Occurrence et produits de transformation des résidus de médicaments dans l'environnement aquatique (milieu et organismes) par approche ciblée et non-ciblée en spectrométrie de masse

Nancy Ariza Castro

▶ **To cite this version:**

Nancy Ariza Castro. Occurrence et produits de transformation des résidus de médicaments dans l'environnement aquatique (milieu et organismes) par approche ciblée et non-ciblée en spectrométrie de masse. Sciences de la Terre. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTG082 . tel-02542660

HAL Id: tel-02542660
https://theses.hal.science/tel-02542660

Submitted on 14 Apr 2020

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Sciences de l'eau

École doctorale GAIA - Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche HydroSciences Montpellier

Occurrence et produits de transformation des résidus de médicaments dans l'environnement aquatique (milieu et organismes) par approche ciblée et non-ciblée en spectrométrie de masse

Présentée par Nancy ARIZA CASTRO

Le 17 décembre 2019

Sous la direction de Elena GOMEZ et Hélène FENET

Devant le jury composé de

Mme. Farida AKCHA, Chercheur, Ifremer	Rapporteur
M. Régis MOILLERON, Professeur, Université Paris-Est Créteil (UPEC)	Rapporteur
Mme. Catherine PERRIN, Professeur, Université Montpellier	Président du jury
Mme. Floria ROA, Professeur, Instituto Tecnológico de Costa Rica	Membre du jury
Mme. Elena GOMEZ, Professeur, Université Montpellier	Directeur de thèse
Mme. Hélène FENET, Professeur, Université Montpellier	Co-Directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Sciences de l'eau

École doctorale GAIA - Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche HydroSciences Montpellier

Occurrence et produits de transformation des résidus de médicaments dans l'environnement aquatique (milieu et organismes) par approche ciblée et non-ciblée en spectrométrie de masse

Présentée par Nancy ARIZA CASTRO

Le 17 décembre 2019

Sous la direction de Elena GOMEZ et Hélène FENET

Devant le jury composé de

Mme. Farida AKCHA, Chercheur, Ifremer	Raporteur
M. Régis MOILLERON, Professeur, Université Paris-Est Créteil (UPEC)	Raporteur
Mme. Catherine PERRIN, Professeur, Université Montpellier	Président du jury
Mme. Floria ROA, Professeur, Instituto Tecnológico de Costa Rica	Membre du jury
Mme. Elena GOMEZ, Professeur, Université Montpellier	Directeur de thèse
Mme. Hélène FENET, Professeur, Université Montpellier	Co-Directeur de thèse

Résumé

La surveillance des résidus de médicaments (RdM) ces dans les milieux aquatiques a commencé il y a deux dizaines d'années, notamment en Amérique du Nord et Europe. Cependant, dans les pays du Sud, notamment sur le continent africain, les informations scientifiques issues de l'analyse bibliographique restent très rares et ponctuelles. Cette constatation a permis de fixer le premier objectif de cette thèse : renseigner les niveaux de contamination des eaux de surface et des eaux souterraines par les RdM dans une ville africaine soumise à une forte pression anthropique, Yaoundé, au Cameroun, et rechercher les modalités d'exposition de la population humaine en fonction des usages de l'eau dans cette ville. Le développement d'une méthode d'analyse multiresidues de molécules mères et de métabolites nous a permis de diagnostiquer l'état de la pollution des eaux. Des composés appartenant à quatre classes thérapeutiques ont été détectés et quantifiés dans les eaux de surface, montrant des fortes concentrations en anti-inflammatoires non stéroïdiens. Les résultats ont révélé une contamination plus importante en milieu urbain qu'en milieu péri-urbain et une contamination de l'eau souterraine par au moins un médicament. L'étude des sources de cette contamination met en évidence l'absence d'assainissement efficace et la diffusion de la contamination à travers les multiples latrines, drains et fosses septiques. L'utilisation par la population des eaux souterraines comme alternative pour l'eau de consommation génère en conséquence une exposition potentielle des populations aux RdM présents dans ces milieux.

Les écosystèmes aquatiques récepteurs, y compris le milieu marin, sont soumis à une présence de RdM qui génère une exposition chronique des organismes aquatiques à ces substances. Cette exposition se traduit soit par un métabolisme, rarement renseigné pour les espèces marines, ou bien peut favoriser la bioaccumulation et interroge quand aux effets de RdM sur ces organismes non cibles. Le deuxième objectif de la thèse a été d'améliorer les connaissances sur le métabolisme des médicaments sur des organismes non cibles, plus spécifiquement de l'antidépresseur venlafaxine chez *Mytilus galloprovincialis*. Une approche non ciblée appliquée sur les tissus mous de moules exposées et de moules non exposées à la venlafaxine a permis de caractériser par une approche sans a priori le métabolisme de cet antidépresseur chez la moule méditerranéenne. En complément de cette approche non ciblée, une approche ciblée a été conduite afin d'optimiser les méthodes d'extraction tissulaire sur les métabolites renseignés à ce jour chez l'homme et chez la moule. Cette étude a identifié 4 métabolites de phase I. Au delà des métabolites déjà renseignés, deux nouveaux métabolites hydroxylés à différentes positions au niveau de la structure de la venlafaxine ont été identifiés. Un de ces deux hydroxylés est le principal métabolite chez notre organisme d'étude. Nos résultats ont mis en évidence des différences dans le processus de biotransformation entre les humains chez qui le métabolite principal est un métabolite déméthylé (ODV) et les moules, chez qui le métabolite principal est hydroxylé (OH-VEN).

Abstract

Monitoring of drug residues (MDR) in aquatic environments began two decades ago, particularly in North America and Europe. However, in the countries of the South, particularly on the African continent, scientific information from the literature review remains very rare and ad hoc. This observation made it possible to set the first objective of this thesis: to provide information on the levels of surface water and groundwater contamination by MDR in an African city under high anthropogenic pressure, Yaoundé, Cameroon, and to research the modalities of exposure of the human population according to water uses in this city. The development of a multiresidue method for the analysis of parent molecules and metabolites has enabled us to diagnose the state of water pollution. Compounds from four therapeutic classes have been detected and quantified in surface waters, showing high concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs. The results revealed greater contamination in urban areas than in peri-urban areas and groundwater contamination with at least one drug. The study of the sources of this contamination highlights the lack of effective sanitation and the spread of contamination through multiple latrines, drains and septic tanks. The population's use of groundwater as an alternative for drinking water therefore generates potential exposure of populations to the RoW present in these environments.

Receiving aquatic ecosystems, including the marine environment, are subject to the presence of MDR, which generates chronic exposure of aquatic organisms to these substances. This exposure either results in a metabolism, rarely known for marine species, or can promote bioaccumulation and raises questions about the effects of MDR on these non-target organisms. The second objective of the thesis was to improve knowledge of drug metabolism in non-target organisms, specifically venlafaxine antidepressant in *Mytilus galloprovincialis*. A non-targeted approach applied to the soft tissues of mussels exposed and not exposed to venlafaxine made it possible to characterize without a priori the metabolism of this antidepressant in Mediterranean mussels. In addition to this non-targeted approach, a targeted approach was conducted to optimize tissue extraction methods on metabolites reported to date in humans and mussels. This study identified 4 phase I metabolites. In addition to the metabolites already reported, two new hydroxylated metabolites at different positions in the venlafaxine structure have been identified. One of these two hydroxylates is the main metabolite in our study organism. Our results showed differences in the biotransformation process between humans in which the main metabolite is a demethylated metabolite (ODV) and mussels in which the main metabolite is hydroxylated (OH-VEN).

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier Dieu de m'avoir permis de vivre cette aventure avec ma famille, de m'avoir donné la santé, la force dans les moments difficiles et aussi de la joie pendant ces années.

Ce projet professionnel et personnel n'aurait pas été possible sans la participation des différents acteurs.

