

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Développement d'un procédé à deux phases liquides permettant l'extraction, la concentration et la biodégradation de modulateurs endocriniens

**Par
Julianne Ouellette**

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade Maître ès Sciences (M. Sc.)
en Microbiologie Appliquée

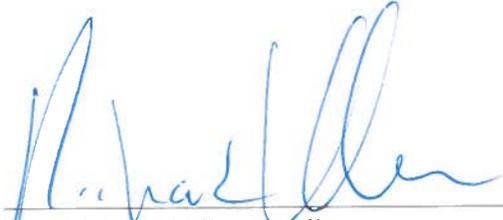
Jury d'évaluation

Examineur Interne	François Lépine INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Sébastien Sauvé Université de Montréal, Département de chimie
Directeur de recherche	Richard Villemur INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Le principal objectif de ce projet est de vérifier la possibilité d'employer un système à deux phases immiscibles pour permettre la biodégradation de certains modulateurs endocriniens. Les xénobiotiques ciblés au cours de cette étude, ont été les composés d'origine naturelle et synthétique présents en plus grandes concentrations dans les eaux usées et ceux reconnus comme possédant les potentiels estrogéniques les plus importants c'est-à-dire : l'estrone (E1), l'estradiol (E2), l'estriol (E3) le bisphénol A (BPA) et le 4-n-nonylphénol (NP). Une méthode analytique comprenant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), en association avec deux méthodes d'extraction ont permis d'extraire et d'analyser les six composés à l'étude compris dans les deux phases du système. Des tests préliminaires ont été menés sur l'huile de silicone et l'Hytrex afin d'évaluer laquelle de ces deux phases immiscibles convient le mieux aux modulateurs endocriniens testés. L'évaluation de la solubilité maximale, de la capacité de relargage ainsi que du coefficient de partition des composés dans les phases hydrophobes testées ont démontré que les modulateurs à l'étude présentent une variation de leur propriété physico-chimique trop importante pour l'utilisation d'une phase hydrophobe universelle. Le modèle de système biphasique employant les deux phases hydrophobes à l'étude a également été utilisé afin d'enrichir six différents consortiums bactériens exposés à 40 ou à 100 mg/L de chacun des modulateurs endocriniens, selon la nature du composé et de la phase hydrophobe employée. L'évaluation du rendement de biodégradation des modulateurs endocriniens généré par les six consortiums bactériens enrichis démontre que certains d'entre eux abritent des microorganismes capables de dégrader le bisphénol A ainsi que l'estriol sans toutefois induire une minéralisation complète. L'évaluation du potentiel de biodégradation des composés démontre également une transformation de l'estradiol en estrone par l'intermédiaire de certains enrichissements. Une étude préliminaire de la composition microbienne d'un de ces enrichissements a permis d'isoler sept souches associées à cinq genres différents et capables de dégrader les estrogènes naturels.


Julianne Ouellette, étudiante


Richard Villemur, directeur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en un premier temps mon directeur de recherche, Richard Villemur, de m'avoir permis de réaliser ce projet de recherche. Sa confiance, sa disponibilité ainsi que son soutien m'ont été d'une grande aide tout au long de ces deux années. Je tiens également à remercier les chimistes du Groupe de recherche en microbiologie de l'environnement, François Lépine et Sylvain Milot pour m'avoir aidé à réaliser toute la portion chimie analytique de ce projet. Merci également à Sylvia dos Santos et Germain Lacoste-Caron, qui ont également travaillé sur le projet et avec qui j'ai eu d'intéressantes discussions. J'aimerais également remercier tous les membres du groupe de recherche en microbiologie de l'environnement en particulier mes collègues étudiants pour leur précieux conseils ainsi que pour leur joie de vivre. Finalement, je remercie le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) ainsi que la Fondation Armand-Frappier pour leur soutien financier au cours de ces deux années.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES SIGLES ET DES ABBRÉVIATIONS.....	xiv
INTRODUCTION	xvi
1. REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1 Introduction aux modulateurs endocriniens	1
1.1.1 Structures et propriétés physico-chimiques des modulateurs endocriniens.....	2
1.1.1.1 Hormones naturelles et synthétiques.....	3
1.1.1.2 Composés d'origine industrielle	4
1.2 Mécanisme d'action des estrogènes et des modulateurs endocriniens.....	7
1.2.1 Les estrogènes et le rôle physiologique des récepteurs estrogéniques.....	7
1.2.2 Mécanismes d'action des modulateurs endocriniens.....	8
1.2.2.1 Inhibition de l'aromatase	9
1.2.2.2 Interférence des récepteurs estrogéniques.....	9
1.2.2.3 Perturbation du métabolisme des hormones	10
1.3 Potentiel estrogénique.....	11
1.3.1 Évaluation du potentiel estrogénique de manière in vivo	11
1.3.2 Évaluation du potentiel estrogénique de manière in vitro.....	12
1.3.3 Potentiel estrogénique des modulateurs endocriniens à l'étude.....	13
1.4 Présence des modulateurs endocriniens dans l'environnement.....	14
1.5 Impact des modulateurs endocriniens à l'étude.....	16
1.6 Traitements des eaux usées.....	16
1.6.1 Traitement préliminaire et sédimentation	17
1.6.2 Traitements secondaires	17
1.6.3 Traitements tertiaires.....	19

1.7	Microorganismes responsable de la biodégradation des modulateurs endocriniens	21
1.7.1	Biodégradation des estrogènes	21
1.7.1.1	Bactéries hétérotrophes	21
1.7.1.2	Biomasse nitrifiante	22
1.7.2	Biodégradation des composés industriels	23
1.7.2.1	Biodégradation du nonylphénol	23
1.7.2.2	Biodégradation du bisphénol A	24
1.8	Systèmes biphasiques	28
1.8.1	Caractéristiques des systèmes à deux phases immiscibles	28
1.8.2	Mécanismes microbiens impliqués dans les systèmes biphasiques	32
1.8.3	Contraintes et restrictions des systèmes biphasiques	33
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	36
2.1	Analyse des modulateurs endocriniens à l'étude par CG-SM	36
2.1.1	Dérivation des modulateurs endocriniens	36
2.1.2	Analyses des modulateurs endocriniens par CG-SM	36
2.1.3	Extraction des modulateurs endocriniens des phases aqueuses et hydrophobes	37
2.1.3.1	Extraction des phases aqueuses à l'acétate d'éthyle	38
2.1.3.1.1	Évaluation de la capacité de relargage de l'Hytrel	38
2.1.3.1.2	Évaluation du coefficient de partition	38
2.1.3.1.3	Test de biodégradation	38
2.1.3.2	Extraction des phases hydrophobes	39
2.1.3.2.1	Extraction en phase solide de l'huile de silicone	41
2.1.3.2.2	Double extraction au méthanol de l'Hytrel	41
2.2	Évaluation de la solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans les phases hydrophobes	41
2.2.1	Solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l'huile de silicone	41
2.2.2	Solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l'Hytrel	43
2.3	Évaluation de la capacité de relargage de l'Hytrel	46
2.3.1	Chargement des modulateurs endocriniens dans l'Hytrel	46
2.3.2	Démarrage du système biphasique	47

2.3.3	Analyse des deux phases suite au relargage.....	47
2.4	Évaluation du coefficient de partition des différents modulateurs dans l’Hytrel	51
2.4.1	Préparation des solutions aqueuses	51
2.4.2	Démarrage des systèmes biphasique.....	52
2.4.3	Analyse des deux phases suite à la partition des modulateurs	53
2.5	Enrichissement en système biphasique.....	58
2.5.1	Modulateurs endocriniens	58
2.5.2	Biomasse employée.....	58
2.5.3	Composition des enrichissements	59
2.5.4	Chargement des modulateurs endocriniens dans les phases hydrophobes	61
2.5.5	Repiquage et conditions d’incubation	61
2.5.6	Conservation du consortium	62
2.6	Étude préliminaire de la composition de l’enrichissement <i>A - Hytrel</i>	62
2.6.1	Isolement des souches	62
2.6.2	Extraction d’ADN par billes de verre	63
2.6.3	Électrophorèse sur gel d’agarose	64
2.6.4	Amplification des gènes de l’ARN ribosomal (ARNr) 16S	65
2.6.5	Séquençage des gènes ARNr 16S des isolats de l’enrichissement <i>A-Hytrel</i> .	65
2.7	Évaluation du rendement de biodégradation des modulateurs endocriniens.....	66
2.7.1	Test de dégradation	66
3	RÉSULTATS.....	68
3.1	Analyse des modulateurs endocriniens par CG-SM.....	68
3.1.1	Méthode au CG-SM.....	68
3.1.2	Évaluation de la limite de quantification	70
3.2	Étude comparative du rendement d’extraction obtenu par différente cartouche d’extraction en phase solide.....	72
3.3	Solubilité maximale des modulateurs dans les phases hydrophobes.....	73
3.3.1	Solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l’huile de silicone.	73
3.3.2	Solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l’Hytrel.....	75
3.4	Détermination de la capacité de relargage des modulateurs endocriniens en système biphasique	75

3.5	Détermination du coefficient de partition des différents modulateurs endocriniens	79
3.6	Enrichissements de consortiums microbiens dégradant les M.E. et isolement de souches bactériennes	82
3.6.1	Caractérisation du consortium bactérien A-Hytrel	82
3.6.2	Évaluation du potentiel de dégradation des modulateurs endocriniens	85
4	DISCUSSION	91
4.1	Analyse et quantification des modulateurs endocriniens	91
4.1.1	Méthode d'analyse au CG-SM	91
4.1.2	Traitements des phases hydrophobes	92
4.2	Sélection de la phase hydrophobe du système	93
4.2.1	Coûts des phases hydrophobes	94
4.2.2	Affinité des phases hydrophobes pour les modulateurs endocriniens	94
4.3	Microflore sélectionnée en système biphasique	97
4.3.1	Capacité de dégradation de la microflore	98
4.3.2	Diversité bactérienne issue de l'enrichissement <i>A-Hytrel</i>	99
4.3.3	Efficacité des isolats versus les consortiums	100
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	102
	Références	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques des composés à l'étude.	6
Tableau 2 : Concentrations des modulateurs endocriniens dans l'environnement	15
Tableau 3. Microorganismes dégradant les modulateurs endocriniens	25
Tableau 4. Phases hydrophobes employées en système à deux phases immiscibles.....	31
Tableau 5 : Techniques analytiques employées pour l'analyse des modulateurs endocriniens ainsi que leurs limites de détection.....	35
Tableau 6. Ions de confirmation et de quantification des modulateurs endocriniens et des standards deutérés dérivés.....	37
Tableau 7. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des contrôles issus de la détermination de la solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l'Hytrel.	45
Tableau 8. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des fractions issues de la détermination de la solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l'Hytrel.	45
Tableau 9. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des fractions issues de la détermination de la capacité de relargage de l'Hytrel.	49
Tableau 10 : Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des contrôles issus de la détermination de la capacité de relargage de l'Hytrel.	50
Tableau 11. Volume des solutions-mères à 1000 mg/L employées pour saturer les différentes phases aqueuses ainsi que des dilutions effectuées afin d'obtenir trois concentrations distinctes employées pour l'évaluation du coefficient de partition des différents modulateurs endocriniens.	52

Tableau 12. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des fractions issues de la détermination du coefficient de partition des différents estrogènes dans l'Hytrel.....	55
Tableau 13. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des fractions issues de la détermination du coefficient de partition du nonylphénol et du bisphénol A dans l'Hytrel.....	56
Tableau 14. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des contrôles issus de la détermination du coefficient de partition des différents modulateurs dans l'Hytrel.....	57
Tableau 15. Description de la composition des enrichissements.....	60
Tableau 16. Composition des géloses TSA employées pour l'ensemencement des enrichissements et des isolats sélectionnés pour le test de dégradation.....	67
Tableau 17. Paramètres de régression linéaire des courbes de calibration et les limites de quantification des différents composés selon la méthode de CG-SM développée.	71
Tableau 18 : Solubilité des modulateurs endocriniens dans l'huile de silicone	74
Tableau 19: Solubilité des modulateurs endocriniens dans l'Hytrel	75
Tableau 20: Capacité de relargage des modulateurs endocriniens dans l'eau à partir de l'Hytrel	78
Tableau 21: Coefficients de partition des modulateurs endocrinien dans l'Hytrel.....	81
Tableau 22 : Résultats d'identification des isolats issus de l'enrichissement <i>A-Hytrel</i> . L'identification a été réalisée par l'intermédiaire de l'analyse des séquences avec la banque de données BLASTn.	84
Tableau 23. Caractéristiques désirables d'un polymère employé pour le relargage de substances peu solubles dans l'eau à des organismes dégradeurs dans un système solide-liquide.....	94

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Mécanisme d'action des récepteurs estrogéniques à l'échelle moléculaire. Figure adaptée de (Mueller 2004).	8
Figure 2 : Rôle de l'aromatase dans la biosynthèse du 17- β -estradiol. Image adaptée de (Yang et al. 2006).	9
Figure 3. Interférence directe des récepteurs estrogéniques par l'intermédiaire des modulateurs endocriniens. Figure adaptée de (Swedenborg et al. 2009).....	10
Figure 4 : Représentation schématique du système d'expression inductible par les estrogènes chez la levure (YES).	13
Figure 5. Étapes nécessaires à l'extraction en phase solide des modulateurs endocriniens contenus dans l'huile de silicone.	40
Figure 6. Représentation graphique du programme utilisé pour l'amplification de l'ADNr 16S des isolats issus de l'enrichissement <i>A-Hytrel</i>	65
Figure 7: Chromatogramme du décompte total des ions (TIC) d'une solution standard contenant 25 mg/L des modulateurs endocriniens dérivés et de leur standard internes.	69
Figure 8: Courbes de calibrations des différents composés à l'étude établies par l'intermédiaire de solutions standards de concentrations variant entre 0.0005 mg/L et 100 mg/L.	71
Figure 9: Pourcentages de récupération du 17 - α - éthinylestradiol, du bisphénol A et du 4 - n - nonylpénol contenus dans l'huile de silicone en utilisant différents types de cartouches d'extraction en phase solide (SPE).	73
Figure 11: Évaluation des rendements de dégradation de l'estradiol (E2), de l'estriol (E3) de l'estrone (E1) et du 17 - α - éthinylestradiol (EE2) obtenus par les enrichissements des classes A et D après 4 jours d'incubation.	88
Figure 12: Évaluation des rendements de dégradation du bisphénol A obtenus par les enrichissements associés aux classes B et D après 4 jours d'incubation	89
Figure 13: Évaluation des rendements de dégradation de l'estradiol (E2), de l'estriol (E3) de l'estrone (E1) et du 17 - α - éthinylestradiol (EE2) générés par les sept souches sélectionnées de l'enrichissement <i>A-Hytrel</i> suite à 4 jours d'incubation	90

LISTE DES SIGLES ET DES ABBRÉVIATIONS

E1	Estrone
E2	17- β -Estradiol
E3	Estriol
EE2	17 - α éthynylestradiol
BPA	Bisphénol A
NP	4-n-nonylphénol
mg	milligramme
L	Litre
Log K _{ow}	Logarithme du coefficient de partition octanol-eau
NPE	Nonylphénol éthoxylate
R.E	Récepteurs estrogéniques
ERE	Élément de réponse estrogénique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
CYP	Cytochrome P450
hER	<i>Human estrogen receptor</i>
CPRG	chlorophenol red- β -D-galactopyranoside
YES	Yeast Estrogen Screen test
μ g	microgramme
SRT	<i>Solids retention time</i>
HRT	Hydraulic retention time
CL	Chromatographie en phase liquide
CG	Chromatographie en phase gazeuse
CG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
EPS	Extraction en phase solide
MeEE2	Menastrol
RBS	Réacteur biologique séquentiel
TSA	<i>Tryptic soy agar</i>
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
BSA	Albumine de sérum bovin
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
TIC	<i>Total ion count</i>
Ctl	Contrôle

INTRODUCTION

Depuis la moitié du 20^e siècle, il a été établi que le rejet de composés d'origines industrielles et pharmaceutiques dans l'environnement provoque une perturbation du système endocrinien chez de nombreux amphibiens et poissons. Une exposition à ce genre de composés génère sur la faune aquatique des anomalies au niveau du système reproducteur par la féminisation des poissons mâles en plus d'interférer avec le développement normal des gonades. La présence de ce genre de composés dans l'environnement n'affecte pas seulement les organismes au bas de la chaîne alimentaire; il a également été proposé que les modulateurs endocriniens puissent être la cause de l'apparente baisse de la qualité du sperme depuis les années 1940 et l'augmentation de l'incidence du cancer des testicules chez l'homme. La principale voie d'entrée de ces composés dans l'environnement se fait via les effluents des usines de traitements des eaux usées et des industries. Les estrogènes et les alkylphénols sont les composés présentant le plus fort potentiel estrogénique retrouvés dans les eaux usées. C'est pourquoi ce projet a en particulier porté sur l'étude de ces deux familles de composés. Les faibles concentrations de modulateurs (de l'ordre du ng/L au µg/L) rendent leur élimination inefficace par les systèmes conventionnels de traitements des eaux usées. Les systèmes à deux phases immiscibles constituent une alternative intéressante aux méthodes physico-chimiques couramment employées pour le traitement des xénobiotiques contenus dans les eaux usées. Ce genre de système est employé depuis les vingt dernières années dans de nombreux processus visant la biodégradation de polluants environnementaux à caractère hydrophobe.

Le but de ce projet était donc de développer un système à deux phases immiscibles pour permettre la biodégradation des modulateurs endocriniens retrouvés en plus grandes concentrations dans les eaux usées c'est-à-dire : l'estradiol, l'estrone, l'estriol, l'éthynylestradiol, le nonylphénol, et le bisphénol A. L'hypothèse principale était que le caractère hydrophobe des ces modulateurs permettrait leur mouvement des eaux usées à une phase hydrophobe permettant de les rendre plus disponibles pour leur biodégradation par une flore microbienne adaptée.

Pour permettre la réalisation de ce projet, trois objectifs spécifiques ont été abordés. En un premier temps, des méthodes analytiques ont été développées afin de permettre la quantification et par le fait même le suivi des modulateurs endocriniens au sein des deux phases du système. Ensuite, l'identification de la phase hydrophobe la plus appropriée entre l'Hytrel et l'huile de silicone, soit les deux phases testées, a été effectuée par l'entremise de l'évaluation de certains paramètres physico-chimiques tels que la solubilité maximale des composés dans chaque phase, la capacité de relargage des modulateurs ainsi que leur coefficient de partition au sein de l'Hytrel. Finalement, le développement d'une microflore adaptée au système biphasique et capable de dégrader certains des modulateurs à l'étude a été mise au point suite à des enrichissements en série comprenant comme principale source de carbone les xénobiotiques testés.

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Introduction aux modulateurs endocriniens

On compte jusqu'à présent plus de 100 000 composés synthétiques et semi-synthétiques sur le marché (Acerini et al. 2006). Parmi ceux-ci, il existe une classe bien particulière qui depuis les trente dernières années suscite beaucoup d'inquiétude au sein de la communauté scientifique. Il s'agit d'un groupe de composés appelés modulateurs endocriniens. Ces molécules sont définies comme étant une substance exogène ou un mélange de celles-ci qui altère les fonctions du système endocrinien et qui par le fait même génère des effets sur les organismes et leur progéniture (Vos et al. 2000). L'agence de protection environnementale des États-Unis (US EPA) décrit les modulateurs comme étant capable d'interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison et l'élimination des hormones naturelles responsables de maintenir l'homéostasie de l'organisme. L'ensemble des molécules capables de perturber le système endocriniens sont jusqu'à présent regroupées sous six grandes classes soit : les hormones (naturelles et synthétiques), les produits de soin personnel, les produits chimiques industriels, les pesticides, les sous-produits de combustion et les surfactants (Chang et al. 2009). Les principaux organismes affectés par une exposition à ce genre de composés sont les mammifères, les oiseaux, les reptiles, les poissons et les invertébrés (Tyler et al. 1998). Ces organismes entrent en contact avec ces types de polluants par l'intermédiaire de l'eau, de l'air et des aliments. Dès les années soixante, on constata que ce type de molécules n'étaient pas complètement éliminées par les traitements conventionnels des eaux, menant donc à l'évidence que ces derniers peuvent se retrouver dans la nature (Stumm-Zollinger et al. 1965). Au cours des années soixante-dix et quatre-vingt, la présence d'hormones d'origine humaine et des produits pharmaceutiques ont été détectés dans les effluents des usines de traitements des eaux ainsi que dans les cours d'eau avoisinants (Aherne et al. 1989). Personne n'a semblé alarmé par cette découverte puisque les concentrations détectées étaient extrêmement faibles. Cependant, c'est au cours de la décennie des années quatre-vingt-dix que la lumière a été jetée sur les réels impacts que peut générer la présence de tels composés en milieu aquatique et ce même à de faibles

concentrations. En 1995 et 1996, on observa dans certaines rivières du Royaume-Uni la présence de poissons mâles présentant des caractéristiques d'organismes intersexués c'est-à-dire exhibant la présence simultanée des caractères gonadiques retrouvés chez le mâle et chez la femelle de la même espèce (Jobling et al. 1998). Les principaux responsables de cette perturbation ont été identifiés comme étant les estrogènes naturels (estradiol et estrone) et synthétiques (17 - α - éthinylestradiol) excrétés par les humains et retrouvés dans les effluents d'eaux traitées.

Tel que cité précédemment, les modulateurs endocriniens sont capables de perturber le système du même nom. Le système endocrinien est un système extrêmement complexe via lequel des stimuli exogènes et endogènes sont traités par l'intermédiaire du système nerveux central. Ce dernier déclenche une longue chaîne de réactions biochimiques menant à la sécrétion par l'hypothalamus de glycoprotéines appelées glandotrophines. (Lintelmann et al. 2003). Ces glycoprotéines vont à leur tour agir sur les principales glandes endocrines c'est-à-dire l'hypophyse, la thyroïde, le thymus, les glandes surrénales, le pancréas, les ovaires et les testicules afin de générer la synthèse et la sécrétion d'hormones spécifiques. Ces dernières régulent de nombreuses fonctions du corps en se liant à des récepteurs situés dans certains tissus et organes. En constatant l'ampleur des fonctions régulées par ce seul système, il est facile de comprendre qu'une perturbation du système endocrinien peut générer de graves effets sur le fonctionnement normal des organismes. Les effets les plus flagrants exposés dans les ouvrages scientifiques jusqu'à présent portent principalement sur les anomalies du développement des organes reproducteurs (Bergeron et al. 1994; MacLatchy et al. 1995). Ces dernières sont principalement causées par une perturbation du fonctionnement normal des estrogènes et des récepteurs estrogéniques (Tyler et al. 1998).

1.1.1 Structures et propriétés physico-chimiques des modulateurs endocriniens

Décrire les structures et les propriétés de l'ensemble des composés répertoriés comme modulateurs endocriniens serait un travail beaucoup trop laborieux, c'est pourquoi, au cours de cette section seules les structures et les propriétés physico-chimiques de six molécules en particulier seront abordées. Il s'agit des six composés

employés aux cours de cette étude c'est-à-dire : l'estrone (E1), l'estradiol (E2), l'estriol (E3) et le 17 - α - éthynelestradiol (EE2) qui appartiennent à la classe des hormones naturelles et synthétiques ainsi que le bisphénol A (BPA) et le 4-n-nonylphénol (NP) deux composés d'origine industrielle.

1.1.1.1 Hormones naturelles et synthétiques

Les estrogènes naturels sont sécrétés principalement par les cellules folliculaires entourant les ovocytes des ovaires (Tyler et al. 1998). Il s'agit d'hormones stéroïdiennes lipophiles et solubles dans les graisses. La famille des estrogènes naturels compte trois composés. Parmi ceux-ci se trouve l'estradiol, le principal et le plus puissant des trois. L'estriol et l'estrone constituent des métabolites moins actifs que l'estradiol; par contre, ils se retrouvent en plus grande quantité dans l'urine (Tapiero et al. 2002). Le 17 - α - éthynelestradiol appartient à la famille des estrogènes synthétiques et correspond à l'estrogène le plus puissant des quatre estrogènes à l'étude. Ce dernier entre principalement dans la conception de la pilule contraceptive, le médicament le plus prescrit dans le monde entier (De Mes et al. 2005)

Les estrogènes naturels et synthétiques sont constitués de dix-huit atomes de carbone regroupés sous trois cycles hexagonaux A, B, C et un cycle pentagonal D (Combalbert et al. 2010). Ces quatre molécules présentent des différences structurelles au niveau du cycle pentagonal D plus particulièrement par la nature du groupement fonctionnel présent aux positions C-16 et C-17 (Hanselman et al. 2003). L'estradiol se caractérise par la présence d'un groupement hydroxyle en position C-17 contrairement à l'estrone qui possède pour cette même position un groupement carbonyle. L'estriol se distingue de l'estradiol et de l'estrone par la présence de deux groupements hydroxyle en position C-16 et C-17. Le 17 - α - éthynelestradiol constitue en fait une molécule d'estradiol additionnée d'un groupement éthyne en position C-17.

Les valeurs présentées au tableau 1 révèlent que les estrogènes sont très peu solubles dans l'eau avec une solubilité moyenne pour les estrogènes naturels de 13 mg/L. Le 17 - α - éthynelestradiol présente une solubilité encore plus faible que les composés naturels avec une valeur de 4.8 mg/L. Leur faible solubilité dans l'eau corrèle avec leur

caractère hydrophobe qui est également élevé en présentant des valeurs de coefficient de partition variant entre 2.45 et 3.67. Leur très faible valeur de pression de vapeur démontre que ces composés sont très peu volatiles.

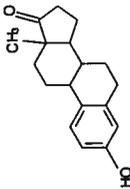
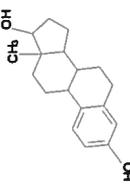
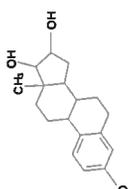
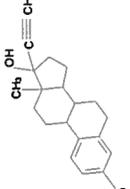
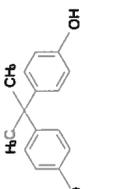
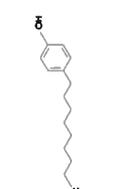
1.1.1.2 Composés d'origine industrielle

Le bisphénol A est un composé contenant deux noyaux aromatiques et deux groupements hydroxyle en position *para* (Bae et al. 2002). Il entre dans la composition des résines époxy qui sont largement utilisées comme enduit protecteur sur les contenants alimentaires, dans les peintures et dans les produits adhésifs (Staples et al. 1998). La littérature fait état du fait que le bisphénol A peut s'échapper des emballages plastiques contaminant ainsi la nourriture et l'environnement. D'après sa solubilité moyenne dans l'eau et sa très faible valeur de pression de vapeur, le bisphénol A peut présenter une tendance à se partitionner dans l'eau et son taux d'évaporation à partir du sol ou de l'eau est faible (Lintelmann et al. 2003). Sa valeur de coefficient de partition ($\text{Log } K_{ow}$: 3.4) suggère que dans l'eau, ce composé peut se retrouver associé avec la matière organique contenue dans les sédiments (Tsai 2006). Toutefois, ce composé est biodégradable par de nombreux microorganismes retrouvés dans l'environnement. Il est également métabolisable par certaines enzymes retrouvées chez les plantes et les animaux (Kang et al. 2006).

Le nonylphénol est un métabolite issu de la dégradation du nonylphénol éthoxylate (NPE). Ce dernier fait partie des alkylphenols éthoxylates qui représentent la classe la plus utilisée de surfactants. Ce type de surfactants entre dans la composition de détergents domestiques, de pesticides et de produits industriels (Ying et al. 2002). Le nonylphénol rejeté dans l'environnement se retrouve sous forme d'un mélange complexe de plus de 100 isomères présentant différentes structures et positions de chaînes alkyles. Le nonylphénol substitué en position *para* soit le 4-NP constitue le principal isomère rejeté dans l'environnement. Le nonylphénol est constitué d'une partie lipophile et hydrophile. La section lipophile du composé est la plus importante et comprend le cycle benzène et la chaîne alkyle. La partie hydrophile constitue le groupement hydroxyle associé à la fonction phénol. Le nonylphénol a une faible solubilité (5.43 mg/L). Toutefois, dû à son groupement phénol, sa solubilité peut varier en fonction du pH. À pH

élevé, le groupement hydroxyle du composé se dissocie favorisant sa solubilité. Le NP possède également une valeur de coefficient de partition ($\text{Log } K_{ow}$: 4.48) élevée caractéristique de sa nature hydrophobe. Tout comme pour le BPA, le nonylphénol par son caractère hydrophobe a tendance à s'associer avec la matière organique présente dans les sédiments.

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des composés à l'étude.

Propriétés	Estrone (E1)	Estradiol (E2)	Estriol (E3)	17- α - éthynylestradiol (EE2)	Bisphénol A	4-n-nonylphénol (NP)
Structure moléculaire						
Poids moléculaire (g/mole)	270.4 ^a	272.2 ^a	288.4 ^a	296.2 ^a	228.29 ^b	220 ^c
Solubilité dans l'eau (mg/L)	12.42 ^d	12.96 ^d	13.25 ^d	4.83 ^d	120 ^d	5.43 ^d
LogK _{ow}	3.13 ^d	4.01 ^d	2.45 ^d	3.67 ^d	3.4 ^d	4.48 ^d
Pression de Vapeur (mm Hg)	2.3 x 10 ^{-10e}	2.3 x 10 ^{-10e}	6.7 x 10 ^{-15e}	4.5 x 10 ^{-11e}	4.5 x 10 ^{-8f}	8.175 x 10 ⁻⁴
Potentiel estrogénique	0.38 ^e	1 ^e	2.4 x 10 ^{-3e}	1.19 ^e	1.1 x 10 ^{-4e}	2.5 x 10 ^{-5e}

^a: (Westerhoff et al. 2005).^b: (Rahman et al. 2009) ^c: (Ying et al. 2002). ^d: (Lintelmann et al. 2003). ^e: (Rutishauser et al. 2004). ^f:

1.2 Mécanisme d'action des estrogènes et des modulateurs endocriniens

1.2.1 Les estrogènes et le rôle physiologique des récepteurs estrogéniques

Les estrogènes exercent leur action en interagissant avec les récepteurs estrogéniques (R.E.). Ces derniers sont retrouvés dans de nombreux tissus tels que le système nerveux central, le système cardiovasculaire, le système immunitaire, le tractus uro-génital, le tractus gastro-intestinal, les reins, les os, les glandes mammaires et l'utérus (Gustafsson 1999). Les récepteurs estrogéniques font partie de la super famille des récepteurs nucléaires et agissent comme facteurs de transcription inductibles par l'entremise d'un ligand. La figure 1 démontre schématiquement le mécanisme d'action des estrogènes et des récepteurs estrogéniques. Les estrogènes voyagent jusqu'à un tissu spécifique par l'intermédiaire du système sanguin où on les retrouve liés à une protéine de liaison. Suite à sa dissociation, les hormones diffusent à travers la membrane cellulaire et par la suite dans le noyau où se trouve le récepteur estrogénique. Ce dernier en absence d'hormones se retrouve séquestré dans un complexe multi-protéique. La liaison de l'hormone au récepteur induit certains changements de conformation entraînant sa dimérisation et sa liaison à un élément de réponse estrogénique (ERE) qui constitue une séquence d'ADN située dans la région régulatrice des gènes cibles (Hall et al. 2001). De concert avec la machinerie générale de la transcription qui comprend différents facteurs de transcription, l'ARN polymérase et d'autres protéines, les gènes ciblés par le récepteur estrogénique seront transcrits en ARNm qui sera par la suite traduit en protéine (Mueller 2004). L'expression des récepteurs estrogéniques peut également être stimulée par leurs propres ligands. Les protéines produites ainsi que les récepteurs estrogéniques assurent différents rôles et fonctions selon la nature du tissu où ils sont exprimés. Par exemple, l'activité des estrogènes et des récepteurs estrogéniques au niveau du système nerveux central engendre de nombreux effets tels que le contrôle de la reproduction et le comportement sexuel (Gustafsson 1999). Il semblerait également qu'au niveau des tissus vasculaires l'activation des récepteurs estrogéniques sous l'influence des estrogènes inhiberaient la prolifération des cellules du muscle lisse impliqué dans les lésions vasculaires (Gustafsson 1999).

