

**Étude du devenir de l'azote et évaluation de la toxicité produite par
l'oxydation par voie humide sur des composés pharmaceutiques
d'intérêt environnemental**

par

Mégane Moreau

Mémoire présentée au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES, UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Juillet 2023

Juillet 2023

*le jury a accepté le mémoire de madame Mégane Moreau
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Pedro Alejandro Segura
Directeur de recherche
Département de chimie

Professeur Philippe Dauphin Ducharme
Président rapporteur
Département de chimie

Professeure Jean-Philippe Bellenger
Évaluateur interne
Faculté des sciences

« Tout est poison, rien n'est poison : c'est la dose qui fait le poison » —

Paracelse (1541)

SOMMAIRE

La présence des composés pharmaceutiques dans l'environnement est un enjeu de santé de plus en plus préoccupant. En effet, à la suite de la consommation de médicaments dédiés à la santé animale et humaine, ces derniers ne sont pas totalement métabolisés, puis se retrouvent dans l'environnement, résistant donc aux traitements d'épuration conventionnels. Le biote, étant exposé à ces contaminants émergents, subit donc des effets négatifs tels qu'un stress oxydatif, une réduction de l'activité, des retards de développement ou bien la féminisation des espèces (Bio, Nunes, 2020; De Lange et al., 2006; Foster et al., 2010; Gagne et al., 2011). Avec l'avancement de la science et de la médecine moderne, la consommation en composés pharmaceutique ne fait qu'augmenter. Dans les centres hospitaliers, il est possible de retrouver une grande charge de ces composés pharmaceutiques en raison de leur utilisation et sont donc relâchés dans les eaux usées. Ainsi, les effluents hospitaliers ont été sélectionnés afin d'étudier l'élimination de ces contaminants par l'oxydation par voie humide, un procédé d'oxydation avancé. Toutefois, les effluents produits sont toxiques et ne peuvent pas être directement relâchés dans l'environnement (Boucher et al., 2021; Zou et al., 2007).

Il en est donc convenu d'opter sur l'identification et la quantification des produits de transformation afin d'identifier la source de cette toxicité afin d'optimiser les conditions réactionnelles. Guerette et al. (2021) a donc identifié et quantifié quatre acides carboxyliques (acide acétique, formique, glycolique et succinique) majoritairement formés lors de l'oxydation par voie humide des effluents hospitaliers. Lors de ce projet, l'évaluation de la toxicité de ces produits de transformation a été évaluée en plus du suivi des produits de transformation contenant de l'azote. Lors de l'étude de la toxicité aiguë des acides carboxyliques, il s'est avéré que, lorsque le pH des solutions est contrôlé avec l'aide d'un tampon carbonate, ces acides carboxyliques ne causent pas la toxicité observée.

C'est alors que le premier objectif de ce travail prend tout son importance. En effet, le premier objectif de ce projet est de déterminer le devenir de l'azote lors de l'oxydation par voie humide des composés pharmaceutiques étant donné que le devenir du carbone est déjà connu. Ensuite, le second objectif de ce projet est d'effectuer l'évaluation de la toxicité des

échantillons traités par OVH afin de comprendre la provenance de la toxicité créée à la suite du traitement OVH des composés pharmaceutiques.

En premier lieu, les trois composés pharmaceutiques à l'étude sont le diclofénac, la gabapentine et le triméthoprim. Ces derniers ont été sélectionnés en fonction de leur structure ainsi que de leur élimination lors des procédés d'épuration conventionnels et lors de l'OVH (Boucher et al., 2021; Escher et al., 2011). Ces trois molécules ont donc été traitées par oxydation par voie humide dans les mêmes conditions réactionnelles que Boucher et al. (2021) et Guerette et al. (2021). Quant à l'identification des produits de transformation de l'azote organique, trois produits de transformation, généralement retrouvés dans la littérature, ont été sélectionnés. Il s'agit de l'aniline, l'éthylamine ainsi que la diéthylamine. Seulement l'éthylamine a été quantifiée en faible concentration, soit de $380 \mu\text{g L}^{-1}$ pour une concentration de 306 mg L^{-1} de triméthoprim traité par OVH. Ensuite, ce projet s'est concentré sur la quantification des produits de transformation azotés inorganiques, soit l'azote ammoniacal (qui peut induire une toxicité aigüe chez les organismes aquatiques) (Environnement et Lutte contre les changements climatiques, 2020). Pour une concentration de 258 mg L^{-1} pour le diclofénac, de 280 mg L^{-1} pour la gabapentine et de 306 mg L^{-1} pour le triméthoprim, les concentrations en azote ammoniacal sont respectivement de $12,3 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$, de $24,1 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ et de $753 \pm 6 \text{ mg L}^{-1}$. Toutefois, les concentrations initiales en composés pharmaceutiques (traités par oxydation par voie humide) étaient de $1501 \mu\text{g L}^{-1}$ à $1676 \mu\text{g L}^{-1}$. Lorsque les concentrations en azote ammoniacal quantifiées sont rapportées aux concentrations en composés pharmaceutiques testés à l'aide de *Daphnia magna* ($1501 \mu\text{g L}^{-1}$ à $1676 \mu\text{g L}^{-1}$), ces valeurs d'azote ammoniacal sont environ 620 fois plus petites que la concentration effective médiane de l'ammonium ($31 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$). Étant donné ce grand écart entre les valeurs d'azote ammoniacal produites et la CE_{50} , la source de la toxicité ne provient donc pas essentiellement de la production d'azote ammoniacale à la suite du traitement d'oxydation par voie humide.

Afin d'atteindre le second objectif, soit d'effectuer l'évaluation de la toxicité des échantillons traités par OVH, une évaluation du pouvoir oxydant des échantillons traités a été effectuée, en plus des bioessais avec *Daphnia magna*. La méthode d'évaluation du

pouvoir oxydant est une méthode développée à l'aide de la technologie de la désorption thermique par laser diode couplée à la spectrométrie de masse, plus précisément, un triple quadripôle (LDTD-QqQMS). Cette méthode se base sur la nitration de la tyrosine lorsqu'un oxydant est mélangé avec une source de nitrate (NaNO_3). La méthode ultra rapide de quantification de la tyrosine et de la nitrotyrosine permet d'obtenir une limite de détection de $2,90 \mu\text{g L}^{-1}$ et de $4,91 \mu\text{g L}^{-1}$ et une précision de 8,51 % et de 7,55 % sur les valeurs de contrôle qualité bas ($33,9 \mu\text{g L}^{-1}$) de la tyrosine ainsi que de la nitrotyrosine respectivement. Toutefois, à l'aide de cette méthode, aucun pouvoir oxydant n'a été observé. La provenance de la toxicité observée serait donc encore une avenue à explorer pour le devenir de ce projet.

Afin d'assurer une implantation viable du réacteur, il faut s'assurer que l'OVH, placée en amont des stations d'épurations conventionnelles, ne causerait de nuisances pour les consortiums de bactéries et que les rejets à la sortie des stations d'épuration respectent les normes de rejets environnementaux. Les retombées de ce projet permettent donc d'établir que les composés azotés ciblés, susceptible de causer une toxicité, ne sont pas responsables de la toxicité observée. Les composés d'azote inorganique ciblés sont éliminables lors des étapes de nitrification et de dénitrification des consortiums bactériens des stations d'épurations conventionnelles. Toutefois, une partie de la toxicité demeure toujours inconnue.

Mots clés : Toxicité, produits de dégradation, oxydation par voie humide, devenir de l'azote, oxydants, spectrométrie de masse

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire de maîtrise en chimie n'aurait pas été possible sans l'aide, les conseils, et le temps de certaines personnes que je tiens à remercier. Tout d'abord, je tiens à adresser mes sincères remerciements mon directeur de recherche, Professeur Pedro Alejandro Segura pour m'avoir offert l'opportunité de développer mes compétences au sein de son laboratoire de recherche, de guider mes réflexions et de me prodiguer des conseils tout au long des deux dernières années. Je tiens également à remercier toute l'équipe du professeur Segura, plus particulièrement Cassandra Guérette, qui m'a guidée dès mon entrée au laboratoire et qui m'a permis de devenir autonome et compétente.

Je remercie le personnel de soutien de l'Université de Sherbrooke, particulièrement Philippe Venne, coordonnateur de laboratoires de spectroscopie de masse, René Gagnon, coordonnateur des laboratoires d'enseignement et des laboratoires de spectroscopie et chromatographie, et Michel Trottier, technicien de laboratoire, pour leurs précieux conseils ainsi que pour les formations afin d'utiliser l'instrumentation analytique au département de chimie.

Je tiens à témoigner ma gratitude pour l'équipe Phytronix technologies qui m'ont accueilli pour mon stage dans leurs locaux et qui m'ont permis d'utiliser leur laboratoire et leur instrumentation. Je tiens spécialement à remercier Serge Auger, mon superviseur de stage, pour ses précieux conseils. Je remercie également BioTalent Canada, sans qui le stage chez Phytronix technologies n'aurait pas été possible.

Je tiens à remercier le programme FONCER Technologies environnementales de décontamination et gestion intégrée des eaux et effluents résiduels (TEDGIEER) pour leur aide financière ainsi que pour l'organisation de l'école d'été et de nombreux colloques.

Je remercie le Centre de transfert technologique en écologie industrielle (CTTÉI) de Sorel-Tracy pour le support financier pour les déplacements ainsi que pour l'utilisation du réacteur d'oxydation par voie humide. Je tiens à remercier Pascal Lemoine, Sophie Girard et Said Adi également du CTTÉI pour leur aide précieuse et leurs conseils.

Finalement, je tiens à témoigner de ma gratitude à ma famille qui m'a supporté tout au long de mon parcours scolaire et spécialement à mon conjoint qui m'a offert un support inconditionnel tout au long de ma maîtrise et sans lequel je n'aurai pu terminer ce programme.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	IV
REMERCIEMENTS	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES	XIV
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1. THÉORIE.....	11
1. 1. Procédés d'oxydation avancés	11
1. 2. Oxydation par voie humide.....	11
1. 2. 1. Champs d'applications de l'oxydation par voie humide (OVH)	11
1. 2. 2. Fonctionnement physique du réacteur d'OVH	12
1. 2. 3. Réactions radicalaires	12
1. 2. 4. Minéralisation	13
1. 3. Produits de dégradation azotés retrouvés dans la littérature	13
1. 4. Relations entre le pouvoir oxydant et le stress oxydatif	17
1. 4. 1. Stress oxydatif.....	17
1. 4. 2. Sources exogènes d'oxydants	17
1. 5. Effets aigus de la toxicité	18
CHAPITRE 2. MÉTHODOLOGIE	20
2. 1. Oxydation par voie humide.....	20
2. 1. 1. Réacteur d'oxydation par voie humide	20
2. 1. 2. Choix des composés pharmaceutiques et concentrations traitées	21
2. 1. 3. Conditions expérimentales.....	22
2. 2. Suivi de l'élimination des composés pharmaceutiques	22
2. 3. Demande chimique en oxygène	26
2. 4. Quantification des produits de transformation.....	26
2. 4. 1. Analyse ciblée des acides carboxyliques par GC-MS	26
2. 4. 1. 1. Acides carboxyliques volatils	26
2. 4. 1. 2. Acides carboxyliques semi-volatils	29

2. 4. 2. Analyse ciblée des produits de transformation azotés organiques par LC-MS	31
2. 4. 2. 1. Contrôle et assurance qualité	34
2. 4. 3. Quantification des produits de transformation azotés inorganiques à l'aide d'une électrode sélective à l'azote ammoniacal.....	36
2. 4. 3. 1. Vérification de l'électrode	36
2. 4. 3. 2. Préparation des solutions et échantillons	36
2. 5. Quantification de l'azote ammoniacal par spectrophotométrie	37
2. 6. Évaluation de la toxicité produite par oxydation par voie humide	38
2. 6. 1. Évaluation du pouvoir oxydant d'un effluent	38
2. 6. 1. 1. Analyses statistiques	42
2. 6. 1. 1. 1. Deux groupes et moins.....	42
2. 6. 1. 1. 2. Trois groupes et plus	42
2. 6. 2. Bioessais avec <i>Daphnia magna</i>	42
2. 6. 2. 1. Solutions de composés pharmaceutiques.....	45
2. 6. 2. 2. Solution d'acides carboxyliques	46
2. 6. 2. 3. Solution d'ammoniac	46
CHAPITRE 3. SUIVI DE L'ÉLIMINATION DES COMPOSÉS	
PHARMACEUTIQUES, IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES	
PRODUITS DE DÉGRADATION AZOTÉS GÉNÉRÉS LORS DE	
L'OXYDATION PAR VOIE HUMIDE DES COMPOSÉS	
PHARMACEUTIQUES.....	48
3. 1. Résultats et discussion	48
3. 1. 1. Suivi de l'élimination de composés pharmaceutiques par OVH	48
3. 1. 2. Suivi de la diminution de la demande chimique en oxygène.....	51
3. 1. 3. Quantification des produits de transformation acides carboxyliques lors du traitement des composés pharmaceutiques par oxydation par voie humide.	53
3. 1. 3. 1. Développement de méthode.....	56
3. 1. 3. 2. Problématiques.....	56
3. 1. 3. 3. Validation de la méthode de quantification des produits de transformation azotés organiques	56

3. 1. 4. Quantification des produits de transformation azotés inorganiques lors du traitement des composés pharmaceutiques par oxydation par voie humide	59
3. 1. 5. Mesure de la conductivité ainsi que du pH des composés pharmaceutiques traités par OVH	63
CHAPITRE 4. ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ GÉNÉRÉE LORS DU	
TRAITEMENT DE COMPOSÉS PHARMACEUTIQUES PAR OXYDATION	
PAR VOIE HUMIDE.....	65
4. 1. Résultats et discussion	65
4. 1. 1. Évaluation du pouvoir oxydant d'échantillons traités par oxydation par voie humide	65
4. 1. 1. 1. Développement de méthode.....	66
4. 1. 1. 2. Validation de la méthode	69
4. 1. 1. 3. Analyses d'échantillons dopés.....	71
4. 1. 2. Évaluation de la toxicité aiguë sure <i>Daphnia magna</i> d'échantillons traités par OVH	72
CONCLUSION.....	80
BIBLIOGRAPHIE.....	83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Normes de rejets des effluents municipaux au Québec (Gouvernement du Québec, 2022)	3
Tableau 2. Comparaison de différents procédés d'oxydation avancés	7
Tableau 3. Produits de transformations azotés retrouvés dans la littérature	15
Tableau 4. Mesures de toxicologie	19
Tableau 5. Expériences d'oxydation par voie humide au CTTÉI.....	22
Tableau 6. Paramètres MS pour le suivi de l'élimination des composés pharmaceutiques par LC-QqQMS	25
Tableau 7. Paramètre MS de la méthode de quantification des acides carboxyliques volatils par GC-MS.....	28
Tableau 8. Paramètre MS de la méthode de quantification des acides carboxyliques semi-volatils par GC-MS	30
Tableau 9. Gammes de linéarité pour les amines organiques à l'étude	31
Tableau 10. Gradient chromatographique pour l'analyse des amines organiques par LC-QqQMS.....	33
Tableau 11. Paramètres MS pour la quantification des produits de transformations azotés organiques par LC-QqQMS.....	35
Tableau 12. Préparation de la droite d'étalonnage.....	37
Tableau 13. Paramètres de la méthode de l'acide salicylique modifiée pour l'analyse de l'azote ammoniacal par la spectrophotométrie.	38
Tableau 14. Paramètres MS pour la quantification de la tyrosine et de la nitrotyrosine par LDTD-QqQMS	41
Tableau 15. Préparation des solutions tests du contrôle qualité de dichromate de potassium	44
Tableau 16. Préparation des solutions tests des composés pharmaceutiques à 1 500 µg L ⁻¹	45
Tableau 17. Préparation des solutions tests des composés pharmaceutiques traités par OVH à une concentration initiale de 1 500 µg L ⁻¹	45

Tableau 18. Préparation des solutions test des acides carboxyliques (acide acétique, acide formique, acide glycolique et acide succinique) à pH contrôlé	46
Tableau 19. Préparation des solutions tests d'ammoniac à pH contrôlé.....	47
Tableau 20. Validation de la méthode de suivi de l'élimination des composés pharmaceutiques par LC-QqQMS	49
Tableau 21. Taux d'élimination des composés pharmaceutiques à l'étude par OVH	50
Tableau 22. Quantification des acides carboxyliques dans les échantillons traités par oxydation en voie humide.....	54
Tableau 23. Ratio des acides carboxyliques à la suite de l'OVH	55
Tableau 24. Validation de la méthode de quantification des amines organiques par LC-QqQMS	58
Tableau 25. Quantification des amines organiques de petite taille dans les échantillons traités par OVH.	58
Tableau 26. Comparaison des méthodes de quantification de l'azote ammoniacal	60
Tableau 27. Mesure de conductivité et de pH des échantillons traités par OVH.	63
Tableau 28. Détermination de la stabilité de la nitrotyrosine et de la tyrosine ($n=6$)	69
Tableau 29. Validation de la méthode de quantification de la tyrosine et de la nitrotyrosine par LDTD-QqQMS.....	70

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Traitements présents dans une station d'épuration conventionnelle	2
Figure 2. Structures des molécules sélectionnées pour le développement de méthode en GC-MS ainsi qu'en LC-MS.....	16
Figure 3. Réacteur d'oxydation par voie humide. A) contrôleur ; B) cuve de réaction et chauffage ; C) sonde de température et agitateur ; D) air comprimé ; E) valve de prélèvement.....	20
Figure 4. Sélection des composés pharmaceutiques	21
Figure 5. Rampe de température du GC-MS lors de l'analyse des acides carboxyliques volatils.....	28
Figure 6. Rampe de température du GC-MS lors de l'analyse des acides carboxyliques semi-volatils.....	30
Figure 7. Schéma de la désorption thermique par diode laser (Schéma inspiré de Shimadzu [LDTD Ion Source]. A) plaque LazWell 96 puits ; B) diode laser ; C) gaz porteur ; D) ionisation chimique à pression atmosphérique ; E) décharge couronne ; F) spectromètre de masse	40
Figure 8. Patron laser lors de l'analyse par LDTD-QqQMS	41
Figure 9. Bioessais avec <i>D. magna</i>	44
Figure 10. Demande chimique en oxygène des échantillons avant ainsi qu'après traitement d'oxydation par voie humide.	51
Figure 11. Diminution de la demande chimique en oxygène lors du traitement des composés pharmaceutiques par oxydation par voie humide.....	52
Figure 12. Équivalent molaire de la conversion des composés pharmaceutiques en azote ammoniacal.	60
Figure 13. Méthode d'évaluation du pouvoir oxydant de l'échantillon de composé pharmaceutique traité par OVH. A) Formation de la peroxyinitrite ; B) Prélèvement de la peroxyinitrite ; C) Nitration de la tyrosine ; D) Prélèvement de l'échantillon ; E) Dilution de l'échantillon ; F) Dépôt de l'échantillon ; G) Analyse par LDTD-QqQMS.....	66
Figure 14. Stabilité de la peroxyinitrite après 48 heures et une semaine à -20 °C.....	67

Figure 15. Temps optimal de la nitration de la tyrosine	68
Figure 16. Consommation de la tyrosine à la suite de l'arrêt du réacteur d'OVH par l'oxydant ($n=8$) ; A) Suivi en fonction de la tyrosine; B) Suivi en fonction de la nitrotyrosine	71
Figure 17. Détermination de la concentration effective médiane pour A) le diclofénac ; B) la gabapentine ; C) le triméthoprim.....	74
Figure 18. Toxicité observée chez <i>D. magna</i> après 48 heures d'exposition.....	75
Figure 19. Toxicité aiguë observée lorsque le crustacé <i>D. magna</i> est exposé au mélange d'acides organiques (acides acétique, formique, glycolique, succinique).	76
Figure 20. Détermination de la concentration effective médiane de l'ammonium.....	77

INTRODUCTION

Les produits pharmaceutiques sont des contaminants émergents que l'on trouve de plus en plus dans les eaux usées. Les contaminants dans l'environnement sont le résultat de la consommation croissante de médicaments pour la santé humaine et animale. L'existence de ces composés pharmaceutiques dans l'environnement intéresse donc à la fois la communauté scientifique et le grand public (Brooks et al., 2012; Daniels et al., 2020). De plus, la présence de ces produits pharmaceutiques signifie que les organismes aquatiques sont en contact à ces composés xénobiotiques (Abhilash, 2012; Brooks et al., 2012). Par conséquent, cette exposition peut conduire à de la bioaccumulation et ainsi accroître l'exposition humaine à ces nouveaux contaminants (Abhilash, 2012; Brooks et al., 2012; Gros et al., 2006). L'étude de la présence de ces produits pharmaceutiques dans les eaux usées et les eaux de surface permet ainsi de déterminer le degré d'exposition et permet également d'étudier l'élimination de ces composés xénobiotiques de l'environnement par des procédés chimiques, biologiques et physiques.

I. 1. Les effluents hospitaliers

Parmi les différentes sources de pharmaceutiques dans l'environnement, les hôpitaux occupent une place importante en raison de la grande consommation de médicaments par nombre de personnes. En effet, selon l'étude de Escher et al. (2011) en Suisse, un pays industrialisé, près du tiers de la charge de composés pharmaceutique se retrouvant à la station d'épuration d'une ville ayant une population de 54 000 âmes provenait d'un hôpital ayant une capacité de 338 lits. L'administration de médicaments aux patients hospitalisés ainsi que la métabolisation de ces drogues au sein de la même institution permettent d'expliquer la différence de concentrations entre les eaux usées municipales et hospitalières. Les mécanismes de métabolisation de ces drogues dans l'organisme permettent d'expliquer la présence des composés parents dans l'effluent hospitalier. En effet, plusieurs composés pharmaceutiques tels que le triméthoprimé ainsi que la morphine sont faiblement métabolisés. Entre 40 % et 69 % du triméthoprimé demeure inchangé. En ce qui concerne la morphine, plus de 70 % de la molécule parent est excrétée par l'organisme (Jjemba, 2006). De plus, il faut tenir compte de la diversité de drogues contenues dans les effluents

hospitaliers, effectivement, ces effluents contiennent une multitude de composés qui ne sont administrés que dans les hôpitaux. Des agents radioactifs, traitement oncologique, des médicaments de sédation sont principalement utilisés dans les centres hospitaliers et se retrouveront donc excrétés dans les eaux usées (Castegnaro, Hansel, 2006; Santos et al., 2013). Il est possible de retrouver de la sulfaméthoxazole, un antibiotique, de la metformine, un hypoglycémiant, ainsi que de l'acétaminophène, un analgésique, et à des concentrations aussi élevées que $113,64 \mu\text{g L}^{-1}$, $211,25 \mu\text{g L}^{-1}$ et $374,9 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivement, dans des effluents hospitaliers (Oliveira et al., 2015). Ensuite, ces effluents sont dirigés vers les stations d'épurations municipales où plusieurs traitements physiques, chimiques et biologiques sont effectués.

I. 2. Traitements des effluents municipaux au Québec

Le but initial d'une installation d'épuration des eaux usées est de « réduire les risques pour la santé humaine et de l'environnement » (Gouvernement du Canada, 2020). Il ne faut donc pas que les rejets humains et industriels perturbent l'environnement aquatique. Trois traitements peuvent être présents dans les stations d'épuration du Québec, soit le traitement primaire, le traitement secondaire, puis le traitement tertiaire (figure 1).

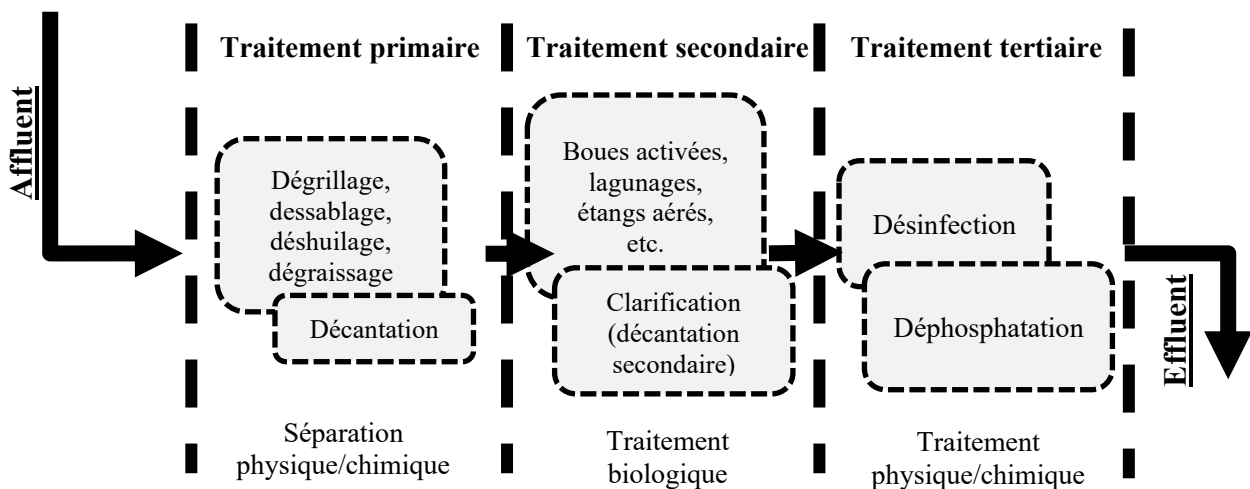


Figure 1. Traitements présents dans une station d'épuration conventionnelle

Les normes de rejets environnementaux à la sortie des stations d'épurations se constituent de critères chimiques et biologiques. L'un des critères qui sont généralement utilisés lors du traitement des eaux usées est la demande biochimique en oxygène après 5 jours (DBO₅). Cette mesure permet d'évaluer la quantité d'oxygène requise pour oxyder la matière organique (végétale, animal, etc.), de même que la matière inorganique (sulfures, sels ferreux, etc.) dans un échantillon aqueux (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2014). Le tableau (tableau 1) suivant compile les paramètres surveillés par les autorités québécoises lorsqu'il est question de traitement des eaux usées.

Tableau 1. Normes de rejets des effluents municipaux au Québec (Gouvernement du Québec, 2022)

Paramètres		Norme québécoise
DBO ₅	Demande biochimique en oxygène sur 5 jours	Inférieur ou égal à 25 mg/L
MES	Matières en suspension	Inférieure ou égal à 25 mg/L
pH	Potentiel hydrogène	6,0 à 9,5
Toxicité aiguë	Concentration effective médiane avec <i>Oncorhynchus mykiss</i> et <i>Daphnia magna</i>	Ne dois pas affecter plus de 50 % de la population

La demande chimique en oxygène (DCO) est également l'un des critères permettant d'estimer le niveau de polluants présent dans les effluents et qui est utilisé dans les traitements des eaux usées. Cette mesure permet d'évaluer la « quantité d'oxygène requise pour oxyder la matière organique et inorganique oxydable contenue dans un échantillon » (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2016). Cette mesure est également utile pour identifier le traitement approprié et effectuer le suivi de l'efficacité du traitement. Ensuite, l'indice de biodégradabilité est un indicateur afin d'établir si l'effluent à traiter sera adéquatement dégradé par le traitement biologique (Abdalla, Hammam, 2014). Cet indice est donc le ratio DBO₅/DCO (Abdalla, Hammam, 2014; Saravanathamizhan, Perarasu, 2021). Si le ratio est supérieur à 0,5, l'effluent sera facilement biodégradable, alors que s'il se situe entre 0,4 et 0,5, la biodégradabilité de l'effluent

sera moyenne (Saravanathamizhan, Perarasu, 2021). Pour un ratio se situant entre 0,2 et 0,4, le traitement biologique ne sera pas suffisant afin d'éliminer les contaminants (Saravanathamizhan, Perarasu, 2021). L'utilisation de certains prétraitements chimiques et physiques permet de modifier l'indice de biodégradabilité et ainsi d'augmenter la biodégradabilité de l'effluent par le traitement secondaire (Saravanathamizhan, Perarasu, 2021). Bien que plusieurs traitements physiques, chimiques et biologiques sont présents afin de retirer les contaminants, certains composés pharmaceutiques se sont révélés résistants à ces traitements. En effet, le métoprolol, un bêtabloquant, démontre des taux d'élimination de moins de 20 % et le diclofénac, un anti-inflammatoire non stéroïdien, démontre des taux d'élimination entre 21 % et 50 % dans des stations d'épuration conventionnelles (de Jesus Gaffney et al., 2017).

