



Toxicité de composés aromatiques et de leurs sous-produits de dégradation

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU
MASTER II
OPTION : Eau et Assainissement

Présenté et soutenu publiquement le 28 Juin 2016 par :

Dawidwendé Thècle Laetitia ZOUNGRANA

Travaux dirigés par : Geoffroy LESAGE

Maitre de conférences à l'UM2

Marc CRETIN

Professeur de l'UM2

Julie MENDRET

Maitre de conférences à l'UM2

Yacouba KONATE

Enseignant chercheur à 2iE

Travaux effectués au Laboratoire de Génie des Procédés Membranaires (GPM),
Institut Européen des Membranes (IEM).

Jury d'évaluation du stage :

Président : Dr Hela KAROUI

Membres et correcteurs : Dr Yacouba KONATE
M.C. Geoffroy LESAGE
M.C. Julie MENDRET

Promotion [2014/2015]

« Dans la vie on ne fait pas ce que l'on veut mais on est responsable de ce que l'on est. »

Jean-Paul Sartre.

DEDICACES

Ceci est l'œuvre d'une aventure inouïe qui apportera un petit plus à la science mais aussi à ma personne.

Je rends grâce au Seigneur de m'avoir ouvert une si belle opportunité et de m'avoir donné une famille et des amis qui, malgré la distance m'ont toujours soutenue.

Je dédie ce mémoire à mon père ZOUNGRANA Marou Christophe et à ma mère YERBANGA Marcelline qui n'ont cessé de me soutenir durant tout mon parcours académique.

REMERCIEMENTS

Le stage de recherche qui m'a permis de rédiger ce mémoire s'est déroulé à Montpellier en France à l'institut Européen des Membranes.

Je remercie mon tuteur de stage Geoffroy LESAGE grâce à qui ce stage a été possible. Je le remercie d'une part pour son implication personnelle dans les démarches pour l'obtention de mon visa et d'autre part pour son accompagnement et la confiance qu'il a placée en moi tout au long de mes six mois de recherches.

Mes remerciements vont également à l'endroit du professeur Marc CRETIN pour sa disponibilité, sa grande humanité et son suivi tout au long de mon stage.

Je remercie mon référent à 2iE Dr Yacouba KONATE qui, fort de son expérience, n'a cessé de me prodiguer des conseils.

Je remercie toute l'équipe de travail de l'IEM et en particulier Thi-Xuan-Huong.Le, doctorante à l'IEM, avec qui, j'ai eu le plaisir de collaborer étroitement dans le travail durant la période de stage.

Je n'oublie pas Stella LACOUR et Julie MENDRET toutes deux, maitres de conférence à l'Université de Montpellier qui m'ont accordé un appui constant pour un bon déroulement de mes travaux.

RESUME

De grandes quantités d'eaux usées sont produites chaque jour et acheminées vers les stations de traitement des eaux usées. La plus-part de ces eaux contient des déchets pharmaceutiques et des molécules organiques qui sont difficilement éliminables par les filières classiques de traitement. En outre, ces composés dégradés donnent lieu à des sous-produits souvent plus toxiques et fortement préjudiciables à l'environnement.

La présente étude a pour objet d'évaluer l'écotoxicité de l'Acide Orange 7, du paracétamol et de la carbamazépine ainsi que de leurs sous-produits de dégradation au cours du traitement par procédé électro-fenton.

La mesure de la toxicité a été réalisée avec la méthode ISO 11348 (Microtox) qui détermine le taux d'inhibition de la souche bactérienne *Vibrio fischeri* face à des solutions présumées toxiques. Il apparaît que les sous-produits immédiats des différents composés sont plus toxiques que le composé initial. Ce résultat s'illustre par un fort taux d'inhibition des bactéries marines *Vibrio fischeri*. En effet, le 1,4-benzoquinone, l'hydroquinone et le 1,2 - naphthoquinone se distinguent comme étant les plus toxiques. En revanche les sous-produits apparaissant à la fin du chemin réactionnel sont des acides carboxyliques qui, à l'exemple des acides fumarique et maléique, ont une toxicité relativement faible. Lorsque les sous-produits sont mixés, l'évaluation de la toxicité ne se comporte pas comme une moyenne des toxicités mais, comme un effet de synergie global influençant le comportement de la solution observée.

Mots Clés :

-
- 1 – Ecotoxicité**
 - 2 – Acide Orange 7**
 - 3 - Paracétamol**
 - 4 – Carbamazépine**
 - 5 – Sous-produits**

ABSTRACT

Substantial quantities of wastewater are produced each day and transported to wastewater treatment plants. Most of these waters contain pharmaceutical waste and organic molecules that are not easily removed by conventional treatment processes. In addition, the by-products of degradation result are often more toxic and highly harmful to the environment. This study lead to evaluate the ecotoxicity of acid orange 7, paracetamol and carbamazepine and their by-products identified during the electrofenton process.

The measure of toxicity was made using the Microtox ISO 11348 method which measures the degree of bacterial inhibition face to toxic solutions. It appears that the direct by-products of the various compounds are more toxic than the original compound. This result is illustrated by a high rate of bacteria *Vibrio fischeri* inhibition. Indeed, 1,4-benzoquinone, hydroquinone, 1,2-naphthoquinone stand out as the most toxic. However byproducts appearing at the end of the reaction path are carboxylic acids which are relatively low toxicity like fumaric and maleic acids. When by-products are mixed, the toxicity is not behaving as an average of toxicities but some by-products in solution influence the toxicity of the mixture.

Key words:

1 – Ecotoxicity

2 – Acid Orange 7

3 - Paracetamol

4 - Carbamazepine

5 – By-products

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AO7 : Acide Orange 7

PCM : Paracetamol

CBZ : Carbamazepine

ACT : Acétanomiphène

COT : Carbone Organique Total

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

EF : Electrofenton

MS : Spectrométrie de masse

µm: Micromètre

mL : Millilitre

mM : Millimole

mA : Milli-ampère

mm : Millimètre

g.mol⁻¹ : Gramme par mole

ng : Nano-gramme

L : Litre

NaCl : Chlorure de sodium

V. fischeri : *Vibrio fischeri*

° C : Degré Celsius

SOMMAIRE

Dédicaces	iv
Remerciements	iv
Liste des abréviations	vii
Sommaire	1
Liste des tableaux	3
Liste des figures	4
I. Introduction	5
II. Synthèse bibliographique	7
II.1 Présentation des composés étudiés	7
II.2 Dégradation du paracétamol, de l'Acide Orange 7 et de la carbamazépine et par électrofenton.....	8
II.3 Bioessais avec <i>Vibrio fischeri</i>	10
III. Objectifs et Hypothèses de travail.....	12
IV. Matériels et Méthodes	13
IV.1. Produits chimiques.....	13
IV.1.1. Préparation des solutions des sous-produits de l'AO7.....	13
IV.1.2. Préparation des solutions de sous-produits du PCM.....	15
IV.1.3. Préparation de la solution de carbamazépine.....	17
IV.2 Tests d'écotoxicité	17
IV.2.1. Présentation du Microtox et de ses consommables.....	17
IV.2.2. Mode de fonctionnement du Microtox et de calcul du taux d'inhibition.....	19
IV.2.3. Mesure de toxicité grâce au screening tests	19
IV.3 Culture bactérienne	21
V. Résultats et Discussions	22
V.1 Estimation de l'erreur intra échantillons	22
V.2 Toxicité des sous-produits de l'acide orange 7	23
V.2.1 Toxicité de sous-produits de l'Acide Orange 7 testés individuellement.....	23

Toxicité de composés aromatiques et de leurs sous-produits de dégradation

V.2.2 Toxicité des sous-produits de l'Acide Orange 7 testés en mélanges	27
V.3 Toxicité des sous-produits du paracétamol	30
V.3.1 Toxicité de sous-produits individuels du paracétamol	30
V.3.2 Toxicité des sous-produits standards du paracétamol en mélange.....	36
V.4 Evolution de la toxicité de la carbamazépine	37
VI. Conclusion.....	40
VII. Annexes.....	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Groupes de sous-produits de l'AO7 et leurs concentrations en fonction du temps d'apparition	15
Tableau 2 : Groupes de sous-produits du PCM et leurs concentrations en fonction du temps d'apparition	17

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Diagramme de Pourbaix : Zones de prédilection en fonction du pH pour la formation d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} en solution	9
Figure 2 : Extrait de chemin réactionnel de l'Acide Orange 7	14
Figure 3 : Extrait de chemin réactionnel du paracétamol	16
Figure 4 : Microtox Analyzer et ses consommables.	18
Figure 5: Estimation du coefficient de variation en fonction du niveau de toxicité des échantillons.....	22
Figure 6: Corrélacion entre COT et Toxicité de AO7 au cours de l'EF.....	23
Figure 7 : Toxicité des sous-produits de l'AO7 apparaissant entre 5 et 30 min	24
Figure 8 : Toxicité des sous-produits de l'AO7 apparaissant entre 30 et 60 min	25
Figure 9 : Toxicité des sous-produits de l'AO7 apparaissant entre 6 et 8h d'EF	26
Figure 10 : Toxicité des mélanges des composés de l'AO7 apparaissant entre 5-30min	28
Figure 11 : Toxicité des mélanges des sous-produits de l'AO7 du groupe 30-60 min	29
Figure 12 : Toxicité des mélanges des sous-produits de l'AO7 du groupe 6-8h	30
Figure 13: Corrélacion entre COT et Toxicité du PCM au cours de l'EF.....	31
Figure 14 : Points singuliers choisis pour les mesures	31
Figure 15 : Toxicité des sous-produits aromatiques du PCM apparaissant à 10 min d'EF	32
Figure 16 : Toxicité des sous-produits aromatiques du PCM apparaissant à 60 min d'électrofenton	33
Figure 17 : Toxicité des sous-produits aromatiques du PCM apparaissant à 80 min d'EF	34
Figure 18 : Sous-produits aromatiques apparaissant à 120 min d'EF	34
Figure 19 : Toxicité des acides carboxyliques du PCM.....	35
Figure 20 : Toxicité des sous-produits aromatiques du PCM en mélanges	36
Figure 21 : Toxicité des acides carboxyliques du PCM en mélange	37
Figure 22 : Evolution de la toxicité de la solution de CBZ à 20 mg/L ayant subi un EF sur 8h	38
Figure 23 : Evolution de la toxicité de la solution de CBZ à 200 mg/L ayant subi un EF sur 8h.....	39

I. INTRODUCTION

De nos jours, les molécules organiques dont les composés pharmaceutiques, sont au cœur des préoccupations environnementales. En effet, la demande de plus en plus croissante des populations entraîne une production importante chaque année de produits pharmaceutiques. En France par exemple, le marché florissant des antidouleurs à base de paracétamol est illustratif : suivant une étude menée en 2012, il s'en vend près de 14 boîtes par seconde ou 422 millions de boîtes par an (ConsoGlobe, 2012).

Cette importante production en amont entraîne fortement des concentrations résiduelles en aval. Ainsi, les antalgiques consommés ou plus généralement les molécules organiques ou pharmaceutiques provenant soit des centres hospitaliers, soit des rejets industriels ou même des ménages, se retrouvent dans les eaux usées et sont acheminées vers les filières classiques des stations d'épuration. Alors que, ce sont des molécules difficilement biodégradables et nécessitant donc un traitement supplémentaire au traitement biologique.

Le constat est donc qu'en l'absence de traitement tertiaire, la plus part de ces éléments se retrouvent dans la nature à de faibles concentrations et dont la bioaccumulation peut être néfastes aux organismes vivants (Stockholm County Council, 2014-2015).

Aussi, les molécules organiques, si elles ne sont pas entièrement dégradées, elles peuvent donner naissance à des produits intermédiaires qui peuvent être relativement plus toxiques que la molécule d'origine. Des dommages relativement graves peuvent être causés par l'effet cocktail des sous-produits de dégradation des polluants de base ; ces dommages relèvent du domaine de l'écotoxicologie.

En effet, l'écotoxicologie est une science relativement récente qui découle de l'écologie et de la toxicologie. Elle est née du constat que les polluants contaminent la biosphère et dans certains cas, ils interagissent entre eux et avec le vivant. Cette discipline scientifique étudie le comportement et les effets d'agents « polluants » sur les écosystèmes, qu'il s'agisse d'agents d'origine artificielle (incluant médicaments, perturbateurs endocriniens, etc.) ou d'agents naturels dont l'homme modifie la répartition et/ou les cycles dans les différents compartiments de la biosphère (Philippe, et al., 2007).

Le traitement biologique élimine partiellement la pollution et les sous-produits sortant de la filière de traitement se trouvent être souvent plus toxiques. Ces sous-produits sont parfois non-dégradables ou ne se dégradant pas assez vite par la lumière, l'oxygène, les bactéries de l'eau, les bactéries du sol ou les bactéries des sédiments; Ces polluants se retrouvent dans le

réseau trophique ou dans l'eau, dans l'air, dans les sols et dans les sédiments. Ils peuvent alors agir seuls ou en synergie entre eux, avec d'autres polluants (dont les résidus de pesticides) comme facteurs de perturbation endocrinienne sur la santé des animaux, des plantes ou d'autres organismes qui les absorbent.

C'est au vu de tous ces composés organiques plus ou moins récents et qui, de plus en plus se retrouvant dans le milieu naturel qu'une étude sur l'écotoxicité de 3 polluants organiques à savoir le paracétamol (PCM), l'Acide Orange 7 (AO7) et la carbamazépine (CBZ) a été envisagée à l'échelle de laboratoire.

L'importance d'une telle étude est d'autant plus certaine qu'elle intègre à la fois la toxicité des polluants et celle de leurs sous-produits de dégradation ; ce qui présente une plus-value par rapport aux études faites par d'autres auteurs qui ont soit seulement travaillé sur les processus de dégradation des polluants organiques ou soit seulement sur la toxicité de ces polluants.

La présente étude va donc consister à évaluer la toxicité individuelle des sous-produits connus de l'AO7 et du PCM et à les mélanger selon différents protocoles pour en déterminer la toxicité. Les travaux vont aussi permettre pour le CBZ de suivre l'évolution de sa toxicité tout au long d'un traitement tertiaire par procédé d'oxydation avancé. Le procédé ici utilisé est l'électrofenton pour une dégradation des molécules de CBZ en composés non toxiques.

L'étude sera subdivisée en trois principales parties selon le polluant étudié. Dans un premier temps il s'agira de mesurer la toxicité des sous-produits de l'Acide Orange 7 préparés à certaines concentrations puis de réaliser des mélanges de sous-produits. Dans un second temps il s'agira de déterminer la toxicité du PCM et de ses sous-produits seuls puis en mélanges préparés à des concentrations définies. En dernier lieu, sera mesurée la toxicité d'une solution de carbamazépine dégradée par électrofenton.

II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 PRÉSENTATION DES COMPOSÉS ÉTUDIÉS

Trois principales molécules ont fait l'objet de l'étude à savoir le colorant Acide Orange 7 (AO7), la molécule de paracétamol (PCM) et celle de la carbamazépine (CBZ). Ces trois composés aromatiques sont des molécules présentes de manière notoire dans les eaux usées d'origines urbaines et industrielles.

L'Acide Orange 7 est un composé qui, s'il est ingéré, peut à forte dose (Rat (Orale) : > 10 500 mg/kg), causer des dommages à l'organisme tels que : irritation des yeux, atteinte des voies sanguines, dommages hépatiques et production d'effet cathartique. Ce composé est aussi connu sous le nom de Acide Orange 2 ou sel monosodique. D'autres nomenclatures rencontrées dans la littérature le désignent également comme étant le benzenesulfonique acide, et le sel monosodique de l'acide ((hydroxy-2 naphthalenyl)-1 azo)-4 benzenesulfonique (CSST, 2014).

Aujourd'hui l'Acide Orange 7 est destiné à être utilisé dans les formulations de teinture capillaire comme un colorant direct à une concentration maximale de 0,5 %. Il est également autorisé à être utilisé comme colorant cosmétique, classé CI 15510 à l'annexe IV de la directive sur les cosmétiques de l'UE (Scientific Committee on Consumer Safety, 2014). A priori non dangereux à faibles concentrations pour la santé humaine, l'Acide Orange 7 se révèle cependant être une molécule très difficilement biodégradable et de nature à polluer les ressources en eau (Salhi, et al., 2014).

Le deuxième composé qui a fait l'objet d'étude est la molécule de paracétamol encore appelé acétaminophène de formule brute $C_8H_9NO_2$. Cette molécule se retrouve fréquemment dans les rejets urbains mais aussi dans les rejets industriels notamment au niveau de l'industrie pharmaceutique. Des effluents de station d'épuration ont montré des concentrations résiduelles de paracétamol à hauteur de 108,1 - 11308 ng/L (Académie Nationale de Pharmacie, 2008). La molécule de paracétamol est considérée comme une molécule de base dans la fabrication de nombreux autres médicaments dérivés faisant partis de la classe des antalgiques antipyrétiques non salicylés et courant d'utilisation. Cela explique sa présence dans de nombreux effluents domestiques.

Lorsque les usines de traitement des eaux usées utilisent le procédé de javellisation, le paracétamol pourrait se transformer en produit toxique (Avignon, 2005). Ainsi sous l'action de l'hypochlorite, il se substitue en 1,4-benzoquinone et N-acétyl-p-benzoquinone (Bedner, et

al., 2006). La première molécule est suspectée d'être génotoxique et mutagène, tandis que la seconde est toxique pour le foie.

La troisième molécule soumise à étude est la Carbamazépine. C'est un composé généralement utilisé pour le traitement des troubles de la saisie et de la douleur neuropathique et est également utilisé dans le traitement de trouble bipolaire et en combinaison avec un antipsychotique dans certains cas de schizophrénie. D'autres utilisations peuvent inclure le trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité et le trouble de stress post-traumatique (Alrashood, 2016).

La carbamazépine a des propriétés physiques particulières à savoir des caractéristiques de solubilité faible dans l'eau (Yousef, et al., 2007). Elle est également difficilement biodégradable avec des taux de biodégradation de moins de 10 à 30% en sortie de station d'épuration (Académie Nationale de Pharmacie, 2008).

Les trois molécules décrites ci-dessus à savoir les molécules d'Acide Orange 7, de paracétamol et de carbamazépine ont fait l'objet d'intérêt de nombreuses recherches. En effet, le paracétamol et la carbamazépine sont courants dans les eaux usées urbaines et pharmaceutiques tandis que l'Acide Orange 7 est spécifiquement présent dans les rejets d'eau des industries textiles. De plus, elles sont difficilement biodégradables et se retrouvent dans les effluents des stations d'épuration et donc aussi bien dans les ressources en eau terrestres que dans le sol et dans l'air.

II.2 DEGRADATION DU PARACETAMOL, DE L'ACIDE ORANGE 7 ET DE LA CARBAMAZEPINE ET PAR ELECTROFENTON

Des procédés d'oxydation avancée sont généralement utilisés afin de dégrader les composés résistants au traitement biologique : ozonation, électrofenton, photo-oxydation, peroxyde d'hydrogène... Dispositifs souvent coûteux, ces procédés s'avèrent pour la plus part efficaces à l'élimination des molécules résistantes. L'électrofenton est le procédé auquel nous nous sommes intéressés.

Durant le processus d'électrofenton, des réactions de décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par des sels métalliques (en particulier des métaux de transition) sont initiées en vue de générer des espèces radicalaires (OH^\bullet , HO_2^\bullet) très réactives vis-à-vis des polluants organiques.