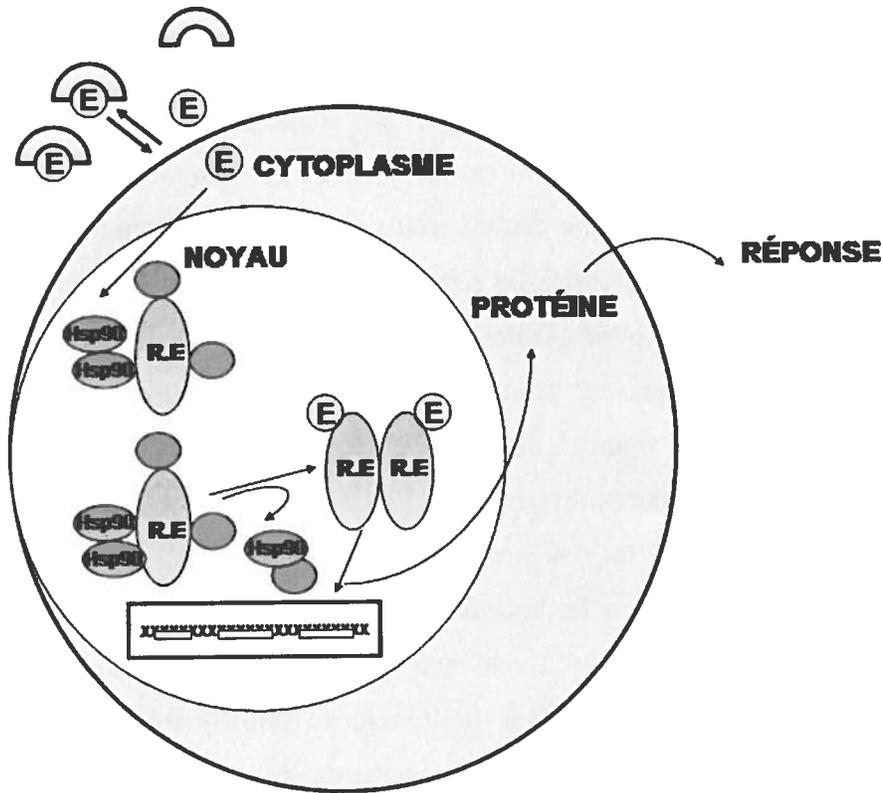


Figure 1. Mécanisme d'action des récepteurs estrogéniques à l'échelle moléculaire. Figure adaptée de (Mueller 2004).

1.2.2 Mécanismes d'action des modulateurs endocriniens

L'interférence exercée par une substance exogène sur le système hormonal est définie comme étant de la perturbation endocrinienne et la substance elle-même est reconnue comme étant un modulateur endocrinien (Swedenborg et al. 2009). La littérature fait également état du fait que ces xéno-hormones peuvent avoir un effet sur les protéines et les processus de transcriptions géniques contrôlés par les récepteurs modulant ainsi, l'expression des gènes et la réponse de certains tissus (Tyler et al. 1998). Il existe différents mécanismes connus par lesquels les modulateurs endocriniens sont capables d'interférer avec le fonctionnement normal du système endocrinien. Ces mécanismes comprennent entre autres l'inhibition de l'aromatase, l'interférence avec les récepteurs estrogéniques et le métabolisme des hormones naturelles. L'ensemble de ces processus de perturbation seront décrits au cours des sections suivantes.

1.2.2.1 Inhibition de l'aromatase

La dernière étape impliquée dans la biosynthèse des estrogènes correspond à la transformation en cycle aromatique du cycle A (figure 2). L'enzyme impliquée au cours de cette étape porte le nom d'aromatase. Certains pesticides tels que le DDT et du tributylétain sont reconnus comme étant capable d'inhiber l'activité de l'aromatase (Yang et al. 2006). Cette inhibition a pour effet d'interférer avec la stéroïdogénèse. À plus grande échelle, un tel phénomène peut engendrer la perturbation de nombreux processus hormono-régulés tels que la production et la maturation des spermatozoïdes, le développement de la puberté, l'inhibition ou la stimulation du développement et de la croissance de tumeurs au niveau du sein, des ovaires et de la prostate (Sanderson et al. 2003).

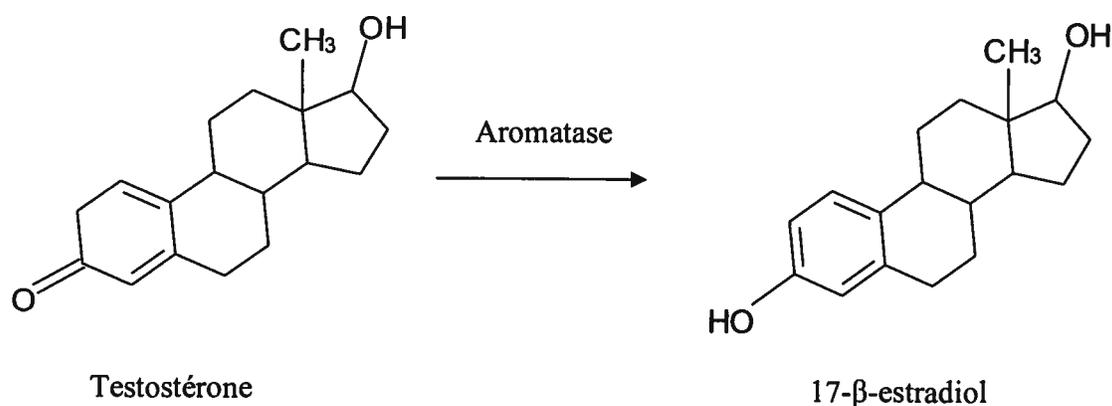


Figure 2 : Rôle de l'aromatase dans la biosynthèse du 17-β-estradiol. Image adaptée de (Yang et al. 2006).

1.2.2.2 Interférence des récepteurs estrogéniques

L'interférence des modulateurs endocriniens sur le fonctionnement normal des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs nucléaires correspond au mécanisme le plus décrit dans la littérature. Tel que cité précédemment, les récepteurs estrogéniques appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires. Ces derniers chez les mammifères sont impliqués dans la plupart des fonctions vitales telles que le développement fœtal, l'homéostasie, la reproduction, le métabolisme et la réponse à des substances xénobiotiques (Swedenborg et al. 2009). La perturbation du fonctionnement normal des

récepteurs estrogéniques par l'intermédiaire des modulateurs endocriniens peut s'effectuer soit par l'entremise d'une interaction directe (A) ou de façon indirecte (B) (figure 3). Un des principaux problèmes associés aux modulateurs endocriniens correspond à la promiscuité apparente des récepteurs estrogéniques c'est-à-dire, qu'ils possèdent une affinité pour un large spectre de composés (Witorsch 2000). Grâce à cette caractéristique, certains xénobiotiques peuvent se lier directement aux récepteurs et agir comme agonistes en stimulant la transcription des gènes cibles ou comme antagoniste en inhibant l'activité des récepteurs. Certains modulateurs endocriniens inhibent l'activité des récepteurs en induisant leur dégradation par l'intermédiaire de l'ubiquitination et du protéosome. Une diminution de la quantité de récepteurs estrogéniques risque de diminuer la réponse de l'organisme aux estrogènes naturels.

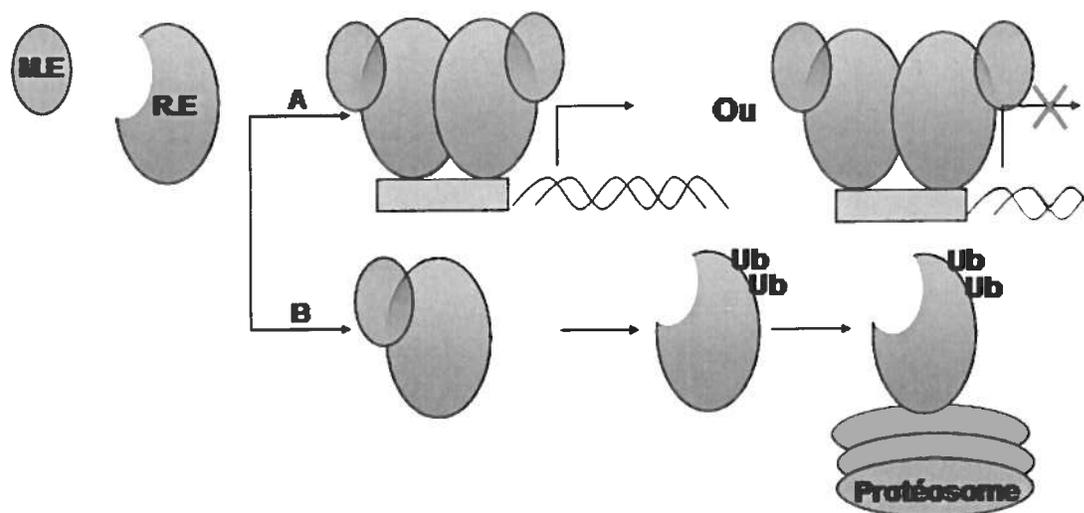


Figure 3. Interférence directe des récepteurs estrogéniques par l'intermédiaire des modulateurs endocriniens. Figure adaptée de (Swedenborg et al. 2009).

1.2.2.3 Perturbation du métabolisme des hormones

Certains modulateurs endocriniens tels que les composés appartenant à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont capables de stimuler l'activité des enzymes appartenant à la superfamille des CYP. Cette famille est constituée de mono-oxygénases responsables du métabolisme oxydatif de plusieurs médicaments, de

produits chimiques ainsi que des substances endogènes telles que les stéroïdes (Tsuchiya et al. 2005). L'activation de ce type d'enzymes suite à une exposition à certains modulateurs endocriniens peut mener à l'augmentation du catabolisme des hormones et par conséquent compromettre la voie de signalisation des hormones (Swedenborg et al. 2009)

1.3 Potentiel estrogénique

Le potentiel estrogénique d'un composé correspond à son activité estrogénique définie comme étant sa capacité à interagir avec les récepteurs estrogéniques d'un organisme et d'en perturber le fonctionnement normal par l'entremise des mécanismes décrits précédemment. Depuis la découverte des effets néfastes de certains composés chimiques sur la régulation et le fonctionnement normal du système endocrinien, de nombreuses méthodes ont été mises au point afin d'évaluer leur potentiel estrogénique. Les méthodes qui se sont avérées les plus efficaces sont basées sur des essais biologiques. Ces essais biologiques reposent sur de nombreux mécanismes tels que la prolifération cellulaire, la liaison au ligand, l'induction de la luciférase, l'induction de la vitellogénine ou l'interaction antigène-anticorps (Chang et al. 2009). Ces approches expérimentales sous forme d'essais biologiques peuvent être divisées en deux grandes classes soit *in vivo* et *in vitro*.

1.3.1 Évaluation du potentiel estrogénique de manière *in vivo*

Ce type d'essais biologiques évalue l'effet d'un présumé modulateur endocrinien ou d'un mélange de ceux-ci sur des organismes entiers tels que les amphibiens, les poissons, les oiseaux et les insectes. Les réponses reconnues comme étant positives sont entre autres la présence apparente de malformations, de troubles de la reproduction, de perturbations du développement normal des œufs et de la progéniture ainsi qu'un déséquilibre de la production des protéines du sérum telle que la vitellogénine (Chang et al. 2009). L'évaluation de la concentration de vitellogénine plasmatique chez certains poissons, suivant leur exposition à des échantillons environnementaux est perçue dans la littérature comme une bonne méthode de criblage permettant la détection de la présence de composés estrogéniques dans différents habitats aquatiques (Jiménez 1997). En

particulier, la production de vitellogénine chez les poissons mâles peut être interprétée comme un signe de perturbation endocrinienne (Tilton et al. 2002). La vitellogénine est une protéine de l'œuf produite par le foie des poissons femelles et induite en réponse à l'estradiol. Une exposition aux estrogènes stimule les gènes impliqués dans la synthèse de cette protéine menant à la production de vitellogénine plasmatique chez le poisson mâle.

Les tests *in vivo* comme la plupart des essais biologiques présentent à la fois des avantages et des inconvénients. Il est entre autres reconnu que les tests *in vivo* sont essentiels puisqu'ils fournissent des informations importantes sur les réponses que peuvent générer chez un organisme une exposition à des xéno-hormones (Shappell et al. 2007). Toutefois, ce type d'essai ne convient pas à un criblage à grande échelle et son utilité se trouve limitée par les coûts engendrés, la faible sensibilité et le besoin d'une main-d'œuvre importante (Jiménez 1997). Pour remédier à de tels inconvénients certains chercheurs font plutôt appel aux essais *in vitro*.

1.3.2 Évaluation du potentiel estrogénique de manière *in vitro*

Ce type d'essai biologique fait appel à l'usage de cellules eucaryotes afin d'évaluer le potentiel estrogénique de certains composés et présente comme avantage d'être plus rapide et moins laborieux que les essais *in vivo*. Le "Yeast Estrogen Screen test" est l'un des tests *in vitro* les plus documentés dans la littérature. Ce test utilise des cellules de levures transfectées avec le gène codant pour le récepteur estrogénique humain (human estrogen receptor hER). Cette séquence génique fut introduite de façon stable à l'intérieur du chromosome principale de la levure. Un plasmide d'expression portant le gène rapporteur *lacZ* codant pour l'enzyme β -galactosidase fut également transfecté à l'intérieur de ce système de levure afin de mesurer l'activité du récepteur. Dans ce système, le récepteur hER est exprimé sous une forme capable de se lier à une séquence dite réceptive aux estrogènes. Cette dernière se situe dans la région promotrice du plasmide d'expression. Suite à sa liaison avec un ligand actif tel qu'un modulateur endocrinien ou un métabolite présentant un potentiel estrogénique, le complexe ligand-récepteur va interagir avec certains facteurs de transcription générant l'expression du gène *lacZ* et par le fait même la production de β -galactosidase. Cette dernière se retrouve

sécrétée dans le milieu extracellulaire où elle va métaboliser un substrat chromogénique le CPRG (chlorophenol red- β -D-galactopyranoside) normalement jaune en un produit rouge qui peut être quantifié à 540 nm.

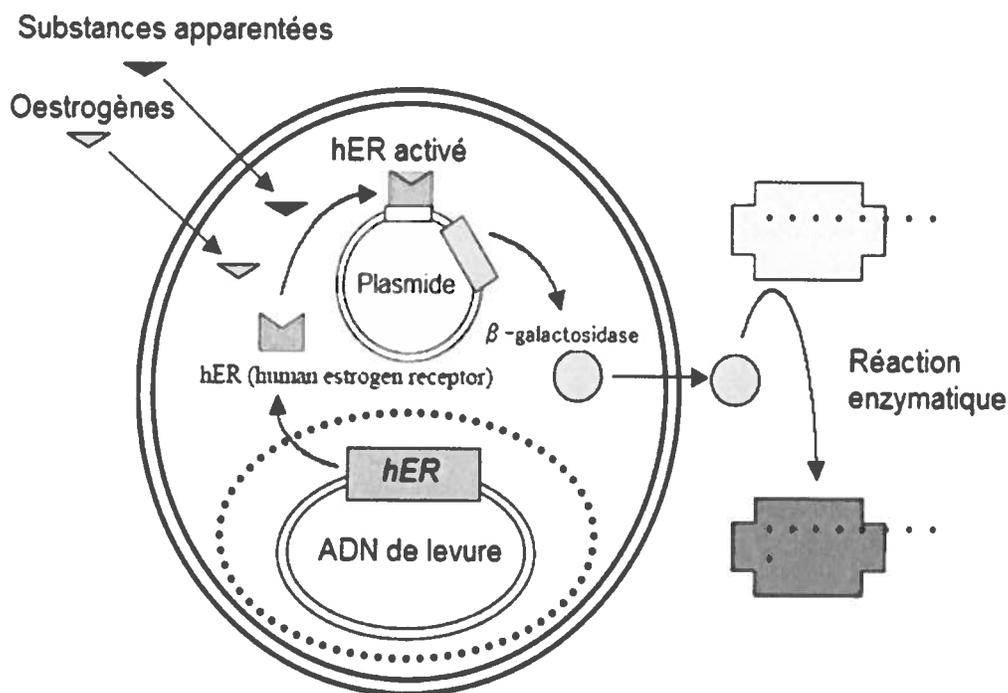


Figure 4 : Représentation schématique du système d'expression inducible par les œstrogènes chez la levure (YES).

1.3.3 Potentiel œstrogénique des modulateurs endocriniens à l'étude

D'après les valeurs de potentiel œstrogénique présentées dans le tableau 1 et obtenues par l'intermédiaire du bioessai YES (Rutishauser et al. 2004), les composés appartenant à la famille des hormones naturelles et synthétiques présentent des valeurs de potentiel œstrogénique largement supérieures aux composés d'origine industrielle. Parmi les hormones naturelles, le 17- β -œstradiol démontre la plus importante activité œstrogénique des trois composés associés à cette classe. L'œstrone présente un potentiel œstrogénique de 2.6 fois inférieur à l'E2 et de 158 fois supérieur à l'œstriol qui constitue l'œstrogène le moins actif des quatre œstrogènes à l'étude. Le 17- α -éthynylestradiol constitue le composé le plus œstrogénique des six modulateurs à l'étude avec une valeur

de potentiel estrogénique de 1.19. Le bisphénol A avec une valeur de 1.1×10^{-4} est le composé d'origine industrielle le plus estrogénique à l'étude suivi du NP.

1.4 Présence des modulateurs endocriniens dans l'environnement

La présence de modulateurs endocriniens dans l'environnement, en particulier en milieu aquatique est un phénomène observé depuis des décennies. Ce type de composés se retrouve dans les cours d'eaux par l'intermédiaire de différentes voies. La contamination en estrogènes naturels et synthétiques origine entre autres : des industries pharmaceutiques, des excréments de médicaments et d'autres métabolites par les humains et les animaux, des eaux traitées ainsi que d'une mauvaise gestion des déchets médicamenteux par les individus et les hôpitaux (Kozłowska-Tylingo et al. 2010). Le bisphénol A et le nonylphénol en tant que produits d'origine industrielle entrant dans la composition de nombreux produits à usage domestique présentent deux principales sources de contaminations aquatiques soit : les effluents d'origine industriels et municipaux. La présence des composés à l'étude fut répertoriée dans de nombreux pays industrialisés tels que : le Royaume-Uni, les États-Unis, l'Italie, l'Allemagne, le Canada, la Suède, le Japon, l'Espagne et les Pays-Bas (Desbrow et al. 1998; Belfroid et al. 1999; Ternes et al. 1999; Kuch et al. 2000). Le tableau 2 résume les concentrations des différents composés à l'étude ayant été répertoriées dans les effluents des usines de traitements des eaux de différents pays.

Tableau 2 : Concentrations des modulateurs endocriniens dans l'environnement.

Composés	Concentrations observées
17- β -estradiol	1-50 ng/L ^(a) jusqu'à 64 ng/L ^(b)
17- α -éthynylestradiol	0.2-7 ng/L ^(a) jusqu'à 42 ng/L ^(b)
Estrone	< 0.1 – 48 ng/L ^(b,c) jusqu'à 76 ng/L ^(d)
Estriol	1-9 ng/L ^(e)
Nonylphénol	< 0.2-5.4 μ g/L ^(f) jusqu'à 3 μ g/L ^(g)
Bisphénol A	0.018-0.702 μ g/L ^(h) jusqu'à 0.98 μ g/L ⁽ⁱ⁾

Références : ^a (Routledge et al. 1998); ^b (Ternes et al. 1999); ^c (Belfroid et al. 1999); ^d (Desbrow et al. 1998); ^e (Kuch et al. 2000); ^f (Blackburn et al. 1995); ^g (Lye et al. 1999); ^h (Fromme et al. 2002); ⁱ (Gómez et al. 2007).

En observant les valeurs dans ce tableau, on constate que les composés appartenant à la famille des estrogènes naturels et synthétiques sont tous présents à des concentrations de l'ordre du ng/L, contrairement aux composés d'origine industrielle qui sont présent à des concentrations de μ g/L. Cette échelle de concentrations peut sembler faible, cependant elle est assez importante pour générer des effets sur la faune aquatique. Les concentrations effectrices pour le 17- β -estradiol et le 17- α -éthynylestradiol chez les espèces les plus sensibles à ce type de composés sont rapportées comme étant de 0.1 à 10 ng/L (Langston et al. 2005). Les valeurs observées sont donc de 6.4 à 10 fois supérieures aux concentrations effectrices. Ces composés sont reconnus comme étant responsables des effets estrogéniques observés chez des espèces retrouvées en aval de certaines usines de traitements des eaux (Desbrow et al. 1998). Même si les estrogènes se retrouvent à des concentrations de l'ordre de 1000 fois inférieures au nonylphénol et au bisphénol A, leur rôle de principaux acteurs dans la perturbation endocrinienne de la faune aquatique est dû à l'importance de leur potentiel estrogénique (tableau 1). Toutefois, on ne doit pas sous-estimer l'action de certains composés d'origine industrielle et leurs effets sur l'environnement. Le nonylphénol en particulier est reconnu comme un composé capable de s'accumuler chez certains organismes aquatiques et même certaines algues. De ce fait, bien que le nonylphénol présente un potentiel estrogénique largement inférieur au E2, la bioconcentration de ce dernier couplé avec son abondance relative dans l'environnement

(concentrations de $\mu\text{g/L}$) pourrait très bien mener à un niveau d'estrogénicité chez certains organismes équivalent à l'estradiol (Langston et al. 2005).

1.5 Impact des modulateurs endocriniens à l'étude

Les effets générés par la présence de modulateurs endocriniens dans l'environnement s'étend sur un large spectre d'organismes tels que les mollusques, les poissons, les reptiles, les oiseaux et les mammifères (Tyler et al. 1998). Chez les poissons, de nombreuses études ont démontrées qu'une exposition à certains xeno-estrogènes en particulier le 17- β -estradiol ainsi que le 17- α -éthynylestradiol induit la production de vitellogénine chez les mâles, interfère avec la production des œufs, perturbe le ratio mâle-femelle et diminue la population issue de la progéniture (Patyna et al. 1999; Brown et al. 2005). Le nonylphénol a entre autres été reconnu comme étant capable de perturber le système endocrinien de certains crustacés. Les effets répertoriés chez ce genre d'organismes sont entre autres l'induction d'anomalies du développement et d'une croissance lente de la progéniture (LeBlanc et al. 2000). La présence de modulateurs endocriniens dans l'environnement n'affecte pas seulement le système endocrinien. Ces derniers ont également été reconnus comme étant capables d'altérer le système immunitaire. Le bisphénol A fait parti de ce genre de modulateurs immunodépresseurs. Ce composé est capable de causer la déplétion généralisée du tissu lymphoïde chez le lynx ainsi que la perturbation des voies de signalisation des cellules immunitaires de certains mollusques (Peña et al. 2006; Canesi et al. 2008). Les modulateurs endocriniens n'affectent pas seulement les organismes situés au bas de la chaîne alimentaire. Ces derniers sont également capables d'induire certains effets chez l'humain. L'hypothèse a été émise que ce genre de composés pourraient être responsables de la diminution de la qualité du sperme et de la perturbation du ratio des sexes au Canada et au États-Unis (Allan et al. 1997; Mackenzie et al. 2005).

1.6 Traitements des eaux usées

Tel que cité précédemment, l'inefficacité des traitements des eaux conventionnels correspond à une des principales sources de contamination de l'environnement. L'élimination ou la dégradation des modulateurs endocriniens dépend de nombreux

facteurs tels que le type de traitement utilisés et les propriétés chimiques intrinsèques des contaminants (poids moléculaire, hydrophobicité, contenu en carbone aromatique et la composition des groupements fonctionnels) (Rahman et al. 2009). Les traitements conventionnels des eaux sont constitués généralement de trois étapes c'est-à-dire : le traitement préliminaire, la sédimentation et le traitement secondaire. Ces étapes ne contribuent pas toutes avec la même importance à l'élimination des modulateurs endocriniens. Depuis la découverte de l'inefficacité actuelle des traitements des eaux à l'élimination des modulateurs endocriniens, des méthodes physiques ainsi que chimiques ont été mises au point et évaluées comme traitements tertiaires. Un survol de l'ensemble du processus du traitement des eaux sera donc abordé au cours de cette section.

1.6.1 Traitement préliminaire et sédimentation

Le traitement préliminaire tel que le nom l'indique constitue la première étape du traitement des eaux au cours de laquelle, on fait appel à des écrans afin d'éliminer les matières solides et denses. La sédimentation permet d'éliminer les particules solides en suspension en leur permettant de se déposer au fond de grands réservoirs suite à une période de sédimentation de quelques heures. Ces deux étapes contribuent pour très peu ou pas à l'élimination des composés estrogéniques (Ternes et al. 1999; Koh et al. 2008).

1.6.2 Traitements secondaires

Les traitements secondaires utilisent les microorganismes afin de transformer ou de dégrader les contaminants organiques. La nature des microorganismes capables de dégrader les modulateurs endocriniens seront abordés au cours de la prochaine section. Les traitements secondaires les plus connus sont : les filtres biologiques et les boues activées. Essentiellement, ces deux procédés convertissent rapidement les composés organiques présents en milieu aqueux en biomasse qui se trouve par la suite séparée de la phase aqueuse par sédimentation (Johnson et al. 2001). De nombreuses études démontrent que le traitement par boues activées présente une meilleure élimination des composés estrogéniques que les filtres biologiques (Svenson et al. 2003; Servos et al. 2005). Svenson et coll (2003) rapporte même que ce dernier est capable d'éliminer à 81 % l'estrogénicité de l'affluent contrairement à 28 % pour les filtres biologiques. Les boues

activées semblent efficacement éliminer les estrogènes naturels et synthétiques des eaux usées. Toutefois, ces composés ne sont pas tous éliminés avec la même efficacité par ce type de traitement secondaire. Baronti et coll (2000) suite à l'étude de six différentes usines de traitements des eaux appuient cet énoncé en présentant des moyennes d'élimination respectives pour l'estrone, l'estradiol, l'estriol et le 17- α -éthynylestradiol de 61 %, 86 %, 95 % et 85 %. L'élimination des estrogènes par l'intermédiaire de boues activées est très bien documentée dans la littérature. Toutefois, l'importance du rôle joué par ce type de processus dans l'élimination du nonylphénol et du bisphénol A est moins étudié. Des études à l'échelle de laboratoire semblent indiquer que le traitement par boues activées élimine tout aussi efficacement ces deux composés d'origine industrielle que les composés estrogéniques avec des rendements d'élimination supérieurs à 90 % (Stasinakis et al. 2010). La biodégradation est le principal facteur impliqué dans l'élimination des modulateurs par boues activées. L'adsorption des composés les plus lipophiles et hydrophobes à la biomasse est également un phénomène observé et considéré comme contribuant faiblement à la bioremédiation des xénobiotiques. Puisque ce type de traitement fait appel à des microorganismes, de nombreux facteurs peuvent influencer l'efficacité du processus de biodégradation tels que : le temps de séjour des matières solides (*solids retention time (SRT)*), le temps de séjour des matières solubles (*hydraulic retention time (HRT)*) et la température. Le SRT correspond à la moyenne du temps que les solides provenant de la boue activée passe à l'intérieur du bioréacteur. Cette valeur est généralement exprimée en jours. Plusieurs recherches ont démontré qu'une augmentation du SRT améliore l'élimination des modulateurs endocriniens (Holbrook et al. 2002; Andersen et al. 2003). Ceci peut être attribué à la croissance lente des microorganismes capable de dégrader ce genre de composés. Le HRT se définit comme étant la moyenne de temps que les composés solubles demeurent à l'intérieur du bioréacteur. Généralement, la plupart des systèmes de boues activées en Europe utilisent des HRT de 4 à 14 heures (Johnson et al. 2001). Tout comme pour le SRT, l'augmentation de ce paramètre corrèle avec une augmentation de l'efficacité du système. Ce dernier énoncé peut s'expliquer par le fait que l'augmentation de la période d'exposition de ce genre de composé aux microorganismes contenus dans la biomasse, permet une biodégradation plus complète et par le fait une diminution plus importante du potentiel estrogénique de l'effluent. La

variation de température généralement occasionnée par le changement de saisons est également un facteur influençant l'efficacité des traitements secondaires. Une baisse de température occasionne un ralentissement du métabolisme basal des microorganismes ce qui génère par le fait même une diminution du rendement de biodégradation des modulateurs.

1.6.3 Traitements tertiaires

Suite à la lecture de la précédente section, il est facile de constater l'importance que jouent les traitements secondaires dans l'élimination des modulateurs endocriniens des eaux usées. Toutefois, ces derniers ne sont pas efficaces à 100 %, générant ainsi des effluents post-traitements possédant toujours un potentiel estrogénique. Afin de contrer ce problème, différents traitements tertiaires ont été étudiés à l'échelle de laboratoire en vue d'une future application au niveau industriel. Ces techniques incluent entre autres : l'absorption par charbon activé, l'ozonation et l'irradiation aux ultraviolets.

L'élimination des modulateurs endocriniens par l'intermédiaire de charbon activé est un des traitements tertiaires les plus documentés jusqu'à présent. Au cours des dernières années plusieurs chercheurs ont démontré la forte capacité du charbon activé à éliminer un large éventail de modulateurs endocriniens (Nakanishi et al. 2002; Choi et al. 2005; Fukuhara et al. 2006). Par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes, le charbon activé élimine efficacement les composés organiques non-polaires plus particulièrement ceux présentant un coefficient de partition octanol-eau ($\text{Log } K_{ow}$) supérieur à 2 (Snyder et al. 2003). Snyder et coll (2003) ont même démontré que le charbon activé sous forme granulaire et en poudre (5mg/L) est capable d'éliminer plus de 90 % des estrogènes (pour des concentrations initiales de 100-200 ng/L). Toutefois, la capacité d'absorption du charbon activé se trouve largement limitée lorsqu'il est exposé à une eau contenant des composés organiques, des surfactants et des acides humiques. Ce dernier énoncé peut s'avérer problématique puisque ces composés font partie de la composition courante des effluents issus des traitements secondaires des eaux usées.

L'ozonation est également une autre méthode étudiée générant des résultats prometteurs pour le traitement des modulateurs endocriniens. Ce processus mène à la

transformation des hormones stéroïdiennes par l'intermédiaire de deux oxydants soit : l'ozone et les radicaux hydroxyles (Huber et al. 2003). L'ozone moléculaire (O_3) réagit avec les groupements amines, phénols et les composés aliphatiques munis de double liaison menant par le fait même à la dégradation des micropolluants possédants ces groupements fonctionnels. Une étude a démontrée que l'ozonation permet d'enlever plus de 95 % des composés estrogéniques contenus dans les eaux usées (estrone, estradiol, estriol et éthinylestradiol) à des concentrations initiales variant entre 347 et 361 ng/L avec l'application de 1.25 mg/L d'ozone et ce pour un temps de réaction aussi faible que deux minutes (Snyder et al. 2006). L'ozonation est souvent couplée à l'irradiation aux ultraviolets dans le but d'éliminer plus efficacement les composés récalcitrants. Cette combinaison de deux procédés porte le nom de procédé d'oxydation avancée et peut contenir une combinaison de différentes méthodes physiques et chimiques telles que : l'UV/ O_3 , l'UV/ H_2O_2 .

Le rayonnement aux ultraviolets est une méthode largement utilisée pour désinfecter les eaux usées. Cette méthode fut également reconnue comme étant capable de générer la photo-dégradation d'hormones stéroïdiennes (estradiol et éthinylestradiol) (Mazellier et al. 2008). Cette photolyse est associée au fait que de nombreux modulateurs endocriniens et produits pharmaceutiques possèdent des chromophores capables d'absorber les rayons UV. Toutefois, les doses d'UV typiquement requises pour la désinfection sont largement inférieures à celles requises pour traiter les micropolluants (Snyder et al. 2003). Les coûts engendrés par les doses requises pour la dégradation des modulateurs endocriniens font de l'irradiation aux ultraviolets une option trop coûteuse pour être envisageable. Cependant, les procédés d'oxydation avancée, dont cette méthode fait partie, est une approche qui a également fait état de nombreuses recherches. Feng et coll (2005) ont démontré l'efficacité de cette technique lorsque combinée avec du peroxyde d'hydrogène comme oxydant. Ce procédé d'oxydation avancée est capable d'éliminer plus de 98 % de l'estrone, de l'estradiol et du 17 - α - éthinylestradiol contenus dans l'eau (Feng et al. 2005).

Même si ces traitements tertiaires éliminent efficacement les xénobiotiques, les coûts actuels générés par l'utilisation de telles méthodes à grande échelle les rendent non viable économiquement.