I. 3. Effets écotoxicologiques des composés pharmaceutiques

Bien que les stations d'épurations soient en mesure d'abaisser considérablement la DCO et le taux de matière en suspension dans un effluent, ces traitements ne sont actuellement pas adaptés à des fins d'élimination des composés pharmaceutiques (de Jesus Gaffney et al., 2017; Zhang et al., 2016). C'est pourquoi il est possible de retrouver des concentrations environnementales en composés pharmaceutiques de l'ordre du nanogramme par litre (ng/L) au microgramme par litre (µg/L) (Sathishkumar et al., 2020). Même à des concentrations environnementales, plusieurs effets ont été observés sur le biote lorsqu'exposés à ces contaminants. En effet, l'exposition aux antibiotiques dans les eaux usées hospitalières contribue aux gènes de résistances d'une communauté bactérienne (Rowe et al., 2017). La résistance aux antibiotiques est une problématique qui ne peut être prise à la légère. Effectivement, selon un rapport de l'Agence de la santé publique du Canada (2021), il y a une accentuation de la résistance de plusieurs infections, ce qui entraîne un traitement de la maladie beaucoup plus difficile. Entre 2015 et 2019, une augmentation de 57 % a été observée pour la résistance de *Staphylococcus aureus* à la méticilline (Agence de la santé publique du Canada, 2021). Bien que la résistance aux antibiotiques soit un facteur inquiétant, d'autres composés pharmaceutiques présents dans les eaux de surface et les effluents sont préoccupants. De fait, l'ibuprofène, un analgésique, a un effet observable sur le comportement de *Gammarus pulex*, un crustacé, dès une concentration de 10 ng L⁻¹, en réduisant

son activité (De Lange et al., 2006). La fluoxétine, un psychotrope utilisé pour le traitement de l'état dépressif, la boulimie et les troubles obsessionnels compulsifs (TOC), peut causer des retards de développement chez *Rana pipiens*, la grenouille léopard, lorsqu'exposé à des concentrations environnementales (entre $0,012 \text{ ug L}^{-1}$ et $0,099 \text{ ug L}^{-1}$) (Foster et al., 2010). Ces retards de développement peuvent donc provoquer un déclin de la population (Foster et al., 2010).

I. 4. Solutions proposées pour l'élimination des contaminants émergents dans les effluents hospitaliers

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, plusieurs effets sont observés à la suite de l'exposition à des concentrations environnementales des composés pharmaceutiques sur le biote. Il en convient donc qu'il faut s'assurer de retirer ces contaminants émergents, des contaminants récemment découverts et/ou surveillés, des effluents avant leur introduction dans l'environnement. Les solutions proposées afin de pallier ce problème sont l'utilisation de procédés d'oxydation avancés (POA ou Advanced Oxidation Process, AOP, en anglais) (Office québécois de la langue française, 2011). Ces technologies se basent sur la réactivité des radicaux libres, tels que les radicaux hydroxyles ($\text{HO}^\bullet$), les anions radicalaires superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), les radicaux hydroperoxydes ($\text{OH}_2^\bullet$) ou bien les radicaux alkoxydes ($\text{RO}^\bullet$), afin de dégrader la matière organique (Kanakaraju et al., 2018). Plusieurs procédés d'oxydation avancés sont disponibles sur le marché et d'autres sont en cours de développement. Toutefois, ces derniers peuvent être coûteux ou bien nécessitent l'utilisation de produits chimiques. Le tableau comparatif suivant (tableau 2) présente différents POA.

L'utilisation de méthodes combinant le peroxyde d'hydrogène ainsi que des rayons ultraviolets (UV), permettant d'obtenir une bonne diminution de la demande chimique en oxygène (DCO), mais ces dernières produisent des effluents toxiques et nécessitent l'utilisation de produits chimiques (Kanakaraju et al., 2018; Qiu et al., 2019). En ce qui concerne l'utilisation de catalyseurs métallique, ces derniers engendrent des coûts élevés et la diminution de la demande chimique en oxygène n'est pas aussi grande que celle observée avec l'oxydation par voie humide. L'oxydation par voie humide permet d'éliminer les produits pharmaceutiques en injectant de l'air agissant à

titre d'oxydant dans un réacteur en conditions sous-critique. Il est possible d'obtenir ces conditions sous-critiques en effectuant le traitement dans un contenant hermétique sous pression et chauffé, lorsque le traitement est effectué en lots. Toutefois, l'OVH ne nécessite pas l'ajout de produits chimiques, diminue considérablement la DCO et le coût d'utilisation n'est pas si élevé, comparativement à l'utilisation de catalyseurs.

Tableau 2. Comparaison de différents procédés d'oxydation avancés

Caractéristiques	Fenton (Kanakaraju et al., 2018)	H₂O₂/UV (Kanakaraju et al., 2018)	Photocatalyse (Kanakaraju et al., 2018)	Oxydation par voie humide (Boucher et al., 2021)
Ajout de produits chimiques	FeSO ₄ ; H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	Catalyseur métallique	Aucun
Production d'effluent toxique	Oui (Qiu et al., 2019)	Oui (Qiu et al., 2019)	Oui (Silva et al., 2016)	Oui (Boucher et al., 2021)
Coût d'utilisation	4,00 USD/m ³ ^{a.}	400,00 USD/m ³ ^{a.}	2284,00 USD/m ³ ^{a.}	27,00 CAD/m ³ ^{b.}
Efficacité moyenne (diminution de la DCO ^{c.})	50 % (Tekin et al., 2006)	60 % (Sindelar et al., 2014)	30 % (Dialynas et al., 2008)	95 % (Debellefontaine, Foussard, 2000)

a. Retrait du phénol (diminution de la DCO de 80 %) (Qiu et al., 2019) ; b. Diminution de la DCO des effluents hospitaliers (Boucher et al., 2021) ; c. Diminution de la DCO

I. 5. État de l'art sur l'OVH non catalytique

Le procédé d'oxydation avancé sélectionné pour ce projet est donc l'oxydation par voie humide (OVH) non catalytique. Ce dernier nécessite peu de coûts d'exploitation (27 \$ CAD/m³ d'eau traité) pour un débit de 86 L min⁻¹ d'eaux usées traitées et aucun produit chimique n'est introduit dans le système afin de dégrader la matière organique présente dans l'effluent (Boucher et al., 2021). Il faut tout de même tenir compte des dépenses en capital (investissement) afin d'implanter un tel système. Ces investissements sont estimés à 2 350 000 CAD (Boucher et al., 2021). Au moment que l'oxydant est injecté dans le réacteur, des radicaux hydroxyles sont formés. Ces derniers peuvent alors, à leur tour, réagir avec la matière organique et dégrader les composés pharmaceutiques.

Lors d'études précédentes, ce réacteur s'est montré très prometteur. Effectivement, pour les composées pharmaceutiques testées, ces derniers ont été dégradés à plus de 99 % (Boucher et al., 2021). De fait, la carbamazépine, un anticonvulsivant, ainsi que le triméthoprim, un antibiotique, sont habituellement dégradés à des taux moyens de moins de 10 % et de moins de 50 %, respectivement dans les stations d'épuration conventionnelles (Lin et al., 2009; Zhang et al., 2008). L'utilisation d'un POA, permet d'augmenter l'efficacité d'élimination de ces composés. En effet, lorsque le traitement d'OVH est appliqué sur les effluents hospitaliers, la carbamazépine et le triméthoprim sont dégradés à plus de 99,8 % après 20 minutes de temps de résidences dans le réacteur (Boucher et al., 2021). L'OVH permet d'obtenir une grande efficacité d'élimination sans y ajouter de produits chimiques (voir Tableau 2). L'application principale de l'OVH serait alors d'être utilisée comme prétraitement à la sortie des centres hospitaliers afin de réduire la DCO et d'éliminer les composés pharmaceutiques qui y sont présents.

Ayant prouvé l'efficacité de l'OVH sur des composés pharmaceutiques retrouvés dans les effluents hospitaliers, des bioessais de toxicité ont été effectués afin de vérifier si ce traitement est sans danger pour l'environnement aquatique (Boucher et al., 2021). Les bioessais, qui permettent l'évaluation de la toxicité aiguë des effluents traités, sont des tests normés. *Aliivibrio fischeri*, une

bactérie bioluminescente, permettant de déterminer la concentration effective à 20 % et à 50 % de la population, provient du test BioToxWaterTox Standard Kit formulé selon les normes ISO 11348-3. *Daphnia magna*, un crustacé, permettant de déterminer la concentration effective médiane de l'effluent à l'étude, est conforme aux lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement économique n° 202 (OECD, 2004). Les résultats présentés dans Boucher et al. (2021) permettent de conclure qu'il y a une augmentation de la toxicité aiguë après traitement OVH auprès de ces deux organismes tests.

À la lumière des résultats présentés dans Boucher et al. (2021), l'oxydation par voie humide formerait donc des produits de transformation toxique pour *Aliivibrio fischeri* et *Daphnia magna*. Afin de permettre l'implantation de ce traitement à l'exutoire des hôpitaux, la source de cette toxicité doit donc être identifiée. Guerette et al. (2021), a identifié et quantifié des acides carboxyliques formés lors de la dégradation de composés pharmaceutiques. Parmi les 14 acides carboxyliques sous investigation, quatre principaux acides carboxyliques ont pu être quantifiés dans les effluents traités par OVH, soit l'acide acétique, l'acide formique, l'acide glycolique et l'acide succinique (Guerette et al., 2021). Selon Guerette et al. (2021), ces quatre acides carboxyliques expliquent 39% de la DCO des effluents traités durant 25 min. Toutefois, 61% de la DCO demeure inconnue.

I. 6. Objectifs

L'OVH est une solution attrayante lorsqu'elle est appliquée en prétraitement des effluents hospitaliers afin d'éliminer les contaminants émergents tels que les composés pharmaceutiques. Toutefois, afin d'assurer une implantation viable de l'OVH en prétraitement des effluents hospitaliers, ces rejets doivent permettre la pérennité des traitements subséquents et être adéquatement traités dans les stations de traitement des eaux usées afin d'obtenir un rejet dans l'environnement exempt de risques pour la santé ainsi que l'environnement. Le devenir du carbone a été étudié par (Guérette, 2021). Ainsi, l'objectif de ce projet de recherche est donc d'identifier ainsi que de quantifier de nouveaux produits de dégradation azotés (devenir de l'azote), puis

d'effectuer l'évaluation de l'effet toxique de tous les produits de transformations quantifiés sur le crustacé *Daphnia magna*. Dans un premier temps, ce projet se centrera sur l'identification des produits de dégradations azotées, tant inorganiques qu'organiques, générés par l'OVH. Ces composés ont été peu étudiés à ce jour et pourraient être responsables de la toxicité observée (Guest, Varma, 1991; Thomulka, Lange, 1995). Dans un second temps, ce projet se centrera sur l'évaluation de la toxicité des effluents traités à l'aide du pouvoir oxydant ainsi que l'évaluation de la toxicité aiguë.

CHAPITRE 1. THÉORIE

1. 1. Procédés d'oxydation avancés

Les procédés d'oxydation avancés se basent sur la réactivité et la non-sélectivité du radical hydroxyle afin de dégrader la matière organique (Kanakaraju et al., 2018). Ces procédés sont donc en mesure de dégrader une vaste gamme de contaminants émergents qui subsistent aux traitements d'épuration conventionnels. L'efficacité d'élimination et leur pouvoir de transformer ces contaminants plus complexes en forme non toxique simple sont les raisons pourquoi l'utilisation de ces procédés est de plus en plus recherchée (Kanakaraju et al., 2018). Effectivement, de 1990 à 2018, le nombre de publications concernant le traitement des eaux usées par procédés d'oxydation avancés a radicalement augmenté (Garrido-Cardenas et al., 2019). Durant cette période, plus de 450 articles ont été publiés, alors qu'en 1990, aucun article concernant ces traitements avait été publié (Garrido-Cardenas et al., 2019).

1. 2. Oxydation par voie humide

1. 2. 1. Champs d'applications de l'oxydation par voie humide (OVH)

L'oxydation par voie humide (OVH), un POA, est un traitement conçu pour le traitement des eaux usées qui sont trop diluées à des fins d'incinération, mais trop concentrées pour le traitement biologique (Zou et al., 2007). Effectivement, les traitements biologiques ne sont pas adaptés pour traiter des effluents de plus de 10 000 mg L⁻¹ de DCO. L'OVH est également un traitement utilisé lorsque les contaminants sont peu biodégradables (Tungler et al., 2015). Un contaminant peu biodégradable ne sera pas dégradé lors du traitement secondaire dans une station d'épuration conventionnelle. En effectuant l'OVH en prétraitement, ces contaminants sont donc transformés en composés de forme plus simple et l'indice de biodégradabilité augmente (Tembhekar et al., 2015). Ainsi, ces contaminants pourront être traités par le traitement biologique à la station d'épuration. Les effluents hospitaliers n'ont pas une grande différence de DCO avec les effluents

municipaux. Ils peuvent atteindre 850 mg L^{-1} alors que les effluents municipaux peuvent atteindre une DCO de 500 mg L^{-1} , toutefois, ils contiennent des composés résistants aux traitements secondaires (Evens et al., 2001).

1. 2. 2. Fonctionnement physique du réacteur d'OVH

L'OVH se déroule en état sous-critique afin que l'oxydant, l'air, soit en mesure de créer des radicaux hydroxyles. Ainsi, en appliquant des températures élevées (entre 150 et 320°C) et une pression (entre 2 et 15 MPa), l'effluent dans le réacteur peut rester sous forme liquide (Zou et al., 2007). Lors de l'injection de l'air, contenant de l'oxygène qui agit à titre d'oxydant, la matière organique est donc oxydée et dégradée en molécules de structures moins complexes (Zou et al., 2007). Des raisons de sécurité expliquent le fait que le réacteur est opéré avec de l'air et non de l'oxygène pur. Les risques d'explosion sont donc réduits (Zou et al., 2007). De plus, le réacteur est adiabatique, ce qui veut dire qu'il n'y a pas de transfert de chaleur entre le réacteur et l'extérieur. Lorsque la phase aqueuse se vaporise, la chaleur est absorbée, toutefois, lorsque les molécules organiques, telles que les composés pharmaceutiques, sont oxydées ou bien hydrolysées, l'énergie est relâchée (Zou et al., 2007). Ainsi, lorsque la DCO est suffisamment élevée, il y a possibilité d'autosuffisance thermique du réacteur. L'autosuffisance thermique du réacteur tient compte du fait que l'énergie qui sera libérée lors de l'oxydation des eaux usées, ayant une DCO assez élevée, maintiendra la température du réacteur et déclenchera ensuite de nouvelles réactions d'oxydation.

1. 2. 3. Réactions radicalaires

Lors de l'OVH, trois types de réactions sont en jeu afin de dégrader la matière organique. La première étape qui va mener à la dégradation de la matière organique est l'étape d'initiation. Cette étape consiste en la formation de radicaux libres réactifs qui entameront la réaction d'oxydation. Plusieurs voies peuvent être réalisées afin d'obtenir le radical libre. Premièrement, la formation de radicaux libres peut être initiée par une seule molécule (tel que le dioxygène, l'eau et la matière

organique), mais l'initiation peut aussi être initiée par la réaction de deux molécules entre elles (l'eau et le dioxygène ainsi que la matière organique et le dioxygène) (Ingale et al., 1996; Rivas et al., 1998; Robert et al., 2002). L'étape de propagation est l'étape où les radicaux formés lors de l'initiation vont réagir avec la matière organique, l'eau ou bien l'oxygène afin de créer d'autres radicaux et de scinder la matière organique en plus petites molécules. C'est à cette étape que les radicaux formés sont très réactifs et non sélectifs, ce qui permet d'appliquer l'OVH à plusieurs types de contaminants environnementaux afin de les éliminer. Lors de l'étape de terminaison, les radicaux vont réagir ensemble afin de former un composé qui est moins réactif et de forme plus simple (acide carboxylique, oxygène, eau, produits de transformation).

1. 2. 4. Minéralisation

L'objectif principal de l'utilisation d'un procédé d'oxydation avancé est l'obtention de la minéralisation. Lorsque la minéralisation complète est atteinte, les molécules plus complexes, telles que les composés pharmaceutiques, sont transformées en molécules inorganiques sous leur forme la plus simple (Bridgham, Ye, 2013). Du dioxygène, de l'eau, des nitrates, des nitrites, de l'ammoniac, du méthane, des sulfates et des acides halogénés sont alors formés. En ce qui concerne l'OVH, ce traitement est connu pour facilement transformer les composés d'azotes organiques en ammoniac, toutefois, la minéralisation n'est pas atteinte complètement (Zou et al., 2007). Dans le cas de l'OVH, tels qu'il est mentionné dans Boucher et al. (2021) ainsi que dans Guerette et al. (2021), la dégradation du carbone organique s'arrête à l'obtention de l'acide acétique, la minéralisation du carbone organique n'est donc pas atteinte.

1. 3. Produits de dégradation azotés retrouvés dans la littérature

En ce qui concerne l'oxydation par voie humide, peu de données sont disponibles quant aux produits de transformation générés lors du traitement de composés pharmaceutiques. Ainsi, plusieurs produits de transformation ont été sélectionnés à partir de ceux observés lors du traitement de composés pharmaceutiques par d'autres procédés d'oxydation avancés. Selon Zou

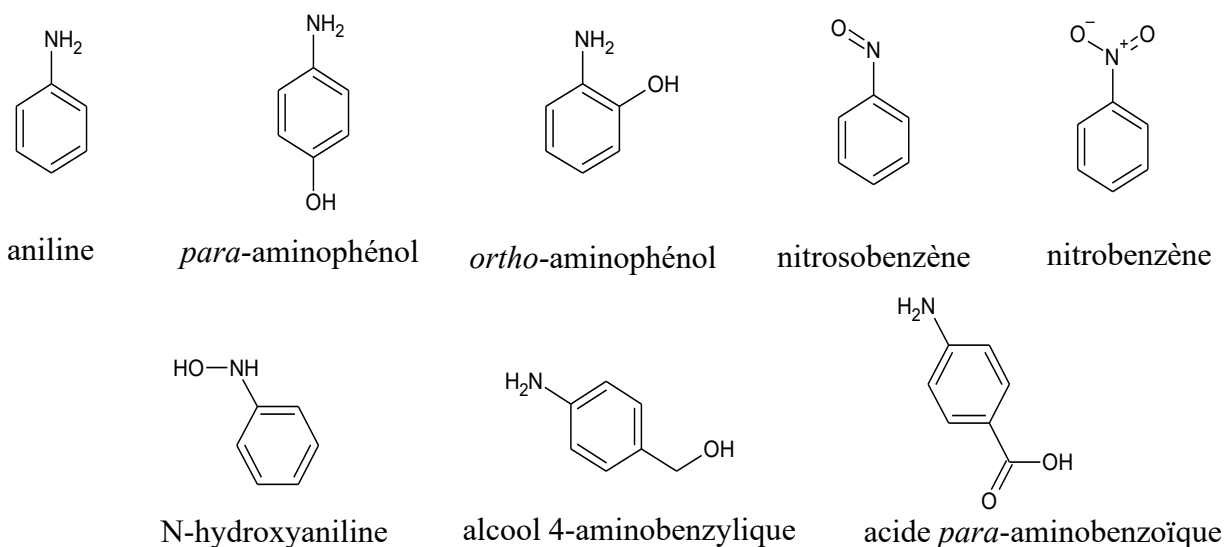
et al. (2007), le produit de transformation azoté formé lors de l'oxydation par voie humide est l'ammoniac.

Plusieurs articles présentent les principaux produits de dégradation des composés pharmaceutiques traités par différents POA (Bhat, Gogate, 2021; Giri, Golder, 2015; Lozano et al., 2022; Moctezuma et al., 2012; Vogna et al., 2004; Zou et al., 2007). Les produits de transformation généralement retrouvés sont l'éthylamine, la diéthylamine, la méthylamine, la diméthylamine, l'ammoniac, les nitrates et les aminophénols. La liste complète des produits de transformation se trouvent dans le tableau 3. À la lumière des résultats de ces recherches, la minéralisation complète est difficilement atteinte.

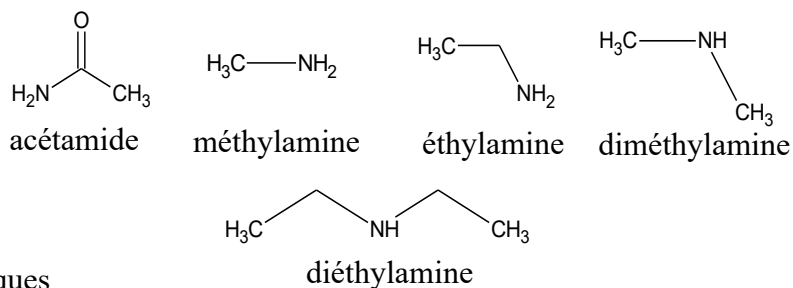
Tableau 3. Produits de transformations azotés retrouvés dans la littérature

Composé pharmaceutique	Produit de transformation	POA utilisé	Source
Paracétamol	<i>para</i> -aminophénol ; acétamide	<i>para</i> -nitrophénol ; Photocatalyse (TiO ₂ /UV)	(Moctezuma et al., 2012)
Carbamazépine	acide <i>para</i> -aminobenzoïque	UV/H ₂ O ₂	(Vogna et al., 2004)
Chloramphénicol	<i>para</i> -aminophénol, <i>ortho</i> -aminophénol, acide <i>para</i> -nitrobenzoïque, nitrobenzène, 4- nitrocathécol, ammoniac, nitrate	Photo-Fenton	(Giri, Golder, 2015)
Ciprofloxacine	éthylamine, ammoniac, nitrate	Photo-Fenton	(Giri, Golder, 2015)
Dipyrrone	éthylamine, ammoniac, nitrate	Photo-Fenton	(Giri, Golder, 2015)
Sulfadiméthoxine	ammoniac, nitrate	Électrodes BDD	(Lozano et al., 2022)
Sulfaméthazine	ammoniac, nitrate	Électrodes BDD	(Lozano et al., 2022)
Sulfamérazine	ammoniac, nitrate	Électrodes BDD	(Lozano et al., 2022)
Sulfadiazine	ammoniac, nitrate	Électrodes BDD	(Lozano et al., 2022)
Sulfathiazole	ammoniac, nitrate	Électrodes BDD	(Lozano et al., 2022)
Aniline	nitrobenzène, nitrosobenzène, <i>para</i> - aminophénol,	Ozonation, photocatalyse, Fenton	(Bhat, Gogate, 2021)
Diméthylamine	méthylamine	Catalyse	(Bhat, Gogate, 2021)
N-nitrosodiéthylamine	diéthylamine, diméthylamine, diéthylamine, éthylamine, nitrate	UV ; UV/O ₃	(Bhat, Gogate, 2021)

Les produits de transformation les plus simples et les plus récurrents ont donc été sélectionnés. La figure ci-dessous (figure 2) présente les produits de transformations qui ont été sélectionnés afin de développer une méthode de quantification par GC-MS ainsi que par LC-MS.



Amines aromatiques



Amines aliphatiques

Amines inorganiques

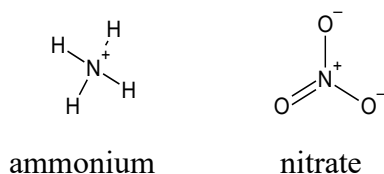


Figure 2. Structures des molécules sélectionnées pour le développement de méthode en GC-MS ainsi qu'en LC-MS.

1. 4. Relations entre le pouvoir oxydant et le stress oxydatif

1. 4. 1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un état dans lequel se retrouve un organisme vivant. Lorsqu'il est question de stress oxydatif, il est important de mentionner les sources d'oxydants et comment les organismes vivants se défendent contre cette attaque. Plusieurs espèces chimiques sont responsables de causer un état de stress oxydatif. En effet, les espèces réactives en oxygène (ROS) et les espèces réactives en azote (RNS) sont deux grandes catégories d'oxydants pour les organismes vivants. En ce qui concerne les espèces réactives en oxygène, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi que les radicaux hydroxyles sont les principaux oxydants dont il est question dans la littérature (Storz, Imlay, 1999). Par la suite, les espèces réactives en azotes principalement mentionnées sont le monoxyde d'azote (NO), le peroxydinitrite ($^{\bullet}ONOO$) ainsi que les nitrothiols (RSNO) (Storz, Imlay, 1999). Un organisme entre donc dans un état de stress oxydatif lorsqu'il y a un déséquilibre entre les oxydants (radicaux libres) ainsi que les antioxydants présents au sein de ce vivant (Adwas et al., 2019).

1. 4. 2. Sources exogènes d'oxydants

Plusieurs sources de polluants environnementaux, tels que les radiations solaires (UVA), certains métaux lourds (fer, arsenic, cuivre, cadmium, nickel), l'ozone et la pollution atmosphérique peuvent être responsables d'accroître la production d'espèces réactives en oxygène dans les cellules du vivant (Sharifi-Rad et al., 2020). Pour l'être humain, des actions du quotidien vont contribuer à l'exposition croissante de ROS telles que fumer la cigarette, consommer de l'alcool et la consommation récréative de drogues (Adwas et al., 2019; Agarwal et al., 2012; Agarwal et al., 2014; Sharifi-Rad et al., 2020). Pour les organismes aquatiques, les contaminants environnementaux, tels que l'acide perfluorooctanesulfonique (PFOS), des insecticides (perméthrine), des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), peuvent induire un stress oxydatif chez ces derniers (Hellou et al., 2012; Silvestre, 2020). Lors de l'OVH, plusieurs ROS sont formés afin de dégrader la matière organique (Rivas et al., 1998). Toutefois, il reste à

découvrir si ces composés oxydants persistent à la suite de l'arrêt du réacteur d'oxydation par voie humide. L'importance de se pencher sur la formation de ROS et de RNS durant l'OVH provient du fait qu'il ne faut pas ajouter une source exogène d'oxydant dans l'environnement. Bien que les ROS et RNS peuvent être dommageables pour l'organisme, ils ne sont pas que dangereux. Effectivement, naturellement, il y a présence de ROS produits par des mécanismes endogènes et servent de signaleurs au sein de l'organisme (Huang, Li, 2020; Mittler, 2017). Le danger est lorsque l'organisme n'est pas en mesure de maintenir l'homéostasie des composés oxydants (se défendre avec suffisamment d'antioxydants) (Rahman et al., 2012). C'est alors que ce dernier peut être affecté négativement par ces oxydants. Sur les vivants, le stress oxydatif peut causer des dommages à l'ADN, la nitration de la tyrosine sur les protéines, la peroxydation des lipides et des dommages à la membrane cellulaire (Adwas et al., 2019; Danielson, Andersen, 2008). Ces dommages peuvent donc « [entraver la morphologie et la physiologie] » des organismes aquatiques (Saikia, Chowdhury, 2020).