Un grand merci à mon mari Mario Zamora et à ma fille Daniela Zamora qui m'ont soutenu dès le début de la création de ce projet. Mon amour, merci d'avoir accepté de vivre cette aventure avec moi, pour le dévouement dont tu as fait preuve pour mon bien-être et celui de notre fille. Merci de m'avoir toujours soutenue et d'être resté fort et heureux malgré les difficultés. À ma petite poupée, merci d'avoir été si courageuse et forte face à tous les changements et d'avoir maintenu ce beau sourire qui m'a encouragée à continuer jour après jour.

Je remercie ma famille et mes proches au Costa Rica pour leur soutien. Merci à Ricardo, Cinthya, Marlon, Doña Idania, Don Victor, Gaby et à mes parents Maribell et Berny pour leur encouragement sans faille, leur soutien inconditionnel et leur amour.

Je voudrais également remercier tous mes collègues de la Faculté de Chimie, le personnel administratif du Département des Ressources Humaines et le Bureau des Affaires Internationales de l'Instituto Tecnológico de Costa Rica, pour le financement et le soutien que nous avons reçus durant les différentes étapes de ce projet: installation et séjour en France et retour au Costa Rica.

Je remercie sincèrement mes deux directrices de thèse Elena Gomez et Hélène Fenet qui m'ont accompagnées tout au long de mon travail. Elena, je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet de thèse et pour nos échanges scientifiques qui m'ont permis de m'enrichir un peu plus chaque jour. Hélène, je te remercie également pour tes conseils, ta disponibilité et ton soutien inconditionnel aux moments clés de l'élaboration de ma thèse. Bénéficier de ton recul scientifique a été très enrichissant pour moi.

J'adresse également mes plus sincères remerciements à Frédérique Courant, qui pendant ces 3 années m'a beaucoup appris professionnellement et humainement. Je tenais à exprimer ma gratitude envers toi pour m'avoir épaulée largement au quotidien. Ta pédagogie et ta disponibilité qui m'ont permis de m'améliorer.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du jury pour l'évaluation de cette thèse. Je suis reconnaissante envers Mme Farida Akcha, chercheur à Ifremer de Nantes et M. Régis Moilleron, professeur à l'Université Paris-Est Créteil d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Je suis également très heureuse d'avoir pu compter sur Mme Floria Roa, professeur à l'Instituto Tecnológico de Costa Rica qui a accepté d'être examinatrice de ce travail.

Un grand merci à mon amie Bénédicte pour mille et une chose: son soutien moral, sa technicité, sa disponibilité en restant de longues journées avec moi, ainsi que ses encouragements pendant les moments difficiles. Merci aussi de m'avoir enseigné la culture et la gastronomie françaises et de m'avoir donné ton amitié inconditionnelle.

Je remercie le personnel du laboratoire du Département des Sciences de l'Environnement et Santé publique. Merci, David pour ton soutien logistique, pour les échanges culturels, pour nos conversations sympathiques sur les serpents. Merci également de m'avoir sauvé la vie en récupérant toutes les informations indispensables de mon disque dur externe qui a cessé de fonctionner après être tombé au sol!. Aussi, merci Abdel pour ton soutien logistique, pour m'avoir permis d'en savoir plus sur ta culture et pour les pause-café gourmandes avec thés à la menthe et crêpes!. Merci, également à Mireille pour nos conversations amicales, pour avoir partagé avec moi des expériences théâtrales et pour ton soutien pendant ces années et surtout le jour où j'ai déposé ma thèse à l'école doctorale. Merci Nicolas, Myriam et Aurélie pour partager des pause-café très conviviales.

J'adresse également mes remerciements à tous les stagiaires, doctorants et post-doctorants avec qui j'ai eu l'occasion de partager des moments très agréables durant ces années passées au laboratoire Marina, Bénilde, Thibaut, Cylia, Rayana, Chan, Gaëlle, Juan, Andrés, Adrien Mónica et Fatmé.

Je remercie Céline pour son aide au laboratoire et ses conseils techniques. Je remercie également Perrine Branchet (IMT Mines Amès) pour avoir partagé avec moi des moments très productifs et émouvants lors de la co-rédaction de l'article scientifique sur l'occurrence des produits pharmaceutiques.

Publication et communication internationales

Publications

Branchet, P., Ariza Castro, N., Fenet, H., Gomez, E., Courant, F., Sebag, D., Gardon, J., Jourdan, C., Ngounou Ngatcha, B., Kengne, I., Cadot, E., Gonzalez, C., 2019. Anthropic impacts on Sub-Saharan urban water resources through their pharmaceutical contamination (Yaoundé Center Region, Cameroon). Science of the Total Environment. 660, 886–898.

Ariza-Castro, N., Courant, F., Dumas, T., Marion, B., Fenet, H., Gomez, E. Metabolism of Venlafaxine in the Mediterranean Mussel (*Mytilus Galloprovincialis*): Combinations of Targeted and Non-Targeted Approaches. A soumettre à Science of the Total Environment

Communications orales

Ariza Castro, N., Courant, F., Marion, B., Gomez, E., Fenet, H. Study of the metabolism of venlafaxine in the mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*); combination of targeted and non-targeted approaches. 42nd CIESM Congress (Portugal) 7-11 Octobre 2019.

Ariza Castro, N., Courant, F., Fenet, H., Gomez, E. Développement d'une méthode multi-résidus d'analyse des médicaments dans les eux de surface. Journée des doctorants IM2E, Montpellier, 22-23 mars 2018.

Communications par affiche

Ariza Castro, N., Courant, F., Marion, B., Gomez, E., Fenet, H. Study of the metabolism of venlafaxine in the mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*); combination of targeted and non-targeted approaches. 42nd CIESM Congress (Portugal) 7-11 Octobre 2019.

Sommaire

Sommaire **8**
Liste des Tableaux **10**
Liste des Figures **11**
Liste des Abréviations **12**
Lexique **14**
Introduction générale **15**
Chapitre 1: État actuel de la contamination de l'environnement aquatique par les médicaments **19**
1. Les médicaments **20**
1.1 Classification et utilisation thérapeutique des médicaments 20
1.2 Métabolisation des médicaments 21
2. Apport de résidus de médicaments (RdM) à usage humain à l'environnement aquatique **24**
2.1 Les eaux usées: source principale de la contamination par les RdM de l'environnement aquatique. 26
2.1.1 Élimination des RdM dans les stations d'épuration (STEP) conventionnelles 26
2.1.2 Occurrence des RdM dans les STEP 27
2.2 Autres sources potentielles de contamination par les RdM dans l'environnement aquatique 31
3. Le transfert et la transformation des RdM dans l'environnement aquatique par des processus abiotiques et biotiques **31**
3.1 Des processus abiotiques 32
3.1.1 L'adsorption 32
3.1.2 La photodégradation 32
3.2. Des procesus biotiques: la biodégradabilité 33
4. Occurrence des RdM dans les eaux de surface et les eaux souterraines **34**
4.1 Les eaux de surface 34
4.2 Les eaux souterraines 42
5. Bioaccumulation et occurrence des RdM dans le biote **45**
6. Conclusions associées à la présence des RdM dans l'environnement aquatique et perspectives de recherche **49**
Chapitre 2: Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse: analyse des résidus de médicaments et des métabolites par approche ciblée et non ciblée **51**
1. Introduction **52**
2. Approche ciblée **52**
2.1 Généralites 52
2.1.1 Préparation des échantillons: prétraitement et extraction/purification 53
2.1.2 Analyse: séparation et détection 54
2.2 Développement analytique 59
2.2.1 Choix des molécules 60
2.2.2 L'optimisation de l'extraction/purification 60
2.2.2.1 Méthode multi-résidus dans des matrices aqueuses 60