1.7 Microorganismes responsables de la biodégradation des modulateurs endocriniens

1.7.1 Biodégradation des estrogènes

La biodégradation est le principal mode d'élimination des estrogènes dans les eaux usées. Ce type de dégradation s'effectue par l'entremise de différents mécanismes tels que : la dégradation comme source de carbone par des bactéries hétérotrophes et le cométabolisme par l'intermédiaire d'une biomasse nitrifiante. Une quantité importante des microorganismes reconnus comme étant capable de biodégrader les estrogènes sont regroupés au sein du tableau 3. Un grand nombre de ceux-ci ont été isolés à partir de boue activée provenant des usines de traitements des eaux municipales.

1.7.1.1 Bactéries hétérotrophes

Une quantité importante de microorganismes hétérotrophes sont capables de métaboliser les estrogènes. La littérature fait entre autres état des espèces *Achromobacter xylosoxidans* et *Ralstonia* sp. isolées de boues activées et capables d'utiliser directement l'estradiol comme substrat (Weber et al. 2005). En plus d'être reconnues comme étant aptes à utiliser l'estradiol comme source de carbone, certaines espèces telles que *Sphingomonas* sont capables de dégrader l'estradiol en métabolites non-estrogéniques (Yu et al. 2007). Les métabolites issus de la biodégradation de l'estradiol ainsi que les voies métaboliques employées par certaines bactéries pour dégrader ce produit demeurent jusqu'à ce jour un important sujet de recherche. De nombreuses recherches démontrent que l'estradiol compte un principal métabolite soit l'estrone ainsi qu'une série de métabolites secondaires parmi lesquels ont été identifiés jusqu'à présent : l'estriol, le 16 α -hydroxyestrone, le 2-méthoxyestradiol et 2-méthoxyestrone (Lee et al. 2002).

Le 17- α -éthynylestradiol est reconnu comme étant un composé résistant à la biodégradation dû à l'encombrement stérique engendré par la présence d'un groupement éthynyle situé sur le 17^e carbone de la molécule (Bolt 1979). De ce fait, les bactéries

hétérotrophes citées précédemment comme étant aptes à dégrader les estrogènes naturels à l'étude sont incapables de dégrader ce composé synthétique. Toutefois, les espèces *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus zopfii* et *Sphingobacterium* sp. JCR5, toutes trois isolées à partir de boues activées, sont capables de dégrader cette hormone synthétique (Yoshimoto et al. 2004; Yu et al. 2007).

La biodégradation du 17- α -éthynylestradiol par l'intermédiaire des bactéries hétérotrophes débute de la même manière que celle de l'estradiol soit par l'oxydation de l'alcool secondaire situé sur le 17^e carbone en groupement cétone et menant par le fait même à la formation de l'estrone (Haiyan et al. 2007; Yu et al. 2007). Toutefois, l'estrone issu de la dégradation du 17- α -éthynylestradiol est dégradé via une voie métabolique différente de celle proposée par Lee et coll (2002) (Combalbert et al. 2010). Cette dernière mène à la dégradation de l'estrone en acide 2-hydroxy-2,4-diène-1,6-dioïque et en acide 2-hydroxy-2,4-diènevalérique (Haiyan et al. 2007). Ces métabolites secondaires se trouvent par la suite complètement dégradés en dioxyde de carbone et en eau.

1.7.1.2 Biomasse nitrifiante

Les usines de traitements de eaux sont souvent appelées à éliminer l'ammonium (NH_4^+) des eaux usées par l'intermédiaire d'un traitement biologique. Ce polluant toxique pour la faune aquatique est généralement éliminé par l'intermédiaire d'un processus de nitrification qui comprend une biomasse du même nom c'est-à-dire : une biomasse nitrifiante. Ce processus s'effectue en deux étapes et par le fait même avec l'aide de deux types de bactéries soit : les bactéries ammonium-oxydantes qui convertissent l'ammonium en nitrite (NO_2^-) et les bactéries nitrite-oxydantes qui transforment le nitrite en nitrate (NO_3^-). Les bactéries de type ammonium-oxydantes en particulier *Nitrosomonas europaea* produisent une enzyme ; l'ammonium mono-oxygénase qui non seulement catalyse l'oxydation de l'ammonium mais qui cométabolise une variété de composés organiques parmi lesquels on peut compter les estrogènes (Vader et al. 2000). L'utilité de l'ammonium mono-oxygénase dans la biodégradation des estrogènes est grandement reconnue pour le 17- α -éthynylestradiol, le composé estrogénique le plus récalcitrant. Certaines recherches indiquent même que le 17 - α - éthynylestradiol est

dégradé avec succès en présence de biomasse nitrifiante, ce qui n'est pas le cas lorsque ce composé se trouve en présence de bactéries hétérotrophes seulement (De Gusseme et al. 2009). L'ammonium mono-oxygénase et par le fait même *Nitrosomonas europaea* semble également responsable de la première étape de la dégradation des estrogènes naturels générant ainsi des intermédiaires qui à leur tour servent de substrat pour les microorganismes hétérotrophes (Xiao et al. 2001; Shi et al. 2004; De Gusseme et al. 2009).

1.7.2 Biodégradation des composés industriels

1.7.2.1 Biodégradation du nonylphénol

La majorité du nonylphénol relâché dans l'environnement se retrouve sous la forme d'un complexe mélange technique constitué de plus de 100 isomères et dont le principal s'avère être le 4-nonylphénol (4-NP). Le 4-n-nonylphénol, c'est-à-dire le composé sélectionné au cours de cette étude, constitue un des isomères de 4-nonylphénol retrouvés en abondance dans la nature. La littérature fait état d'un certain nombre de bactéries appartenant au groupe des *Sphingomonas* capable de croître avec comme seule source de carbone et d'énergie le mélange technique de nonylphénol (Tanghe et al. 1999; Fujii et al. 2001; Gabriel et al. 2005b). L'étude et l'identification des métabolites générés par la biodégradation du nonylphénol sont difficiles à cause de la présence des différents isomères (Tanghe, et al. 1999). Chaque isomère peut générer une série de métabolites à lui seul, ce qui rend le travail fastidieux. Néanmoins, Gabriel et coll (2005) ont établi que les trois souches appartenant au groupe *Sphingomonas* (tableau 3) et reconnues comme étant capables de métaboliser le 4-nonylphénol, métabolisent ce dernier en suivant un modèle particulier. Ces dernières relâchent dans le milieu de culture la chaîne latérale nonyl du substrat sous forme d'alcool composé de neuf carbones (Gabriel et al. 2005a). Ce groupement alcool ne semble pas être métabolisé d'avantage par les souches bactériennes. Il s'agit plutôt de la portion aromatique du 4-nonylphénol qui se retrouve complètement minéralisée et qui sert par le fait même de source de carbone.

1.7.2.2 Biodégradation du bisphénol A

Tel que cité précédemment, le bisphénol A est un composé qui entre dans la composition de nombreux type de plastiques et de résines époxy. Sa facilité à se déloger de la matière première pour se retrouver dans l'environnement rend ce composé problématique. Comme pour le nonylphénol, la littérature fait état d'un certain nombre de bactéries appartenant au groupe *Sphingomonas* capable de dégrader le bisphénol A (voir tableau 3). La capacité des Sphingomonades de dégrader de nombreux xénobiotiques repose sur le fait qu'elles sont largement distribuées dans la nature et qu'elles sont reconnues pour posséder des capacités de dégradation extraordinaire envers les composés chimiques récalcitrants. Même si les Sphingomonades semblent jouer un rôle important dans la biodégradation du bisphénol A, c'est grâce à certaines études sur la souche MV1, un bacille gram-négatif poussant en condition aérobie que les voies métaboliques du bisphénol A furent élucidées (Lobos et al. 1992; Spivack et al. 1994). Lobos et coll (1992) ainsi que Spivack et coll (1994) démontrèrent que la souche MV1 métabolise le bisphénol A par l'intermédiaire d'une voie majoritaire et d'une voie minoritaire. Le bisphénol A est dégradé à 85% (voie majoritaire) en 4-hydroxy-acétophénone et en 4-hydroxybenzoïque pour par la suite être minéralisé complètement en dioxyde de carbone (CO₂) (Pauwels et al. 2008).

Tableau 3. Microorganismes dégradant les modulateurs endocriniens

Microorganismes	Classification	Composés dégradés	Origine	Références
<i>Sphingomonas</i> SPP 16SRD6	α -Proteobactéries Sphingomonadales	E1-E2	Sable de l'aquifère	(Ke et al. 2007)
<i>Novosphinobium</i> <i>tardaogens</i>	α -Proteobactéries Sphingomonadales	E1, E2, E3	Boues activées	(Fujii et al. 2002)
<i>Sphingomonas</i> sp.	α -Proteobactéries Sphingomonadales	E1-E2	Boues activées	(Yu et al. 2007)
<i>Aminobacter</i> sp. C4	α -Proteobactéries Rhizobiales	E1-E2	Boues activées	(Yu et al. 2007)
<i>Aminobacter</i> <i>aminovorans</i>	α -Proteobactéries Rhizobiales	E1-E2	Boues activées	(Yu et al. 2007)
<i>Phyllobacterium</i> <i>myrsinacearum</i>	α -Proteobactéries Rhizobiales	E1, E2, E3, EE2	Non-identifiée	(Pauwels et al. 2008)
<i>Brevundimonas</i> <i>diminuta</i> NK2	α -Proteobactéries Caulobactérales	E2	Culture mixte de boue activée et d'isolat	(Muller et al. 2010)
<i>Alcaligenes faecalis</i> SP03	β -Proteobactéries Burkholdérales	E2	Culture mixte de boues activée	(Muller et al. 2010)
<i>Pusillomonas</i> sp.	β -Proteobactéries Burkholdérales	E2	Culture mixte de boues activée	(Muller et al. 2010)
<i>Achromobacter</i> <i>xyloxidans</i>	β -Proteobactéries Burkholdérales	E1-E2-E3	Culture mixte de boues activée	(Weber et al. 2005)
<i>Ralstonia picketti</i>	β -Proteobactéries Burkholdérales	E1-E2	Culture mixte de boues activée	(Weber et al. 2005)
<i>Ralstonia picketti</i>	β -Proteobactéries Burkholdérales	E1-E2, E3, EE2	Composte	(Pauwels et al. 2008)
<i>Denitrobacter</i> sp.	β -Proteobactéries Denitrobacter	EE2	Culture mixte de boues activée	(Muller et al. 2010)
<i>Denitratisona</i> <i>oestradiolicum</i>	β -Proteobactéries Rhodocyclales	E2	Boues activées	(Fahrback et al. 2006)

Tableau 3 (suite). Microorganismes dégradant les modulateurs endocriniens

Microorganismes	Classification	Composés dégradés	Origine	Références
<i>Steroidobacter denitrificans</i>	γ -Proteobactéries Xanthomonadales	E2	Digesteur	(Fahrbach et al. 2008)
<i>Acenitobacter</i> sp.	γ -Proteobactéries Pseudomonadales	E2	Sable de l'aquifère	(Ke et al. 2007)
<i>Acenitobacter</i> sp.	γ -Proteobactéries Pseudomonadales	E1, E2, E3, EE2	Composte	(Pauwels et al. 2008)
<i>Escherichia coli</i>	γ -Proteobactéries Enterobacterales	E2	Boues activées	(Yu et al. 2007)
<i>Pseudomonas</i> sp.	γ -Proteobactéries Pseudomonadales	E1, E2, E3, EE2	Boues activées	(Pauwels et al. 2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ -Proteobactéries Pseudomonadales	E2	Boues activées	(Zeng et al. 2009)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ -Proteobactéries Pseudomonadales	E1, E2, E3, EE2	Composte	(Pauwels et al. 2008)
<i>Shewanella baltica</i> (putative)	γ -Proteobactéries Alteromonadales	E1, E2, E3, EE2	Digesteur anaérobie	(Ivanov et al. 2010)
<i>Agromyces auranticus</i>	Actinobactérie	E2-E3	Sable de l'aquifère	(Ke et al. 2007)
<i>Rhodococcus zopfii</i>	Actinobactérie	E1, E2, E3, EE2	Boues activées	(Yoshimoto et al. 2004)
<i>Rhodococcus equi</i>	Actinobactérie	E1, E2, E3, EE2	Boues activées	(Yoshimoto et al. 2004)
<i>Rhodococcus ruber</i> M2	Actinobactérie	E2	Boues activées	(Yu et al. 2007)
<i>Microbacterium testaceum</i>	Actinobactérie	E2	Boues activées	(Yu et al. 2007)
<i>Nocardioides simplex</i>	Actinobactérie	E2	Boues activées	(Yu et al. 2007)

Tableau 3 (suite). Microorganismes dégradant les modulateurs endocriniens

Microorganismes	Classification	Composés dégradés	Origine	Références
<i>Sphingobacterium</i> sp. JCR5	Bactériidies	E1, E2, E3, EE2, MeEE2	Boues activées	(Haiyan et al. 2007)
<i>Flavobacterium</i> sp.	Bactériidies	E2	Boues activées	(Yu et al. 2007)
<i>Bacillus subtilis</i>	firmicutes	E1, E2	Boues activées	(Jiang et al. 2010)
<i>Fusarium proliferatum</i>	Fungi Ascomycota	EE2	lisier	(Shi et al. 2002)
<i>Chorella vulgaris</i>	Viridiplantae Chlorophyta	E2	Eau douce	(Lai et al. 2002)
<i>Sphingomonas xenophaga bayram</i>	α -Proteobactéries Sphingomonadales	NP	Boues activées	(Gabriel et al. 2005a)
<i>Sphingomonas cloacae</i> sp. nov.	α -Proteobactéries Sphingomonadales	NP	Boues activées	(Fujii et al. 2001)
<i>Sphingomonas</i> sp. TTNP3	α -Proteobactéries Sphingomonadales	NP	Boues activées	(Tanghe et al. 1999)
Bactérie gram-négative non-identifiée - MV1	Non-classée	BPA	Sédiment	(Zhang et al. 2007)
<i>Achromobacter xyloxidans</i> B-16	β -Proteobactéries Burkholdérales	BPA	Composte	(Spivack et al. 1994) (Zhang et al. 2007)

1.8 Systèmes biphasiques

Les systèmes biphasiques ont été développés au début des années quatre-vingt dans l'industrie de la fermentation afin de permettre une augmentation du taux d'oxygène dissout présent en milieu de culture et également, afin de permettre un meilleur rendement de production de certains composés inhibiteurs tels que l'éthanol et l'acide citrique (Malinowski 2001). Au cours des années quatre-vingt-dix, les chercheurs ont commencé à exploiter les bénéfices des systèmes biphasiques pour permettre la biodégradation de certains xénobiotiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Kohler et al. 1994), le phénol (Collins et al. 1997) et le pentachlorophénol (Munro et al. 1997). L'utilisation de ce type de système dans les processus de bioremédiation repose sur le fait que les systèmes à deux phases immiscibles permettent de contrecarrer deux problèmes importants dans le domaine des polluants environnementaux, soit : la haute toxicité de certains substrats ou intermédiaires de dégradation ainsi que la faible distribution des polluants aux microorganismes dans le cas de xénobiotiques à caractères hydrophobes. Dans le cadre de ce projet, le choix d'employer un modèle de système à deux phases immiscibles pour permettre la biodégradation des modulateurs endocriniens a été basé sur le dernier élément de l'énoncé précédent.

Les six composés à l'étude tels que décrits à la section 1.1 possèdent un caractère légèrement hydrophobe en plus de se retrouver à de très faibles concentrations dans les eaux usées. L'utilisation d'une phase hydrophobe couplée à une phase aqueuse comprenant des microorganismes capables de dégrader les modulateurs endocriniens permettrait en un premier temps de concentrer les modulateurs à une concentration assez importante pour que ces derniers deviennent une des principales sources de carbone disponible et en un deuxième temps de permettre une meilleure exposition des substrats aux microorganismes dégradeurs.

1.8.1 Caractéristiques des systèmes à deux phases immiscibles

Les systèmes à deux phases immiscibles sont des systèmes composés d'une phase aqueuse abritant des microorganismes dégradeurs et d'une seconde phase immiscible.

Cette dernière peut soit servir de réservoir en éliminant par le fait même les produits potentiellement toxiques de la phase aqueuse (Daugulis 1997) ou par la distribution du substrat à des concentrations plus appropriées pour la dégradation (Cruickshank et al. 2000). De plus, au fur et à mesure que les substrats sont consommés par l'entremise des microorganismes, un déséquilibre est créé entraînant les xénobiotiques contenus dans la phase hydrophobe à se partitionner dans la phase aqueuse. Cette partition du substrat dans la phase aqueuse s'effectue jusqu'à ce que la phase organique soit complètement dépourvue de tout xénobiotiques (Daugulis 2001). Ce type de système est dit à l'équilibre puisque la vitesse à laquelle les composés diffusent d'une phase à l'autre dépend de la vitesse à laquelle ces derniers sont métabolisés par les microorganismes.

La nature et le choix de la phase hydrophobe est un des points les plus important dans la mise au point de ce type de système. Les caractéristiques essentielles à la sélection d'une phase hydrophobe seront d'ailleurs abordées au cours de la section suivante. Généralement, les liquides employés à titre de phase hydrophobe sont des solvants organiques tels que l'huile de silicone et l'hexadécane (tableau 4). Depuis les dernières années, des polymères solides composés de copolymères de polyuréthane et d'acétate de vinyle sont de plus en plus employés comme phase immiscible (Daugulis et al. 2003; Morrish et al. 2008). Il semblerait que les composés organiques sont capables de se partitionner entre la phase aqueuse et ces polymères thermoplastiques de la même manière qu'ils le font lors de l'emploi de solvants organiques comme phase hydrophobe. Les principaux solvants et polymères solides employés dans divers systèmes à deux phases immiscibles visant la bioremédiation de certains xénobiotiques sont résumés au sein du tableau 4. Tel que représenté par ce dernier tableau, une importante variété de phases hydrophobes ont été testées en système biphasique pour la dégradation de substrats toxiques. Parmi l'ensemble des phases testées, l'huile de silicone ainsi que l'Hytreil demeurent les plus étudiées jusqu'à présent (Quijano et al. 2009). Le choix d'utiliser l'Hytreil et l'huile de silicone au cours de ce projet repose principalement sur le fait que, tel que démontré au sein du tableau 4, ces deux phases hydrophobes permettent la biodégradation d'une variété de composés présentant des propriétés physico-chimiques distinctes tous comme les modulateurs endocriniens à l'étude.

Sélection d'une phase hydrophobe

L'efficacité d'un système à deux phases immiscibles repose principalement sur le choix adéquat de la phase hydrophobe qu'il contient. Ce choix doit tenir compte des caractéristiques des différents polluants traités, de leurs concentrations ainsi que des particularités des microorganismes employés (Van Groenestijn et al. 1999). Il existe une série de critères permettant de guider la sélection d'une phase hydrophobe. Daugulis et coll (1997) ont d'ailleurs établi qu'une phase hydrophobe adéquate doit être biocompatible et par le fait même non-toxique pour les microorganismes utilisés. De plus, elle doit être non-biodégradable afin d'éviter que la phase hydrophobe en elle-même ne serve de substrat. La phase hydrophobe d'intérêt doit également être disponible à faible coût et présenter une forte affinité pour les composés cibles (Bruce et al. 1991). Un autre point important à considérer, est la réutilisation de la phase immiscible lors de multiple cycles de biodégradation. Dans cette optique, il est important de choisir une phase facilement récupérable. Sur ce point les polymères solides nouvellement employés dans le domaine des systèmes biphasique présentent un avantage évident, ces derniers sont reconnus comme étant facile d'usage en plus d'être récupérable facilement (Morrish et al. 2008). Le plus grand avantage des polymères solides c'est que la structure de ces derniers peut être adaptée sur mesure pour favoriser l'absorption sélective des molécules cibles (Prpich et al. 2006). Dans le cas des solvants organiques employés à titre de phase hydrophobe, la densité, la viscosité et la solubilité dans l'eau sont des points pouvant affecter la récupération de la phase hydrophobe liquide (Bruce et al. 1991).

Tableau 4. Phases hydrophobes employées en système à deux phases immiscibles

Phase Hydrophobe	Composé cible	Microorganismes	Références
Hexadécane	α -pinène	Boue activée	(Muñoz et al. 2008)
Hexadécane	Hexane	<i>Fusarium solani</i>	(Arriaga et al. 2006)
Hexadécane	Toluène	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> Y234	(Daugulis et al. 2003)
Huile de silicone 20cSt	Butyrate d'éthyle	<i>Candida</i> sp. CF3	(Ascon-Cabrera et al. 1995)
Huile de silicone 20cSt	Phénanthrène	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Bouchez et al. 1995)
Huile de silicone 20cSt	Hydrocarbures aromatiques polycycliques	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Rhodococcus</i> sp.	(Bouchez et al. 1997)
Huile de silicone 20cSt	Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Consortium bactérien	(Lafortune et al. 2009)
Huile de silicone 200cSt	Xylène, Acétate de butyle	Culture mixte	(Gardin et al. 1999)
Huile de silicone 200cSt	Hexane	<i>Fusarium solani</i>	(Arriaga et al. 2006)
Huile de silicone 200cst	α -pinène	Boue activée	(Muñoz et al. 2008)
Elvax 40	Phénol	<i>Pseudomonas Putida</i>	(Amsden et al. 2003)
Elvax 40	Benzène	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	(Daugulis et al. 2003)
Elvax 360	Biphényle	<i>Burkholderia xenovorans</i>	(Rehmann et al. 2007b)
Hytrel 8206	Biphényle	<i>Burkholderia xenovorans</i>	(Rehmann et al. 2007b)
Hytrel 8206	Phénol	Consortium bactérien	(Prpich et al. 2004)
Hytrel 8206	Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Consortium bactérien	(Rehmann et al. 2010)
Hytrel 8206	Phénol, <i>o</i> -crésol, 4-chlorophénol	Consortium bactérien	(Prpich et al. 2006)

1.8.2 Mécanismes microbiens impliqués dans les systèmes biphasiques

Dans la littérature, de nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer la prise des substrats faiblement solubles par les microorganismes en systèmes biphasiques (Guieysse et al. 2001).

Le premier mécanisme tient seulement compte du substrat dissout dans la phase aqueuse comme étant biodisponible pour les microorganismes biodégradeurs. Au cours de ce mécanisme, le taux de dégradation du substrat dépend du taux de transfert de masse de la phase hydrophobe à la phase aqueuse (Bouchez et al. 1995; Déziel et al. 1999). Le transfert de masse par définition caractérise la vitesse de transfert du substrat de la phase hydrophobe à la phase aqueuse (Cruickshank et al, 2000). Il existe différentes approches pour augmenter le transfert de masse. Ces dernières se basent sur l'augmentation du taux de dissolution et de solubilisation du substrat en phase aqueuse par l'ajout de surfactants (Villemur et al. 2000) qui caractérise le second mécanisme de prise du substrat.

Au cours de ce second mécanisme, les microorganismes produisent un composé tensioactif générant la formation de petites gouttelettes ou de micelles générant respectivement l'émulsion ou la pseudo-solubilisation du substrat en phase aqueuse (Déziel et al. 1999). La formation de micelles permet d'augmenter la surface interfaciale entre les deux phases et par le fait même le taux d'échange du substrat. Ce second mécanisme est toutefois limité aux phases hydrophobes aqueuses et ne s'applique donc pas aux polymères solides à l'étude (Hytrel).

Le troisième et dernier mécanisme est caractérisé par la croissance de microorganismes à l'interface des deux phases hydrophobes sous la forme d'un biofilm (Ascon-Cabrera et al. 1995). Le caractère hydrophobe de la paroi cellulaire de certaines bactéries leur permet d'adhérer à la surface poreuse des polymères thermoplastiques ou à la surface de grosses gouttelettes de solvant organique liquide leur permettant, d'extraire directement les xénobiotiques dissous dans la phase hydrophobe.

Ces trois mécanismes peuvent survenir simultanément au sein du même système selon les propriétés des microorganismes, du type de substrat, des conditions de croissance et du type de phase hydrophobe employée (Déziel et al. 1999).

1.8.3 Contraintes et restrictions des systèmes biphasiques

Jusqu'à présent l'ensemble des systèmes biphasiques étudiés dans le domaine de la bioremédiation des xénobiotiques demeurent à l'échelle du laboratoire. Le passage à l'essai pilote ainsi qu'à l'échelle industrielle n'est pas encore envisageable puisque ce genre de système fait face à de nombreuses contraintes et restrictions.

Certaines phases hydrophobes liquides ont tendance à former des émulsions généralement engendrées par leur faible tension de surface (Quijano et al. 2009). La présence de mousse engendre une perte importante dans la récupération de la phase immiscible générant des pertes économiques substantielles puisque certains des solvants employés à titre de phase hydrophobes sont coûteux. Les microorganismes eux-mêmes peuvent être un facteur nuisible à la récupération de la phase hydrophobe dans ce type de système. Tel que cité précédemment, la production de biosurfactants en plus d'être bénéfique pour le rendement de biodégradation peut également nuire au bon fonctionnement du bioréacteur en générant des émulsions au sein du système engendrant par le fait même certaines difficultés opérationnelles. Le caractère hydrophobe de la paroi cellulaire de certaines bactéries leur permettant d'adhérer à l'interface phase hydrophobe-phase aqueuse décrite précédemment est un autre facteur pouvant entraver la récupération de la phase organique (Ascon-Cabrera et al. 1995; Tomei et al. 2008; Rocha-Rios et al. 2009).

La séquestration des polluants à caractère hydrophobe dans la phase du même nom est également un problème important dans l'emploi des systèmes biphasiques. Ce problème revêt une importance significative dans notre cas puisque ce projet fait l'étude de six composés faiblement solubles dans l'eau. Ce phénomène survient lorsque les composés hydrophobes par affinité demeurent emprisonnés dans la phase hydrophobe

limitant ainsi leur relargage en phase aqueuse et par le fait même le rendement de biodégradation du système (Guieysse et al. 2001).

1.9 Méthodes d'analyse et de quantification des modulateurs endocriniens

La présence des modulateurs endocriniens à des concentrations aussi faibles que celles du ng/L dans les eaux usées rend leur analyse et leur quantification un réel défi. Présentement, les approches instrumentales mises au point pour analyser ce genre de composés emploient la spectrométrie de masse une technique démontrant une importante sensibilité (Chang et al. 2009). Dans la littérature, on rapporte l'emploi de ce mode de détection en combinaison avec différents instruments analytiques tels que la chromatographie liquide (CL) ou en phase gazeuse (CG) (voir tableau 5). Au cours de ce projet, l'analyse et la quantification des six composés à l'étude ont été réalisées en employant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). L'analyse des modulateurs endocriniens par chromatographie en phase gazeuse nécessite généralement une dérivation des composés afin d'augmenter leur détection et leur sensibilité (Nie et al. 2009). La chromatographie liquide, contrairement à la phase gazeuse, ne nécessite pas la dérivation des composés avant injection. Toutefois, cette technique présente le désavantage d'être assujettie à de l'interférence provenant de la matrice de l'échantillon générant une suppression importante du signal en spectrométrie de masse (Reemtsma 2003). Généralement, les échantillons d'eau usée analysés afin de détecter la présence de modulateurs endocriniens subissent un prétraitement qui porte le nom d'extraction en phase solide (EPS). Ce traitement permet d'extraire et de pré-concentrer les analytes. Ce mode d'extraction a d'ailleurs été employé au cours de ce projet afin d'extraire les modulateurs endocriniens contenus dans l'huile de silicone.

Tableau 5 : Techniques analytiques employées pour l'analyse des modulateurs endocriniens ainsi que leurs limites de détection.

Méthodes	Analytes	Limite de détection (ng/L)	Références
CL-SM-SM	E1, E2, E3, EE2 MeEE2, BPA, NP	0.08-33	(Heisterkamp et al. 2004)
EPS-CG-SM	E1, E2, E3, EE2 MeEE2, BPA, NP	12-32	(Heisterkamp et al. 2004)
EPS-LC-SM-SM	EE2	1	(Zhang et al. 2004)
EPS-CG-SM	E2, EE2	0.2-0.4	(Huang et al. 2001)
EPS-CG-SM	E1, E2, E3, EE2	0.2	(Xiao et al. 2001)
EPS-CG-SM/SM	E1, E2, EE2	0.5	(Ternes et al. 1999)

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Analyse des modulateurs endocriniens à l'étude par CG-SM

2.1.1 Dérivation des modulateurs endocriniens

Avant d'être analysé par CG-SM, chaque échantillon a été soumis à une réaction de silylation permettant de rendre les modulateurs qu'il contenait thermostables et volatiles. Cette réaction consistait à ajouter aux échantillons évaporés à sec dans les vials à fond conique (LabSphere Inc, Laval, Qc, Canada), 100 µL d'un mélange de silylation renfermant 50 % de pyridine (Fisher Scientific, NJ, É - U), 45 % de BSTFA (N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacetamide; Supelco, PA, É - U) et 5 % de TMCS (Chlorotriméthylsilane; Aldrich Chemical Co Inc, WI, É - U). Les échantillons ont par la suite été scellés, vortexés et incubés pendant 3 heures à 70°C. Une fois refroidi à température pièce, les échantillons étaient analysés par CG-SM selon la méthode décrite à la section 2.1.2.

2.1.2 Analyses des modulateurs endocriniens par CG-SM

Les analyses par CG-SM ont été effectuées en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (GC Ultra Trace, Thermo Scientific, ON, CA) couplé à un spectromètre de masse avec trappe ionique (MS Polaris-Q, Thermo Scientific, ON, CA). Une colonne capillaire de type DB-5 (30 m x 0.25 mm, épaisseur de la phase stationnaire 0.25 µm,) et un débit de gaz vecteur de 1 mL/min ont été utilisés. À chaque injection, 1 µL était injecté en mode *splitless* dans une chambre d'injection chauffée à une température de 290° C permettant la vaporisation complète de l'échantillon. Les constituants ont été séparés les uns des autres en soumettant le four du CG au programme suivant : 90° C pour une période de 7 minutes suivi d'une augmentation graduelle jusqu'à 200° C suivant un taux de 40°C/min, ensuite le four augmente graduellement de 6°C/min pour atteindre 280° C. Cette température est par la suite maintenue pour une durée de 5 minutes après quoi, le CG atteint la température maximale de 300°C pour une période de 2 minutes. La ligne de transfert au spectromètre ainsi que celle de la source d'impact électronique ont été maintenues à des températures respectives de 280°C et 250°C. L'analyse a été

effectuée en mode d'ionisation positif, par balayage des rapports m/z situés entre 100 et 600. Le tableau 6, présente les rapports m/z des différents modulateurs et standards deutérés qui ont été utilisés au cours du projet comme ions de confirmation et comme ions de quantification. Il est à noter que ces valeurs représentent la forme dérivée de chacun des composés. La limite de détection de la méthode pour chaque modulateur endocrinien à l'étude a été évaluée à l'aide de solutions standards de concentrations variant entre 0.0005 à 100 mg/L.

Tableau 6 : Ions de confirmation et de quantification des modulateurs endocriniens et des standards deutérés dérivés.

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Ion de confirmation (m/z)	Ion de quantification (m/z)
Estrone (E1)	342	342
E1-d ₄	346	346
β - estradiol (E2)	416	416
E2-d ₄	420	420
Estriol (E3)	504	504
E3-d ₄	506	506
17 α - éthynelestadiol (EE2)	440	425
EE2-d ₄	444	429
Bisphénol A (BPA)	357	357
BPA-d ₄	361	361
4-n-nonylphénol (NP)	292	292
NP-d ₄	296	296

2.1.3 Extraction des modulateurs endocriniens des phases aqueuses et hydrophobes

Au cours de ce projet, différentes méthodes d'extraction ont été mises au point afin d'extraire les modulateurs endocriniens contenus dans les phases aqueuses (milieu de culture, eau milli Q) et hydrophobes des systèmes à deux phases immiscibles testés. Ces méthodes ont été employées pour : évaluer la solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans les phases hydrophobes (section 2.2), la capacité de relargage de l'Hytrex (section 2.3), le coefficient de partition des modulateurs dans l'Hytrex (section 2.4) et le rendement de biodégradation des modulateurs endocriniens (section 2.7).

2.1.3.1 Extraction des phases aqueuses à l'acétate d'éthyle

2.1.3.1.1 Évaluation de la capacité de relargage de l'Hytrel

Pour chaque échantillon et contrôle, un volume de 12 mL a été transféré dans des éprouvettes en verre vissables équipées d'un bouchon muni d'un fond de téflon. Un volume de 20 µL de chaque solution-mère de standards deutérés (CDN Isotope, Pointe - Claire, Qc, Canada) à 1000 mg/L, correspondant aux modulateurs contenus dans la phase aqueuse a ensuite été ajouté afin d'obtenir une concentration finale de 1.7 mg/L. L'extraction a ensuite été effectuée en ajoutant 2 mL d'acétate d'éthyle (Baker) et en agitant doucement dix fois par inversion. L'acétate d'éthyle a été séparé de la phase aqueuse en soumettant l'ensemble des échantillons à une centrifugation de 5 minutes à 1000 rpm (Damon/IEC Division CU-5000). Le surnageant contenant les modulateurs endocriniens a été prélevé et transféré dans des vials de verre (Labsphere Inc, Qc, CA) contenant une faible quantité de sulfate de sodium (Na_2SO_4) un agent hygroscopique afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles. Les vials ont brièvement été vortexés (30 secondes) et l'acétate d'éthyle issu de chaque échantillon transféré de nouveau dans un autre vial de verre. L'ensemble des vials ont par la suite été entreposés à 4°C jusqu'à leur analyse par CG-SM.