1. 5. Effets aigus de la toxicité

Il est question de toxicité aiguë lorsqu'un organisme est exposé qu'à une seule reprise, ou pendant une courte période, à un contaminant et qu'un effet est décelé peu de temps après l'exposition (Walum, 1998). Pour la toxicité aquatique, l'exposition est généralement d'une durée de moins de 4 jours (Van Coillie, Parent, 2015). En toxicologie, plusieurs termes sont utilisés afin de définir l'application et l'effet des contaminants sur le vivant. Le tableau suivant (tableau 4) permet de visualiser tous ces termes et leurs fonctions afin de déterminer l'effet des agents toxiques sur les organismes.

Tableau 4. Mesures de toxicologie

Mesure	Description	Toxicologie	Écotoxicologie	Effet	Population affectée
Dose létale (DL)	Dose administrée à des individus.	•		Effets létaux	50 %
Dose d'effet (DE) ou dose d'inhibition (DI)	Dose administrée à des individus.	•		Effets sublétaux	20 % ou 50 %
Concentration létale (CL)	Concentration environnementale du contaminant (eau, air et/ou sol).		•	Effets létaux	50 %
Teneur létale moyenne (TL ₅₀)	Concentration environnementale du contaminant dans l'air.		•	Effets létaux	50 %
Tolérance létale moyenne (TL _m)	Concentration environnementale du contaminant dans l'eau.		•	Effets létaux	50 %
Concentration d'effet (CE) ou concentration d'inhibition (CI)	Concentration environnementale du contaminant (eau, air et/ou sol).		•	Effets sublétaux	20 % ou 50 %

La concentration effective est utilisée comme indicateur pour les effets sublétaux (Van Coillie, Parent, 2015). Toutefois, comme il est mentionné dans Van Coillie et Parent (2015), dans la littérature scientifique, ce paramètre peut être associé à la concentration létale. En ce qui concerne les bioessais avec *D. magna* (Daphtoxkit F), l'effet observé est l'immobilité ainsi que la mortalité des crustacés. Ce sont donc des effets sublétaux et létaux qui sont observés. C'est pourquoi le terme « concentration effective (CE) » est utilisé comme descriptif.

CHAPITRE 2. MÉTHODOLOGIE

2. 1. Oxydation par voie humide

2. 1. 1. Réacteur d'oxydation par voie humide

Le traitement dont il est question dans ce projet est l'oxydation par voie humide non catalytique. Le réacteur utilisé est le réacteur en mode lot vertical de 420 mL provenant de TOP Industrie (France). Ce réacteur est fait sur mesure, selon les besoins du centre de transfert technologique. Ce réacteur se situe dans les locaux du Centre de transfert technologique en écologie industrielle (CTTÉI) à Sorel-Tracy, au Québec (figure 3).



Figure 3. Réacteur d'oxydation par voie humide. A) contrôleur ; B) cuve de réaction et chauffage ; C) sonde de température et agitateur ; D) air comprimé ; E) valve de prélèvement

2. 1. 2. Choix des composés pharmaceutiques et concentrations traitées

Les composés pharmaceutiques sélectionnés contiennent tous minimalement un atome d'azote afin de pouvoir étudier le devenir de l'azote après traitement OVH. Ces derniers ont été sélectionnés en fonction de leurs propriétés physiques, soit la présence de cycle aromatique ou non, le nombre d'atomes d'azote et en fonction de leur élimination lors d'essai d'oxydation par voie humide précédente (Boucher et al., 2021).

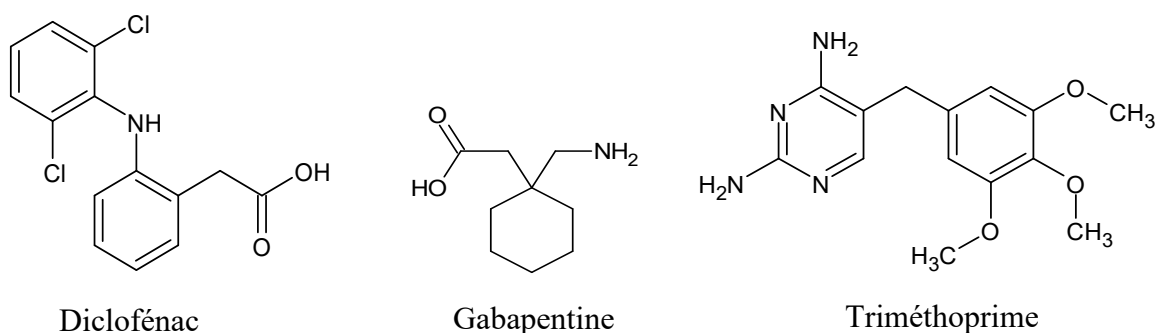


Figure 4. Sélection des composés pharmaceutiques

Le diclofénac (figure 4), un anti-inflammatoire a été sélectionné en raison de sa rapide élimination lors du traitement OVH, ainsi que de sa structure, soit la présence d'un cycle aromatique et la présence d'un atome d'azote. Lors d'essais OVH précédents, ce dernier a été éliminé à plus de 90 % lors du chauffage (température de 200 °C) (Boucher et al., 2021). La gabapentine (figure 4), un antiépileptique et un analgésique, a été sélectionnée en fonction de sa structure (aucun cycle aromatique, un atome d'azote). De plus, ce dernier est rapidement éliminé lors du traitement OVH. En effet, avant même d'injecter l'oxydant, soit à une température de 200 °C, la gabapentine est éliminée à plus de 99 % (Boucher et al., 2021). Finalement le triméthoprim (figure 4), un antibiotique, a été sélectionné pour son élimination lente lors de l'OVH. Le triméthoprim est éliminé à près de 100 % lorsque le réacteur est chauffé à 300 °C et que l'oxydant est injecté dans le réacteur. De plus, cette drogue contient quatre atomes d'azote. Ces trois molécules ont également été étudiées par Boucher et al. (2021) et Guerette et al. (2021). Les résultats obtenus pourront donc y être comparés, car les expériences OVH ont été effectuées dans les mêmes conditions expérimentales, mais dans un réacteur permettant un plus grand volume à traiter.

2. 1. 3. Conditions expérimentales

Le traitement des drogues par OVH s'est effectué au Centre de transfert technologique en écologie industrielle (CTTÉI), situé dans la ville de Sorel-Tracy. Premièrement, un volume maximal de 150 mL d'échantillon est introduit dans le réacteur. Le tableau suivant (tableau 5) présente les différentes expériences OVH réalisées.

Tableau 5. Expériences d'oxydation par voie humide au CTTÉI

Composé	Pureté	Numéro d'expérience	Concentration initiale mg L⁻¹	Demande chimie en oxygène réelle mg L⁻¹
Diclofénac	99,7 %	MPO-162	258	389
		MPO-163	1,676	-
Gabapentine	99,8 %	MPO-164	280	528,5
		MPO-165	1,676	-
Triméthoprim	99,8 %	MPO-167	1,501	-
		MPO-168	306	1840

Après avoir scellé le réacteur et mis en place les mesures de sécurité nécessaires, le chauffage débute. Le chauffage du système s'effectue graduellement jusqu'à l'atteinte d'une température de 285 °C. Lorsque cette température est atteinte, l'air est injecté à 10 N. L. Les réactions s'effectuant dans les réacteurs sont exothermiques ce qui permet l'atteinte d'une température de 290 °C dès la première minute de temps de résidence. Le temps de résidence total est de 20 minutes. Ensuite, le réacteur est refroidi afin de permettre un prélèvement sécuritaire et afin de récupérer l'échantillon traité sous forme liquide. Le prélèvement des aliquotes s'effectue par la valve de prélèvement manuellement.

2. 2. Suivi de l'élimination des composés pharmaceutiques

La méthode de suivi de l'élimination des composés pharmaceutiques a été tirée du mémoire de Guérette (2021). La méthode présentée dans Guérette (2021) est effectuée par désorption

thermique par diode laser (LDTD) couplée à la spectrométrie de masse (QqQMS). La méthode présentée dans les lignes suivantes a été adaptée afin de pouvoir effectuer le suivi de l'élimination des composés pharmaceutiques par chromatographie en phase liquide en tandem.

L'analyse par LC-MS pour le suivi de l'élimination des composés pharmaceutique s'est effectué à l'aide du système Acquity Ultra Performance LC (Waters, Massachusetts, États-Unis). La colonne utilisée est une colonne en phase inverse (C_{18}) de la compagnie Waters, soit une HSS T3 d'une dimension de particules de $1,8\ \mu\text{m}$ ($2,1\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$). Les phases mobiles utilisées afin de faire éluer les analytes sur la colonne et de les séparer sont composées d'eau et d'acide formique (0,1 %) pour la phase mobile A et de méthanol et d'acide formique (0,1 %) pour la phase mobile B. Les consommables sont de grade Optima LCMS et proviennent de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, États-Unis).

Toutes les solutions sont fraîchement préparées la journée de l'analyse. Les solutions mères de standards analytiques (gabapentine [99,8 %], diclofénac [99,7 %] ainsi que triméthoprim [99,8 %]) ont été préparées à des concentrations de $1000\ \text{mg L}^{-1}$ dans du méthanol de grade Optima LCMS (Fisher Scientific). Les solutions de calibration et de contrôles qualité ont été effectuées dans de l'eau de grade Optima LCMS (Fisher Scientific). Les solutions intermédiaires ont été préparées à des concentrations de $10\ \text{mg L}^{-1}$ et $2\ \text{mg L}^{-1}$ dans de l'eau de grade Optima LCMS (Fisher Scientific) pour les trois drogues à l'étude. Les concentrations de la droite de calibration se situent de $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ à $1500\ \mu\text{g L}^{-1}$. La concentration du contrôle qualité de basse concentration est de $150\ \mu\text{g L}^{-1}$. Celle du contrôle qualité moyen est de $750\ \mu\text{g L}^{-1}$. La concentration du contrôle qualité haut est de $1125\ \mu\text{g L}^{-1}$. Les standards analytiques utilisés proviennent de Sigma Aldrich (Missouri, États-Unis) (diclofénac, gabapentine, triméthoprim et gabapentine- d_{10}) et de DCN Isotopes (Québec, Canada) (diclofénac- d_3 , triméthoprim- d_4) et ont une pureté de plus de 98 %. Avant l'injection, 1 mL d'échantillon a été filtré sur un filtre en PTFE de $0,2\ \mu\text{m}$ Millex (Sigma Aldrich), puis transféré dans un vial ambré de 1,5 mL conçu pour les systèmes de chromatographie liquide. Par la suite, 10 μL de la solution de standard interne à 5,2 mg/L y sont ajoutés. La solution de standard interne se compose de diclofénac- d_4 (98 %, DCN Isotopes, Québec, Canada), de triméthoprim- d_3 (99,9 %, DCN Isotopes) et de gabapentine- d_{10} ($100\ \mu\text{g/mL}$ dans de méthanol, Sigma Aldrich). Ensuite, 5 μL d'échantillon est injecté dans le système de chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse (LC-QqQMS).

Afin de séparer les composés pharmaceutiques sur la colonne de chromatographie en phase liquide, un gradient est appliqué. Cette méthode chromatographique est tirée des travaux de Boucher et al. (2021). Initialement, l'équilibration de la colonne se fait avec 98 % de la phase mobile A et 2 % de la phase mobile B pendant trois minutes. Ensuite, la proportion de phases mobile B augmente à 100 % en sept minutes, puis maintient ce plateau pour deux minutes. Par la suite, pendant une minute, la proportion de la phase mobile B va redescendre à 2 % et ce plateau est maintenu pendant trois minutes.

La quantification du diclofénac, de la gabapentine ainsi que du triméthoprim est effectuée en utilisant un spectromètre de masse triple quadripôle (QqQMS). Le mode de mesure de réactions sélectionnées (en anglais, *Selected Reaction Monitoring*, SRM) est utilisé. Les transitions de quantification et de confirmation sont présentées dans le tableau ci-dessous (tableau 6).

Tableau 6. Paramètres MS pour le suivi de l'élimination des composés pharmaceutiques par LC-QqQMS

Composé	Polarité	Fenêtre d'acquisition (min)	Type de transition	Ion précurseur (m/z)	Ion produit (m/z)	Tension du cône (V)	Énergie de collision (V)
Diclofénac	+	6,5 à 10,5	Quantification	296	250	5	12
			Confirmation	296	215	5	19
Diclofénac-d ₄	+		Quantification	300	254	5	12
			Confirmation	300	219	5	19
Gabapentine	+	2,5 à 6,5	Quantification	172	137	20	15
			Confirmation	172	95	20	22
Gabapentine-d ₁₀	+		Quantification	182	164	10	15
			Confirmation	182	147	10	15
Triméthoprim	+	3,0 à 7,0	Quantification	291	230	30	22
			Confirmation	291	123	30	22
Triméthoprim-d ₃	+		Quantification	294	264	30	22
			Confirmation	294	123	30	22

2. 3. Demande chimique en oxygène

La méthode utilisée pour l'analyse de la demande chimique en oxygène est celle produite par le fabricant Hach Company (2021), approuvée par l'U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Les échantillons doivent être mélangés et homogénéisés avant l'analyse. Cette étape a été réalisée à l'aide d'un mélangeur vortex. 100 mL de l'échantillon est transféré dans un bécher de 250 mL et est agité à l'aide d'un agitateur magnétique. Après avoir préchauffé l'incubateur (DRB200, Hach, Colorado, États-Unis), 0,20 mL de l'échantillon est ajouté dans un vial de réaction de solution de digestion pour DCO (20 à 1500 mg L⁻¹) de la compagnie Hach contenant de l'acide sulfurique et du dichromate de potassium, l'agent oxydant. Après avoir bien refermé les vials, ces derniers sont agités par inversions. Après deux heures d'incubation (150°C) dans un réacteur DR2000, l'agent oxydant a réagi avec la matière organique et inorganique oxydable et est réduit en ion chromique (Cr³⁺), ce qui produit la coloration verte (Hach Company, 2021). Après la période d'incubation, l'analyse de la DCO se fait par spectrophotométrie à l'aide de l'appareil analyseur de la demande chimique en oxygène DR2700 de Hach. Les échantillons sont alors analysés par colorimétrie pour déterminer la valeur de la demande chimique en oxygène en mg L⁻¹ (Hach Company, 2021).

2. 4. Quantification des produits de transformation

2. 4. 1. Analyse ciblée des acides carboxyliques par GC-MS

La méthode utilisée afin de quantifier les quatre principaux acides carboxyliques formés lors de l'OVH des effluents hospitaliers a été tirée de Guerette et al. (2021). Les deux acides carboxyliques volatiles retenus sont l'acide acétique ainsi que l'acide formique. Pour les acides carboxyliques semi-volatiles sont l'acide glycolique ainsi que l'acide succinique.

2. 4. 1. 1. Acides carboxyliques volatils

Dues à une perte de sensibilité de l'appareil analytique, les plages de calibration ont été modifiées. Les solutions mères d'acide acétique (99,7 %, Sigma Aldrich) et d'acide formique (> 99 %, Thermo Fisher Scientific) ont toutes été effectuées dans de l'eau de grade LC-MS à une concentration de 10 g L⁻¹. Huit points de calibration, d'une concentration de 10 mg L⁻¹ à 200 mg L⁻¹

¹, ont été effectués dans de l'eau de grade LC-MS. Les contrôles qualité ont été préparés à une concentration de 30 mg L⁻¹, pour le contrôle qualité bas (QCL), de 60 mg L⁻¹ pour le contrôle qualité moyen (QCM) et de 1400 mg L⁻¹ pour le contrôle qualité de haute concentration (QCH). Aucune dilution n'a été effectuée pour les échantillons traités par oxydation par voie humide. La solution mère de standard interne (acide acétique-d₄, 99,27 %, Sigma Aldrich) a été préparée à une concentration de 100 mg L⁻¹ dans de l'eau de grade Optima LC-MS. Étant donné qu'aucun test de stabilité n'a été effectué, les solutions mères ont été fraîchement préparées lors de toutes les journées d'analyses.

Pour tous les échantillons, 200 µL ont été filtrés sur un filtre de PTFE de 0,20 µm (Millex, Sigma Aldrich), puis déposés dans un tube Eppendorf d'un volume de 2 mL (Safe Lock, Eppendorf, Hambourg, Allemagne). À ce tube de microcentrifugation de 2 mL a été ajouté un volume de 25 µL d'acide acétique-d₄ à 100 mg L⁻¹. Afin d'extraire les analytes en solutions, 25 µL d'acide chlorhydrique 1,2 N a été ajouté dans le tube Eppendorf. Tous les échantillons ont été mélangés à l'aide d'un agitateur vortex pendant 30 secondes. Ensuite, le solvant d'extraction le méthyl-*tert*-butyléther (MTBE) a été ajouté (600 µL) provenant de Thermo Fisher Scientific. Les échantillons ont été mélangés à l'aide d'un agitateur vortex pendant une minute. Afin d'aider à la séparation de phases, les échantillons ont été centrifugés à 6000 rpm pendant quatre minutes dans une microcentrifugeuse (Fisherbrand High-Speed Mini-Centrifuge, Thermo Fisher Scientific). Dans un second tube de microcentrifugation de 2 mL, 400 µL de la phase organique y ont été transférés. Une seconde extraction liquide-liquide est effectuée en ajoutant 400 µL de MTBE dans le premier tube à microcentrifugation. L'étape de mélange (1 minute) ainsi que de centrifugation (4 minutes) a été répétée, puis 400 µL de la phase organique ont été transférés dans le second tube Eppendorf. Afin de s'assurer qu'il ne reste plus d'eau dans la phase organique extraite, du Na₂SO₄ a été ajouté. Par la suite, 500 µL de la phase organique asséchée ont été filtrés sur un filtre en PTFE 0,20 µm (Millex). Cet extrait a, par la suite, été transféré dans un vial GC-MS de 2 mL (Chromatographic Specialties, Ontario, Canada), puis 100 µL de l'agent dérivant, le BSTFA avec 1 % de TMCS (Sigma Aldrich), ont été ajoutés à l'extrait. Pour l'analyse des échantillons, 1 µL a été injecté dans l'appareil GC-MS.

Les analyses en GC-MS ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse GC2012 et d'un spectromètre de masse QP2010S de Shimadzu (Kyoto, Japon). La colonne capillaire utilisée

est une HP-5MS de Agilent Technologies (Californie, États-Unis) d'une dimension de 30 m de long, de 0,25 mm de diamètre interne et d'une épaisseur de film de 0,25 μm . L'injecteur est programmé à une température de 250 °C et l'interface à une température de 300 °C. Le gaz porteur est de l'hélium et est programmé à un débit de 1 mL min⁻¹ et à une vitesse linéaire de 36,1 cm s⁻¹. L'analyse des acides carboxyliques volatils s'effectue en mode *split*, dans un ratio de 1 : 50. La rampe de température utilisée est présente dans la figure ci-dessous (figure 5). Un retour aux conditions initiales est effectué automatiquement après chacun des échantillons.

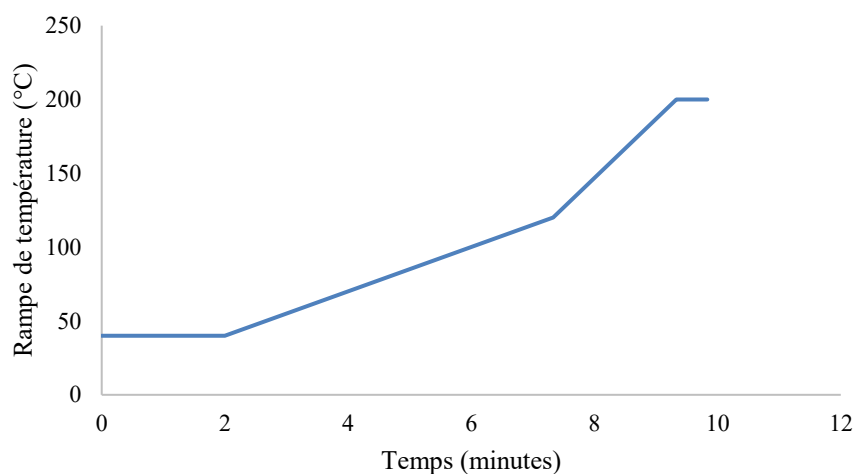


Figure 5. Rampe de température du GC-MS lors de l'analyse des acides carboxyliques volatils

Afin de quantifier les analytes, une méthode de suivi des ions sélectionnés (SIM en anglais, soit *selected ion monitoring*) est utilisée. L'ionisation est de l'impact électronique (EI), une ionisation dure, à 70 eV. Le tableau suivant (tableau 7) présente les ions de quantification ainsi que les ions de confirmation.

Tableau 7. Paramètre MS de la méthode de quantification des acides carboxyliques volatils par GC-MS

Composé	Temps de rétention (min)	Ion de quantification (m/z)	Ion de confirmation (m/z)
Acide acétique	3,13	117	75
Acide acétique-d ₄	3,10	120	76
Acide formique	2,31	103	75

2. 4. 1. 2. Acides carboxyliques semi-volatils

Cette méthode est également tirée de Guerette et al. (2021). Les solutions mères des acides carboxyliques semi-volatils ont été effectuées dans le méthanol à une concentration de 1000 mg L⁻¹. Dues à une perte de sensibilité de l'appareil analytique, les plages de calibration ont été modifiées. Par la suite, des solutions de travail, pour l'acide succinique et glycolique, à 100 mg L⁻¹ ont été effectuées dans de l'eau de grade LCMS. Les standards analytiques proviennent de Sigma Aldrich et ont une pureté respective de 99,5 % et de 99,8 % pour l'acide glycolique et pour l'acide succinique. Sept points de calibration, d'une concentration de 1 mg L⁻¹ à 15 mg L⁻¹, ont été effectués dans de l'eau de grade LCMS (Thermo Fisher Scientific). Les contrôles qualité ont été préparés à une concentration de 3 mg L⁻¹, pour le contrôle qualité bas (QCL), de 4,5 mg L⁻¹ pour le contrôle qualité moyen (QCM) et de 15 mg L⁻¹ pour le contrôle qualité de haute concentration (QCH). Les échantillons traités n'ont nécessité aucune dilution avant l'extraction des acides carboxyliques semi-volatils. La solution mère de standard interne d'acide succinique-d₄ (99 %, Sigma Aldrich) a été préparée à une concentration d'environ 1000 mg L⁻¹ dans du méthanol de grade LCMS (Thermo Fisher Scientific). Ensuite, des solutions intermédiaires et de travail de 100 mg L⁻¹ ainsi que de 46,6 mg L⁻¹, respectivement, ont été préparées dans du méthanol de grade LCMS (Thermo Fisher Scientific).

L'extraction des acides carboxyliques de l'eau est effectuée avant l'injection des échantillons dans le système GC-MS. D'abord, 500 µL d'échantillon ont été filtrés sur des filtres 0,20 µm en PTFE (Millex, Sigma Aldrich) puis déposés dans des tubes de verre. Par la suite, 30 µL du standard interne (acide succinidique-d₄) à une concentration de 46,6 mg L⁻¹ sont ajoutés. Les échantillons sont mélangés à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes, puis sont évaporés à sec sous un jet d'azote dans un bain à 60 °C. Lorsque l'évaporation est terminée, l'échantillon est reconstitué avec 620 µL d'un mélange de méthyl-tert-butyléther (MTBE) et d'acétonitrile (ACN) dans des proportions d'un pour un (1 : 1). Le MTBE et l'ACN proviennent de Thermo Fisher Scientific. Ensuite, 80 µL de l'agent dérivant (BSTFA+ 1% TMCS) sont ajoutés, puis les échantillons sont incubés à une température de 60 °C pendant une période de 30 minutes. Lorsque l'incubation est

terminée, la totalité de la solution est transférée dans des vials GCMS (Chromatographic Specialties), puis 1 μL est injectée dans l'instrumentation analytique.

Pour l'analyse des acides carboxyliques semi-volatiles, un chromatographe en phase gazeuse GC2012 ainsi qu'un spectromètre de masse QP2010S de Shimadzu ont été utilisés. La colonne capillaire utilisée est une HP-5MS de Agilent Technologies ($30\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$, $0,25\text{ }\mu\text{m}$ DI). L'injecteur et l'interface sont programmés à une température de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ et de $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivement. Également lors de cette analyse, l'hélium est le gaz porteur (débit 1 mL min^{-1} et vitesse linéaire de $36,1\text{ cm s}^{-1}$). L'analyse des acides carboxyliques volatils s'effectue en mode *splitless*. La rampe de température utilisée est présente dans la figure ci-dessous (figure 6). Un retour aux conditions initiales est effectué automatiquement après chacun des échantillons.

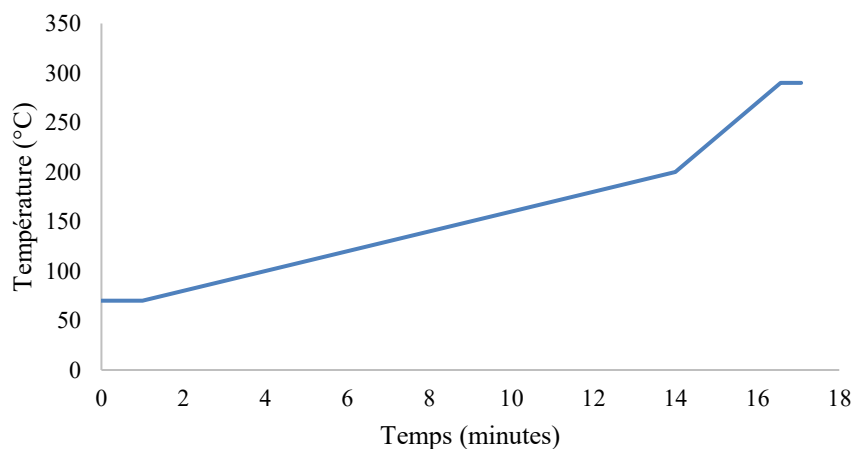


Figure 6. Rampe de température du GC-MS lors de l'analyse des acides carboxyliques semi-volatils

Le tableau suivant (tableau 8) présente les fragments utilisés dans la méthode SIM pour l'analyse de l'acide glycolique et l'acide succinique.

Tableau 8. Paramètre MS de la méthode de quantification des acides carboxyliques semi-volatils par GC-MS

Composé	Temps de rétention (min)	Ion de quantification (m/z)	Ion de confirmation (m/z)
---------	-----------------------------	--------------------------------	------------------------------

Acide glycolique	5,67	205	177, 147
Acide succinique	9,01	247	147
Acide succinique-d ₄	8,97	251	147

2. 4. 2. Analyse ciblée des produits de transformation azotés organiques par LC-MS

Les solutions mères ont été fraîchement préparées dans de l'eau de grade Optima LC-MS à des concentrations de 1000 mg L⁻¹. Les trois standards analytiques, soit l'aniline, l'éthylamine ainsi que la diéthylamine, sont combinés dans une solution intermédiaire à des concentrations respectives de 20 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹ et de 10 mg L⁻¹ dans de l'eau de grade Optima LCMS. Le tableau suivant (tableau 9) présente les gammes de linéarité pour les standards de calibration et de contrôles qualité. L'aniline (>99,5 %), l'éthylamine (69,1 %) et la diéthylamine (99,99 %) proviennent de Sigma Aldrich, alors de l'aniline-d₂ (99,7 %) ainsi que le diéthylamine-d₄ (99,6 %) proviennent de CDN Isotopes.

Tableau 9. Gammes de linéarité pour les amines organiques à l'étude

	Concentration (µg L ⁻¹)		
	Aniline	Éthylamine	Diéthylamine
Standard 1	66,7	100	33,3
Standard 2	100	150	50
Standard 3	133,3	200	66,7
Standard 4	200	300	100
Standard 5	400	600	200
Standard 6	600	900	300
Standard 7	800	1200	400
Standard 8	1000	1500	500
Contrôle qualité bas	300	450	150
Contrôle qualité moyen	500	750	250
Contrôle qualité haut	750	1125	375

Les solutions mères des standards internes sont préparées dans du méthanol de grade LCMS à des concentrations de 1000 mg L^{-1} . Les deux standards internes, l'aniline- d_2 ainsi que le diéthylamine- d_4 , sont combinés dans une solution de travail à une concentration de 10 mg L^{-1} dans du méthanol de grade Optima LCMS.

