strenn B., Gans O. et Kroiss H. (2005) The solids retention time-a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Res.*, **39**: 97-106.
- Clara M., Strenn B., Saracevic E. et Kreuzinger N. (2004) Adsorption of bisphenol-A, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere*, **56(9)**: 843-851.
- Colborn T., Vom Saal F.S. et Soto A.M. (1993) Developmental Effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.*, **101(5)**: 378-384.
- Coleman H.M., Eggins B.R., Byrne J.A., Palmer F.L. et King E. (2000) Photocatalytic degradation of 17-[beta]-oestradiol on immobilised TiO₂. *Appl. Catal. B, Environ.*, **24(1)**: L1-L5.
- Coleman H.M., Eggins B.R., Byrne J.A., Palmer F.L. et King E. (2000) Photocatalytic degradation of 17-[beta]-oestradiol on immobilised TiO₂. *Appl. Catal., B: Environ.*, **24(1)**: L1-L5.
- Coleman H.M., Routledge E.J., Eggins B.R. et Byrne J.A. (2004) Rapid loss of estrogenicity of steroid estrogens by UVA photolysis and photocatalysis over an immobilised titanium dioxide catalyst. *Water Res.*, **38(14)**: 3233-3240.
- Colisi L.M., Huang Q. et Weber Jr. W.J. (2006) Quantitative structure-activity relationship based quantification of the impacts of enzyme-substrate binding on rates of peroxidase-mediated reactions of estrogenic phenolic chemicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **128(12)**: 4041-4047.
- Commission Européenne. (2001) *Pollutants in urban wastewater and sewage sludge*. Rapport final, London, Angleterre, 273 p.
- Cook J.W., Dodds E.C., Hewett C.L. et Lawson W. (1934) The estrogenic activity of some condensed-ring compounds in relation to their other biological activities. *Proc. the Royal Society of London, B*, **114**: 272-286.
- Cooper V.A. et Nicell J.A. (1996) Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Res.*, **30(4)**: 954-964.

- Council N.R. (1999) Hormonally active agents in the environment. *Committee on Hormonally Active Agents in the Environment*, National Research Council, Washington DC, 452.
- Cravedi J.-P. (1999) *Les xéno-estrogènes, perturbateurs endocriniens potentiels*. Laboratoire des Xénobiotiques, Centre INRA de Toulouse. Site Internet: <http://www.inra.fr/PRESSE/COMMUNIQUE/nhsa99/dp7.htm> (Sept. 15, 2003).
- Crisp T.M., Clegg E.D., Cooper R.L., Wood W.P., Anderson D.G., Baetcke K.P., Hoffmann J.L., Morrow M.S., Rodier D.J., Schaeffer J.E., Touart L.W., Zeeman M.G. et Patel Y.M. (1998) Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis." *Environ. Health Perspect.*, **106(1)**: 11-56.
- Croley T.R., Hughes R.J., Koenig B.G., Metcalfe C.D. et March R.E. (2000) Mass spectrometry applied to the analysis of estrogens in the environment. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **14(13)**: 1087-1093.
- CSTEE (1999) *Effects of Endocrine Disrupting Chemicals, with emphasis on Wildlife and Ecotoxicology Test Methods*. Working Group on Endocrine Disrupters Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment, CSTEE Opinion on Human and Wildlife Health, European Commission. Site Internet : http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/sct/out37_en.pdf
- Cui C.W, Ji S.L. et Ren H.Y. (2006) Determination of steroid estrogens in wastewater treatment plant of a contraceptives producing factory. *Environ. Monit. Assess.*, **121(1-3)**: 407-417.
- d'Acunzo F., Galli C. et Masci B. (2002) Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. Solubility and steric issues. *Eur. J. Biochem.*, **269**: 5330-5335.
- 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. *Sci. Total Environ.*, **302(1-3)**: 199-209.
- Dachs J., van Ry D.A. et Eisenreich S.J. (1999) Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of the lower Hudson river estuary. *Environ. Sci. Technol.*, **33(15)**: 2676-2679.
- Danish Environmental Protection Agency (DEPA) (2002) *Feminisation of fish - The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature*.

- Environmental Project N° 729, Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment, 184 p.
- Danish Environmental Protection Agency (DEPA) (2003) *Evaluation of Analytical Chemical Methods for Detection of Estrogens in the Environment*. Working Report N° 44, Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment, 69 p.
- Danish Environmental Protection Agency (DEPA) (2004). *Degradation of Estrogens in Sewage Treatment Processes*. Environmental Project N° 899, Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment, 61 p.
- De Riso A., Gullotti M., Casella L., Monzani E., Profumo A., Gianelli L., De Gioia L., Gaiji N. et Colonna S. (2003) Selectivity in the peroxidase catalyzed oxidation of phenolic sulfides. *J. Mol. Catal., A: Chem.*, **204–205**: 391–400.
- de Voogt P. et van Hattum B. (2003) Critical factors in exposure modeling of endocrine active substances. *Pure Appl. Chem.*, **75(11–12)**: 1933-1948.
- Deborde M., Rabouan S., Duguet J.-P. et Legube B. (2005) Kinetics of Aqueous Ozone-Induced Oxidation of Some Endocrine Disruptors. *Environ. Sci. Technol.*, **39(16)**: 6086-6092.
- Deborde M., Rabouan S., Gallard H. et Legube B. (2004) Aqueous chlorination kinetics of some endocrine disruptors. *Environ. Sci. Technol.*, **38(21)**: 5577-5583.
- del Olmo M., Gonzalez-Casado A., Navas N.A. et Vilchez J.L. (1997) Determination of bisphenol A (BPA) in water by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, **246(1)**: 87-92.
- Den Hond E., Roels H.A., Hoppenbrouwers K., Nawrot T., Thijs L., Vandermeulen C., Winneke G., Vanderschueren D. et Staessen J.A. (2002) Sexual Maturation in Relation to Polychlorinated Aromatic Hydrocarbons: Sharpe and Skakkeback's Hypothesis Revisited. *Environ. Health Perspect.*, **110(8)**: 771-776.
- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P. et Waldock M. (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.*, **32(11)**: 1549-1558.

- Diano N., Grano V., Fraconte L., Caputo P., Ricupito A., Attanasio A., Bianco M., Bencivenga U., Rossi S., Manco I., Mita L., Del Pozzo G. et Mita D.G. (2007) Non-isothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: BPA as a model of pollutant. *Appl. Catal., B: Environ.*, **69(3-4)**: 252–261.
- Ding W.-H. et Chiang C.-C. (2003) Derivatization procedures for the detection of estrogenic chemicals by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17(1)**: 56-63.
- Diniz M.S., Peres I. et Pihan J.C. (2005a) Comparative study of the estrogenic responses of mirror carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated municipal sewage effluent (Lisbon) during two periods in different seasons. *Sci. Total Environ.*, **349(1-3)**: 129-139.
- Diniz M.S., Peres I., Magalhães-Antoine I., Falla J. et Pihan J.C. (2005b) Estrogenic effects in crucian carp (*Carassius carassius*) exposed to treated sewage effluent *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **62(3)**: 427–435.
- Donova M.V., Egorova O.V. et Nikolayeva V.M. (2005) Steroid 17b-reduction by microorganisms-a review. *Process Biochem.*, **40(7)**: 2253–2262.
- Dray J., Dray T.F. et Ullmann A. (1972) Hydrolysis of urinary metabolites of different steroid hormones by -glucuronidase from *Escherichia coli*. *Ann. Inst. Pasteur*, **123(6)**: 853-857.
- Dunford H.B. et Adeniran A.J. (1986) Hammett rho sigma correlation for reactions of horseradish peroxidase compound II with phenols. *Arch. Biochem. Biophys.*, **251**: 536–542.
- Edwards W., Bowes R., Leukes W.D., Jacobs E.P., Sanderson R., Rose P.D. et Burton S.G. (1999) A capillarity membrane bioreactor using immobilized polyphenol oxidase for the removal of phenols from industrial effluents. *Enzyme Microb. Technol.*, **24(3-4)**: 209-217.
- Ehlers G.A. et Rose P.D. (2005). Immobilized white-rot fungal biodegradation of phenol and chlorinated phenol in trickling packed-bed reactors by employing sequencing batch operation. *Bioresource Technol.*, **96(11)**: 1264–1275.

- Ensuncho L., Alvarez-Cuenca M. et Legge R.L. (2005) Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **27(3)**: 185–191.
- Environnement Canada (1999) *Endocrine Disrupting Substances in the environment*. Site Internet: http://www.ec.gc.ca/eds/fact/eds_e.pdf (July 19, 2003).
- Environnement Canada (2001) *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999) – Liste des substances d'intérêt prioritaire – Rapport d'évaluation – Le Nonylphénol et ses dérivés*. Gouvernement du Canada, Ottawa, Ontario, Canada (Mars, 2001).
- 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.
- Esperanza M., Suidan M.T., Nishimura F., Wang Z.-M., Sorial G.A., Zaffiro A., McCauley P., Brenner R. et Sayles G. (2004) Determination of Sex Hormones and Nonylphenol Ethoxylates in the Aqueous Matrixes of Two Pilot-Scale Municipal Wastewater Treatment Plants. *Environ. Sci. Technol.*, **38(11)**: 3028-3035.
- Fan Y., Zhang M., Da S-L. et Feng Y-Q. (2005) Determination of endocrine disruptors in environmental waters using poly(acrylamidevinylpyridine) monolithic capillary for in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analyst*, **130**: 1065–1069.
- Fang H., Tong W., Perkins R., Soto A.M., Prechtel N.V. et Sheehan D.M. (2000) Quantitative comparisons of *in vitro* assays for estrogenic activities. *Environ. Health Perspect.*, **108(8)**: 723-729.
- Farré M. et Barceló D. (2003). Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends Anal. Chem.*, **22(5)**: 299-310.
- Farré M., Brix R. et Barceló D. (2005) Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years. *Trends Anal. Chem.*, **24(6)**: 532-545.