2.1.3.1.2 Évaluation du coefficient de partition

L'extraction des phases aqueuses additionnées de standard interne a été réalisée en ajoutant 6 mL d'acétate d'éthyle (Baker) et en mélangeant à dix reprises par inversion. L'ensemble des échantillons ont par la suite été centrifugés 5 minutes à 1000 rpm (Damon/IEC Division CU-5000). Les phases supérieures contenant les composés d'intérêt ont été prélevées et transférées dans des vials de verre afin d'être traitées au Na_2SO_4 . Les vials ont été conservés à 4°C jusqu'à leur analyse par CG-SM.

2.1.3.1.3 Test de biodégradation

Un volume de 10 mL de chacun des échantillons a été transféré dans des éprouvettes vissables de 15 mL, auxquelles ont été ajoutés 10 µL de chaque solution-mère de standards deutérés correspondant au modulateurs contenus dans le milieu de

culture afin d'obtenir une concentration finale de 1 mg/L. Les composés d'intérêt ont été extraits en ajoutant 2.5 mL d'acétate d'éthyle (Baker) et en agitant dix fois par inversion. Afin de bien partitionner les deux phases, l'ensemble des tubes ont été centrifugés à 1000 rpm pour une période de 10 minutes (Damon/IEC Division CU-5000). La phase supérieure contenant les modulateurs résiduels issus du test de dégradation, les standards deutérés ainsi que l'acétate d'éthyle a été récupérée et déposée dans un vial de verre (Labsphere). Afin d'éliminer toutes traces d'eau, une petite quantité de (Na_2SO_4), a été ajoutée aux échantillons. Un volume de 100 μL de chaque extrait traité aux Na_2SO_4 a par la suite été déposé dans un vial conique et évaporé à sec sous jet d'azote (évaporateur multiple : Reacti-Therm I-18822, Pierce, Thermo Scientific, IL, É - U).

2.1.3.2 Extraction des phases hydrophobes

2.1.3.2.1 Extraction en phase solide de l'huile de silicone

Basé sur le fait que l'huile de silicone ne peut être injectée dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse sans endommager sérieusement l'appareil, les échantillons ont du subir une phase d'extraction avant de pouvoir être analysés. Cette phase d'extraction était constituée de cinq étapes telles que représentées à la figure.5. En un premier temps, la procédure utilisait une cartouche Oasis HLB (500 mg/6 mL, Waters, Milliford, É - U) en combinaison avec un système à extraction multiple (20 positions, avec un support pour tubes de 13 x 75 mm, Waters, Milliford, É - U). La phase stationnaire de la cartouche a par la suite été conditionnée à l'aide de 5 mL d'acétate d'éthyle en utilisant une pression sous vide de 0.039 psi (étape 2). Un volume de 1 mL d'huile de silicone contenant les modulateurs endocriniens solubilisés ainsi que les standards deutérés a été chargé sur la cartouche (étape 3).

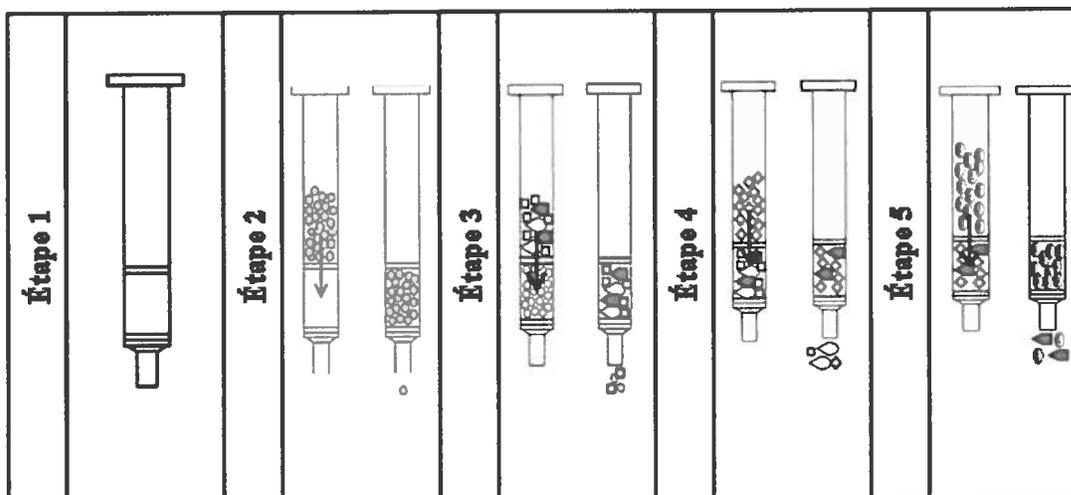


Figure 5. Étapes nécessaires à l'extraction en phase solide des modulateurs endocriniens contenus dans l'huile de silicone.

En utilisant une pression sous vide extrêmement faible (0.019-0.029 psi), l'huile de silicone chargée a lentement diffusé à travers la phase stationnaire permettant aux modulateurs endocriniens de se lier par affinité, à cette dernière. L'huile de silicone dorénavant dépourvue de composés a par la suite été éluée dans le système à extraction multiples. Une étape de lavage a été exécutée à quatre reprises en utilisant 5 mL de pentane afin d'éliminer complètement l'huile de silicone qui aurait pu demeurer dans la cartouche (étape 4). Cette étape a été réalisée en utilisant une pression sous vide de 0.077 psi. Le choix du pentane comme solvant de lavage est basé sur le fait que ce solvant est miscible avec l'huile de silicone et qu'il ne présente aucune affinité pour les composés à l'étude. Les résidus de solvant contenus à l'intérieur du système à extractions multiples ont été éliminés et un support contenant des tubes en verre a été installé. Les modulateurs ainsi que les standards liés à la phase stationnaire ont été élués avec quatre volumes successifs de 5 mL de méthanol. Les quatre volumes de méthanol contenus dans quatre tubes ont tous été évaporés à sec à 40°C en utilisant un évaporateur à tiges multiples combiné à un jet d'azote (évaporateur multiple ; Reacti-Therm I-18822, Pierce, Thermo Scientific, IL, É - U). Les résidus secs issus de la première élution ont été suspendus de nouveau dans 1 mL de méthanol (Baker). Ce volume a ensuite été prélevé et déposé dans le tube issu de la seconde élution afin de solubiliser à son tour les résidus issus de cette

deuxième élution. Cette étape a également été répétée pour le troisième et quatrième tube. Le méthanol contenant les composés issus des quatre élutions a été prélevé et entreposé dans des vials en verre (LabSphere) munis de bouchons de téflon.

2.1.3.2.2 Double extraction au méthanol de l'Hytrel

Afin d'extraire l'ensemble des modulateurs endocriniens contenus dans l'Hytrel, la totalité de la phase hydrophobe solide issue de chaque échantillon a été déposée dans un vial de scintillation d'une capacité de 20 mL. À chaque vial a été ajouté 5 mL de méthanol (Baker). L'ensemble des vials ont par la suite été scellés à l'aide d'un bouchon de polypropylène muni d'un fond de téflon et incubés 2 jours, à 150 rpm, à 25°C, dans l'obscurité afin de permettre aux modulateurs liés à l'Hytrel de se solubiliser dans le méthanol. Ce dernier a ensuite été prélevé et déposé dans une éprouvette de verre vissable d'une capacité de 15 mL. Une deuxième extraction au méthanol a été effectuée en suivant les mêmes étapes que décrites précédemment afin d'extraire le maximum de modulateurs contenus dans l'Hytrel. Les deux volumes de 5 mL de méthanol issus des extractions sont combinés et évaporés sous jet d'azote. Les modulateurs recueillis suite à la procédure de double extraction sont solubilisés de nouveau dans 5 mL de méthanol. L'ensemble des éprouvettes sont par la suite entreposées à 4°C à des fins d'analyse.

2.2 Évaluation de la solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans les phases hydrophobes

2.2.1 Solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l'huile de silicone

Afin d'évaluer la solubilité maximale de chaque modulateur endocrinien à l'étude dans l'huile de silicone, de façon individuelle et combinée, 5 mg de chaque composé (Sigma-Aldrich Chemical Company, St - Louis, MO, É - U) ont été déposés dans un vial de scintillation (Sigma-Aldrich) d'une capacité de 20 mL auquel 5 mL d'huile de silicone à 20 centistokes (cSt) (diméthylpolysiloxane; Sigma-Aldrich) ont été ajoutés. Cette dernière manipulation a été effectuée en triplicata pour chaque modulateur ainsi que pour le mélange de ces derniers.

En plus des échantillons réguliers, deux types de contrôle ont été effectués. Le premier contrôle a été réalisé en déposant dans des vials de scintillations 5 mL d'une solution-mère de 1000 mg/L de chacun des six composés à l'étude. Ces solutions-mères de 4-n-nonylphénol, de bisphénol A, d'estriol, d'estrone, de 17 - α - éthynelestradiol et de 17 - β - estradiol (Sigma-Aldrich) ont été préparées en dissolvant 5 mg de chaque composé dans 5 mL de méthanol (Baker). Ce contrôle avait pour but d'évaluer s'il existe une dégradation naturelle des modulateurs au cours de l'incubation qui pourrait fausser les résultats de solubilité. Le second contrôle consistait tout simplement en 5 mL d'huile de silicone absente de tous modulateurs et déposée dans un vial de scintillation. Ce dernier contrôle avait pour but d'évaluer si au cours des manipulations certains composés parasites auraient pu s'absorber dans l'huile de silicone et fausser les analyses.

Les échantillons ainsi que les contrôles ont par la suite été scellés à l'aide d'un bouchon de polypropylène muni d'un fond de téflon et incubés 4 jours, à 150 rpm, à 25°C, dans l'obscurité afin de permettre à une quantité maximale de composés de se solubiliser. Tous les échantillons d'huile de silicone ont par la suite été prélevés et filtrés à l'aide d'une seringue de 5 mL (Becton Dickinson and Company, NJ, É - U) muni d'un filtre de type PTFE 0.2 μ m (Chromatographic Specialities Inc, Canada) afin d'éliminer les modulateurs non-dissous. Un volume de 3 mL d'huile filtrée a été transféré dans une éprouvette de verre à laquelle ont été ajoutés 150 μ L de solutions-mères à 1000 mg/L de standards deutérés (CDN Isotope, Pointe - Claire, Qc, Canada) représentant chaque composé à l'étude afin d'obtenir une concentration finale de 50 mg/L. Ces solutions-mères ont été réalisées en dissolvant 5 mg de chaque standard deutéré dans 5 mL de méthanol (Baker). Ces dernières ont par la suite été conservées à - 20°C dans des vials en verre (LabSphere) munis de bouchons de téflon.

L'huile additionnée de standards deutérés a été bullée à l'azote pour évaporer le méthanol issu de la solution-mère de standard. Un volume de 1 mL de chaque échantillon a été prélevé et traité par l'intermédiaire de la méthode d'extraction en phase solide (voir section 2.1.3.2.1). Dans le but d'évaluer la solubilité maximale de chaque composé dans l'huile, 100 μ L de chaque échantillon extrait ont été déposés dans un vial conique,

évaporés à sec sous jet d'azote, dérivés (voir section 2.1.1) et par la suite analysés par CG-SM (voir section 2.1.2). Dans le cas du premier contrôle, c'est-à-dire celui uniquement composé de méthanol, une quantité plus petite, soit 5 µL, contrairement à 100 µL a été utilisée à des fins d'analyse. Dans les vials coniques associés aux premiers contrôles ont également été ajoutés 5 µL de standards deutérés à 1000 mg/L correspondant aux modulateurs à analyser afin d'obtenir après l'ajout du mélange de dérivation une concentration de standard interne de 50 mg/L.

2.2.2 *Solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l'Hytrel*

Afin d'évaluer la solubilité maximale des six modulateurs à l'étude dans l'Hytrel de façon individuelle et combinée, 3,53 g d'Hytrel 8206 (Dupont, Canada) ont été déposés dans un vial de scintillation d'une capacité de 20 mL auquel 5 mL d'une solution-mère contenant 1000 mg/L d'un des six modulateurs ou des six modulateurs combinés ont été ajoutés. Les solution-mères ont été conçues de la même façon qu'à la section 2.2.1. Cette dernière manipulation a été effectuée en triplicata pour chaque modulateur.

Tout comme pour l'évaluation de la solubilité maximale dans l'huile de silicone, deux types de contrôles ont été réalisés. Le premier contrôle consiste en 5 mL d'une solution-mère comportant une concentration finale de 1000 mg/L de chacun des six composés à l'étude déposée dans un vial de scintillation. Le second contrôle a été réalisé en déposant 3.53 g d'Hytrel dans un vial de scintillation auxquels ont été ajouté 5 mL de méthanol pur. La raison de ce contrôle est d'évaluer si le méthanol constituerait un solvant trop corrosif pour l'Hytrel ce qui pourrait générer l'apparition de pic parasites dans la fraction de méthanol analysée à la suite du test.

L'ensemble des échantillons et des contrôles ont été scellés et incubés 4 jours, à 150 rpm, à 25°C, dans l'obscurité dans le but de permettre à une quantité maximale de modulateurs de s'absorber dans l'Hytrel. Suite à la période d'incubation, l'ensemble du méthanol contenu dans chaque vial a été prélevé et entreposé dans des vials de verre (Labsphere Inc, Qc, CA) à une température de 4°C à des fins d'analyse. Cette fraction

représentait la **fraction 1** de l'expérience et correspond la quantité de modulateurs qui ne s'est pas absorbée dans l'Hytreil.

Suite au prélèvement du méthanol, l'Hytreil a été traité à son tour. En un premier temps, les modulateurs qui se sont seulement adsorbés en périphérie de l'Hytreil dû à sa texture légèrement poreuse ont été éliminés grâce à un lavage à l'eau milli-Q. Cette étape de lavage a été réalisée en ajoutant aux échantillons d'Hytreil contenus dans les vials de scintillation, 5 mL d'eau-milli-Q. Les vials ont été scellés et vortexés pour une période d'une minute. L'eau a été prélevée et transférée dans une éprouvette de verre vissable afin d'en extraire les modulateurs endocriniens par extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle. Cette extraction a été effectuée en ajoutant à 4 mL d'eau, 4 µL des solutions-mères de standards deutérés correspondants aux modulateurs contenus dans l'eau. À la suite de quoi, 1.5 mL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés. Les modulateurs ont par la suite été extraits grâce à dix inversions successives du mélange eau-acétate d'éthyle. L'ensemble des éprouvettes ont par la suite été soumises à une centrifugation de 1000 rpm pour une durée de 5 min. L'acétate d'éthyle issu de chaque extrait a été prélevé et entreposé dans des vials en verre à une température de 4°C à des fins d'analyse. Les extraits issus du lavage représentaient la **fraction 2** de cette expérience. Les modulateurs endocriniens qui se sont adsorbés au polymère grâce à des interactions chimiques ont été extraits selon la méthode de double extraction au méthanol décrite à la section 2.1.3.2.2 et constituaient la **troisième et dernière fraction** de cette expérimentation.

Selon la nature des fractions et des contrôles, différents volumes ont été déposés dans des vials coniques (voir Tableaux 7 et 8). Pour les fractions qui n'ont pas été extraites à l'acétate d'éthyle soient les fractions 1 et 3 ainsi que les deux contrôles, 5 µL d'une solution de standard deutéré à 1000 mg/L correspondant aux modulateurs contenus dans les échantillons ont été ajoutés. Cette étape a été effectuée afin d'obtenir une concentration de standard interne de 50 mg/L. Le contenu de chaque vial conique a été évaporé à sec, dérivé et analysé tel que décrit respectivement aux sections 2.1.1 et 2.1.2.

Tableau 7. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des contrôles issus de la détermination de la solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l'Hytrel.

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Contrôle 1		Contrôle 2	
	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne (mg/L)
E1	5	50	100	50
E2	5	50	100	50
E3	5	50	100	50
EE2	5	50	100	50
BPA	5	50	100	50
NP	5	50	100	50
Mélange de l'ensemble des M.E.	5	50	100	50

Tableau 8. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des fractions issues de la détermination de la solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l'Hytrel.

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3	
	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne (mg/L)
E1	10	50	100	2.67	10	50
E2	10	50	100	2.67	10	50
E3	10	50	100	2.67	12.5	50
EE2	10	50	100	2.67	10	50
BPA	10	50	100	2.67	10	50
NP	10	50	100	2.67	5	50
Mélange de l'ensemble des M.E.	10	50	100	2.67	5	50

2.3 Évaluation de la capacité de relargage de l’Hytrel

2.3.1 Chargement des modulateurs endocriniens dans l’Hytrel

La méthode employée pour charger les modulateurs endocriniens dans l’Hytrel est similaire à celle utilisée pour évaluer la solubilité des composés dans ce type de polymère (voir section 2.2.2). En un premier temps, des solutions-mères de 500 mg/L ont été réalisées pour les six modulateurs endocriniens individuellement ainsi que pour l’ensemble des composés combinés. Pour ce faire, 12.5 mg de chaque composé ont été dissous dans un volume final de 25 mL de méthanol (Baker). Un volume de 5 mL de chacune des solutions-mères a été transféré dans un vial de scintillation d’une capacité de 20 mL contenant 3.53 g d’Hytrel. Cette dernière étape a été répétée à trois reprises afin d’obtenir des triplicatas. Les vials ont par la suite été scellés à l’aide d’un bouchon de polypropylène muni d’un fond de téflon et incubés 4 jours, à 150 rpm, à 25°C, dans l’obscurité afin de permettre à une quantité maximale de modulateurs de s’absorber dans l’Hytrel. Un contrôle (**Contrôle 1**) a également été effectué au cours de cette étape afin d’évaluer si une dégradation naturelle des modulateurs endocriniens engendrée par la longue période d’incubation pouvait entraver l’absorption des composés dans la phase hydrophobe. Ce contrôle consistait principalement en un volume de 5 mL de chaque solution-mère déposé dans un vial de scintillation ne contenant pas d’Hytrel. Ces vials ont été incubés sous les mêmes conditions que les échantillons.

Suite à la période d’incubation, le méthanol issu de chaque échantillon et contrôle a été prélevé et entreposé dans des vials de verre (Labsphere) à une température de 4°C à des fins d’analyse. Ces échantillons représentaient la **fraction 1** de cette expérience qui constituait la quantité de modulateurs endocriniens incapables de se charger à l’Hytrel.

L’Hytrel a par la suite été lavé à l’eau milli-Q suivant la méthode évoquée à la section 2.2.2 afin d’éliminer la quantité de composés qui ont adhéré à l’Hytrel dû à sa texture poreuse. Les modulateurs endocriniens contenus dans cette eau ont été extraits à l’acétate d’éthyle. Pour ce faire, 4 mL d’eau dérivée de chaque lavage d’échantillon d’Hytrel ont été transférés dans des tubes en verre vissable d’une capacité de 15 mL. À

chaque tube a été ajouté un volume de 20 μ L de standards deutérés d'une concentration de 1000 mg/L correspondant aux modulateurs contenus dans l'eau. Un volume de 1.5 mL d'acétate d'éthyle a par la suite été additionné à chaque tube. Ces derniers ont été scellés à l'aide d'un bouchon muni d'un fond de téflon et mélangés par inversion à dix reprises. L'acétate d'éthyle a été séparé de l'eau en soumettant l'ensemble des tubes à une centrifugation de 1000 rpm pour une durée de 5 minutes. La phase supérieure de chaque échantillon a été prélevée et entreposée à 4°C dans des vials de verre pour être analysée. Ces extraits d'acétate d'éthyle représentaient la **fraction 2** de cette expérience.

2.3.2 Démarrage du système biphasique

Suite au lavage, les échantillons d'Hytrell ont été déposés pour une nuit dans une étuve à 70°C afin d'éliminer toutes traces d'eau. Les systèmes biphasiques ont par la suite été démarrés en déposant respectivement chaque échantillon d'Hytrell dans une bouteille en verre de 125 mL. Un volume de 20 mL d'eau milli-Q a été ajouté à chaque bouteille afin de constituer la phase aqueuse du système. Un système biphasique contrôle contenant 3.53 g d'Hytrell absent de tout modulateur et 20 mL d'eau milli-Q a également été réalisé au cours de cette étape. Les bouteilles ont ensuite été scellées et incubées 4 jours, à 150 rpm, à 25°C, dans l'obscurité pour permettre aux modulateurs de diffuser dans la phase aqueuse et par le fait même d'atteindre un équilibre entre les deux phases du système.

2.3.3 Analyse des deux phases suite au relargage

Les phases aqueuses issues de chaque système biphasique ainsi que les échantillons d'Hytrell ont été traités selon les méthodologies décrites dans les sections 2.1.3.1.1 et 2.1.3.2.2. Les échantillons d'acétate d'éthyle dérivés du traitement des phases aqueuses ainsi que les extraits de méthanol issus du traitement de l'Hytrell représentaient respectivement les **fractions 3 et 4** de cette expérience. Pour les besoins de la cause, les **fractions 5 et 6** ont été attribués aux phases aqueuse et hydrophobe du contrôle 2.

Selon la nature des fractions, différents volumes ont été déposés dans des vials coniques (voir Tableaux 9 et 10). Les vials associés aux fractions n'ayant pas été extraites

à l'acétate d'éthyle c'est-à-dire les fractions 1, 4, 6 et le contrôle 1 ont subi un ajout de 5 μ L d'une solution de standards deutérés à 1000 mg/L correspondant aux modulateurs contenus dans les échantillons. Cette étape a été réalisée afin d'obtenir une concentration de standards internes de 50 mg/L. Le contenu de chaque vial conique a été évaporé à sec, dérivé et analysé tel que décrit respectivement aux sections 2.1.1 et 2.1.2.

Tableau 9. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des fractions issues de la détermination de la capacité de relargage de l'Hytrel.

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3		Fraction 4	
	Volume d'échantillon analysé (μ L)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (μ L)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (μ L)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (μ L)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)
E1	50	50	100	5	300	5	5	50
E2	25	50	100	5	300	5	5	50
E3	50	50	100	5	300	5	5	50
EE2	50	50	100	5	300	5	5	50
NP	50	50	300	5	300	5	5	50
BPA	16.67	50	150	5	300	5	5	50
Mélange de l'ensemble des M.E.	50	50	100	5	300	5	5	50

Tableau 10 : Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des contrôles issus de la détermination de la capacité de relargage de l'Hytrel.

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Contrôle 1			Fraction 5 ^a			Fraction 6 ^b		
	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	
E1	5	50	100	1.66	100	1.66	100	50	
E2	5	50	100	1.66	100	1.66	100	50	
E3	5	50	100	1.66	100	1.66	100	50	
EE2	5	50	100	1.66	100	1.66	100	50	
NP	5	50	100	1.66	100	1.66	100	50	
BPA	5	50	100	1.66	100	1.66	100	50	
Mélange de l'ensemble des M.E.	5	50	100	1.66	100	1.66	100	50	

^a Phase aqueuse du contrôle 2. ^b Phase hydrophobe du contrôle 2.

2.4 Évaluation du coefficient de partition des différents modulateurs dans l'Hytrel

2.4.1 Préparation des solutions aqueuses

Pour chaque composé, trois solutions de concentrations différentes ont été produites. Les concentrations employées variaient en fonction de la nature du modulateur endocrinien et de sa solubilité maximale dans l'eau. Ces concentrations tenaient également compte de la capacité maximale de chargement de chaque modulateur dans 1.059 g d'Hytrel. L'obtention des différentes concentrations a été réalisée en saturant trois solutions de 260 mL d'eau milli-Q et ce pour chacun des six composés à l'étude. La saturation des phases aqueuses a été effectuée en déposant dans un Erlenmeyer d'une capacité de 500 mL un certain volume d'une solution-mère de modulateur endocriniens d'une concentration de 1000 mg/L afin d'obtenir une concentration finale supérieure à la leur solubilité maximale dans l'eau (voir Tableau 11). Les modulateurs ont été évaporés à sec sous jet d'azote et 260 mL d'eau milli-Q ont été ajoutés à chaque Erlenmeyer. L'ensemble des Erlenmeyers ont été scellés et incubés 2 jours à 150 rpm, à 25°C, dans l'obscurité pour permettre à un maximum de modulateurs de se solubiliser. À la suite de cette période d'incubation les échantillons de solutions aqueuses ont été filtrés sur une membrane de PTFE de 0.2 µm afin d'éliminer la portion de composés non solubilisés. Pour chacun des composés, les solutions de phases aqueuses filtrées ont été diluées afin d'obtenir trois concentrations distinctes (voir Tableau 11). Toutefois, aucune dilution n'a été nécessaire pour les solutions dont les concentrations choisies représentaient 100% de la solubilité maximale du composé dans l'eau. Pour chacune des 18 solutions produites, un volume de 40 mL a été prélevé et transféré dans une éprouvette de verre vissable d'une capacité de 60 mL. Un volume de 30 µL de standard interne associé au modulateur contenu dans chaque phase aqueuse a été ajouté aux éprouvettes afin d'obtenir une concentration finale de 0.75 mg/L. Les éprouvettes ont par la suite été traitées à l'acétate d'éthyle afin d'en extraire les modulateurs endocriniens. L'extraction a été réalisée selon la méthode décrite à la section 2.1.3.1. Les extraits obtenus représentaient la **fraction 1** de cette expérience et constituaient la quantité de modulateurs endocriniens qui était contenus dans la phase aqueuse avant le démarrage des systèmes biphasiques.

Tableau 11. Volume des solutions-mères à 1000 mg/L employées pour saturer les différentes phases aqueuses ainsi que des dilutions effectuées afin d'obtenir trois concentrations distinctes employées pour l'évaluation du coefficient de partition des différents modulateurs endocriniens.

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Solubilité maximale dans l'eau 25°C (mg/L) ^a	Volume de solution-mère à 1000 mg/L employé (mL)	Dilutions effectuées ^b
E1	12.42	1.3	1
			1/2
			1/4
E2	12.96	1.3	1
			1/2
			1/4
E3	13.25	3.9	7/10
			1/2
			1/4
EE2	4.83	3.9	7/10
			1/2
			1/4
NP	5.43	1.3	1
			3/4
			1/2
BPA	120	10	1/12
			1/20
			1/40

^a Issu de (Lintelmann et al. 2003).^b Ces dilutions ont été effectuées sur les phases aqueuses saturées et filtrées.

2.4.2 Démarrage des systèmes biphasique

Pour déterminer le coefficient de partition des six composés à l'étude de façon individuelle, 1.059 g d'Hyrel ont été ajoutés dans six Erlenmeyers de 125 mL contenant 60 mL d'une solution d'eau milli-Q comprenant trois concentrations différentes de composés (voir section 2.4.1). Cette dernière manipulation a été effectuée en triplicata pour chaque composé. L'ensemble des Erlenmeyers ont été scellés à l'aide d'un bouchon de polypropylène (Chemglass, É - U) et incubés 2 jours à 150 rpm, à 25°C, dans l'obscurité pour permettre à l'équilibre des composés entre les deux phases d'être atteint. Un système biphasique contrôle a également été réalisé en incubant sous les mêmes

conditions que décrites précédemment 1.059g d'Hyrel dans un Erlenmeyer de 125 mL contenant 60 mL d'eau milli-Q absente de modulateurs. Ce contrôle a été effectué en triplicata.

2.4.3 *Analyse des deux phases suite à la partition des modulateurs*

Afin d'évaluer la concentration de modulateurs endocriniens contenus dans les différentes phases aqueuses suite à l'équilibre, 40 mL de chacune de ces phases ont été prélevés et transférés dans des éprouvettes vissables d'une capacité de 60 mL. Un volume de 20 µL de standard deutéré associé au composé contenu dans chaque phase aqueuse a été ajouté aux éprouvettes dans le but d'obtenir une concentration finale en phase aqueuse de 0.5 mg/L. Ce dernier énoncé est vrai pour la plupart des modulateurs endocriniens à l'étude soit : tous les composés associés aux estrogènes et le bisphénol A. Toutefois, pour le 4-n-nonylphénol un volume de 7 µL de standard interne a plutôt été employé afin d'obtenir une concentration de standard en phase aqueuse de 0.175 mg/L. Les modulateurs ont été extraits selon la méthode décrite à la section 2.1.3.1.2. Les extraits provenant de cette étape constituaient la **fraction 2** de cette expérience. Les échantillons d'Hyrel ont également été traités au méthanol (voir section 2.1.3.2.2) afin d'extraire les modulateurs endocriniens du polymère. Ces extraits représentaient la **fraction 3** de cette expérience.

Afin d'évaluer si les phases aqueuses des trois contrôles ont été contaminées par certains composés issus de l'érosion possible de l'Hyrel suite à une agitation constante de 2 jours, 40 mL des phases aqueuses contrôles ont été prélevés et transférés dans des éprouvettes vissables d'une capacité de 60 mL. Un volume de 20 µL de standard deutéré des composés à l'étude a été ajouté aux éprouvettes sauf pour le nonylphénol ou un volume de 7 µL a plutôt été additionné. Les phases aqueuses ont été extraites selon la méthode décrite à la section 2.1.3.1.2 et constituaient la **fraction 4** de cette expérience. L'Hyrel des contrôles a également été traité afin d'évaluer si le polymère avait la faculté d'absorber certains composés parasites issus de l'eau milli-Q. L'extraction de l'Hyrel a été effectuée selon la méthodologie présentée à la section 2.1.3.2.2 et constituait la **fraction 5** de cette expérience.

En fonction des fractions, des volumes variés d'échantillons ont été déposés dans des vials coniques (voir Tableaux 12, 13 et 14). Les vials associés aux fractions 3 et 5 ont subi un ajout de 2.5 μL d'une solution de standards deutérés à 1000 mg/L correspondant au modulateurs contenus dans les échantillons. Cette étape a été réalisée afin d'obtenir une concentration de standards internes de 50 mg/L. Le contenu de chaque vial conique a été évaporé à sec, dérivé et analysé tel que décrit respectivement aux sections 2.1.1 et 2.1.2. Il est toutefois à noter qu'une petite modification à l'étape de dérivation a été apportée au cours de cette expérience. Un volume de 50 μL du mélange réactionnel a été employé au lieu du 100 μL décrit à la section 2.1.1

Tableau 12. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des fractions issues de la détermination du coefficient de partition des différents estrogènes dans l'Hytrel.

Modulateurs endocriens (M.E.)	Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3	
	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)
	50	5	100	6.67	50	50
E1	100	10	200	13.33	100	50
	200	20	300	20	200	50
	50	5	250	16.67	100	50
E2	100	10	400	26.67	150	50
	200	200	600	39.99	250	50
	50	5	37.5	2.5	200	50
E3	125	12.5	50	3.33	125	50
	400	40	75	5	175	50
	37.5	3.75	375	25	50	50
EE2	50	5	500	33.33	75	50
	75.5	7.55	750	50	100	50

Tableau 13. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des fractions issues de la détermination du coefficient de partition du nonylphénol et du bisphénol A dans l'Hytrel.

Modulateurs endocriens (M.E.)	Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3	
	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (µL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)
NP	1	5	2030	47.44	75	50
	3/4	7.5	1630	38.09	200	50
	1/2	10	2041	47.69	300	50
	1/12	2.5	70	4.67	5	50
BPA	1/20	5	100	6.67	7.5	50
	1/40	10	150	10	15	50

Tableau 14. Volume des échantillons et concentrations des standards internes utilisés pour l'analyse des contrôles issus de la détermination du coefficient de partition des différents modulateurs dans l'Hytrel.