Les amines organiques à l'étude nécessitent une dérivation avant l'analyse par LC-MS. Aucune dilution des échantillons n'est nécessaire. Premièrement, $300 \text{ }\mu\text{L}$ d'une solution de 20 g L^{-1} de bicarbonate de sodium (Thermo Fisher Scientific), afin d'obtenir un pH environnant 9 est ajouté dans un vial en verre avec bouchon en téflon/PTFE. Ensuite, $100 \text{ }\mu\text{L}$ d'échantillon est déposé dans ce même vial. Par la suite, $10 \text{ }\mu\text{L}$ de la solution de travail de standards interne y sont déposés (10 mg L^{-1} , pour l'aniline- d_2 ainsi que pour le diéthylamine- d_4). La solution est mélangée pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex. $500 \text{ }\mu\text{L}$ de l'agent dérivant, le chlorure de dansyle (5 g L^{-1} dans de l'acétone) est ajouté dans chacun des vials. La solution est à nouveau agitée pendant 30 secondes puis est incubée à 45°C pendant 60 minutes à la noirceur. Pour donner suite à ce temps d'attente, $400 \text{ }\mu\text{L}$ d'hydroxyde d'ammonium 25 % sont ajoutés dans chacun des vials afin d'arrêter la réaction de dérivation. Afin d'éliminer les impuretés, les sels et afin d'augmenter la limite de détection, une micro-extraction sur phase solide est utilisée. Le dansyle de chlorure (99,7 %) et l'hydroxyde d'ammonium (25,9 %) proviennent de Sigma Aldrich.

La micro-extraction sur phase solide ($\mu\text{-SPE}$) est effectuée à l'aide d'une cartouche en phase inverse de 96 puits Strata-X polymériques (Phenomenex, Californie, États-Unis), contenant 2 mg de phase solide par puits. Premièrement, les cartouches doivent être conditionnées. Un volume de $200 \text{ }\mu\text{L}$ de méthanol est ajouté dans chacun des puits utilisés, puis ce $200 \text{ }\mu\text{L}$ est élué. Ensuite $200 \text{ }\mu\text{L}$ d'eau est ajouté, puis est élué. Ensuite, $750 \text{ }\mu\text{L}$ d'échantillon est chargé sur la cartouche. Afin d'éliminer les impuretés de l'échantillon telles que les sels, $200 \text{ }\mu\text{L}$ d'une solution d'eau de grade Optima LCMS et de méthanol de grade Optima LCMS (90 : 10) sont ajoutés dans chacun des puits. Lorsqu'il n'y a plus de liquide dans les puits, les analytes sont élués en y ajoutant deux fois $25 \text{ }\mu\text{L}$ d'une solution de méthanol de grade Optima LCMS contenant 2 % d'acide formique. Afin d'avoir le bon solvant d'injection pour la chromatographie en phase liquide, les échantillons sont évaporés à sec et reconstitués dans $250 \text{ }\mu\text{L}$ d'une solution d'eau et de méthanol de grade Optima LCMS (1 : 1). Les échantillons reconstitués sont ensuite transférés dans un vial LC-MS, puis $5 \text{ }\mu\text{L}$

sont injectés dans le système LC-QqQMS. L'eau et le méthanol de grade Optima LCMS proviennent de Thermo Fisher Scientific.

La chromatographie en phase liquide se base sur le principe d'un équilibre entre une phase liquide et une phase solide (colonne analytique). Selon les propriétés intrinsèques des analytes et la force de l'éluant, il y aura une séparation chromatographique. L'éluant est un mélange de deux phases mobiles. La phase mobile A, qui est la phase mobile ayant le moins de force éluant en chromatographie liquide en phase inverse est composé d'eau de grade LCMS avec 0,2 % d'acide formique comme additif. La phase mobile B ayant le plus grand pouvoir d'élution est composée de méthanol de grade de LCMS avec 0,2 % d'acide formique comme additif. L'eau, le méthanol et l'acide formique de grade Optima LCMS proviennent de Thermo Fisher Scientific. La colonne analytique utilisée (phase inverse C₁₈) est une Acquity HSS-T3 (Waters) ayant des particules de 1,8 µm. Les dimensions de cette colonne sont de 2,1 mm sur 50 mm. Le système chromatographique utilisé est le système Acquity Ultra Performance LC de Waters. Afin d'obtenir une séparation optimale des analytes, un gradient de phases mobiles est appliqué à un débit total de 0,5 mL min⁻¹ (tableau 10).

Tableau 10. Gradient chromatographique pour l'analyse des amines organiques par LC-QqQMS.

Temps (min)	Phase mobile A (%)	Phase mobile B (%)
Initial	90	10
3,00	90	10
10,00	30	70
11,00	0	100
12,00	0	100
12,50	90	10
16,50	90	10

Le spectromètre de masse utilisé afin d'effectuer la quantification des analytes est une Xevo T-QS micro-StepWave et l'ionisation se fait par électro-ébulisaison utilisant une source de type Zspray, tous deux également de Waters. Afin de permettre la quantification des produits de transformation azotés, une analyse ciblée est effectuée en utilisant le mode SRM. L'optimisation des paramètres

SRM a été effectuée à l'aide de l'outil IntelliStart de Waters. Les paramètres de la méthode MS se retrouvent dans le tableau 11. L'acquisition des données a été effectuée avec le logiciel MassLynx (Waters) et le traitement de données avec le logiciel TargetLynx (Waters). Tous les consommables utilisés pour effectuer la chromatographie en phase liquide (méthanol, eau, acide formique) sont de grade Optima LCMS et proviennent de Thermo Fisher Scientific.

2. 4. 2. 1. Contrôle et assurance qualité

Selon les lignes directrices de validation de méthode bioanalytique du U.S. Department of Health and Human Services et al. (2018), la précision des contrôles qualités doit se situer à $\pm 15\%$ CV et l'exactitude doit se situer à $\pm 15\%$ de la valeur théorique. Le coefficient de détermination (R^2) doit être plus grand que 0,99.

La limite de quantification est déterminée par la plus petite concentration ayant une déviation de moins de 20 % avec la valeur nominale injectée dans l'appareil analytique.

Les contrôles qualité pour les trois analytes à l'étude ont été déterminés à partir de la valeur maximale de la gamme de linéarité. La valeur du contrôle qualité haut correspond à 75 % de la valeur maximale de la gamme de linéarité, soit de $750\ \mu\text{g L}^{-1}$, de $1125\ \mu\text{g L}^{-1}$ et de $375\ \mu\text{g L}^{-1}$ pour l'aniline, l'éthylamine et le diéthylamine respectivement. En ce qui concerne le contrôle qualité moyen, ce dernier correspond à 50 % de la valeur maximale de la gamme de linéarité, soit de $500\ \mu\text{g L}^{-1}$, de $750\ \mu\text{g L}^{-1}$ et de $250\ \mu\text{g L}^{-1}$ pour l'aniline, l'éthylamine et le diéthylamine respectivement. Finalement, pour le contrôle qualité bas, ce contrôle qualité correspond à 30 % de la valeur maximale de la gamme de linéarité. Ils sont donc d'une concentration de $300\ \mu\text{g L}^{-1}$, de $450\ \mu\text{g L}^{-1}$ et de $150\ \mu\text{g L}^{-1}$ pour l'aniline, l'éthylamine et le diéthylamine respectivement.

Tableau 11. Paramètres MS pour la quantification des produits de transformations azotés organiques par LC-QqQMS

Composé	Polarité	Fenêtre d'acquisition	Type de transition	Ion précurseur	Ion produit	Énergie de collision
	ESI	(min)		(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	(V)
Aniline	+	9,0 à 13,0	Quantification	327,2	156,0	24
			Confirmation	327,2	171,0	24
Aniline-d ₂	+	9,0 à 13,0	Quantification	329,2	156,1	35
			Confirmation	329,2	171,2	25
Éthylamine	+	7,5 à 10,5	Quantification	279,1	115,0	54
			Confirmation	279,1	128,3	48
Diéthylamine	+	9,0 à 13,0	Quantification	307,1	157,0	26
			Confirmation	307,1	128,1	54
Diéthylamine-d ₄	+		Quantification	311,2	158,0	24

2. 4. 3. Quantification des produits de transformation azotés inorganiques à l'aide d'une électrode sélective à l'azote ammoniacal

La quantification de l'azote ammoniacal est effectuée à l'aide d'une électrode sélective d'ions (ISE en anglais, *ion selective electrode*) de haute performance Orion de Thermo Fisher Scientific. La membrane de cette électrode est hydrophobe et perméable aux gaz. Afin d'analyser l'azote ammoniacal sous la forme de l'ammoniac, le pH doit être plus élevé que 9. Ainsi, avant d'insérer l'électrode dans l'échantillon, la solution d'ajustement de pH (ajusteur de force ionique, ISA en anglais, *ion strenght adjuster*) pour l'ammoniaque de faible niveau est ajoutée dans un ratio de 1 : 50 (ISA : échantillon). L'ISA provient également de Thermo Fisher Scientific. Afin de permettre l'équilibre des gaz entre l'extérieur et l'intérieur de l'électrode, la lecture s'effectue après deux minutes d'agitation (barreau magnétique).

2. 4. 3. 1. Vérification de l'électrode

Afin de vérifier le bon fonctionnement de l'électrode, 100 mL d'eau distillée est ajouté dans un bécher de 150 mL avec un agitateur magnétique. Afin d'ajuster le pH, 2 mL de la solution d'ISA y est ajouté. La lecture s'effectue en millivolt (mV), c'est donc à cette étape que l'appareil est configuré en millivolt (mV). Avant d'insérer l'électrode dans la solution, l'électrode est rincée avec de l'eau distillée, puis asséchée avec une lingette Kimwipes (Kimberly Clark, Texas, États-Unis) sans frotter l'électrode. Une fois l'électrode dans la solution, 1 mL de la solution standard de 0,1 M de chlorure d'ammonium (Thermo Fisher Scientific) y est ajouté. Après deux minutes d'agitation, la lecture devrait être stable. Il faut donc noter la valeur en millivolt. Ensuite, 10 mL de la solution standard 0,1 M de chlorure d'ammonium sont ajoutés au bécher. Attendre que la lecture soit stable et prendre en note la valeur de différence de potentiel en millivolt. La différence entre ces deux mesures doit se situer entre 54 et 60 mV.

2. 4. 3. 2. Préparation des solutions et échantillons

La courbe d'étalonnage est effectuée avec une dilution en série (tableau 12). La solution mère est la solution de chlorure d'ammonium d'une concentration de 0,1 M. Les solutions étalons

sont effectuées dans des fioles jaugées de 100 mL, puis de l'eau désionisée est utilisé afin de jauger les solutions.

Tableau 12. Préparation de la droite d'étalonnage

Niveau de calibration	Concentration en chlorure d'ammonium (M)	Concentration de la solution mère (M)	Volume de la solution mère (mL)	Volume de la solution total (mL)
Standard 4	10^{-2}	10^{-1}	10	100
Standard 3	10^{-3}	10^{-2}	10	100
Standard 2	10^{-4}	10^{-3}	10	100
Standard 1	10^{-5}	10^{-4}	10	100

Pour les échantillons réels, ces derniers sont dilués si leur réponse initiale sort de la plage d'étalonnage. Avant d'insérer l'électrode dans les solutions d'échantillon, la solution de ISA y est ajoutée dans un ratio 1 : 50 (ISA : échantillon). La lecture est stable après 2 minutes d'agitation. Entre chacun des échantillons, l'électrode est rincée à l'eau distillée puis est asséchée à l'aide d'une lingette Kimwipes.

2. 5. Quantification de l'azote ammoniacal par spectrophotométrie

L'analyse de l'azote ammoniacal par la méthode de l'acide salicylique modifiée a été développée par Yu et al. (2021). La solution rapporteuse (terminologie utilisée dans l'article de (Yu et al., 2021)) est préparée dans un tube Falcon de 15 mL (VWR) et est composée de citrate de sodium tribasique (0,75 g) et d'acide 4-méthoxysalicylique (0,053 g), tous deux, provenant de Sigma Aldrich. Cinq millilitres d'eau Milli-Q y sont ensuite ajoutés. De l'hydroxyde de sodium (1 mL à 2,6 M [Thermo Fisher Scientific]) ainsi qu'une solution nitroprussiate de sodium (0,3 mL à 20 mM [LabChem, Pennsylvanie, États-Unis]) sont ajoutés dans ce même tube. Par la suite, une solution d'hypochlorite de sodium (dans un tampon carbonate) est préparée dans un contenant de 100 mL. 1,2 g de carbonate de sodium (Thermo Fisher Scientific), puis 0,08 g de bicarbonate de sodium (Thermo Fisher Scientific) sont ajoutés dans ce contenant. Ces deux sels sont dissous dans 20 mL d'eau Milli-Q. 3,4 mL d'hypochlorite de sodium (0,85 M, javellisant), puis 20 mL d'eau

Milli-Q y sont ajoutés. Dans un vial 1 dram (VWR), 2,64 mL d'échantillon y est déposé. Ensuite, dans l'ordre, 0,26 mL de la solution reporteur et 0,1 mL de la solution d'hypochlorite de sodium y sont ajoutés. Après avoir mélangé les solutions à l'aide d'une pipette d'un millilitre, les échantillons sont incubés à 25 °C pour une période de 25 minutes. Les échantillons sont, par la suite, analysés à l'aide d'un spectrophotomètre (Genesys 20, Thermo Fisher Scientific) en utilisant une cellule de quartz. La longueur d'onde sélectionnée est de 680 nm. La gamme de linéarité ainsi que le coefficient de détermination de la méthode présentée dans ce paragraphe se trouvent dans le tableau 13.

Tableau 13. Paramètres de la méthode de l'acide salicylique modifiée pour l'analyse de l'azote ammoniacal par la spectrophotométrie.

Composé	Gamme de linéarité mg L ⁻¹	Coefficient de détermination R ²
Ammonium	0,01 à 2	> 0,99

2. 6. Évaluation de la toxicité produite par oxydation par voie humide

2. 6. 1. Évaluation du pouvoir oxydant d'un effluent

Les solutions mères de tyrosine et de nitrotyrosine ont été préparées à des concentrations de 50 mM dans 0,1 N d'hydroxyde de sodium. Les solutions intermédiaires ont été préparées à des concentrations de 500 mg L⁻¹, 1000 mg L⁻¹, 500 mg L⁻¹ et 200 mg L⁻¹ dans un tampon de phosphate dibasique (Sigma Aldrich) à 100 mM. La droite d'étalonnage a été préparée à des concentrations de 1,13 mg L⁻¹ à 200 mg L⁻¹ pour la tyrosine ainsi que la nitrotyrosine. Les contrôles qualité ont été préparés à des concentrations de 3,39 mg L⁻¹ (QCL), 100 mg L⁻¹ (QCM) et 150 mg L⁻¹ (QCH). L'eau, l'hydroxyde de sodium 1 N, ainsi que les standards analytiques de tyrosine (>99,7 %) et de nitrotyrosine (>98 %) proviennent de chez Sigma Aldrich. Les standards internes, tyrosine-d₄ (98,7 %) et nitrotyrosine-d₃ (99 %) proviennent de chez CDN Isotopes (Québec, Canada). Ces derniers ont été préparés à des concentrations de 500 mg L⁻¹ dans 0,1 N d'hydroxyde de sodium. Les solutions de travail ont été préparées à 20 mg L⁻¹ dans une solution de méthanol : eau (1 : 1). Le contrôle qualité positif est composé de 600 mM de peroxyde d'hydrogène et de 700 mM

d'acide chlorhydrique dans de l'eau de grade Optima LCMS (Thermo Fisher Scientific). En ce qui concerne le contrôle qualité négatif, ce dernier est composé de 700 mM d'acide chlorhydrique dans de l'eau de grade Optima LCMS (Thermo Fisher Scientific).

Afin de déterminer si les échantillons possèdent un pouvoir oxydatif, deux étapes doivent être effectuées, soit la formation de la peroxy-nitrite et la nitration de la tyrosine. Pour la formation de la peroxy-nitrite, 1 mL d'une solution de 600 mM de nitrite de sodium (> 99 %, Sigma Aldrich) est placé dans une seringue de 3 mL avec un embout Luer Lock. Dans une seconde seringue de 3 mL avec un embout Luer Lock, l'échantillon ou les contrôles qualité (positif et négatif) qui sont acidifiés (700 mM HCl) y sont contenus à un volume de 1 mL. Le contrôle qualité positif est composé de peroxyde d'hydrogène (Sigma Aldrich) à 600 mM acidifié, alors que le contrôle négatif ne contient que de l'eau acidifiée. Ces deux seringues sont connectées par du tubing de système de chromatographie liquide à une jonction en « T ». Les deux réactifs sont poussés dans la jonction en « T » à un débit de 30 mL h⁻¹ à l'aide d'un pousse-seringue KD Scientific (Massachusetts, États-Unis). La solution de peroxy-nitrite va sortir dans un vial contenant 1 mL d'hydroxyde de sodium 1N à 0 °C. Cette étape a été effectuée au CTTEI, à Sorel-Tracy, immédiatement après la réaction d'oxydation par voie humide. La prochaine étape est la nitration de la tyrosine. Dans un vial de 4 mL, 2,8 mL de tyrosine à 0,5 mM dans un tampon phosphate dibasique de 100 mM y est contenu. Ensuite, 200 µL de la solution de peroxy-nitrite sont injectés à l'aide d'une seringue en verre dans ce vial. Durant 3,5 minutes, la solution est agitée, chauffée à 45 °C et est bullée dans du CO₂.

Avant de déposer l'échantillon dans une plaquette 96 puits LazWell (Phytronix, Canada), l'échantillon doit être dilué dans une solution contenant un tampon phosphate dibasique (Thermo Fisher Scientific) et du sérum albumine bovine (BSA, Sigma Aldrich) afin d'aider à la désorption thermique. L'échantillon y est donc dilué dans un facteur de 1 : 50. Ensuite, 5 µL sont déposés dans le puits de la LazWell puis sont séchés pendant 8 minutes à 40 °C. La nitration de la tyrosine et l'analyse par LD TD-QqMS se sont effectuées chez Phytronix Technologies à Québec. Lorsque la technologie de désorption thermique par diode laser (LD TD) est utilisée, l'échantillon doit être à l'état solide dans le puit LazWell. Ensuite, la plaque est insérée dans l'appareil et les échantillons sont introduits dans le spectromètre de masse par désorption thermique. La diode laser frappe le derrière de la plaque en acier inoxydable, les analytes désorberont thermiquement et seront

emportés vers le spectromètre de masse à l'aide du gaz porteur et du tube de transfert. L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est une technique d'ionisation utilisée pour l'analyse des échantillons dans le triple quadripôle. La figure 7 présente un schéma du LDSTD-QqQMS. Les critères de validation de la méthode sont basés sur les lignes directrices de validation de méthode bioanalytique du U.S. Department of Health and Human Services et al. (2018). Ainsi, pour les contrôles qualité, la précision doit se situer à $\pm 15\%$ CV et l'exactitude doit se situer à $\pm 15\%$ de la valeur théorique. De plus, le coefficient de détermination (R^2) doit être plus grand que 0,99.

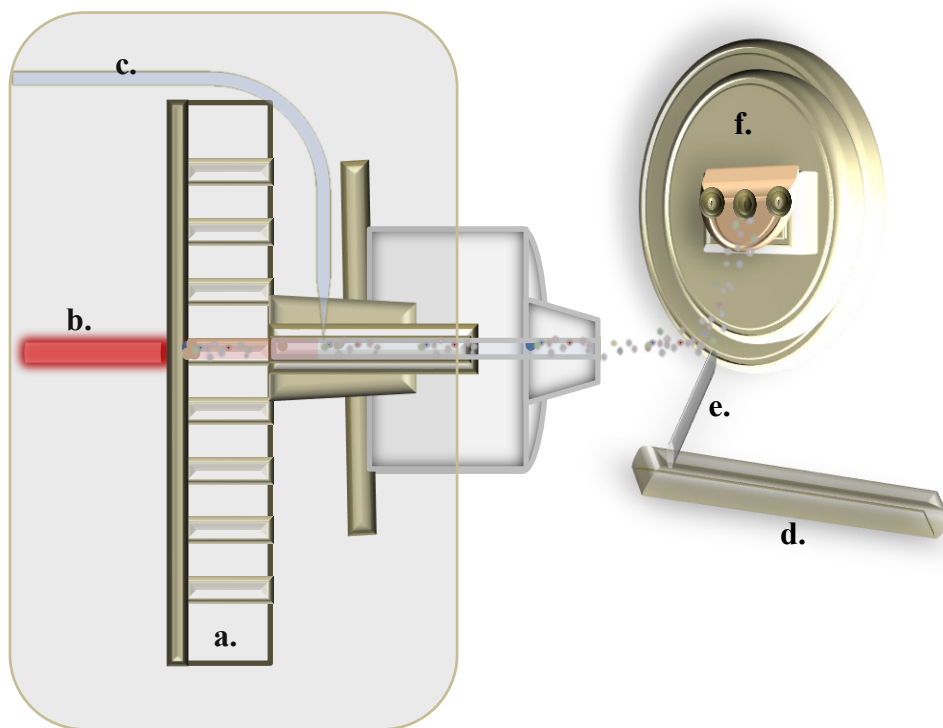


Figure 7. Schéma de la désorption thermique par diode laser (Schéma inspiré de Shimadzu [LDSTD Ion Source]. A) plaque LazWell 96 puits ; B) diode laser ; C) gaz porteur ; D) ionisation chimique à pression atmosphérique ; E) décharge couronne ; F) spectromètre de masse

Le patron laser utilisé afin d'obtenir une désorption optimale des analytes est présenté dans la figure 8.

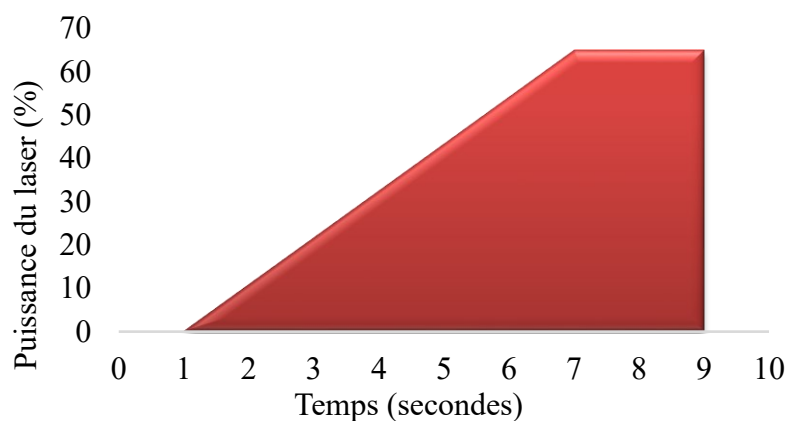


Figure 8. Patron laser lors de l'analyse par LDTD-QqQMS

Le mode SRM est utilisé pour la quantification de la tyrosine ainsi que la nitrotyrosine. Le tableau suivant (tableau 14) présente les transitions de quantification et de confirmation pour la tyrosine et la nitrotyrosine.

Tableau 14. Paramètres MS pour la quantification de la tyrosine et de la nitrotyrosine par LDTD-QqQMS

Composé	Polarité APCI	Type de transition	Ion précurseur (m/z)	Ion produit (m/z)	Énergie de collision (V)
Tyrosine	-	Quantification	179,9	92,8	20
		Confirmation	179,9	72,0	20
Tyrosine-d ₄	-	Quantification	184,0	96,9	20
		Confirmation	184,0	71,9	20
Nitrotyrosine	-	Quantification	225,0	163,0	20
		Confirmation	225,0	135,9	20
Nitrotyrosine-d ₃	-	Quantification	228,0	166,1	20
		Confirmation	228,0	151,1	20

2. 6. 1. 1. Analyses statistiques

2. 6. 1. 1. 1. Deux groupes et moins

Lorsque seulement deux groupes de données sont présents, il est possible d'effectuer un test t de Student. Ce test statistique est utilisé lors de la détermination de la stabilité de la peroxyinitrite, l'oxydant formé précédant la nitration de la tyrosine. Préalablement, l'analyse de la variance doit être effectuée à l'aide du test F. Si les variances sont hétérogènes (inégaux), alors le test t à variance inégale doit être effectué. Inversement, si les variances sont homogènes (égales), le test t à variance égale doit être effectué. Le seuil de confiance utilisé est $\alpha=0,05$.

2. 6. 1. 1. 2. Trois groupes et plus

Afin de déterminer si les résultats du potentiel oxydant sont significativement différents, une analyse statistique sur les moyennes est effectuée avec le test d'ANOVA. L'analyse de variance à un facteur est donc utilisée afin de déterminer la variance du pouvoir oxydant sur les échantillons traités par oxydation en voie humide. Si l'hypothèse nulle est rejetée, le test t de Student sera effectué afin de déterminer lesquelles des moyennes sont significativement différentes. Avant d'effectuer le test t de Student, le test F est utilisé afin de déterminer si les variances sont homogènes ou bien hétérogènes. Si la variance n'est pas homogène, le test t peut être effectué. Ainsi, si, pour les deux moyennes comparées, l'hypothèse nulle est rejetée, ces deux moyennes sont significativement différentes. Le seuil de confiance utilisé est $\alpha=0,05$.

2. 6. 2. Bioessais avec *Daphnia magna*

Les bioessais avec *Daphnia magna* de toxicité aiguë sont des tests certifiés par ISO Standard 6341 et par l'OECD (2004) n° 202. Afin de s'assurer de la validité des résultats obtenus, un test de contrôle avec du dichromate de potassium doit être effectué pour chaque boîte de tests (6 tests/boîte). Le protocole standard a été appliqué pour tous les échantillons, mais a subi une légère modification afin de maintenir une concentration en sels constante. La concentration effective médiane est obtenue en appliquant le modèle dose-réponse à la série de données comprenant le pourcentage d'effet (mort et immobilité) et les concentrations en contaminant. Afin de vérifier la validité des résultats, la qualité de la régression linéaire doit être supérieure à 0,9 (coefficient de détermination ajusté, R^2 -ajusté, *Adjusted-R²*).

Dans l'ensemble standardisé DaphToxKit F (Environnemental bio-detection products inc. [EBPI], Ontario, Canada), les solutions standard d'eau douce sont des solutions utilisées comme média de croissance et c'est également le diluant utilisé lors de la préparation des solutions de contrôle et de tests. Quatre solutions concentrées de sels, le bicarbonate de sodium (129,5 mg), le chlorure de calcium dihydraté (588 mg), le sulfate de magnésium heptahydraté (246,5 mg) et le chlorure de potassium (11,5 mg) sont ajoutés dans une fiole de 250 mL, puis jaugés avec de l'eau distillée afin d'obtenir la solution standard d'eau douce 8x. En ce qui concerne la solution standard d'eau douce 1x, ces mêmes solutions de sels sont ajoutées dans une fiole jaugée de 2 L, puis jaugée avec de l'eau distillée. Avant l'éclosion et le lancement des essais de toxicité aiguë, les solutions standard d'eau douce doivent être à température pièce et doivent être aérées (bullées) durant 15 minutes.