2.2.2.2 Méthode venlafaxine et ses métabolites dans des tissus de la moule 64
2.2.2.3 Méthode venlafaxine et ses métabolites dans l'eau de mer. 72
2.2.3 L'optimisation de la séparation chromatographique 73
2.2.3.1 Méthode multi-résidus 73
2.2.3.2 Méthode venlafaxine et ses métabolites 76
2.2.4 L'optimisation de la mesure spectrométrique de masse 76
2.2.5 La validation des protocoles retenus 79
2.2.5.1 La linéarité 80
2.2.5.2 Les limites de détection et de quantification 80
2.2.5.3 Les rendements et les effets matrice 80
3. Approche non ciblée 82
3.1 Généralites 82
3.2 Développement de l'analyse non ciblé dans les tissus de la moule 84
3.2.1 Design expérimental 84
3.2.2 L'acquisition des données 85
3.2.3 Stratégie de recherche de métabolites 85
Chapitre 3: Diagnostic de la contamination des eaux superficielles et souterraines par les médicaments dans la région de Yaoundé (Cameroun) par approche ciblée. 88
1. Antropic impacts on Sub-Saharan urban water resources through their pharmaceutical contmination (Yaoundé, Center Region, Cameroon) 89
1.1 Contexte 89
1.2 Objectif et principaux résultats 89
Chapitre 4: Caractérisation du métabolisme de la venlafaxine chez la moule (Mytilus Galloprovincialis) 125
1. Metabolism of Venlafaxine in the Mediterranean Mussel (Mytilus Galloprovincialis): Combinations of Targeted and Non-Targeted Approaches 126
1.1 Contexte 126
1.2 Objectif et principaux résultats 126
Conclusion générale et perspectives 145
Références bibliographiques 149

Liste des Tableaux

Tableau 1. Exemples de code ATC, classes thérapeutiques, structures chimiques, formules brutes et propriétés et usage thérapeutique de quelques médicaments 22
Tableau 2. Les niveaux de concentration en ug/L [min-max] de RdM en entrées et sorties de STEP sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe) 29
Tableau 3. Concentrations en ng/L de RdM dans les eaux superficielles sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe) 35
Tableau 4. Concentrations en ng/L de RdM dans les eaux souterraines sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe) 43
Tableau 5. Concentrations les plus élevées de RdM signalées dans les organismes marins dans la littérature (ng/g poids sec (dw en anglais) ou poids humide* (ww en anglais)) 47
Tableau 6. Méthodes d'analyse utiliées pour mesurer des produtis pharmaceutiques dans les eaux de surface et les tissus des organismes marins tels que les bivalves. 55
Tableau 7. Classe thérapeutique, CAS, structure chimique, formule brute, pKa et log Kow des médicaments et des métabolites sélectionnés. 61
Tableau 8. Rendements bruts et Effets matrice des molécules dans l'application du protocole d'extraction/purification dans les échantillons d'eau milliQ 64
Tableau 9. Résumé du protocole QuEChERS selon Martínez Bueno et al. (2014) adapté à une prise d'essai de 0,5 g 67
Tableau 10. Rendements bruts et effets matrice obtenus dans l'application du protocole d'extraction/purification de la venlafaxine et ses métabolites dans les tissus de la moule. 72
Tableau 11. Rendements bruts et effets matrice obtenus dans l'application du protocole d'extraction/purification de la venlafaxine et ses métabolites dans les eaux de mer utilisées dans l'exposition de la moule. 73
Tableau 12. Valeurs moyennes pour les paramètres de la MS déterminées pour les différentes molécules selon la méthode ciblée. 77
Tableau 13. Mode d'ionisation et ions de quantification et de confirmation retenues pour chaque molécule étudiée dans l'analyseur Orbitrap. 78
Tableau 14. Résumé des valeurs obtenues pour chacun des analytes selon les critères d'évaluation: linéarité, rendements bruts, effet matrice, limite de détection et de quantification de la méthode multi-résidus de médicaments 81
Tableau 15. Résumé des valeurs obtenues pour chacun des analytes selon les critères d'évaluation: linéarité, rendements bruts, effet matrice, limite de détection et de quantification de la méthode 82

Liste des Figures

Figure 1. Niveaux de la méthode ATC proposée par l'OMS: exemple de l'antiépileptique carbamazépine 20
Figure 2. Schéma du métabolisme de la venlafaxine chez l'homme 23
Figure 3. Schéma des différentes sources d'oxazépam. 24
Figure 4. Voies d'introduction de résidus de médicaments d'usage humain dans l'environnement aquatique. 25
Figure 5. Tests realisés et protocole définitif d'extraction de la venlafaxine et ses métabolites dans les tissus de la moule. 65
Figure 6. Types d'interactions présentes dans les cartouches OASIS HLB et MCX 66
Figure 7. Conditions générales pour l'application du protocole d'extraction/purification: comparaison des cartouches HLB et MCX 66
Figure 8. Rendements bruts et effets matrice obtenus dans la première expérience: comparaison entre les techniques SPE avec les cartouches MCX et HLB et QuEChERS 68
Figure 9. Conditions générales d'optimisation pour améliorer l'extraction des glucuronides. 69
Figure 10. Rendements bruts et effets matrice obtenus dans les tests d'extraction à basse température, de purification avec l'alumine et Z-sep+ (2 g) et de la cartouche SPE OASIS MCX. 70
Figure 11. Rendements bruts et effets matrice obtenus dans les tests avec l'augmentation de la prise d'essai (à 1 g) et de la quantité du support de la cartouche MCX (500 mg): comparaison avec la condition sélectionnée dans la première expérience. 71
Figure 12. Caractéristiques des colonnes chromatographiques utilisées. 74
Figure 13. Exemples de chromatogrammes obtenus pour quatre molécules en mode d'ionisation négatif en utilisant trois colonnes C18 différentes: Nucleoshell, Zorbax et ACE 75
Figure 14. Chromatogrammes obtenus pour l'ibuprofène en utilisant la phase mobile avec et sans l'acide formique. 75
Figure 15. Chromatogrammes obtenus pour 6 molécules (acetaminophène, 1-hydroxyibuprofène, ibuprofène, aténolol, ofloxacine et carbamzépine) dans deux modes d'ionisation: positif et négatif avec l'analyseur Orbitrap. 76
Figure 16. Exemples de chromatogrammes obtenus pour les molécules aténolol, codéine 6βD-glucuronide, codéine, norbuprénorphine glucuronide, ofloxacine, ciprofloxacine, buprénorphine, venlafaxine, norbuprénorphine, oxazepam glcuronide, carbamazépine et diazepam en mode d'ionisation positif en utilisant leurs ions de quantification et énergies de collision définies pour cette étude. 79
Figure 17. Niveaux de confiance proposés pour l'identification dans l'analyse non ciblée par HRMS. 83
Figure 18. Exemples d'EIC de deux signaux potentiels à être des métabolites 86
Figure 19. Exemple d'évaluation de temps de rétention et forme du pic entre les signaux suspects et le signal de la VEN 86

Liste des Abréviations

ACN. Acétonitrile

AHFS. American Society of Health System Pharmacists

AINS. Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

ATC. Anatomical Therapeutic Chemical

DCE. Directive Cadre sur l'Eau

DCSMM. Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin

D_{ow}. Distribution ratio octanol-water (coefficient apparent de distribution octanol-eau qui permet de tenir compte les formes neutres et ionisées)

EIC. Extracted Ion Chromatograms (Chromatogrammes d'ions extraits)

EPA. Environmental ProtectionAgency (Agence de Protection de l'Environnement)

EphMRA. European Pharmaceutical Marketing Research Association (Association Européenne de Recherche en Marketing Pharmaceutique)

ESA-CCI. European Spatial Agency-Climate Change Initiative (Agence Spatiale Européenne-Initiative sur le Changement Climatique)

ESI. ElectroSpray Ionization (électronébulisation)

HCD. High energy collision dissociation (Dissociation par Collision à Haute Énergie)

HESI. Heated electrospray ionization (ionisation par électrospray chauffée)

HPLC. High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide haute performance)

HRMS. High Resolution Mass Spectrometry (spectrométrie de masse haute résolution)

Kow. Coefficient de distribution octanol-eau

LC. Liquid Chromatography (chromatographie liquide)

LC-MS. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse)

LC-MS/MS. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem)

LOD. Limit of detection (Limite de détection)