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Fraction 4		Fraction 5	
	Volume d'échantillon analysé (μL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)	Volume d'échantillon analysé (μL)	Concentration finale du standard interne dans le vial (mg/L)
E1	300	20	200	50
E2	750	50	250	50
E3	75	5	175	50
EE2	750	50	100	50
NP	2150	50.24	300	50
BPA	150	10	15	50

2.5 Enrichissement en système biphasique

2.5.1 *Modulateurs endocriniens*

Les modulateurs endocriniens utilisés au cours des enrichissements sont tous issus de solutions-mères d'une concentration identique, soit de 1000 mg/L. Des solutions-mères de 4-n-nonylphénol, de bisphénol A, d'estriol, d'estrone, de 17- α -éthynylestradiol et de 17- β -estradiol (Sigma-Aldrich) ont été préparées en dissolvant 5 mg de chaque composé dans 5 mL de méthanol (Baker). Ces solutions de modulateurs endocriniens ont été fraîchement préparées à chaque expérience. À des fins de dosage, des solutions-mères de standards deutérés (CDN Isotope, Pointe - Claire, Qc, Canada) correspondant à chacun des composés cités précédemment ont également été produites et ce à une concentration de 1000 mg/L. Les solutions standards ont été conservées à -20°C dans des vials en verre (LabSphere) munis de bouchons de téflon.

2.5.2 *Biomasse employée*

Les enrichissements ont été effectués en suivant le principe du système à deux phases immiscibles afin de développer une microflore adaptée au système biphasique et capable de dégrader les modulateurs endocriniens comme source de carbone.

La biomasse de départ provenait de trois sources distinctes dans le but d'augmenter la diversité microbienne des enrichissements et par le fait même les chances d'obtenir des microorganismes capables de dégrader le genre de composés à l'étude. La première biomasse provenait d'un échantillon de boues activées de l'usine d'épuration des eaux usées de Vaudreuil (Qc). La seconde, était issue d'un réacteur biologique séquentiel (RBS - 2) permettant la déphosphatation du lisier de porc et mis au point dans le laboratoire du Pr. Pierre Juteau (INRS-Institut Armand-Frappier). La troisième et dernière biomasse dérivait d'un consortium bactérien capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). L'inoculum bactérien utilisé au cours du premier enrichissement était un mélange en proportions égales de chacune des biomasses.

2.5.3 Composition des enrichissements

Au total, six enrichissements ont été démarrés en parallèle (voir tableau 15) dans des Erlenmeyers de 250 mL en inoculant 5 mL de la biomasse décrite précédemment dans 35 mL de milieu minéral ESM (Teske 2007) supplémenté de 25 mg/L d'extrait de levure (BBL, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, É - U). Le milieu ESM a été préparé de la façon suivante : à la solution de milieu minéral ESM a été ajouté 25 mg/L d'extrait de levure. Cette solution a été par la suite stérilisée à 121 °C pour une période de 30 minutes. Une fois refroidie, une solution de NaHCO₃ ayant été préalablement stérilisée par filtration a été ajoutée au milieu afin d'obtenir une concentration finale de 0.5 g/L. Des solutions d'éléments traces et de vitamines aussi stérilisées par filtration ont été ajoutées au milieu dans le but d'obtenir des pourcentages respectifs de 0.3 % (v/v) et de 1 % (v/v).

À ces 35 mL de milieu de culture aqueux a été additionné, selon l'enrichissement, 10 mL d'huile de silicone à 20 centistokes (cSt) (diméthylpolysiloxane; Sigma-Aldrich) ou 7 g d'Hytrel 8206 (DuPont, Canada). Tel que qu'observé dans le tableau 15 les six enrichissements démarrés ont été regroupés sous trois grandes classes qui se distinguent par la nature de la principale source de carbone qu'ils contiennent. Les enrichissements de la **classe A** comprenaient comme principale source de carbone les modulateurs endocriniens appartenant à la famille des **estrogènes** (estriol, estrone, 17 - α - éthynelestadiol et de 17 - β - estradiol). La **classe B** renfermait les modulateurs associés à la famille des **alkylphénols** (4-n-nonylphénol et bisphénol A). Les enrichissements de la **classe D** regroupaient **l'ensemble des molécules à l'étude** (estriol, estrone, 17- α -éthynelestadiol, 17- β -estradiol, 4-n-nonylphénol et bisphénol A). Ces sources de carbone étaient comprises dans les phases hydrophobes (huile de silicone 20 cSt et Hytrel 8206) et étaient présentes à des concentrations de 40 ou 100 mg/L selon la nature du composé et de la phase hydrophobe employée.

Tableau 15. Description de la composition des enrichissements.

Nom de l'enrichissement	Principale source de carbone	Concentration de la source de carbone (mg/L)	Nature de la phase immiscible
<i>A-Huile de silicone</i>	Estrogènes	40	Huile de silicone 20 cSt
<i>A-Hytrel</i>	Estrogènes	100	Hytrel 8206
<i>B-Huile de silicone</i>	Alkylphénols	Nonylphénol : 100 Bisphénol A : 40	Huile de silicone 20 cSt
<i>B-Hytrel</i>	Alkylphénols	100	Hytrel 8206
<i>D-Huile de silicone</i>	Ensemble des Modulateurs à l'étude	Nonylpénol : 100 Autres composés : 40	Huile de silicone 20 cSt
<i>D-Hytrel</i>	Ensemble des Modulateurs à l'étude	100	Hytrel 8206

2.5.4 Chargement des modulateurs endocriniens dans les phases hydrophobes

Selon la classe d'enrichissement concernée (A, B ou D), un volume spécifique de chaque solution-mère de modulateurs a été ajouté à l'huile de silicone pour obtenir les concentrations décrites précédemment. Le mélange d'huile de silicone et de modulateurs endocriniens a été par la suite bullé à l'azote afin d'évaporer le méthanol issu des solutions-mères. Les solutions d'huile de silicone ont ensuite été filtrées sur membrane de poly(étrafluoroéthylène) (PTFE) de 0.2 µm (Chromatographic Specialities Inc, Canada) permettant ainsi, d'éliminer la quantité de composés non-dissous.

Le chargement des modulateurs endocriniens dans l'Hytrell a été effectué en déposant dans des Erlenmeyers de 125 mL, 7 g d'Hytrell auxquels a été ajouté 10 mL d'une solution de méthanol comprenant 200 mg/L de chaque modulateur endocrinien associé à la classe d'enrichissement concernée. Les flasques ont été par la suite scellés et incubés deux jours à 25°C, dans l'obscurité et avec une agitation constante de 150 rpm afin de permettre aux composés de s'absorber à l'Hytrell.

Les concentrations des différents composés à l'étude contenus dans l'huile de silicone ou dans l'Hytrell, selon l'enrichissement, ont été évaluées de façon plus précise par chromatographie en phase gazeuse (voir section 2.1.3.2, 2.1.1 et 2.1.2). Ces concentrations correspondaient au temps zéro.

2.5.5 Repiquage et conditions d'incubation

Dans le but de sélectionner une microflore spécialisée, des repiquages de chacun des six enrichissements ont été effectués sur une base mensuelle. Au cours de ces derniers, 5 mL des phases aqueuses de chaque enrichissement ont été inoculés dans un nouveau système biphasique constitué de 35 mL de milieu aqueux ESM auxquels ont été ajoutés 10 mL d'huile de silicone ou 7 g d'Hytrell chargés de modulateurs endocriniens. L'ensemble des enrichissements ont été incubés à 25°C, en obscurité et avec une agitation constante de 150 rpm.

Deux contrôles abiotiques ont également été effectués afin d'évaluer si les phases hydrophobes utilisées sont biodégradables et par le fait même peuvent servir elles-mêmes de source de carbone. Ces derniers ont été réalisés en inoculant 5 mL de biomasse initiale dans 35 mL de milieu ESM absent d'extrait de levure auquel 10 mL d'huile de silicone ou 7 g d'Hytrel ne contenant pas de modulateurs ont été additionnés. Ces contrôles ont été incubés et repiqués sous les mêmes conditions que les enrichissements.

2.5.6 *Conservation du consortium*

Au cours de chaque passage, les 35 mL de phase aqueuse restants suite au transfert de 5 mL de chaque enrichissement aux enrichissements subséquents ont été déposés dans un tube en polypropylène stérile de 50 mL. Ces derniers ont ensuite été soumis à une centrifugation de 5000 rpm, à la suite de quoi une partie du surnageant a été éliminé afin de concentrer la biomasse. À chaque transfert, cinq aliquotes de 1 mL de phase aqueuse concentrée ainsi que 5 mL d'huile de silicone ou 7 g d'Hytrel, selon le type d'enrichissement, étaient conservés. Une aliquote de 1 mL de la phase aqueuse concentrée a été additionnée à une solution contenant 50 % de glycérol stérile et placée à -80°C afin de conserver la biomasse qu'il renfermait. Les quatre aliquotes restants ont été conservés à -20°C à des fins d'extraction d'ADN. Les échantillons de phases hydrophobes ont été conservés à 4°C pour extraire les modulateurs endocriniens qu'ils contenaient (voir section 2.1.3.2). Cette dernière étape était nécessaire à l'évaluation du suivi de la dégradation des composés par rapport au temps zéro.

2.6 **Étude préliminaire de la composition de l'enrichissement A - Hytrel**

2.6.1 *Isolement des souches*

Afin de représenter le plus justement la diversité phénotypique des isolats présents dans l'enrichissement *A - Hytrel*, ainsi que dans le but de trouver un grand nombre de souches dégradant les estrogènes, quatre milieux de culture différents ont été employés. Il s'agit du milieu minéral ESM décrit précédemment, additionné toutefois d'agar et de 1 mg/L d'estrogènes, du milieu R2A (BBL), du milieu TSA (Tryptic Soy Agar) (BBL) et finalement d'une seconde version du milieu ESM auquel ont été

additionnés de l'agar, 1 mg/L d'estrogènes et 1 % (v/v) d'une solution de vitamines. À partir d'un échantillon de la phase aqueuse issue du septième repiquage de l'enrichissement *A - Hytrel*, différentes dilutions ont été effectuées (10^0 à 10^{-6}). Pour chaque dilution, 10 μ L ont été étalés sur des géloses des quatre milieux cités précédemment. Les géloses ont été incubées à 25°C durant 5 jours ou jusqu'à l'apparition de colonies. Chaque colonie présentant des caractéristiques phénotypiques distinctes a été repiquée à trois reprises. Les colonies ayant survécu à trois repiquages successifs ont été ensemencées en milieu TSB liquide (Tryptic Soy Broth) (BBL) et incubées pendant 12 heures à 37°C et à 150 rpm. Pour chaque isolat ensemencé, 500 μ L de culture ont été déposés dans des tubes cryogéniques (Fisher Scientific, ON, CA) stériles contenant 500 μ L d'une solution de 50 % de glycérol et entreposés à - 80°C. Un second aliquote de 500 μ L des cultures décrites précédemment a été utilisé afin d'en extraire l'ADN (voir section 2.6.2).

2.6.2 *Extraction d'ADN par billes de verre*

Chaque échantillon d'isolat issu des cultures bactériennes liquides ont été centrifugés 5 minutes à 13 000 rpm afin d'éliminer le surnageant. Le culot bactérien, a par la suite été suspendu de nouveau dans 250 μ L de tampon TEN (Tris HCL 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0) et transféré dans un tube de 1.5 mL contenant 250 mg de billes de verres stériles auquel ont été additionné 500 μ L d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Le broyage des cellules bactériennes a ensuite été effectué en déposant les tubes dans un homogénéisateur (FastPrep FP120-115, Thermo Savant, GMI, Ramsey, MN, É - U) pour une période de 20 secondes à vitesse 4.0. Cette dernière étape a été effectuée deux fois avec une période d'attente de 5 minutes entre chaque homogénéisation. Au cours de cette période d'attente les échantillons ont été conservés sur glace. Les tubes ont ensuite été centrifugés 15 minutes à 13 000 rpm afin de séparer les débris cellulaires de l'ADN. La phase supérieure contenant l'ADN a par la suite été prélevée et déposée dans un tube stérile contenant 500 μ L d'une solution de chloroforme/alcool isomylique (49/1). Le tout a été mélangé par inversion et soumis à une centrifugation d'une minute à 13 000 rpm. Un volume de 300 μ L de la phase supérieure a été prélevé et transféré dans un tube comprenant 600 μ L et 75 μ L d'acétate

d'ammonium (10 M). L'ensemble des tubes ont été déposés à - 20°C pour un minimum de 30 minutes pour permettre la précipitation de l'ADN puis centrifugés à 13 000 rpm pendant 15 minutes. Les culots ont par la suite été lavés en ajoutant 500 µL d'éthanol 70 % (v/v) et en centrifugeant 2 minutes à 13 000 rpm. Les échantillons ont ensuite été séchés à l'air libre afin d'enlever toutes traces d'éthanol et suspendus de nouveau dans 50 µL d'eau milli-Q stérile. L'efficacité des extractions d'ADN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (voir section 2.6.3). La concentration de l'ADN extrait a également été évaluée par densité optique (D.O.) à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies Inc, DE, É - U) à 260 nm. Suite à la concentration dosée, les échantillons d'ADN sont dilués à l'aide d'eau milli-Q afin d'obtenir une concentration de 25 ng/µL essentielle à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (voir section 2.6.4).

2.6.3 *Électrophorèse sur gel d'agarose*

La qualité des extraits d'ADN a été testée sur gel d'agarose UltraPure™ 1 % (Invitrogen, Carlsbad, CA, É - U). Le gel a été réalisé en dissolvant l'agarose UltraPure dans du tampon TAE 1X (1 mM EDTA, 40 mM Tris-acétate pH 8.0) et le tout a été déposé dans un moule muni d'un peigne afin de permettre au gel de polymériser. Le gel a ensuite été déposé dans une cuve à électrophorèse (Bio-Rad Laboratories Inc, CA, É - U) renfermant du tampon TAE 1X. À 5 µL de chaque échantillon d'ADN testé ont été ajoutés 2 µL d'un tampon de chargement constitué de 30 % (v/v) de glycérol, 0.25 % (p/v) de xylène cyanol (Sigma-Aldrich) et de 0.25 % de bleu de bromophénol (Sigma-Aldrich). Les échantillons d'ADN ont ensuite été chargés dans les puits du gel. En plus des échantillons, 5 µL d'un marqueur de poids moléculaire de type λ *Sty* I ont été ajoutés dans un des puits du gel. Ce marqueur est issu de la digestion de l'ADN total du phage lambda par l'enzyme de restriction *Sty* I générant sur gel des fragments d'ADN de tailles distinctes qui nous permettent d'associer la taille de nos fragments d'ADN à une valeur spécifique en paire de bases. L'appareil à électrophorèse a ensuite été mis sous tension à 90 Volts pour une période de 60 minutes afin de permettre à l'ADN de migrer. Suite à la migration le gel a été déposé dans une solution de bromure d'éthidium et agité pendant 10 minutes afin de permettre au bromure d'éthidium de pénétrer dans le gel et de

s'intercaler entre les deux brins d'ADN. Cet agent intercalant, devient fluorescent sous les rayons U.V. permettant ainsi de visualiser l'ADN. Les fragments d'ADN ont donc été visualisés grâce au system AlphaImager™ 3400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, É - U) combiné à l'appareil Bio-Rad gel-Doc (modèle 1000, Bio-Rad, Hercules, CA, É - U).

2.6.4 Amplification des gènes de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S

Les gènes ARNr 16S issue de l'ADN extrait de chaque isolat ont été amplifiés par l'intermédiaire d'une réaction de PCR. Chaque réaction a été effectuée en ajoutant 2 µL d'ADN d'une concentration de 25 ng/µL, à 48 µL d'un mélange réactionnel comprenant 5 µL de tampon Taq 10 X (GE healthcare), 1 µL de dNTPs 10 X (GE healthcare), 1 µL de l'amorce 2F-YM (5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG -3'), 1 µL de l'amorce pH (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA -3'), 1 µL d'albumine de sérum bovin (BSA) 20 µg/µL, 0.5 µL de Taq polymérase (5U/µL, GE Healthcare) et 38.5 µL d'eau milli-Q stérile. L'amplification a été rendue possible en utilisant l'appareil GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystem, CA, É - U) combiné au programme représenté à la figure 6. L'efficacité de la réaction d'amplification a par la suite été vérifiée sur gel d'agarose 1 % (voir section 2.6.3).

1 cycle			30 cycles			1 cycle
80°C	94°C	55°C	72°C	94°C	55°C	72°C
2 mins	5 mins	5 mins	45 secs	45 secs	45 secs	10 mins

Figure 6. Représentation graphique du programme utilisé pour l'amplification de l'ADNr 16S des isolats issus de l'enrichissement *A-Hytrel*.

2.6.5 Séquençage des gènes ARNr 16S des isolats de l'enrichissement *A-Hytrel*

Tous les amplicons issus de l'amplification par PCR décrite à la section précédente ont été séquencés au Centre d'Innovation Génome Québec. Seule l'amorce 2f-YM a été utilisée au cours du séquençage. Grâce à cette amorce, environ 1000 nucléotides du gène ont été séquencés. Les séquences obtenues ont par la suite été

corrigées avec l'aide du logiciel Chromas version 2.0 et comparées à celles contenues dans la banque de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) par l'intermédiaire de l'application blastn. Cet outil compare les séquences soumises aux séquences contenues dans la base de données et calcule de façon statistique l'importance de l'appariement des séquences. Chaque séquence soumise a été associée à un genre particulier. Les isolats appartenant à des genres différents ont été choisis afin d'évaluer leur capacité à dégrader les estrogènes (voir section 2.7).

2.7 Évaluation du rendement de biodégradation des modulateurs endocriniens

2.7.1 Test de dégradation

Un test de dégradation a été effectué afin d'évaluer si les différents consortiums sélectionnés au cours des enrichissements possédaient la capacité de dégrader les molécules à l'étude. Ce même test a également été utilisé pour évaluer la capacité des différents isolats sélectionnés à la section 2.6.5 à dégrader les estrogènes. Pour ce faire, les biomasses de chaque enrichissement issues du onzième repiquage, conservées à -80°C, ont étéensemencées sur des géloses TSA contenant 1 mg/L de chaque modulateur associé à leur enrichissement respectif (voir Tableau 16). Cette étape a également été effectuée pour chaque isolat sélectionné de l'enrichissement *A-Hytrel*.

Tableau 16. Composition des géloses TSA employées pour l'ensemencement des enrichissements et des isolats sélectionnés pour le test de dégradation.

Type de milieu	Concentration de chaque modulateur (mg/L)	Ensemencements concernés par le type de milieu
TSA + estrogènes	1	<i>A- Huile de silicone</i> <i>A- Hytrel</i> Isolats de l'enrichissement <i>A-Hytrel</i>
TSA + Bisphénol A	1	<i>B-Huile de silicone</i> <i>B-Hytrel</i>
TSA + estrogènes + Bisphénol A	1	<i>D-Huile de silicone</i> <i>D-Hytrel</i>

L'ensemble des géloses ont été incubées à 25°C, dans l'obscurité pour une période de 3 à 5 jours. Une colonie de chaque gélose a été sélectionnée et ensemencée dans 3 mL de milieu TSB additionné de 1 mg/L de modulateurs. Ces ensemencements ont servi de pré-cultures. Ces dernières ont été incubées une nuit à 37°C, à 150 rpm. Les étapes suivantes ont été effectuées en triplicata. À partir des pré-cultures, des cultures de chaque enrichissement et de chaque isolat ont été démarrées avec une D.O. à 600 nm de 0.01, dans un volume de 12 mL de milieu TSB additionné de modulateurs endocriniens présentant la même composition que celle employée sur gélose (voir Tableau.16). Ces cultures ont été soumises à une incubation de 4 jours, à 25°C, à 150 rpm dans l'obscurité. Un échantillon stérile de chacun des milieux (TSB + estrogènes, TSB + Bisphénol A et TSB + estrogènes + bisphénol A) a été conservé à 4°C comme temps zéro. Des contrôles négatifs de chaque milieu ont également été réalisés en incubant 12 mL de chaque milieu avec les cultures décrites précédemment. Suite à la période d'incubation, les modulateurs endocriniens résiduels ont été extraits de chaque échantillon afin d'évaluer le rendement de dégradation de ces derniers. Les extractions ont été réalisées par la méthode d'extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle (voir section 2.1.3.1.3). Les extraits ont par la suite été analysés CG-SM (voir section 2.1.1 et 2.1.2).

3 RÉSULTATS

3.1 Analyse des modulateurs endocriniens par CG-SM

3.1.1 Méthode au CG-SM

J'ai établi une méthode fiable et sensible pour quantifier les différents modulateurs à l'aide du CG-SM. Le chromatogramme du décompte total des ions (*total ion count*; TIC) des modulateurs endocriniens et des standards internes dérivés d'une solution de standards de 25 mg/L est présenté à la figure 7. Une bonne séparation des composés à l'étude a pu être obtenue sous les conditions expérimentales utilisées (voir section 2.4.4). La séquence d'élution des dérivés des modulateurs endocriniens a suivi généralement l'ordre de leur poids moléculaire, sauf pour le bisphénol A et l'estrone. Toutefois, il a été impossible d'observer la séparation entre les modulateurs et leur forme deutérée. Ce dernier point n'est cependant pas un problème, puisque pour chaque composé à l'étude, la molécule et sa forme deutérée possédaient un ion quantitatif distinct. Le 4-n-nonylphénol a donc été le premier composé à être élué avec un temps de rétention de 12.98 minutes. Quelques minutes plus tard, le bisphénol A sortait à son tour avec un temps de rétention de 15.78 minutes. Les quatre composés appartenant à la classe des estrogènes étaient les derniers à être élués avec des temps de rétention variant entre 20.60 et 23.62 minutes. De plus, il a été facile d'observer que les estrogènes présentaient des signaux de réponse distincts même si ces derniers possédaient des structures chimiques extrêmement similaires entre elles et qu'une concentration identique de 25 mg/L a été employée. La détection de l'estrone était moins sensible en présentant une sensibilité de six fois inférieure à la sensibilité moyenne obtenue pour le 4-n-nonylphénol, le bisphénol A, l'estradiol et le 17- α -éthynylestradiol. L'estriol a démontré la plus importante sensibilité avec une abondance relative près de 100.

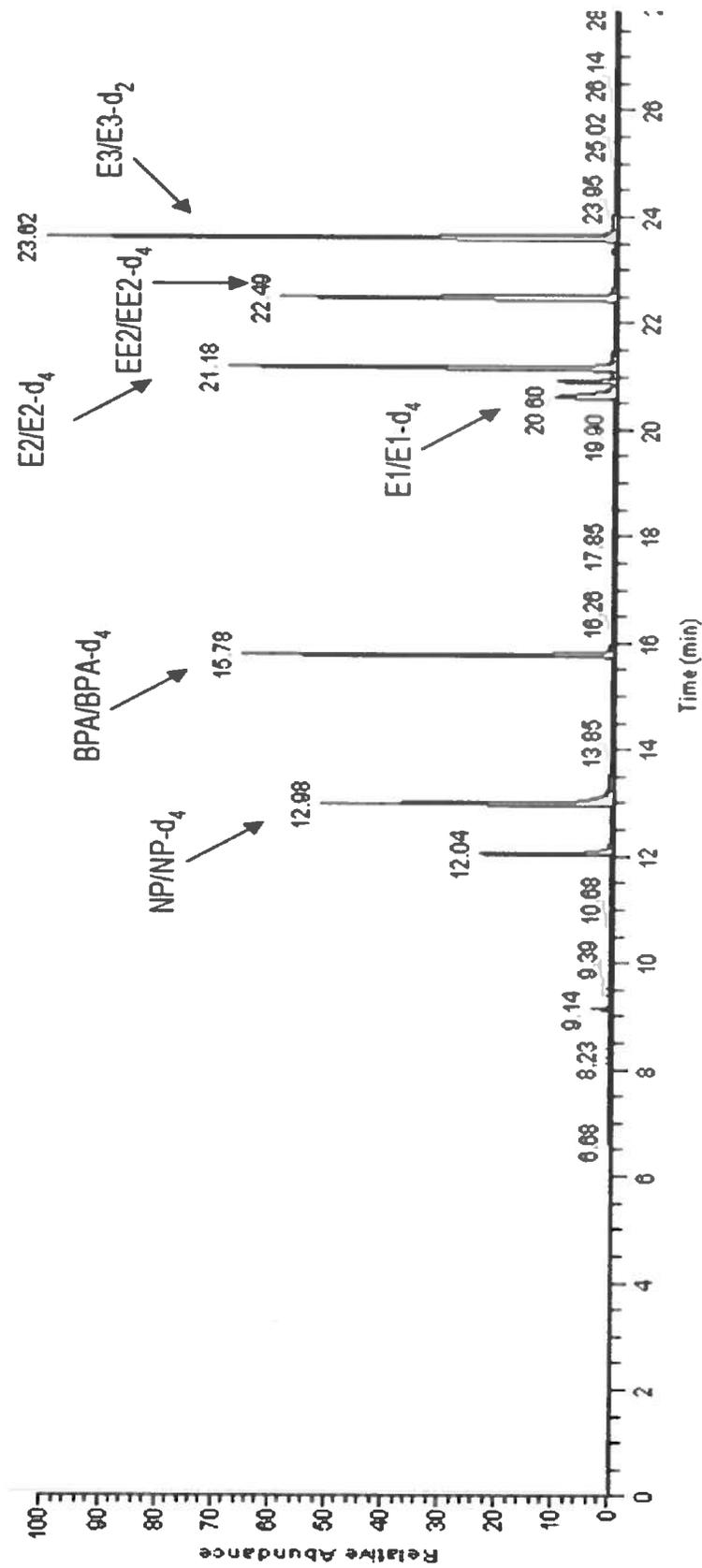


Figure 7: Chromatogramme du décompte total des ions (TIC) d'une solution standard contenant 25 mg/L des modulateurs endocriniens dérivés et de leur standard internes. La solution standard a été directement analysée sous les conditions décrites à la section 2.1.2.

3.1.2 Évaluation de la limite de quantification

Au cours du projet, des courbes standards de chaque composé à l'étude ont été effectuées avec l'aide de solutions standards de concentrations variant entre 0.0005 mg/L et 100 mg/L (Figure 8). Les données de régression linéaire sont résumées au sein du tableau 17. Pour l'ensemble des composés, les coefficients de détermination (r^2) obtenus étaient tous supérieurs à 0.9948 indiquant une excellente linéarité des courbes de calibration. La limite de quantification établie reposait sur la concentration pour laquelle la valeur du ratio de l'aire du composé multipliée par la concentration du standard interne sur l'aire du standard interne présentait un écart entre triplicata inférieur à 30 %. Les limites de quantification obtenues pour l'ensemble des composés variaient entre 0.0005 et 0.05 mg/L (Tableau 17). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour la sensibilité. L'estriol présentait une limite de quantification 10 fois plus élevée que le bisphénol A et l'estradiol, et 100 fois plus élevée que l'estrone, le 17- α -éthynylestradiol et le 4-nonylphénol. Les courbes standards effectuées ont seulement servi à la mise au point de la méthode par CG-SM ainsi qu'à l'évaluation de la limite de quantification de chaque composé. L'évaluation des concentrations des différentes molécules contenues dans les échantillons aux cours des expériences a toutefois été effectuée sur la base de l'usage de différents standards internes deutérés associés à chaque molécule à l'étude et en effectuant le calcul suivant :

$$\text{Concentration du M.E} = \frac{\text{Aire sous la courbe du M.E} * \text{Concentration du standard M.E- d}_4}{\text{Aire sous la courbe du standard M.E- d}_4}$$

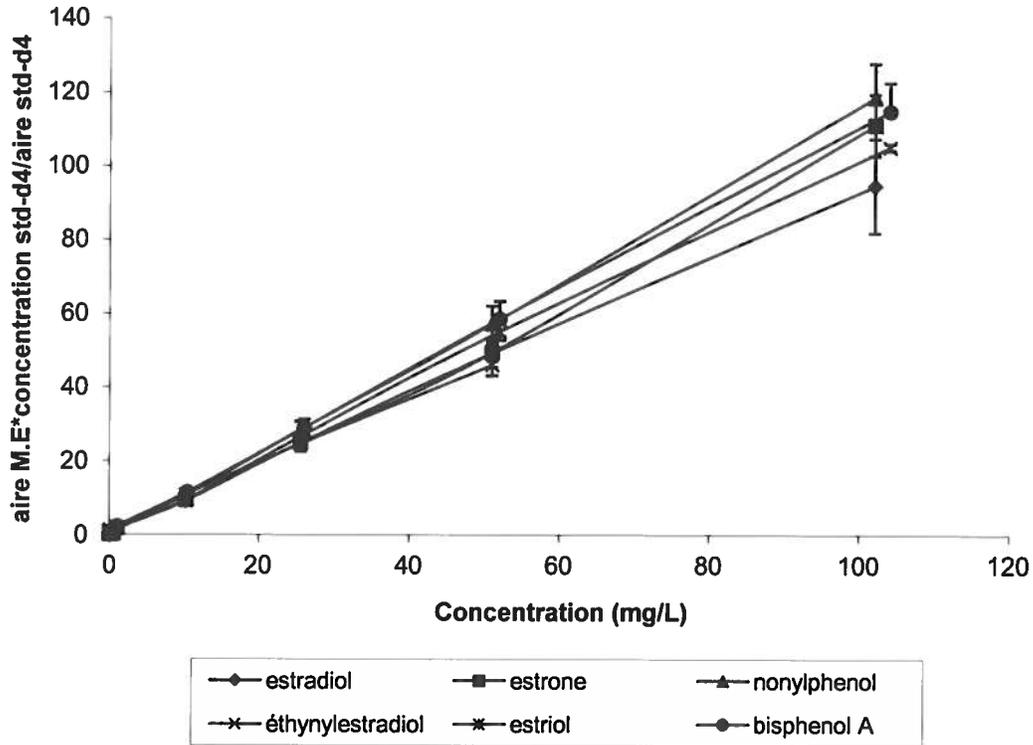


Figure 8: Courbes de calibrations des différents composés à l'étude établies par l'intermédiaire de solutions standards de concentrations variant entre 0.0005 mg/L et 100 mg/L. Les standards ont été analysés selon la méthode décrite à la section 2.1.2.

Tableau 17. Paramètres de régression linéaire des courbes de calibration et les limites de quantification des différents composés selon la méthode de CG-SM développée.

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Pente	Coefficient de détermination (r^2)	Limite de quantification (mg/L)
E1	1.0623	0.9965	0.05
E2	0.9389	0.9995	0.005
E3	0.8453	0.9948	0.0005
EE2	1.0229	0.9993	0.05
NP	1.1549	0.9995	0.05
BPA	1.1113	0.9998	0.005

3.2 Étude comparative du rendement d'extraction obtenu par différente cartouche d'extraction en phase solide

Afin d'optimiser la procédure d'extraction mise au point pour extraire les composés à l'étude de l'huile de silicone, différentes phases stationnaires ont été évaluées. En utilisant les mêmes solvants d'extraction, trois différents types de cartouche ont été testées afin d'évaluer leur efficacité d'extraction: EnviChrom P (500 mg/6 mL, Supelco, Bellefonte, É - U), Oasis HLB (500 mg/6 mL, Waters, Milliford, É - U) et Sep-pak (500 mg/6 mL, Waters, Milliford, É - U). Trois composés (EE, BPA, NP) sur les six étudiés ont été choisis afin de représenter chacune des deux familles de composés à l'étude soit : les estrogènes et les alkylphénols. Une concentration de 10 mg/L de chaque composé a été bullée dans 3 mL d'huile de silicone. Un volume d'un millilitre a été extrait suivant la méthode d'extraction en phase solide décrite précédemment (voir section 2.1.3.2.1). Les analyses par CG-SM (Figure 9) ont montré que la cartouche Oasis HLB présente des rendements de récupération supérieurs à 96 % et ce pour les trois molécules testées (EE2 : 107 ± 10 %, BPA : 96 ± 6 %, NP : 97 ± 3 %). La cartouche EnviChrom-P a présenté une bonne récupération du 17- α -éthynylestradiol (92 ± 12 %) et du bisphénol A (101.8 ± 0.2 %). Toutefois, cette phase stationnaire n'a montré aucune affinité pour le 4-n-nonylphénol puisque le pourcentage de récupération obtenu pour ce composé était négligeable (0.18 ± 0.03 %). La phase stationnaire associée à la cartouche Sep-pak était la moins adaptée à l'extraction des composés à l'étude puisqu'elle a montré pour les trois composés testés les plus faibles pourcentages de récupération des trois cartouches (EE2 : 24 ± 3 %, BPA : 90 ± 4 %, NP : 0.14 ± 0.01 %).