- Farré M., Klöter G., Petrovic M., Alonso M.C., López de Alda M.J. et Barceló D. (2002) Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment. *Anal. Chim. Acta*, **456**(1): 19-30.
- Fawell J.K., Sheahan D., James H.A., Hurst M. et Scott S. (2001) Oestrogens and oestrogenic activity in raw and treated water in severn trent water. *Water Res.*, **35**(5): 1240-1244.
- Federal Register (1998a) *Endocrine Disruptor Screening Program*. Notice by U.S. Environmental Protection Agency, 63 FR 42852-42855.
- Federal Register (1998b) *Endocrine Disruptor Screening Program: Statement of Policy and Priority-Setting Workshop*. Notice by U.S. Environmental Protection Agency, 63 FR 71541-71568.
- Fent K. (1996) Organotin compounds in municipal wastewater and sewage sludge: contamination, fate in treatment processes and ecotoxicological consequences. *Sci. Total Environ.*, **185**(1-3): 151-159.
- Fent K. (1998) *Ökotoxikologie: Umweltchemie – Toxikologie – Ökologie*. Volume 21, Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag.
- Ferguson P.L., Iden C.R. et Brownawell B.J. (2001) Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary. *Environ. Sci. Technol.*, **35**(12): 2428-2435.
- Field J.A. et Reed R.L. (1996) Nonylphenol polyethoxy carboxylate metabolites of non-ionic surfactants in U.S. paper mill effluents, municipal sewage treatment plant effluents, and river waters. *Environ. Sci. Technol.*, **30**(12): 3544-3550.
- Filali-Meknassi Y., Auriol M., Adams C. et Tyagi R.D. (2004) Natural and synthetic hormones removal by enzymatic degradation. Dans : *Proceedings of 20th Canadian Association on water quality (CAWQ)*, Ottawa, Canada, 29 octobre 2004.
- Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., Barata C. et Riva M.C. (2004) Endocrine disrupting compounds in wastewater, sludge treatment processes and receiving waters: overview. *Practice Period. Hazard. Toxic Radioact. Waste Manage.*, **8**(1): 1-18.

- Filali-Meknassi, Y., Auriol, M., Adams, C., Surampalli, R.Y., 2004b. Endocrine Disrupters Compounds in the Livestock Dejections and Slaughterhouses Effluent. Dans : *Proceedings of the International Water Association (IWA)*. 19-24 septembre 2004, Marrakech, Maroc, Biennial World Water Congress.
- Filali-Meknassi, Y., Auriol, M., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2007. Quantification of steroid sex hormones using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Water Environ. Res.*, **79** (doi. 10.2175/106143007X156781).
- Filali-Meknassi Y., Auriol M., Adams C.D. and Tyagi R.D., 2006. Removal of steroid Estrogens From a municipal wastewater by the enzyme horseradish peroxidase. Dans : *Proceedings of the International Water Association (IWA)*. 9-14 septembre 2006, Pékin, Chine, Biennial World Water Congress.
- Fine D.D., Breidenbach G.P., Price T.L. et Hutchins S.R. (2003) Quantitation of estrogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction, pentafluorobenzyl/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A*, **1017(1-2)**: 167-185.
- Flock C., Bassi A. et Gijzen M. (1999) Removal of aqueous phenol and 2-chlorophenol with purified soybean peroxidase and raw soybean hulls. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **74(4)**: 303-309.
- Folmar L.C., Denslow N.D., Rao V., Chow M., Crain D.A., Enblom J., Marcino J. et Guilette L.J. (1996) Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.*, **104(10)**: 1096-1101.
- Fuerhacker M., Breithofer A. et Jungbauer A. (1999) 17 β -estradiol: behaviour during waste water treatment. *Chemosphere*, **39(11)**: 1903-1909.
- Fuerhacker M., Scharf S., Pichler W., Ertl T. et Haberl R.(2001) Sources and behaviour of bismuth active substances (BiAS) in a municipal sewage treatment plant. *Sci. Total Environ.*, **277**: 95–100.

- Fukahori S., Ichiura H., Kitaoka T. et Tanaka H. (2003) Photocatalytic decomposition of bisphenol A in water using composite TiO₂-zeolite sheets prepared by a papermaking technique. *Environ. Sci. Technol.*, **37**(5): 1048–1051.
- Fukuda T., Uchida H., Suzuki M., Miyamoto H., Morinaga H., Nawata H. et Uwajima T. (2004) Transformation products of bisphenol A by a recombinant *Trametes villosa* laccase and their estrogenic activity. *J Chem. Technol. Biotechnol.*, **79**(11): 1212–1218.
- Fukuda T., Uchida H., Takashima Y., Uwajima T., Kawabata T. et Suzuki M. (2001) Degradation of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*.” *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **284**(3): 704-706.
- Furuichi T., Kannan K., Giesy J.P. et Masunaga S. (2004) Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water samples from Japan using instrumental analysis and *in vitro* reporter gene assay. *Water Res.*, **38**(20): 4491-4501.
- Gallard H., Leclercq A. et Croué J.P. (2004) Chlorination of bisphenol A: kinetics and byproducts formation. *Chemosphere*, **56**(5): 465-473.
- Garcia-Reyero N., Grau E., Castillo M., López de Alda M.J., Barceló D. et Piña B. (2001) Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**(6): 1152-1158
- Garcia-Reyero N., Raldúa D., Quirós L., Llaveria G., Cerdà J., Barceló D., Grimalt J.O. et Piña B. (2004) Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**(3): 670-675.
- Gascón J., Oubiña A. et Barceló D. (1997) Detection of endocrinedisrupting pesticides by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): application to atrazine. *Trends Anal. Chem.*, **16**: 554–562.
- Gentili A., Perret D., Marchese S., Mastropasqua R., Curini R. et Di Corcia A. (2002) Analysis of Free Estrogens and their Conjugates in Sewage and River Waters by Solid-Phase Extraction then Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*, **56**(1-2): 25-32.

- Ghioureliotis M. et Nicell J.A. (1999) Assessment of soluble products of peroxidase-catalyzed polymerization of aqueous phenol. *Enzyme Microb. Technol.*, **25(3-5)**: 185–193.
- Ghioureliotis M. et Nicell J.A. (2000) Toxicity of soluble products from the peroxidase-catalysed polymerization of substituted phenolic compounds. *J Chem. Technol. Biotechnol.*, **75(1)**: 98-106
- Gianfreda L., Sannino F., Rao M.A. et Bollag J.-M. (2003) Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. *Water Res.*, **37(13)**: 3205-3215.
- Gibson R., Smith M.D., Spary C.J., Tyler C.R. et Hill E.M. (2005) Mixtures of Estrogenic Contaminants in Bile of Fish Exposed to Wastewater Treatment Works Effluents. *Environ. Sci. Technol.*, **39(8)**: 2461-2471.
- Giesy J.P., Snyder E.M., Nichols K.M., Snyder S.A., Villalobos S.A., Jones P.D. et Fitzgerald S. D. (2003) Examination of reproductive endpoints in goldfish (*carassius auratus*) exposed *in situ* to municipal sewage treatment plant effluent discharges in Michigan, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, **22(10)**: 2416–2431.
- Goda Y., Kobayashi A., Fukuda K., Fujimoto S., Ike M. et Fujita M. (2000) Development of the ELISAs for detection of hormonedisrupting chemicals. *Water Sci. Technol.*, **42(7–8)**: 81–88.
- Gomes R.L., Scrimshaw M.D. et Lester J.N. (2003) Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. *Trends Anal. Chem.*, **22(10)**: 697-707.
- Gordon D.A., Toth G.P., Graham D.W., Lazorchak J.M., Reddy T.V., Knapp C.W., deNoyelles Jr. F., Campbell S. et Lattier D.L. (2006) Effects of eutrophication on vitellogenin gene expression in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 17 α -ethynylestradiol in field mesocosms. *Environ. Pollution*, **142(3)**: 559-566.
- Green S. et Chambon P. (1991) The oestrogen receptor: From perception to mechanism. Dans : Nuclear Hormone Receptors. Parker M.G. (Éditeur), Academic, London, UK, pp.15-38.
- Gutendrof B. et Westendorf J. (2001) Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicol.*, **166(1-2)**: 79-89.