Les éphippia sont les œufs de daphnie en état de dormance. L'éclosion des éphippia doit se dérouler sur une période de 72 heures. Premièrement, les éphippia sont rincés du média d'entreposage à l'aide d'eau distillée dans un petit tamis, puis les éphippia sont transférés dans le plat de pétri destiné à l'éclosion à l'aide de la solution standard d'eau douce 1x. Par la suite, les éphippia sont incubés entre 20 et 22 C pour 72 heures sur une source lumineuse continue d'environ 6000 lux. La table lumineuse LightPad 930 LX (Arthograph, États-Unis) est utilisée afin de faire éclore les éphippia ainsi qu'afin d'effectuer le décompte des daphnies. Après 72 heures, les daphnies sont transférées dans les puits afin d'effectuer l'essai de la CE₅₀. Toutefois, deux heures avant de transférer les daphnies afin de débiter le test, un vial contenant des spirulines dans le standard d'eau douce 1x est transféré dans les boîtes de pétri. Les spirulines sont des algues qui serviront de nutriments pour les daphnies avant de débiter le test. Ces algues sont ajoutées afin d'éviter d'avoir des mortalités dues à la famine. Pour débiter les essais, chaque solution est déposée dans les puits, puis les daphnies y sont ajoutées (figure 9).

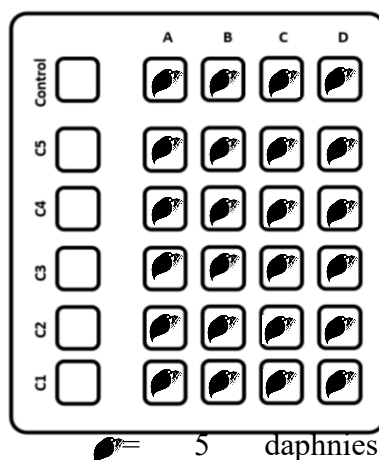


Figure 9. Bioessais avec *D. magna*

Pour les solutions du test de contrôle de dichromate de potassium, la solution mère est préparée dans de l'eau distillée à une concentration de 1000 mg L^{-1} dans une fiole jaugée de 100 mL. Ensuite, une solution intermédiaire de 10 mg L^{-1} de dichromate de potassium dans de l'eau distillée a été préparée dans une fiole jaugée de 100 mL. Les solutions tests sont préparées avec le standard d'eau douce. Les concentrations préparées sont présentes dans le tableau 15.

Tableau 15. Préparation des solutions tests du contrôle qualité de dichromate de potassium

Solution test	Concentration mg L^{-1}	Volume de la solution à 10 mg L^{-1} mL	Volume de standard d'eau douce (8x) mL	Volume de standard d'eau douce (1x) mL	Volume total mL
C1*	3,2	32,0	12,5	0,0	100
C2	1,8	18,0	0,0	82,0	100
C3	1,0	10,0	0,0	90,0	100
C4	0,56	5,6	0,0	94,4	100
C5	0,10	1,0	0,0	99,0	100

*L'eau est le diluant

Afin de valider l'ensemble de tests, la concentration effective médiane doit se situer entre $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ et $2,1 \text{ mg L}^{-1}$ après 24 heures.

2. 6. 2. 1. Solutions de composés pharmaceutiques

Les solutions de composés pharmaceutiques non traitées par OVH ont été diluées à 87,5 % pour la solution test C1. À cette fiole de 100 mL, 12,5 mL de la solution standard d'eau douce (8x) y a été ajouté afin de garder le taux de sels constant. Les solutions tests (C1 à C5) sont préparées selon les dilutions ci-dessous et le standard d'eau douce (1x) est utilisé pour la dilution. La préparation des solutions de composés pharmaceutiques se trouvent dans les tableaux 16 et 17.

Tableau 16. Préparation des solutions tests des composés pharmaceutiques à 1 500 $\mu\text{g L}^{-1}$

Solution test	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Volume initial de l'échantillon mL	Volume de standard d'eau douce (8x) mL	Volume de standard d'eau douce (1x) mL	Volume total mL
C1*	1177,5	87,5	12,5	0,0	100
C2	376,8	32,0	0,0	68,0	100
C3	117,8	10,0	0,0	90,0	100
C4	37,7	3,2	0,0	96,8	100
C5	11,8	1,0	0,0	99,0	100

*L'eau est le diluant

Tableau 17. Préparation des solutions tests des composés pharmaceutiques traités par OVH à une concentration initiale de 1 500 $\mu\text{g L}^{-1}$

Solutions tests	Pourcentage de l'échantillon initial (%)	Volume initial de l'échantillon traité mL	Volume de standard d'eau douce (8x) mL	Volume de standard d'eau douce (1x) mL	Volume total mL
C1*	20,00	20	12,5	0,0	100
C2	6,20	32	0,0	68,0	100
C3	2,00	10	0,0	90,0	100
C4	0,64	3,2	0,0	96,8	100
C5	0,20	1,0	0,0	99,0	100

*L'eau est le diluant

Les solutions de composés pharmaceutiques traités ont été diluées à 20 % et 12,5 mL de la solution d'eau douce standard (8×) a été ajouté afin de garder le taux de sels constant pour toutes les concentrations testées. Ensuite, les solutions tests sont préparées selon les pourcentages de l'échantillon traité (initialement à 1500 µg L⁻¹) ci-dessous et le standard d'eau douce (1×) est utilisé pour la dilution.

2. 6. 2. 2. Solution d'acides carboxyliques

Les acides acétiques quantifiés dans Guerette et al. (2021) ont été testés en mélange. Les solutions ont été préparées selon les concentrations présentées dans le tableau ci-dessous (tableau 18). Étant donné qu'il y a un changement de pH, ce dernier a été contrôlé à l'aide d'un tampon carbonate à un pH environnant 7. Le tampon carbonate est composé de 46,00 mM de bicarbonate de sodium et de 4,15 mM de carbonate de sodium. Ce tampon est utilisé étant donné que la solution d'eau douce standard contient des carbonates et il permet de remonter le pH des solutions à des pH environnants 7.

Tableau 18. Préparation des solutions test des acides carboxyliques (acide acétique, acide formique, acide glycolique et acide succinique) à pH contrôlé

Solution test	Concentration (mg L ⁻¹)				Volume total mL
	Acide acétique	Acide formique	Acide glycolique	Acide succinique	
C1	150,0	141,6	26,0	50,0	100
C2	48,0	45,3	8,3	16,0	100
C3	15,0	14,1	2,6	5,0	100
C4	4,8	4,5	0,8	1,6	100
C5	1,5	1,4	0,3	0,5	100

2. 6. 2. 3. Solution d'ammoniac

La concentration effective médiane de l'ammoniac a également été déterminée à l'aide du test standardisé DaphToxKit F. Le pH a également été contrôlé, mais à un pH environnant 9, car le

tampon carbonate (46,00 mM de bicarbonate de sodium et de 4,15 mM de carbonate de sodium) utilisé ne permettait pas d'abaisser davantage le pH. Les solutions ont été préparées selon les concentrations présentées dans le tableau ci-dessous (tableau 19).

Tableau 19. Préparation des solutions tests d'ammoniac à pH contrôlé

Solution test	Concentration en ammoniac mg L⁻¹	Volume de l'échantillon traité mL	Volume de standard d'eau douce (8x) mL	Volume de standard d'eau douce (1x) mL	Volume total mL
C1*	10,0	87,5	12,5	0,0	100
C2	5,6	56,0	0,0	44,0	100
C3	3,2	32,0	0,0	68,0	100
C4	1,8	18,0	0,0	82,0	100
C5	1,0	10,0	0,0	90,0	100

*L'eau est le diluant

La figure 9 présente la planche de tests contenant des puits où les différents tests seront effectués. Dans la première rangée, la rangée contrôle, 10 mL de solution standard d'eau douce 1x y sera déposé dans chaque puits. Ensuite, avec la solution appropriée, chaque puits aura 10 mL de la solution à tester. De plus, afin d'éviter la dilution des solutions toxiques à tester, la première colonne va contenir les daphnies (minimalement 20 daphnies) pour ensuite être répartie dans les puits. Dans chaque puits, cinq daphnies y seront déposées à l'aide d'une micropipette en plastique. Pour cette étape, la table lumineuse est utilisée. Après 24 heures de tests ainsi que 48 heures de tests, le nombre de daphnies immobilisées ou bien de décédés sont comptés afin de déterminer la CE₅₀ à 24 heures ainsi que la CE₅₀ à 48 heures.

CHAPITRE 3. SUIVI DE L'ÉLIMINATION DES COMPOSÉS PHARMACEUTIQUES, IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES PRODUITS DE DÉGRADATION AZOTÉS GÉNÉRÉS LORS DE L'OXYDATION PAR VOIE HUMIDE DES COMPOSÉS PHARMACEUTIQUES

3. 1. Résultats et discussion

3. 1. 1. Suivi de l'élimination de composés pharmaceutiques par OVH

Les procédés d'oxydation avancés, tels que l'OVH, ont démontré leurs preuves quant à l'élimination des produits pharmaceutiques dans les eaux. Effectivement, l'étude de Boucher et al. (2021) démontre une élimination de plus de 99 % pour le triméthoprim, la gabapentine ainsi que le diclofénac. Le triméthoprim, qui est un composé pharmaceutique difficilement éliminé (Halling-Sorensen et al., 2000), obtient des taux d'élimination de 55 % à plus de 90 % lors de la photocatalyse (Mpatani et al., 2021). Afin de confirmer les résultats obtenus précédemment dans Boucher et al. (2021) ainsi que dans Guérette (2021), le suivi de l'élimination des composés pharmaceutiques a été effectué. Ce suivi s'est effectué par LC-QqQMS. Étant donné que la méthode a dû être transférée de la LDTD-QqQMS vers la LC-QqQMS, une validation a été effectuée. Le tableau suivant (tableau 20) présente les données de validation obtenue. Les critères de validation ont été tirés de l'U.S. Department of Health and Human Services et al. (2018). Ainsi, la précision et l'exactitude doivent se situer à ± 15 %. Pour la droite de calibration, le coefficient de détermination (R^2) doit être plus élevé que 0,99. Le suivi de l'élimination des composés pharmaceutiques permet d'évaluer l'efficacité du traitement. Ainsi, il devient possible d'effectuer la comparaison de ces résultats avec d'autres procédés d'oxydation avancés étudiés.

Tableau 20. Validation de la méthode de suivi de l'élimination des composés pharmaceutiques par LC-QqQMS

Composé	Limite de quantification ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Domaine de linéarité ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	Exactitude (%)			Précision (%)					
				150 $\mu\text{g L}^{-1}$	750 $\mu\text{g L}^{-1}$	1150 $\mu\text{g L}^{-1}$	150 $\mu\text{g L}^{-1}$		750 $\mu\text{g L}^{-1}$		1150 $\mu\text{g L}^{-1}$	
							Intra-jour	Inter-jour	Intra-jour	Inter-jour	Intra-jour	Inter-jour
Diclofénac	50	50 – 1500	0,999	2,22	0,28	0,06	5,11	6,77	1,14	4,22	4,25	5,33
Gabapentine	150	150 — 1500	0,996	1,63	4,94	1,70	6,62	6,42	0,77	1,20	4,55	4,38
Triméthoprim	50	50 — 1500	0,999	7,28	2,45	0,78	9,18	12,2	1,60	6,25	2,83	11,95

Le suivi de l'élimination des composés pharmaceutiques par OVH a été effectué tant pour les échantillons d'une concentration de $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ que pour les échantillons plus concentrés (environ 300 mg L^{-1}). Les taux d'élimination des trois composés pharmaceutiques à l'étude par l'OVH avaient été établis par Boucher et al. (2021) et par Guérette (2021). Les résultats obtenus lors de ce projet sont similaires. Après traitement, les concentrations en composés pharmaceutiques se situaient sous les limites de détection. Les pourcentages d'élimination ont donc été déterminés à l'aide de cette valeur (LOD) (tableau 21).

Tableau 21. Taux d'élimination des composés pharmaceutiques à l'étude par OVH

Composé pharmaceutique	Concentration initiale ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Élimination (%)	Concentration initiale (mg L^{-1})	Élimination (%)
Diclofénac	1676	> 98,9	258	> 99,1
Gabapentine	1676	> 95,1	28	> 95,9
Triméthoprim	1501	> 97,1	306	> 96,4

Lors des travaux de Boucher et al. (2021) et de Guérette (2021), dès 15 minutes de temps de résidence dans le réacteur, des taux d'élimination de 99,9 % sont atteints. Selon les résultats obtenus lors de ce projet, les trois composés pharmaceutiques ont été dégradés à des taux élevés (>95,9 %). L'efficacité d'élimination est donc reproductible avec les mêmes conditions de réaction et des concentrations initiales semblables en composés pharmaceutiques, toutefois, le réacteur n'est pas le même. En effet lors de l'étude de Boucher et al. (2021) et celle de Guérette (2021), le réacteur utilisé est le réacteur horizontal Cellule 2646.0000 conçu par TOP Industrie de 170 mL, alors que celui utilisé lors de ce projet est le réacteur vertical de 420 mL, également conçu par TOP Industrie. Bien que des taux d'élimination élevés soient observés, ces produits pharmaceutiques sont transformés en produits de dégradation, c'est pourquoi la DCO est également calculée lors des expériences avec le réacteur d'OVH.

3. 1. 2. Suivi de la diminution de la demande chimique en oxygène

La demande chimique en oxygène est un paramètre utilisé lors du traitement des eaux usées. Ainsi, pour évaluer l'efficacité globale du système (diminution de la DCO) et afin d'effectuer des comparaisons entre plusieurs traitements, ce paramètre est principalement utilisé (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2016). Les figures 10 et 11 présentent les résultats de la DCO des échantillons traités par OVH.

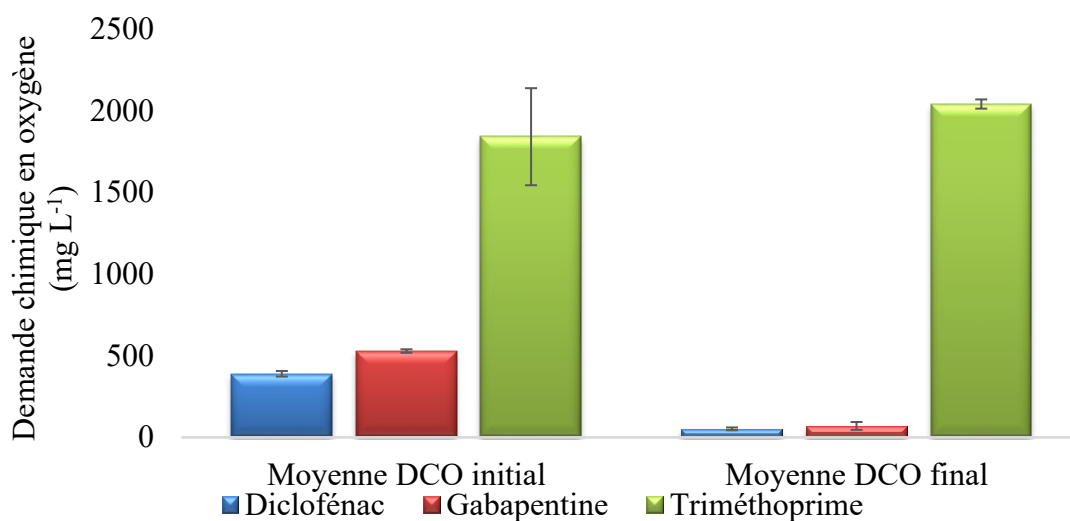


Figure 10. Demande chimique en oxygène des échantillons avant ainsi qu'après traitement d'oxydation par voie humide.

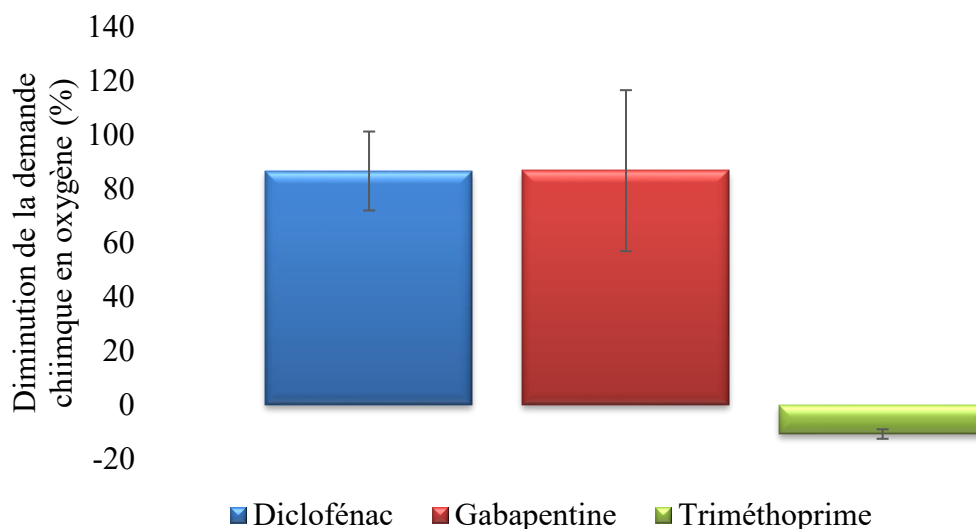


Figure 11. Diminution de la demande chimique en oxygène lors du traitement des composés pharmaceutiques par oxydation par voie humide.

Les résultats pour le diclofénac et la gabapentine sont similaires à ce qui avait été obtenu précédemment (Guérette, 2021). En effet, lors de l'essai OVH de la gabapentine, une diminution de 86 % avec un écart relatif de 30 % a été obtenue. En ce qui concerne le diclofénac, la diminution observée lors de ce projet est de 86 % avec un écart relatif de 15 %. Les grands écarts relatifs obtenus pourraient être inhérents à la technique utilisée pour déterminer la DCO ou bien au réacteur d'oxydation par voie humide.

En ce qui concerne le triméthoprim, l'augmentation de la DCO à la suite du traitement par OVH n'est pas ce qui avait été observé précédemment. Guérette (2021) avait obtenu une diminution de 73 % pour ce composé pharmaceutique. La solubilité du triméthoprim dans l'eau est de 400 mg L⁻¹ à 25 °C. La concentration utilisée est inférieure à cette limite de solubilité, toutefois, même à une concentration de 306 mg L⁻¹, le triméthoprim était difficilement soluble à 22 °C. Afin de le rendre plus soluble, l'échantillon a dû être chauffé avant son introduction dans le réacteur. Cet écart des résultats pourrait-il se rapporter à cette valeur de faible solubilité ? Une fraction solide de triméthoprim aurait-elle été introduite dans le réacteur, ce qui pourrait expliquer la plus grande demande chimique en oxygène après traitement ? L'aliquote introduite dans le réacteur est censée être sous forme de solution, mais est-il possible que cette solution ait été refroidie lors de son introduction dans le réacteur et qu'une partie du triméthoprim ait précipité ? Ainsi, lors du

prélèvement de la solution (afin de déterminer la DCO), il est probable que la portion prélevée ne contient pas tout le triméthoprimine en solution étant donné que le solide n'est pas totalement dissous. À la lumière de ce résultat, la validité des résultats du triméthoprimine est remise en question, car la quantité initiale injectée dans le réacteur peut être supérieure à ce qui a été noté. Pour les résultats de quantification de produits de transformation qui seront présentés dans les sections suivantes, il faut considérer l'erreur sur la valeur de demande chimique en oxygène du triméthoprimine.

Précédemment, l'OVH avait démontré une très grande efficacité. Lors d'essais sur un effluent industriel à une pression de 150 bar, d'une DCO initiale de 40 000 mg L⁻¹ et que l'oxygène est utilisé comme oxydant, un taux de 89,9 % de diminution de la DCO avait été atteint (Debellefontaine, Foussard, 2000). Les deux sections précédentes démontrent l'efficacité de l'élimination des composés pharmaceutiques lors de l'OVH. Bien que la molécule parent soit éliminée, des produits de transformation sont créés et ces derniers peuvent donc être responsables de la toxicité observée. Toutefois, avec la présence de certains produits de transformation organiques, la minéralisation totale n'est pas atteinte. La présence de certains produits de transformation permet d'obtenir une idée sur l'avancement de la réaction d'oxydation dans le réacteur OVH (Guérette, 2021). Dans Guérette et al. (2021), quatre acides carboxyliques ont été identifiés et quantifiés à la suite du traitement des effluents hospitaliers par oxydation par voie humide. Lors de l'étude des produits de dégradation de ce projet, ce sont donc ces acides qui ont été étudiés, soit l'acide acétique, l'acide formique, l'acide glycolique ainsi que l'acide succinique.

3. 1. 3. Quantification des produits de transformation acides carboxyliques lors du traitement des composés pharmaceutiques par oxydation par voie humide.

Afin de comparer les résultats obtenus à ceux obtenus précédemment par Guérette et al. (2021), quatre acides carboxyliques, soit l'acide acétique, formique, glycolique et succinique, ont été quantifiés au GC-MS. Tel qu'il est démontré avec l'acide acétylsalicylique dans Guérette (2021), la concentration de ces quatre acides dans l'échantillon traité permet de déterminer l'avancement de la transformation. En effet, plus le temps de résidence dans le réacteur augmente, plus la concentration en acide acétique augmente, mais les concentrations en acides succiniques,

glycoliques et formiques diminuent (Guérette, 2021). Toutefois, lors de ce projet, une seule prise de l'échantillon a été effectuée après 20 minutes de temps de résidence dans le réacteur. Il n'est donc pas possible d'effectuer le suivi temporel de ces quatre acides carboxyliques. Cependant, la détermination des concentrations en acides organiques présents dans les trois échantillons traités par OVH (diclofénac, gabapentine, triméthoprim) lors de ce projet permet d'estimer la transformation des composés pharmaceutiques traités. Le tableau suivant (tableau 22) présente les concentrations en acides carboxyliques quantifiés dans les échantillons de diclofénac, de gabapentine et de triméthoprim traités par OVH.

Tableau 22. Quantification des acides carboxyliques dans les échantillons traités par oxydation en voie humide.

Composé	Acide acétique Concentration (mg/L)	Acide formique Concentration (mg/L)	Acide glycolique Concentration (mg/L)	Acide succinique Concentration (mg/L)
Diclofénac	12,7 ± 0,4	4,4 ± 0,9	0,25± 0,05	2,30 ± 0,06
Gabapentine	27,7 ± 0,9	7,4 ± 0,1	0,160± 0,003	4,55 ± 0,07
Triméthoprim	200 ± 10	67 ± 3	19,7± 0,4	60,5 ± 0,7

Tel qu'il est mentionné dans Guérette (2021), dès 7,5 minutes de temps de résidence dans le réacteur d'OVH, l'acide acétique est l'acide carboxylique principalement présent comme produits de transformation des trois pharmaceutiques, soit la gabapentine, le diclofénac et le triméthoprim. Pour des concentrations initiales traitées similaires, la proportion d'acides carboxyliques permet de déterminer l'avancement de la réaction d'oxydation. Plus la réaction est complète, plus la quantité d'acide acétique sera grande. Le tableau 23 présente les ratios de l'acide acétique sur l'acide formique (AA/AF), les ratios de l'acide acétique sur l'acide succinique (AA/AS) et les ratios de l'acide acétique sur l'acide glycolique (AA/AG) afin de déterminer l'avancement de la réaction. Les ratios provenant de Guérette et al. (2021) ont été estimés à partir des figures présentes dans l'article.

Tableau 23. Ratio des acides carboxyliques à la suite de l'OVH

Composé pharmaceutique	Ratio AA/AF	Ratio AA/AS	Ratio AA/AG	Sources
Diclofénac	5	5	8	(Guerette et al., 2021)
Gabapentine	9	3	9	(Guerette et al., 2021)
Triméthoprim	16	5	16	(Guerette et al., 2021)
Diclofénac	3	6	51	Ce projet
Gabapentine	4	6	173	Ce projet
Triméthoprim	3	3	10	Ce projet

La grande production d'acide acétique peut aussi être observée lorsque des effluents d'usine de pâtes et papiers sont traités par un POA, soit l'utilisation de l'oxydation en voie humide catalytique (Pintar et al., 2004). En effet, dans Pintar et al. (2004), après le traitement des effluents de blanchissement de l'usine de pâtes et papiers, l'acide acétique est l'acide carboxylique majoritairement produit suite au traitement d'oxydation en voie humide catalytique. Dans cette étude de Pintar et al. (2004), les produits de transformations étudiés sont les acides carboxyliques et dicarboxyliques par chromatographie en phase liquide. En ce qui concerne les résultats obtenus lors de ce projet, bien que la quantité d'acide acétique est supérieure à celles obtenues en acides formique, glycolique et succinique, les concentrations obtenues ne sont pas aussi élevées que ce qui avait été quantifié dans Guérette (2021) pour les mêmes composés pharmaceutiques et pour des concentrations traitées similaires. Cette différence pourrait être expliquée par une masse différente injectée dans le réacteur d'OVH, car le ratio AA/AS suggère que l'avancement de la réaction est similaire. Toutefois, les résultats obtenus dans ce projet pour le ratio AA/AG suggèrent que l'acide glycolique s'est, à son tour, dégradé pour produire la forme la plus persistante du carbone (acide acétique) après le traitement d'OVH (Guerette et al., 2021).

Les composés pharmaceutiques contiennent, pour la plupart, minimalement un atome d'azote sur leur structure. Néanmoins, l'évaluation des produits de transformation azotés lors de l'OVH est peu mentionnée dans la littérature. Maintenant que le devenir des composés carbonés est identifié en quatre acides carboxyliques principaux, il est temps de s'attaquer au devenir de l'azote contenu dans les produits pharmaceutiques à la suite de l'OVH. Une méthode au LC-QqQMS a été

développée afin de quantifier trois composés aminés potentiellement produits lors de l'OVH, soit l'aniline, l'éthylamine ainsi que la diéthylamine.

3. 1. 3. 1. Développement de méthode

L'analyse des amines ciblées dans cette étude par chromatographie liquide nécessite l'utilisation d'un agent dérivant. L'utilisation des agents dérivants en LC-MS permet d'augmenter la séparation chromatographique, permet d'augmenter l'efficacité d'ionisation, ce qui permet entre autres d'obtenir de meilleures limites de détection (David et al., 2021). Plusieurs agents dérivants ont été testés, l'agent dérivant retenu est le chlorure de dansyle. Ce dernier est polyvalent et la dérivation se produit en une heure. Afin d'obtenir une étape de préconcentration, une micro-extraction sur phase solide est utilisée (Camel, 2003). Ainsi, avec les plaques de micro-extraction Strata-X (Phenomenex), il est possible d'effectuer 96 extractions simultanément.

3. 1. 3. 2. Problématiques

Lors de l'analyse au LC-MS, plusieurs problèmes peuvent survenir. Le principal problème qui a été observé est la contamination. Initialement, les phases mobiles de la LC-MS, l'équipement de laboratoire, l'agent dérivant puis quelques standards étaient contaminés. Il s'est avéré que quelques molécules ciblées pour l'analyse en LC-MS ne s'ionisaient pas bien, se dégradait rapidement ou bien il n'était pas possible de le dériver dans les conditions choisies. Ainsi, seulement trois molécules ont été retenues pour l'analyse en LC-QqQMS, soit l'aniline, l'éthylamine ainsi que la diéthylamine. Tel qu'il est présenté dans le tableau 3, l'éthylamine et la diéthylamine sont des produits de transformation principalement observés après traitement par les POA mis à part l'ammoniac et les nitrates.

3. 1. 3. 3. Validation de la méthode de quantification des produits de transformation azotés organiques

Les critères de validation de la méthode d'analyse par chromatographie liquide en tandem utilisé proviennent de l'U.S. Department of Health and Human Services et al. (2018). L'exactitude ainsi que la précision doivent se situer à plus ou moins 15 %. La limite de quantification est déterminée par la plus petite concentration ayant une déviation de moins de 20 % avec la valeur nominale

injectée dans l'appareil analytique (U.S. Department of Health and Human Services et al., 2018). Les paramètres de validation de la méthode de quantification des amines organiques ciblées sont présentés dans le tableau 24.