LOQ. Limit of quantification (Limite de quantification)

MDL. Method Detection Limit (Limite de détection de la méthode)

MeOH. Méthanol

MQL. Method Quantification Limit (Limite de quantification de la méthode)

MS. Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse)

MS^2. Tandem Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse en tandem)

MW. Molecular weight (masse moléculaire)

NDV. N-desmethylvenlafaxine

NNDDODV. N,N-didesmethyl-O-desmethylvenlafaxine

NNDDV. N,N-didesmethylvenlafaxine

NODDV. N,O-didesmethylvenlafaxine

ODV. O-desmethylvenlafaxine

OMS. Organisation Mondiale de la Santé

PhACs. Pharmaceutically active compunds

PLE. Pressurized Liquid Extraction (extraction par liquide pressurisé)

Q-Orbitrap. Quadripôle-Orbitrap

QqQ. Triple quadripôle

Q-ToF. Quadripôle-temps de vol

QuEChERS. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

RdM. Résidus de médicaments

SPE. Solid Phase Extraction (Extraction en phase solide)

STEP. Station de Traitement des Eaux Usées

VEN. Venlafaxine

Lexique

Contaminant

Elément ou substance contenu dans l'environnement (air, eau, sédiments...) en quantité anormale (cet à dire non naturelle) par rapport au bruit de fond naturel (Cabane, 2012).

Métabolites

Molécules issues du métabolisme des médicaments dans un organisme vivant. Ces molécules peuvet être actives et conserver un effet pharmacologique, inactives, réactives ou toxiques (Académie Nationale de Pharmacie, 2019).

Polluant

Substance ou procesus de nature physique, chimique ou biologique introduits par l'homme et susceptibles de contaminer les divers écosystèmes terrestres, limniques (relatif à l'ensemble des eaux continentales) ou marins (Cabane, 2012).

Produit de transformation ou dégradation

Espèce chimique issue de la transformation du médicament ou de ses métabolites par des réactions physico-chimiques non biologiques (photo-transformation, chimio-transformation, entre autres) (Académie Nationale de Pharmacie, 2019).

Résidus de médicaments (RdM)

Ensemble des molécules (molécules parents, métabolites et produits de transformation) issues de la production, de l'usage thérapeutique ou de l'élimination des médicaments destinés à usage thèrapeutique humain ou animal (Académie Nationale de Pharmacie, 2019)

Introduction générale

L'eau est à la base du développement. Des facteurs tels que la croissance démographique, l'urbanisation et le développement économique génèrent une forte demande de ressources en eau pour l'agriculture, l'industrie et l'énergie, contribuant ainsi à amplifier la pression actuelle sur les ressources en eau.

Les activités humaines génèrent le rejet de polluants anthropiques qui contaminent les eaux de surface et souterraines. Parmi les contaminants anthropiques, les produits pharmaceutiques sont considérés comme contaminants ubiquitaires des milieux aquatiques (Björlenius et al., 2018; Deo, 2014; Sui et al., 2015). Ils s'agit des molécules biologiquement actives, conçues pour agir sur des cibles biologiques précises et comprennent une large variété de substances à usage humain et vétérinaire (Académie Nationale de Pharmacie, 2019). Ceux utilisés chez l'homme, une fois consommés, métabolisés et excrétés sont rejetés dans les eaux usées domestiques. Ces rejets ainsi que les rejets hospitaliers et industriels des usines de production pharmaceutique rejoignent la station d'épuration (STEP), quand elles existent, pour être traités (Ebele et al., 2017). Cependant, les stations d'épuration les plus répandues, basées sur un traitement biologique, ne sont pas adaptées pour traiter ce mélange complexe de substances (contenant des molécules parentes, des métabolites et des produits de dégradation) de caractéristiques physico-chimiques très variées (Margot et al., 2015). En conséquence, nombre de ces substances sont finalement déversées dans les eaux superficielles. Ainsi, les rejets d'eaux usées (traitées et non traitées) sont considérés comme la voie principale de la contamination des milieux aquatiques par les résidus de médicaments (RdM) à usage humain. D'autres voies de contamination par les RdM moins significatives correspondent à la contamination des sols due aux sites d'enfouissement, à l'épandage de boues et à l'utilisation d'eaux usées traitées provenant des STEP pour l'irrigation. Les RdM peuvent rejoindre les eaux superficielles par le ruissellement et les eaux souterraines par l'infiltration (Ebele et al., 2017; Li, 2014).

Une fois dans l'environnement, les RdM peuvent subir des processus de transformation abiotiques et biotiques, dépendants de leurs propriétés physico-chimiques et des conditions environnementales (Baena-nogueras et al., 2017; Kosjek et al., 2012; Yang et al., 2011). Malgré ces processus d'atténuation naturels, les résidus de médicaments continuent à être détectés dans les milieux aquatiques à des concentrations pouvant générer des effets délétères sur les organismes aquatiques et exposant de façon indirecte les populations humaines à ces composés.

Grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes analytiques permettant de mesurer des concentrations inférieures au ng/L (Alvarez-Muñoz et al., 2015b; Björlenius et al., 2018; Brieudes et al., 2017), de nombreuses études ont déterminé l'occurrence, a niveau de traces (ng/L), des RdM dans les eaux continentales en Europe et en Amérique du Nord (Hughes et al., 2013). Cependant, dans les pays du Sud, notamment sur le continent africain, peu d'information est disponible (Fekadu et al., 2019), ce qui justifie de poursuivre les efforts pour renseigner l'état de contamination des milieux aquatiques par les RdM dans les conditions propres à ces pays. En effet, les conditions d'accès aux

médicaments et leurs usages diffèrent de ceux renseignés en Europe et en Amérique du Nord, tout comme les systèmes de distribution d'eau potable et de collecte (ou de non collecte) des eaux usées. L'étude des niveaux de contamination dans des situations hydrologiques locales prend alors tout son sens car la pression exercée sur les eaux de surface et souterraines peut être très élevée.

Il convient de noter que les études en milieu marin sont les moins nombreuses; l'argument souvent évoqué étant une probable faible concentration due à la dilution dans ce milieu dès les zones côtières (Maruya et al., 2012). Cependant, ce milieu est exposé aux RdM à travers: 1) l'urbanisation des zones côtières, 2) les sorties de STEP, dans le cas des émissaires en mer (Fenet et al., 2014), 3) les activités maritimes et 4) les apports des bassins versants. Quelques travaux disponibles ont toutefois permis de mettre en évidence que les médicaments sont présents dans ce milieu à des concentrations allant de quelques nanogrammes par litre à quelques microgrammes par litre (Arpin-Pont et al., 2016). Cela pose la question de l'exposition et des risques associés aux ds résidus de médicaments et de leurs produits de transformation dans les organismes marins.

A fin de protéger les milieux aquatiques, quelques textes réglementaires ont été introduit en Europe et aux Etats Unis. La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) de l'Union Européenne, dans son rapport "Directive 2013/39/EU", a intégré dans sa première "liste de surveillance" le diclofénac, le 17-β-estradiol, le 17-α-ethinylestradiol et 3 macrolides afin de recueillir des données pour faciliter la détermination des mesures appropriées pour traiter le risque présenté par ces substances (Collado et al., 2014; Communauté Européenne, 2013). Cette liste de vigilance a été revue en Juillet 2018. Le diclofénac a été retiré et deux antibiotiques ont été ajoutés (amoxiciline et ciprofloxacine) (Académie Nationale de Pharmacie, 2019). De son côté, l'arrêté du 7 août 2015, modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010, spécifique à la France, intègre dans sa liste de substances pertinentes à surveiller dans les eaux de surface, les résidus de médicaments suivants: la carbamazépine et un des ses métabolites (carbamazépine époxyde), l'ibuprofène, le kétoprofène, l'acétaminophène, le sulfaméthoxazole, l'oxazépam et le diclofénac. Aux Etats Unis, l'Environmental Protection Agency (EPA), en tant qu'organisme de réglementation de la pollution des eaux usées et de l'eau potable aux États-Unis, a ajouté à la liste des candidats aux contaminants de l'eau potable certains résidus de médicaments (RdM) comme l'érythromycine, la nitroglycérine, la quinoléine, l'éthinylestradiol et autres hormones utilisées dans les préparations pharmaceutiques. Concernant le milieu marin, des initiatives telles que la Directive Cadre "stratégie pour le milieu marin" (DCSMM, 2008/56/CE) et la Convention pour la protection de l'environnement marin de l'Atlantique du Nord-Est (ou Convention OSPAR) ont des objectifs communs pour la protection ou la restauration des écosystèmes marins. Toutefois, seule cette dernière initiative a inclus quelques produits pharmaceutiques dans sa liste de surveillance. Malgré les efforts d'acquisition des données concernant l'occurrence et les effets des résidus de médicaments dans l'environnement, l'intégration de ces composés dans les différents textes réglementaires reste limitée et plus parcellaire en milieu marin