La réaction principale du procédé d'oxydation Fenton conduit à la formation de radicaux hydroxyles par la réduction catalysée de H_2O_2 par Fe^{2+} dans un milieu acide :



Pour éviter les inconvénients rencontrés pendant le processus Fenton notamment le transport du H_2O_2 et le risque potentiel de la perte de l'activité, sont combinés l'addition d'ions ferreux avec la génération de peroxyde d'hydrogène provenant de l'électrode in situ. La production de H_2O_2 en solution aqueuse est obtenue par électro-réduction de l'oxygène dissous sous un potentiel cathodique appliqué approprié (Xia, et al., 2015) . Des électrodes cathodiques tels que le carbone vitreux (Valdez, et al., Nov 2012), le feutre de carbone (Huong, et al., 2015), une éponge de carbone (A. Özcan, et al., 2008), et l'électrode de diffusion de gaz (Yu, et al., 2015) sont couramment utilisés à cet effet comme l'indique l'équation 2 :



Les radicaux hydroxyles formés peuvent attaquer et lancer l'oxydation des polluants (RH) d'où l'équation suivante :



L'électrolyte est ajusté à un pH acide avant le début de l'électrofenton, le choix du potentiel hydrogène se justifie par le diagramme de Pourbaix (fig. 1) pour une optimisation de la réaction car au-delà de pH 3 le fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}) est susceptible de précipiter et de former des hydroxydes de fer.

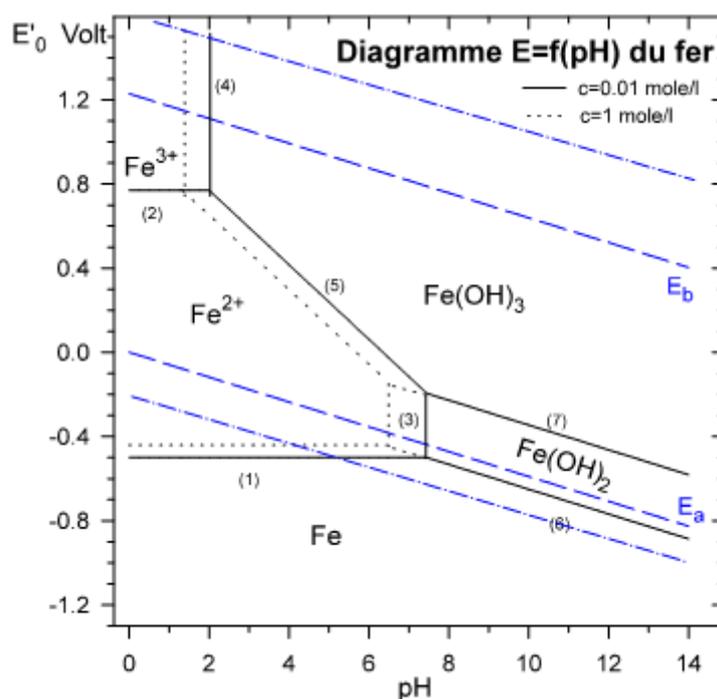


Figure 1 : Diagramme de Pourbaix : Zones de prédilection en fonction du pH pour la formation d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} en solution

II.3 BIOESSAIS AVEC *VIBRIO FISCHERI*

Plusieurs auteurs tels Boillota, et al. (2008) ont travaillé sur les bioessais avec des organismes cibles comme la bactérie marine *Vibrio fischeri* (inhibition de la luminescence en 15 et 30 min), le microcrustacé *Daphnia magna* (inhibition de la mobilité en 24 h et 48 h), l'algue *Pseudokichneriella subcapitata* (inhibition de la croissance de la population en 72 h), le microcrustacé *Ceriodaphnia dubia* (inhibition de la mobilité en 24 h et 48 h, inhibition de la croissance de la population en 7 jours et inhibition de la reproduction en 7 jours), le rotifère *Brachionus calyciflorus* (inhibition de la reproduction en 48 h) et la lentille d'eau *Lemna minor* (inhibition de la croissance en 7 jours).

V. fischeri est une bactérie marine, flagellée, bioluminescente, hétérotrophe, Gram-négative. Selon Dunn (2012), c'est une bactérie modèle pour l'étude de la bioluminescence microbienne. Certaines colonies sont libres et se nourrissent en décomposant de la matière organique mais la bactérie *Vibrio fischeri* vit souvent en symbiose dans l'organisme de poissons marins comme le poisson lanterne ou le calamar (Prévot, 2014).

Le test avec *Vibrio fischeri* est basé sur la réduction de la bioluminescence bactérienne en présence de composés d'essai (Pinto, et al., 2012).

En effet, l'intensité lumineuse des bactéries luminescentes de souche *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 diminue après un certain temps d'exposition à une substance toxique. Cette bactérie émet de la luminescence au cours de sa croissance et cette bioluminescence est proportionnelle à sa respiration cellulaire. L'activité de la cellule bactérienne est réduite en présence d'éléments toxiques qui provoquent la mort ou l'inhibition d'une partie des micro-organismes. Comme l'activité de la cellule pourrait être réduite par la présence d'éléments toxiques, la bioluminescence est donc un très bon indicateur de l'état de la bactérie et donc de la toxicité globale de l'échantillon.

Afin de procéder aux différentes mesures de toxicité des solutions, un tube de bactérie est apprêté en imitant les conditions de vie du milieu marin (Romero, et al., 2008). Avant de procéder à la mise en contact avec le polluants, elles doivent émettre suffisamment de lumière ce qui correspond à une phase de croissance maximale stationnaire : le taux de croissance devient nul et les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent. Après 15 min, on mesure la luminescence des bactéries seules sans polluant puis des lectures sont faites sur la luminescence des bactéries après 5 min et 15 min de temps de contact.

Le Microtox Analyzer est un instrument très répandu pour l'évaluation de la toxicité. Le principe de fonctionnement du Microtox est basé sur un enregistrement de la luminescence de

Vibrio fischeri. Cette luminescence dépend des conditions du métabolisme et de la toxicité de l'environnement. Microtox est appliqué comme un outil de dépistage pour un large éventail de problèmes écotoxicologiques. Plus de 50% de toutes les demandes de l'essai de toxicité Microtox sont liés à l'évaluation des déchets industriels, domestiques ou des études de lixiviation. C'est l'exemple de l'évaluation des risques, en relation avec un déversement de pétrole simulé (Zadorozhnaya, et al., 2015).

Costaa, et al., (2015) a également travaillé sur des bactéries de l'espèce *Vibrio fischeri* en mettant en contact les bactéries et un inhibiteur, la luminescence des bactéries était mesurée par la suite et les résultats ont été comparés avec ceux fournis par un kit de dosage conventionnel (Biotox®).

III. OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE TRAVAIL

❑ Objectifs

L'objectif général de notre travail consiste à adapter les protocoles de mesure de toxicité du Microtox à chaque type d'échantillon selon sa matrice, sa nature et sa concentration.

Il s'agit de manière spécifique de :

- Contribuer à la validation de la méthode analytique de toxicité (chimométrie : répétabilité, reproductibilité)
- Mesurer la toxicité de sous-produits de l'AO7 et du PCM seuls en solutions puis en combinaison (l'effet cocktail de polluants)
- Mesurer l'évolution de la toxicité de la carbamazépine durant sa réaction de dégradation.

❑ Hypothèses

Les composés aromatiques tels l'Hydroquinone; la 1,4Benzoquinone sont très toxiques pour la souche bactérienne *Vibrio fischeri*.

Les acides carboxyliques comme les acides oxalique et oxamique sont faiblement toxiques.

IV. MATERIELS ET METHODES

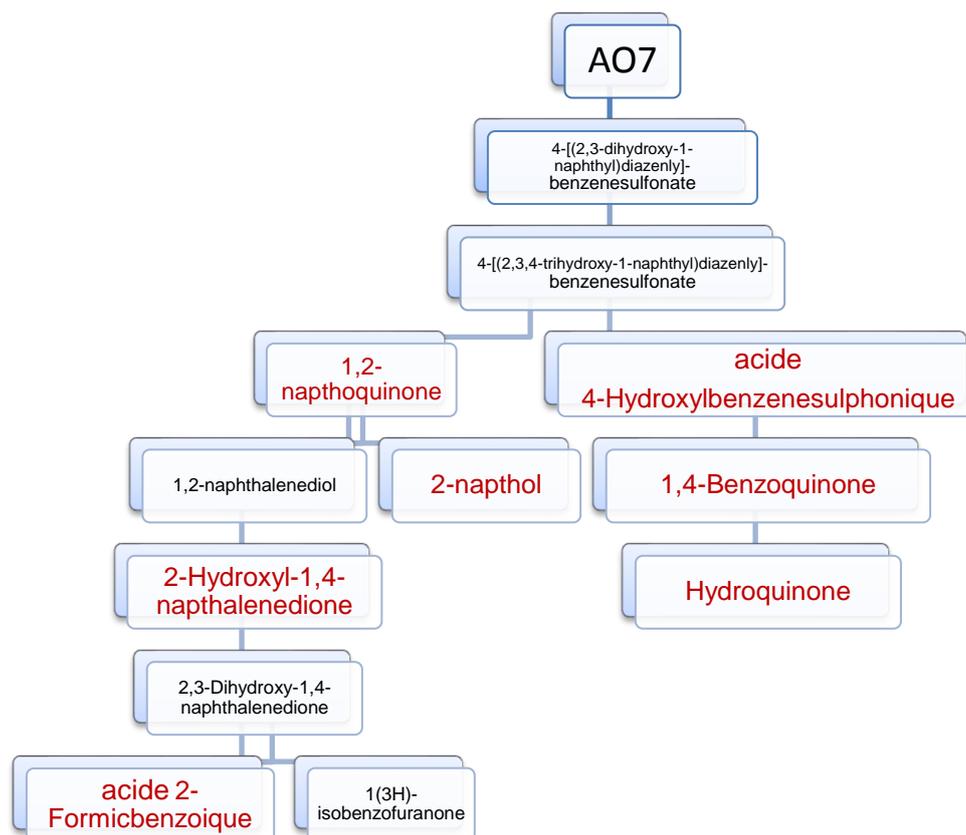
IV.1. PRODUITS CHIMIQUES

Les produits chimiques utilisés sont :

- La Carbamazépine (99% Sigma Aldrich).
- L'Acide Orange 7 (Orange II sodium salt) et ses sous-produits standards : Hydroquinone (99%) (H9003 Sigma-Aldrich Réactif Plus); 1,4-benzoquinone(99%); L'acide 2-Formicbenzoïque (99%); 1,2-naphtoquinone (97%); 2-hydroxyl-1,4-napthalenedione (97%); L'acide 4-Hydroxylbenzenesulphonique (99%); 2-naphtol (99%); L'acide oxalique; L'acide maléique; l'acide oxamique; L'acide fumarique (tous de Sigma-Aldrich).
- L'Acétaminophène (paracétamol) ainsi que ses sous-produits : Le Benzoquinone (99%); le benzaldéhyde; l'acide benzoïque (99%); l'acide oxalique; L'acide maléique; l'acide oxamique; l'acide formique; L'acide fumarique; l'acide acétique (tous de Sigma-Aldrich).

IV.1.1. Préparation des solutions des sous-produits de l'AO7

Les sous-produits de l'AO7 apparaissant dans le chemin de dégradation ont été détectés HPLC-MS (Cf. annexe 1). La figure 2 présente les sous-produits de l'AO7 et ceux marqués en couleur rouge sont les sous-produits auxquels nous nous sommes intéressés :



❑ Figure 2 : Extrait de chemin réactionnel de l'Acide Orange 7

Des solutions de 0,5L sont préparées à partir des sous-produits dilués dans de l'eau milliQ. La masse m à peser pour chaque standard se calcule par :

$$m = M * Cm * v$$

Où : M est la masse molaire du composé ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Cm la concentration molaire du composé identifiée au cours de l'électrofenton (M/L)

v le volume dans lequel sera préparé la solution (L).

Chaque sous-produit se formant au moment de la dégradation de l'AO7 comporte un plateau de temps d'apparition où la concentration est la plus élevée. Ces sous-produits sont donc préparés à leurs concentrations maximales.

Lors de la préparation des solutions de sous-produits de l'AO7 et du PCM, il est impératif d'ajuster le pH à intervalles de valeurs entre 6,5 et 7,5 avant de procéder à la mesure de la toxicité sur les souches de *Vibrio fischeri*. Afin de réaliser ces ajustements de pH, des solutions d'hydroxyde de sodium (NaOH) et d'acide sulfurique (H_2SO_4) ont été préparées à une concentration de normalité 4 N puis diluées pour obtenir les solutions filles de normalités suivantes : 2N, 1N, 0,5N ; 0,1N ; 0,05N ; 0,02N ; 0,01N ; 0,005N et 0,001N.

Chacune de ces solutions de sous-produits a subi des tests de toxicité sur *V. fischeri* puis elles

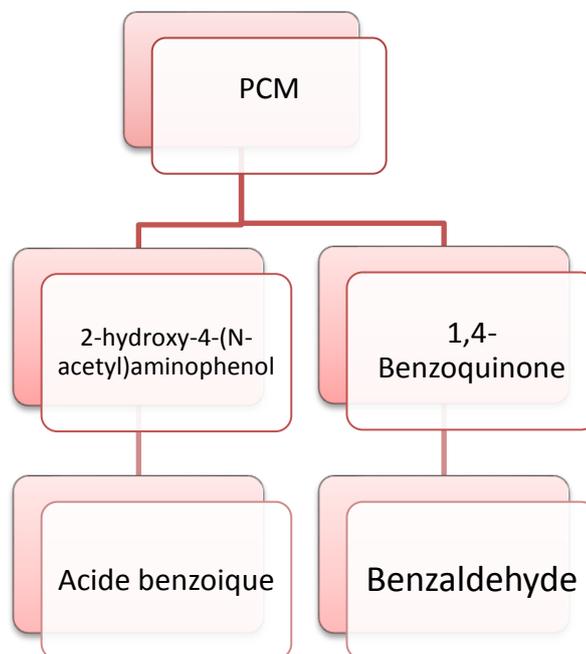
ont été combinées selon le temps d'apparition des sous-produits au cours de l'EF. Le tableau 1 résume les différentes concentrations maximales des sous-produits puis les regroupe selon que leurs pics de concentration apparaissent entre 5 et 30 min ; entre 30 et 60 min ou entre 6 et 8 heures.

Tableau 1 : Groupes de sous-produits de l'AO7 et leurs concentrations en fonction du temps d'apparition

Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
5-30min	30-60 min	6h-8h
1,4-Benzoquinone 0,0038 mM/L	Hydroquinone 0,9 mM/L	Acide oxalique 1,114 mM/L
2-Formicbenzoic acide 0,94 mM/L	Acide fumarique 0,254 mM/L	Acide maléique 0,173 mM/L
1,2-napthoquinone 0,33 mM/L		Acide oxamique 0,091 mM/L
2-Hydroxyl-1,4-napthoquinone 0,166 mM/L		
4-Hydroxylbenzenesulphonic acide 0,0076 mM/L		
Acide fumarique 0,254 mM/L		

IV.1.2. Préparation des solutions de sous-produits du PCM

Les sous-produits du PCM ont été identifiés par HPLC-MS (Cf. annexe 1) lors de la dégradation du paracétamol par électrofonton puis ont fait l'objet de tests de toxicité. La figure 3 présente les sous-produits du PCM qui ont été utilisés pour préparer les solutions qui ont ensuite subi des tests de toxicité.



□ Figure 3 : Extrait de chemin réactionnel du paracétamol

Des solutions de 0,5L sont préparées en diluant la masse à peser correspondant à chaque sous-produit. Cette masse m à peser se détermine suivant le calcul :

$$m = M * C_m * v$$

Où M est la masse molaire du composé (g.mol^{-1})

C_m la concentration molaire du composé identifiée au cours de l'électroxydation (M/L)

v le volume dans lequel sera préparé la solution (L).

Des temps singuliers ont été identifiés au cours de la dégradation du PCM par EF, ces singularités s'observent à 10 min, 60 min, 80 min et 120 min. Afin d'étudier la toxicité des composés à ces temps donnés, les sous-produits ont été préparés aux concentrations auxquelles ils apparaissent respectivement en solution à 10 min, 60 min, 80 min et 120 min durant l'électroxydation. Le pH est ajusté entre 6,5 et 7,5 avant de procéder à la mesure de la toxicité sur les souches de *Vibrio fischeri*. Par la suite ces sous-produits sont mixés ensemble par groupe de temps d'apparition comme l'indique le tableau 2.

Tableau 2 : Groupes de sous-produits du PCM et leurs concentrations en fonction du temps d'apparition

Groupe A	Groupe B	Groupe C	Groupe D
10 min	60 min	80 min	120 min
PCM 0,5 mM/L	PCM 0,2 mM/L	PCM 0,1 mM/L	Benzaldehyde 0,03 mM/L
Benzoquinone 0,244 mM/L	benzoquinone 0,035 mM/L	benzoquinone 0,005 mM/L	Acide benzoïque 0,01 mM/L
benzaldehyde 0,93 mM/L	benzaldehyde 0,25 mM/L	benzaldehyde 0,16 mM/L	
acide benzoïque 0,09 mM/L	acide benzoïque 0,05 mM/L	acide benzoïque 0,03 mM/L	

IV.1.3. Préparation de la solution de carbamazépine

La carbamazépine (99% Sigma Aldrich) a été préparée dans 500 mL d'eau milliQ à une concentration de 20 mg/L, puis un deuxième test a été réalisé sur une solution de carbamazépine ayant une concentration initiale de 200 mg/L ; un électrolyte support et un catalyseur qui sont respectivement Na_2SO_4 (50 mM) et $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mM) ont été ajoutés et le mélange est ajusté à un pH de 3 avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4). Un électrofenton a été réalisé sur les solutions avec une intensité de courant de 500 mA puis un échantillonnage s'est fait pour connaître la toxicité au cours de la dégradation.

Afin de mesurer l'efficacité de la méthode fenton, l'abatement en Carbone organique Total de la solution initiale est mesuré.

IV.2 TESTS D'ECOTOXICITE

IV.2.1. Présentation du Microtox et de ses consommables

Les tests de toxicité sont réalisés sur un appareil : le Microtox qui permet une lecture de l'intensité de l'émission lumineuse par les bactéries. Les mesures de luminosité sont effectuées sur des bactéries dégelées et remise en état grâce à une solution de reconstitution (7% de NaCl), une solution d'ajustement osmotique (22% de NaCl) et un diluant (2% de NaCl). Ces solutions sont riches en sel afin de reproduire au maximum les conditions de vie de ces bactéries marines.

Le Microtox est formé d'une unité compacte avec 30 puits incubateurs à 15°C, un puits

destiné au réactif à 5°C et un puits de mesure à 15°C. Un écran d'affichage permet de lire les différentes mesures ; un bouton de calibration SET et un bouton de mesure READ permettent d'introduire la cuve contenant les bactéries dans le puits de mesure.

A l'arrière de l'appareil se trouve un bouton sélecteur de mode qui permet de se placer en mode Mutatox Genotoxicity test, en mode Microtox acute toxicity test ou alors en mode Microtox chronic toxicity test and ATP test. Nous avons utilisé le mode Microtox acute toxicity test pour nos différentes mesures.



Figure 4 : Microtox Analyzer et ses consommables.

Les éléments auxiliaires de l'unité compacte du Microtox sont les cuves en verre qui contiennent les échantillons à tester. La bactérie *Vibrio fischeri* (*Vibrio fischeri* NRRL B-11177) et les différentes solutions (ajustement osmotique, diluant, reconstitution). Aussi sont indispensables des micropipettes de volume 100 µL et 1000 µL réglables; des seringues-filtres PTFE de 13 mm de diamètre et 0,2 µm de taille de pores. Des seringues de 2 mL fournies par VWR International ont été utilisées pour la collecte de l'échantillon et le filtrage avant les essais.

L'équipement nécessaire à la réalisation des mesures était composé d'un pH-mètre, d'un agitateur magnétique, d'un congélateur pour la conservation des bactéries lyophilisées à -20 ° C, de la solution pour les bactéries lyophilisées à -18 ° C et d'un réfrigérateur pour le stockage d'échantillons à 4 ° C.

Des mesures ont été réalisées pour des temps de contact avec les polluants de 5 à 15 min. La valeur de la toxicité a été exprimée en pourcentage d'inhibition de la luminescence par rapport à un blanc (solution saline sans polluant).

Le test de toxicité des bactéries avec le Microtox est basé sur les principes généraux décrits par la norme ISO 11348-2.