Tableau 24. Validation de la méthode de quantification des amines organiques par LC-QqQMS

Composé	Limite de quantification ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Domaine de linéarité ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	Contrôles qualité		Exactitude (%)		Précision (%)			
				QCL	QCH	QCL	QCH	QCL		QCH	
				($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)			Intra-jour	Inter-jour	Intra-jour	Inter-jour
Aniline	133	133 – 1000	0,999	300	750	7,80	4,81	7,91	10,12	6,94	7,41
Éthylamine	100	100 — 1500	0,990	450	1125	0,50	5,76	8,86	11,22	3,23	14,22
Diéthylamine	33,3	33,3 - 500	0,999	150	375	4,75	1,58	3,64	6,76	6,13	8,48

À la suite de l'obtention de ces résultats de validation de la méthode de quantification des petites amines organiques par LC-MS, les échantillons traités par OVH (diclofénac, gabapentine et triméthoprim) ont été dérivés, extraits puis analysés afin de déterminer s'il y a production d'amines organiques (aniline, éthylamine et diéthylamine). Le tableau suivant (tableau 25) présente les résultats de quantification des amines organiques ciblées par LC-QqQMS.

Tableau 25. Quantification des amines organiques de petite taille dans les échantillons traités par OVH.

Analyte	Diclofénac		Gabapentine		Triméthoprim	
	Avant traitement $\mu\text{g L}^{-1}$	Après traitement $\mu\text{g L}^{-1}$	Avant traitement $\mu\text{g L}^{-1}$	Après traitement $\mu\text{g L}^{-1}$	Avant traitement $\mu\text{g L}^{-1}$	Après traitement $\mu\text{g L}^{-1}$
Aniline	< 133	< 133	< 133	< 133	< 133	< 133
Éthylamine	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	380 ± 30
Diéthylamine	< 33,3	< 33,3	< 33,3	< 33,3	< 33,3	< 33,3

Avant traitement d'oxydation en voie humide, les valeurs d'aniline, d'éthylamine et de diéthylamine se situaient sous la limite de détection pour le diclofénac, la gabapentine ainsi que le triméthoprim. Toutefois, après traitement d'OVH, seulement l'éthylamine est quantifiée en faible quantité dans l'échantillon de triméthoprim. Considérant les concentrations en composés pharmaceutiques traités, il est possible de conclure que les composés pharmaceutiques contenant de l'azote se transforment peu en petites amines organiques qui ont été ciblées. L'éthylamine et la diéthylamine sont considérées comme des intermédiaires de réaction dans Klare et al. (1999) lorsqu'une solution modèle d'espèces azotées est traitée par photocatalyse. Effectivement, lors de la combinaison de l'oxyde de titane (TiO_2), de l'UV et de l'ozone, l'éthylamine atteint un plateau dès 60 minutes de traitement, mais sa concentration diminue dès 180 minutes de traitement. La faible présence de ces amines organiques pourrait-elle agir comme indicateur sur l'avancement de la réaction d'oxydation pour le réacteur d'OVH ? En effet, les résultats de quantification de l'ammoniac ainsi que des nitrates suggèrent une constante augmentation de ces produits de transformation jusqu'à l'arrêt du test, soit à 300 minutes de réaction (Klare et al., 1999).

L'un des principaux produits de transformation azotés produits à la suite des procédés d'oxydation avancés est l'azote ammoniacal. Tel que mentionné précédemment, l'un des buts de l'utilisation de POA est d'obtenir la minéralisation des contaminants émergents. L'azote ammoniacal est l'un des produits de transformation minéralisés lorsque la matière organique contenant de l'azote est oxydée. La quantification de l'azote ammoniacal permet d'évaluer le devenir de l'azote contenu dans les molécules traitées par OVH.

3. 1. 4. Quantification des produits de transformation azotés inorganiques lors du traitement des composés pharmaceutiques par oxydation par voie humide

L'analyse de l'azote inorganique dans les échantillons s'est effectuée à l'aide de deux méthodes, soit l'analyse de l'azote ammoniacal par la méthode de l'acide salicylique modifiée et l'utilisation d'une électrode sélective haute performance de l'azote ammoniacal (tableau 26). L'analyse de l'azote ammoniacal à l'aide de la méthode d'acide salicylique modifiée est tirée de Yu et al. (2021), et nécessite une dilution entre un facteur de 50 et de plus de 300 afin d'entrer dans la gamme de linéarité de la méthode.

Tableau 26. Comparaison des méthodes de quantification de l'azote ammoniacal

Composé pharmaceutique	Spectrophotométrie		Électrode sélective	
	Facteur de dilution	Concentration en azote ammoniacal mg L^{-1}	Facteur de dilution	Concentration en azote ammoniacal mg L^{-1}
Diclofénac	50	$12,3 \pm 0,2$	1	$3,7 \pm 0,2$
Gabapentine	50	$24,1 \pm 0,3$	1	10 ± 3
Triméthoprim	300	753 ± 6	4	207 ± 6

Bien que les deux méthodes produisent des résultats différents, l'ordre de grandeur d'azote ammoniacal produit demeure semblable entre les composés pharmaceutiques à l'étude. Les résultats obtenus (figure 12) indiquent donc une grande production d'azote ammoniacale pour le triméthoprim, ce qui s'explique par la présence de quatre atomes d'azote contenu dans sa structure moléculaire, comparativement à un seul atome d'azote pour la diclofénac ainsi que pour la gabapentine.

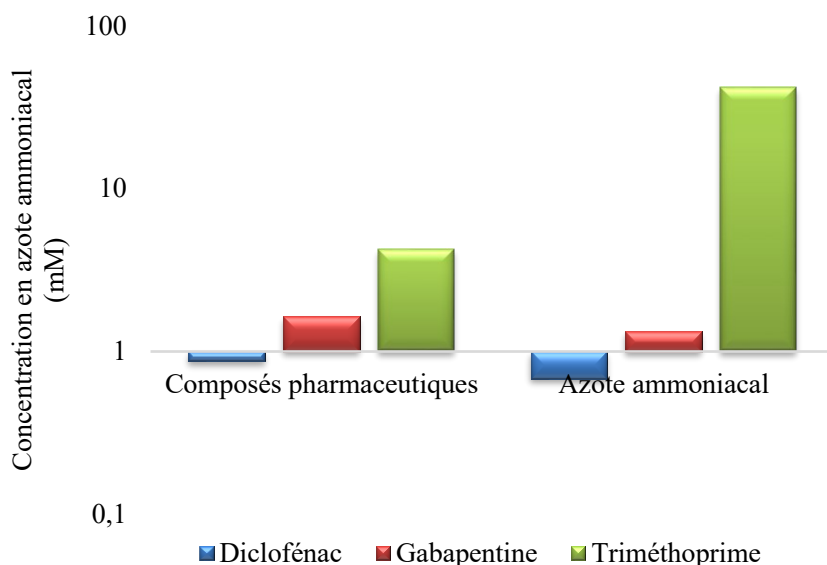


Figure 12. Équivalent molaire de la conversion des composés pharmaceutiques en azote ammoniacal.

Lorsque les équivalents molaires de la production d'azote sont calculés, il est possible de remarquer que les valeurs attribuées à la production d'azote ammoniacal pour le triméthoprim

sont très élevées. Effectivement, si la concentration initiale de 306 mg L^{-1} de triméthoprimine est utilisée afin de calculer la conversion théorique en 100 % d'azote ammoniacal, le triméthoprimine se serait converti à 992 %. Cette valeur erronée laisse, encore une fois, supposer que la valeur initiale introduite dans le réacteur d'OVH était faussée. Toutefois, pour le diclofénac et la gabapentine, leur conversion serait alors à des taux de 78,3 % et de 81,5 % respectivement. Ces valeurs suggèrent donc qu'il y a majoritairement production d'azote ammoniacale lors de l'OVH des composés pharmaceutiques. Néanmoins, 21,7 % et 18,5 % de l'azote, pour le diclofénac et la gabapentine respectivement, n'est pas encore identifiés. L'azote non identifié pourrait donc provenir de source oxydée de l'azote, soit les nitrites et les nitrates ou bien d'une perte de l'ammoniac sous sa forme gazeuse.

L'azote ammoniacal est un paramètre suivi et enregistré à l'effluent des stations d'épuration, car c'est l'un des critères de la qualité de l'eau de surface au Québec (Ministère de l'Environnement de la lutte contre les changements climatiques de la Faune et des Parcs, 2023a). Les concentrations aiguës des rejets varient en fonction de la température ainsi que du pH. Les valeurs maximales permises aux effluents varient entre $0,54 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$ (pH 9 et 30°C) et $66 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$ (pH 6,5 et 0 à 14°C) (Ministère de l'Environnement de la lutte contre les changements climatiques de la Faune et des Parcs, 2023a). Dans les stations d'épuration, le décapage à l'ammoniac (*ammonia stripping* en anglais) peut être utilisé afin de retirer l'azote ammoniacal se situant à des concentrations entre 10 et 100 mg L^{-1} (Environmental Protection Agency, 2000). Ce procédé nécessite l'ajout de chaux ou d'hydroxyde de sodium afin d'abaisser le pH et d'obtenir de l'ammoniac sous forme gazeuse (Environmental Protection Agency, 2000). Lorsque les concentrations excèdent 100 mg L^{-1} , les procédés biologiques peuvent être appliqués où des bactéries effectueront le processus de nitrification et de dénitrification (Environmental Protection Agency, 2000). Les bactéries aérobiques utilisent une source de carbone (CO_2) ainsi que de l'oxygène dissous afin d'oxyder l'ammonium et, ainsi, d'effectuer le processus de nitrification (Environmental Protection Agency, 2000). Les bactéries anaérobiques présentes dans les traitements biologiques sont, quant à elles, en mesure d'effectuer la dénitrification (Environmental Protection Agency, 2000). Toutefois, les traitements biologiques contenant des bactéries anaérobiques oxydantes de l'ammonium (*anaerobic ammonium oxidation* en anglais anammox) permettent également de retirer l'azote ammoniacal, les nitrites et les nitrates afin de les convertir en azote gazeux sans aucune source de

carbone ni d'oxygène dissous (Kuenen, 2008). Bien que l'OVH permet une grande production d'azote ammoniacal, ce traitement est placé en amont des stations d'épurations conventionnelles. L'impact de la toxicité produite, en partie, par la présence d'azote ammoniacal sera à évaluer sur les traitements biologiques des stations d'épuration. Il faut toutefois tenir compte de la dilution importante des effluents hospitaliers avec les effluents municipaux lors de leur entrée dans les stations d'épuration conventionnelles. De plus, les concentrations en azote quantifiées lors de ce projet semblent très grandes pour être ensuite acheminées aux stations d'épurations municipales. Toutefois, il est à noter que les échantillons traités dans ce réacteur afin d'identifier les produits de transformation sont beaucoup plus concentrés que les concentrations que l'on retrouve dans les effluents hospitaliers. Effectivement, il est possible de retrouver entre $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ et $0,49 \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofénac, entre $0,72 \mu\text{g L}^{-1}$ et $105,83 \mu\text{g L}^{-1}$ de gabapentine et entre $0,35 \mu\text{g L}^{-1}$ et $20,33 \mu\text{g L}^{-1}$ de triméthoprim dans les effluents hospitaliers (Oliveira et al., 2015). Comparativement aux concentrations introduites dans le réacteur d'OVH, soit 258 mg L^{-1} de diclofénac, 280 mg L^{-1} de gabapentine et 306 mg L^{-1} de triméthoprim. Les valeurs présentes dans les effluents sont donc de 2,6 milles à 8,5 millions fois plus petites que les concentrations testées. L'utilisation de ces hautes concentrations est justifiée pour identifier et quantifier les produits de transformation azotés créés lors de l'OVH. Toutefois, le facteur de conversion n'est pas connu lorsque de faibles concentrations sont traitées, effectivement l'OVH est performant à des DCO élevées. L'OVH fonctionne relativement bien à des DCO entre 500 et 1500 mg L^{-1} (Zou et al., 2007). Sous la barre des 500 mg L^{-1} , l'efficacité de la dégradation de la matière organique est réduite (Zou et al., 2007). Il serait intéressant de suivre le facteur de conversion à des DCO semblables à celles retrouvées à la sortie des effluents hospitaliers afin de valider que cette conversion est la même à différentes concentrations. Tout comme il est mentionné précédemment avec le ratio de l'acide acétique sur l'acide succinique, la forme de l'azote retrouvée après traitement OVH peut être un indicateur sur l'avancement de la réaction d'oxydation. Plus la forme de l'azote inorganique sera présente comparativement à l'azote organique, plus la réaction d'oxydation de l'azote sera avancée. Comparativement au carbone, dont l'oxydation s'arrête lorsqu'il y a production d'acide acétique, les composés azotés s'oxydent plus facilement ce qui permet l'obtention d'une plus grande production de composés azotés inorganiques qu'organique, tel qu'il a été démontré dans les sections précédentes.

3. 1. 5. Mesure de la conductivité ainsi que du pH des composés pharmaceutiques traités par OVH

Toujours dans une optique de respect des normes de rejets environnementaux et de survie des traitements biologiques, le pH et la conductivité des échantillons traités par OVH ont été mesurés (tableau 27) (Ministère de l'Environnement de la lutte contre les changements climatiques de la Faune et des Parcs, 2023b). Lorsque des effluents hospitaliers sont traités par l'OVH, le pH à la sortie du réacteur est neutre (Boucher et al., 2021). Néanmoins, lorsque traités individuellement, les pH des échantillons vont grandement varier. Les échantillons, tels que le triméthoprim, contenant beaucoup d'azote ammoniacal, ont tendance à avoir un pH plus basique, alors que les échantillons de gabapentine à un pH neutre. La production d'acides carboxyliques et d'ammonium pourrait donc avoir un impact sur le pH des solutions de composés pharmaceutiques traités seules. Toutefois, lors du traitement des effluents hospitaliers, qui est un mélange complexe de sels, d'urée, et de déchets hydrosolubles, un effet tampon pourrait expliquer l'obtention d'un pH neutre après traitement OVH.

Tableau 27. Mesure de conductivité et de pH des échantillons traités par OVH.

Composé pharmaceutique	pH	Conductivité ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
Diclofénac	4,70	286,0
Gabapentine	7,00	211,7
Triméthoprim	8,20	4638,7

La conductivité est un paramètre qui est utilisé lors du traitement des eaux usées (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2015). La conductivité est une mesure qui permet de déterminer la capacité d'un échantillon à conduire un courant électrique (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2015). Plus la minéralisation est avancée, plus la conductivité devrait augmenter. Effectivement, il est mentionné dans De Neve et al. (2000) que la minéralisation de l'azote pourrait être suivie par la conductivité, toutefois, des études supplémentaires doivent être effectuées. Lors de ce projet, il est possible de constater que la conductivité de l'échantillon de triméthoprim traité par OVH est plus élevée que l'échantillon de

diclofénac ainsi que de gabapentine. Cette augmentation de conductivité pourrait s'expliquer par la présence d'azote ammoniacal en grande quantité et donc par la présence de quatre atomes d'azote sur la molécule du triméthoprim, mais également de la présence d'acides carboxyliques. En ce qui concerne le diclofénac ainsi que la gabapentine traitée par OVH, ceux-ci possèdent une conductivité semblable qui pourrait être expliquée par la présence d'un seul atome d'azote sur leur structure respective et leur taux de transformations en azote ammoniacal. Toutefois, la quantité d'azote ammoniacal quantifiée est plus élevée pour la gabapentine que pour le diclofénac, alors que l'inverse peut être constaté pour la conductivité des échantillons traités. La conductivité du diclofénac est plus élevée que celle de la gabapentine. Pour des composés purs traités par OVH, le suivi du pH et de la conductivité pourrait être un indicateur du déroulement de l'oxydation, néanmoins, la structure des molécules pures traitées devra être tenue en compte pour expliquer les changements de pH et de conductivité (production d'azote ammoniacale et d'ions).

Après l'analyse des produits de transformations des composés pharmaceutiques azotés, un seul produit de dégradation se démarque comme étant l'un des majeurs produits de transformations, soit l'azote ammoniacal. À la section suivante, il sera possible de conclure si la toxicité observée auprès des *D. magna* provient réellement de la présence de ces ions dans l'eau traitée ou bien si la cause de la toxicité est encore en partie inconnue. Bien que l'azote ammoniacal soit l'un des principaux produits de transformations azotés qui ont été identifiés, une autre forme de l'azote inorganique n'a pas été évaluée lors de ce projet. Dans Brillas et al. (1998), les deux principaux produits de dégradation de l'aniline à la suite de plusieurs procédés d'oxydation avancée sont l'ammonium ainsi que les nitrates. Afin d'augmenter les connaissances sur le devenir de l'azote après traitement d'OVH, il serait intéressant d'y ajouter la quantification des nitrates et des nitrites qui sont des formes oxydées de l'azote inorganique. La quantification de l'azote ammoniacal et des acides organiques pourrait donc devenir un indicateur sur le déroulement de la réaction dans le réacteur et ainsi devenir des outils de suivi pour différentes matrices et composés pharmaceutiques traités par oxydation par voie humide. D'ailleurs l'utilisation d'une électrode de conductivité pourrait s'avérer être un outil intéressant pour l'analyse en temps réel de la réaction d'oxydation à l'intérieur du réacteur d'OVH.

CHAPITRE 4. ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ GÉNÉRÉE LORS DU TRAITEMENT DE COMPOSÉS PHARMACEUTIQUES PAR OXYDATION PAR VOIE HUMIDE

4. 1. Résultats et discussion

Dans le chapitre précédent, plusieurs produits de transformation des composés pharmaceutiques à l'étude ont été identifiés et quantifiés. Dans ce chapitre, le pouvoir oxydant, pouvant causer un état de stress oxydation, ainsi que l'effet de ces produits de transformation sur le crustacé *Daphnia magna* seront évalués afin d'évaluer l'effet et la provenance de la toxicité observée après traitement d'oxydation par voie humide sur des composés pharmaceutiques ainsi que des effluents hospitaliers.

4. 1. 1. Évaluation du pouvoir oxydant d'échantillons traités par oxydation par voie humide

Le pouvoir oxydant de l'effluent traité est un critère qui a été sélectionné afin d'évaluer l'effet toxique du traitement OVH en raison de l'effet des espèces réactives sur les organismes vivants. Peu de données sont disponibles en ce qui concerne la présence d'espèces réactives formées lors des procédés d'oxydation avancés. Le contact du biote avec des espèces réactives en oxygène ainsi qu'en azote peut provoquer un état de stress oxydatif chez ce dernier. Tel qu'il est mentionné dans le Chapitre 1, lorsqu'un organisme entre dans un état de stress oxydatif, ce dernier peut subir des dommages aux cellules, aux lipides ainsi qu'à l'ADN (Bartesaghi, Radi, 2018; Tsikas, Duncan, 2014). La méthode qui est présentée dans les lignes suivantes se base sur l'un des effets biologiques observés lorsqu'un organisme est exposé à des espèces réactives, soit la nitration de la tyrosine. La nitration de la tyrosine se produit lorsque la tyrosine, présente dans des protéines, est en présence de peroxynitrite, un oxydant, ce qui va former la nitrotyrosine (Bartesaghi, Radi, 2018; Oury et al., 1995; Tsikas, Duncan, 2014).

4. 1. 1. 1. Développement de méthode

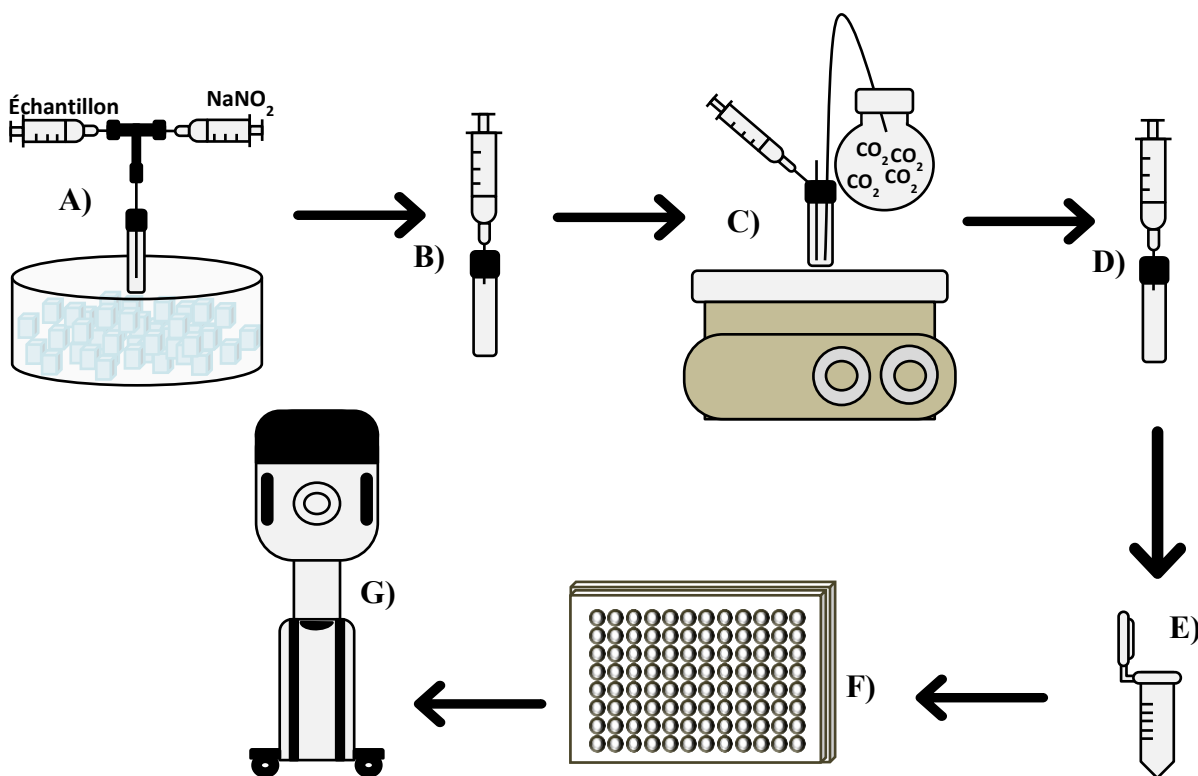


Figure 13. Méthode d'évaluation du pouvoir oxydant de l'échantillon de composé pharmaceutique traité par OVH. A) Formation de la peroxynitrite ; B) Prélèvement de la peroxynitrite ; C) Nitration de la tyrosine ; D) Prélèvement de l'échantillon ; E) Dilution de l'échantillon ; F) Déposition de l'échantillon ; G) Analyse par LDTD-QqQMS

La première étape de l'évaluation du pouvoir oxydant de l'échantillon traité par OVH consiste en la formation de la peroxynitrite à l'aide d'une source de nitrite, soit le nitrite de sodium (Oury et al., 1995). La peroxynitrite est formée en conditions acides, toutefois, le temps de vie dans ces conditions est de quelques millisecondes (Khan et al., 2000). La réaction s'effectue donc dans une jonction en T, puis la peroxynitrite est conservée dans une solution basique (NaOH 1N) à 0 °C (figure 13 [A]). Dès que la réaction est terminée, la peroxynitrite peut être conservée jusqu'à 48 heures au congélateur (-20 °C). Des essais de stabilité sur la peroxynitrite ont été effectués à -20 °C pendant 48 heures ainsi que pendant une semaine afin de déterminer la stabilité de l'oxydant (figure 14). La détermination de la stabilité de l'oxydant est essentielle, car les essais d'OVH sont

effectués à Sorel-Tracy (CTTÉI), alors que l'analyse du pouvoir oxydant s'effectue à Québec (Phytronix technologies). La détermination de la stabilité de l'oxydant permet donc de déterminer la faisabilité de l'analyse étant donnée la contrainte physique entre la formation de la peroxyxynitrite et la nitration de la tyrosine.

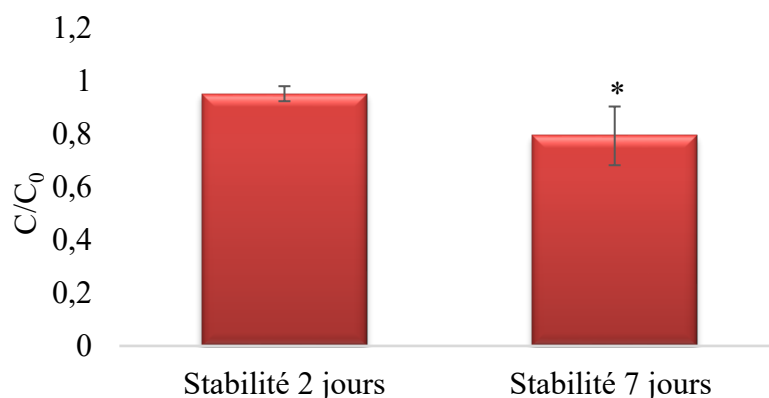


Figure 14. Stabilité de la peroxyxynitrite après 48 heures et une semaine à -20 °C

* les données sont significativement différentes avec test t de Student.

Afin d'effectuer la nitration de la tyrosine et d'ainsi évaluer le pouvoir oxydant de l'échantillon, l'oxydant qui est formé, la peroxyxynitrite, est prélevé à l'aide d'une seringue (figure 13 [B]), puis 200 μL est injecté dans un vial contenant 2800 μL de tyrosine à 0,5 mM dans un tampon phosphate dibasique (100 mM). Afin de permettre une nitration rapide de la tyrosine, le pH de la réaction doit être légèrement diminué (Teixeira et al., 2016; Tsikas, Duncan, 2014). La réaction est donc bullée avec du dioxyde de carbone dans le vial de réaction (Teixeira et al., 2016; Tsikas, Duncan, 2014). De plus, un léger chauffage (40 °C) est appliqué afin d'accélérer la conversion de la tyrosine en nitrotyrosine (figure 13 [C]). La figure suivante (figure 15) présente la conversion de la tyrosine en nitrotyrosine. À la lumière de ces résultats, le temps de réaction sélectionné est de 3 minutes 30 secondes.