La présence constante de résidus de médicaments dans le milieu aquatique génère une exposition chronique dans les écosystèmes récepteurs. L'exposition continue des organismes aquatiques à ces substances peut favoriser leur bioaccumulation (Howard et Muir, 2011) et interroge quant à leurs

impacts sur ces organismes non ciblés. La majorité des études s'intéressent à la détection et la quantification des résidus de médicaments accumulés dans les organismes d'eau douce (Du et al., 2012 ; Gelsleichter and Szabo, 2013 ; Liu et al., 2015), tandis que dans les organismes marins, les informations disponibles restent limitées. Quelques travaux ont mis en évidence l'accumulation de molécules mères et de leurs métabolites dans les tissus des organismes marins (Pazdro et al., 2015). Cependant, peu d'études permettent de déterminer si l'origine de ces composés est le résultat d'une absorption directe ou du métabolisme de l'organisme marin. La caractérisation du métabolisme des produits pharmaceutiques dans les organismes marins nécessite la réalisation d'expositions en conditions contrôlées en laboratoire. Les profils métaboliques obtenus à partir de l'analyse des organismes exposés et non exposés au(x) produit(s) pharmaceutique(s) permettent de mettre en évidence des métabolites potentiels chez les organismes (Jeon et al., 2013). L'application d'une approche non ciblée permet d'accéder à l'élucidation des structures de ces types de composés qui n'étaient pas préalablement ciblées (Bonnefille et al., 2017). L'amélioration des équipements de laboratoire pour l'acquisition de données et l'évolution des outils informatiques pour le traitement des données rendent cette approche prometteuse dans ce domaine.

Compte tenu de ce qui précède, les objectifs de ce travail de thèse sont: 1) renseigner les niveaux de contamination des eaux de surface et des eaux souterraines par les résidus de médicaments dans une ville africaine soumise à une forte pression anthrophique et de rechercher les modalités d'exposition indirecte des populations humaines en fonction des usages de l'eau. Ce travail a été réaliser dans la ville africaine Yaoundé, au Cameroun et 2) d'améliorer les connaissances sur le métabolisme des médicaments, notamment l'antidépresseur venlafaxine dans un organisme marin, la moule afin d'identifier des métabolites qui pourraient être impliqués dans des effets qui pourraient être observés. La problématique effet n'est pas abordée dans ce projet de thèse.

Pour répondre au **premier objectif**, nous avons développé une méthode d'analyse ciblée qui comprend des produits pharmaceutiques et des métabolites appartenant à huit classes thérapeutiques dans des matrices aqueuses pour l'appliquer à l'étude de la contamination des eaux de surface et souterraines de la ville de Yaoundé, au Cameroun. En effet, le régime pluviométrique du Cameroun, la densité humaine dans Yaoundé, le faible développement des réseaux d'assainissement de la ville et la proximité de la nappe permettant l'accès à l'eau de consommation en font un site d'étude de choix pour comprendre le transfert de la contamination par les produits pharmaceutiques.

Pour répondre au **deuxième objectif**, nous avons développé une approche non ciblée afin de caractériser sans a priori le métabolisme de l'antidépresseur venlafaxine chez la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*. La venlafaxine est un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, ce qui pourrait générer des effets délétères chez la moule, comme cela a déjà été montré pour l'antidépresseur fluoxétine, un inhibiteur de la recapture de sérotonine (Hazelton et al., 2013 ; Lazzara et al., 2012). Des études conduites in situ ont mis en évidence la contamination de l'eau et de cet organisme par la venlafaxine et quelques uns de ses métabolites. Cependant, seuls quelques métabolites connus chez l'homme disposant de standards analytiques ont

été étudiés à ce jour. L'étude en laboratoire du métabolisme par analyse non ciblée permettrait de déterminer les métabolites produits par *M. galloprovincialis* exposé à une faible concentration de venlafaxine et la recherche de métabolites jusqu'ici non renseignés.

Le premier chapitre de cette thèse dresse un état de l'art non exhaustif sur les sources, les transferts et l'occurrence des résidus de médicaments dans l'environnement aquatique avec une emphase particulière sur les milieux aquatiques africains et les organismes marins, les moules.

Le chapitre 2 comprend deux parties. Une première partie est consacrée à l'état des lieux non exhaustif sur les développements méthodologiques ciblés qui ont été mis en place pour déterminer et quantifier des résidus de médicaments et leurs métabolites dans l'environnement aquatique (milieu et organismes), suivie de la démarche expérimentale appliquée. La deuxième partie de ce chapitre porte également un état des lieux non exhaustif concernant l'approche non ciblée ainsi que la démarche expérimentale mise en oeuvre.

Le chapitre 3 se focalise sur l'application de la méthode ciblée développée dans les matrices aqueuses de Yaoundé (Cameroun), avec le but de générer le premier diagnostic de pollution des rivières et des eaux souterraines par les résidus de médicaments et de rechercher les modalités d'exposition indirecte des populations humaines en fonction des usages de l'eau. Ce chapitre est rédigé sous la forme d'un article scientifique : "Antropic impacts on Sub-Saharan urban water resources through their pharmaceutical contamination (Yaoundé, Center Region, Cameroon)".

Le chapitre 4 est consacré à l'application d'une approche non ciblée pour caractériser la venlafaxine et ses métabolites (en complément d'une approche ciblée) chez la moule méditerranéenne. Aussi, ce chapitre est rédigé sous la forme d'un article scientifique : "Metabolism of Venlafaxine in the Mediterranean Mussel (*Mytilus Galloprovincialis*) : combinations of targeted and non-targeted approaches".

Finalement, le chapitre 5 est consacré aux conclusions et perspectives de ces travaux

Chapitre 1: État actuel de la contamination de l'environnement aquatique par les médicaments

1. Les médicaments

1.1 Classification et utilisation thérapeutique des médicaments

Selon le code français de la Santé publique, un médicament est: « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique »

Les médicaments peuvent être classés selon la nomenclature chimique, la forme galénique, la classe thérapeutique, etc. Parmi les méthodologies de classification se trouvent celles établies par: l'American Society of Health-System Pharmacists (classification pharmacologique et thérapeutique AHFS), l'European Pharmaceutical Marketing Research Association (EphMRA) et par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) (classification Anatomical Therapeutic Chemical: ATC), cette dernière étant la plus utilisée (Abou-atmé et al., 2006; Tollier et al., 2005). La classification ATC presente cinq niveaux (Fig. 1) parmi lesquels se trouve la classe thérapeutique.