IV.2.2. Mode de fonctionnement du Microtox et de calcul du taux d'inhibition

La toxicité des sous-produits du paracétamol, de l'AO7 et celle de la carbamazépine ont été déterminées en mesurant l'effet polluant sur la luminescence de bactéries marines de la souche *Vibrio fischeri* NRRL B- 11177.

La perturbation des bactéries *Vibrio fischeri* par la présence de composés comme l'AO7 ou le paracétamol a pour conséquence directe la baisse d'émission de luminosité par ces bactéries.

Ainsi, la formule de calcul du taux d'inhibition est la suivante :

$$i(t)(\%) = \left(1 - \frac{\text{Lech}(t)}{\text{Lech}(0)} \right) \times 100$$

Avec $i(t)$ étant le taux d'inhibition au cours du temps

Lech (t) luminescence émise par les bactéries au temps t après contact avec l'échantillon

Lech (0) luminescence émise par les bactéries au temps 0 après contact avec l'échantillon

Cet affaiblissement d'émission de luminosité par les bactéries peut aussi s'expliquer par l'inhibition du métabolisme bactériens des *Vibrio* ou par la diminution du nombre de bactéries dans le milieu. D'où la formule :

$$R(t) = \frac{\text{Lblanc}(t)}{\text{Lblanc}(0)}$$

Avec $R(t)$ étant le taux d'inhibition naturel dû au métabolisme au cours du temps

Lblanc (t) luminescence émise par les bactéries au temps t après contact avec le blanc

Lblanc (0) luminescence émise par les bactéries au temps 0 après contact avec le blanc

Le taux d'inhibition intrinsèque des bactéries après contact avec le polluant $I(t)$ est déterminé par la formule :

$$I(t) (\%) = \left(1 - \frac{\text{Lech}(t)}{R(t) \times \text{Lech}(0)} \right) \times 100$$

IV.2.3. Mesure de toxicité grâce au screening tests

Différents tests sont proposés par le Microtox en fonction de la toxicité de l'échantillon à tester. En effet, avant de définir un test approprié à la toxicité d'un polluant donné, celui-ci devra subir les différents tests de screening adaptés au niveau de toxicité.

- Le 2% screening test est le test de mesure de toxicité pour les échantillons de très forte toxicité.

- Le 45% screening test est adapté aux échantillons de toxicité moyenne
- et le 81,9% screening test pour les échantillons de faible toxicité.

Seuls le 45% et le 81,9% screening tests se sont montrés adaptés au degré de toxicité des échantillons étudiés.

□ Le 45% screening test (Cf. annexe 3)

La toxicité des échantillons de sous-produits de l'Acide Orange 7 et de paracétamol a été mesurée par le 45% screening test. Le 45% désigne la concentration finale de l'échantillon qui sera introduit dans le puits de lecture du Microtox :

Après ajout des 100 µL de la solution d'ajustement osmotique, la concentration C' est déterminée par la formule :

$$C' = \frac{1000\mu L}{(1000 + 100)\mu L} = 0,909090$$

Dans la solution concentrée à 90,909%, ont été prélevés 500 µL pour ajouter à 500 µL de la solution bactérienne et du diluant, ce qui conduit à une nouvelle concentration C'' donnée par la formule :

$$C'' = \frac{500\mu L}{(500 + 500)\mu L} = 0,5$$

Le produit de C' et C'' nous donne la concentration C :

$$C = C' * C'' = 0,90909 * 0,5 * 100 = 45,4545\%$$

□ Le 81,9% screening test (Cf. annexe 4)

Les échantillons de CBZ ont quant à eux subi un 81,9% screening test :

Après ajout de 100 µL de solution d'ajustement osmotique, la concentration C' est donnée par la même formule que précédemment énoncée :

$$C' = \frac{1000\mu L}{(1000 + 100)\mu L} = 0,909090$$

Dans la solution concentrée à 90,909%, sont prélevés 900 µL pour ajouter à 100 µL de solution bactérienne, ce qui conduit à une nouvelle concentration C'' donnée par la formule :

$$C'' = \frac{900\mu L}{(900 + 100)\mu L} = 0,9$$

Le produit de C' et C'' nous donne la concentration C :

$$C = C' * C'' = 0,90909 * 0,9 * 100 = 81,8\%$$

IV.3 CULTURE BACTERIENNE

La culture faite a permis d'assurer la disponibilité suffisante des bactéries par le renouvellement des stocks servant à effectuer les tests de toxicité. Cette opération se fait dans un milieu sain (non contaminé) donc, il est impératif de disposer d'un matériel stérile. Les matières suivantes ont été utilisées: l'eau, une source d'énergie, une source de carbone, une source azote et des éléments minéraux.

En présence de ses différents éléments cités, de nombreuses bactéries sont capables de croître et elles sont qualifiées de phototrophes (Comission Environnement et Biologie Subaquatiques, 2015).

Vibrio fischeri est une bactérie exigeante en matière de culture (stérilité du milieu de culture), contrairement à la plus part des bactéries courantes tel *Escherichia coli* (Carolina Biological Supply Company, 2013).

Dans le processus de la multiplication cellulaire dans les conditions idéales, pour la préparation d'un litre de milieu de culture il été nécessaire de disposer de : 10g de bouillon nutritif (oxoid), 23 g de NaCl, un tampon de phosphate (15,5 g de Na₂HPO₄, 2 g de NaH₂PO₄) qui sert à maintenir le pH dans la plage de neutralité.

Par la suite un tube bactéries lyophilisées est réactivé et soumis sous agitation pendant 2h à l'incubateur aéré. Puis ces bactéries ont étéensemencées dans le milieu de culture liquide. L'ensemencement s'est fait à un taux de 5%, soit 1,5 mL de solution de bactéries réactivées dans 28,5 mL de milieu de culture, ce qui donne un volume final de 30 mL de culture bactérienne. La culture a été réalisée à température comprise entre 25 et 30°C pendant 24 h. La croissance des bactéries est suivie par la mesure de la densité optique au spectrophotomètre jusqu'à ce qu'elles atteignent la phase stationnaire. On centrifuge alors la solution afin d'en extraire les bactéries cultivées. (Cf. annexe 2)

V. RESULTATS ET DISCUSSIONS

V.1 ESTIMATION DE L'ERREUR INTRA ECHANTILLONS

Afin de quantifier l'erreur de la mesure de la toxicité, un coefficient de variation a été calculé. Pour cela, cinq échantillons de faible toxicité, cinq de toxicité moyenne et cinq de forte toxicité ont été préparés. Ensuite des lectures de toxicités ont été faites sur ces 15 échantillons et la mesure a été répétée 3 fois de suite. Sur les résultats de toxicités obtenus, ont été calculés la moyenne et l'écart type puis le rapport écart type moyenne a donné le coefficient de variation, des travaux similaires ont été menés par Farré, et al., (2006). La figure suivante présente l'échelle de toxicité selon le taux d'inhibition des bactéries et le coefficient de variation (CV) des mesures en fonction du niveau de toxicité.

$$CV (\%) = \frac{\text{ecart type}}{\text{moyenne}} * 100$$

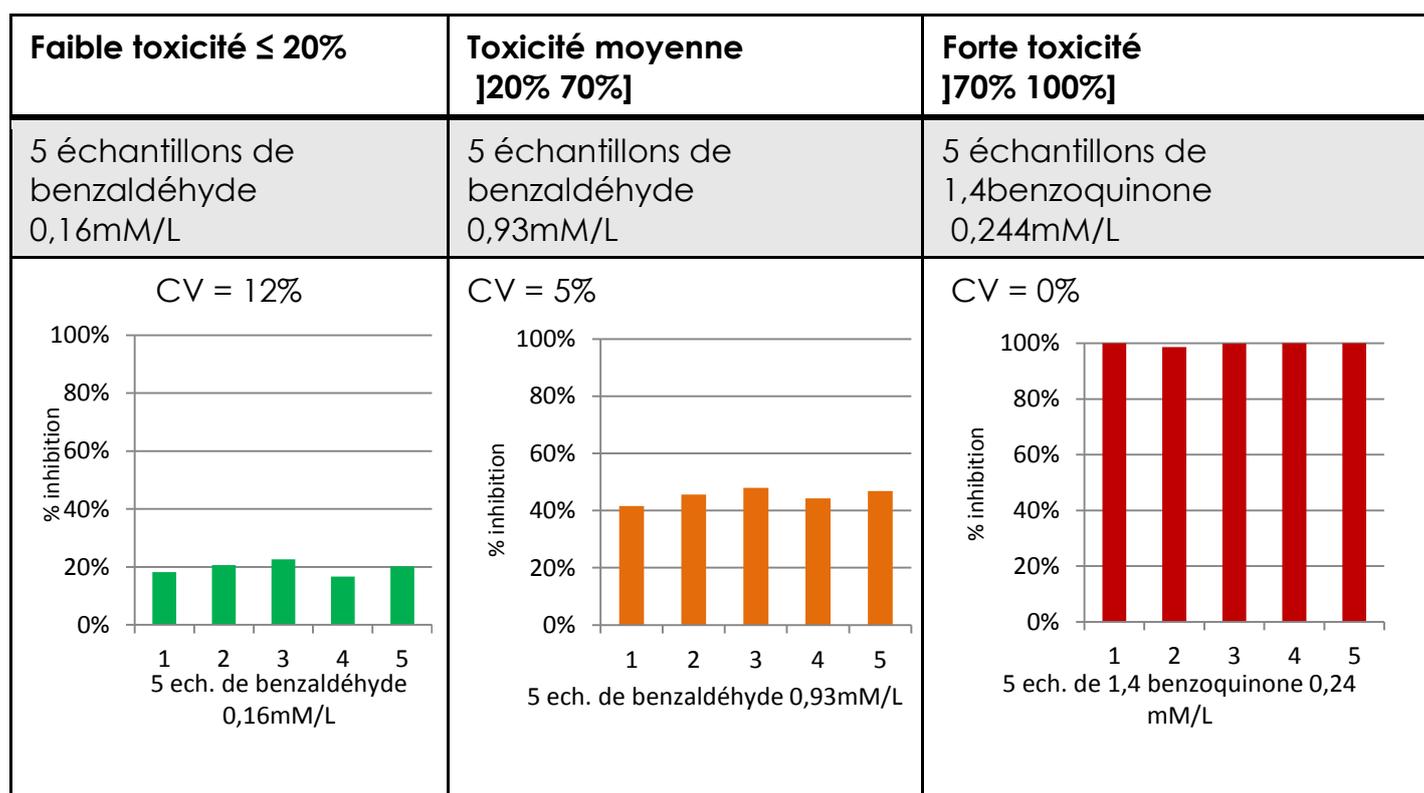


Figure 5: Estimation du coefficient de variation en fonction du niveau de toxicité des échantillons

Le constat est que pour des échantillons toxiques le coefficient de variation est nul car la toxicité inhibe entièrement les bactéries et il est de fait impossible d'observer une variation de valeurs d'inhibition. Cependant pour des échantillons moyennement ou faiblement toxiques le

A= 1-4benzoquinone

B= 2-carboxybenzaldehyde

C = 1-2,naphthoquinone

D = 2-hydroxy-1,4naphthoquinone

E = 4-hydroxybenzenesulphonique acide

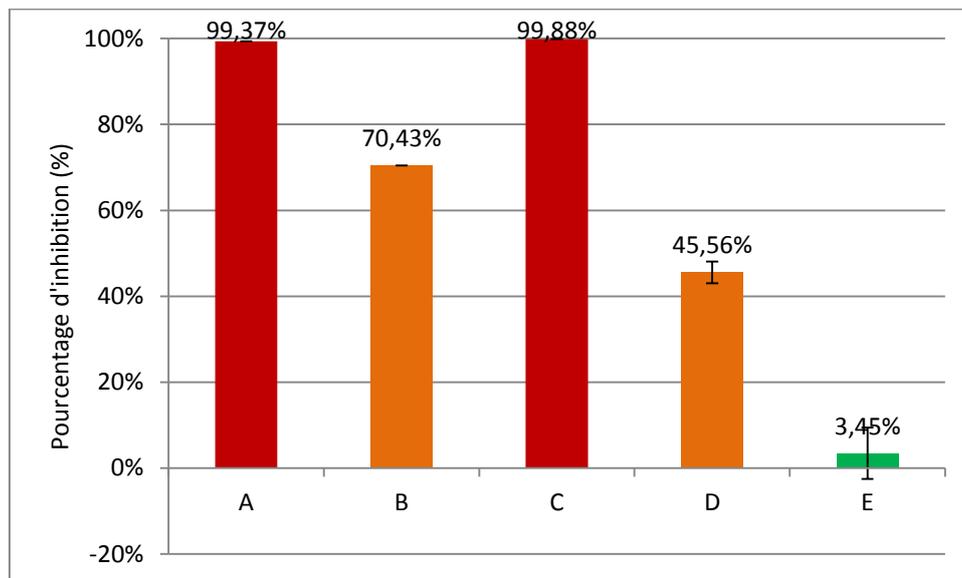


Figure 7 : Toxicité des sous-produits de l'AO7 apparaissant entre 5 et 30 min

Les composés A et C qui sont respectivement la benzoquinone et la naphthoquinone ont une toxicité très forte. Cela s'observe par une inhibition notoire de la luminescence des bactéries *Vibrio fischeri* à plus de 99%.

Ces résultats sont confirmés par les travaux de Das, et al., (2010).

☐ Toxicité des sous-produits de l'AO7 présents dans l'intervalle de temps de 30 à 60 min de dégradation

Les sous-produits présents entre 30 et 60 min et dont la toxicité a été mesurée sont :

G = hydroquinone

H = 2-naphthol

F = Acide Fumarique

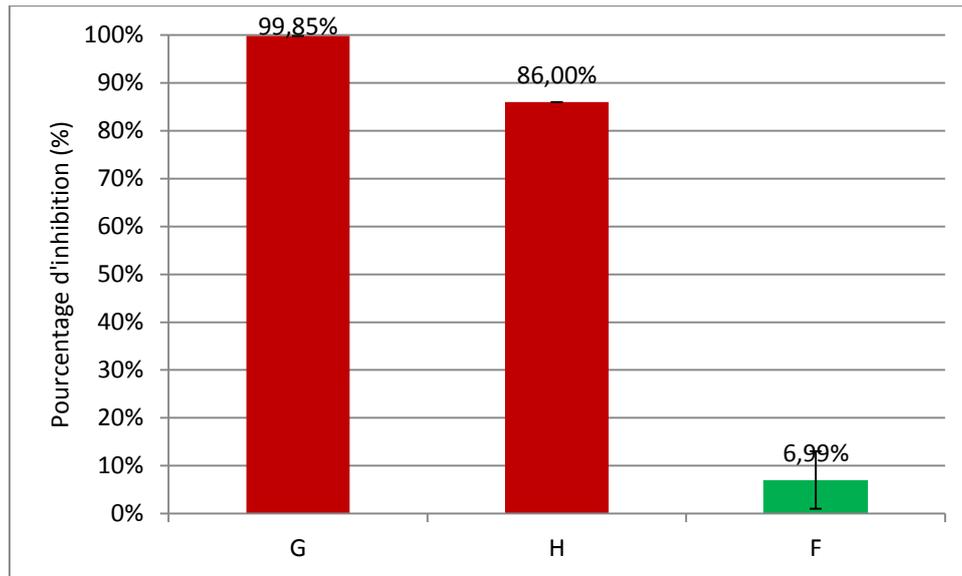


Figure 8 : Toxicité des sous-produits de l'AO7 apparaissant entre 30 et 60 min

On constate une toxicité très élevée du composé G qui est l'hydroquinone à 99,85% d'effet inhibiteur sur les bactéries (fig. 8) ce qui confirme les travaux de (Enguita, et al., 2013). Le 2-naphtol a également un effet très toxique relativement moins que l'hydroquinone mais sa toxicité se situe autour de 90%. L'acide fumarique se démarque des deux autres composés car sa toxicité est faible, soit moins de 10% d'inhibition des bactéries.

□ Toxicité des sous-produits de l'AO7 présents dans l'intervalle de 6 à 8h de dégradation

Pareillement que les tests précédents les sous-produits présents entre 6 et 8 h ont été testés afin d'observer le comportement de la toxicité sur les bactéries. Ces composés sont :

- L'acide oxalique (oxalic acid)
- L'acide maléique (maleic acid)
- L'acide oxamique (oxamic acid)

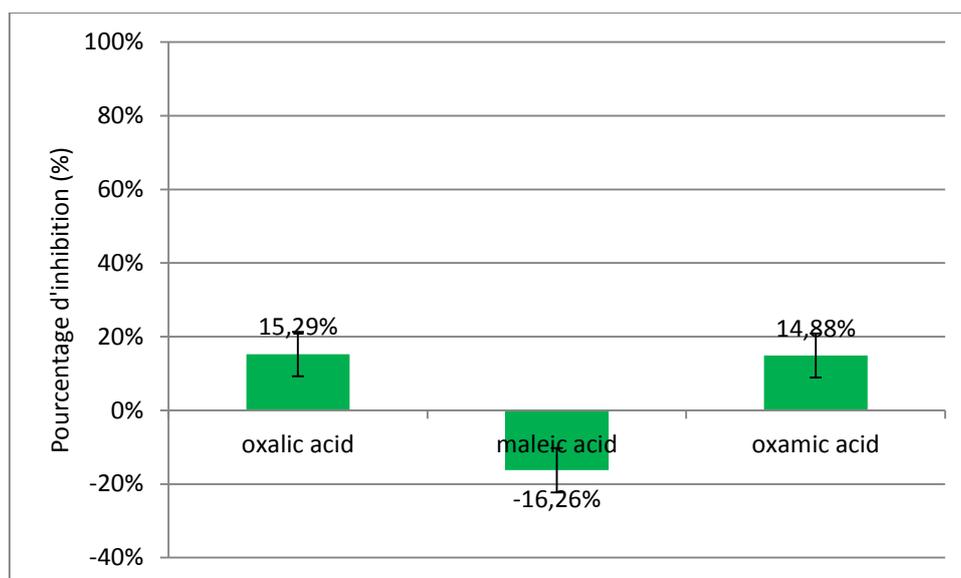


Figure 9 : Toxicité des sous-produits de l'AO7 apparaissant entre 6 et 8h d'EF

Les composés carboxyliques sont ceux apparaissant entre 6 h et 8 heures d'électrofenton. Ces acides ont une faible toxicité qui n'excède pas la valeur maximale de 16% d'inhibition (fig. 9).

L'acide maléique apparaît être le plus inoffensif avec une valeur de toxicité très faible voire négative. Cela signifie que la solution d'acide maléique n'est aucunement dangereuse pour les bactéries. Les acides oxamique et oxalique ont également un taux d'inhibition relativement faible. Ces résultats s'alignent avec les recherches de Fitzhugh, et al., (2006) qui ont également travaillé sur la toxicité des acides oxalique et oxamique.

Lors de la mesure de toxicité des sous-produits de l'Acide Orange 7, il ressort d'un constat général que la toxicité augmente au début de la réaction d'électrofenton et décroît suivant qu'ils apparaissent aux intervalles de [5 30 min], [30 60 min], [6 8h] (Wu, et al., 2012).