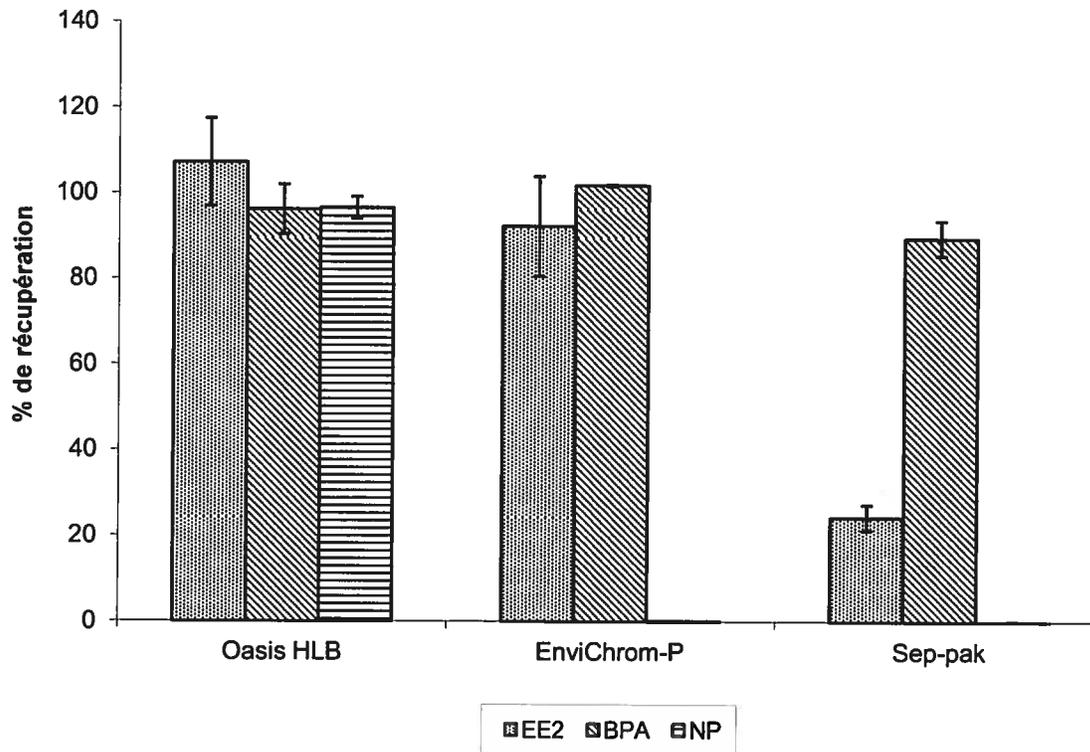


Figure 9: Pourcentages de récupération du 17- α -éthynylestradiol, du bisphénol A et du 4-n-nonylpénol contenus dans l'huile de silicone en utilisant différents types de cartouches d'extraction en phase solide (SPE).

3.3 Solubilité maximale des modulateurs dans les phases hydrophobes

Dans le système à deux phases immiscibles mis au point, les phases hydrophobes jouent le rôle de réservoir en contenant les modulateurs endocriniens. Il est donc important de déterminer la quantité maximale de chaque composé que peut contenir l'huile de silicone et l'Hytrel.

3.3.1 Solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l'huile de silicone

La solubilité des six composés dans l'huile de silicone a été déterminée individuellement et en combinaison afin d'évaluer la capacité de la phase hydrophobe à solubiliser de façon préférentielle certains composés. Le tableau 18 montre individuellement ou ensemble que l'estrone, l'estradiol, l'estriol et le bisphénol A étaient de 1.61 à 147 fois plus soluble dans l'eau que dans l'huile de silicone. Toutefois, pour le

17- α -éthynylestradiol et le 4-n-nonylphénol, nous avons observé le contraire. Ces composés étaient respectivement de 6.1 à 657 fois plus soluble dans l'huile de silicone que dans l'eau. Il a été également noté qu'au cours de cette expérience la solubilité maximale du 4-n-nonylphénol n'a pas pu être établie. Initialement, une concentration de 1000 mg/L de ce composé a été testée de façon individuelle et combiné afin d'en évaluer la solubilité maximale. Il s'est avéré que pour les deux paramètres testés, cette concentration a été complètement solubilisée dans 5 mL d'huile de silicone. Aucune distinction de solubilité apparente n'était visible entre les échantillons individuels et combinés. Une concentration de 3000 mg/L a par la suite été testée uniquement de façon individuelle afin d'évaluer si cette concentration excessive était soluble dans cette phase hydrophobe. Tel que présenté au tableau 18, cette concentration s'est avérée complètement soluble dans l'huile de silicone. Nous avons constaté également que la solubilité du bisphénol A diminue de 1.5 fois lorsque ce dernier a été mis en présence des autres composés. L'effet contraire a été toutefois observé pour l'estriol où la présence des cinq autres composés a nettement favorisé sa solubilité qui est près de sept fois supérieure à celle obtenue individuellement.

Tableau 18 : Solubilité des modulateurs endocriniens dans l'huile de silicone

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Solubilité dans l'eau ^a 25 °C (µg/g)	Solubilité dans l'huile de silicone (µg/g)	
		Individuellement	Ensemble ^b
E1	12.4	2.14 ± 0.01	2.08 ± 0.18
E2	12.96	1.42 ± 0.05	1.14 ± 0.10
E3	13.25	0.09 ± 0.04	0.62 ± 0.19
EE2	4.83	31.23 ± 0.53	29.63 ± 2.85
NP	5.43	3563.46 ± 404.51 ^c	1151.28 ± 30.18
BPA	120	74.68 ± 2.43	50.09 ± 1.64

^a Issu de (Lintelmann et al. 2003). ^b Les six modulateurs endocriniens ont été dissous ensemble dans l'huile de silicone. ^c Cette concentration ne représente pas la valeur de solubilité maximale du 4-n-nonylphénol dans l'huile de silicone mais bien la concentration maximale testée.

3.3.2 Solubilité maximale des modulateurs endocriniens dans l'Hytrel

Tout comme pour l'huile de silicone, la solubilité des six modulateurs endocriniens à l'étude a été évaluée de façon individuelle et combinée dans l'Hytrel. Pour ce faire, 3.53 g d'Hytrel ont été incubés dans des solutions de méthanol comprenant une concentration de 1000 mg/L de chacun des composés. Un temps d'incubation de 4 jours sous une agitation continue de 150 rpm a été alloué aux échantillons afin d'atteindre une saturation maximale des modulateurs à l'intérieur du polymère. Les modulateurs ont été extraits et analysés selon les méthodes décrites aux sections 2.1.3.2.2, 2.1.1 et 2.1.2. Les valeurs présentées dans le tableau 19 démontrent que toutes manières confondues (individuellement ou ensemble) les six composés sont de 5.18 à 138 fois plus solubles dans l'Hytrel que dans l'eau. On constate également pour le 4-n-nonylphénol et le bisphénol A une faible augmentation de solubilité lorsque ces derniers étaient en présence des autres modulateurs.

Tableau 19: Solubilité des modulateurs endocriniens dans l'Hytrel

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Solubilité dans l'eau ^a 25 °C (µg/g)	Solubilité dans l'Hytrel (µg/g)	
		Individuellement	Ensemble ^b
E1	12.42	590 ± 35	577 ± 19
E2	12.96	661 ± 30	611 ± 44
E3	13.25	514 ± 33	452 ± 20
EE2	4.83	666 ± 48	571 ± 30
NP	5.43	438 ± 4	549 ± 31
BPA	120	621 ± 16	705 ± 42

^a Issu de (Lintelmann et al. 2003). ^b Les six modulateurs endocriniens ont été dissous ensemble dans l'Hytrel.

3.4 Détermination de la capacité de relargage des modulateurs endocriniens en système biphasique

L'étude du dynamisme entre les deux phases impliquées dans le système est un aspect primordial du projet. Puisque les microorganismes se retrouvent dans la phase aqueuse et que les modulateurs endocriniens représentant leur source de carbone primaire sont contenus dans la phase hydrophobe, il est important d'évaluer la capacité avec laquelle ce genre de composés peuvent diffuser d'une phase à l'autre.

L'expérience mise au point pour évaluer la capacité de relargage de chaque modulateur endocrinien compris dans l'Hytrel de façon individuelle et combinée est composée de trois étapes. Il s'agit des étapes suivantes : du chargement des modulateurs endocriniens dans l'Hytrel, du démarrage du système biphasique et de l'analyse des deux phases suite au relargage.

Afin d'évaluer la capacité avec laquelle les billes d'Hytrel sont aptes à relarguer les modulateurs emmagasinés dans la phase aqueuse, 3.53 g de polymère ont été chargés à l'aide d'une solution de méthanol contenant de façon individuelle ou collective 500 mg/L de chaque composé à l'étude. Cette étape a été suivie d'une période d'équilibration en système biphasique comprenant 20 mL d'eau milli-Q soumise à une agitation constante de 150 rpm pour une période de 4 jours. La concentration des composés ayant demeurés dans l'Hytrel ainsi que la concentration des composés relargués en phase aqueuse ont été évaluées par CG-SM et résumées au sein du tableau 20. Le test a été effectué avec chaque modulateur de manière individuelle et ensemble afin d'évaluer si l'Hytrel possède une capacité de relargage préférentielle pour certains composés. Le tableau 20 montre que pour l'ensemble des composés (individuellement ou ensemble) plus de 99 % de la concentration initialement contenue dans l'Hytrel est demeurée dans cette phase suite à l'équilibration du système biphasique. Une très faible proportion a donc été libérée en phase aqueuse. Les concentrations relarguées dans la phase aqueuse variaient entre $0.003 \pm 0.003 \mu\text{g/g}$ et $3.160 \pm 0.137 \mu\text{g/g}$. Ces valeurs sont de 3.93 à 1810 fois inférieures à la solubilité maximale de chaque composé dans l'eau. Le relargage des modulateurs en phase aqueuse n'a donc pas été limité par leur solubilité dans l'eau. Nous avons pu également constater que le chargement de l'ensemble des composés dans l'Hytrel a influencé sur la capacité de relargage de certains de ceux-ci. Ce fut le cas pour l'estrone et le 4-n-nonylphénol, où nous avons observé une baisse respective de 14.56 et de 2.33 fois de la concentration relâchée en phase aqueuse lorsque ces derniers étaient combinés au cinq autres modulateurs. L'estrone a été le composé le plus affecté par la présence des autres modulateurs en présentant une diminution importante de sa concentration en phase aqueuse qui est passé de $3.160 \pm 0.137 \mu\text{g/g}$ (individuellement) à $0.217 \pm 0.006 \mu\text{g/g}$ (ensemble). Le 4-n-nonylphénol a été 2.33 fois

moins apte à être relargué en phase aqueuse lorsque combiné avec les autres composés. Même si cette baisse est moins significative que pour l'estrone, cette dernière est toutefois importante si l'on tient compte de la très faible concentration en phase aqueuse obtenue pour ce même composé de manière individuelle ($0.007 \pm 0.002 \mu\text{g/g}$).

Tableau 20: Capacité de relargage des modulateurs endocriniens dans l'eau à partir de l'Hytrel

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Individuellement				Ensemble ^b			
	% Résiduel dans l'Hytrel	% Relargué en phase aqueuse	Concentration en phase aqueuse (µg/g)	Solubilité dans l'eau ^a 25 °C (µg/g)	Concentration en phase aqueuse (µg/g)	% Relargué en phase aqueuse	Concentration en phase aqueuse (µg/g)	% Résiduel dans l'Hytrel
E1	98.281 ± 0.028	1.719 ± 0.028	3.160 ± 0.137	12.42	0.217 ± 0.006	0.112 ± 0.008	0.217 ± 0.006	99.888 ± 0.008
E2	99.934 ± 0.001	0.066 ± 0.001	0.138 ± 0.003	12.96	0.154 ± 0.003	0.074 ± 0.003	0.154 ± 0.003	99.926 ± 0.003
E3	99.643 ± 0.026	0.357 ± 0.026	0.978 ± 0.027	13.25	0.798 ± 0.060	0.296 ± 0.033	0.798 ± 0.060	99.704 ± 0.033
EE2	99.974 ± 0.004	0.026 ± 0.004	0.051 ± 0.001	4.83	0.058 ± 0.004	0.026 ± 0.002	0.058 ± 0.004	99.974 ± 0.002
NP	99.997 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.007 ± 0.002	5.43	0.003 ± 0.003	0.001 ± 0.001	0.003 ± 0.003	99.999 ± 0.001
BPA	99.965 ± 0.002	0.035 ± 0.002	0.079 ± 0.004	120	0.088 ± 0.003	0.036 ± 0.001	0.088 ± 0.003	99.964 ± 0.001

^a Issu de (Lintelmann et al. 2003). ^b Les six modulateurs endocriniens ont été chargés ensemble dans l'Hytrel.

3.5 Détermination du coefficient de partition des différents modulateurs endocriniens

Le coefficient de partition des différents modulateurs endocriniens entre l'Hytrell et l'eau a été caractérisé afin de confirmer d'avantage la compétence de l'Hytrell comme phase de relargage.

Les coefficients de partition des différents composés à l'étude face à l'Hytrell ont été évalués en exposant 1.059 g d'Hytrell à 60 mL de phase aqueuse comprenant trois concentrations différentes de chaque modulateur. L'ensemble des systèmes biphasiques ont été incubés 4 jours, sous une agitation constante de 150 rpm et à 25°C afin de permettre aux modulateurs de se partitionner à l'équilibre entre les deux phases testées. Les concentrations de chaque composé contenues dans les deux phases après équilibration ont été déterminées par CG-SM. Les coefficients de partition ont été établis comme étant la pente du graphique de la concentration du composé contenu dans l'Hytrell en fonction de la concentration résiduelle du même composé dans la phase aqueuse. Le volume d'Hytrell a été calculé en divisant la masse de polymère employé (1.059 g) par sa densité (1170 g/L, (Gao et al. 2009)). Tel que présenté à la figure 10, un haut niveau de linéarité a été obtenu pour les six modulateurs à l'étude et ce face aux trois concentrations testées. Ces résultats démontrent donc qu'en augmentant la concentration de chaque composé dans la phase aqueuse, nous avons obtenu une relation linéaire correspondant à une augmentation dans la capacité de chargement du polymère. Le tableau 21 montre les valeurs de coefficient de partition obtenues pour les différents composés sous forme logarithmique ($\text{Log } K_{s/w}$) ainsi que les valeurs théoriques du logarithme du coefficient de partition octanol-eau ($\text{Log } K_{o/w}$) de chacun de ceux-ci. Les valeurs de coefficient de partition obtenues variaient de 2.30 à 5.11.

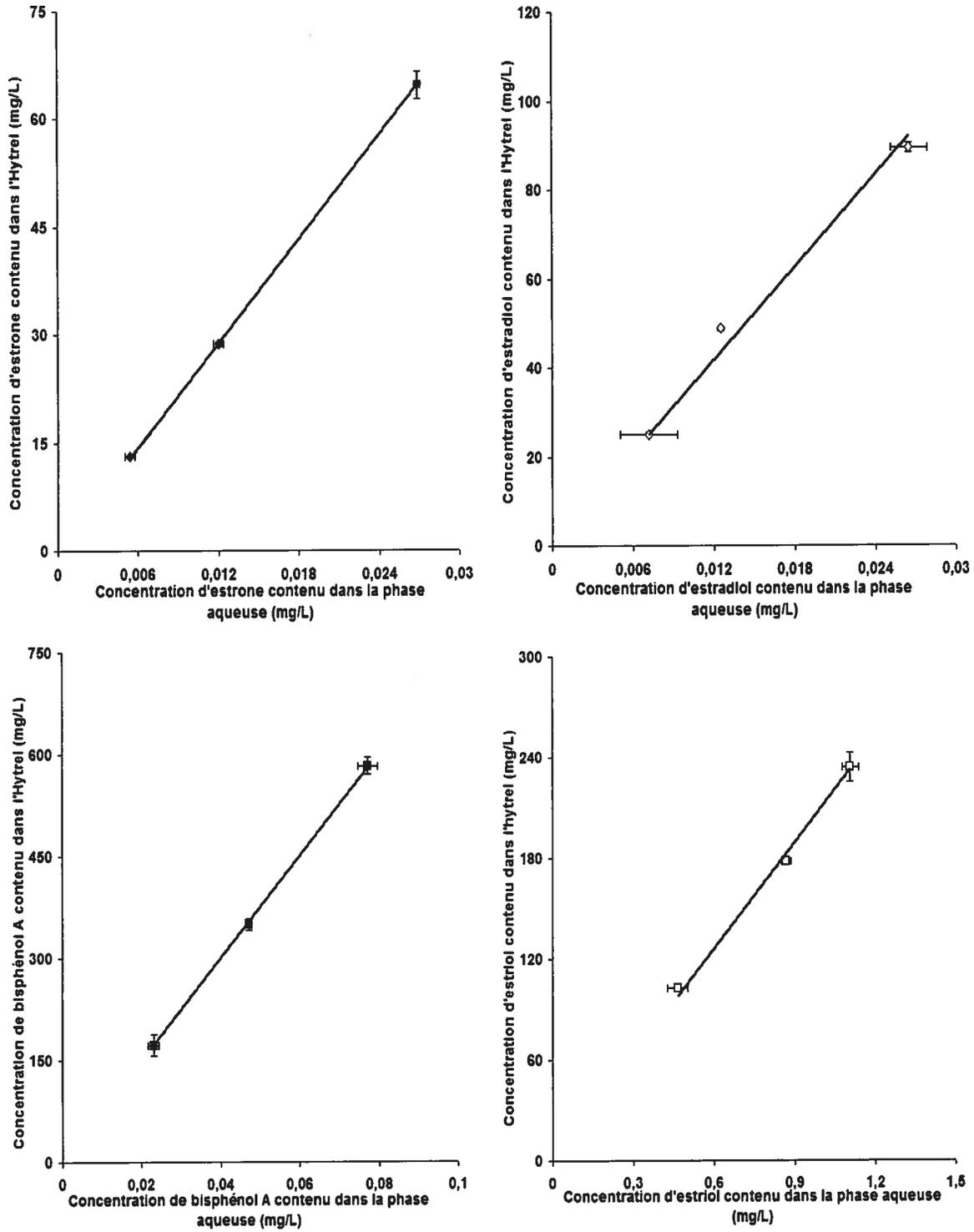


Figure 10 : Graphiques des concentrations contenues dans l'Hytreil en fonction des concentrations résiduelles en phase aqueuse obtenus pour les six modulateurs à l'étude.

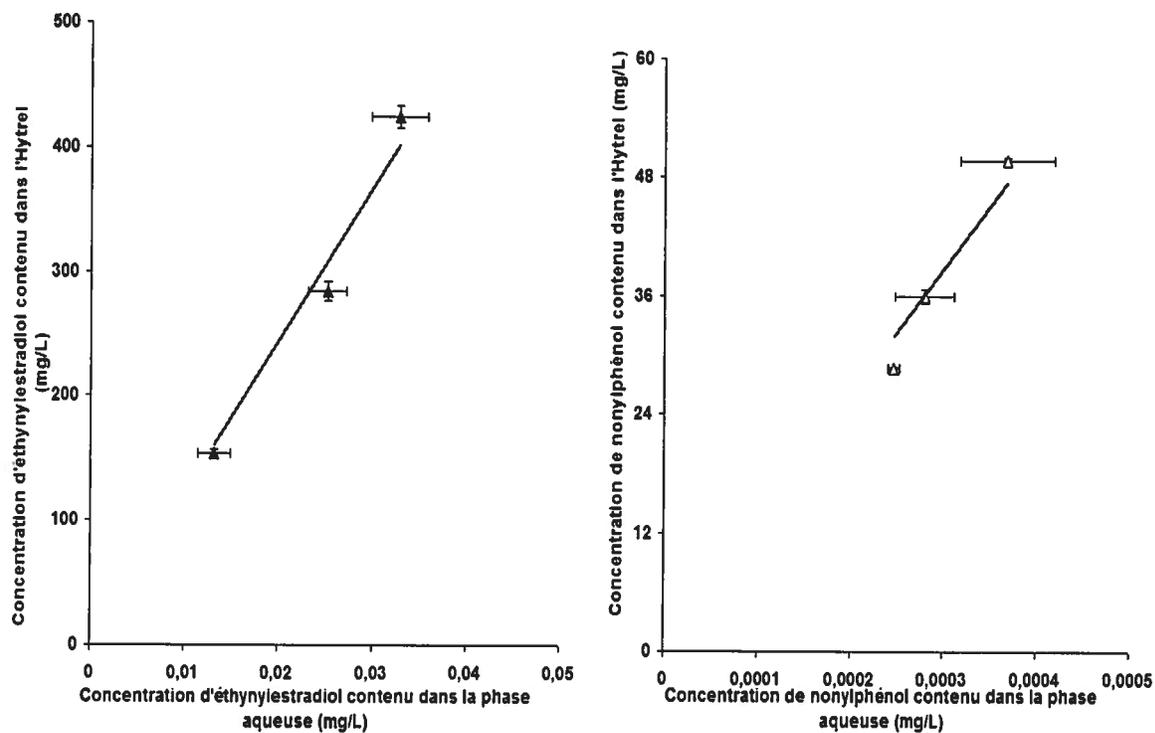


Figure 10 (suite): Graphiques des concentrations contenues dans l’Hytrel en fonction des concentrations résiduelles en phase aqueuse obtenus pour les six modulateurs à l’étude.

Tableau 21: Coefficients de partition des modulateurs endocriniens dans l’Hytrel

Modulateurs endocriniens (M.E.)	Log $K_{s/w}$ ^a	Log $K_{o/w}$ ^b
E1	3.38	3.13
E2	3.54	4.01
E3	3.88	2.45
EE2	2.30	3.67
NP	4.09	4.48
BPA	5.11	3.4

^a Issu du logarithme de la pente de chaque droite représentée à la figure 10 ^b Issu de (Lintelmann et al. 2003).

3.6 Enrichissements de consortiums microbiens dégradant les M.E. et isolement de souches bactériennes

Un des objectifs de ce projet était de développer une microflore adaptée au modèle du système à deux phases immiscibles à l'étude et capable de dégrader les modulateurs endocriniens comme principale source de carbone. Pour ce faire, six enrichissements ont été effectués dans un milieu minéral (ESM) supplémenté avec différentes combinaisons des composés à l'étude. L'efficacité de dégradation des différentes microflores sélectionnées a été évaluée. La diversité microbienne d'un enrichissement en particulier (*A-hytrel*) a été également étudiée.

3.6.1 Caractérisation du consortium bactérien A-Hytrel

Vu l'important nombre d'enrichissements ainsi que le temps restreint du projet, seule la diversité biologique de l'enrichissement *A - Hytrel* a été évaluée. Cet enrichissement a été choisi en particulier, dû à la turbidité importante que présentait la phase aqueuse suite à 30 jours d'incubation et ce à chaque passage.

La méthode d'isolement sur gélose a été employée afin d'isoler les différentes souches bactériennes comprises dans l'enrichissement *A-Hytrel*. Cet enrichissement renfermait une biomasse issue de trois sources distinctes (voir section 2.5.2) ainsi qu'une phase hydrophobe constituée d'Hytrel comprenant 100 mg/L d'estriol, d'estrone, de 17- α -éthynylestradiol et de 17- β -estradiol. Afin de représenter le plus justement la diversité phénotypique du consortium, quatre différents milieux de culture ont été utilisés soit : un milieu riche TSA, un milieu minimal R2A et deux versions différentes du milieu minéral ESM. Aux milieux minéraux a été ajouté 1 mg/L de chaque estrogène à l'étude afin de favoriser la croissance bactérienne. Suite à trois repiquages successifs des colonies présentant des caractéristiques phénotypiques distinctes, l'ADN des isolats a été extrait et le gène de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S a été amplifié par PCR. Au total, 20 isolats ont été examinés. Le tableau 22 présente les résultats d'identification des différents isolats ainsi que leur pourcentage d'appariement à l'espèce la plus proche selon le programme BLASTn. Les 20 isolats analysés sont tous associés à quatre grands groupes soit : les firmicutes, les actinobactéries, les β et γ -protéobactéries. En présentant des

pourcentages d'homologie entre 93 et 100 %, les isolats ont pu également être associés aux cinq genres suivants : *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhodanobacter*, *Pusillimonas* et *Microbacterium*. Les sept isolats surlignés dans le Tableau 22 ont été sélectionnés afin d'évaluer leur potentiel de dégradation face aux estrogènes à l'étude. Le critère principal pour le choix des isolats du test de dégradation a été la diversité des genres. Toutefois, deux isolats (TSA-1, ESMV-1A) appartenant au genre *Bacillus* et deux isolats appartenant au genre *Rhodococcus* (ESM-1 et ESMV-3) ont été sélectionnés. Le choix des isolats TSA-1 et ESMV-1A reposait principalement dans le fait qu'il s'agissait peut-être de deux souches différentes puisque l'analyse BLASTn avait associé ces deux isolats respectifs aux souches G10 et tu10 de l'espèce *Bacillus nealsonii*. Les isolats ESM-1 et ESMV-3 semblaient tous deux être associés à l'espèce *Rhodococcus erythropolis*. Toutefois, ils ne présentent pas le même pourcentage d'homologie. Ce qui nous laisse croire, qu'il existe peut être certaines divergences entre les deux isolats. Nous avons estimé que les différences de souches ainsi que les divergences d'homologie entre isolats pourraient peut-être générer des différences au niveau de l'efficacité de dégradation des isolats.

Tableau 22 : Résultats d'identification des isolats issus de l'enrichissement *A-Hytrel*. L'identification a été réalisée par l'intermédiaire de l'analyse des séquences des gènes ARNr 16s avec la banque de données BLASTn.

Isolats	Identification (BLASTn)	Groupes	Identité (%)
TSA-1	<u>Bacillus nealsonii</u>	Firmicutes	99
TSA-2	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actinobactérie	99
TSA-3	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actinobactérie	99
TSA-4	<i>Rhodanobacter terrae</i>	γ -protéobactérie	99
TSA-6	<i>Rhodanobacter terrae</i>	γ -protéobactérie	100
TSA-7	<u>Pusillimonas noertemannii</u>	β -protéobactérie	96
R2A-1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Firmicutes	99
R2A-2	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actinobactérie	99
R2A-3	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actinobactérie	99
R2A-4	<u>Microbacterium schleiferi</u>	Actinobactérie	98
R2A-5	<u>Rhodanobacter lindaniclasticus</u>	γ -protéobactérie	93
R2A-6	<i>Rhodanobacter terrae</i>	γ -protéobactérie	99
R2A-7	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actinobactérie	99
R2A-8	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actinobactérie	99
ESM-1	<u>Rhodococcus erythropolis</u>	Actinobactérie	99
ESM-2	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actinobactérie	99
ESMV-1A	<u>Bacillus nealsonii</u>	Firmicutes	99
ESMV-1B	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actinobactérie	99
ESMV-2	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actinobactérie	99
ESMV-3	<u>Rhodococcus erythropolis</u>	Actinobactérie	97

% d'identité de la séquence des gènes ARNr 16S avec les espèces les plus apparentées

3.6.2 Évaluation du potentiel de dégradation des modulateurs endocriniens

Le potentiel de dégradation des consortiums bactériens issus du onzième repiquage de chacun des six enrichissements en cours ainsi que des sept isolats sélectionnés de l'enrichissement *A-Hytrel* a été évalué en milieu liquide. Le milieu sélectionné était un milieu riche TSB additionné d'une concentration initiale de 1 mg/L de chaque modulateur associé aux enrichissements respectifs (voir section 2.7.1). Toutefois, il est à noter que le potentiel de dégradation du 4-n-nonylphénol n'a pas été évalué au cours de ce test. L'efficacité de dégradation des cinq modulateurs restants a été évaluée suite à 4 jours d'incubation. La figure 11 présente les rendements de dégradation des estrogènes en $\mu\text{moles/L}$ des différents enrichissements comprenant ce genre de composés comme source de carbone c'est-à-dire les enrichissements appartenant aux classes A et D. En comparant les valeurs obtenues pour l'estradiol suivant les 4 jours d'incubation, nous avons observé que les enrichissements *A-Huile de silicone* et *A-Hytrel* présentaient des diminutions respectives de $33 \pm 4 \%$ et de $37 \pm 6 \%$ de la concentration initiale de l'estradiol. L'enrichissement *D-Huile de silicone* a présenté une légère hausse ($10 \pm 9 \%$) de la concentration d'estradiol par rapport au temps zéro. Toutefois, cette hausse était négligeable lorsqu'on tenait compte de l'écart-type, suggérant que cet enrichissement n'a pas dégradé l'estradiol. L'enrichissement *D-Hytrel* a été le plus performant des quatre puisqu'il a dégradé près de $61 \pm 5 \%$ de la concentration initiale d'estradiol. Les résultats obtenus pour la dégradation de l'estriol par les enrichissements appartenant aux classes A et D ont montré que l'estriol était difficilement dégradé par les consortiums puisqu'un seul des enrichissements soit : l'enrichissement *A-Hytrel* a présenté une dégradation significative de $25 \pm 2\%$. L'estrone était le seul des modulateurs pour certains enrichissements présentant des concentrations après 4 jours d'incubation supérieures à celles du temps zéro (Fig. 11). Les enrichissements *A-Hytrel* et *D-Hytrel* ont présenté respectivement des hausses significatives de $25.02 \pm 7.45 \%$ et $16.29 \pm 29.10 \%$. Ces hausses pourraient être attribuables à la transformation de l'estradiol, contenu initialement dans le milieu de culture, en estrone. Il s'agit de la première étape issue de la voie métabolique de l'estradiol employée par certains microorganismes répertoriés dans la littérature (Lee et al. 2002) Cette quantité d'estrone dérivant du métabolisme de l'estradiol s'ajouterait donc à la concentration initiale

d'estrone présente dans le milieu de culture pour donner une valeur supérieure à celle du temps zéro. Les enrichissements *A-Huile de silicone* et *D-Huile de silicone* ont présenté des résultats difficilement interprétables vu l'importance de leur écart-type, mais suggèrent fortement que ces derniers n'ont présenté aucune dégradation importante d'estrone. Des quatre composés à l'étude, le 17- α -éthynylestradiol a été la molécule la plus récalcitrante puisqu'aucun des enrichissements appartenant aux classes A et D n'abritaient des microorganismes capables de dégrader ce composé. Ce dernier énoncé est facilement constatable par l'absence d'une diminution de la concentration en 17- α -éthynylestradiol suite aux 4 jours d'incubation et ce pour les quatre enrichissements testés.

Les rendements de dégradation du bisphénol A obtenus par les enrichissements associés aux classes B et D et représentés à la figure 12 ont démontré que tout comme pour le 17- α -éthynylestradiol ce composé est difficilement dégradable par les différents consortiums enrichis au cours du projet. Les enrichissements *D-Huile de silicone*, *B-Huile de silicone* et *B-Hytrel* ont présenté des diminutions négligeables et respectives de 3 ± 1 %, de 4 ± 3 % et de 9.8 ± 0.3 %. L'enrichissement D-Hytrel a présenté une diminution modeste mais significative de 29 ± 7 %.

Les résultats obtenus par la dégradation des composés associés à la famille des estrogènes par les isolats issus de l'enrichissement *A-Hytrel* (Fig. 13) ont présenté certaines différences par rapport à ceux obtenus par la dégradation de ces mêmes composés par les différents enrichissements (voir Fig. 11). Pour l'estradiol, nous avons observé pour trois des isolats testés soit les isolats ESM-1, ESMV-3 et TSA-7 des augmentations respectives de 20 ± 2 %, de 21 ± 7 % et de 95 ± 4 %. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par les enrichissements où ces derniers ont présenté une absence ou une diminution de la concentration d'estradiol par rapport au temps zéro. Toutefois, cette tendance a été également observée chez quatre des sept isolats choisis soit les isolats ESMV-1A (59 ± 8 %), R2A-4 (61 ± 17 %), R2A-5 (35 ± 11 %) et TSA-1 (51 ± 7 %). Les isolats ont également dégradé plus efficacement l'estriol que les consortiums issus des enrichissements. Cinq des sept isolats ont montré une baisse

significative de la concentration d'estriol suite aux 4 jours d'incubation (Fig. 13). Il s'agissait des isolats suivant : ESM-1 ($74 \pm 6 \%$), ESMV-1A ($14 \pm 5 \%$), ESMV-3 ($71 \pm 12 \%$), R2A-4 ($30 \pm 6 \%$) et TSA-1 ($26 \pm 3 \%$). Les isolats ESM-1, ESMV-3 ainsi que R2A-4 ont montré même des pourcentages de diminution supérieurs à ceux obtenus par le consortium de l'enrichissement *A-Hytrel* ($25 \pm 2 \%$) d'où étaient issus ces derniers. Tout comme pour l'estradiol, les résultats obtenus pour l'estrone diffèrent pour certains isolats de ceux obtenus pour les enrichissements. L'enrichissement *A-Hytrel* qui au cumulatif (voir Figure 11) a présenté une hausse de la concentration en estrone ($25 \pm 8 \%$) par rapport au temps zéro abritait également des microorganismes capables de dégrader ce composé. Les isolats ESM-1, ESMV-3 et TSA - 7 ont montré des baisses importantes et respectives de $54 \pm 4 \%$, de $60 \pm 6 \%$ et de $71 \pm 7 \%$. Ces isolats étaient les mêmes qui ont montré une hausse de la concentration en estradiol par rapport au temps zéro. Il se pourrait donc que ce genre de microorganismes au lieu de convertir l'estradiol en estrone a effectué l'étape contraire c'est-à-dire convertir l'estrone en estradiol. Toutefois, si nous avons observé une baisse drastique du niveau d'estrone, ceci ne s'est pas répercuté en une hausse de la concentration en estradiol. Pour ces isolats, l'ensemble de l'estrone n'a pas été complètement converti en estradiol; une certaine portion a peut-être été transformée en un autre métabolite.