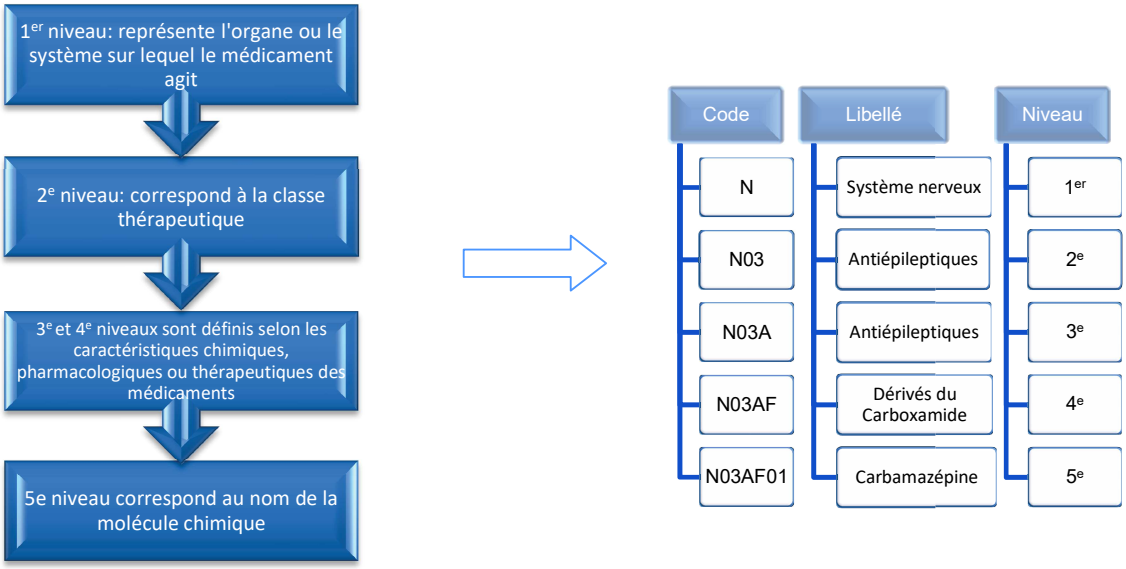


Figure 1. Niveaux de la méthode ATC proposée par l'OMS: exemple de l'antiépileptique carbamazépine

En 1970, l'OMS crée une liste avec "les médicaments essentiels" pour prendre en considération les besoins essentiels dans les pays du tiers monde. Parallèlement, cette organisation internationale a incité les pays développés à établir leur propre liste. L'OMS, à l'heure actuelle, recense 117 pays ayant une liste. Parmi ceux-ci, il y a des membres de l'Union Européenne (la Bulgarie, la Slovaquie, la Suède entre autres), des pays africains (le Cameroun, l'Ethiopie, l'Egypte, entre autres), des pays

d'Océanie (le Kiribi et les Iles Marshall et Salomon entre autres), des pays asiatiques (le Viêt Nam, la Thaïlande, la Chine entre autres), des pays de l'Amérique du Sud (l'Argentine, la Bolivie, le Brésil entre autres), trois pays d'Amérique Centrale (le Salvador, l'Honduras et le Nicaragua) et seulement le Mexique comme pays d'Amérique du Nord (WHO, 2013). En 2017, la liste comporte 433 médicaments jugés essentiels pour répondre aux besoins de santé publique les plus importants au monde. Plusieurs classes thérapeutiques ont été considérées dans la liste de médicaments essentiels. Des exemples sont montrés dans le tableau 1.

1.2 Métabolisation des médicaments

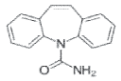
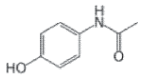
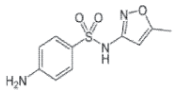
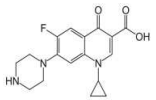
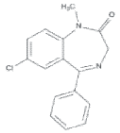
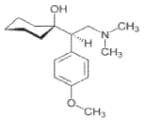
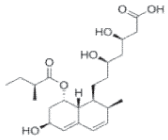
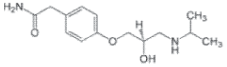
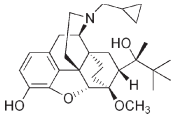
Au cours de leur usage thérapeutique, les médicaments suivent différentes étapes dans l'organisme. Quatre étapes sont identifiées: l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination. L'étape d'absorption est le mécanisme par lequel le médicament passe de son site d'administration à la circulation générale et pour cela, il devra traverser des membranes cellulaires. Une fois la circulation sanguine atteinte, le médicament va se répartir dans des tissus et des organes. En fonction de leurs caractéristiques chimiques, les médicaments peuvent ou non subir des transformations, afin de faciliter leur élimination par la voie rénale ou la voie biliaire (Lüllmann et al., 2003).

Les transformations sont principalement effectuées par réactions enzymatiques avec la finalité de rendre la molécule plus hydrophile. Elles conduisent à la détoxication et la perte d'activité de la molécule. Cependant, dans certains cas, les métabolites sont pharmacologiquement actifs, responsables d'actions pharmacologiques (Kang et al., 2010).

Un médicament peut être métabolisé dans au sein de différents tissus: les poumons, les reins, l'intestin ou encore le foie, lieu principal de ces transformations. Classiquement deux types de transformations sont distinguées: Phase I et Phase II, lesquelles peuvent être séquentielles ou indépendantes. Un métabolite assez hydrosoluble après la phase I peut être excrété ou il peut subir également une réaction de phase II. Des réactions d'oxydation (prioritairement), de réduction et d'hydrolyse constituent la phase I qui conduit à la formation de métabolites polaires avec des groupements fonctionnels tels que des hydroxyles (-OH), des amines ($-NH_2$), des carboxyles (-COOH) entre autres. Si les métabolites de la phase I sont suffisamment polaires, ils peuvent être facilement éliminés. Cependant, la plupart des produits de la phase I ne sont pas éliminés rapidement et subissent ensuite une réaction pour former des conjugués. C'est la réaction de phase II. Les réactions de conjugaison résultent en un transfert de groupements polaires sur la molécule comme la glycine (glycoconjugaison), le sulfate (sulfoconjugaison), des radicaux (méthyl, acétyl, entre autres), et l'acide glucuronique (glucuronoconjugaison), ce dernier étant le mécanisme principal (Parkinson, 1995).

Afin d'illustrer plus en détail le métabolisme d'un médicament, nous avons pris la venlafaxine comme exemple (Fig. 2). Cette molécule qui est un inhibiteur sélectif de la sérotonine et de la noradrénaline couramment prescrite dans le traitement de maladies psychiatriques comme la dépression (principalement), les troubles anxieux généralisés et les troubles de panique, est fortement métabolisée chez l'homme (Godoy et al., 2016; Gu et al., 2018).

Tableau 1. Exemples de code ATC, classes thérapeutiques, structures chimiques, formules brutes et propriétés et usage thérapeutique de quelques médicaments

Médicaments	Examples de code ATC[1]	Classe thérapeutique	Structure chimique	Formule brute	Propriétés et usages thérapeutiques[2 et 3]
Carbamazépine	N03AF01	Antiépileptique		$C_{15}H_{12}N_2O$	Antiépileptique, neurotrope et psychotrope. Utilisé dans la prise en charge de: douleurs neuropathiques, épilepsies, névralgies faciales et troubles bipolaires.
Acetaminophène (paracétamol)	N02BE01	Analgésique/Anti-inflammatoire		$C_8H_9NO_2$	Antalgique et antipyrétique. Utilisé, seul ou en association avec d'autres principes actifs, dans la prise en charge de: douleurs d'intensité légère à modérée, fièvre
Sulfaméthoxazole	J01EC01	Anti-infectieux		$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	Anti-infectieux. Utilisé en association avec le triméthoprime dans la prise en charge de: cystites, fièvres typhoïdes, infections digestives, infections respiratoires, otites, pyélonéphrites et sinusites
Ciprofloxacine	J01MA02	Antibiotique		$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	Antibiotique. Utilisé dans la prise en charge de: sinusites, pneumonies, méningites à *Neisseria meningitidis*, des infections bronchopulmonaires, intra-abdominales,ostéoarticulares, urinaires, de la peau et des tissus mous, etc.
Diazepam	N05BA01	Anxiolytique		$C_{16}H_{13}ClN_2O$	Myorelaxant, anxiolytique, sédatif, hypnotique, anticonvulsivant et amnésiant. Utilisé dans la prise en charge d'anxiétés, crises d'angoisse, convulsions fébriles chez l'enfant, delirium tremens, états de mal épileptiques, inductions d'anesthésies générales, prémédications d'endoscopies, sevrages alcooliques et tétanos.
Venlafaxine	N06AX16	Antidépresseur		$C_{17}H_{27}NO_2$	Antidépresseur. Utilisé dans la prise en charge d'épisodes dépressifs majeurs, phobies sociales, troubles anxieux généralisés et troubles paniques.
Pravastatine	C10AA03	Régulateur des lipides sanguins		$C_{23}H_{36}O_7$	Inhibiteur compétitif réversible et spécifique de la HMG Co-A générant une diminution modérée de la synthèse de cholestérol intracellulaire et inhibiteur de la production des LDL. Utilisé dans la prise en charge de: hyperlipidémies, hypercholestérolémies, pathologies artérielles ischémiques et patients à haut risque cardiovasculaire
Aténolol	C07AB03	β-Bloquant		$C_{14}H_{22}N_2O_3$	Inhibiteur des récepteurs β1. Utilisé dans la prise en charge de: angors, extrasystoles, fibrillations, flutters, hypertensions artérielles, infarctus du myocarde et tachycardies.
Buprénorphine	N02AE01	Substitutif aux opiacés		$C_{29}H_{41}NO_4$	Agoniste opioïde μ partiel. Utilisé dans la prise en charge de dépendances aux opiacés comme l'héroïne.