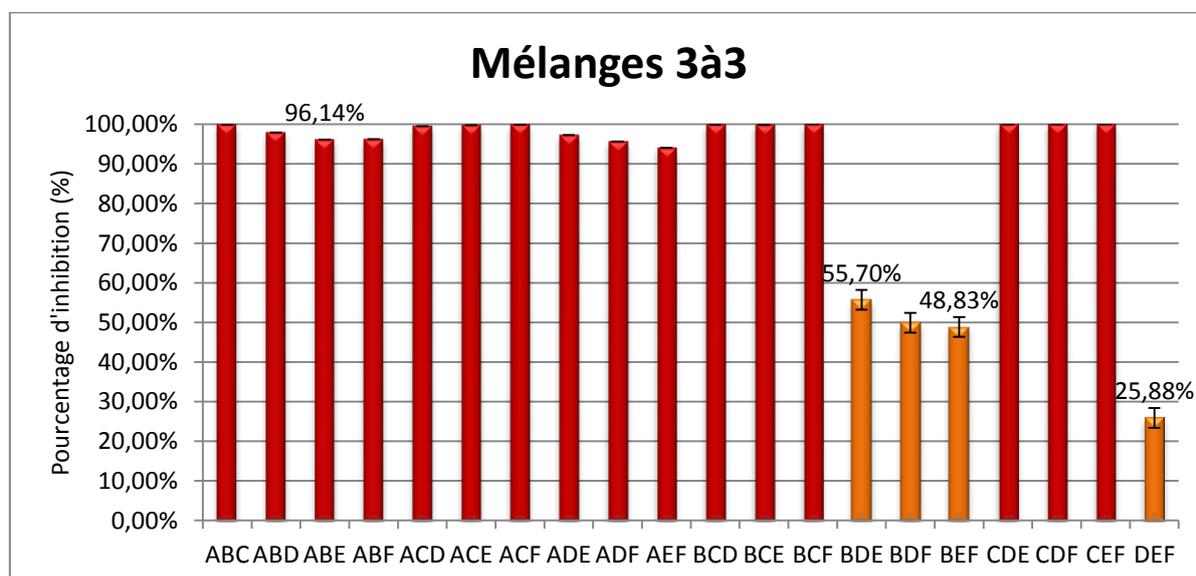
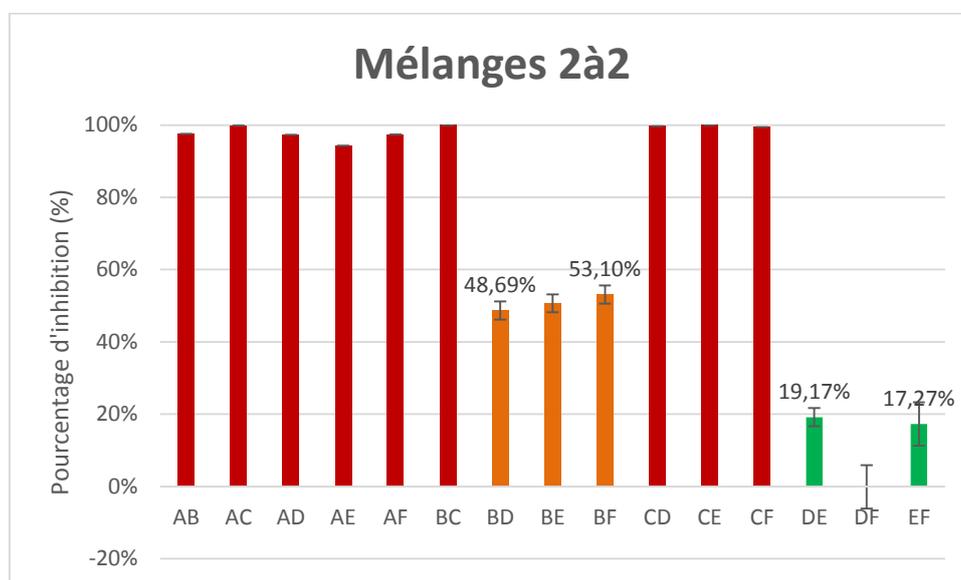
Cela explique le fait que les sous-produits apparaissant en début de réaction à savoir les composés aromatiques sont les plus toxiques (Lee, et al., 2013). Aussi, les sous-produits finaux notamment les acides carboxyliques sont moins toxiques excepté l'acide fumarique qui apparaît avec le groupe des composés aromatiques bien que n'étant pas toxique.

V.2.2 Toxicité des sous-produits de l'Acide Orange 7 testés en mélanges

Des groupes de sous-produits ont été réalisés selon leur temps d'apparition au moment de la réaction d'électrofenton. Par un calcul de combinaison les composés ont été mixés selon qu'ils appartiennent au même groupe afin d'évaluer la toxicité en solution selon que deux ou plusieurs composés se retrouvent simultanément en solution :

□ Groupe des sous-produits 5 – 30 min

Le groupe des sous-produits se formant au début de l'électrofenton c'est-à-dire entre 5 et 30 min est le plus grand car il contient le plus de sous-produits. Cela va conduire à une multitude de mélanges possibles pour ce groupe soit 57 combinaisons. La mesure de la toxicité des différents mélanges se présente comme suit :



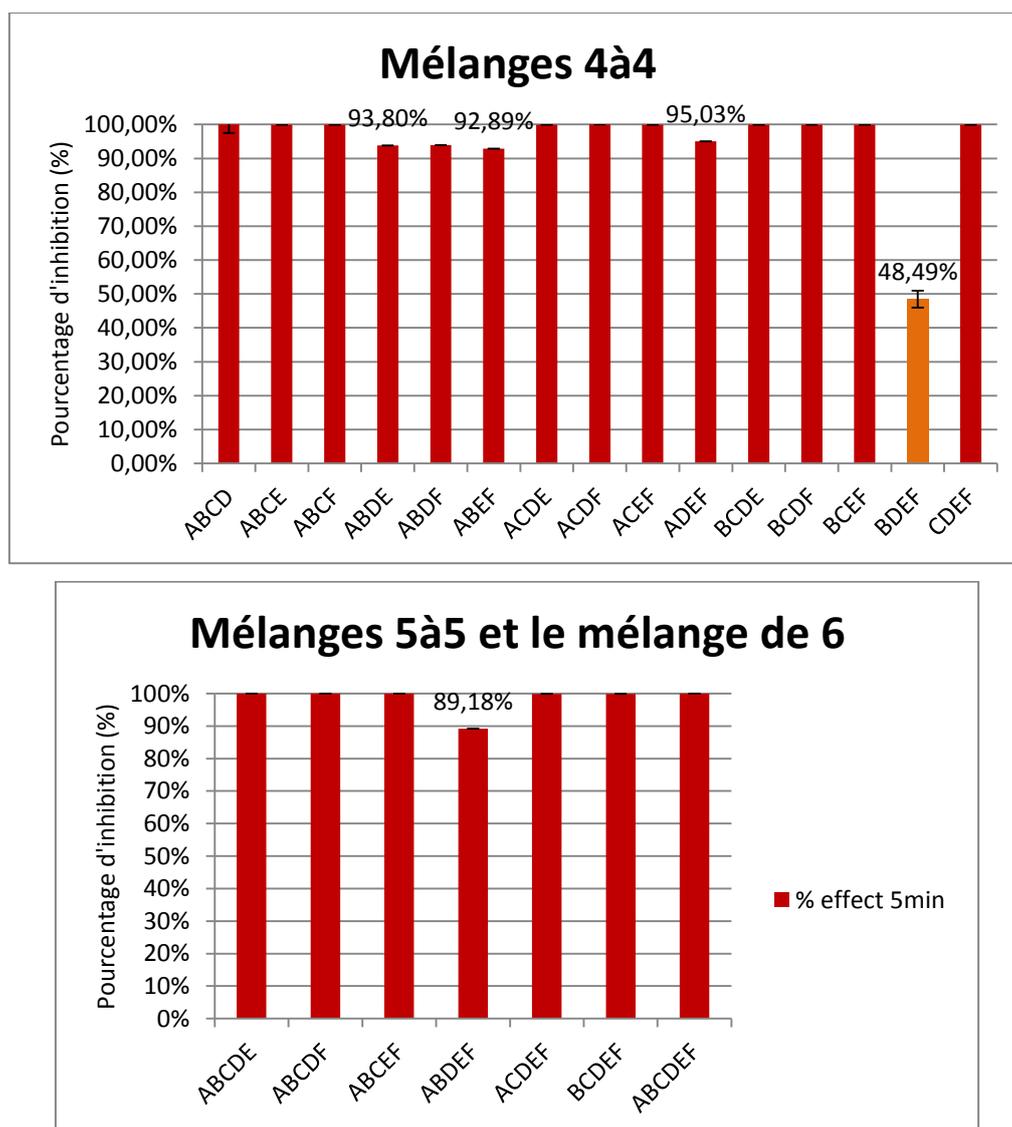


Figure 10 : Toxicité des mélanges des composés de l'AO7 apparaissant entre 5-30min

Le premier groupe d'apparition des sous-produits est le plus toxique car les sous-produits aromatiques apparaissant en premier lieu sont très toxiques. Lorsque des mélanges sont effectués dans ce premier groupe, on constate qu'ils sont quasiment tous toxiques. A l'exception des mélanges DE, DF et EF. Le composé F qui est l'acide fumarique est non toxique, mélangé au composé D qui a une toxicité de 46% la toxicité du mélange s'annule. Le constat est le même pour le mélange DE. En effet la faible toxicité du composé E qui est le 4-hydroxybenzenesulphonique acide inhibe la toxicité initiale du sous-produit D qui est le 2-hydroxy-1,4naphtoquinone.

Aussi, le composé B qui est le 2-carboxybenzaldéhyde à une toxicité individuelle de 75% mais en mélange avec l'acide fumarique de très faible toxicité ; la toxicité du mélange BF chute aux alentours de 53% (fig. 10).

□ Groupe des sous-produits 30 – 60 min

Les composés appartenant au deuxième groupe (sous-produits présents entre 30 min et 1 heure d'électroxydation) ont été associés comme l'indique la figure suivante en mélanges de deux par deux puis tous les trois ensembles dans un mélange.

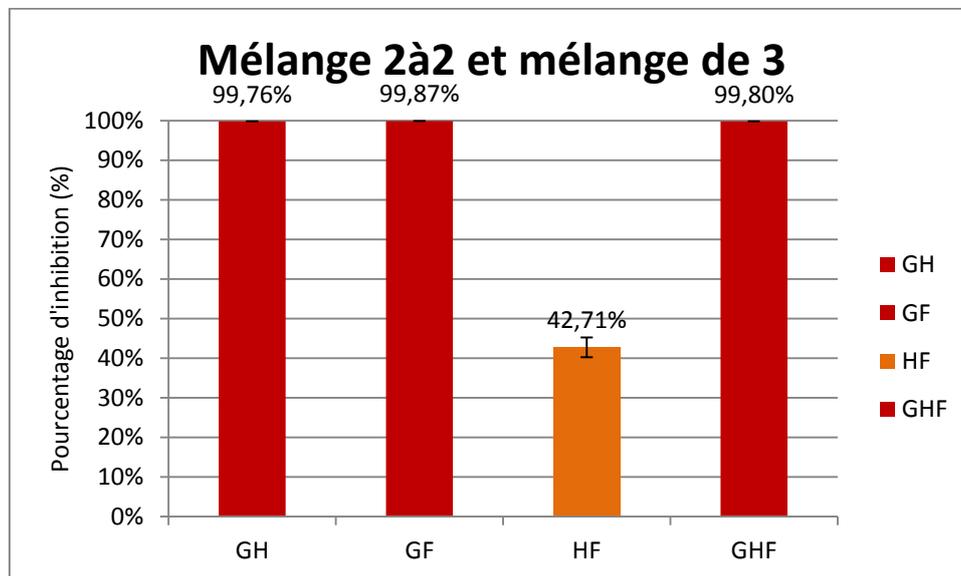


Figure 11 : Toxicité des mélanges des sous-produits de l'AO7 du groupe 30-60 min

Pour le groupe des sous-produits apparaissant entre 30 et 60 min il convient de noter que les mélanges sont tout aussi toxiques que les sous-produits testés individuellement excepté le mélange d'acide fumarique et de 2-naphtol qui a une toxicité moyenne autour de 43% (fig. 11).

□ Groupe des sous-produits 6 – 8 heures

Les acides carboxyliques malgré leur faible toxicité ont également été mis ensembles par deux et par trois afin de voir si une toxicité ne naitrait pas d'une combinaison de ces composés.

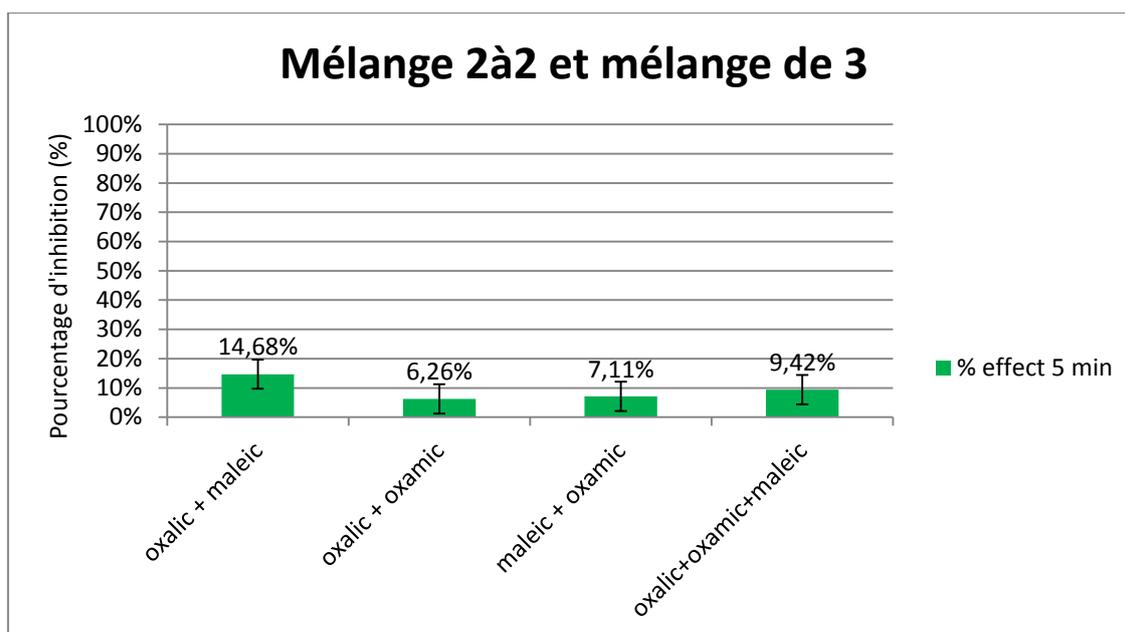


Figure 12 : Toxicité des mélanges des sous-produits de l'AO7 du groupe 6-8h

En ce qui concerne les sous-produits du groupe 6-8 heures ; il apparaît que les courtes chaînes d'acide carboxyliques que sont l'acide oxamique, oxalique et maléique ne sont pas toxiques même étant mélangés ensemble car la toxicité des différents mélanges n'excède pas 15% (fig. 12). Ces résultats sont en parfait accord avec les résultats trouvés dans la littérature car en fin de réaction les composés apparaissant ne sont pas toxiques. (Wu, et al., 2012)

V.3 TOXICITE DES SOUS-PRODUITS DU PARACETAMOL

V.3.1 Toxicité de sous-produits individuels du paracétamol

La molécule de paracétamol a efficacement été dégradée par électrolyse sur une durée de 8 h. En effet, au de cet électrolyse des mesures de TOC et de toxicité ont été réalisées comme l'indique la figure 13. On constate que le TOC passe d'une valeur initiale de 100% à 22% à la fin du traitement; la toxicité quant à elle décroît également passant 100% d'inhibition sur les bactéries à une toxicité nulle au bout de 7 h de traitement.

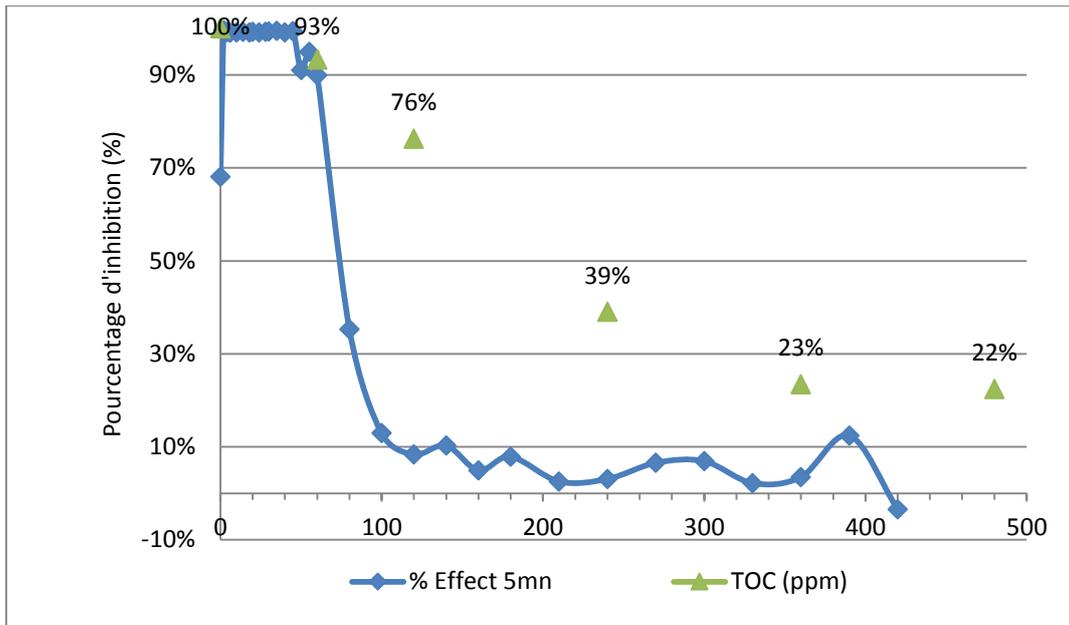


Figure 13: Corrélation entre COT et Toxicité du PCM au cours de l'EF

Les sous-produits du paracétamol ont été préparés aux concentrations auxquelles elles se trouvent en solution lors de l'électrofenton à des temps donnés. Les périodes concernées sont 10 min, 60 min, 80 min et 120min d'électrofenton (fig. 14).