- Hach, 1997. Water Analysis Handbook, 3rd Ed., Hach Co., Loveland, CO, US.
- Hanselman T., Graetz D.A. et Wilkie A.C. (2003) Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review. *Environ. Sci. Technol.*, **37(24)**: 5471-5478.
- Hansen P.-D., Dizer H., Hock B., Marx A., Sherry J., McMaster M. et Blaise Ch. (1998) Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. *Trends in Anal. Chem.*, **17(7)**: 448-451.
- Harries J.E., Janbakhsh A., Jobling S., Matthiessen P., Sumpter J.P. et Tyler C.R. (1999) Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18(5)**: 932-937.
- Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Sumpter J.P., Tylor T. et Zaman N. (1997) Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16(3)**: 534-542.
- Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Routledge E.J., Rycroft R., Sumpter J.P. et Tylor T. (1996) A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.*, **15(10)**: 1993-2002.
- Harris J.M., 1992. Introduction to biotechnical and biological applications of poly(ethylene glycol). In Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications. J.M. Harris (Éditeur), New York, Plenum Press, pp. 1-14.
- Hartmann S., Lacorn M. et Steinhart H. (1998) Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chem.*, **62(1)**: 7-20.
- Hashimoto S., Horiuchi A., Yoshimoto T., Nakao M., Omura H., Kato Y., Tanaka H., Kannan K. et Giesy J.P. (2005) Horizontal and Vertical Distribution of Estrogenic Activities in Sediments and Waters from Tokyo Bay, Japan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **48(2)**: 209-216.
- Hayes T., Haston K., Tsui M., Hoang A., Haeffele C. et Yonk A. (2002) Feminization of male frogs in the wild: water-borne herbicide threatens amphibian populations in parts of the United States. *Nature*, **419**: 895-896.

- Health Canada. (1999) *Human health and exposure to chemicals which disrupt estrogen, androgen and thyroid hormone physiology*. Environmental and Occupational Toxicology Division, Environmental Health Directorate, HPB. Tunney's Pasture, P.L., Canada.
- Hegeman M.J.M., van der Weijden C. et Loch F.G. (1995) Sorption of benzo(a)pyrene and phenanthrene on suspended harbour sediment as a function of sediment concentration and salinity, a laboratory study using solvent partition coefficient. *Environ. Sci. Technol.*, **29(2)**: 363–371.
- Heisterkamp I., Ganrass J. et Ruck W. (2004) Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC-MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samplesTM. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378(3)**: 709–715.
- Helaleh M.I.H., Fujii S. et Korenaga T. (2001a) Column silylation method for determining endocrine disruptors from environmental water samples by solid phase micro-extraction. *Talanta*, **54(6)**: 1039-1047.
- Helaleh M.I.H., Takabayashi Y., Fujii S. et Korenaga T. (2001b) Gas chromatographic–mass spectrometric method for separation and detection of endocrine disruptors from environmental water samples. *Anal. Chim. Acta.*, **428(2)**: 227-234.
- Herbst A.L., Ulfelder H. et Poskanzer D.C. (1971) Adenocarcinoma of the vagina: an association of maternal stilboestrol therapy with tumour appearance in young women. *New England Journal of Medicine*, **284(15)**: 878-881.
- Hintemann T., Schneider C., Schöler H.F. et Schneider R.J. (2006) Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. *Water Res.*, **40(12)**: 2287-2294.
- Höger B., Taylor S., Hitzfeld B., Dietrich D.R. et van den Heuvel M.R. (2006) Stimulation of reproductive growth in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) following exposure to treated sewage effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, **25(10)**: 2753–2759.
- Holbrook R., Love N. et Novak F. (2004) Sorption of 17-estradiol and 17-ethinylestradiol by colloidal organic carbon derived from biological wastewater treatment systems. *Environ. Sci. Technol.*, **38(12)**: 3322-3329.

- Horikoshi S., Watanabe N., Onishi H., Hidaka H. et Serpone N. (2002) Photodecomposition of a nonylphenol polyethoxylate surfactant in a cylindrical photoreactor with TiO₂ immobilised fibreglass cloth. *Appl. Catal., B: Environ.*, **37(2)**: 117–129.
- Howard P.H. Handbook of environmental fate and exposure data, vol. 1. Chelsea, MI: Lewis Publishers, 1989.
- Hu J.-Y., Aizawa T. et Ookubo S. (2002a) Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.*, **36(9)**: 1980-1987.
- Hu J.-Y., Cheng S., Aizawa T., Terao Y. et Kunikane S. (2003) Products of aqueous chlorination of 17 β -estradiol and their estrogenic activities. *Environ. Sci. Technol.*, **37(24)**: 5665-5670.
- Hu J.-Y., et Aizawa T. (2003) Quantitative structure–activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic chemicals. *Water Res.*, **37(6)**: 1213-1222.
- Hu J.-Y., Xie G.H. et Aizawa T. (2002b) Products of aqueous chlorination of 4-nonylphenol and their estrogenic activity. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21(10)**: 2034-2039.
- Hu J.-Y., Zhang H. et Chang H. (2005) Improved method for analyzing estrogens in water by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J. Chromato. A*, **1070(1-2)**: 221–224
- Huang C.-H. et Sedlak D.L. (2001) Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20(1)**: 133–139.
- Huang Q. et Weber Jr. W.J. (2005) Transformation and removal of bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions: efficacy, products, and pathways. *Environ. Sci. Technol.*, **39(16)**: 6029-6036.
- Huang Q., Tang J. et Weber Jr. W.J. (2005) Precipitation of enzyme-catalyzed phenol oxidative coupling products: Background ion and pH effects. *Water Res.*, **39(13)**: 3021-3027.
- Huber M.M., Canonica S., Park G.-Y. et von Gunten U. (2003) Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes. *Environ. Sci. Technol.*, **37(5)**: 1016-1024.

- Huber M.M., Göbel A., Joss A., Hermann N., Löffler D., Mcardell C.S., Ried A., Siegrist H., Ternes T.A. et von Gunten U. (2005) Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study. *Environ. Sci. Technol.*, **39**(11): 4290-4299.
- Huggett D.B., Foran C.M., Brooks B.W., Weston J., Peterson B., Marsh K.E., La Point T.W. et Schlenk D. (2003) Comparison of in vitro and in vivo bioassays for estrogenicity in effluent from North American municipal wastewater facilities. *Toxicol. Sci.*, **72**(1): 77-83.
- IARC (1979) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Sex Hormones (II). Volume 21. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Ike M., Asano M., Belkada F.D., Tsunoi S., Tanaka M. et Fujita M. (2002) Degradation of biotransformation products of nonylphenol ethoxylates by ozonation and UV/TiO₂ treatment. *Water Sci. Technol.*, **46**: 127-132.
- Ikehata K. et Nicell J.A. (2000) Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technol.*, **74**(3): 191-199.
- Ikehata K., Buchanan I.D. et Smith D.W. (2004) Recent developments in the production of extracellular fangal peroxidases and laccases for waste treatment. *J. Environ. Eng. Sci.*, **3**(1): 1-19.
- Irmak S., Erbatur O. et Akgerman A. (2005) Degradation of 17 β -estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques. *J. Hazardous Materials B*, **126**(1-3): 54-62.
- Islinger M., Pawlowski S., Hollert H., Volkl A. et Braunbeck T. (1999) Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay. *Sci. Total Environ.*, **233**(1-3): 109-122.
- Isobe T., Nishiyama H., Nakashima A. et Takada H. (2001) Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environ. Sci. Technol.*, **35**(6): 1041-1049.

- 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. *J. Chromato. A*, **984**(2): 195-202
- Jaffe R. (1991) Fate of hydrophobic organic pollutants in the aquatic environment: a review. *Environ. Poll.*, **69**(2-3): 237-257.
- Jiang J.Q., Yin Q., Zhou J.L. et Pearce P. (2005). Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters. *Chemosphere*, **61**(4), 544-550.
- Jobling S. et Sumpter J.P. (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.*, **27**(3-4): 361-372.
- Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G. et Sumpter J. P. (1998) Widespread sexual disruption in wild fish. *Envir. Sci. Technol.*, **32**(17): 2498-2506.
- Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M.G. et Sumpter J.P. (1995) A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.*, **103**(6): 582-587.
- Johannes C. et Majcherczyk A. (2000) Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied Environ. Microbiol.*, **66**(2): 524-528.
- John D.M., House W.A. et White G.F. (2000) Environmental fate of nonylphenol ethoxylates: differential adsorption of homologs to components of river sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19**(2): 293-300.
- Johnson A.C. et Sumpter J.P. (2001) Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Envir. Sci. Technol.*, **35**(24): 4697-4703.
- Johnson A.C., Belfroid A. et Di Corcia A. (2000) Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.*, **256**(2-3): 163-173.
- Jürgens M.D., Holthaus K.I.E., Johnson A.C. et Smith J.J.L. (2002) The potential for estradiol and ethynilestradiol degradation in English rivers. *Envir. Toxicol. Chem.*, **21**(3): 480-488.