Sources: [1](WHO, 2018); [2](VIDAL France, 2019); [3] (Lüllmann et al., 2003)

La venlafaxine (VEN) est principalement métabolisée dans le foie par deux enzymes du groupe des cytochromes P450: CYP2D6 et CYP3A4, à travers des réactions de déméthylation et de glucuronoconjugaison principalement et présente une excrétion urinaire comme composé inchangé entre 1 et 10% de la dose administrée (Dziurkowska et Wesolowski, 2012; Sangkuhl et al. 2015). Son principal métabolite, l'O-desmethylvenlafaxine (ODV) a une activité pharmacologique similaire à la venlafaxine. Ce métabolite et sa forme conjuguée (glucuronide) ont un taux d'excrétion de 30% dans l'urine. Des proportions plus faibles d'excrétion sont montrés par les métabolites N,O-didesmethylvenlafaxine (NODDV) (7-12%) et sa forme glucuronide (NODDV-glucu) (5-7%), N-desmethylvenlafaxine (NDV) (1%), N,N-didesmethylvenlafaxine (NNDDV) et N,N-didesmethyl-O-desmethylvenlafaxine (NNDDODV), ces deux derniers avec seulement 1% d'excrétion (Howell et al., 1993).

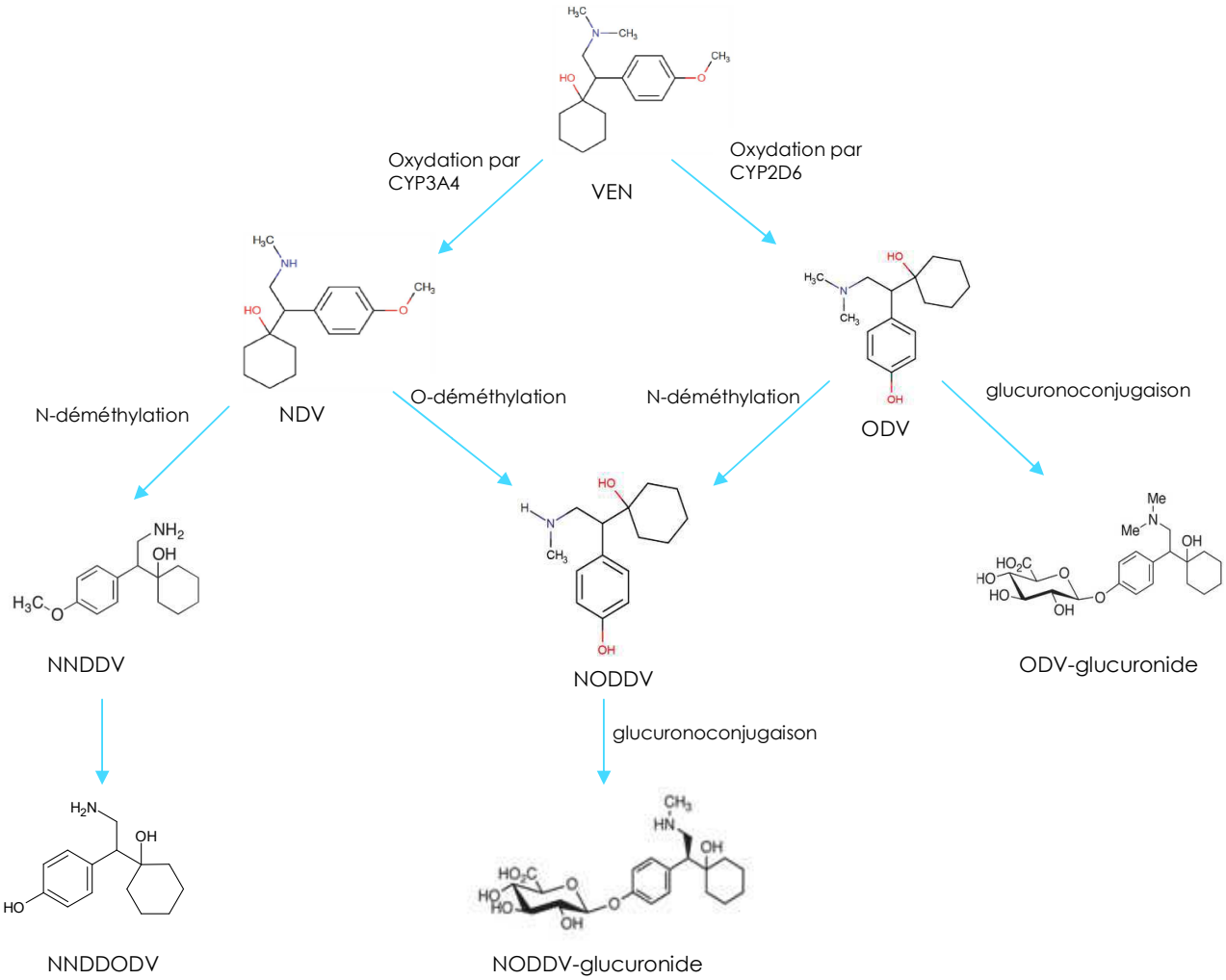


Figure 2. Schéma du métabolisme de la venlafaxine chez l'homme

(VEN:venlafaxine, NDV:N-desmethylvenlafaxine, ODV:O-desmethylvenlafaxine, NNDDV:N,N-didesmethylvenlafaxine, NODDV:N,O-didesmethylvenlafaxine, NODDV-glucuronide:N,O-didesmethylvenlafaxine glucuronide, ODV-glucuronide:O-desmethylvenlafaxine glucuronide, NNDDODV:N,N-didesmethylvenlafaxine-O-desmethylvenlafaxine)

Les réactions de métabolisation sont complexes et conditionnées d'autre part par les propriétés physico-chimiques de la molécule active et des enzymes de détoxification. Un médicament peut être métabolisé par différentes voies et un produit du métabolisme peut être commun à plusieurs médicaments comme c'est le cas de l'oxazépam. Ce dernier est une molécule active et un métabolite commun à plusieurs molécules actives telles que prazépam, diazépam, nordazépam et clorazépate dipotassium (Besse et al., 2008) (Fig. 3) (Les carrés gris indiquent des molécules actives et les carrés blancs indiquent les métabolites)

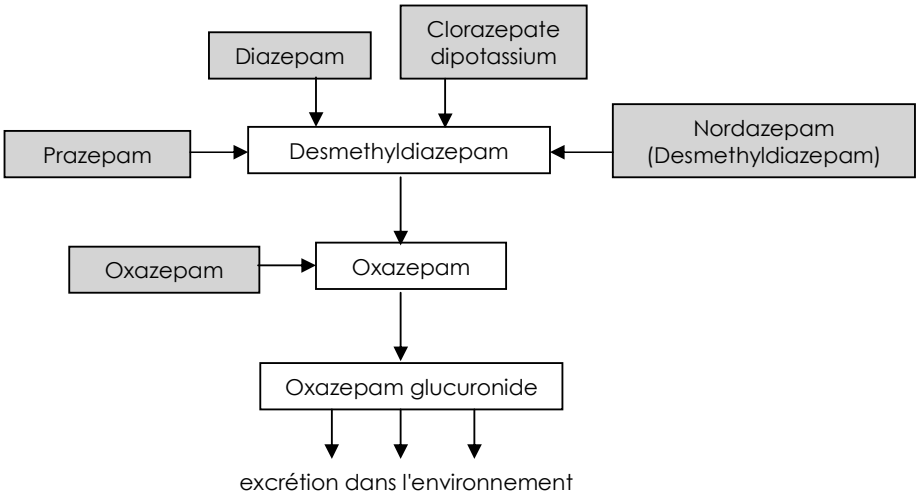


Figure 3. Schéma des différentes sources d'oxazépam.