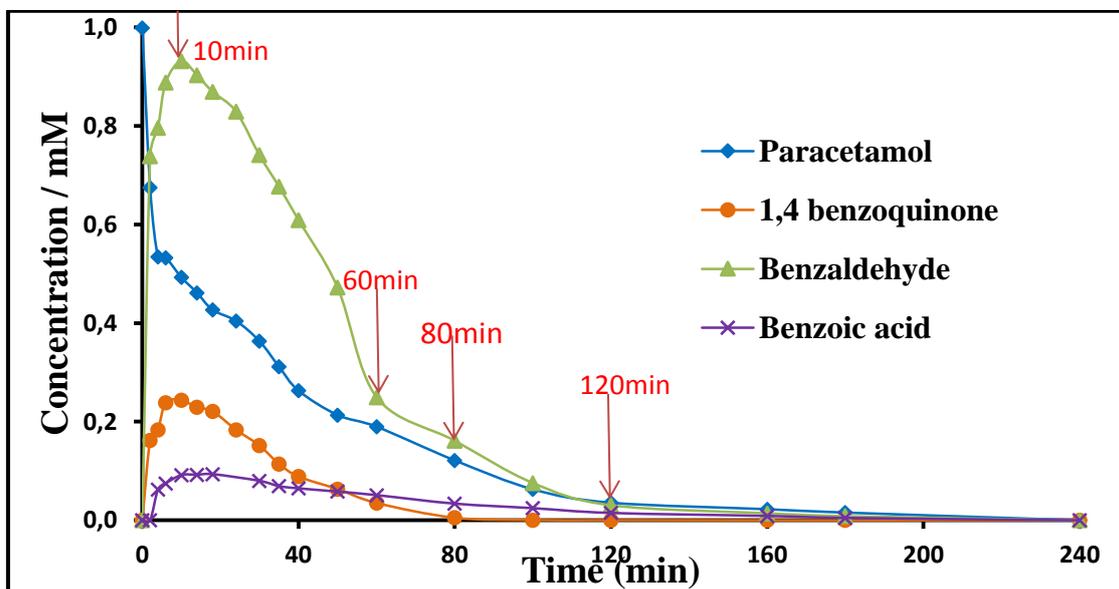


Figure 14 : Points singuliers choisis pour les mesures

☐ Toxicité des sous-produits aromatiques apparaissant à 10 min d'électrofenton

A 10 min d'électrofenton, se retrouvent en solutions les sous-produits suivants :

Le PCM 0,5 mM/L

Le benzoquinone 0,244 mM/L

Le benzaldehyde 0,93 mM/L

L'acide benzoïque (benzoic acid) 0,09 mM/L

Leurs toxicités se présentent comme suit :

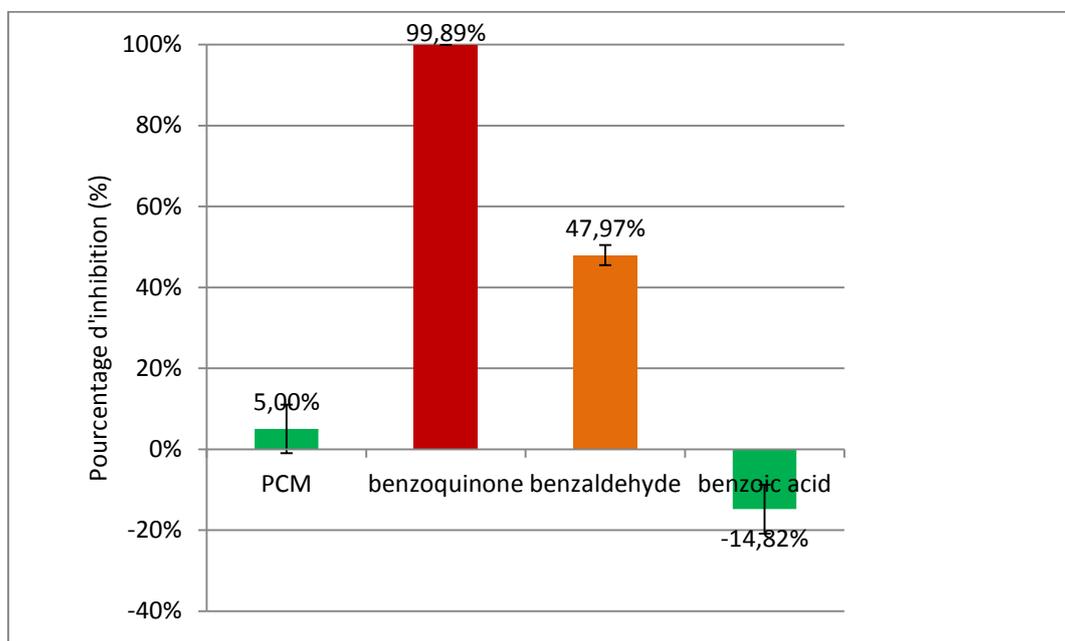


Figure 15 : Toxicité des sous-produits aromatiques du PCM apparaissant à 10 min d'EF

Des sous-produits apparaissant à 10 min d'électrofenton (fig. 15), le benzoquinone est celui qui a la plus forte toxicité. Cette toxicité est évoquée dans les travaux publiés par Rubio, et al., (2011). Sa toxicité est très forte relativement au produit d'origine qui est le PCM en solution puis la toxicité décroît avec l'apparition d'un sous-produit moyennement toxique qu'est le benzaldéhyde (Paulraj, et al., 2011) et de l'acide benzoïque qui a une faible toxicité (Velegaki, et al., 2010).

❑ Toxicité des sous-produits aromatiques apparaissant à 60 min d'électrofenton

A 1 heure d'EF les sous-produits se trouvant en solution et leurs concentrations respectives sont :

Le PCM 0,2 mM/L

Le benzoquinone 0,035 mM/L

Le benzaldehyde 0,25 mM/L

L'acide benzoïque (benzoic acid) 0,05 mM/L

La mesure de toxicité de ces composants s'illustre dans la figure suivante :

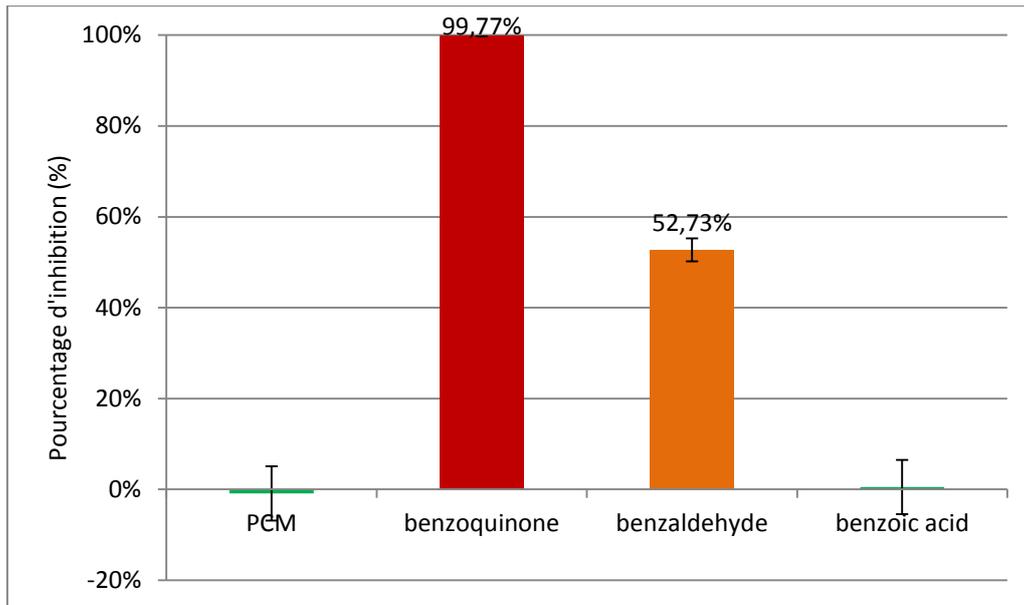


Figure 16 : Toxicité des sous-produits aromatiques du PCM apparaissant à 60 min d'électrofonton

A 60 min de réaction de dégradation le PCM et les 3 autres sous-produits se trouvent toujours en solution mais à concentration réduite (fig. 16). Cependant la toxicité du benzoquinone est toujours de 100%.

❑ Toxicité des sous-produits aromatiques apparaissant à 80 min d'électrofonton

Après 80 min d'EF les sous-produits se trouvant en solution, leurs concentrations respectives ainsi que la toxicité engendrée se présentent comme suit :

PCM 0,1 mM/L

Benzoquinone 0,005 mM/L

Benzaldehyde 0,16 mM/L

Acide benzoïque (benzoic acid) 0,03 mM/L

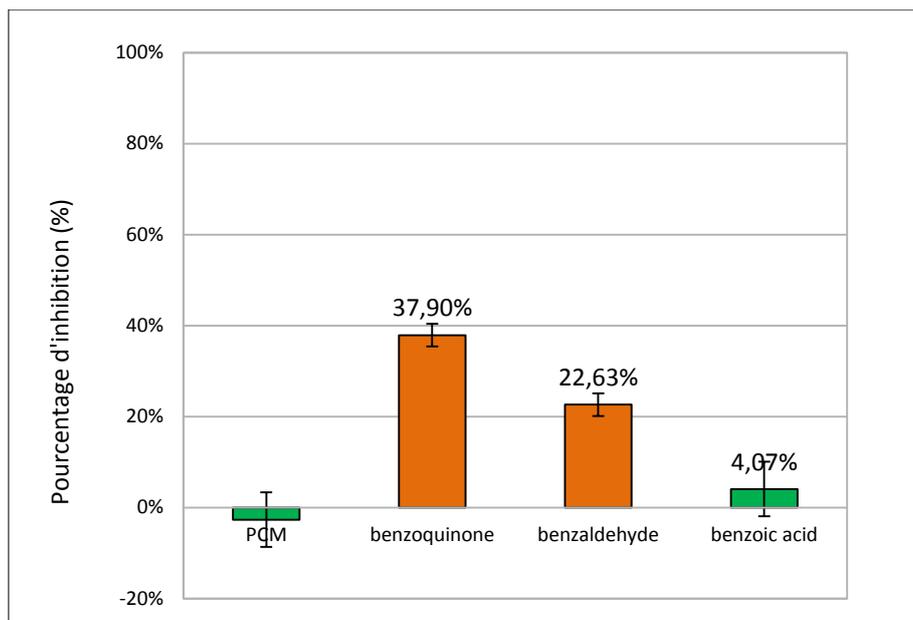


Figure 17 : Toxicité des sous-produits aromatiques du PCM apparaissant à 80 min d'EF

Ce n'est qu'à partir de 80 min d'électrofenton que l'on constate que la toxicité du benzoquinone diminue autour de la moyenne c'est à dire 40% d'inhibition (fig. 17). Celle du benzaldéhyde passe également de 53% (à 60 min) à 23%.

□ Toxicité des sous-produits aromatiques apparaissant à 120 min d'électrofenton

A 120 min d'EF seuls le benzaldehyde et l'acide benzoïque sont en solution, leurs toxicités s'illustrent comme le montre la figure 18.

Benzaldehyde 0,03 mM/L

Acide benzoïque (benzoic acid) 0,01 mM/L

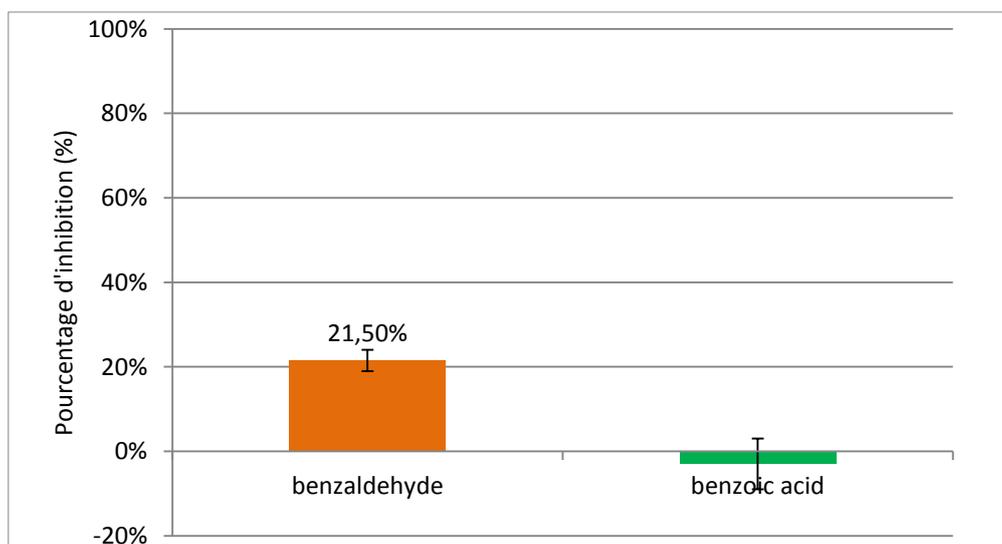


Figure 18 : Sous-produits aromatiques apparaissant à 120 min d'EF

A 120 min d'électrofenton, seuls le benzaldéhyde et l'acide benzoïque sont résiduels en solution mais à des concentrations très faibles qui ce qui engendre une toxicité n'excédant pas 21% d'inhibition (fig. 18). La toxicité du benzaldéhyde décroît fortement car à 10 min d'EF le benzaldehyde inhibait 50% des bactéries.

❑ Toxicité des sous-produits Carboxyliques apparaissant entre 6 et 8h d'électrofenton

Peu après l'apparition des sous-produits aromatiques du paracétamol, se forment en solutions les sous-produits carboxyliques. Au nombre de six, ces sous-produits ont été préparés aux concentrations qui suivent puis des tests de toxicité ont été faits.

Acide Oxalique (oxalic)	0,388mM/L
Acide Maléique (maleic)	0,0034mM/L
Acide Oxamique (oxamic)	0,5157mM/L
Acide Formique (formic)	0,388mM/L
Acide Fumarique (fumaric)	0,0776mM/L
Acide acétique (acetic)	0,5884mM/L

La figure 19 montre les différentes valeurs de toxicité engendrées par les composés précédemment cités.

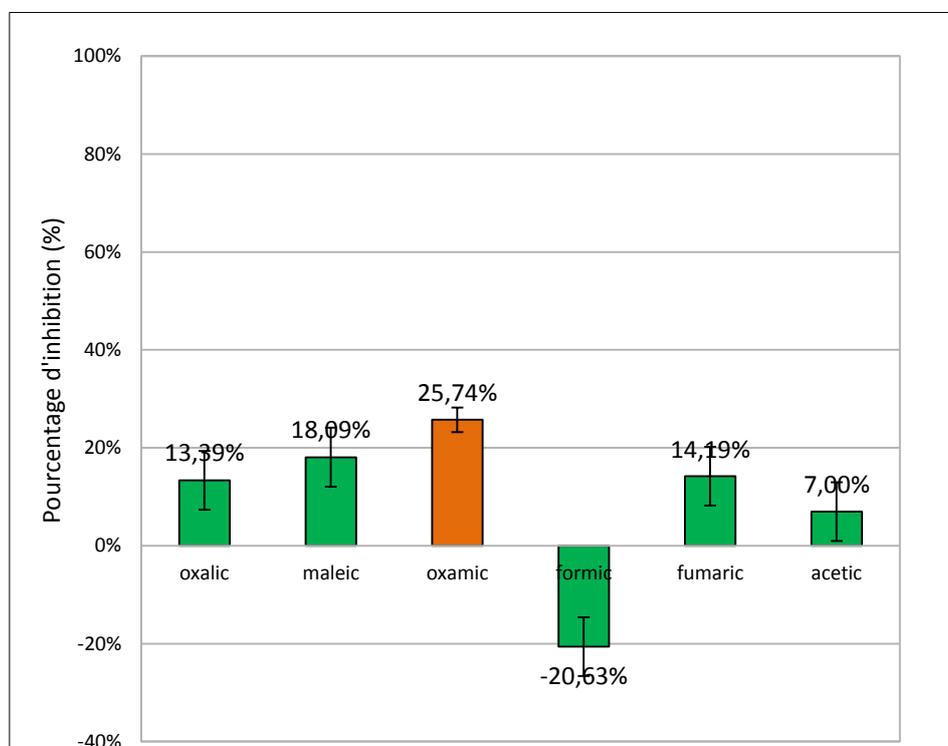


Figure 19 : Toxicité des acides carboxyliques du PCM

A l'instar des sous-produits carboxyliques de l'AO7, ceux du PCM sont tous aussi peu

toxiques (fig. 19). Certains sous-produits se retrouvent dans les deux chemins de dégradation mais à des concentrations différentes. Apparaissent cependant dans le cas du paracétamol de l'acide formique très peu toxique (Liu, et al., 2010) et de l'acide acétique avec une toxicité très faible.

V.3.2 Toxicité des sous-produits standards du paracétamol en mélange

☐ Toxicité des mélanges des sous-produits aromatiques du PCM

Les sous-produits apparaissant à 10min d'électrofenton ont été mélangés tous ensemble en solution de même que les sous-produits apparaissant à 60, 80 et 120 min d'électrofenton. Ces groupes de mélanges respectivement le groupe A, B, C, D ont permis de comparer l'évolution de la concentration et celle de la toxicité (fig. 20).

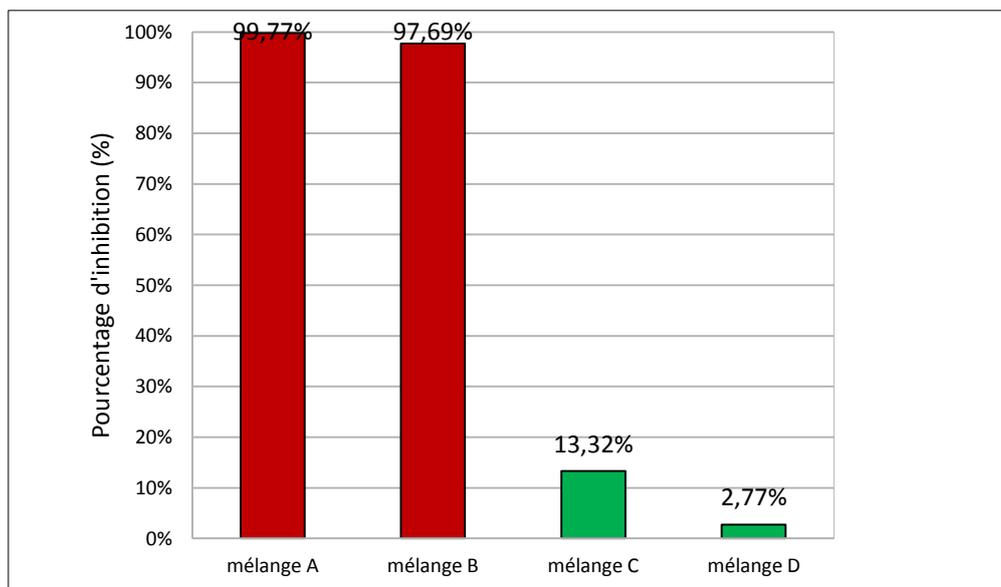


Figure 20 : Toxicité des sous-produits aromatiques du PCM en mélanges

Lorsque les sous-produits sont en mélange selon leur temps d'apparition, la recrudescence de la toxicité est en accord avec la mesure d'inhibition bactérienne des différents échantillons prélevés au cours de l'électrofenton. En effet on constate que de 100% de toxicité au départ ; la toxicité passe à 97% à 60 min puis à 13% à 80 min pour enfin atteindre 3% à la 120 e min (fig. 20). Cette chute de toxicité a également été observée lors de travaux de (Trovó, et al., 2012).

□ Toxicité des mélanges des sous-produits carboxyliques du PCM

Trois mélanges des acides carboxyliques ont été réalisés selon leur temps d'apparition (fig. 21).

Mélange 1 : 210 – 270 min : acide oxalique + acide formique

Mélange 2 : 270 – 330 min : acide formique + acide acétique + acide maléique + acide oxalique

Mélange 3 : 330 – 420 min: acide oxamique + acide maléique

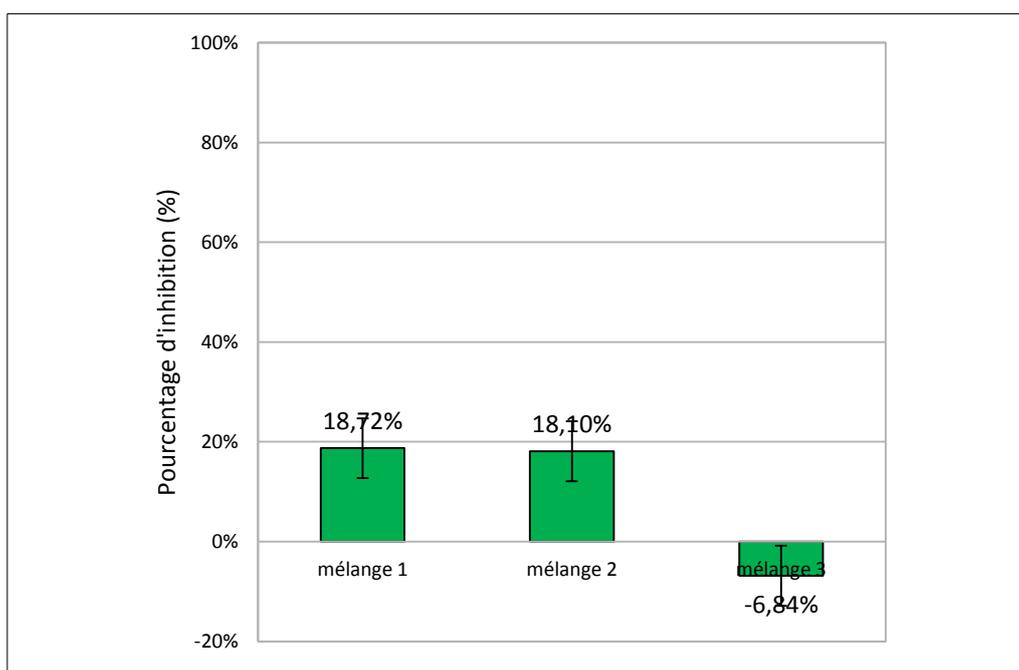


Figure 21 : Toxicité des acides carboxyliques du PCM en mélange

Lorsque les courtes chaînes d'acides carboxyliques sont mélangées on constate que la toxicité décroît. En effet les sous-produits présents entre 210 et 270 min présentent une toxicité de 19% tandis que le second groupe de composés présents entre 270 et 330 min ont une toxicité maximale égale à 18%. La toxicité disparaît pour le dernier groupe de sous-produits apparaissant entre 330 et 420 min car aucune inhibition des bactéries n'est constatée (fig. 21).