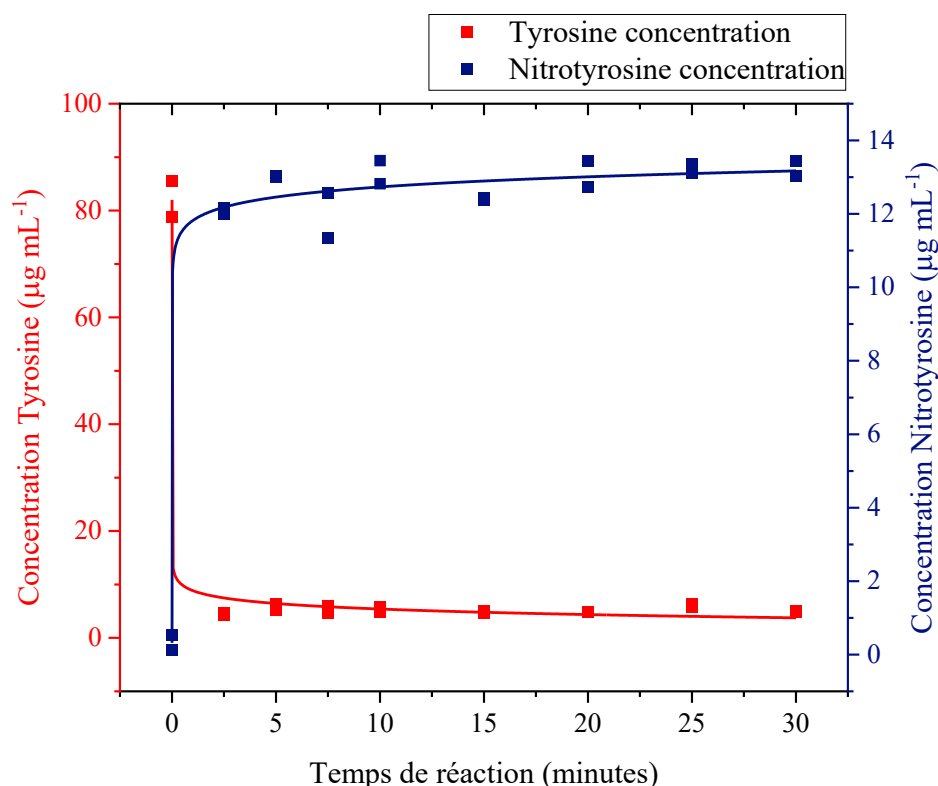


Figure 15. Temps optimal de la nitration de la tyrosine

Afin de permettre l'analyse par LDSTD-QqQMS de l'échantillon traité, une dilution de 1 : 50 dans une solution contenant les standards internes (tyrosine- d_4 et nitrotyrosine- d_3), un tampon phosphate et d'albumine de sérum bovin (BSA) dans une proportion finale de méthanol et d'eau de 50 : 50. Tel qu'il est mentionné dans Segura et al. (2022) et dans Gravel et al. (2019), le BSA est utilisé comme un agent aidant à la désorption. Cet effet peut être expliqué par l'affinité du BSA avec la plaque d'acier inoxydable ainsi que par la formation de plus petits cristaux de BSA à la surface de la plaque ce qui favorisera la désorption thermique (Gravel et al., 2019; Segura et al., 2022). Ayant une meilleure désorption thermique, l'intensité du signal sera améliorée. Après séchage, l'échantillon est analysé par LDSTD-QqQMS. L'analyse de la stabilité de la tyrosine ainsi que de la nitrotyrosine permet de déterminer si les échantillons peuvent être entreposés après la nitration. Les résultats (tableau 28) démontrent une faible stabilité de la part de la nitrotyrosine ainsi que de la tyrosine tant à sec sur la plaque LazWell (température pièce), qu'en solution au réfrigérateur (4 °C) pendant 24 heures. Ainsi, les échantillons doivent être analysés immédiatement après la nitration de la tyrosine.

Tableau 28. Détermination de la stabilité de la nitrotyrosine et de la tyrosine ($n=6$)

	Concentration théorique ng mL⁻¹	Concentration moyenne ng mL⁻¹	Précision % RSD	Exactitude %
Nitrotyrosine				
Stabilité en solution à 4 °C (24 h)	33,9	386,8	211,9	1141,0
	1500	1510,6	12,1	100,7
Stabilité à sec sur une LazWell à température pièce (24 h)	33,9	12,3	1674,4	36,2
	1500	1370,3	10,7	91,4
Tyrosine				
Stabilité en solution à 4 °C (24 h)	33,9	392,2	147,3	1056,9
	1500	1507,5	28,7	0,5
Stabilité à sec sur une LazWell à température pièce (24 h)	33,9	1,9	1600,8	94,2
	1500	1240,0	35,7	17,3

4. 1. 1. 2. Validation de la méthode

La validation de la méthode est basée sur les lignes directrices de l'U.S. Department of Health and Human Services et al. (2018). Ainsi, l'exactitude et la précision à trois niveaux de contrôle qualité ont été évaluées. L'exactitude et la précision doivent se situer dans les ± 15 %. Quant au coefficient de détermination (R^2), ce dernier doit être plus élevé que 0,99. La limite de quantification est déterminée par la plus petite concentration ayant une déviation de moins de 20 % avec la valeur nominale injectée dans l'appareil analytique (U.S. Department of Health and Human Services et al., 2018). Les résultats de validation de la méthode de quantification de la tyrosine et de la nitrotyrosine par LDTD-QqQMS sont présentés dans le tableau 29.

Tableau 29. Validation de la méthode de quantification de la tyrosine et de la nitrotyrosine par LDTD-QqQMS.

Composé	Limite de quantification	Domaine de linéarité	R ²	Exactitude (%)			Précision (% CV)					
				33,9	1000 µg	1500 µg	33,9 µg L ⁻¹		1000 µg L ⁻¹		1500 µg L ⁻¹	
	(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	µg L ⁻¹	L ⁻¹	L ⁻¹	Intra- jour	Inter- jour	Intra- jour	Inter- jour	Intra- jour	Inter- jour	
Tyrosine	11,3	11,3 - 2000	0,9988	3,10	0,94	-0,44	8,51	11,50	2,23	1,87	3,63	3,26
Nitrotyrosine	11,3	11,3 - 2000	0,9966	6,17	- 0,96	0,08	7,55	18,40	1,39	2.52	2,01	2,20

4. 1. 1. 3. Analyses d'échantillons dopés

L'analyse des échantillons dopés s'est déroulée sur une période de deux jours pour chacun des composés pharmaceutiques. Due à une contrainte physique, la réaction d'oxydation par voie humide ainsi que la formation de la peroxyxynitrite s'est effectuée la première journée à Sorel-Tracy. La nitration de la tyrosine ainsi que l'analyse par LDTD-QqQMS s'est effectuée lors de la deuxième journée à Québec. Étant donnée la stabilité de la peroxyxynitrite à des températures basses (-20 °C) pour 48 heures, il a été possible d'effectuer les analyses sur cette période de deux jours. Le contrôle négatif est composé d'eau désionisée et le contrôle positif de 600 mM H₂O₂. Quant à l'échantillon initial, ce dernier est prélevé avant traitement OVH et l'échantillon final est prélevé après 20 minutes de temps de résidence dans le réacteur.

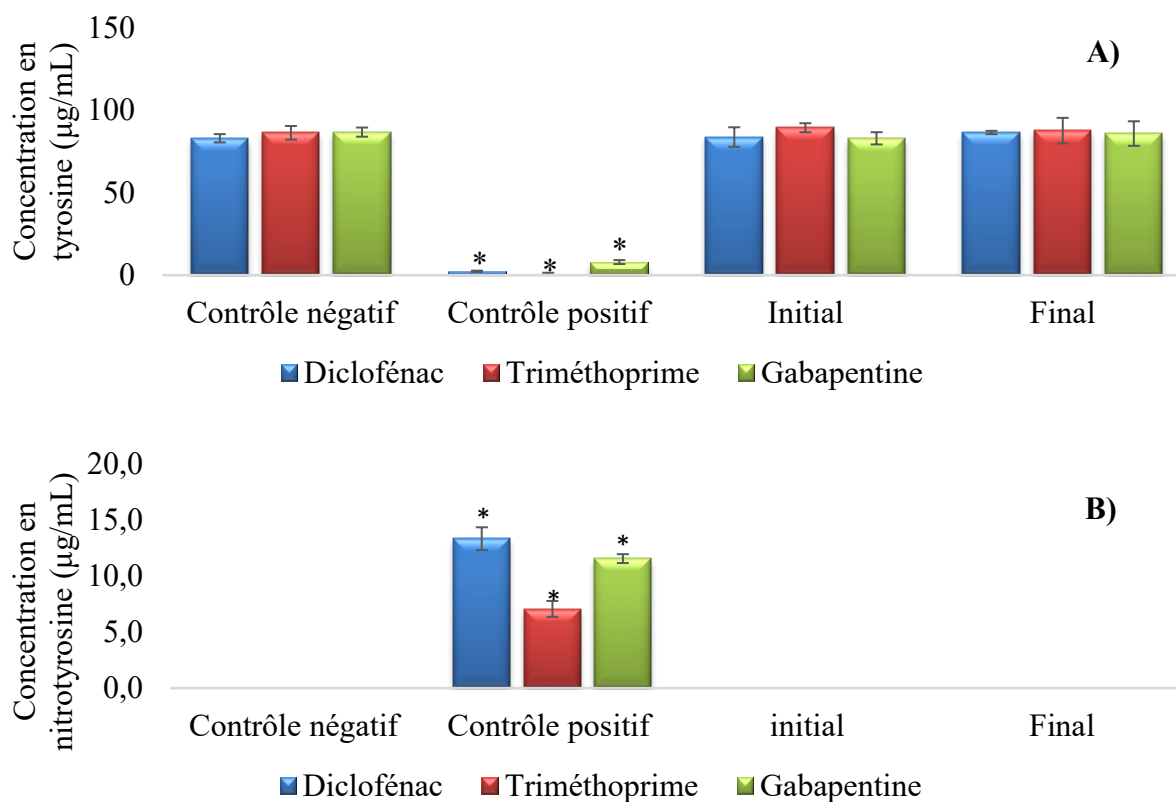


Figure 16. Consommation de la tyrosine à la suite de l'arrêt du réacteur d'OVH par l'oxydant ($n=8$); A) Suivi en fonction de la tyrosine; B) Suivi en fonction de la nitrotyrosine

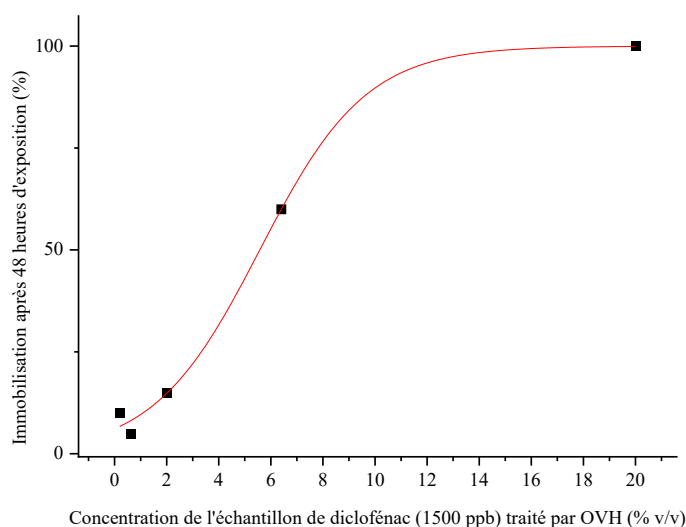
*significativement différents selon le test ANOVA et le test posthoc Tukey (HSD).

Bien qu'il y ait formation d'espèces réactives en oxygène lors des procédés d'oxydation avancés, aucun pouvoir oxydant n'a été observé après 20 minutes de temps de résidence dans le réacteur (figure 16) (Dong et al., 2022). La stabilité des espèces est peut-être très faible, ce qui expliquerait également les résultats obtenus. Une autre question peut alors être posée, si les espèces réactives ne réagissent pas lors de l'arrêt du réacteur, la méthode utilisée est-elle assez sensible ? Dans Dong et al. (2022), ils utilisent la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (en anglais electron paramagnetic resonance spectroscopy, EPR) afin de vérifier s'il y a création d'hydroxyles radicalaire lors du traitement, mais permet également l'identification des espèces réactives (Zhang et al., 2018). Bien que l'utilisation de la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique semble une bonne alternative à la méthode développée lors de ce projet, cette méthode n'est pas très accessible. Dans Zhang et al. (2018), plusieurs méthodes plus accessibles y sont présentées tels que des méthodes dépendantes de la fluorescence (coloration au dihydroéthidium, diacétate de dichlorodihydrofluorescéine), méthodes dérivées de la chimiluminescence (lucigenin, luminol), méthode de chromatographies (LC-MS), méthodes de spectrophotométrie (réduction du cytochrome C, boronates, diaminobenzidine) et des méthodes électrochimiques. Est-il alors possible de se servir de l'une de ces méthodes afin d'identifier ces mêmes espèces après l'arrêt du réacteur ? Ainsi, il n'est pas possible de conclure s'il y a production d'espèces oxydantes lors du traitement d'oxydation par voie humide, car ces dernières ne sont pas présentes en assez grande quantité afin d'être détectées par le test développé lors de ce projet (LDTD-QqQMS).

4. 1. 2. Évaluation de la toxicité aiguë sur *Daphnia magna* d'échantillons traités par OVH

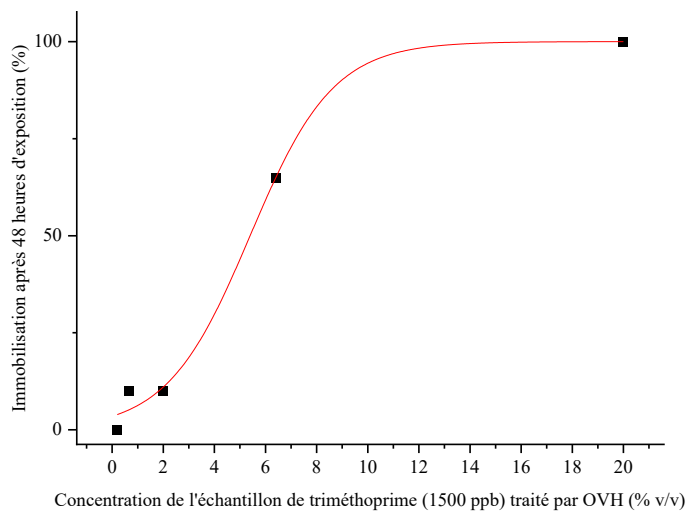
Plusieurs essais de toxicité aiguë ont été effectués afin de déterminer l'origine de la toxicité observée à la suite du traitement d'oxydation par voie humide. Premièrement, la toxicité aiguë des drogues traitées individuellement a été évaluée. Initialement, les composés pharmaceutiques ont été introduits à des concentrations de 1 500 µg L⁻¹. Les concentrations effectives présentées ci-dessous seront donc des pourcentages (v/v) de l'échantillon traité. En ce qui concerne la gabapentine, avant d'appliquer le traitement d'OVH, aucune toxicité n'a été observée. Toutefois, lorsque le traitement OVH a été appliqué, la concentration effective de l'échantillon traité après 48 heures d'exposition est de 4,9 ± 0,3 % (v/v). Pour le triméthoprim, l'échantillon avant

traitement ne présentait aucune toxicité aiguë chez l'organisme *D. magna*. Toutefois, après traitement OVH, la concentration effective médiane après 48 heures d'exposition était de $5,4 \pm 0,2$ % (v/v). Le dernier composé dont la toxicité aiguë a été évaluée avant et après traitement OVH est le diclofénac. Initialement, aucune toxicité n'a été observée, toutefois, après traitement, la concentration effective médiane est de $5,6 \pm 0,2$ % (v/v) après 48 heures d'exposition. Afin d'assurer la validité des résultats, le coefficient de régression ajusté (R^2) de la régression non linéaire doit être minimalement de 0,99.



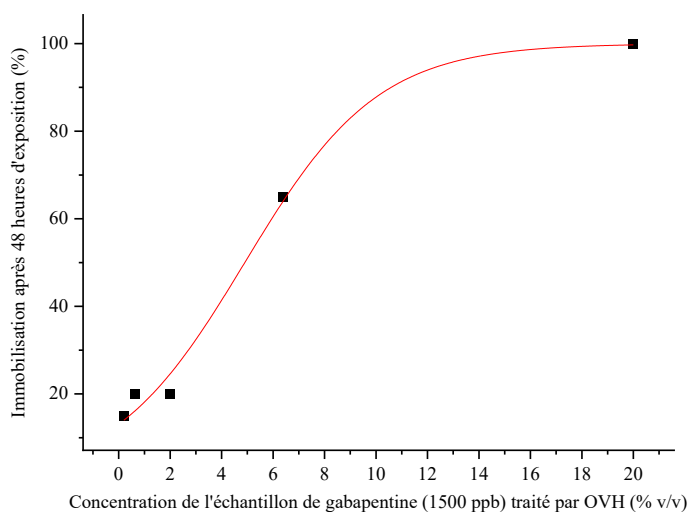
A)

Modèle	Dose réponse
CE ₅₀ (%)	$5,6 \pm 0,2$
R ²	0,9958



B)

Modèle	Dose réponse
CE ₅₀ (%)	5,4 ± 0,2
R ²	0,9929



C)

Modèle	Dose réponse
CE ₅₀ (%)	4,9 ± 0,3
R ²	0,9910

Figure 17. Détermination de la concentration effective médiane pour A) le diclofénac ; B) la gabapentine ; C) le triméthoprime

Les figures 17 et 18 présentent les résultats des bioessais avec *Daphnia magna* afin de déterminer la concentration effective médiane. Le modèle utilisé est celui de la dose-réponse et les R² sont

tous plus grands que 0,99. À la suite de l'obtention de ces résultats, il est possible de conclure que les drogues traitées par OVH sont ensuite dégradées en produits de transformations qui possèdent une certaine toxicité. Tel qu'il a été mentionné dans le chapitre précédent (Chapitre 3), l'un des mandats de ce projet est de déterminer les produits de dégradation pouvant causer cette toxicité. C'est pourquoi des bioessais avec *Daphnia magna* ont également été effectués afin de déterminer la contribution des produits de transformation identifiés sur la toxicité observée.

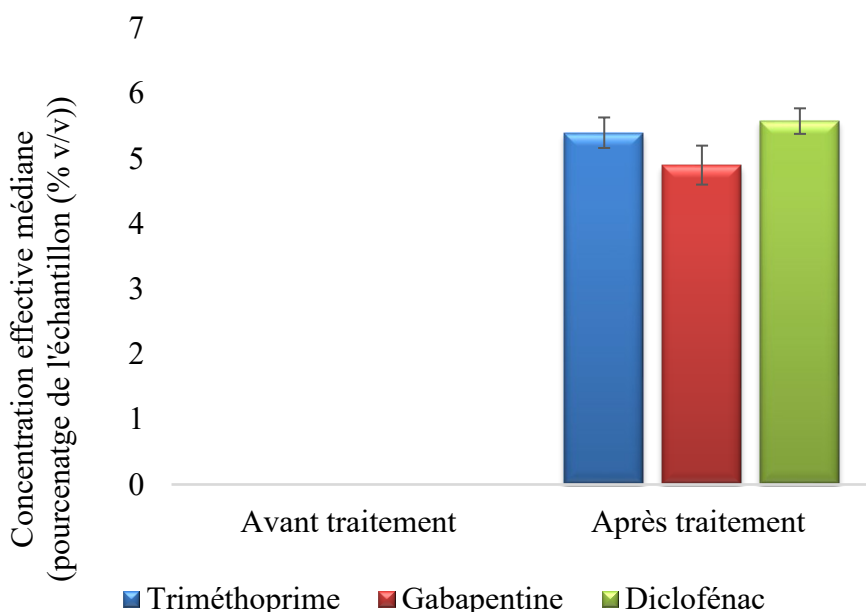


Figure 18. Toxicité observée chez *D. magna* après 48 heures d'exposition.

Lors d'une étude précédente, quatre acides carboxyliques ont été quantifiés dans des échantillons d'effluents hospitaliers traités (Guerette et al., 2021). Ainsi, afin de pouvoir déterminer leur effet sur la toxicité aiguë observée, des bioessais ont été effectués à l'aide d'un mélange d'acide acétique, formique, glycolique ainsi que d'acide succinique. La composition initiale de ce mélange est de 150 mg L⁻¹ d'acide acétique, 142 mg L⁻¹ d'acide formique, 26 mg L⁻¹ d'acide glycolique et 44 mg L⁻¹ d'acide succinique. Lors des premiers essais, une toxicité aiguë à 22 ± 8 % (v/v) a été observée (figure 19). Il faut toutefois considérer que le R²-ajusté est de 0,98.

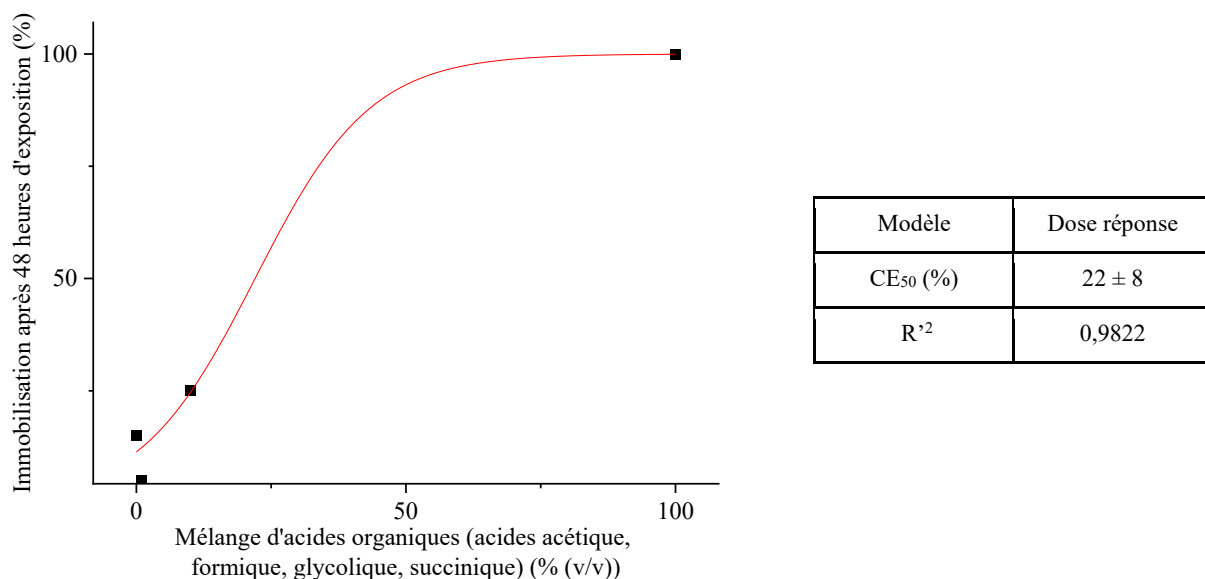


Figure 19. Toxicité aiguë observée lorsque le crustacé *D. magna* est exposé au mélange d'acides organiques (acides acétique, formique, glycolique, succinique).

Bien qu'une toxicité aiguë ait été observée lors du bioessai sur les acides carboxyliques retrouvés dans les échantillons traités par OVH, le pH change en fonction de la concentration, ce qui peut expliquer l'immobilité ainsi que la mortalité observée. Lors de précédents tests d'oxydation en voie humide sur des effluents hospitaliers, les pH mesurés étaient neutres à la sortie du réacteur. Ainsi, lors du second bioessai avec les acides carboxyliques, le pH des solutions tests a été contrôlé avec l'ajout du tampon carbonate jusqu'à l'obtention d'un pH neutre. Après 48 heures d'exposition, aucune mortalité ou immobilité n'a été observée. La mortalité initiale provenait donc de l'exposition à des pH acides. En vue de ces résultats, il est possible de conclure que la toxicité observée ne provenait principalement pas de la présence de ces acides carboxyliques, mais peut provenir d'un effet synergique, additif ou antagoniste de la présence d'acides organiques avec d'autres produits de transformation des composés pharmaceutiques ou bien seulement de la présence de ces autres produits de transformations produits lors de l'OVH des composés pharmaceutiques.

Il est maintenant élucidé que le mélange d'acides carboxyliques quantifiés par Guerette et al. (2021) ne provoque pas de mortalité ni d'immobilisation chez *Daphnia magna*. L'origine de la toxicité observée doit donc provenir de la présence d'autres produits de transformation. L'azote ammoniacal est le produit de transformation azoté qui a été quantifié au cours de ce projet. Afin de valider son effet sur *D. magna*, des bioessais ont été effectués et la concentration effective médiane de l'ammonium a été déterminée. La concentration effective médiane observée de l'azote ammoniacal sur *D. magna* est de 31 ± 2 mg L⁻¹ (figure 20). Le pH des solutions a été contrôlé à l'aide du tampon carbonate (pH environnant 9). Des tests avec l'utilisation d'un tampon phosphate, afin d'obtenir des pH neutres, ont démontrés que ce tampon (phosphate) provoque la mortalité des daphnies.

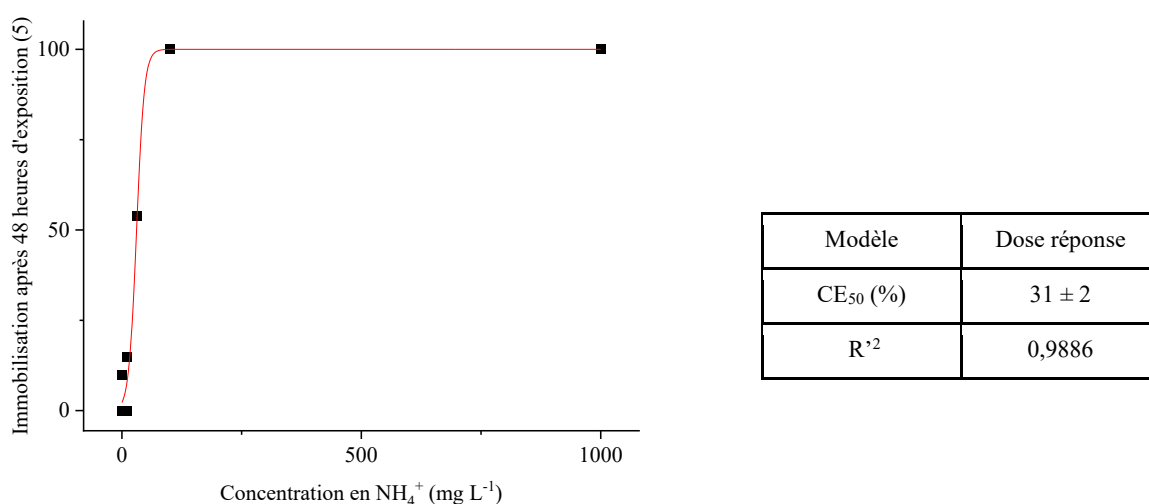


Figure 20. Détermination de la concentration effective médiane de l'ammonium

Il est possible d'estimer la concentration approximative d'azote ammoniacal qui serait produite lors du traitement des composés pharmaceutiques à des concentrations environnementales. Effectivement, selon Oliveira et al. (2015), les concentrations maximales mesurées dans des effluents hospitaliers de diclofénac, de gabapentine et de triméthoprime sont respectivement de 0,49 µg L⁻¹, de 105,83 µg L⁻¹ et de 20,33 µg L⁻¹. Ainsi, si pour une concentration de 258 mg L⁻¹ de diclofénac, la quantité d'azote ammoniacal produite est de 12,3 mg L⁻¹, pour 280 mg L⁻¹ de

gabapentine, la quantité d'azote ammoniacal produite est de 24,1 mg L⁻¹ et pour 306 mg L⁻¹ de triméthoprim, la quantité d'azote ammoniacal est de 753 mg L⁻¹, les taux d'azote ammoniacal produits individuellement par les composés pharmaceutiques à des concentrations environnementales traitées par OVH devraient au maximum atteindre une concentration de 50 µg L⁻¹. Étant donné que la CE₅₀ de l'ammonium est de 31 mg L⁻¹, il est très peu probable que la seule source de toxicité des effluents traités par l'OVH provient de la production d'azote ammoniacale. Les concentrations d'azote ammoniacal produites par les composés pharmaceutiques purs seraient donc environ 620 fois plus petites que la CE₅₀ de l'ammonium.

Dans Guérette (2021), l'analyse en non ciblé tant en GC-MS de l'acide acétylsalicylique, de la gabapentine, du diclofénac ainsi que du triméthoprim a permis l'identification d'intermédiaires de réaction et de produits de transformation qui n'avaient pas été quantifiés en GC-MS ciblé. C'est le cas de l'acide lactique, de l'urée, de l'uracile, de la cytosine, de l'acide 3-hydroxypropionique, de l'acide benzoïque, de l'acide salicylique, du méthénamine, de la gabapentine lactame, du 1-(2,6-dichlorophényl)-2-indolinone, du 3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde, du syringaldéhyde et du phénol (Guérette, 2021). En ce qui concerne les analyses non ciblées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en temps de vol (LC-QToF), plusieurs produits de transformations ont été détectés, mais leur structure n'a pas été élucidée (Guérette, 2021).