Certains des isolats ont suivi néanmoins la tendance du consortium de l'enrichissement *A-Hytrel* en présentant une hausse de la concentration en estrone suite aux 4 jours d'incubation par rapport au temps zéro. Il s'agissait des isolats ESMV - 1A ($74 \pm 10 \%$), R2A-4 ($26 \pm 4 \%$), R2A-5 ($53 \pm 5\%$) et TSA - 1 ($43 \pm 10 \%$). Ces hausses ont été de 1 à 2.94 fois plus élevées que celle obtenue par l'enrichissement *A-Hytrel* ($25 \pm 8 \%$) à lui seul. La dégradation du 17- α -éthynylestradiol a suivi la même direction que celle obtenue à la figure 11 c'est-à-dire qu'aucun des isolats n'a dégradé ce composé. Pour les sept isolats testés, aucune baisse significative de la concentration en 17- α -éthynylestradiol par rapport au temps zéro n'a été observée.

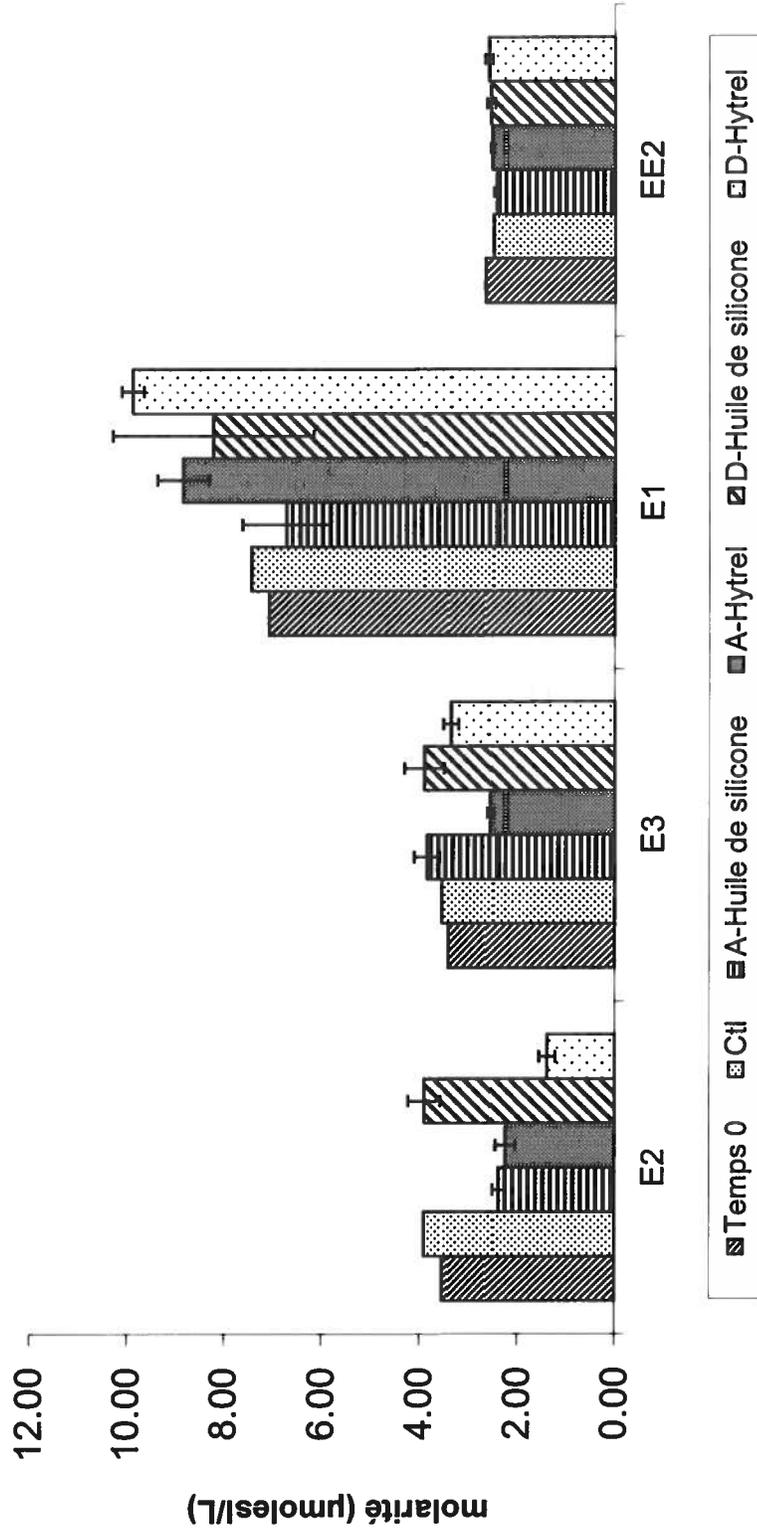


Figure 11: Évaluation des rendements de dégradation de l'estrone (E1) et du 17- α -éthynylestradiol (EE2) obtenus par les enrichissements des classes A et D après 4 jours d'incubation en milieu TSB à 25°C sous agitation de 150 rpm. Le temps zéro correspondait à la concentration initiale de chaque composé contenu dans le milieu de culture avant incubation. Le contrôle (CtI) représente la concentration de chaque composé contenu dans le milieu TSB suite aux 4 jours d'incubation en absence de bactéries.

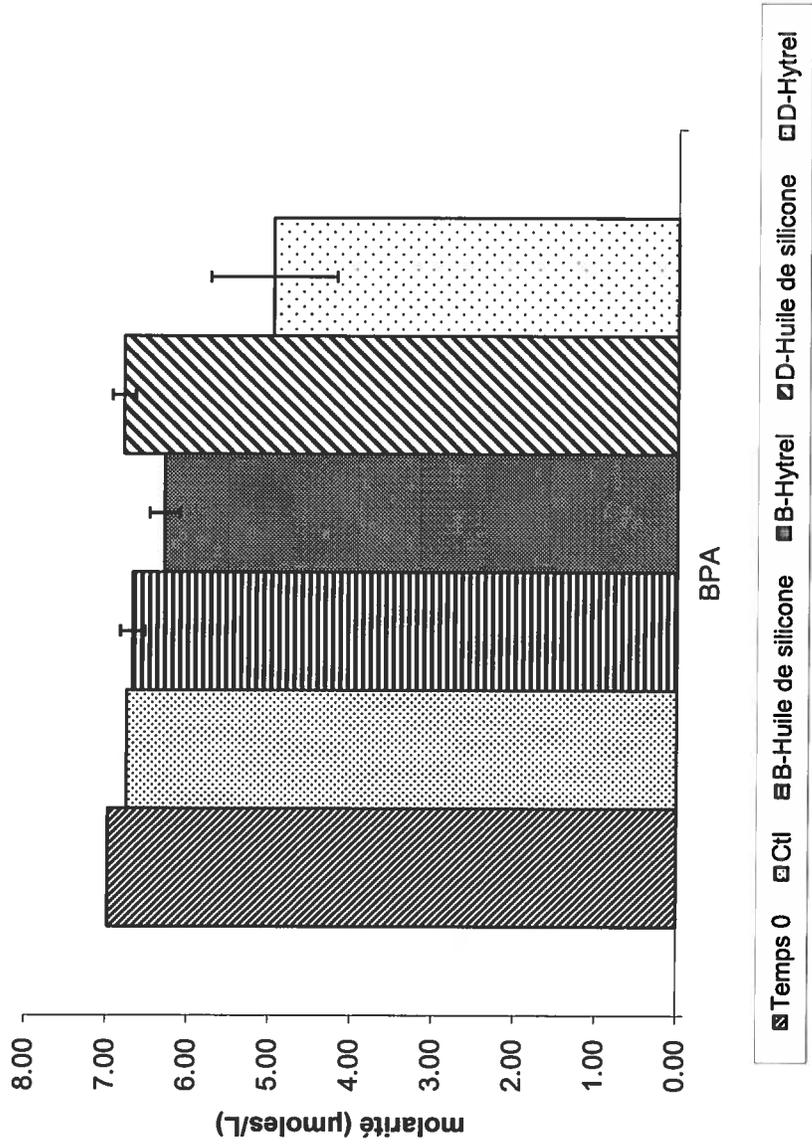


Figure 12: Évaluation des rendements de dégradation du bisphénol A obtenus par les enrichissements associés aux classes B et D après 4 jours d'incubation en milieu TSB à 25° C sous agitation de 150 rpm. Le temps zéro ainsi que le contrôle correspondaient respectivement à la concentration initiale de bisphénol A avant et après incubation du milieu en absence de bactéries.

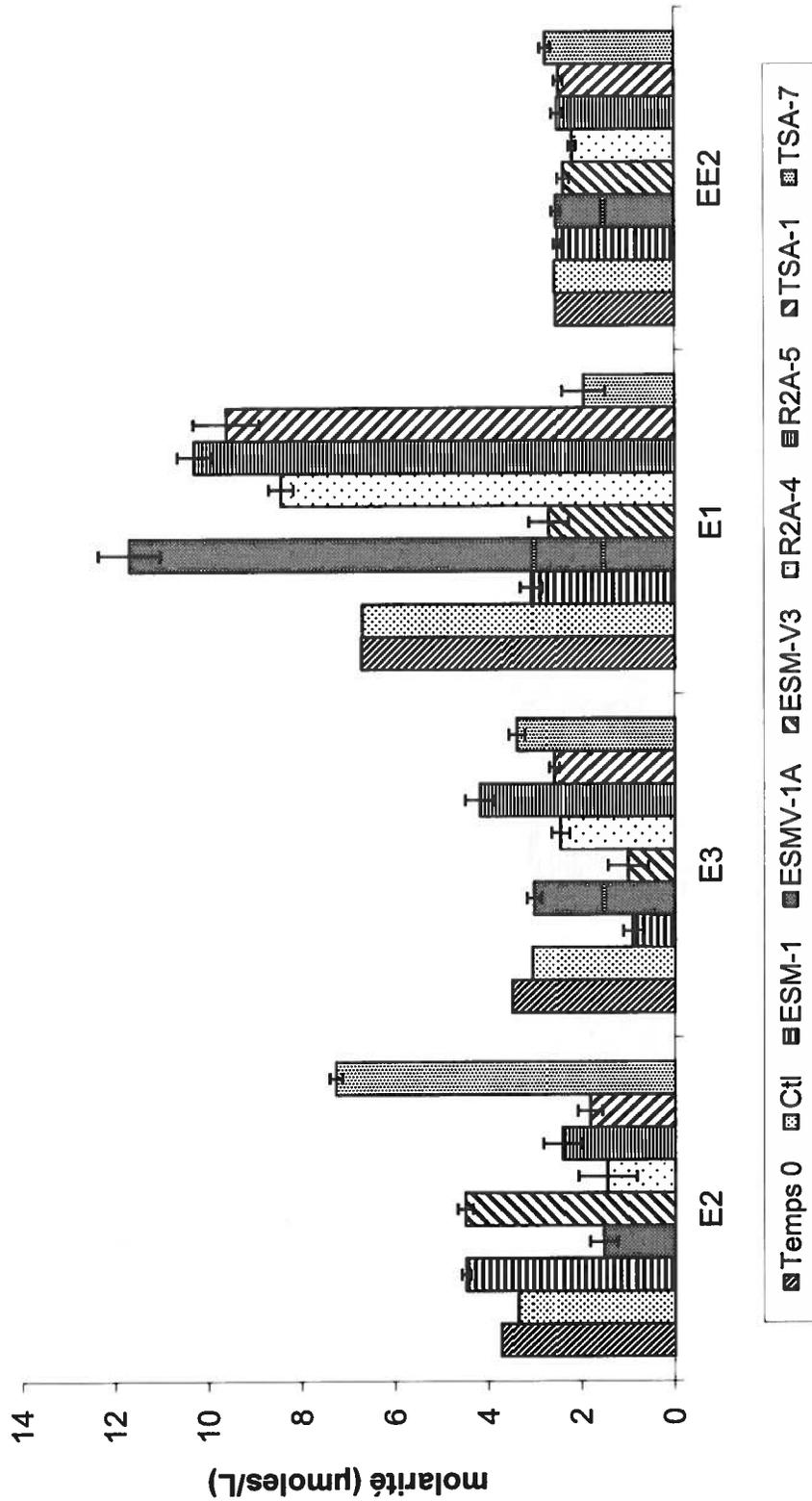


Figure 13: Évaluation des rendements de dégradation de l'estradiol (E2), de l'estrone (E1) et du 17- α -éthynylestradiol (EE2) générés par les sept souches sélectionnées de l'enrichissement *A-Hytre* suite à 4 jours d'incubation en milieu TSB à 25°C sous agitation de 150 rpm. Le temps zéro ainsi que le contrôle correspondaient respectivement à la concentration initiale de chaque estrogène avant et après incubation du milieu en absence de bactéries.

4 DISCUSSION

Dans le but de développer un procédé à deux phases liquides permettant l'extraction, la concentration et la biodégradation de modulateurs endocriniens, trois objectifs ont été étudiés. Il s'agit des objectifs suivants: la mise au point de méthodes analytiques permettant le suivi des composés à l'étude, ainsi que le choix du solvant le plus approprié pour la phase hydrophobe du système biphasique et le développement d'une microflore spécialement adaptée au système biphasique et capable de dégrader les modulateurs endocriniens.

4.1 Analyse et quantification des modulateurs endocriniens

Au cours de ce projet une attention particulière a été consacrée au développement de méthodes permettant l'extraction des modulateurs endocriniens des phases hydrophobes testées ainsi qu'à la mise au point d'une méthode de chromatographie en phase gazeuse. Cette dernière a permis de quantifier les modulateurs endocriniens au cours des multiples expériences réalisées.

4.1.1 Méthode d'analyse au CG-SM

La chromatographie en phase gazeuse (CG) en combinaison avec la spectrométrie de masse (SM) est une méthode communément utilisée dans l'analyse des modulateurs endocriniens. La méthode employée au cours du projet a impliqué au préalable à l'injection une étape de dérivation. Cette étape est requise pour augmenter la volatilité des analytes et favoriser la séparation chromatographique (Ding et al. 2003). La méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et combinée à la dérivation a permis la détection des six composés à l'étude avec une excellente résolution. Les ions moléculaires dérivés correspondant également aux pics de base obtenus en spectrométrie de masse ont été sélectionnés comme ions quantitatifs sauf pour le 17- α -éthynylestradiol. Le pic de base est le pic le plus élevé dans un spectre de masse pour lequel est assigné une valeur d'intensité relative de 100 (Nie et al. 2009). La sélection du pic de base comme ion quantitatif permet d'augmenter la sensibilité et la

sélectivité de la méthode de détection en réduisant l'interférence générée par le bruit de fond (Nie et al. 2009). Même si les pics de base ont été sélectionnés comme ions quantitatifs, la sensibilité de la méthode a été plutôt moyenne avec l'obtention de limites de détection situées entre 0.0005 et 0.05 mg/L pour les différents composés l'étude. Ces limites de détection sont dites moyenne en comparaison aux limites de détection présentées dans la littérature. Ces dernières présentent des valeurs de l'ordre du ng/L (Quintana et al. 2004; Soliman et al. 2004). Toutefois, cette moyenne sensibilité n'a en aucun cas affecté la validité des résultats obtenus puisque l'ensemble des expériences ont été effectuées à l'échelle du mg/L.

4.1.2 Traitements des phases hydrophobes

L'impossibilité d'analyser directement l'huile de silicone ou l'Hytrell par chromatographie a généré la mise au point de méthodes telles l'extraction en phase solide (SPE) et la double extraction au méthanol afin d'extraire les composés d'intérêts des phases hydrophobes à l'étude. La méthode d'extraction en phase solide est une méthode souvent employée pour la quantification des modulateurs endocriniens contenus dans des échantillons d'eau (Sacher et al. 2001; Chang et al. 2009). Cette méthode s'est avérée également extrêmement efficace dans l'extraction des modulateurs endocriniens de l'huile de silicone en présentant des rendements d'extraction entre 96 et 107 % (Oasis HLB) pour les différentes familles de composés à l'étude. La phase d'optimisation de cette méthode d'extraction a montré que la composition de la phase stationnaire influence grandement la récupération des composés. Selon le type de cartouche employée (Oasis HLB, EnviChrom-P ou Sep-pak), le pourcentage de récupération pour un même composé peut varier de 12 % (Bisphénol A : Oasis HLB : 96 ± 6 %, EnviChrom-P : 101.8 ± 0.2 % et Sep-pak : 90 ± 4 %) à 96 % (Nonylphénol : Oasis HLB : 97 ± 3 %, EnviChrom-P : 0.18 ± 0.03 %, Sep-pak : 0.14 ± 0.01 %). Cette méthode d'extraction s'est avérée également reproductible en présentant des écarts-types inférieurs à 10 %. La phase stationnaire Oasis HLB a offert le meilleur rendement d'extraction des trois phases testées et ce, pour les deux familles de composés à l'étude, soit les estrogènes et les alkylphénols. Ce dernier énoncé est justifiable par la composition de la phase stationnaire de ce type de cartouche qui comporte en proportion égale des monomères lipophiles de divinylbenzène

et hydrophobes de N-vinylpyrrolidone qui permettent à la fois de retenir les modulateurs possédant un caractère plus polaire tel que l'estriol ($\text{Log } K_{ow} : 2.45$) et les composés non-polaires comme le 4-n-nonylphénol ($\text{Log } K_{ow} : 4.48$).

La double extraction au méthanol des composés absorbés dans l'Hytrel s'est avérée être une méthode tout aussi efficace et même plus simple que la méthode d'extraction en phase solide. Cette méthode a entre autres permis d'évaluer la solubilité maximale des composés dans ce polymère avec une reproductibilité entre triplicata située entre 1 et 7 %. Ce dernier énoncé démontre que la méthode d'extraction en elle-même s'est avérée reproductible. L'extraction des modulateurs endocriniens de l'Hytrel a également rendu possible l'évaluation de la capacité de ce composé à relarguer en phase aqueuse les modulateurs endocriniens ainsi qu'à déterminer le coefficient de partition de chacun de ceux-ci dans l'Hytrel. Il s'agit de deux facteurs capitaux à l'évaluation de l'Hytrel comme phase hydrophobe potentielle du système à deux phases immiscibles mis au point. De nombreuses études relatent l'utilisation de l'Hytrel comme phase hydrophobe en système biphasique (Prpich et al. 2006; Rehmann et al. 2007a; Rehmann et al. 2007b; Morrish et al. 2008). Toutefois, aucune de ces études n'a quantifié directement les composés contenus dans cette phase. Celles-ci ont plutôt calculé la concentration contenue dans le polymère par bilan de masse de la concentration initialement connue versus la concentration quantifiée en phase aqueuse. Ce projet constitue donc une des premières études quantifiant directement les composés à partir du polymère même.

4.2 Sélection de la phase hydrophobe du système

Le choix de la phase hydrophobe du système biphasique est un élément capital au bon fonctionnement du bioprocédé. Rehmann et coll (2007) ont établi un guide pour la sélection appropriée de la phase de relargage d'un système à deux phases immiscibles (Tableau 23). Même si ces critères ont été établis pour le choix d'une phase hydrophobe solide comme l'Hytrel, ces derniers font également parti des critères de sélection de phase hydrophobe liquide telle que l'huile de silicone.

Les deux polymères à l'étude c'est-à-dire l'huile de silicone et l'Hytrel répondent bien au point 2 à 5 ainsi qu'aux points 7 à 9. Toutefois, ils se distinguent au niveau des

points 1 et 6 soit au niveau de leur coût ainsi que leur affinité pour les modulateurs endocriniens.

Tableau 23. Caractéristiques désirables d'un polymère employé pour le relargage de substances peu solubles dans l'eau à des organismes dégradeurs dans un système solide-liquide.

Caractéristiques

1. Commercialement disponible à faible coûts
 2. Sécuritaire d'emploi
 3. Non-toxique pour les microorganismes employés
 4. Non disponible comme source de carbone et d'énergie ou non-biodégradable
 5. Ne promeut pas la formation de biofilm sous les conditions opérationnelles choisies
 6. Possède une affinité désirable pour les molécules cibles
 7. Thermostable à des fins de stérilisation
 8. Stable en milieu aqueux aux pH et aux concentrations en électrolyte du milieu de culture employé
 9. Stable dans le milieu employé pour chargé le polymère des molécules cible
-

4.2.1 Coûts des phases hydrophobes

Au niveau des coûts, l'Hytrell a un avantage potentiel sur l'huile de silicone en étant quarante-sept fois moins dispendieux que l'huile de silicone : 192 US \$ kg⁻¹ (Sigma-Aldrich, 2010), Hytrell : 4.07-5.61 US \$ kg⁻¹ (Rehmann et al. 2007). Il s'agit d'un point important à considérer dans l'optique de l'application de ce système à l'échelle industrielle où de grands volumes ou quantités de phases hydrophobes sont requis.

4.2.2 Affinité des phases hydrophobes pour les modulateurs endocriniens

Le principal critère choisi au cours de cette étude afin d'évaluer l'affinité des phases hydrophobes pour les composés testés a été l'évaluation de la solubilité de chaque modulateurs endocriniens dans l'huile de silicone et dans l'Hytrell. Les résultats obtenus au cours de cette expérience démontrent entre autres que l'huile de silicone n'est pas la phase hydrophobe de choix pour le bioprocédé que nous tentons de mettre au point. Le

bisphénol A, l'estrone, l'estradiol et l'estriol sont de 1.61 à 147 fois moins solubles dans l'huile de silicone que dans l'eau. Seul le 17 - α - éthynelestadiol et le 4-n-nonylphénol offre une meilleure solubilité de ces composés dans cette phase hydrophobe qu'en milieu aqueux. Leur plus forte affinité pour la phase aqueuse est problème important. Ceci indique que suite à l'ajout d'un certain volume d'huile de silicone à une eau usée contenant les six composés à l'étude, seul le 17 - α - éthynelestadiol et le 4-n-nonylphénol se partitionneraient dans la phase hydrophobe. Les quatre autres composés demeureront dans la phase aqueuse puisque leur affinité pour cette dernière est plus importante. Ce dernier énoncé nous indique que très peu des composés à l'étude se concentreront dans l'huile de silicone afin d'éventuellement servir de source de carbone pour les microorganismes dégradeurs.

Au cours de cette expérience, l'évaluation de la solubilité maximale du nonylphénol dans l'huile de silicone n'a pas été déterminée. Basé sur le fait que le 4-n-nonylphénol se retrouve à des concentrations de ng/L dans les eaux usées soit 3.38×10^9 fois inférieure à la solubilité trouvée pour ce composé dans l'huile de silicone ($3563.46 \pm 404.51 \mu\text{g/g}$), il est fortement improbable qu'en se concentrant d'une eau usée à l'huile de silicone, ce composé atteigne une telle concentration. Suite à ce dernier énoncé, des concentrations supérieures à 3000 mg/L n'ont donc pas été testées.

L'Hytrell présente des résultats de solubilité beaucoup plus encourageants. Les six composés à l'étude sont de 5.18 à 138 fois plus solubles dans ce polymère que dans l'eau. Cela signifie que l'Hytrell a une forte affinité pour les composés à l'étude. Cette forte affinité des différents composés pour l'Hytrell peut être associée à la composition de ce polymère. L'Hytrell contient approximativement 50 % de poly(butylène terephthalate) (PBT) et 50 % de butylène ether glycol terephthalate (Prpich et al. 2004). La présence de groupement fonctionnel esters au sein de la composition de ce polymère génère des sites potentiels de liaisons hydrogènes avec les groupements hydroxyles des six modulateurs à l'étude. D'après ces résultats, l'Hytrell serait un réservoir idéal pour les modulateurs endocriniens. L'addition de ce polymère à une eau usée renfermant les modulateurs

endocriniens à l'étude générerait rapidement un passage des composés cibles de la phase aqueuse à la phase hydrophobe vu la forte affinité qu'ils ont pour cette dernière.

Toutefois, cette forte affinité qu'a l'Hytrell pour les modulateurs endocriniens est problématique. Les résultats de capacité de relargage obtenus pour ce polymère nous démontrent que cette affinité est tellement importante qu'elle séquestre les composés à l'intérieur de l'Hytrell. Seule une faible proportion soit, moins de 1 % des modulateurs se retrouvent relargués en phase aqueuse. Ce dernier énoncé s'avère problématique puisque ce qu'on désire d'une phase hydrophobe optimale c'est que cette dernière possède une affinité suffisante pour qu'elle puisse agir à titre de réservoir mais que cette affinité soit assez fragile pour permettre à cette phase de relarguer en phase aqueuse les composés cibles.

L'importante affinité des modulateurs endocriniens pour l'Hytrell est également constatable par les valeurs du logarithme du coefficient de partition obtenues ($\text{Log } K_{s/w}$). Ces dernières se trouvent entre 2.30 et 5.11. Par définition, le coefficient de partition se décrit comme étant le ratio de la concentration d'un soluté contenu dans la phase du polymère divisé par la concentration de ce même soluté contenu dans la phase aqueuse, le tout à l'équilibre (Morrish et al. 2008). Une valeur supérieure à un nous indique donc que le soluté dans le cas présent les modulateurs endocriniens a plus d'affinité pour le polymère que pour la phase aqueuse puisqu'ils s'y retrouvent en plus grande concentration. Ce dernier élément limite donc l'accessibilité des modulateurs endocriniens emprisonnés dans la phase hydrophobe aux microorganismes compris en phase aqueuse. Les valeurs de coefficients de partition obtenues, en étant toutes supérieures à 1, nous indique que l'ensemble des composés à l'étude ont plus d'affinité pour l'Hytrell que pour l'eau. Toutefois, en comparant les valeurs de coefficient de partition dans l'Hytrell aux valeurs théoriques des coefficients de partition octanol-eau (Tableau 21), nous avons constaté que l'affinité des composés pour l'Hytrell ne dépend pas seulement de leur hydrophobicité ici représentée par la valeur du $\text{Log } K_{ow}$. Le composé le plus hydrophobe n'était donc pas nécessairement le composé présentant la

plus haute valeur de coefficient de partition dans l'Hytrel. D'autres facteurs semblent donc être impliqués dans l'affinité des composés pour ce polymère hydrophobe.

L'huile de silicone et l'Hytrel ne semblent donc pas les solvants les plus appropriés à la mise au point du présent système à deux phases immiscibles. Une étude plus approfondie, impliquant des solvants et des polymères communément employés dans d'autres systèmes biphasiques (ex : EVA, nylon, Nucrel, polyuréthane, 1-dodécane) devrait être effectuée afin d'évaluer si ces derniers seraient plus adéquats pour les modulateurs endocriniens étudiés.

4.3 Microflore sélectionnée en système biphasique

La sélection d'une microflore capable de dégrader des composés possédant des caractéristiques physico-chimiques aussi différentes que ceux à l'étude est un point important à la réussite de ce projet. Il a été répertorié dans la littérature que l'addition d'une phase hydrophobe aux enrichissements a le potentiel de réduire la période d'acclimatation nécessaire à l'isolement de microorganismes adaptés (Déziel et al. 1999). Basé sur ce dernier énoncé, six enrichissements ont donc été réalisés en inoculant une biomasse issue de trois sources distinctes dans un milieu minéral contenant une phase hydrophobe soit l'huile de silicone ou l'Hytrel. Ces phases hydrophobes ont été utilisées à titre de réservoir de modulateurs endocriniens en renfermant des concentrations variées de ces composés. Les concentrations employées ont été basées sur la nature des phases hydrophobes sélectionnées et de la solubilité maximale des modulateurs dans celle-ci. Les modulateurs endocriniens contenus dans les phases hydrophobes testées ont été les principales sources de carbone consommables par les microorganismes dans le but d'induire une pression de sélection afin de favoriser les souches capables de métaboliser ce genre de composés. Afin d'évaluer la capacité des enrichissements à dégrader les modulateurs à l'étude, des tests de dégradation en cultures liquides (TSB) additionnées de 1 mg/L de chaque modulateur endocrinien ont été effectués. Les consortiums issus du onzième repiquage de chaque enrichissement ont été utilisés au cours de ce test. Basé sur le fait que chaque repiquage a été effectué sur une base mensuelle, cela signifie que

chaque consortium inoculé dérivait d'une période d'acclimatation de 330 jours. Cette période d'acclimatation était largement suffisante pour obtenir des consortiums stables et adaptés aux systèmes biphasiques puisque de nombreux ouvrages relatent l'utilisation de périodes d'acclimatation aussi courtes que 4 à 10 jours (Prpich et al. 2006; Rehmann et al. 2007) et ce, pour la sélection de consortiums capables de dégrader des composés phénolés aussi stables et persistants que les modulateurs à l'étude.

4.3.1 Capacité de dégradation de la microflore

Les tests de dégradation brièvement décrits à la section précédente n'ont démontré aucune minéralisation complète des cinq modulateurs testés par les enrichissements suite à 4 jours d'incubation. Toutefois, les différentes microflores enrichies ont été capables d'induire la dégradation de certains d'entre eux. La plupart des enrichissements associés aux classes A et D et couplés aux deux différentes phases hydrophobes testées auraient converti l'estradiol en estrone. De nombreuses études ont démontrées que la conversion de l'estradiol en estrone est possible sous différentes conditions (aérobiques, anoxiques et anaérobiques) et ce par différents microorganismes et cultures mixtes (Lee et al. 2002; Czajka et al. 2006). Cependant, l'enrichissement *A-Huile de silicone* est le seul enrichissement qui a présenté une dégradation de l'estradiol (diminution de $33 \pm 4 \%$) sans toutefois obtenir une accumulation en estrone. Ceci nous amène à appuyer l'hypothèse de certains chercheurs (Fujii et al. 2002) qu'il peut exister d'autres voies métaboliques de l'estradiol que la conversion en estrone. Le 17- α -éthynylestradiol, l'estriol et le bisphénol A ont toutefois été récalcitrant à la dégradation puisque très peu des six enrichissements développés ont dégradé ces composés. Ce dernier énoncé est justifiable par la présence de faibles ou même l'absence de baisses observables dans les concentrations obtenues suite à 4 jours d'incubation par rapport au temps zéro. Les faibles résultats de dégradation obtenus pour le 17- α -éthynylestradiol ne sont pas surprenants, puisque ce composé d'origine industrielle est reconnu pour être beaucoup plus récalcitrant (Cajthaml et al. 2009). Le groupement éthynyl situé à la 17^e position du composé synthétique génère un encombrement stérique empêchant l'accès au groupement hydroxyle situé à cette même position, ce qui rend ce composé plus difficile à dégrader (Bolt 1979) Toutefois, l'estriol et le bisphénol A ne sont pas considérés

comme des composés récalcitrants au même titre que le 17- α -éthynylestradiol. De ce fait, de nombreux microorganismes associés aux genres *Achromobacter* et *Pseudomonas* ont été reconnus comme étant apte à dégrader ces composés (Weber et al. 2005; Zhang et al. 2007; Pauwels et al. 2008). Différents facteurs peuvent être évoqués pour justifier la faible dégradation de l'estriol et du bisphénol A. Entre autres, il peut s'agir de la constitution de l'inoculum de départ ou des conditions dans lesquelles les tests de dégradation ont eu lieu. La biomasse initialement inoculée au cours du premier enrichissement était issue de trois sources distinctes soit : d'une boue activée déphosphatant le lisier de porc, de l'usine de traitement des eaux de Vaudreuil, ainsi qu'un consortium dégradant les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Les deux dernières sources évoquées dans l'énoncé précédent abritaient une microflore qui n'a jamais été exposée à l'estriol et au bisphénol A. Par contre, le lisier de porc est reconnu pour contenir des estrogènes tels l'estradiol et l'estrone (Burnison et al. 2003). Puisque les consortiums issus de ces sources n'ont jamais été exposés à ce genre de composés, il se peut qu'ils ne contiennent pas ou très peu de microorganismes équipés d'enzymes capables de dégrader des composés tels que l'estriol et le bisphénol A. De plus, les conditions employées au cours des tests de dégradation diffèrent de celles utilisées au cours des enrichissements. La différence de milieu (riche (TSB) vs minéral (ESM)) et les divergences de concentrations employées aux cours des deux processus pourraient avoir mené à la dominance de certaines souches par rapport à d'autres aux cours des tests de dégradation.