- Karam J. et Nicell J.A. (1997) Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **69(2)**: 141-153.
- Karickhoff S.W., Brown D.S. et Scott T.A. (1979) Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Res.*, **13(3)**: 241-248.
- Kavanagh R.J., Balch G.C., Kiparissis Y., Niimi A.J., Sherry J., Tinson C. et Metcalfe C.D. (2004) Endocrine disruption and altered gonadal development in white perch (*Morone Americana*) from the lower Great Lakes region. *Environ. Health Perspect.*, **112(8)**: 898-902.
- Kazunga C., Aitken M.D. et Gold A. (1999) Primary product of the horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of pentachlorophenol. *Environ. Sci. Technol.*, **33(9)**: 1408-1412.
- Keith L. H. (1998) Environmental Endocrine Disruptors. *Pure Appl. Chem.*, **70(12)**: 2319-2326.
- Kelly K. (2000) Analysis of steroids in environmental water samples using solids-phase extraction and ion-trap gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromato. A*, **872(1-2)**: 309-314.
- Kennedy K., Alemany K. et Warith M. (2002) Optimisation of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorophenol. *Water SA*, **28(2)**: 149-158.
- Keum Y.S. et Li Q.X. (2004) Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*, **56(1)**: 23-30.
- Khanal S.K., Xie B., Thompson M.L., Sung S., Ong S.-K. et van Leeuwen J.H. (2006) Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. *Environ. Sci. Technol.*, **40(21)**: 6537-6546.
- Khim J.S., Kannan K., Villeneuve D.L., Koh C.H. et Giesy J.P. (1999) Characterization and distribution of trace organic contaminants in sediment from Masan Bay, Korea: 1. Instrumental analysis. *Environ. Sci. Technol.*, **33(23)**: 4199-4205.
- Kiesecker J.M. (2002) Synergism between trematode infection and pesticide exposure: A link to amphibian limb deformities in nature? Dans : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: pp. 9900-9904.

- Kim Y.-J. et Nicell J.A. (2006a) Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. *Bioresource Technol.*, **97(12)**: 1431–1442.
- Kim Y.-J. et Nicell J.A. (2006b) Laccase-catalyzed oxidation of bisphenol A with the aid of additives. *Process Biochem.*, **41(5)**: 1029–1037.
- Kinsley C. et Nicell J.A. (2000) Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Bioresource Technol.*, **73(2)**: 139-146.
- Kirk L.A., Tyler C.R., Lye C.M. et Sumpter J.P. (2002) Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21(5)**: 972-979.
- Kiso Y., Kon T., Kitao T. et Nishimura K. (2001) Rejection properties of alkyl phthalates with nanofiltration membranes. *J. Membr. Sci.*, **182(1-2)**: 205-214.
- Kiso Y., Nishimura Y., Kitao T. et Nishimura K. (2000) Rejection properties of non-phenylic pesticides with nanofiltration membranes. *J. Membr. Sci.*, **171(2)**: 229-237.
- Kobuke Y., Tanaka H. et Magara Y. (2002) Nationwide and Regional River Monitoring Studies as well as Bioassays and Treatment of EDs in Waterworks. Dans : *Workshop on Endocrine Disruptors*, 9 avril 2002, IWA Specialist Group on Assessment and Control of Hazardous Substances in Water (ACHSW), Melbourne, Australie.
- Kohtani S., Makino S., Kudo A., Tokumura K., Ishigaki Y., Matsunga T., Nikaido O., Hayakawa K., Nakagaki R. (2002) Photocatalytic degradation of 4-n-nonylphenol under irradiation from solar simulator: comparison between BiVO₄ and TiO₂ photocatalysts. *Chem. Lett.*, **31(7)**: 660–661.
- Kolodziej E.P., Harter T. et Sedlak D.L. (2004) Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.*, **38(23)**: 6377-6384.
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thruman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B. et Buxton H.T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S Streams, 1999-2000: a national reconnaissance.” *Environ. Sci. Technol.*, **36(6)**: 1202-1211.

- Komori K., Tanaka H., Okayasu Y., Yasojima M. et Sato C. (2004) Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan. *Water Sci. Technol.*, **50(5)**: 93-100.
- Körner W., Bolz U., Süßmuth W., Hiller G., Schuller W., Hanf V. et Hagenmaier H. (2000) Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere*, **40(9-11)**: 1131-1142.
- Körner W., Hanf V., Schuller W., Kempter C., Metzger J. et Hagenmaier H. (1999) Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci. Total Environ.*, **225(1-2)**: 33-48.
- Körner W., Spengler P., Bolz U., Schuller W., Hanf V. et Metzger J.W. (2001) Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in south western Germany. 2. Biological Analysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20(10)**: 2142-2151.
- Kosaka K., Yamada H., Matsui S. et Shishida K. (2000) The effects of the co-existing compounds on the decomposition of micropollutants using the ozone/hydrogen peroxide process. *Water Sci. Technol.*, **42(7-8)**: 353-361.
- Kozak R.G., D'Haese I. et Verstraete W. (2001) Pharmaceuticals in the environment: focus on 17 α -ethinyloestradiol. Dans : *Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risk*. Kümmerer K. (Éditeur), Springer Verlag, Heidelberg, Allemagne, pp. 49-65.
- Kreuzinger N., Clara M., Strenn B. et Kroiss H. (2004) Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals from wastewater. *Water Sci. Technol.*, **50(5)**: 149-156.
- Kuch H.M. et Ballschmiter K. (2000) Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366(4)**: 392-395.
- 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 pictogram per liter range. *Environ. Sci. Technol.*, **35(16)**: 3201-3206.
- Kulys J., Vidziunaite R et Schneider P. (2003) Laccase-catalyzed oxidation of naphthol in the presence of soluble polymers. *Enzyme Microb. Technol.*, **32(3-4)**: 455-463.

- Kurniawati S. et Nicell J.A. (2005) Kinetic Model of Laccase-Catalyzed Oxidation of Aqueous Phenol. *Biotechnol. Bioeng.*, **91(1)**: 114-123.
- Kuster M., López de Alda M.J. et Barceló D. (2004) Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *Trends Anal. Chem.*, **23(10-11)**: 790-798.
- Laganà A., Bacaloni A., De Leva I., Faberi A., Fago G. et Marinob A. (2004) Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **501(1)**: 79-88.
- Laganà A., Bacaloni A., Fago G. et Marino A. (2000) Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **14(6)**: 401-407.
- Lai K.M., Johnson K.K., Scrimshaw M.D. et Lester J.N. (2000) Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. *Environ. Sci. Technol.*, **34(18)**: 3890-3894.
- Lai K.M., Scrimshaw M.D. et Lester J.N. (2002) Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *Sci. Total Environ.*, **289(1-3)**: 159-168.
- Lai Y.-C. et Lin S.-C. (2005) Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-chlorophenol from aqueous solution. *Process Biochem.*, **40(3-4)**: 1167-1174.
- Lange I.G., Daxenberger A., Schiffer B., Witters H., Ibarreta D. et Meyer H.H.D. (2002) Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Anal. Chim. Acta*, **473(1-2)**: 27-37.
- Larsen T., Lienert J., Joss A. et Siegrist H. (2004) How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Biotechnol.*, **113(1-3)**: 295-299.
- Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Petterson M., Berg A.H., Olsson P.-E. et Förlin L. (1999) Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptives? *Aquat. Toxicol.*, **45(2-3)**: 91-97.

- Layton A.C., Gregory B.W., Seward J.R., Schultz T.W. et Sayler G.S. (2000) Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee USA. *Environ. Sci. Technol.*, **34(18)**: 3925-3931.
- Lee B.-C., Kamata M., Akatsuka Y., Takeda M., Ohno K., Kamei T. et Magara Y. (2004) Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. *Water Res.*, **38(3)**: 733-739.
- Lee H. et Peart T. (1998) Determination of 17 β -estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Inter.*, **81(6)**: 1209–1216.
- Lee H.B. et Liu D. (2002) Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water, Air, and Soil Pollut.*, **134(1-4)**: 353-368.
- Lee H.B. et Peart T.E. (1995) Determination of 4-nonylphenol in effluent and sludge from sewage treatment plants. *Anal. Chem.*, **67(13)**: 1976–1980.
- Lee H.B., Peart T.E., Bennie D.T. et Maguire R.J. (1997) Determination of nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic acid metabolites in sewage treatment plant sludge by supercritical carbon dioxide extraction. *J. Chromato. A*, **785(1-2)**: 385–394.
- Lee L.S., Strock T.J., Sarmah A.K. et Rao P.S.C. (2003) Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soils and sediment.” *Environ. Sci. Technol.*, **37(18)**: 4098-4105.
- Legler J., Zeinstra L.M., Schuitemaker F., Lanser P.H., Bogerd J., Brouwer A., Vethaak A.D., DeVoogt P., Murk A.J. et Van der Burg B. (2002) Comparison of *in vivo* and *in vitro* reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.*, **36(20)**: 4410-4415.
- Leusch F.D.L., Chapman H.F., Körner W., Gooneratne S.R. et Tremblay L.A. (2005) Efficacy of an advanced sewage treatment plant in southeast Queensland, Australia, to remove estrogenic chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, **39(15)**: 5781-5786.
- Leusch F.D.L., van den Heuvel M.R., Chapman H.F., Gooneratne S.R., Eriksson A.M.E. et Tremblay L.A. (2006) Development of methods for extraction and *in vitro* quantification

- of estrogenic and androgenic activity of wastewater samples. *Comp. Biochem. Physiol. C*, **143(1)**: 117–126.
- Liu B. et Liu X. (2004) Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions. *Sci. Total Environ.*, **320(2-3)**: 269-274.
- López de Alda M.J. et Barceló D. (2001) Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **371(4)**: 437-447.
- López-Molina D., Hiner A.N.P., Tudela J., Garcia-Cánovas F. et Rodriguez-López J.N. (2003) Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *Enzyme Microb. Technol.*, **33(5)**: 738-742.
- Lucier G.W. (1997) Dose-response relationships for endocrine disruptors: what we know and what we don't know. *Regul. Toxicol. Pharm.*, **26(1)**: 34-35.
- Lye C.M., Frid C.L.J., Gill M.E. et McCormick D. (1997) Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Mar. Pollut. Bull.*, **34(1)**: 34-41.
- Ma M., Rao K. et Wang Z. (2006) Occurrence of estrogenic effects in sewage and industrial wastewaters in Beijing, China. *Environ. Pollut.*, In press.
- MacLachy D., Peters L., Nickle J. et Van der Kraak G. (1997) Exposure to beta-sitosterol alters the endocrine status of goldfish differently than 17 β -estradiol. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16(9)**: 1895-1904.
- Maczka C., Pang S., Policansky D. et Wedge R. (2000) Evaluating impacts of hormonally active agents in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, **34(5)**: 136-141.
- Maffini M.V., Rubin B.S., Sonnenschein C. et Soto A.M. (2006) Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **25(254-255)**: 179-186.
- Majcherczyk A., Johannes C. et Hüttermann A. (1998) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.*, **22(5)**: 335–341.