V.4 ÉVOLUTION DE LA TOXICITE DE LA CARBAMAZEPINE

Afin de connaître le comportement de la toxicité de la carbamazépine et de ses sous-produits de dégradation, un échantillonnage a été fait au cours de l'électrofenton. La mesure de l'écotoxicité après contact des différents échantillons sur les souches de *Vibrio fischeri* se présente comme suit :

Pour une concentration initiale de carbamazépine à 20 mg/L (fig. 22)

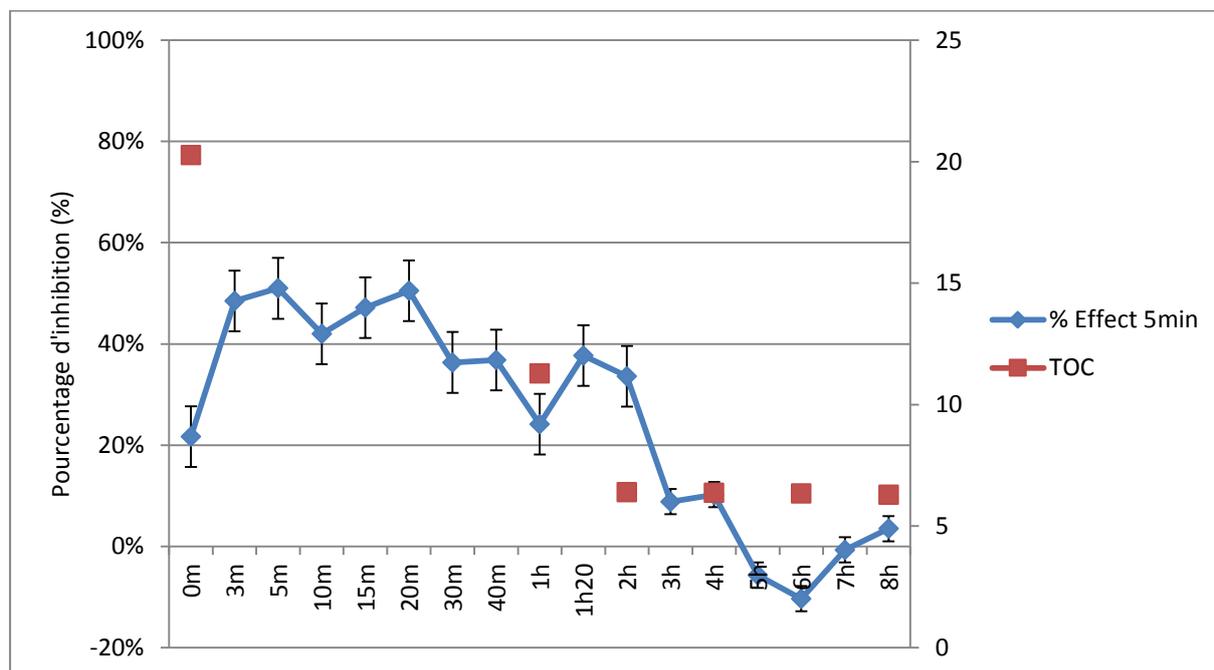


Figure 22 : Evolution de la toxicité de la solution de CBZ à 20 mg/L ayant subi un EF sur 8h

Pour une concentration initiale à 20mg/L, l'allure générale de la courbe de toxicité montre une décroissance de la toxicité de la carbamazépine qui au début de la réaction à une toxicité moyenne avoisinant 20%. Quelques minutes après le début de l'EF la toxicité augmente autour de 50% pour par la suite diminuer progressivement pour presque s'annuler après 5h d'électrofenton (fig. 22). La mesure concomitante de COT montre également une diminution du carbone organique total passant de 20 à 6 mg/L.

Pour une meilleure identification des sous-produits de dégradation de la carbamazépine la concentration initiale a été multipliée par 10 d'où une concentration initiale de 200mg/L. la mesure de toxicité a été faite sur un échantillonnage au cours de 8 h d'électrofenton.

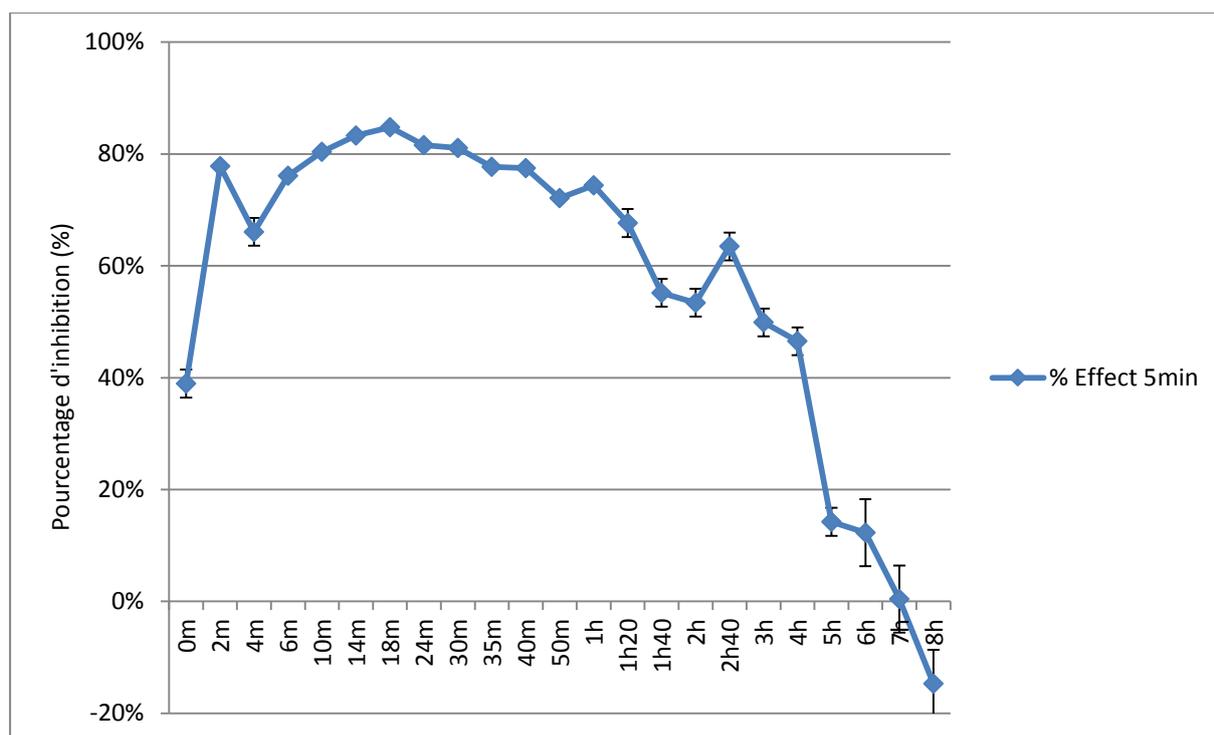


Figure 23 : Evolution de la toxicité de la solution de CBZ à 200 mg/L ayant subi un EF sur 8h.

Le comportement de la toxicité en solution est similaire pour une concentration initiale de 200 mg/L (fig. 23) à la différence que la toxicité initiale est deux fois plus importante : taux d'inhibition des bactéries de 40%. Cette inhibition augmente fortement les premières minutes de l'EF pour décroître au long de la réaction et s'annuler après 7 h de réaction. On pourrait d'une part en déduire l'efficacité de la méthode de dégradation par électroxydation, mais aussi la sensibilité des bactéries en fonction de la concentration du polluant en solution.

VI. CONCLUSION

Au terme de notre étude nous pouvons retenir que les procédés de dégradation des molécules organiques que sont le paracétamol, l'Acide Orange 7 et la carbamazépine conduisent à des sous-produits de dégradation. Les sous-produits apparaissant quelques minutes après le début de la dégradation se révèlent être plus toxiques que les molécules initiales. C'est le cas de l'hydroquinone et du benzoquinone.

Les acides carboxyliques sont relativement moins toxiques comme l'acide fumarique, comme l'acide maléique et apparaissent quant à eux généralement à partir de 4 h d'électrofenton.

Ces résultats confirment les hypothèses émises. Aussi des recherches confortant nos résultats ont été faites par Fitzhugh, et al., (2006) ainsi que par Bonnard, et al., (2006).

Lorsque les tests de toxicité sont réalisés, le taux d'inhibition des bactéries dépend de la concentration de départ du polluant car on observe une diminution de toxicité pour un même polluant au fur et à mesure que sa concentration diminue au cours de l'électrofenton.

Aussi, la toxicité d'un mélange de plusieurs sous-produits ne correspond pas forcément à une moyenne de toxicité mais dépend le plus souvent d'un composé qui influence la toxicité du mélange.

La carbamazépine se caractérise par des propriétés physiques particulières à savoir sa faible solubilité dans l'eau. Sa toxicité est relativement faible pour une concentration initiale de 20mg/L mais on note une augmentation en toxicité quelques temps après le début de l'électrofenton. Cela laisse présager la formation en solution de sous-produits relativement plus toxiques que la carbamazépine elle-même.

Des perspectives peuvent être dégagées de cette étude car les travaux ont été effectués à l'échelle de laboratoire. Ainsi, peuvent être envisagées l'application à l'échelle réelle du procédé de mesure et de détection de la toxicité des différents polluants dans les eaux usées mais aussi un traitement tertiaire pour la dégradation totale de ces polluants.

Bibliographie

Ouvrages et articles

A. Özcan; Y. Şahin; Koparal A. Savaş et Oturan M. A. Carbon sponge as a new cathode material for the electro-Fenton process: Comparison with carbon felt cathode and application to degradation of synthetic dye basic blue 3 in aqueous medium [Revue] // Journal of Electroanalytical Chemistry. - 2008. - pp. vol. 616, pp. 71-78.

Académie Nationale de Pharmacie MÉDICAMENTS ET ENVIRONNEMENT [Rapport]. - Paris, 2008.

Alrashood Sara T. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology [Revue] // Elsevier. - 2016. - p. chap Carbamazepine.

Avignon Claire Toxicité du paracétamol dans les eaux usées [Rapport]. - 2005.

Bedner Mary et MacCrehan William Transformation of Acetaminophen by Chlorination Produces the Toxicants 1,4-Benzoquinone and N-Acetyl-p-benzoquinone Imine [Revue] // Environmental Science and Technology. - 2006. - pp. pages 516–522.

Boillota Clotilde; Bazinb Christine; Tissot-Guerrazc Françoise; Droguetd Jérôme; Perraud Michel; Cetref Jean-Charles; Trepog Dominique; Perrodin Yves Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers : application à un hôpital d'une grande ville française [En ligne] // ResearchGate. - november 2008. - 15 09 2015. - <http://www.researchgate.net/publication/235924316>.

Bound Jonathan P.; Kitsou Katerina et Voulvoulis Nikolaos Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment [Revue] // Environmental Toxicology and Pharmacology. - 2006. - pp. Volume 21, Issue 3, Pages 301–307.

Carolina Biological Supply Company *Vibrio fischeri* [Rapport]. - Carolina : 2700 York Road, Burlington, NC 27215-3398, 2013.

Costa Susana P.F.; Justina Vanessa D.; Bica Katharina; Vasiloiu Maria; Pinto Paula C.A.G.; Saraiva M.; Lúcia M.F.S. Automated evaluation of pharmaceutically active ionic liquids' (eco)toxicity through the inhibition of human carboxylesterase and *Vibrio fischeri* [Revue] // Journal of Hazardous Materials. - 2014. - pp. 265 p. , pages 133– 141.

Cuzzolin Laura; Antonucci Roberto et Fanos Vassilios Paracetamol (Acetaminophen) Efficacy and Safety in the Newborn [Revue] // Current Drug Metabolism. - 2013. - pp. Volume 14, Number 2, pp. 178-185(8).

D. RIBERA; J. TABERLY - BIO-TOX Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et

évaluation des risques [Article] // Record. - Avril 2011. - p. 296.

Daneshvara Nezamaddin; Aber Soheil; Vatanpour Vahid; Rassoulifard Mohammad Hossein Electro-Fenton treatment of dye solution containing Orange II: Influence of operational parameters [Revue] // Journal of Electroanalytical Chemistry. - April 2008. - pp. Volume 615, Issue 2, Pages 165–174.

Das Amlan; Chakrabarty Subhendu; Choudhury Diptiman; Chakrabarty Gopal 1,4-Benzoquinone (PBQ) Induced Toxicity in Lung Epithelial Cells Is Mediated by the Disruption of the Microtubule Network and Activation of Caspase-3. [Revue] // Chemical Research in Toxicology. - 2010. - pp. 1054-1066.

Dunn Anne K. Vibrio fischeri Metabolism: Symbiosis and Beyond [Revue] // Advances in Microbial Physiology. - 2012. - pp. Volume 61, Chapter Two, Pages 37–68.

Enguita Francisco J. et Leitão Ana Lúcia Hydroquinone: Environmental Pollution, Toxicity, and Microbial Answers [Revue] // BioMed Research International. - 2013. - pp. Article ID 542168, 14 pages.

Farré Marinella; Martínez Elena; Hernando M.-D.; Fernández-Alba Amadeo; Fritz Johann; Unruh Eckehardt; Mihail Otilia; Sakkas Vasilis; Morbey Ana; Albanis Triantafyllos; Brito Fatima; Hansen Peter D.; Barceló Damià European ring exercise on water toxicity using different bioluminescence inhibition tests based on Vibrio fischeri, in support to the implementation of the water framework directive [Revue] // Talanta. - 2006. - 2 : Vol. 69. - pp. 323-333.

Fitzhugh O. Garth et Nelson Arthur A. The Comparative Chronic Toxicities of Fumaric, Tartaric, Oxalic, and Maleic Acids [Revue] // Journal of the American Pharmaceutical Association. - 2006. - pp. 217-219.

Huong L. Thi Xuan; Mikhael B.; Joffrey C.; Marc C. A highly active based graphene cathode for the electro-fenton reaction [Revue] // RSC adv. - 2015. - pp. vol. 5, pp. 42536-42539.

Komtchou Simon; Dirany Ahmad; Drogui Patrick; Bermond Alain Removal of carbamazepine from spiked municipal wastewater using electro-Fenton process [Revue] // Environmental Science and Pollution Research. - 2015. - pp. Volume 22, Issue 15, pp 11513-11525.

Lee So-Young; Kang Hyun-Joong et Kwon Jung-Hwan Toxicity cutoff of aromatic hydrocarbons for luminescence inhibition of Vibrio fischeri [Revue] // Ecotoxicology and Environmental Safety. - 2013. - pp. Volume 94, Pages 116-122.

Liu Zhelin; Zhao Bo; Guo Cunlan; Sun Yujing; Shi Yan; Yang Haibin Carbon

nanotube/raspberry hollow Pd nanosphere hybrids for methanol, ethanol, and formic acid electro-oxidation in alkaline media [Revue] // Journal of Colloid and Interface Science. - 2010. - pp. 233-238.

MAKIGUCHI NOBUYOSHI; ARITA MASANOBU et ASAI YOSHIYUKI ISOLATION, IDENTIFICATION, AND SEVERAL CHARACTERISTICS OF LUMINOUS BACTERIA [Revue] // General Applied Microbiology. - 1979. - pp. 387-396.

Markovic Marijana; Jovic Milica; Stankovic Dalibor; Kovacevic Vesna; Roglic Goran; Gojgic-Cvijovic Gordana; Manojlovic Dragan Application of non-thermal plasma reactor and Fenton reaction for degradation of ibuprofen [Revue] // Science of the Total Environment. - 2015. - pp. 1148-1155.

N. Bonnard; F. Pillière; J.-C. Protois; O. Scheinder fiche toxicologique Hydroquinone [Revue] // Institut National de Recherche et de Sécurité. - 2006. - p. 8.

NAŁĘCZ-JAWECKI GRZEGORZ; BARAN STANISLAW; CZ JOANNA MANKIEWICZ-BOCZEK.ELZBIET A NIEMIRY; WOLSKA LIDA; KNAPIK JOANNA A; PIEKARSKA KATARZYN A; BARTOSIEWICZ MARIA; PIETOWKI GRZEGORZ THE FIRST POLISH INTERLABORATORY COMPARISON OF THE LUMINESCENT BACTERIA BIOASSAY WITH THREE STANDARD TOXICANTS [Revue] // Environment Protection Engineering. - 2010. - pp. 96-102.

Nguyen Thi Van COUPLING CHEMICAL ANALYSIS (HPLC AND LC-MS) AND ECO/PHYTO TOXICITY ASSESSMENT FOR THE CHARACTERIZATION OF MICROPOLLUTANTS AND TOXICITY REMOVAL IN ADVANCED OXIDATION PROCESSES [Rapport]. - Montpellier : IEM, 2015.

P.F.Costa Susana; Toxicity assessment of ionic liquids with *Vibrio fischeri*: An alternative [Revue] // Journal of Hazardous Materials. - 2015. - pp. 136–142.

Paulraj M. G.; Reegan A. D. et Ignacimuthu S. Toxicity of Benzaldehyde and Propionic Acid against Immature and Adult Stages of *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera : Culicidae) [Revue] // Journal of Entomology. - 2011. - pp. 539-547.

Philippe LEMAIRE; Jacqueline BAKES Techniques de l'ingénieur. Sécurité et gestion des risques ISSN 1638-6981 [Revue] // Techniques de l'ingénieur, Paris, FRANCE Vol SE1 no SE1600, [Note(s): SE1600.1-SE1602.4] (1/4 p.)

Pinto Paula C.A.G.; Paula C.A.G. Pintoa; Rui A.S. Lapaa; M.Lúcia; M.F.S. Saraivaa Automated high-throughput *Vibrio fischeri* assay for (eco)toxicity screening: Application to ionic liquids [Revue] // Ecotoxicology and Environmental Safety. - 2012. - pp. Volume 80, Pages 97–102.

Prévoit Karine Symbioses microbiennes, ou comment des êtres minuscules font l'individu [Revue] // Critique 4. - 2014. - pp. (n° 803) , p. 320-330 .

RIBERA D., BIO-TOX et - J. TABERLY MELANGES DE POLLUANTS, TOXICITE, ECOTOXICITE [Article] // RECORD 08-0668/1A. - avril 2011. - p. 295 p..

Romero A.; Santos A. et Tojo J. Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids [Revue] // Journal of Hazardous Materials. - 2008. - pp. Volume 151, Issue 1, Pages 268–273.

Rubio Valentina; Zhang Jiawei; Valverde Mahara; Rojas Emilio; Shi Zheng-Zheng Essential role of Nrf2 in protection against hydroquinone- and benzoquinone-induced cytotoxicity [Revue] // Toxicology in Vitro. - 2011. - pp. 521-529.

Ruimy R et Andreumont A. Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition [Revue] // Réanimation. - may 2004. - pp. Volume 13, Issue 3, pp 176–184.

Scheerer Stefanie; Gomez Francisco et Lloyd David Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission [Revue] // ELSEVIER. - 2006. - pp. 321-329.

Scientific Committee on Consumer Safety Acid Orange 7 [Article] // COLIPA n° C15. - 2014. - p. 31.

Severine MARTINI La bioluminescence: un proxy d'activité biologique en milieu profond? Etude au laboratoire et in situ de la bioluminescence en relation avec les variables environnementales. [Revue] // Institut Méditerranéen d'Océanologie (MIO), Thèse de doctorat. Aix-Marseille. - 2013. - p. 245.

Stockholm County Council ENVIRONMENTALLY CLASSIFIED PHARMACEUTICALS [Rapport]. - Stockholm : Janusinfo's editorial office, 2014-2015.

Togola A.; Amalric L. et Bristeau S. les substances pharmaceutiques dans les eaux superficielles et souterraines du bassin de la Loire-Bretagne [Article] // Rapport final BRGM/RP-55578-FR. - avril 2008. - p. 51 pages.