Ces produits de transformations pourraient donc, à leur tour, contribuer à la toxicité observée chez *D. magna*. De plus, trois types d'effet toxique peuvent être présents lorsque nous avons affaire à des mélanges, soit l'effet synergique, l'effet additif, l'effet de potentialisation et l'effet antagoniste (Centre canadien d'hygiène et de sécurité du travail, 2019). Lorsqu'un effet synergique est observé, c'est que dans un mélange, la toxicité observée est plus grande que l'addition des toxicités individuelles (Centre canadien d'hygiène et de sécurité du travail, 2019). Alors que pour l'effet additif, la toxicité des molécules individuelles s'additionne (Centre canadien d'hygiène et de sécurité du travail, 2019). L'effet de potentialisation est lorsqu'un composé, n'ayant aucun effet toxique, est mis en présence d'un autre composé, mais ayant un effet toxique, « ce dernier [devient] beaucoup plus toxique » (Centre canadien d'hygiène et de sécurité du travail, 2019). En ce qui

concerne l'effet antagoniste, lorsque les molécules sont présentes dans un même mélange, l'effet de leur toxicité est réduit (Centre canadien d'hygiène et de sécurité du travail, 2019).

CONCLUSION

Les objectifs de ce projet étaient d'identifier les principaux produits de transformation azotés, en second lieu, d'effectuer l'évaluation de la toxicité afin d'identifier la cause de la toxicité produite à la suite de l'OVH. Les objectifs ont été atteints. En effet, en plus de produire principalement des acides carboxyliques, soit l'acide acétique, l'acide formique, l'acide glycolique ainsi que l'acide succinique, l'oxydation par voie humide des composés pharmaceutique produit, dans certains cas, de l'éthylamine, et dans tous les cas étudiés (diclofénac, gabapentine, triméthoprim) de l'azote ammoniacal. L'obtention de telles concentrations d'azote ammoniacal (12,3 mg L⁻¹ pour le diclofénac, 24,1 mg L⁻¹ pour la gabapentine et 753 mg L⁻¹ pour le triméthoprim) est très intéressante, car il suggère la minéralisation de l'azote lors de ce procédé. Il avait déjà été établi que le produit de transformation d'acide carboxylique permettant d'évaluer l'avancement de la réaction d'oxydation par voie humide était l'acide acétique (Guérette, 2021). En effet, plus la réaction d'oxydation est avancée, plus la concentration en acide acétique augmente, alors que la concentration en acide formique, glycolique et succinique diminue (Guérette, 2021). En ajoutant le suivi de l'azote ammoniacal au suivi des acides carboxyliques, l'avancement de la réaction d'oxydation pourrait être suivi pour différents échantillons. Bien que l'azote ammoniacal ait été quantifié, une autre molécule d'azote inorganique pourrait être quantifiée afin d'augmenter la documentation sur le devenir de l'azote lors de l'OVH des produits pharmaceutiques. Les nitrates et les nitrites sont également produits lors de procédés d'oxydation avancés. Il se pourrait donc bien que ce soit cette forme de l'azote inorganique qui soit formée lors de l'OVH comme second produit de transformation de l'azote. Les nitrates pourraient donc correspondre au ~ 20 % de l'azote qui n'est pas encore identifié après OVH.

Pour le second objectif de ce projet, soit l'évaluation de la toxicité, il a été déterminé que seul, le mélange d'acide carboxylique n'est pas responsable de la toxicité observée après traitement OVH. De plus, bien que l'ammonium possède une toxicité aiguë à 31 mg L⁻¹, les concentrations produites aux concentrations de pharmaceutiques traitées par OVH testées avec *Daphnia magna* seraient trop peu élevées afin de causer la toxicité observée. L'azote ammoniacal n'est donc pas la

principale source de toxicité. Toutefois, plusieurs effets peuvent être observés lorsqu'il est question de toxicité. Effectivement des effets synergiques, additifs, antagonistes et de potentialisation peuvent être observés lorsqu'il est question d'un mélange de composés. L'évaluation de la toxicité de produits de transformation seuls ne peut donc pas expliquer la toxicité observée. De plus, la toxicité aiguë de plusieurs produits de transformations identifiés, mais non quantifiés n'a pas été évaluée. Ces derniers pourraient également être responsables de la toxicité observée. Davantage de recherche est encore nécessaire afin de bien cerner la toxicité produite lors de l'oxydation par voie humide des composés pharmaceutiques.

Bien qu'une partie de la toxicité ne soit pas élucidée, les résultats obtenus nous permettraient d'évaluer l'avancement de la réaction d'oxydation par voie humide et permettraient d'évaluer la viabilité de l'implantation d'un tel prétraitement en amont des stations d'épurations conventionnelles. L'objectif de l'utilisation de l'OVH comme prétraitement des effluents hospitaliers est d'obtenir une implantation viable de ce système. Ce qui est entendu par une implantation viable est d'obtenir des rejets qui n'affecteront pas les consortiums bactériens présents dans le traitement secondaire des stations d'épuration (donc que la toxicité produite n'ait pas d'impacts sur ces consortiums). De plus, les produits de transformations plus complexes, tels que ceux identifiés par LC-QqQMS dans Guérette (2021), devront être dégradés par le traitement secondaire. Néanmoins, l'OVH est connu pour augmenter l'indice de biodégradabilité des effluents traités, ce qui permettrait aux consortiums bactériens de dégrader ces produits de transformation (Tembhekar et al., 2015).

Ce projet a donc permis de définir le devenir de l'azote lorsque des composés pharmaceutiques sont traités par l'oxydation par voie humide. Effectivement, la minéralisation de l'azote semble être atteinte après 20 minutes de temps de résidence dans le réacteur. Peu d'amines organiques ont été quantifiées alors que l'azote ammoniacal est le principal produit de transformation azoté identifié et quantifié lors de ce projet. Ces résultats suggèrent donc que les produits de transformation azotés organiques s'oxydent lors de l'OVH afin d'obtenir ses formes minéralisées. Pour l'avenir de ce projet, le suivi de l'azote ammoniacal, des nitrates, des nitrites ainsi que de l'azote total par la méthode Kjeldahl pourrait être une bonne solution afin de déterminer le devenir

de l'azote inorganique. Bien que l'azote ammoniacal ait été évalué, les formes oxydées de l'azote minéralisé n'ont pas été évaluées (nitrites et nitrates). Ainsi, en évaluant les taux de transformation de l'azote contenue dans les composés pharmaceutiques en azote inorganique (azote ammoniacal et nitrates), il serait possible de déterminer le taux d'azote non identifié, soit de l'azote organique, ou bien le taux d'azote ammoniacal qui est perdu sous forme gazeuse.

Pour le suivi de la toxicité, une chromatographie liquide préparatrice, pourrait être effectué afin de séparer les fractions et d'évaluer leur toxicité séparément. Le même principe est utilisé dans Frank et al. (2021) avec des cartouches d'extraction sur phase solide afin de séparer en fraction un échantillon d'eaux souterraines affectées par les sables bitumineux afin d'effectuer l'évaluation de la toxicité de chacune des fractions. Ainsi, lorsque les fractions présentant une toxicité aiguë sont identifiées, ces dernières pourraient être analysées en chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en non-ciblé. Une étude sur l'effet des effluents de l'OVH devra être conduite. Toutefois, si ces résultats sont concluants et qu'il y a peu d'effets des produits de transformation sur les consortiums bactériens, les perspectives de cette technologie sont prometteuses. L'OVH pourra potentiellement être installée comme prétraitement à l'exutoire des hôpitaux afin de dégrader les produits pharmaceutiques considérés comme des contaminants émergents.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdalla, K. Z., Hammam, G. (2014). Correlation between Biochemical Oxygen Demand and Chemical Oxygen Demand for Various Wastewater Treatment Plants in Egypt to Obtain the Biodegradability Indices. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, 13(1), 7.
- Abhilash, N. T. (2012). Pharmaceuticals in Environment: A review on its effect. *Research Journal of Chemical Sciences*, 2(1), 3.
- Adwas, A. A., Elsayed, A. S. I., Azab, A. E., Quwaydir, F. A. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 6(1), 43-47. <https://doi.org/10.15406/jabb.2019.06.00173>
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(49), 31.
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*, 32(1), 1-17. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
- Agence de la santé publique du Canada. (2021). *Rapport du Système Canadien de Surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens*. (HP37-21F-PDF).
- Bartesaghi, S., Radi, R. (2018). Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biology*, 14, 618-625.
- Bhat, A. P., Gogate, P. R. (2021). Degradation of nitrogen-containing hazardous compounds using advanced oxidation processes: A review on aliphatic and aromatic amines, dyes, and pesticides. *J Hazard Mater*, 403, 123657. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123657>
- Bio, S., Nunes, B. (2020). Acute effects of diclofenac on zebrafish: Indications of oxidative effects and damages at environmentally realistic levels of exposure. *Environ Toxicol Pharmacol*, 78, 103394. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103394>
- Boucher, V., Beaudon, M., Ramirez, P., Lemoine, P., Volk, K., Yargeau, V., Segura, P. A. (2021). Comprehensive evaluation of non-catalytic wet air oxidation as a pretreatment to remove pharmaceuticals from hospital effluents. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 7(7), 1301-1314. <https://doi.org/10.1039/d1ew00203a>
- Bridgham, S. D., Ye, R. (2013). Organic Matter Mineralization and Decomposition. *Methods in Biogeochemistry of Wetlands* (pp. 385-406). <https://doi.org/10.2136/sssabookser10.c20>

- Brillas, E., Mur, E., Saucedo, R., Sánchez, L., Peral, J., Domènech, X., Casado, J. (1998). Aniline mineralization by AOP's: anodic oxidation, photocatalysis, electro-Fenton and photoelectro-Fenton processes. *Applied Catalysis B : Environmental*, 16, 12.
- Brooks, B. W., Berninger, J. P., Ramirez, A. J., Huggett, D. B. (2012). *Perspectives on Human Pharmaceuticals in the Environment* (B. W. Brooks, D. B. Huggett, Eds. Vol. 4). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3473-3_1
- Camel, V. (2003). Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58(7), 1177-1233. [https://doi.org/10.1016/s0584-8547\(03\)00072-7](https://doi.org/10.1016/s0584-8547(03)00072-7)
- Castegnaro, M., Hansel, S. (2006). Les médicaments anticancéreux dans les effluents hospitaliers et domestiques. *Environnement, Risques & Santé*, 5(4).
- Centre canadien d'hygiène et de sécurité du travail. (2019). *Produits et substances chimiques - Synergie et autres termes connexes*. 17 mars <https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/synergism.html#:~:text=In%20toxicology%2C%20synergism%20refers%20to,effects%20of%20the%20individual%20chemicals>.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. (2014). *Détermination de la demande biochimique en oxygène : méthode électrométrique*. (MA.315-DBO1.1, Rév. 3). Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. (2015). *Détermination de la conductivité : méthode électrométrique*. (MA. 115 – Cond. 1.1, rév. 1). d. l. E. e. d. l. L. c. Ministère du Développement durable, l. c. climatiques
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. (2016). *Détermination de la demande chimique en oxygène : méthode de reflux en système fermé suivi d'un dosage par colorimétrie avec le bichromate de potassium*. (MA.315-DCO1.1, Rév. 4). Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec
- Daniels, K. D., Park, M., Huang, Z., Jia, A., Flores, G. S., Lee, H. K., Snyder, S. A. (2020). A review of extraction methods for the analysis of pharmaceuticals in environmental waters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(21), 2271-2299. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1705723>
- Danielson, S. R., Andersen, J. K. (2008). Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, 44(10), 1787-1794. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.005>

- David, V., Moldoveanu, S. C., Galaon, T. (2021). Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *Biomed Chromatogr*, 35(1), e5008. <https://doi.org/10.1002/bmc.5008>
- de Jesus Gaffney, V., Cardoso, V. V., Cardoso, E., Teixeira, A. P., Martins, J., Benoliel, M. J., Almeida, C. M. M. (2017). Occurrence and behaviour of pharmaceutical compounds in a Portuguese wastewater treatment plant: Removal efficiency through conventional treatment processes. *Environ Sci Pollut Res Int*, 24(17), 14717-14734. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9012-7>
- De Lange, H. J., Noordoven, W., Murk, A. J., Lurling, M., Peeters, E. T. (2006). Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquat Toxicol*, 78(3), 209-216. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.002>
- De Neve, S., Van de Steene, J., Hartmann, R., Hofman, G. (2000). Using time domain reflectometry for monitoring mineralization of nitrogen from soil organic matter. *European Journal of Soil Science*, 51(2), 295-304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2000.00306.x>
- Debellefontaine, H., Foussard, J. N. (2000). Wet air oxidation for treatment of industrial wastes. Chemical aspects, reactor design and industrial applications in Europe. *Waste Management*, 20, 15.
- Dialynas, E., Mantzavinos, D., Diamadopoulos, E. (2008). Advanced treatment of the reverse osmosis concentrate produced during reclamation of municipal wastewater. *Water Res*, 42(18), 4603-4608. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.008>
- Dong, C., Fang, W., Yi, Q., Zhang, J. (2022). A comprehensive review on reactive oxygen species (ROS) in advanced oxidation processes (AOPs). *Chemosphere*, 308(Pt 1), 136205. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136205>
- Environmental Protection Agency. (2000). *Wastewater Technology Fact Sheet - Ammonia Stripping* (EPA 832-F-00-019). Office of Water https://www3.epa.gov/npdes/pubs/ammonia_stripping.pdf
- Escher, B. I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., McArdell, C. S. (2011). Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res*, 45(1), 75-92. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.019>
- Evens, E., Blanchard, J.-M., Keck, G., Perrodin, Y. (2001). Caractérisation chimique, biologique et écotoxicologique des effluents hospitaliers. *Environnement, Ingénierie & Développement*, 22, 4. <https://doi.org/https://doi.org/10.4267/dechets-sciences-techniques.1359>

- Environnement et Lutte contre les changements climatiques. (2020). *Fiche d'information - Toxicité aiguë des effluents municipaux: relation entre les concentrations en azote ammoniacal et la toxicité des effluents municipaux pour la truite*. Environnement et Lutte contre les changements climatiques
- Foster, H. R., Burton, G. A., Basu, N., Werner, E. E. (2010). Chronic exposure to fluoxetine (Prozac) causes developmental delays in *Rana pipiens* larvae. *Environ Toxicol Chem*, 29(12), 2845-2850. <https://doi.org/10.1002/etc.345>
- Frank, R. A., Bauer, A. E., Roy, J. W., Bickerton, G., Rudy, M. D., Vanderveen, R., Batchelor, S., Barrett, S. E., Milestone, C. B., Peru, K. M., Headley, J. V., Brunswick, P., Shang, D., Farwell, A. J., Dixon, D. G., Hewitt, L. M. (2021). Preparative isolation, fractionation and chemical characterization of dissolved organics from natural and industrially derived bitumen-influenced groundwaters from the Athabasca River watershed. *Science of The Total Environment*, 777. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146022>
- Gagne, F., Bouchard, B., Andre, C., Farcy, E., Fournier, M. (2011). Evidence of feminization in wild *Elliptio complanata* mussels in the receiving waters downstream of a municipal effluent outfall. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 153(1), 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.09.002>
- Garrido-Cardenas, J. A., Esteban-Garcia, B., Aguera, A., Sanchez-Perez, J. A., Manzano-Agugliaro, F. (2019). Wastewater Treatment by Advanced Oxidation Process and Their Worldwide Research Trends. *Int J Environ Res Public Health*, 17(1). <https://doi.org/10.3390/ijerph17010170>
- Giri, A. S., Golder, A. K. (2015). Decomposition of drug mixture in Fenton and photo-Fenton processes: comparison to singly treatment, evolution of inorganic ions and toxicity assay. *Chemosphere*, 127, 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.010>
- Gouvernement du Canada. (2020). *Traitement des eaux usées municipales*. <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/indicateurs-environnementaux/traitement-eaux-usees-municipales.html>
- Gouvernement du Québec. (2022). Règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées. *chapitre Q-2, r. 34.1*.
- Gravel, A., Guerette, C., Fortin, D., Auger, S., Picard, P., Segura, P. A. (2019). Further studies on the signal enhancement effect in laser diode thermal desorption-triple quadrupole mass spectrometry using microwell surface coatings. *J Mass Spectrom*, 54(12), 948-956. <https://doi.org/10.1002/jms.4455>
- Gros, M., Petrovic, M., Barcelo, D. (2006). Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. *Anal Bioanal Chem*, 386(4), 941-952. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0586-z>

- Guérette, C. (2021). *  tude du devenir des composés pharmaceutiques contenus dans les effluents d'hôpitaux après traitement par oxydation en voie humide* Universit   de Sherbrooke].
- Guerette, C., Lemoine, P., Ramirez, P., Segura, P. A. (2021). Determination of short-chain carboxylic acids and non-targeted analysis of water samples treated by wet air oxidation using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1652, 462352. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462352>
- Guest, I., Varma, D. R. (1991). Developmental toxicity of methylamines in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 32(3), 12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/15287399109531485>
- Hach Company. (2021). Oxygen Demand, Chemical. DOC316.53.01099 (Ed.),
- Halling-Sorensen, B., Lutzhoft, H.-C. H., Andersen, H. R., Ingerslev, F. (2000). Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 6.
- Hellou, J., Ross, N. W., Moon, T. W. (2012). Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. *Environ Sci Pollut Res Int*, 19(6), 2007-2023. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0909-x>
- Huang, M. Z., Li, J. Y. (2020). Physiological regulation of reactive oxygen species in organisms based on their physicochemical properties. *Acta Physiol (Oxf)*, 228(1), e13351. <https://doi.org/10.1111/apha.13351>
- Ingale, M. N., Joshi, J. B., Mahajani, V. V., Gada, M. K. (1996). Waste Treatment of an Aqueous Waste Stream from a Cyclohexane Oxidation Unit. *Process Safety and Environmental Protection*, 74(4), 265-272. <https://doi.org/10.1205/095758296528617>
- Jjemba, P. K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 63(1), 113-130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.11.011>
- Kanakaraju, D., Glass, B. D., Oelgemoller, M. (2018). Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review. *J Environ Manage*, 219, 189-207. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.103>
- Khan, A. U., Kovacic, D., Kolbanovskiy, A., Desai, M., Frenkel, K., Geacintov, N. E. (2000). The decomposition of peroxyxynitrite to nitroxyl anion (NO^{^{2-2212;}}) and singlet oxygen in aqueous solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 2984-2989. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.97.7.2984>

- Klare, M., Waldner, G., Bauer, R., Jacobs, H., Broekaert, J. A. C. (1999). Degradation of nitrogen containing organic compounds by combined photocatalysis and ozonation. *Chemosphere*, 38(9), 15. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00414-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00414-7)
- Kuenen, J. G. (2008). Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature*, 6, 7.
- Lin, A. Y., Yu, T. H., Lateef, S. K. (2009). Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *J Hazard Mater*, 167(1-3), 1163-1169. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.108>
- Lozano, I., Perez-Guzman, C. J., Mora, A., Mahlknecht, J., Aguilar, C. L., Cervantes-Aviles, P. (2022). Pharmaceuticals and personal care products in water streams: Occurrence, detection, and removal by electrochemical advanced oxidation processes. *Sci Total Environ*, 827, 154348. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154348>
- Ministère de l'Environnement de la lutte contre les changements climatiques de la Faune et des Parcs. (2023a). Annexe 2 - Valeurs aiguës finales à l'effluent pour la protection de la vie aquatique d'eau douce pour l'azote ammoniacal total. https://www.environnement.gouv.qc.ca/Eau/criteres_eau/annexe_2.htm
- Ministère de l'Environnement de la lutte contre les changements climatiques de la Faune et des Parcs. (2023b). *Critères de qualité de l'eau de surface - pH*. 16 mars https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/criteres_eau/details.asp?code=s0381#:~:text=Un%20pH%20de%206%2C0,de%20protection%20du%20milieu%20aquatique.
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends Plant Sci*, 22(1), 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Moctezuma, E., Leyva, E., Aguilar, C. A., Luna, R. A., Montalvo, C. (2012). Photocatalytic degradation of paracetamol: intermediates and total reaction mechanism. *J Hazard Mater*, 243, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.010>
- Mpatani, F. M., Aryee, A. A., Kani, A. N., Han, R., Li, Z., Dovi, E., Qu, L. (2021). A review of treatment techniques applied for selective removal of emerging pollutant-trimethoprim from aqueous systems. *Journal of Cleaner Production*, 308. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127359>
- OECD. (2004). *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. OECD Publishing. 25 janvier
- Office québécois de la langue française. (2011). *Contaminant d'intérêt émergent*. <https://vitrinelinguistique.oqlf.gouv.qc.ca/fiche-gdt/fiche/26503165/contaminant-dinteret-emergent>

- Oliveira, T. S., Murphy, M., Mendola, N., Wong, V., Carlson, D., Waring, L. (2015). Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Sci Total Environ*, 518-519, 459-478. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.104>
- Oury, T. D., Tatro, L., Ghio, A. J., Piantadosi, C. A. (1995). Nitration of tyrosine by hydrogen peroxide and nitrite. *Free Radic Res*, 23(6), 537-547. <https://doi.org/10.3109/10715769509065275>
- Pintar, A., Besson, M., Gallezot, P., Gibert, J., Martin, D. (2004). Toxicity to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* of Kraft bleach plant effluents treated by catalytic wet-air oxidation. *Water Res*, 38(2), 289-300. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.027>
- Qiu, W., Zheng, M., Sun, J., Tian, Y., Fang, M., Zheng, Y., Zhang, T., Zheng, C. (2019). Photolysis of enrofloxacin, pefloxacin and sulfaquinoxaline in aqueous solution by UV/H(2)O(2), UV/Fe(II), and UV/H(2)O(2)/Fe(II) and the toxicity of the final reaction solutions on zebrafish embryos. *Sci Total Environ*, 651(Pt 1), 1457-1468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.315>
- Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. M. T., Shekhar, H. U. (2012). Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(07), 997-1019. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.327123>
- Rivas, F. J., Kolaczowski, S. T., Beltran, F. J., McLurgh, D. B. (1998). Development of a model for the wet air oxidation of phenol based on a free radical mechanism. *Chemical Engineering Science*, 53(14), 12.
- Robert, R., Barbati, S., Ricq, N., Ambrosio, M. (2002). Intermediates in wet oxidation of cellulose: identification of hydroxyl radical and characterization of hydrogen peroxide. *Water Research*, 36, 9.
- Rowe, W. P. M., Baker-Austin, C., Verner-Jeffreys, D. W., Ryan, J. J., Micallef, C., Maskell, D. J., Pearce, G. P. (2017). Overexpression of antibiotic resistance genes in hospital effluents over time. *J Antimicrob Chemother*, 72(6), 1617-1623. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx017>
- Saikia, S. K., Chowdhury, S. (2020). Oxidative Stress in Fish: A Review. *Journal of Scientific Research*, 12(1), 145-160. <https://doi.org/10.3329/jsr.v12i1.41716>
- Santos, L. H., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barcelo, D., Montenegro, M. C. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci Total Environ*, 461-462, 302-316. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077>

- Saravanathamizhan, R., Perarasu, V. T. (2021). Improvement of Biodegradability Index of Industrial Wastewater Using Different Pretreatment Techniques. *Wastewater Treatment* (pp. 103-136). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821881-5.00006-4>
- Sathishkumar, P., Meena, R. A. A., Palanisami, T., Ashokkumar, V., Palvannan, T., Gu, F. L. (2020). Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review. *Sci Total Environ*, 698, 134057. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134057>
- Segura, P. A., Guillaumain, C., Eysseric, E., Boudrias, J., Moreau, M., Guerette, C., Clemencin, R., Beaudry, F. (2022). Ultrafast analysis of peptides by laser diode thermal desorption-triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 36(20), e9373. <https://doi.org/10.1002/rcm.9373>
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M. E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., . . . Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol*, 11, 694. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
- Silva, A. R., Martins, P. M., Teixeira, S., Carabineiro, S. A. C., Kuehn, K., Cuniberti, G., Alves, M. M., Lanceros-Mendez, S., Pereira, L. (2016). Ciprofloxacin wastewater treated by UVA photocatalysis: contribution of irradiated TiO₂ and ZnO nanoparticles on the final toxicity as assessed by *Vibrio fischeri*. *RSC Adv.*, 6(98), 95494-95503. <https://doi.org/10.1039/c6ra19202e>
- Silvestre, F. (2020). Signaling pathways of oxidative stress in aquatic organisms exposed to xenobiotics. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol*, 333(6), 436-448. <https://doi.org/10.1002/jez.2356>
- Sindelar, H. R., Brown, M. T., Boyer, T. H. (2014). Evaluating UV/H₂O₂, UV/percarbonate, and UV/perborate for natural organic matter reduction from alternative water sources. *Chemosphere*, 105, 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.040>
- Storz, G., Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 7.
- Teixeira, D., Fernandes, R., Prudencio, C., Vieira, M. (2016). 3-Nitrotyrosine quantification methods : Current concepts and future challenges. *Biochimie*, 125, 11.
- Tekin, H., Bilkay, O., Ataberk, S. S., Balta, T. H., Ceribasi, I. H., Sanin, F. D., Dilek, F. B., Yetis, U. (2006). Use of Fenton oxidation to improve the biodegradability of a pharmaceutical wastewater. *J Hazard Mater*, 136(2), 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.12.012>

- Tembhekar, P. D., Padoley, K. V., Mudliar, S. L., Mudliar, S. N. (2015). Kinetics of wet air oxidation pretreatment and biodegradability enhancement of a complex industrial wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 339-348. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.02.009>
- Thomulka, K. W., Lange, J. H. (1995). Combined Toxicity of Ethylamine and Methylamine in an Aquatic Bioassay System Using the Marine Bacterium *Vibrio Harveyi*. *Chemistry and Ecology*, 11(4), 10. <https://doi.org/10.1080/02757549508039069>
- Tsikas, D., Duncan, M. W. (2014). Mass spectrometry and 3-nitrotyrosine: strategies, controversies, and our current perspective. *Mass Spectrom Rev*, 33(4), 237-276. <https://doi.org/10.1002/mas.21396>
- Tungler, A., Szabados, E., Hosseini, A. M. (2015). Wet Air Oxidation of Aqueous Wastes. *Wastewater Treatment Engineering*. <https://doi.org/10.5772/60935>
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. (2018). *Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry* (FDA-2013-D-1020). <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>
- Van Coillie, R., Parent, L. (2015). *Écotoxicologie générale et appliquée*.
- Vogna, D., Marotta, R., Andreozzi, R., Napolitano, A., d'Ischia, M. (2004). Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of antiepileptic drug carbamazepine. *Chemosphere*, 54(4), 497-505. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00757-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00757-4)
- Walum, E. (1998). Acute Oral Toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 106(2), 7.
- Yu, H., Zhang, G., Cai, Y., Dong, F. (2021). Altering the substituents of salicylic acid to improve Berthelot reaction for ultrasensitive colorimetric detection of ammonium and atmospheric ammonia. *Anal Bioanal Chem*, 413(23), 5695-5702. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03485-3>
- Zhang, Q. H., Yang, W. N., Ngo, H. H., Guo, W. S., Jin, P. K., Dzakupasu, M., Yang, S. J., Wang, Q., Wang, X. C., Ao, D. (2016). Current status of urban wastewater treatment plants in China. *Environ Int*, 92-93, 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.024>
- Zhang, Y., Dai, M., Yuan, Z. (2018). Methods for the detection of reactive oxygen species. *Analytical Methods*, 10(38), 4625-4638. <https://doi.org/10.1039/c8ay01339j>
- Zhang, Y., Geissen, S. U., Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151-1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>

Zou, L. Y., Li, Y., Hung, Y.-T. (2007). Wet Air Oxidation for Waste Treatment. L. K. Wang, Y.-T. Hung, N. K. Shamas (Eds.), *Handbook of Environmental Engineering, Volume 5 : Advanced Physicochemical Treatment Technologies* (Vol. 5, pp. 720). The Humana Press Inc.