- Majima K., Fukui T., Yuan J., Wang G. et Matsumoto K. (2002) Quantitative measurement of 17β -estradiol and estriol in river water by time-resolved fluoroimmunoassay. *Anal. Sci.*, **18(8)**: 869-874.
- Marangoni A.G., 2002. Enzyme Kinetics—a Modern Approach. Marangoni A.G. (Éditeur), Wiley-Interscience, Chichester, 248 p.
- Mastrup M., Jensen R.L., Schäfer A.I. et Khan S. (2001) Fate modeling - an important tool for water recycling. Dans : *Recent Advances in Water Recycling Technologies*. Schäfer A.I., Sherman P. et Waite T.D. (Éditeurs), Brisbane, Australie, pp. 103-112.
- Matsui S., Takigami H., Matsuda T., Taniguchi N., Adachi J., Kawami H. et Shimizu Y. (2000) Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment. *Water Sci. Technol.*, **42(12)**: 173-179.
- Matthiessen P. (2003) Historical perspective on endocrine disruption in wildlife. *Pure Appl. Chem.*, **75(11-12)**: 2197-2206.
- Mazur W. et Adlercreutz H. (1998) Natural and anthropogenic environmental estrogens: The scientific basis for risk assessment. *Pure Appl. Chem.*, **70(9)**: 1759-1776.
- Melcer H., Steel P. et Bedford W.K. (1995) Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic nitrogen compounds in a municipal treatment plant. *Water Environ. Res.*, **67(6)**: 926-934.
- Metcalf C.D., Hoover L. et Sang S. (1996) *Nonylphenol ethoxylates and their use in Canada*. Volume 3. World Wildlife Fund Canada Report.
- Metcalf C.D., Metcalfe T.L., Kiparissis Y., Koenig B.G., Khan C., Hughes R.J., Croley T.R., March R.E. et Potter T. (2001) Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with japanese medaka (*oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, **20(2)**: 297-308.
- Metzler M. et Pfeiffer E. (1995) Effects of estrogens on microtubule polymerization *in vitro*: correlation with estrogenicity. *Environ. Health Perspect.*, **103(Suppl 7)**: 21-22.
- Meylan W.M. et Howard P.H. (1995) Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J. Pharmacological Sciences*, **84**: 83-92.

- Mills A., Davies R.H. et Worsley D. (1993) Water purification by semiconductor photocatalysis. *Chem. Soc. Rev.*, **22**: 417–25.
- Ministère de l'écologie et du développement durable (2003) *Les perturbateurs endocriniens : quels risques ?* Comité de la prévention et de la précaution (CPP), 19 décembre 2003, Paris, France, 15 p.
- Mitani K., Fujioka M. et Kataoka H. (2005) Fully automated analysis of estrogens in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromato. A*, **1081(2)**: 218–224.
- Modaressi K., Taylor K.E., Bewtra J.K. et Biswas N. (2005) Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: protective effect of PEG on enzyme activity. *Water Res.*, **39(18)**: 4309-4316.
- Mol H.G.J., Sunarto S. et Steijger O.M. (2000) Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert.-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromato. A*, **879(1)**: 97-112.
- Moriyama K., Matsufuji H., Chino M. et Takeda M. (2004) Identification and behavior of reaction products formed by chlorination of ethynylestradiol. *Chemosphere*, **55(6)**: 839-847.
- Morris S.L. et Lester J.N. (1994) Behaviour and fate of polychlorinated biphenyls in a pilot wastewater treatment plant. *Water Res.*, **28(7)**: 1553–1561.
- Müller S.O. (2004) Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378(3)**: 582–587.
- Murk A.J., Legler J., van Lipzig M.M.H., Meerman J.H.N., Belfroid A.C., Spenkeliink A., van der Burg B., Rijs G.B.J. et Vethaak D. (2002) Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays.” *Environ. Toxicol. Chem.*, **21(1)**: 16-26.
- Nakada N., Nyunoya H., Nakamura M., Hara A., Iguchi T. et Takada H. (2004) Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23(12)**: 2807-2815.

- Nakada N., Tanishima T., Shinohara H., Kiri K. et Takada H. (2006) Pharmaceutical chemicals and endocrine disruptors in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res.*, **40(17)**: 3297–3303.
- Nakagawa S., Kenmochi Y., Tutumi K., Tanaka T. et Hirasawa I. (2002) A study on the degradation of endocrine disruptors and dioxins by ozonation and advanced oxidation processes. *J. Chem. Eng. Japan*, **35(9)**: 840-847.
- Nakamura M., (1984) Effects of estradiol-17 β on gonadal sex differentiation in two species of salmonids, the masu salmon, *Oncorhynchus masou*, and the chum salmon, *O. keta*. *Aquaculture*, **43(1-3)**: 83-90.
- Nakashima T., Ohko Y., Kubota Y. et Fujishima A. (2003) Photocatalytic decomposition of estrogens in aquatic environment by reciprocating immersion of TiO₂-modified polytetrafluoroethylene mesh sheets. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **160(1-2)**: 115–120.
- Nakashima T., Ohko Y., Tryk D.A. et Fujishima A. (2002) Decomposition of endocrine-disrupting chemicals in water by use of TiO₂ photocatalysts immobilized on polytetrafluoroethylene mesh sheets. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **151(1-3)**: 207–212.
- Nasu M., Goto M., Kato H., Oshima Y. et Tanaka H. (2001) Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants.” *Water Sci. Technol.*, **43(2)**: 101-108.
- Nghiem L.G. et Schäref A.I. (2006) Critical risk points of nanofiltration and reverse osmosis processes in water recycling applications. *Desalination*, **187(1-3)**: 303-312.
- Nghiem L.G., Schäref A.I. et Elimelech M. (2004) Removal of natural hormones by nanofiltration membranes: measurement, modeling, and mechanisms. *Environ. Science Technol.*, **38(6)**: 1888-1896.
- Nicell J.A. (1994) Kinetics of horseradish peroxidase-catalyzed polymerization and precipitation of aqueous 4-chlorophenol. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **60(2)**: 203-215.
- Nicell J.A. (2003) Enzymatic treatment of waters and wastes. Dans : *Chemical Degradation Methods for Wastes and Pollutants: Environmental and Industrial Applications*. Tarr M.A. (Éditeur), Marcel Dekker Inc., New York, NY, US, pp. 423-475.

- Nicell J.A. et Wagner M. (2003) Peroxidase-catalyzed oxidation of phenols in industrial wastewaters. Dans : *Wastewater Treatment Using Enzymes*. Sakurai A. (Éditeur), Research Signpost, Kerala, Inde, pp. 93-124.
- Nicell J.A. et Wright H. (1997) A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme Microb. Technol.*, **21**(4): 302-310.
- Nicell J.A., Saadi K.W. et Buchanan I.D. (1995) Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive. *Bioresource Technol.*, **54**(1): 5-16.
- Nichols K.M., Miles-Richardson S.R., Snyder E.M. et Giesy J.P. (1999) Effects of exposure to municipal wastewater *in situ* on the reproductive physiology of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**(9): 2001-2012.
- Noguerol T.-N., Boronat S., Jarque S., Barceló D., Piña B. (2006) Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta*, **69**(2): 351-358.
- Öberg L.G., Glas B., Swanson S.E., Rappe C. et Paul K.G. (1990) Peroxidase-catalyzed oxidation of chlorophenols to polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**(6): 930-938.
- Ohko Y., Iuchi K.-I., Niwa C., Tatsuma T., Nakashima T., Iguchi T., Kubota Y. et Fujishima A. (2002) 17 β -estradiol degradation by TiO₂ photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity." *Environ. Sci. Technol.*, **36**(19): 4175-4181.
- Ohlenbusch G., Kurnke M.U. et Frimmel E.H. (2000) Sorption of phenols to dissolved organic matter investigated by solid phase microextraction. *Sci. Total Env.*, **253**(1-3): 63-74.
- Onda K., Nakamura Y., Miya A. et Katsu Y. (2003) The behavior of estrogenic substances in the biological treatment process of sewage. *Water Sci. Technol.*, **47**(9): 109-116.
- Ong P.E.A., Chang S., Waite T.D., Schäfer A.I. et Fane A.G. (2001) Removal of trace contaminants using coagulation, PAC and microfiltration hybrid processes. Dans : *Recent Advances in Water Recycling Technologies*. Schäfer A.I., Sherman P. et Waite T.D. (Éditeurs), Brisbane, Australie, pp. 55-64.