Tran Nam; Drogui Patrick; Zaviska Francois; Brar Satinder K. Sonochemical degradation of the persistent pharmaceutical [Revue] // Journal of Environmental Management. - 2013. - pp. 25-32.

Trovó Alam G.; Nogueira Raquel F. Pupo; Agüera Ana; Fernandez-Alba Amadeo R.; Malato, Sixto Paracetamol degradation intermediates and toxicity during photo-Fenton treatment using different iron species [Revue] // Water Research. - 2012. - pp. 5374-5380.

Valdez H. C. Arredondo; Jimenez G. Garcia; Granados S. Gutierrez; Leon C. Ponce de Degradation of paracetamol by advance oxidation processes using modified reticulated

vitreous carbon electrodes with TiO(2) and CuO/TiO(2)/Al(2)O(3) [Revue] // Chemosphere. - Nov 2012. - pp. vol. 89, pp. 1195-201.

Velegraki Theodora; Balayiannis George; Diamadopoulos Evan; Katsaounis Alexandros; Mantzavinos Dionissios Electrochemical oxidation of benzoic acid in water over boron-doped diamond electrodes: Statistical analysis of key operating parameters, kinetic modeling, reaction by-products and ecotoxicity [Revue] // Chemical Engineering Journal. - 2010. - pp. 538-548.

Wiffen Philip J; Derry Sheena; Moore R Andrew; McQuay Henry J Carbamazepine for acute and chronic pain in adults [Revue] // Cochrane Library. - 2012. - p. 45 p..

Wu Jie; Zhang Hui et Qiu Juanjuan Degradation of Acid Orange 7 in aqueous solution by a novel electro/Fe²⁺/peroxydisulfate process [Revue] // Journal of Hazardous Materials. - 2012. - pp. Volumes 215-216, pages 138-145.

Xia G.; Lu Y. et Xu H. Electrogeneration of hydrogen peroxide for electro-Fenton via oxygen reduction using polyacrylonitrile-based carbon fiber brush cathode [Revue] // Electrochimica. - 2015. - pp. vol. 158, pp. 390-396.

Yousef Javadzadeh; Baharak Jafari-Navimipour et Nokhodchi Ali Liquisolid technique for dissolution rate enhancement of a high dose water-insoluble drug (carbamazepine) [Revue] // International Journal of Pharmaceutics. - 2007. - pp. 26-34.

Yu X.; Zhou M.; Ren G.; Ma L. A novel dual gas diffusion electrodes system for efficient hydrogen peroxide generation used in electro-Fenton [Revue] // Chemical Engineering Journal. - 2015. - pp. vol. 263, pp. 92-100.

Yu Xin; Zuo Jiane; Tang Xinyao; Li Ruixia; Li Zaixing; Zhang Fei Toxicity evaluation of pharmaceutical wastewaters using the alga *Scenedesmus obliquus* and the bacterium *V. fischeri* [Revue] // Journal of Hazardous materials. - 2014. - pp. 266 p. , pages 68-74.

Zadorozhnaya Olesya; Kirsanov Dmitry; Buzhinsky Igor; Tsarev Fedor; Abramova Natalia; Bratov Andrey; Munoz Francesc Javier; Ribó Juan; Bori Jaume; Rivad Mari Carmen; Legin Andrey Water pollution monitoring by an artificial sensory system performing in terms of *Vibrio fischeri* bacteria [Revue] // Sensors and Actuators B : Chemical. - 2015. - pp. Volume 207, Part B, Pages 1069–1075.

Sites internet

ConsoGlobe. (2012). Retrieved janvier 14, 2016, from <http://www.planetoscope.com/Sante-autre/1548-consommation-de-doliprane-et-d-efferalgan.html>

Nutrition et croissance des bactéries (procaryotes). Retrieved 01 25, 2016, from <http://www.biologiemarine.com/micro/nutrition.htm>

Clotilde Boillota, C. B.-G.-C. (2008, november). *Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers : application à un hôpital d'une grande ville française.* Retrieved 09 15, 2015, from ResearchGate: <http://www.researchgate.net/publication/235924316>

CSST. (2014). Retrieved 09 08, 2015, from http://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fichecomplete.aspx?no_produit=168302

Salhi, A., Aarfane, A., Tahiri, S., Khamliche, L., Bensitel, M., Rafqah, S., et al. (2014, 06 06). *Préparation et évaluation de l'efficacité photocatalytique du Hydroxyapatite - Titane vis à vis du colorant acide orange 7 en milieux aqueux (Preparation and photocatalytic efficiency evaluation of Hydroxyapatite- Titanium toward Orange Acid 7 dye in aqueous.* Retrieved 09 08, 2015, from J. Mater. Environ. Sci. : http://www.jmaterenvironsci.com/Document/vol5/vol5_N5/193-JMES-960-2014-Salhi.pdf

VII. ANNEXES

Sommaire des annexes

Annexe I : Protocole de l'électrofenton

Annexe II : Protocole de culture bactérienne

Annexe III: 45% screening test

Annexe IV: 81,9% screening test

Annexe I : Protocole de l'électrofenton

La réaction de dégradation par électrofenton des molécules de PCM et d'AO7 a permis grâce à un échantillonnage au cours de celui-ci de déceler les sous-produits de ces composés. Les conditions de réalisation de l'expérience sont établies :

L'expérience s'est déroulée à température ambiante dans une cellule en verre cylindrique de 500 mL non divisée avec deux électrodes. Le courant appliqué était contrôlé par alimentation stabilisée (Lambda Electronique, États-Unis). La cathode préparée (60 cm²) a été utilisée comme électrode de travail et une forme cylindrique de platine comme contre-électrode en maille. L'anode est centrée dans la cellule électrolytique et est entourée par la cathode, qui couvre la paroi interne de la cellule. La distance entre les électrodes est de 1,5 cm. La solution aqueuse de PCM ou AO7, Na₂SO₄ (50 mm) comme électrolyte support et FeSO₄·7H₂O comme catalyseur ont été préparées en ajustant le pH à 3 avec de l'acide sulfurique (H₂SO₄). Dans le cas d'expériences de minéralisation pour trouver les conditions optimales pour le processus EF, solution 200 mL de PCM ou AO7 (0,1 mm) a été utilisé avec une concentration de catalyseur différent et les courants appliqués. Afin d'identifier l'évolution des composés intermédiaires, l'expérience a été réalisée dans 500 mL de solution PCM ou AO7 (1 mm), feso₄·7H₂O (0,2 mm) et de courant appliqué à 500ma. Avant l'électrolyse, on a fait barboter de l'oxygène pour saturer les solutions qui ont été laissé sous agitation magnétique à une vitesse de 800 tours par minute. A côté de cela, afin d'évaluer l'influence de l'oxydation anodique sur la dégradation des polluants, des expériences ont été réalisées dans deux cellules séparément. Un compartiment anodique comprise AO7 (0,1 mm), Na₂SO₄ (50 mm), pH 3 et une cathode constituée AO7 (0,1 mm), Na₂SO₄ (50 mm), feso₄·7H₂O (0,2 mm), pH aussi à 3. Une membrane céramique était installée en tant que séparateur entre ces deux compartiments.

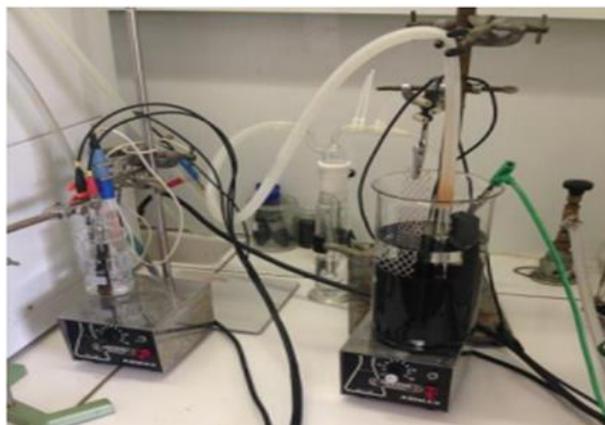


Figure : dispositif d'EF

❖ ANALYSE DES POLLUANTS ET DE LEUR SOUS-PRODUITS

Lorsque les molécules sont dégradées par électrofenton, pour identifier les composés intermédiaires et suivre leur évolution ; un échantillonnage est effectué tout au long de la réaction d'électrofenton. Les échantillons sont d'une part analysés par un TOC mètre afin de suivre la concentration en carbone organique total. D'autre part l'identification et la quantification des sous-produits d'oxydation du colorant ont été effectuées par les techniques d'analyse Chromatographiques : HPLC; LC/MS; COT.

• Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

L'AO7, le PCM et leurs sous-produits d'oxydation aromatiques ont été analysés par une chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Hitachi Co., Japon), avec un réseau de photodiodes Detector (Waters modèle 2996) équipés d'une phase inverse Thermo Scientific AQ C18, 250 * 4,6 mm, diamètre de colonne 5µm. La température de la colonne était de 30 ° C. Le volume d'injection était 20 µl. Un mélange d'acétonitrile et d'eau contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique a été utilisé comme une élution de la phase mobile. Le temps suivant (min) / acétonitrile% (v / v) procédé à gradient a été appliqué: 0 (10%), 35 (70%), 40 (90%), 45 (90%), 50 (10%), 55 (10%). La phase mobile a été injecté un débit de 1 mL.min⁻¹. La détection a été effectuée à $\lambda = 255\text{nm}$.

Les courtes chaînes d'acide carboxyliques ont été déterminés et quantifiés à l'aide ci-dessus HPLC chromatographe, équipé d'un SHODEX KC 811, 7 µm, 8 × 300mm colonne qui a été thermostaté à 30 ° C. Le détecteur à barrette de diodes sélectionnée pour $\lambda = 210\text{nm}$. La phase mobile H₃PO₄ 0,1% a été utilisée pour ce test, avec un taux de 50 µl min⁻¹ flux.

• Chromatographie Liquide/Spectrométrie de Masse (LC/MS)

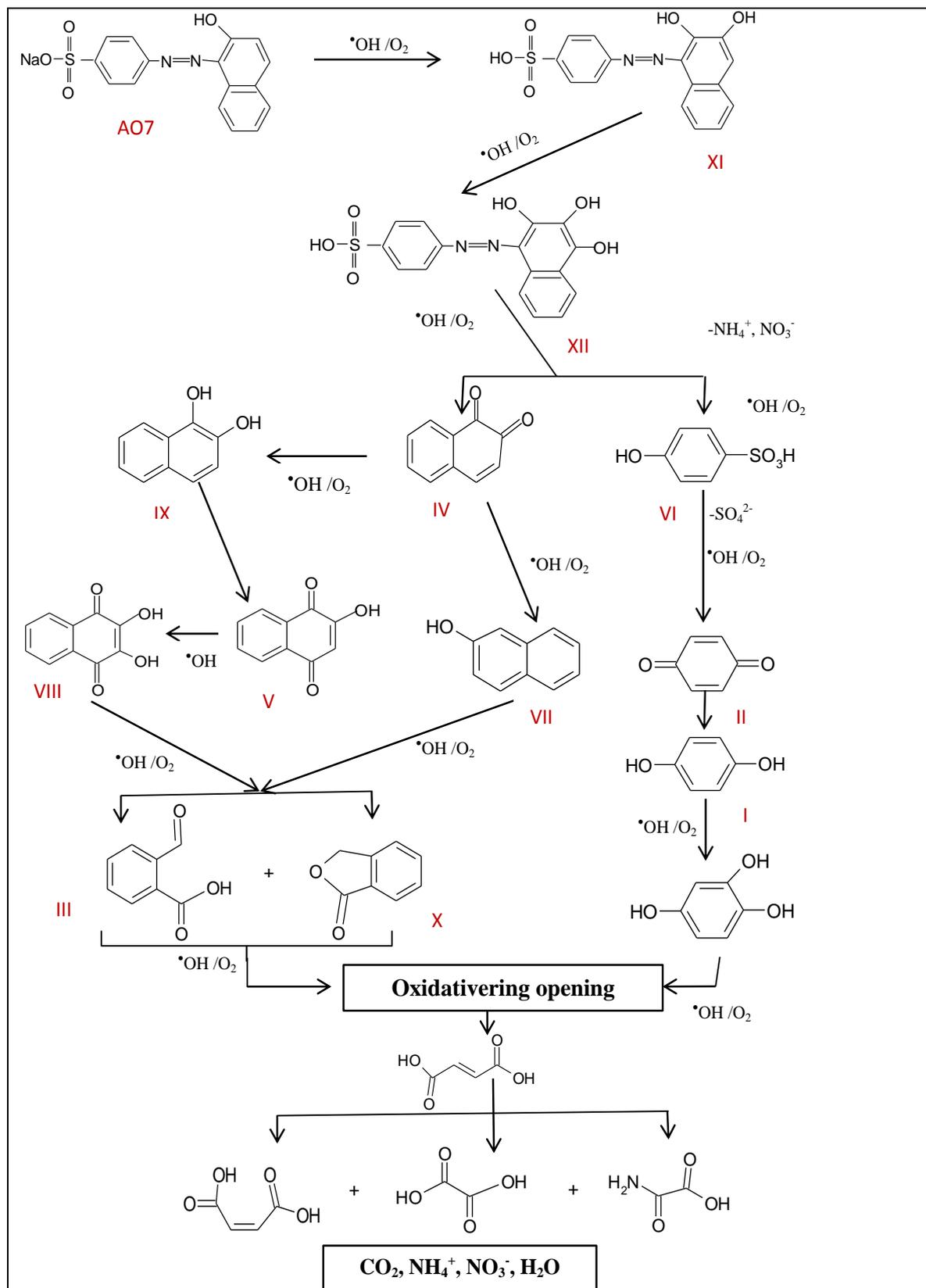
Les produits de dégradation de l'AO7 et du PCM ont également été identifiés par un système LC / MS (Alliance Chaîne E2695). Colonne capillaire de l'eau HSST3 (100 mm x 2,1 mm) a été utilisé pour la séparation de produits intermédiaires. La phase mobile était un mélange d'eau et d'acétonitrile contenant de l'acide formique à 0,1%. Un procédé de gradient a été appliqué pendant la phase mobile suivante (min) / acétonitrile% (v / v): 0 (10%) 1 (10%), 2 (82%), 3 (82%), 4 (10%), 7 (10%). Le débit était 0.25 mLmin⁻¹ et le volume d'injection était de 20 µl. L'éluant de la colonne chromatographique entrer successivement le détecteur UV-Vis de diodes, l'interface ESI et quadruple piège à ions analyseur de masse. L'analyse par MS en mode d'ions positifs a été réalisée sur un spectromètre de masse équipé d'une source d'ions ESI. La gamme de masse était 90-400m / z. La pointe de la sonde et capillaires potentiels ESI ont été fixés à 3,5 kV.

- **Carbone Organique Total (COT)**

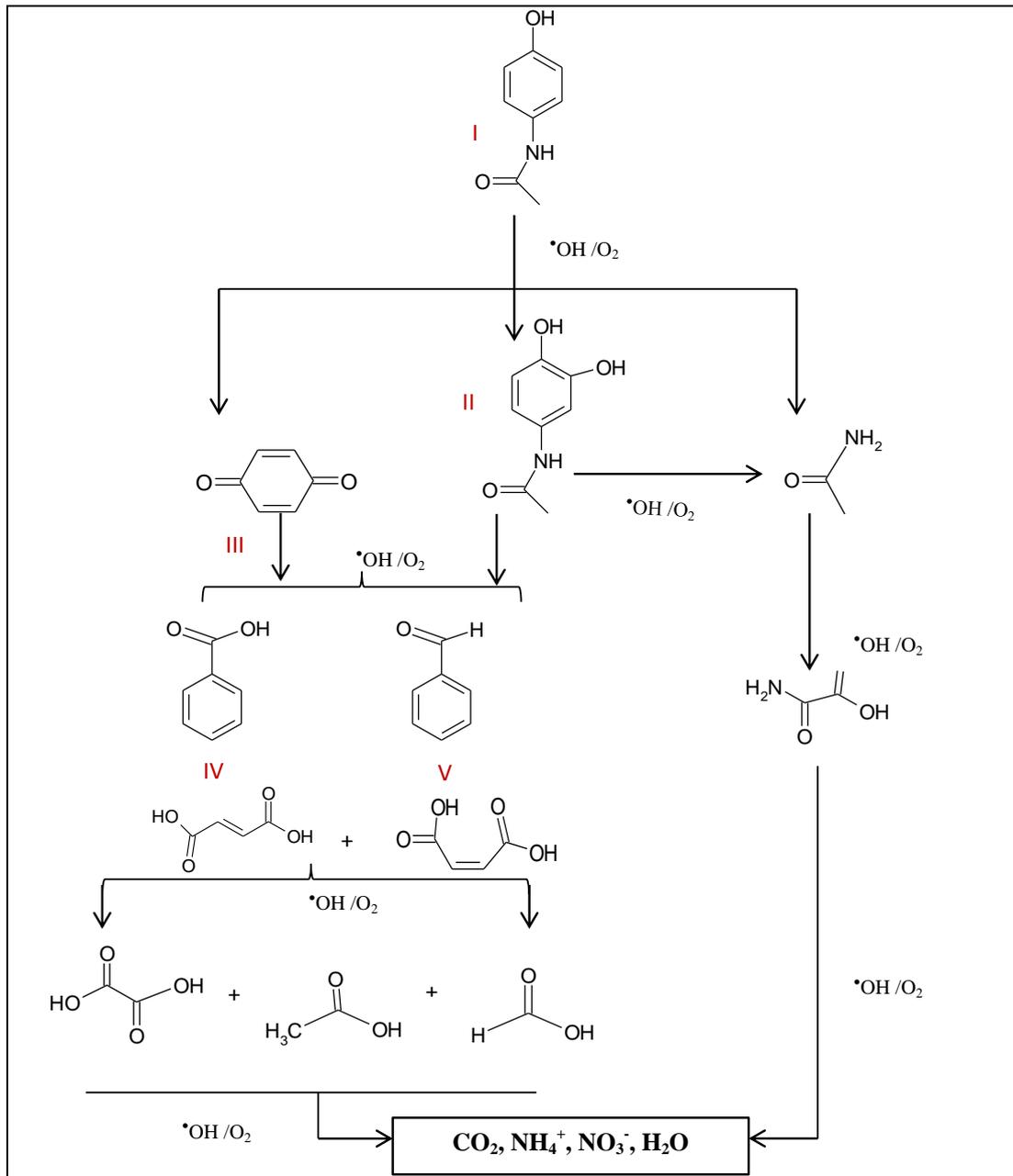
COT (carbone organique total) des solutions initiales et de dégradation ont été analysés par un TOC-L-Shimadzu. Des échantillons ont été acidifiés avec une solution de HCl 1 mM, avant l'injection dans l'appareil. Une courbe d'étalonnage a été établie pour TOC quantitative, en utilisant des normes de phtalate potassium d'hydrogène.

- **Chromatographie Ionique**

Des ions inorganiques (NO_3^- , NH_4^+ , SO_4^{2-}) générés lors de la décomposition ont été identifiés par un dispositif de chromatographie ionique, en utilisant un Dionex ICS-1000 ions basiques, un système de chromatographie en rapport avec un AS4A-SC IonPac (échange d'anions) et CS12 A (échange de cations) 25 cm x colonne 4 mm qui a été thermiquement contrôlée à 35 °C par DS6 détecteur de conductivité à travers un logiciel Chromeleon SE.



Chemin de dégradation de l'AO7 et formules développées des sous-produits de l'acide orange 7



Chemin de dégradation du PCM et formules développées des sous-produits du PCM

Annexe II : Protocole de culture bactérienne

Méthodes

Préparation du milieu de culture

- Prélever 1000 mL d'eau distillée dans une éprouvette graduée.
- Transférer l'eau dans un bécher de 2 litres
- Ajouter les éléments suivants à l'eau distillée, en remuant bien après chaque addition.