4.3.2 Diversité bactérienne issue de l'enrichissement *A-Hytrel*

La diversité microbiologique de l'enrichissement *A-Hytrel* a été évaluée par l'intermédiaire de la méthode d'isolement sur gélose en utilisant différents milieux, suivi d'une identification par séquençage du gène de l'ARNr 16S des isolats obtenus. Les isolats ont été associés à cinq genres différents classés sous quatre grands groupes. Onze isolats sur vingt ont été associés au genre *Rhodococcus*. Certains microorganismes affiliés à ce genre ont été reconnus comme étant capable de dégrader 100 mg/L d'estradiol, d'estriol, d'estrone et de 17 - α - éthynylestradiol en 24 heures (Yoshimoto et al. 2004). Ces onze isolats sont tous fortement affiliés à la même espèce soit

Rhodococcus erythropolis et probablement tous issus du même organisme. *Rhodococcus erythropolis* est reconnu comme possédant une quantité importante d'enzymes capables d'effectuer un grand nombre de réactions de biodégradation (De Carvalho et al. 2005) et même de dégrader des composés tel que le cholestérol qui possède une structure moléculaire similaire à celle des estrogènes (Ferreira et al. 1984). Quatre autres isolats (TSA-4, TSA-6, R2A-5 et R2A-6) ont été associés au genre *Rhodanobacter*. Ce genre n'est pas mentionné dans la littérature comme étant capable de dégrader les estrogènes. Toutefois, il est associé à la dégradation respective de pesticides persistants (Nalin et al. 1999) et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (Kanaly et al. 2002). Trois isolats (TSA-1, R2A-1 et ESMV1-A) ont été reconnus comme appartenant au genre *Bacillus*. Certains microorganismes associés à ce genre ont été isolés de boues activées provenant d'une usine de traitement des eaux et sont reconnus comme étant capable de dégrader complètement 1 mg/L d'estradiol en 4 jours ainsi que de permettre la dégradation de l'estrone (Jiang et al. 2010). Un isolat séquencé (TSA-7) a été identifié comme appartenant au genre *Pusillimonas*. La littérature rapporte ce genre comme étant apte à dégrader l'estradiol en culture mixte avec d'autres microorganismes appartenant au genre *Brevundimonas* et *Alcaligene* (Muller et al. 2010). Le genre *Microbacterium* est le dernier genre caractérisé au cours de cette étude. Seul l'isolat R2A-4 a été associé à ce dernier. La présence de ce genre a été rapportée au sein d'une boue activée d'une usine de traitement des eaux usées. Les résultats présentés au sein de cette étude démontrent que les microorganismes associés à ce genre sont capables de dégrader l'estradiol en 7 jours mais non l'estrone (Yu et al. 2007).

4.3.3 Efficacité des isolats versus les consortiums

Dans la littérature, on évoque le fait que lors de l'utilisation d'un consortium bactérien pour la dégradation de contaminants, la capacité de dégradation globale ne représente pas uniquement la somme des capacités des souches individuelles formant le consortium (Vandermeer et al. 2007). La comparaison des rendements de dégradation des isolats individuels issus de l'enrichissement *A-Hytrel* versus ceux obtenus pour l'enrichissement global (*A-Hytrel*) démontre bien le point évoqué dans l'énoncé précédent. Les isolats présentant une diminution de la concentration en estradiol suite à la

période d'incubation, soit les isolats ESMV1-A, R2A-4, R2A5 et TSA-1 avaient des rendements égaux (R2A-5 : $35 \pm 11 \%$) ou de 1.6 fois supérieurs (TSA-1 : $51 \pm 7 \%$, ESMV-1A : $59 \pm 8 \%$, R2A-4 : $61 \pm 17\%$) à la valeur obtenue pour l'enrichissement A ($37 \pm 6\%$). Certains isolats vont même à l'encontre de la tendance globale de l'enrichissement qui transformait l'estradiol en estrone en présentant plutôt une transformation de l'E1 en E2. Ce comportement a été déjà observé dans la littérature sous des conditions de culture anaérobique au cours de laquelle un consortium bactérien issu des sédiments d'un lac, réduisait l'estrone obtenu initialement du métabolisme de l'estradiol, en E2 (Czajka et al. 2006). Alors que l'enrichissement *A-Hytrel* ne présente qu'une faible dégradation de l'estriol ($25 \pm 2 \%$) certains des isolats tels qu'ESM-1 et ESMV-3 présentent des pourcentages de dégradation 2.9 fois plus élevés. Cette tendance s'inscrit dans la même ligne que les résultats obtenus pour la dégradation de l'estradiol par les isolats versus l'enrichissement. Ces hausses de dégradation obtenues par les isolats individuels par rapport au consortium pourraient être dues au fait que les isolats en culture pure offrent une concentration plus élevée des enzymes aptes à dégrader les estrogènes testés. L'enrichissement renferme des microorganismes variés dont certains d'entre eux peuvent ne pas posséder les enzymes nécessaires au métabolisme de ce genre de composés générant ainsi, un effet de dilution de la quantité de microorganismes dégradeurs. L'utilisation d'un milieu riche tel que le TSB a peut être également jouer un rôle en stimulant la croissance préférentielle de certains microorganismes qui auraient pu nuire à l'établissement au sein de la culture, des souches capables de dégrader les estrogènes. Finalement, les isolats ont suivi la même tendance que le consortium global de l'enrichissement en ne générant aucune dégradation significative du 17 - α - éthyneestradiol qui, tel que cité précédemment est reconnu pour sa persistance.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce projet a permis de faire la lumière sur la possibilité d'utiliser un système à deux phases immiscibles afin de permettre la biodégradation des modulateurs endocriniens retrouvés dans les eaux usées. Deux modèles de systèmes ont été étudiés c'est-à-dire : un système liquide-liquide comprenant comme phase hydrophobe, l'huile de silicone, ainsi qu'un modèle solide-liquide constitué d'Hytrek. Les résultats de solubilité des composés à l'étude au sein des deux phases citées précédemment démontrent que des polymères présentant une composition distincte présentent différentes affinités pour les substrats cibles. Les analyses physico-chimiques ont également permis de révéler qu'aucune des phases hydrophobe à l'étude entre l'huile de silicone et l'Hytrek ne semble optimale pour le développement de ce bioprocédé. Toutefois, la mise au point de six enrichissements sous le modèle du système biphasique a permis de sélectionner différentes biomasses abritant des communautés de microorganismes capables de dégrader le 17- β -estradiol, l'estriol, l'estrone ainsi que le bisphénol A. Une étude plus approfondie d'un de ces enrichissements a également permis d'isoler sept souches distinctes dégradant les estrogènes naturels. La mise au point de méthodes d'extraction a permis de quantifier à même les phases hydrophobes le taux de dégradation généré par les différents consortiums en plus de permettre une évaluation plus exacte des coefficients de partition des composés à l'étude entre les deux phases des systèmes. La quantification à même les phases hydrophobes grâce aux méthodes mises au point au cours de ce projet est une première dans le domaine des systèmes à deux phases immiscibles.

La littérature fait état du fait que la performance d'un système à deux phases immiscibles comprenant un seul type de phase organique pour traiter un mélange de polluants dépend à priori des caractéristiques de chaque polluant (Quijano et al. 2009). Si ces derniers présentent des différences significatives au niveau de leur propriétés telle que leur polarité, plus d'une phase hydrophobe doivent être sélectionnée. Ce projet démontre bien le fait que les six composés à l'étude possèdent des différences trop importantes entre eux pour utiliser une seule phase hydrophobe. Dans le cadre de futurs travaux, il serait intéressant d'évaluer différentes combinaisons de phase hydrophobe afin d'évaluer

si une telle approche pourrait augmenter le rendement de biodégradation des composés à l'étude en plus d'augmenter leur relargage en phase aqueuse.

Ces travaux démontrent le potentiel d'employer les systèmes à deux phases immiscibles dans l'élimination des composés récalcitrants appartenant à la famille des modulateurs endocriniens. Toutefois, les expériences effectuées au cours de cette étude étaient basées sur l'emploi d'une eau synthétique (eau milli-Q) couplée avec des concentrations de modulateurs endocriniens (mg/L) se trouvant au dessus des concentrations contenues dans l'environnement et dans les eaux usées (ng/L à µg/L). Par conséquent, il serait pertinent d'évaluer si ce type de système est capable d'éliminer les composés estrogéniques à des concentrations de ng/L et ce, à partir d'eaux contenant d'autres particules et des sources alternatives de carbone telles que les eaux usées. Il serait également opportun de comparer la dynamique de dégradation du système fermé produit dans ces travaux à celle obtenue par l'utilisation d'une eau usée.

Références

- Acerini, C. L. and I. A. Hughes (2006). "Endocrine disrupting chemicals: A new and emerging public health problem?" Archives of Disease in Childhood **91**(8): 633-638.
- Aherne, G. W. and R. Briggs (1989). "The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment." Journal of Pharmacy and Pharmacology **41**(10): 735-736.
- Allan, B. B., R. Brant, et al. (1997). "Declining sex ratios in Canada." CMAJ **156**(1): 37-41.
- Amsden, B. G., J. Bochanysz, et al. (2003). "Degradation of Xenobiotics in a Partitioning Bioreactor in Which the Partitioning Phase is a Polymer." Biotechnology and Bioengineering **84**(4): 399-405.
- Andersen, H., H. Siegrist, et al. (2003). "Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant." Environmental Science and Technology **37**(18): 4021-4026.
- Arriaga, S., R. Muñoz, et al. (2006). "Gaseous hexane biodegradation by *Fusarium solani* in two liquid phase packed-bed and stirred-tank bioreactors." Environmental Science and Technology **40**(7): 2390-2395.
- Ascon-Cabrera, M. A. and J. M. Lebeault (1995). "Interfacial area effects of a biphasic aqueous/organic system on growth kinetic of xenobiotic-degrading microorganisms." Applied Microbiology and Biotechnology **43**(6): 1136-1141.
- Bae, B., J. H. Jeong, et al. (2002). The quantification and characterization of endocrine disruptor bisphenol-A leaching from epoxy resin. Water Science and Technology. **46**: 381-387.
- Baronti, C., R. Curini, et al. (2000). "Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water." Environmental Science and Technology **34**(24): 5059-5066.
- Belfroid, A. C., A. Van Der Horst, et al. (1999). "Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands." Science of the Total Environment **225**(1-2): 101-108.
- Bergeron, J. M., D. Crews, et al. (1994). "PCBs as environmental estrogens: Turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination." Environmental Health Perspectives **102**(9): 780-781.

- Blackburn, M. A. and M. J. Waldock (1995). "Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales." Water Research **29**(7): 1623-1629.
- Bolt, H. M. (1979). "Metabolism of estrogens: Natural and synthetic." Pharmacology and Therapeutics **4**(1): 155-181.
- Bouchez, M., D. Blanchet, et al. (1997). "Kinetic studies of biodegradation of insoluble compounds by continuous determination of oxygen consumption." Journal of Applied Microbiology **82**(3): 310-316.
- Bouchez, M., D. Blanchet, et al. (1995). "Substrate availability in phenanthrene biodegradation: Transfer mechanism and influence on metabolism." Applied Microbiology and Biotechnology **43**(5): 952-960.
- Brown, A. R., A. M. Riddle, et al. (2005). "Predicting the effects of endocrine disrupting chemicals on healthy and disease impacted populations of perch (*perca fluviatilis*)." Ecological Modelling **189**(3-4): 377-395.
- Bruce, L. J. and A. J. Daugulis (1991). "Solvent Selection Strategies for Extractive Bioeatalysis." Biotechnology Progress **7**(2): 116-124.
- Burnison, B. K., A. Hartmann, et al. (2003). "A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog manure and agricultural runoff." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(10): 2243-2250.
- Cajthaml, T., Z. Kresinova, et al. (2009). "Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol." Environmental Pollution **157**(12): 3325-3335.
- Canesi, L., C. Borghi, et al. (2008). "Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland." Aquatic Toxicology **87**(4): 272-279.
- Chang, H. S., K. H. Choo, et al. (2009). "The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water." Journal of Hazardous Materials **172**(1): 1-12.
- Choi, K. J., S. G. Kim, et al. (2005). "Effects of activated carbon types and service life on removal of endocrine disrupting chemicals: Amitrol, nonylphenol, and bisphenol-A." Chemosphere **58**(11): 1535-1545.
- Collins, L. D. and A. J. Daugulis (1997). "Biodegradation of phenol at high initial concentrations in two-phase partitioning batch and fed-batch bioreactors." Biotechnology and Bioengineering **55**(1): 155-162.

- Combalbert, S. and G. Hernandez-Raquet (2010). "Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure." Applied Microbiology and Biotechnology **86**(6): 1671-1692.
- Cruickshank, S. M., A. J. Daugulis, et al. (2000). "Dynamic modeling and optimal fed-batch feeding strategies for a two-phase partitioning bioreactor." Biotechnology and Bioengineering **67**(2): 224-233.
- Czajka, C. P. and K. L. Londry (2006). "Anaerobic biotransformation of estrogens." Science of the Total Environment **367**(2-3): 932-941.
- Daugulis, A. J. (1997). "Partitioning bioreactors." Current Opinion in Biotechnology **8**(2): 169-174.
- Daugulis, A. J. (2001). "Two-phase partitioning bioreactors: A new technology platform for destroying xenobiotics." Trends in Biotechnology **19**(11): 457-462.
- Daugulis, A. J., B. G. Amsden, et al. (2003)a. "Delivery of benzene to *Alcaligenes xylosoxidans* by solid polymers in a two-phase partitioning bioreactor." Biotechnology Letters **25**(14): 1203-1207.
- Daugulis, A. J. and N. G. Boudreau (2003)b. "Removal and destruction of high concentrations of gaseous toluene in a two-phase partitioning bioreactor by *Alcaligenes xylosoxidans*." Biotechnology Letters **25**(17): 1421-1424.
- De Carvalho, C. C. C. R. and M. M. R. Da Fonseca (2005). "The remarkable *Rhodococcus erythropolis*." Applied Microbiology and Biotechnology **67**(6): 715-726.
- De Gussemé, B., B. Pycke, et al. (2009). "Biological removal of 17 α -ethinylestradiol by a nitrifier enrichment culture in a membrane bioreactor." Water Research **43**(9): 2493-2503.
- De Mes, T., G. Zeeman, et al. (2005). "Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α - ethinylestradiol in STPs for domestic wastewater." Re-views in Environmental Science and Biotechnology **4**(4): 275-311.
- Desbrow, C., E. J. Routledge, et al. (1998). "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening." Environmental Science and Technology **32**(11): 1549-1558.
- Déziel, E., Y. Comeau, et al. (1999). "Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds." Biodegradation **10**(3): 219-233.

- Ding, W. H. and C. C. Chiang (2003). "Derivatization procedures for the detection of estrogenic chemicals by gas chromatography/mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **17**(1): 56-63.
- Fahrbach, M., J. Kuever, et al. (2006). "Denitratisoma oestradiolicum gen. nov., sp. nov., a 17 β -oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**(7): 1547-1552.
- Fahrbach, M., J. Kuever, et al. (2008). "Steroidobacter denitrificans gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **58**(9): 2215-2223.
- Feng, X., S. Ding, et al. (2005). "Degradation of estrone in aqueous solution by photo-Fenton system." Science of the Total Environment **345**(1-3): 229-237.
- Ferreira, N. P. and R. P. Tracey (1984). "Numerical taxonomy of cholesterol-degrading soil bacteria." Journal of Applied Bacteriology **57**(3): 429-446.
- Fromme, H., T. Kuehler, et al. (2002). "Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment." Water Research **36**(6): 1429-1438.
- Fujii, K., S. Kikuchi, et al. (2002). "Degradation of 17 β -estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan." Applied and Environmental Microbiology **68**(4): 2057-2060.
- Fujii, K., N. Urano, et al. (2001). "Sphingomonas cloacae sp. nov., a nonylphenol-degrading bacterium isolated from wastewater of a sewage-treatment plant in Tokyo." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**(2): 603-610.
- Fukuhara, T., S. Iwasaki, et al. (2006). "Adsorbability of estrone and 17 β -estradiol in water onto activated carbon." Water Research **40**(2): 241-248.
- Gao, F. and A. J. Daugulis (2009). "Bioproduction of the aroma compound 2-phenylethanol in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor system by *Kluyveromyces marxianus*." Biotechnology and Bioengineering **104**(2): 332-339.
- Gabriel, F. L. P., W. Giger, et al. (2005)a. "Differential degradation of nonylphenol isomers by *Sphingomonas xenophaga* Bayram." Applied and Environmental Microbiology **71**(3): 1123-1129.
- Gabriel, F. L. P., A. Heidlberger, et al. (2005)b. "A novel metabolic pathway for degradation of 4-nonylphenol environmental contaminants by *Sphingomonas xenophaga* Bayram: ipso-hydroxylation and intramolecular rearrangement." Journal of Biological Chemistry **280**(16): 15526-15533.

- Gardin, H., J. M. Lebeault, et al. (1999). "Biodegradation of xylene and butyl acetate using an aqueous-silicon oil two-phase system." Biodegradation **10**(3): 193-200.
- Gómez, M. J. , et al. (2007). "Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast." Chemosphere **66**(6): 993-1002.
- Guieysse, B. and C. B. Mattiasson (2001). "Microbial degradation of phenanthrene and pyrene in a two-liquid phase-partitioning bioreactor." Applied Microbiology and Biotechnology **56**(5-6): 796-802.
- Gustafsson, J. Å. (1999). "Estrogen receptor β - A new dimension in estrogen mechanism of action." Journal of Endocrinology **163**(3): 379-383.
- Haiyan, R., J. Shulan, et al. (2007). "Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 α -ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5." Chemosphere **66**(2): 340-346.
- Hall, J. M., J. F. Couse, et al. (2001). "The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling." Journal of Biological Chemistry **276**(40): 36869-36872.
- Hanselman, T. A., D. A. Graetz, et al. (2003). "Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review." Environmental Science and Technology **37**(24): 5471-5478.
- Heisterkamp, I., J. Gandrass, et al. (2004). "Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC-MS: A tool for identifying estrogenic compounds in water samples?" Analytical and Bioanalytical Chemistry **378**(3): 709-715.
- Holbrook, R. D., J. T. Novak, et al. (2002). "Estrogen receptor agonist fate during wastewater and biosolids treatment processes: A mass balance analysis." Environmental Science and Technology **36**(21): 4533-4539.
- Huang, C. H. and D. L. Sedlak (2001). "Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(1): 133-139.
- Huber, M. M., S. Canonica, et al. (2003). "Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes." Environmental Science and Technology **37**(5): 1016-1024.
- Ivanov, V., J. J. W. Lim, et al. (2010). "Biodegradation of estrogens by facultative anaerobic iron-reducing bacteria." Process Biochemistry **45**(2): 284-287.

- Jiang, L., J. Yang, et al. (2010). "Isolation and characteristics of 17 β -estradiol-degrading *Bacillus* spp. strains from activated sludge." Biodegradation **21**(5): 729-736.
- Jiménez, B. (1997). "Environmental effects of endocrine disruptors and current methodologies for assessing wildlife health effects." TrAC - Trends in Analytical Chemistry **16**(10): 596-606.
- Jobling, S., M. Nolan, et al. (1998). "Widespread sexual disruption in wild fish." Environmental Science and Technology **32**(17): 2498-2506.
- Johnson, A. C. and J. P. Sumpter (2001). "Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works." Environmental Science and Technology **35**(24): 4697-4703.
- Kanaly, R. A., S. Harayama, et al. (2002). "Rhodanobacter sp. strain BPC1 in a benzo[a]pyrene-mineralizing bacterial consortium." Applied and Environmental Microbiology **68**(12): 5826-5833.
- Kang, J. H., Y. Katayama, et al. (2006). "Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals." Toxicology **217**(2-3): 81-90.
- Ke, J., W. Zhuang, et al. (2007). "Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium." Applied Microbiology and Biotechnology **75**(5): 1163-1171.
- Koh, Y. K. K., T. Y. Chiu, et al. (2008). "Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater." Environmental Technology **29**(3): 245-267.
- Kohler, A., M. Schuttoff, et al. (1994). "Enhanced biodegradation of phenanthrene in a biphasic culture system." Biodegradation **5**(2): 93-103.
- Kozłowska-Tylingo, K., J. Namieśnik, et al. (2010). "Determination of estrogenic endocrine disruptors in environmental samples-a review of chromatographic methods." Critical Reviews in Analytical Chemistry **40**(3): 194-201.
- Kuch, H. M. and K. Ballschmiter (2000). "Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **366**(4): 392-395.
- Lafortune, I., P. Juteau, et al. (2009). "Bacterial diversity of a consortium degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid phase biosystem." Microbial Ecology **57**(3): 455-468.
- Lai, K. M., M. D. Scrimshaw, et al. (2002). "Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*." Applied and Environmental Microbiology **68**(2): 859-864.

- Langston, W. J., G. R. Burt, et al. (2005). "Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment." Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **85**(1): 1-31.
- LeBlanc, G. A., X. Mu, et al. (2000). "Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean daphnia magna." Environmental Health Perspectives **108**(12): 1133-1138.
- Lee, H. B. and D. Liu (2002). "Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria." Water, Air, and Soil Pollution **134**(1-4): 353-368.
- Lintelmann, J., A. Katayama, et al. (2003). "Endocrine disruptors in the environment: (IUPAC technical report)." Pure and Applied Chemistry **75**(5): 631-681.
- Lobos, J. H., T. K. Leib, et al. (1992). "Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a gram-negative aerobic bacterium." Applied and Environmental Microbiology **58**(6): 1823-1831.
- Lye, C. M., C. L. J. Frid, et al. (1999). "Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the U.K. Tyne and Tees estuaries." Environmental Science and Technology **33**(7): 1009-1014.
- Mackenzie, C. A., A. Lockridge, et al. (2005). "Declining sex ratio in a First Nation community." Environmental Health Perspectives **113**(10): 1295-1298.
- MacLachy, D. L. and G. J. Van Der Kraak (1995). "The phytoestrogen β -sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish." Toxicology and Applied Pharmacology **134**(2): 305-312.
- Malinowski, J. J. (2001). "Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology." Biotechnology Advances **19**(7): 525-538.
- Mazellier, P., L. Méité, et al. (2008). "Photodegradation of the steroid hormones 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinylestradiol (EE2) in dilute aqueous solution." Chemosphere **73**(8): 1216-1223.
- Morrish, J. L. E. and A. J. Daugulis (2008). "Improved reactor performance and operability in the biotransformation of carveol to carvone using a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor." Biotechnology and Bioengineering **101**(5): 946-956.
- Mueller, S. O. (2004). "Xenoestrogens: Mechanisms of action and detection methods." Analytical and Bioanalytical Chemistry **378**(3): 582-587.

- Muller, M., D. Patureau, et al. (2010). "Molecular and kinetic characterization of mixed cultures degrading natural and synthetic estrogens." Applied Microbiology and Biotechnology **85**(3): 691-701.
- Muñoz, R., M. Chambaud, et al. (2008). "A systematic selection of the non-aqueous phase in a bacterial two liquid phase bioreactor treating α -pinene." Applied Microbiology and Biotechnology **79**(1): 33-41.
- Munro, D. R. and A. J. Daugulis (1997). "The isolation of a degradation intermediate during the biphasic fermentation of pentachlorophenol." Resource and Environmental Biotechnology **2**(1): 1-18.
- Nalin, R., P. Simonet, et al. (1999). "Rhodanobacter lindaniclasticus gen. nov., sp. nov., a lindane-degrading bacterium." International Journal of Systematic Bacteriology **49**(1): 19-23.
- Nakanishi, A., M. Tamai, et al. (2002). "Adsorption characteristics of bisphenol A onto carbonaceous materials produced from wood chips as organic waste." Journal of Colloid and Interface Science **252**(2): 393-396.
- Nie, Y., Z. Qiang, et al. (2009). "Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1216**(42): 7071-7080.
- Patyna, P. J., R. A. Davi, et al. (1999). "A proposed multigeneration protocol for Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors." Science of the Total Environment **233**(1-3): 211-220.
- Pauwels, B., K. Wille, et al. (2008). " 17α -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17β -estradiol and estriol." Biodegradation **19**(5): 683-693.
- Peña, L., P. Garcia, et al. (2006). "Histopathological and immunohistochemical findings in lymphoid tissues of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*)."
Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases **29**(2-3): 114-126.
- Prpich, G. P. and A. J. Daugulis (2004). "Polymer development for enhanced delivery of phenol in a solid - Liquid two-phase partitioning bioreactor." Biotechnology Progress **20**(6): 1725-1732.
- Prpich, G. P. and A. J. Daugulis (2006). "Biodegradation of a phenolic mixture in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor." Applied Microbiology and Biotechnology **72**(3): 607-615.

- Quijano, G., M. Hernandez, et al. (2009). "Two-phase partitioning bioreactors in environmental biotechnology." Applied Microbiology and Biotechnology **84**(5): 829-846.
- Quintana, J. B., J. Carpinteiro, et al. (2004). "Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection." Journal of Chromatography A **1024**(1-2): 177-185.
- Rahman, M. F., E. K. Yanful, et al. (2009). "Endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment: Implications for the drinking water industry and global environmental health." Journal of Water and Health **7**(2): 224-243.
- Reemtsma, T. (2003). "Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants." Journal of Chromatography A **1000**(1-2): 477-501.
- Rehmann, L. and A. J. Daugulis (2007)a. "Biodegradation of biphenyl in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor." Biochemical Engineering Journal **36**(3): 195-201.
- Rehmann, L., B. Sun, et al. (2007)b. "Polymer selection for biphenyl degradation in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor." Biotechnology Progress **23**(4): 814-819.
- Rehmann, L., G. P. Prpich, et al. (2010). "Remediation of PAH contaminated soils: Application of a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor." Chemosphere.
- Rocha-Rios, J., S. Bordel, et al. (2009). "Methane degradation in two-phase partition bioreactors." Chemical Engineering Journal **152**(1): 289-292.
- Routledge, E. J., D. Sheahan, et al. (1998). "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach." Environmental Science and Technology **32**(11): 1559-1565.
- Rutishauser, B. V., M. Pesonen, et al. (2004). "Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(4): 857-864.
- Sacher, F., F. T. Lange, et al. (2001). "Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany." Journal of Chromatography A **938**(1-2): 199-210.

- Sanderson, T. and M. Van Den Berg (2003). "Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway." Pure and Applied Chemistry **75**(11-12): 1957-1971.
- Servos, M. R., D. T. Bennie, et al. (2005). "Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants." Science of the Total Environment **336**(1-3): 155-170.
- Shappell, N. W., L. O. Billey, et al. (2007). "Estrogenic activity and steroid hormones in swine wastewater through a lagoon constructed-wetland system." Environmental Science and Technology **41**(2): 444-450.
- Shi, J., S. Fujisawa, et al. (2004). "Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*." Water Research **38**(9): 2322-2329.
- Shi, J. H., Y. Suzuki, et al. (2002). Isolation and characterization of the ethynylestradiol-biodegrading microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1. Water Science and Technology. **45**: 175-179.
- Snyder, S. A., E. C. Wert, et al. (2006). "Ozone oxidation of endocrine disruptors and pharmaceuticals in surface water and wastewater." Ozone: Science and Engineering **28**(6): 445-460.
- Snyder, S. A., P. Westerhoff, et al. (2003). "Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: Implications for the water industry." Environmental Engineering Science **20**(5): 449-469.
- Soliman, M. A., J. A. Pedersen, et al. (2004). "Rapid gas chromatography-mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water." Journal of Chromatography A **1029**(1-2): 223-237.
- Spivack, J., T. K. Leib, et al. (1994). "Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A. Rearrangements and stilbene cleavage in bisphenol A metabolism." Journal of Biological Chemistry **269**(10): 7323-7329.
- Staples, C. A., P. B. Dorn, et al. (1998). "A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A." Chemosphere **36**(10): 2149-2173.
- Stasinakis, A. S., C. I. Kordoutis, et al. (2010). "Removal of selected endocrine disruptors in activated sludge systems: Effect of sludge retention time on their sorption and biodegradation." Bioresource Technology **101**(7): 2090-2095.
- Stumm-Zollinger, E. and G. M. Fair (1965). "Biodegradation of steroid hormones." Journal of the Water Pollution Control Federation **37**(11): 1506-1510.

- Svenson, A., A. S. Allard, et al. (2003). "Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants." Water Research **37**(18): 4433-4443.
- Swedenborg, E., J. Rüegg, et al. (2009). "Endocrine disruptive chemicals: Mechanisms of action and involvement in metabolic disorders." Journal of Molecular Endocrinology **43**(1): 1-10.
- Tanghe, T., W. Dhooge, et al. (1999). "Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol." Applied and Environmental Microbiology **65**(2): 746-751.
- Tapiero, H., G. Nguyen Ba, et al. (2002). "Estrogens and environmental estrogens." Biomedicine and Pharmacotherapy **56**(1): 36-44.
- Ternes, T. A., M. Stumpf, et al. (1999). "Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil." Science of the Total Environment **225**(1-2): 81-90.
- Tilton, F., W. H. Benson, et al. (2002). "Evaluation of estrogenic activity from a municipal wastewater treatment plant with predominantly domestic input." Aquatic Toxicology **61**(3-4): 211-224.
- Tomei, M. C., M. C. Annesini, et al. (2008). "Biodegradation of 4-nitrophenol in a two-phase sequencing batch reactor: Concept demonstration, kinetics and modelling." Applied Microbiology and Biotechnology **80**(6): 1105-1112.
- Tsai, W. T. (2006). "Human health risk on environmental exposure to bisphenol-A: A review." Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews **24**(2): 225-255.
- Tsuchiya, Y., M. Nakajima, et al. (2005). "Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human." Cancer Letters **227**(2): 115-124.
- Tyler, C. R., S. Jobling, et al. (1998). "Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence." Critical Reviews in Toxicology **28**(4): 319-361.
- Vader, J. S., C. G. Van Ginkel, et al. (2000). "Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge." Chemosphere **41**(8): 1239-1243.
- Vandermeer, K. D. and A. J. Daugulis (2007). "Enhanced degradation of a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons by a defined microbial consortium in a two-phase partitioning bioreactor." Biodegradation **18**(2): 211-221.
- Van Groenestijn, J. W. and M. E. Lake (1999). "Elimination of alkanes from off-gases using biotrickling filters containing two liquid phases." Environmental Progress **18**(3): 151-155.

- Villemur, R., E. Déziel, et al. (2000). "Two-liquid-phase slurry bioreactors to enhance the degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil." Biotechnology Progress **16**(6): 966-972.
- Vos, J. G., E. Dybing, et al. (2000). "Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation." Critical Reviews in Toxicology **30**(1): 71-133.
- Weber, S., P. Leuschner, et al. (2005). "Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture." Applied Microbiology and Biotechnology **67**(1): 106-112.
- Westerhoff, P., Y. Yoon, et al. (2005). "Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes." Environmental Science and Technology **39**(17): 6649-6663.
- Witorsch, R. J. (2000). "Endocrine disruption: A critical review of environmental estrogens from a mechanistic perspective." Toxic Substance Mechanisms **19**(1): 53-78.
- Xiao, X. Y., D. V. McCalley, et al. (2001). "Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives." Journal of Chromatography A **923**(1-2): 195-204.
- Yang, M., M. S. Park, et al. (2006). "Endocrine disrupting chemicals: Human exposure and health risks." Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews **24**(2): 183-224.
- Ying, G. G., B. Williams, et al. (2002). "Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - A review." Environment International **28**(3): 215-226.
- Yoshimoto, T., F. Nagai, et al. (2004). "Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants." Applied and Environmental Microbiology **70**(9): 5283-5289.
- Yu, C. P., H. Roh, et al. (2007). "17 β -estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge." Environmental Science and Technology **41**(2): 486-492.
- Zeng, Q., Y. Li, et al. (2009). Sorption and biodegradation of 17 β -estradiol by acclimated activated sludge under anaerobic conditions. 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE 2009, Beijing.

Zhang, C., G. Zeng, et al. (2007). "Aerobic degradation of bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste." Chemosphere **68**(1): 181-190.

Zhang, F., M. J. Bartels, et al. (2004). "Quantitation of 17 α -ethinylestradiol in aquatic samples using liquid-liquid phase extraction, dansyl derivatization, and liquid chromatography/positive electrospray tandem mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **18**(22): 2739-2742.