- Quirós L., Céspedes R., Lacorte S., Viana P., Raldúa D., Barceló D. et Piña B. (2005) Detection and evaluation of endocrine-disruption activity in water samples from Portuguese rivers. *Environ. Tox. Chem.*, **24(2)**: 389-395.
- Park B.J. et Kidd K. (2005) Effects of the synthetic estrogen ethinylestradiol on early life stages of mink frogs and green frogs in the wild and *in situ*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24(8)**: 2027–2036.
- Pawlowski S., van Aerle R., Tyler C.R. et Braunbeck T. (2004) Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay.” *Ecotoxicology Env. Safety*, **57(3)**: 330-345.
- Peñalver A., Pocurull E., Borrull F. et Marcé R.M. (2002) Method based on solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. *J. Chrom. A*, **964(1-2)**: 153-160.
- Petrovic M., Solé M., López de Alda M.J. et Barceló D. (2002) Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp.” *Environ. Toxicol. Chem.*, **21(10)**: 2146–2156.
- Pillon A., Boussioux A.-M., Escande A., Ait-Aissa S., Gomez E., Fenet H., Ruff M., Moras D., Vignon F., Duchesne M.-J., Casellas C., Nicolas J.-C. et Balaguer P. (2005) Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor-[alpha]: application to environmental analysis. *Environ. Health Perspect.*, **113(3)**: 278-284.
- Planas C., Guadayol J.M., Droguet M., Escalas A., Rivera J. et Caixach J. (2002) Degradation of polyethoxylated nonylphenols in a sewage treatment plant. Quantitative analysis by isotopic dilution-HRGC/MS. *Water Res.*, **36(4)**: 982-988.
- Population Reports (2000) Oral Contraceptives - An Update. Publié par : the Population Information Program, Center for Communication Programs, The Johns Hopkins School of Public Health, Baltimore, Maryland, US, Site Internet : <http://www.infoforhealth.org/pr/a9edsum.shtml#top>, Volume XXVIII(1).
- Preziosi P. (1998) Endocrine disrupters as environmental signallers: an introduction. *Pure Appl. Chem.*, **70(9)**: 1617-1631.

- Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R. et Sumpter J. (1994) Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.*, **8(4)**: 275-285.
- Quiros L., Céspedes R., Lacorte S., Viana P., Ralduá D., Barceló D. et Piña B. (2005) Detection and evaluation of endocrine-disruption activity in water samples from Portuguese rivers. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24(22)**: 389-395.
- Ramamoorthy K., Wang F., Chen I.C., Safe S., Norris J.D., McDonnell D.P., Gaido K.W., Bocchinfuso W.P. et Korach K.S. (1997) Potency of combined estrogenic pesticides. *Science*, **275(5298)**: 405-406.
- Raman D.R., Williams E.L., Layton A.C., Burns R.T., Easter J.P., Daugherty A.S., Mullen M.D. et Sayler G.S. (2004) Estrogen content of dairy and swine wastes. *Env. Sci. Technol.*, **38(13)**: 3567-3573.
- Refsdal A.O. (2000) To treat or not treat: a proper use of hormones and antibiotics. *Animal Reprod. Sci.*, **60-61**: 109-119.
- Renner R. (1997) European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environ. Sci. Technol.*, **31(7)**: 316A-320A.
- Rodgers-Gray T.P., Jobling S., Morris S., Kelly C., Kirby S., Janbakhsh A., Harries J.E., Waldock M.J., Sumpter J.P. et Tyler C.R. (2000) Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Environ. Sci. Technol.*, **34(8)**: 1521-1528.
- Rodriguez-Mozaz S., López de Alda M.J. et Barceló 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. *J. Chromato. A*, **1045(1-2)**: 85-92.
- Rosenfeldt E.J. et Linden K.G. (2004) Degradation of endocrine disrupting chemicals bisphenol a, ethinyl estradiol, and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes. *Environ. Sci. Technol.*, **38(20)**: 5476-5483.
- Routledge E.J. et Sumpter J.P. (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.*, **15(3)**: 241-248.

- Routledge E.J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M. et Sumpter J.P. (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.*, **32**(11): 1559-1565.
- Rudder J.D., Wiele T.V.D., Dhooge W., Comhaire F. et Verstraete W. (2004) Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17[alpha]-ethynylestradiol (EE2). *Water Res.*, **38**(1): 184-192.
- Saba H. et Nakano M. (2003) Oxidation of triacylglycerol by laccase-natural mediator and laccase-mediator derived from natural compound systems. *J. Oleo Sci.*, **52**(3): 159-166.
- Sabik H., Gagné F., Blaise C., Marcogliese D.J. et Jeannot R. (2003) Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their bioconcentration by mussels (*Elliptio complanata*). *Chemosphere*, **51**(6): 349-356.
- Safe S.H. et Gaido K.W. (1998) Phytoestrogens and anthropogenic estrogenic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**(1): 119-126.
- Saito T., Kato K., Yokogawa Y., Nishida M. et Yamashita N. (2004) Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. *J. Biosci. Bioeng.*, **98**(1): 64-66.
- Sakurada J., Sekiguchi R., Sato K. et Hosoya T. (1990) Kinetic and molecular orbital studies on the rate of oxidation of monosubstituted phenols and anilines by horseradish peroxidase compound II. *Biochem.*, **29**(17): 4093-4098.
- Sakurai A., Toyoda S. et Sakakibara M. (2001) Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *coprinus cinereus* peroxidase *Biotechnol. Lett.*, **23**(12): 995-998.
- Sakuyama H., Endo Y., Fujimoto K. et Hatano Y. (2003) Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase. *J. Bioscience Bioeng.*, **96**(3): 227-231.
- Santé Canada (1999) *Human health and exposure to chemicals which disrupt estrogen, androgen and thyroid hormone physiology*. Environmental and Occupational Toxicology Division, Environmental Health Directorate (HPB), Tunney's Pasture, P.L., Canada.

- 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. *Sci. Total Environ.*, **355**: 135–144.
- Sayles G (2001) Biological fate of estrogenic compounds associated with sewage treatment: a review. Dans : *Effective Risk Management of Endocrine Disrupting Chemicals Workshop*, 18 au 19 septembre 2001, Cincinnati, OH, US.
- Schäfer A.I. et Waite T.D. (2002) Removal of endocrine disrupters in advanced treatment – the Australian approach. Dans : *Proceedings of IWA World Water Congress, Workshop Endocrine Disruptors*. IWA Specialist Group on Assessment and Control of Hazardous Substances in Water (ACHSW), Melbourne, Australie, pp. 37-51.
- Schäfer A.I., Mastrup M. et Jensen R.L. (2002) Enhancing particle interactions and removal of trace contaminants from water and wastewaters. *Desalination*, **147(1-3)**: 243-250.
- Schäfer A.I., Mastrup M. et Venkatesh S. (2001) Estrogen removal using the MIEX[®] and microfiltration hybrid process in water recycling. Dans : *Recent Advances in Water Recycling Technologies*. Schäfer A.I., Sherman P. et Waite T.D. (Éditeurs), Brisbane, Australie, pp. 41-45.
- Schäfer A.I., Nghiem D.L. et Waite T.D. (2003) Removal of natural hormone estrone from water and wastewater using nanofiltration and reverse osmosis. *Envir. Sci. Technol.*, **37(1)**: 182-188.
- Schäfer A.I., Nghiem D.L. et Waite T.D. (2004) Removal of natural hormone estrone from water and wastewater using nanofiltration and reverse osmosis. *Environ. Sci. Technol.*, **38(6)**: 1888–1896.
- Schiffer B., Daxenberger A., Meyer K. et Meyer H.H.D. (2001) The Fate of Trenbolone Acetate and Melengestrol Acetate after Application as Growth Promoters in Cattle: Environmental Studies. *Environ. Health Perspect.*, **109(11)**: 1145-1151.
- Schlenk D., Sapozhnikova Y., Irwin M.A., Xie L., Hwang W., Reddy S., Brownawell B.J., Armstrong J., Kelly M., Montagne D.E., Kolodziej E.P., Sedlak D. et Snyder S. (2005) *In vivo* bioassay-guided fractionation of marine sediment extracts from the Southern

- California bight, USA, for estrogenic activity. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24(11)**: 2820-2826
- Schlüsener M.P. et Bester K. (2005) Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19(22)**: 3269–3278.
- Schneider C., Schneider R.J. et Schöler H.F. (2004) A novel enzymelinked immunosorbent assay for ethynylestradiol using a long-chain biotinylated EE2 derivative. *Steroids*, **69(4)**: 245–253.
- Schneider J.C. et Guarente L. (1991) Vectors for expression of cloned genes in yeast: Regulation, overproduction, and underproduction. *Methods Enzymol.*, **194**: 373-388.
- Schultis T. et Metzger J.W. (2004) Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere*, **57(10)**: 1649-1655.
- Sea-River Magazine. (2001) *Le nonylphénol: un "perturbateur endocrinien" pour les poissons*. Site Internet : http://www.sea-river-news.com/06_1.htm (15 septembre 2003).
- Segmuller B.E., Armstrong B.L., Dunphy R. et Oyler A.R. (2000) Identification of autoxidation and photodegradation products of ethynylestradiol by on-line HPLC–NMR and HPLC–MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **23(5)**: 927-937.
- Servos M.R. (1999) Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Can.*, **34(1)**: 123-177.
- Servos M.R., Bennie D.T., Burnison B.K., Jurkovic A., McInnis R., Neheli T., Schnell A., Seto P., Smyth S.A. et Ternes T.A. (2005) Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Science Total Env.*, **336(1-3)**: 155-170.
- Shareef A., Parnis C.J., Angove M.J., Wells J.D. et Johnson B.B. (2004) Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroa-

- cetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromato. A*, **1026**(2): 295-300.
- Sheahan D.A., Brighty G.C., Daniel M., Kirby S.J., Hurst M.R., Kennedy J., Morris S., Routledge E.J., Sumpter J.P. et Waldock M.J. (2002) Estrogenic activity measured in a sewage treatment works treating industrial inputs containing high concentrations of alkylphenolic compounds - a case study.” *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**(3): 507-514.
- Shi J., Fujisawa S., Nakai S. et Hosomi M. (2004) Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Res.*, **38**(9): 2323-2330.
- Shore L.S., Gurevitz M. et Shemesh M. (1993) Estrogen as an environmental pollutant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **51**(3): 361-366.
- Snyder S.A. (2002) Endocrine disruptors and pharmaceutically active compounds: U.S. regulations and research. Dans : *Proceedings of IWA World Water Congress, Workshop Endocrine Disruptors*. IWA Specialist Group on Assessment and Control of Hazardous Substances in Water (ACHSW), Melbourne, Australie, pp. 1-10.
- 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. *Environ. Sci. Technol.*, **33**(16): 2814-2820.
- Snyder S.A., Vanderford B., Pearson R., Quiñones O. et Yoon Y. (2003a) Analytical Methods Used to Measure Endocrine Disrupting Compounds in Water. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, **7**(4): 224-234.
- Snyder S.A., Villeneuve D.L., Snyder E.M. et Giesy J.P. (2001) Identification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents.” *Environ. Sci. Technol.*, **35**(18): 3620-3625.
- Snyder S.A., Westerhoff P., Yoon Y. et Sedlak D.L. (2003b) Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: implications for the water industry. *Environ. Eng. Sci.*, **20**: 449-469.

- Solé M., López de Alda M.J., Castillo M., Porte C., Ladegaard-Pedersen K. et Barceló D. (2000) Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). *Environ. Sci. Technol.*, **34**(24): 5076-5083.
- Sonnenschein C. et Soto A.M. (1998) An update review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **65**(1-6): 143-150.
- Soto A.M., Sonnenschein C., Chung K.L., Fernandez M.F., Olea N. et Serrano F.O. (1995) The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.*, **103**(Suppl 7): 113-122.
- Spengler P., Körner W. et Metzger J.W. (2001) Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**(10): 2133-2141.
- Stahlschmidt-Allner P., Allner B., Römbke J. et Knacker T. (1997) Endocrine disrupters in the aquatic environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **4**(3): 155-162.
- Staples C.A., Dorn P.B., Klecka G.M., O'Block S.T. et Harris L.R. (1998) A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, **36**(10): 2149-2173.
- Stephanou E. et Giger W. (1982) Persistent organic chemicals in sewage effluent. 2. Quantitative determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, **16**(11): 800-805.
- Stopper H., Schmitt E. et Kobras K. (2005) Genotoxicity of phytoestrogens. *Mut. Res.*, **574**(1-2): 139-155
- Sumpter J.P. (2005) Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, **33**(1): 9-16.
- Sumpter J.P. et Jobling S. (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, **103**(Suppl 7): 173-178.
- Sumpter J.P., Jobling S. et Tyler C.R. (1996) Oestrogenic substances in the aquatic environment and their potential impact on animals, particularly fish. Dans : *Toxicology of aquatic*

- pollution: physiological, molecular and cellular approaches*. Taylor E.W. (Éditeur), Cambridge University Press, pp. 205–224.
- Sumpter J.P., Johnson A.C., Williams R.J., Kortenkamp A. et Scholze M. (2006) Modeling effects of mixtures of endocrine disrupting chemicals at the River Catchment Scale. *Environ. Sci. Technol.*, **40(17)**: 5478-5489.
- Suzuki K., Hirai H., Murata H. et Nishida T. (2003) Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res.*, **37(8)**: 1972-1975.
- Svenson A., Allard A.-S. et Ek M. (2003) Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Res.*, **37(18)**: 4433–4443.
- Swan S.H., Elkin E.P. et Fenster L. (1997) Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ. Health Persp.*, **105(11)**: 1228–1232.
- Swartz C.H., Reddy S., Benotti M.J., Yin H., Barber L.B., Brownawell B.J. et Rudel R.A. (2006) Steroid estrogens, nonylphenol ethoxylate metabolites, and other wastewater contaminants in groundwater affected by a residential septic system on Cape Cod, MA. *Environ. Sci. Technol.*, **40(16)**: 4895-4902.
- Tabata A., Kashiwada S., Ohnishi Y., Ishikawa H., Miyamoto N., Itoh M. et Magara Y. (2001) Estrogenic influences of estradiol-17 β , *p*-nonlphenol and bis-phenol-A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. *Water Sci. Technol.*, **43(2)**: 109-116.
- Tamagawa Y., Yamaki R., Hirai H., Kawai S. et Nishida T. (2006) Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere*, **65(1)**: 97-101.
- Tanaka T., Nose M., Endo A., Fujii T. et Taniguchi M. (2003) Treatment of Nonylphenol with Laccase in a Rotating Reactor. *J. Biosci. Bioeng.*, **96(6)**: 541–546.
- Tanghe T., Devriese G. et Verstraete W. (1998) Nonylphenol degradation in lab scale activated sludge units is temperature dependent. *Water Res.*, **32(10)**: 2889–2896.

- Tanizaki T., Kadokami K. et Shinohara R. (2002) Catalytic photodegradation of endocrine disrupting chemicals using titanium dioxide photosemiconductor thin films. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **68**(5): 732-739.
- Tatsumi K., Wada S. et Ichikawa H. (1996) Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnol. Bioeng.*, **51**(1): 126-130.
- 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. *Anal. Chem.*, **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 Res.*, **38**(19): 4075-4084.
- Ternes T.A., Kreckel P. et Mueller J. (1999b) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total Environ.*, **225**(1-2): 91-99.
- Ternes T.A., Stuber J., Herrmann N., McDowell D., Ried A., Kampmann M. et Teiser B. (2003) Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Res.*, **37**(8): 1976-1982.
- Ternes T.A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R.D. et Servos M. (1999a) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.*, **225**(1-2): 81-90.
- Thacker P.D. (2004) Livestock flood the environment with estrogen. *Environ. Sci. Technol.*, **38**(13): 241A-242A.
- The Joint Food and Agricultural Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (1998) *Residues of some veterinary drugs in animals and foods*. Food and Agriculture Organization of United Nations, FAO Food and Nutrition paper 41.
- Tong Z., Qingxiang Z., Hui H., Qin L. et Yi Z. (1997) Removal of toxic phenol and 4-chlorophenol from waste water by horseradish peroxidase. *Chemosphere*, **34**(4): 893-903.

- Tsutsumi Y., Haneda T. et Nishida T. (2001) Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere*, **42(3)**: 271-276.
- Turan A. (1995) Excretion of natural and synthetic estrogens and their metabolites: occurrence and behaviour. Dans : *Endocrinically Active Chemicals in the Environment*. German Federal Environment Agency, Berlin, Allemagne.
- Tyagi R.D., Foko V.S., Barnabé S., Vidyarthi A.S., Valéro J.R. et Surampalli R.Y. (2002) Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. *Water Sci. Technol.*, **46(10)**: 247-254.
- Tyler C., Jobling R.S. et Sumpter J.P. (1998) Endocrine disrupting in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.*, **28(4)**: 319-361.
- Tyler C.R. et Routledge E.J. (1998) Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl. Chem.*, **70(9)**: 1795-1804.
- Tyler C.R., Spary C., Gibson R., Santos E.M., Shears J. et Hill E.M. (2005) Accounting for differences in estrogenic responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*: Salmonidae) and roach (*Rutilus rutilus*: Cyprinidae) exposed to effluents from wastewater treatment works. *Environ. Sci. Technol.*, **39(8)**: 2599-2607.
- Uchida H., Fukuda T., Miyamoto H., Kawabata T., Suzuki M. et Uwajima T. (2001) Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *trametes villosa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **287**: 355-358.
- Ueda N., Partridge C., Bolland J., Hemming J., Sherman T. et Boettcher A. (2005) Effects of an environmental estrogen on male gulf pipefish, *Syngnathus scovelli* (Evermann and Kendall), a male brooding teleost. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **74(6)**: 1207-1212.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1980) *Ambient Water Quality Criteria for DDT*. Rapport No. EPA 440/5-80-038, Office of Water, Regulations and Standards, Criteria and Standards Division, Washington D.C., USEPA.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1997) *Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*. Rapport No. EPA/630/R-96/012, Washington D.C., USEPA.

- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1998) *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) final report*. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2002) *Draft detailed review paper on a fish two-generation toxicity test*. No de contrat 68-W-01-023, Washington, D.C., US.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2003) *Endocrine Disruptors Research Initiative*. Site Internet: <http://www.epa.gov/endocrine/> (May 5, 2004).
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2003a) *Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Tributyltin (TBT) – Final*. Rapport No. EPA 822-R-03-031, Office of Water, USEPA.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2003b) *Ambient aquatic life water quality criteria for atrazine - revised draft*. Rapport No. EPA-822-R-03-023, Office of Water, USEPA.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2005) *Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria – Nonylphenol – Final*. Rapport No EPA-822-F-05-003, Office of Water, USEPA.
- United States Geological Survey (USGS) (2006a) *Investigations of endocrine disruption in aquatic systems associated with the National Water Quality Assessment (NAWQA) program*. Site Internet: <http://pubs.usgs.gov/fs/FS-081-98/> (March 6, 2006).
- United States Geological Survey (USGS) (2006b) *Reconnaissance of 17 beta-estradiol, 11-ketotestosterone, vitellogenin, and gonad histopathology in common carp of United States streams; potential for contaminant-induced endocrine disruption*. Site Internet: <http://pubs.er.usgs.gov/pubs/ofr/ofr96627/> (March 6, 2006).
- Urase T., Kagawa C. et Kikuta T. (2005) Factors affecting removal of pharmaceutical substances and estrogens in membrane separation bioreactors. *Desalination*, **178**(1-3): 107-113.
- Vader J.S., van Ginkel C.G., Sperling F.M.G.M., 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.

- Valentini F., Compagnone D., Gentili A. et Palleschi G. (2002) An electrochemical ELISA procedure for the screening of 17 β -estradiol in urban waste waters. *Analyst*, **127**(10): 1333–1337.
- Van Aerle R., Pounds N., Maddix S., Hutchinson T.H. et Tyler C.R. (2002) Windows of sensitivity for the estrogenic effects of ethinylestradiol in early life-stages of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicol.*, **11**(6): 423-434.
- Van den Belt K., Verheyen R. et Witters H. (2001) Reproductive effects of ethinylestradiol and 4-t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **41**(4): 458-467.
- Vandertol-Vanier H.A. (2000) The role of laccase from *coriolopsis gallica* in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. Master Thesis, University of Alberta, Department of Biological Sciences, 193 p.
- Vermeirssen E.L.M., Suter M.J.-F. et Burkhardt-Holm P. (2006) Estrogenicity patterns in the swiss midland river Lützelrmurg in relation to treated domestic sewage effluent discharges and hydrology. *Environ. Toxicol. Chem.*, **25**(9): 2413–2422.
- 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.
- Wada S., Ichikawa H. et Tatsumi K. (1995) Removal of phenols and aromatic amines from wastewaters by a combination treatment of tyrosinase and a coagulant. *Biotechnol. Bioeng.*, **45**(4): 304-309.
- Wagner M. et Nicell J.A. (2001) Treatment of a foul condensate from kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.*, **35**(2): 485-495.
- Wagner M. et Nicell J.A. (2002a) Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.*, **36**(16): 4041-4052.
- Wagner M. et Nicell J.A. (2002b) Impact of dissolved wastewater constituents on peroxidase-catalyzed treatment of phenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **77**(4): 419-428.

- Wagner M. et Nicell J.A. (2003) Impact of the presence of solids on peroxidase-catalyzed treatment of aqueous phenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78(6)**: 694-702.
- Wagner M. et Nicell J.A. (2005) Evaluation of horseradish peroxidase for the treatment of estrogenic alkylphenols. *Water Qual. Res. J Canada*, **40(2)**: 145-154.
- Wahlberg C., Renberg L. et Wideqvist U. (1990) Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates as their pentafluorobenzoates in water, sewage sludge and biota. *Chemosphere*, **20(1-2)**: 179-195.
- Watanabe N., Horikoshi S., Kawabe H., Sugie Y., Zhao J. et Hidaka H. (2003) Photodegradation mechanism for bisphenol A at the $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}$ interfaces. *Chemosphere*, **52(5)**: 851-859.
- Weber S., Gallenkemper M., Melin T., Dott W. et Hollender J. (2004) Efficiency of nanofiltration for the elimination of steroids from water. *Water Sci. Technol.*, **50(5)**: 9-14.
- Weber S., Leuschner P., Kämpfer P., Dott W. et Hollender J. (2005) Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67(1)**: 106-112.
- Westerhoff P., Yoon Y., Snyder S. et Wert E. (2005) Fate of endocrinedisruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environ. Sci. Technol.*, **39(17)**: 6649-6663.
- White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P. et Parker M.G. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, **135(1)**: 175-182.
- Wintgens T., Gallenkemper M. et Melin T. (2002) Endocrine disrupter removal from wastewater using membrane bioreactor and nanofiltration technology. *Desalination*, **146(1-3)**: 387-391.
- Wintgens T., Gallenkemper M. et Melin T. (2004) Removal of endocrine disrupting compounds with membrane processes in wastewater treatment and reuse. *Water Sci. Technol.*, **50(5)**: 1-8.
- World Health Organization (WHO) (2002) *Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors*. Document WHO/PCS/EDC/02.2, Geneva, Suisse.

- Wrenn T.R., Wood J.R., Fries G.F. et Bitman J. (1970) Tests of estrogenicity in rats fed low levels of o,p-DDT. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **5(1)**: 61-66.
- Wright H. et Nicell J.A. (1999) Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technol.*, **70(1)**: 69-79.
- Wu Y., Taylor K.E., Biswas N. et Bewtra J.K. (1997) Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. *Wat. Res.*, **31(11)**: 2699-2704.
- Wu Y., Taylor K.E., Biswas N. et Bewtra J.K. (1998) A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol. *Enzyme Microb. Technol.*, **22(5)**: 315-322.
- Wu Y., Taylor K.E., Biswas N. et Bewtra J.K. (1999) Kinetic model for removal of phenol by horseradish peroxidase with PEG. *J. Environ. Eng.*, **125(5)**: 451-458.
- Xiao X-Y., McCalley D.V. et Mcevoy J. (2001) Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *J. Chromato. A*, **923(1-2)**: 195-204.
- Xu F. (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochem.*, **35(23)**: 7608-7614.
- Xuan Y.J., Endo Y. et Fujimoto K. (2002) Oxidative degradation of bisphenol A by crude enzyme prepared from potato. *J. Agric. Food Chem.*, **50(22)**: 6575-6578.
- Yamada K., Akiba Y., Shibuya T., Kashiwada A., Matsuda K. et Hirata M. (2005) Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads. *Biotechnol. Prog.*, **21(3)**: 823-829.
- Yamamoto A., Kakutani N., Yamamoto K., Kamiura T. et Miyakoda H. (2006) Steroid hormone profiles of urban and tidal rivers using LC/MS/MS equipped with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization sources. *Environ. Sci. Technol.*, **40(13)**: 4132-4137

- Ying G.-G., Kookana R.S. et Ru Y.-J. (2002b) Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.*, **28(6)**: 545-551.
- Ying G.-G., Williams B. et Kookana R. (2002a) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. *Environ. Int.*, **28(3)**: 215-226.
- Yoon Y., Westerhoff P. et Snyder S.A. (2005) Adsorption of 3H-labeled 17 α -estradiol on powdered activated carbon. *Water, Air, Soil Pollut.*, **166(1-4)**: 343-351.
- Yoon Y., Westerhoff P., Snyder S.A. et Esparza M. (2003) HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17-estradiol, and 17-ethynyl estradiol on powdered activated carbon. *Water Res.*, **37(14)**: 3530-3537.
- Yoon Y., Westerhoff P., Snyder S.A. et Wert E.C. (2006) Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products. *J. Membrane Sci.*, **270(1-2)**: 88-100.
- Yoon Y., Westerhoff P., Snyder S.A., Wert E.C. et Yoon J. (2007) Removal of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals by nanofiltration and ultrafiltration membranes. *Desalination*, **202(1-3)**: 16-23.
- Yoshida M., Ono H., Mori Y., Chuda Y. et Mori M. (2002) Oxygenation of bisphenol A to quinones by polyphenol oxidase in vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **50(15)**: 4377-4381.
- Young W.F., Whitehouse P., Johnson I. et Sorokin N. (2002) *Proposed predicted-no-effect-concentrations (PNECs) for natural and synthetic steroid oestrogens in surface waters*. Rapport technique No. P2-T04/1, Environment Agency R&D Dissemination Centre, Bristol, Angleterre.
- Zacharewski T. (1997) *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. *Environ. Sci. Technol.*, **31(3)**: 613-623.
- Zacharewski T. (1998) Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of *in vivo* and *in vitro* assays. *Environ. Health Perspect.*, **106(Suppl 2)**: 577-582.
- Zhang F., Bartels M.J., Brodeur J.C., McClymont E.L. et Woodburn K.B. (2004) Quantitation of 17 α -ethynylestradiol in aquatic samples using liquid-liquid phase extraction, dansyl

derivatization, and liquid chromatography/positive electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18(22)**: 2739–2742.

Zhang G. et Nicell J.A. (2000) Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.*, **34(5)**: 1629-1637

Zhang Y. et Zhou J.L. (2005) Removal of estrone and 17 β -estradiol from water by adsorption. *Water Res.*, **39(16)**: 3991-4003.