1,5 g de chlorure de calcium,

5,5 g de chlorure de magnésium,

6,9 g de sulfate de magnésium,

5 g De peptone,

0,7 g de chlorure de potassium,

28,2 g de chlorure de sodium,

3 g d'extrait de levure,

- Mesurer le pH de la solution et ajuster le à 7,4 avec des solutions de NaOH ou de H_2SO_4
- Diviser la solution en deux parties dont une pour le un milieu liquide et une autre pour un milieu solide à laquelle on doit ajouter d'agar en raison de 15g/L et bien mélanger pour homogénéiser la solution.
- Autoclaver l'ensemble des solutions et tout le matériel non stérile susceptible de contaminer la culture, pendant 20 minutes à 121 ° C (2bars de pression).
- Laisser refroidir la solution à 50-55 ° C et verser dans des boîtes de Pétri stérilisées, en raison de 8 boites pour 250mL.

Réactivation de bactéries lyophilisées

- ✓ Mettre le tube fraîchement pris du congélateur dans de l'eau de robinet pendant 10min
- ✓ Ajouter 5mL de milieu de culture dont la préparation est décrite ci-dessus aux bactéries décongelées.
- ✓ Soumettre le tube sous une agitation pendant 2h à l'incubateur aéré.

Ensemencement

Après réactivation des bactéries lyophilisées, l'ensemencement dans le milieu de culture liquide s'est fait dans des erlenmeyer de 250mL à un taux de 5% soit 1,5mL de solution de bactéries réactivées dans 28,5mM de milieu de culture, ce qui donne un volume final de 30mL de culture bactérienne.

Les 2mL de solution bactérienne restantes ont été ensemencées sur du milieu solide dans 3

boîtes de pétri.

Suivi de la croissance des bactéries par mesure de la densité optique au spectrophotomètre

Mise en marche de l'appareil et choix du programme de mesure de l'absorbance sur l'interface du logiciel ;

Réglage de la longueur d'onde (600nm)

Insertion des deux blancs (échantillons servant de référence) : il s'agit ici du milieu de culture non ensemencé et faire l'auto-zéro.

La phase station de la croissance bactérienne est supposée être atteinte lorsque l'absorbance n'évolue pas.

Extraction des bactéries cultivées

Lorsque la phase stationnaire est atteinte, on prélève 2*20mL pour les centrifuger selon la procédure pratique qui suit :

- ✓ Vérification de l'équilibre des masses à 0,1 près et Mise en marche de la centrifugeuse,
- ✓ Réglage des paramètres dont la température et le nombre de tour par minute qui ne doit pas dépasser le maximum inscrit sur le support des échantillons.
- ✓ Démarrage de la centrifugation et surveillance de l'appareil jusqu'à atteindre le nombre rpm fixé.

Test de la luminescence des bactéries

Après centrifugation, le surnageant constitué du milieu de culture est rejeté et l'on récupère le culot constitué de bactéries, auquel l'on rajoute la solution de reconstitution afin de faire le test à la concentration de culture. Une série de lectures simples ont d'abord été effectuées avant de procéder à un test complet qui avait donné des résultats satisfaisants. En effet, afin de vérifier l'efficacité des bactéries cultivées le test de validation de protocole au Sulfate de Zinc a été effectué. Sachant que la valeur normale du test au sulfate de zinc est :

Sulfate de Zinc: EC50 (15min) = 3-10mg/l

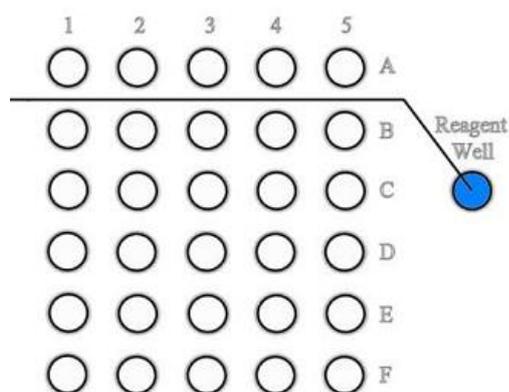
Annexe III : 45% Screening test

1ere étape (spécifique aux échantillons issus de l'electro-Fenton)

- Prélever des échantillons de deux (2) mL (ne pas prélever trop pour éviter l'effet d'augmentation de la concentration des produits dans la solution, ce qui pourrait induire une augmentation de toxicité)
- Ajuster le pH des échantillons à une valeur comprise entre 6,5 et 7,5
- Filtrer avec un filtre à seringue RC 0,2 μm pour enlever le fer précipité

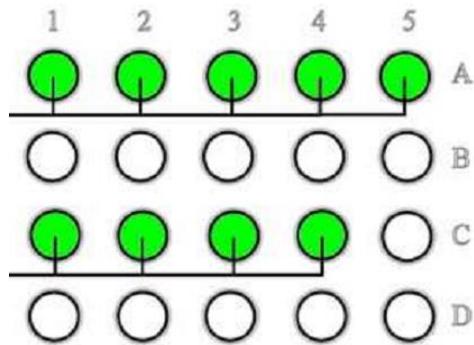
2eme étape

- On dégèle un tube de bactérie pendant 10 min dans un bécher contenant de l'eau de robinet
- Ensuite on ajoute 0,5 mL (500 μL) de solution de réactivation (c'est une solution de NaCl 2% qui a pour but de créer les conditions salines nécessaires aux bactéries) sur les bactéries dégelées. On laisse incuber à 15°C pendant 15 min dans un thermostat
- Puis on ajoute dans le même tube 4,5 mL de la solution de réactivation. Ainsi on aura 5 mL de la solution de suspension de bactéries
- On prend une partie de la solution bactéries et on la met dans un tube Microtox puis on l'insère dans le pré-cool du Microtox à 5°C. on laisse le surplus dans le frigo en attendant la fin du volume contenue dans le pré-cool

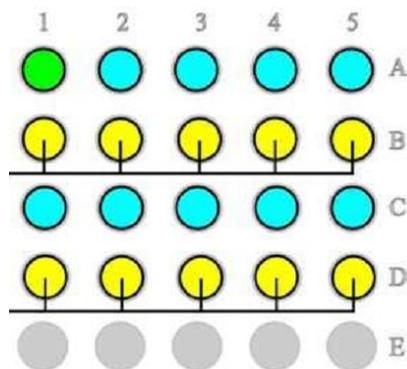


3eme étape

- On prépare les tubes A1 à A5 (et éventuellement C1 à C5 et E1 à E5) de l'incubateur en mettant d'abord 100 μL de solution d'ajustement osmotique (solution de NaCl 22%), ensuite on met 1 mL d'échantillon préparé à l'étape 1 dans chaque tube puis agiter.



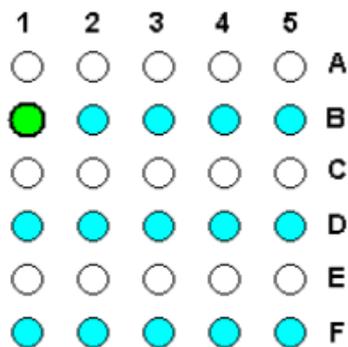
- On prépare les tubes B1 à B5 (et éventuellement D1 à D5 et F1 à F5) de l'incubateur, on y ajoute 100 μ L de la solution de bactéries (la solution de l'étape 2 gardée dans le pré-cool). On laisse incuber pendant 15 min à 15°C.



4eme étape

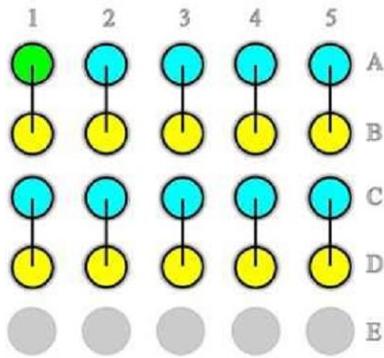
- Après les 15 min, on mesure la luminescence des bactéries seules contenues dans les tubes B (et éventuellement D et E) et l'on imprime la feuille de mesure.

Light Readings: 0 Mins

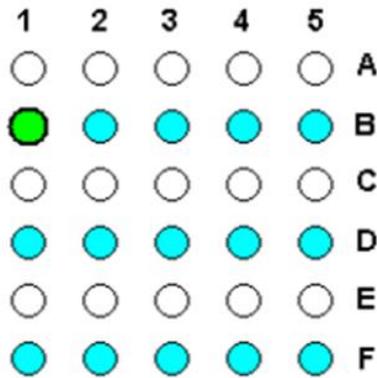


5eme étape

- Après lectures de la luminescence des bactéries seules, on transfère 0,9 mL (900 μ L) des tubes A dans les tubes B (et éventuellement des tubes C dans les tubes D et des tubes E dans les tubes F) et ce de 1 à 5 (avec des embouts de pipettes différents pour éviter toute contamination),



- On mesure ensuite la luminescence des bactéries après 5 min et 15 min (et éventuellement 30 min) de temps de contact. Et l'on imprime la feuille de mesure.



La concentration de l'échantillon dans la solution finale :

Après ajout des 100 μ L de la solution d'ajustement osmotique, la concentration

$$C' = \frac{1000\mu L}{(1000 + 100)\mu L} = 0,909090$$

Dans la solution concentrée à 90,909%, ont été prélevés 900 μ L pour ajouter à 100 μ L de la solution bactérienne, ce qui conduit à une nouvelle concentration de

$$C'' = \frac{900\mu L}{(900 + 100)\mu L} = 0,9$$

Le produit de C' et C'' nous donne la concentration C :

$$C = C' * C'' = 0,90909 * 0,9 * 100 = 81,8\%$$

Blanc (ou échantillon de référence)

Le blanc est une solution qui a la même composition et donc mêmes caractéristiques que les échantillons dont on veut déterminer la toxicité. Il renferme tous les éléments constitutifs des échantillons sauf les éléments présumés causes de la toxicité à évaluer. Son utilisation vise à compenser les erreurs dues aux facteurs susceptibles d'agir sur la valeur de la toxicité intrinsèque des composés mis en évidence des échantillons.

Ainsi celui utilisé dans notre analyse est constitué, pour la solution de 0,1mM d'AO7, de sulfate de fer heptahydraté (FeSO₄-7H₂O) 0,2mM et sulfate de sodium (Na₂SO₄) 50 mM

Préparation des solutions d'ajustement de pH

✓ *L'hydroxyde de sodium (NaOH):*

Quelle quantité de NaOH faut-il prélever pour préparer une solution de molarité 1 ?

$$Cm = CxM$$

Avec Cm la concentration massique qui est recherchée, C la concentration molaire égale à 1 et M la masse molaire qui est égale

$$M(\text{NaOH}) = M(\text{Na}) + M(\text{O}) + M(\text{H}) = 23 + 16 + 1 = 40\text{g/mol}$$

Donc la quantité de NaOH est :

$$Cm = 1\text{mol/L} \times 40\text{g/mol}$$

$$Cm = 40\text{g/L}$$

✓ *L'acide sulfurique (H₂SO₄)*

La quantité à utiliser pour préparer une solution de molarité 1 :

$$Cm = CxM$$

$$M(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2M(\text{H}) + M(\text{S}) + 4M(\text{O})$$

$$M = 2 \times 1 + 32,08 + 4 \times 16 = 98,08\text{g/mol}$$

Donc la quantité de H₂SO₄ est :

$$Cm = 1\text{mol/L} \times 98,08\text{g/mol}$$

$$Cm = 98,08\text{g/L}$$

La quantité d'échantillon à ajuster étant de très faible quantité, le pH peut varier facilement d'un extrême à l'autre. La plus petite goutte de solution d'ajustement que l'on peut prélever peut suffire pour faire varier le pH de 2 à 12. D'où la nécessité de disposer de plusieurs concentrations de la solution d'ajustement. Ainsi, les solutions acide et base sont d'abord préparées à la molarité 4N puis diluées pour obtenir les solutions des molarités suivantes : 2N ; 1N ; 0,5N ; 0,1N ; 0,05N ; 0,02N ; 0,01N ; 0,005N et 0,001N.

La filtration :

Des filtres-seringues de 0,2 μ m d'ouverture de pores sont utilisés pour enlever les hydroxydes de fer qui ont pu se précipiter. Pour éviter de gaspiller trop de filtres qui ont un coût non négligeable, il serait mieux d'utiliser un seul filtre par échantillon. Pour des raisons de gain en temps, l'échantillon peut être filtré juste avant le test de toxicité de sorte à pouvoir mettre directement le filtrat dans les cuvettes du Microtox Analyser, sans avoir à les faire passer dans les cuves de stockage des échantillons.

Calcul du taux d'inhibition I_t (%):

Soient :

- $RLU_{ech}(0)$ la valeur de la luminescence mesurée sur la solution de bactéries avant d'appliquer l'échantillon
- $RLU_{ech}(t)$ la valeur de la luminescence mesurée après une durée t de contact entre la solution de bactéries et l'échantillon avec $t=5$ min, 15 min ou même 30 min souvent.

Nous avons :

$$I(t) (\%) = \left(1 - \frac{RLU_{ech}(t)}{RLU_{ech}(0)}\right) \times 100$$

Mais comme même sans aucune toxicité, la luminescence des bactéries diminue avec le temps et sous l'action des conditions environnementales, il conviendrait alors de compenser les erreurs dues à ces facteurs par la prise en compte de la variabilité de la luminescence $R(t)$ de la solution de bactéries sur laquelle a été appliqué le blanc en lieu et place des échantillons présumés toxiques.

$$R(t) = \frac{RLU_{blanc}(t)}{RLU_{blanc}(0)}$$

NB : $R(t)$ peut être pris égale à 1 si son usage est jugé non opportun

Le taux d'inhibition intrinsèquement imputable à la toxicité des échantillons sera alors :

$$I(t) (\%) = \left(1 - \frac{RLU_{ech}(t)}{R(t) \times RLU_{ech}(0)}\right) \times 100$$

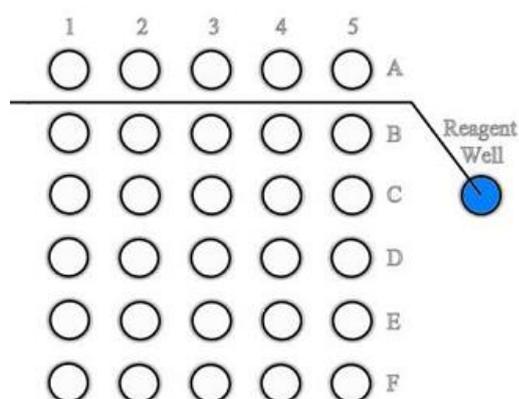
Annexe IV : 81,9% Screening test

1ere étape (spécifique aux échantillons issus de l'electro-Fenton)

- Prélever des échantillons de deux (2) mL (ne pas prélever trop pour éviter l'effet d'augmentation de la concentration des produits dans la solution, ce qui pourrait induire une augmentation de toxicité)
- Ajuster le pH des échantillons à une valeur comprise entre 6,5 et 7,5
- Filtrer avec un filtre à seringue RC 0,2 μm pour enlever le fer précipité

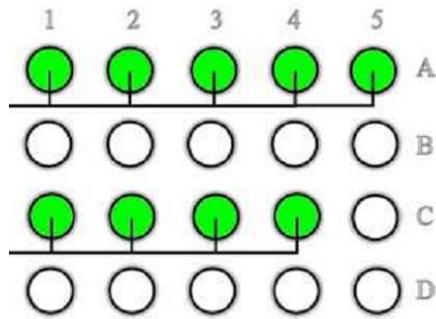
2eme étape

- On dégèle un tube de bactérie pendant 10 min dans un b cher contenant de l'eau de robinet
- Ensuite on ajoute 0,5 mL (500 μL) de solution de réactivation (c'est une solution de NaCl 2% qui a pour but de créer les conditions salines nécessaires aux bactéries) sur les bactéries dégelées. On laisse incuber à 15°C pendant 15 min
- Puis on ajoute dans le même tube 4,5 mL de la solution de réactivation. Ainsi on aura 5 mL de la solution de suspension de bactéries
- On prend une partie de la solution bactéries et on la met dans un tube Microtox puis on l'insère dans le pré-cool du Microtox à 5°C. on laisse le surplus dans le frigo en attendant

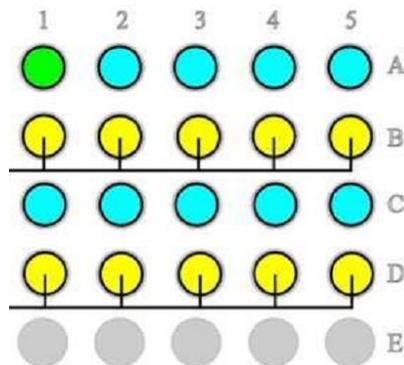


3eme étape

- On prépare les tubes A1 à A5 (et éventuellement C1 à C5 et E1 à E5) de l'incubateur en mettant d'abord 100 μL de solution d'ajustement osmotique (solution de NaCl 22%), ensuite on met 1 mL d'échantillon préparé à l'étape 1 dans chaque tube puis agiter.



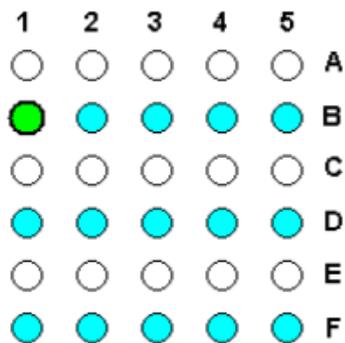
- On prépare les tubes B1 à B5 (et éventuellement D1 à D5 et F1 à F5) de l'incubateur, on y ajoute 400 μL de diluant (solution de NaCl, 2%) et 100 μL de la solution de bactéries (la solution de l'étape 2 gardée dans le pré-cool). On laisse incubé pendant 15 min à 15°C.



4eme étape

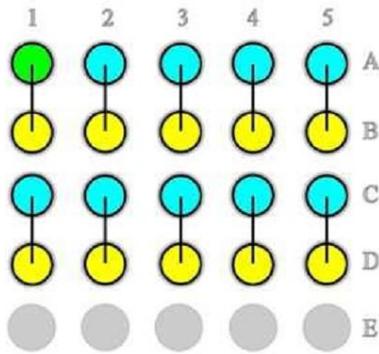
- Après les 15 min, on mesure la luminescence des bactéries seules contenues dans les tubes B (et éventuellement D et E) et l'on imprime la feuille de mesure.

Light Readings: 0 Mins

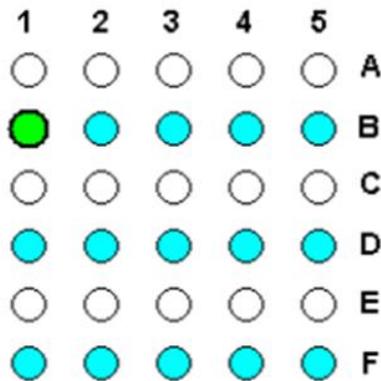


5eme étape

- Après lectures de la luminescence des bactéries seules, on transfère 0,5 mL (500 μL) des tubes A dans les tubes B (et éventuellement des tubes C dans les tubes D et des tubes E dans les tubes F) et ce de 1 à 5 (avec des embouts de pipettes différents pour éviter toute contamination),



- On mesure ensuite la luminescence des bactéries après 5 min et 15 min (et éventuellement 30 min) de temps de contact. Et l'on imprime la feuille de mesure.



La concentration de l'échantillon dans la solution finale :

Après ajout des 100UL de la solution d'ajustement osmotique, la concentration

$$C' = \frac{1000\mu L}{(1000 + 100)\mu L} = 0,909090$$

Dans la solution concentrée à 90,909%, ont été prélevés 500 μ L pour ajouter à 500 μ L de la solution bactérienne et du diluant, ce qui conduit à une nouvelle concentration de

$$C'' = \frac{500\mu L}{(500 + 500)\mu L} = 0,5$$

Le produit de C' et C'' nous donne la concentration C :

$$C = C' * C'' = 0,90909 * 0,5 * 100 = 45,4545\%$$

Le calcul du taux d'inhibition $I_{(t)}$ (%) s'opère de la même manière que pour le 81,9% screening test.