Nous pouvons également remarquer que l'oxazépam glucuronide est un métabolite commun à plusieurs molécules parentes (Fig. 3).

Compte tenu de ce qui précède, nous pouvons dire que les processus du métabolisme humain conduisent donc à l'excrétion de mélanges complexes de composés parents/métabolites sous formes libres ou conjuguées. Ces mélanges complexes ou résidus de médicaments sont rejetés dans les eaux usées domestiques, qui constituent l'une des principales sources de contamination de l'environnement aquatique, comme il sera expliqué dans la section suivante.

2. Apport de résidus de médicaments (RdM) à usage humain à l'environnement aquatique

Plusieurs sources d'introduction de RdM à usage humain dans l'environnement sont connues (Fig. 4). Une fois les médicaments consommés, métabolisés et excrétés par l'homme, ils sont rejetés dans les eaux usées domestiques. Le rejet de médicaments non utilisés et périmés via les éviers et les toilettes contribue également à la présence de ces substances dans les rejets d'eaux usées domestiques. Ces eaux usées rejoignent la station d'épuration (STEP) via un réseau d'assainissement. Les STEP peuvent, également, recueillir les rejets hospitaliers et industriels des usines de production

pharmaceutique. Cependant, les STEP n'étant pas conçues pour le traitement optimal de ces RdM, ils sont finalement déversés dans les eaux superficielles.

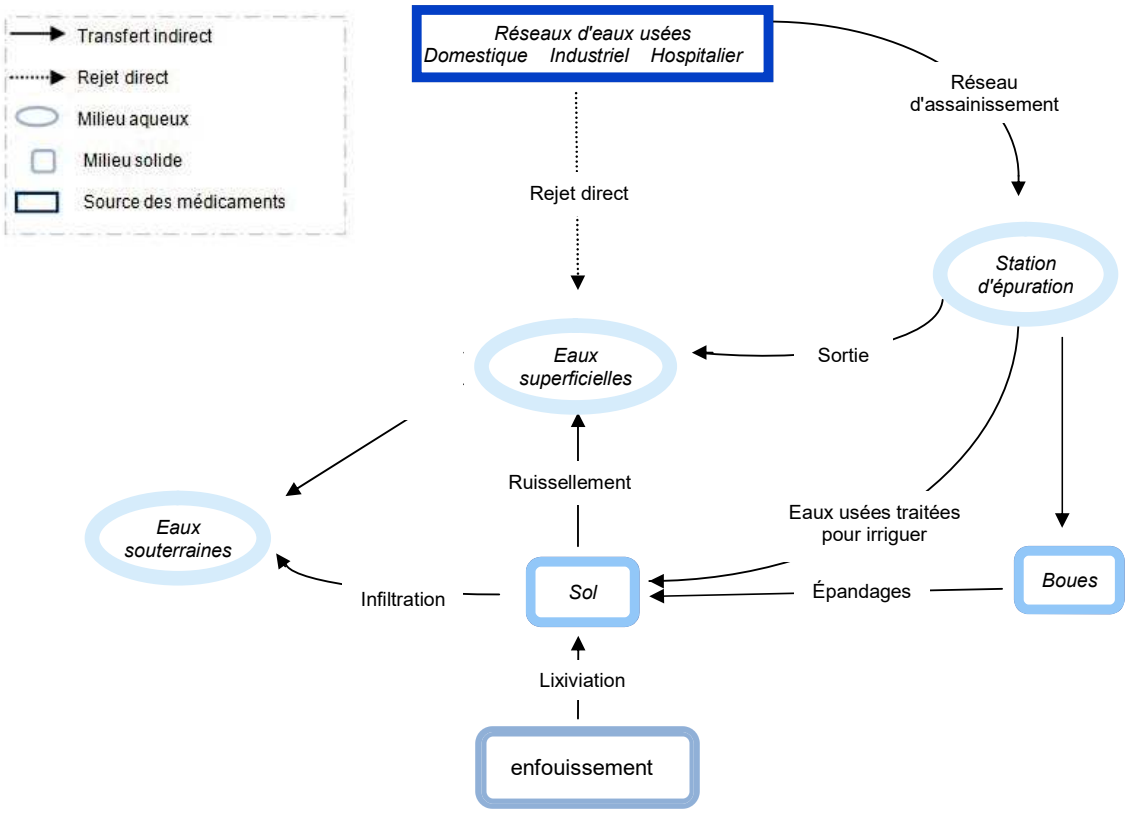


Figure 4. Voies d'introduction de résidus de médicaments d'usage humain dans l'environnement aquatique.

Dans les zones non raccordées au réseau d'assainissement, ces rejets (domestiques, industriels et hospitaliers) sont directement introduits dans l'environnement. Ainsi, les rejets d'eaux usées contenant des RdM à usage humain sont considérés comme la voie principale de la contamination des milieux aquatiques. D'autres voies de contamination par les RdM moins significatives correspondent à la contamination des sols due aux sites d'enfouissement, à l'épandage de boues et à l'utilisation d'eaux usées traitées provenant des STEP pour l'irrigation. Les RdM peuvent rejoindre les eaux superficielles par le ruissellement et les eaux souterraines par l'infiltration (Ebele et al., 2017; Li, 2014).

Le transfert constant de ces RdM au milieu aquatique leurs confère un caractère "pseudo persistant" et génère une exposition chronique dans les écosystèmes récepteurs (Nikolaou et al., 2007).

La description des voies d'introduction de résidus de médicaments à usage humain dans l'environnement aquatique met en évidence les éléments à considerer pour comprendre leur devenir dans les milieux aquatiques et la problématique de l'exposition des organismes du milieu aquatique.

Le développement de ces éléments nous permettra d'ilustrer l'état de contamination de l'environnement aquatique (milieu et organismes) par les RdM.

2.1 Les eaux usées: source principale de la contamination par les RdM de l'environnement aquatique.

Comme évoqué précédemment, les eaux usées contenant des RdM sont la source principale de la contamination de l'environnement aquatique. Les rejets domestiques, industriels et hospitaliers rejoignent les STEP, quand elles existent, pour être traités. Cependant, les stations d'épuration conventionnelles ne sont pas adaptées pour traiter ce mélange complexe de substances (contenant des molécules parentes, des métabolites et des produits de dégradation) dues à la grande variabilité de leurs caractéristiques physico-chimiques, ce que nous allons illustrer plus en détail dans la section suivante.

2.1.1 Élimination des RdM dans les stations d'épuration (STEP) conventionnelles

Classiquement, le traitement des eaux usées se compose de quatre étapes successives que sont les prétraitements (exemple dégrillage-tamisage), le traitement primaire (exemple sédimentation, clarification), le traitement secondaire (biologiques), et le traitement tertiaire pour éliminer du phosphore par exemple. Les deux premiers traitements tentent d'éliminer une partie des RdM (principalement hydrophobes) adsorbés sur les particules et le traitement biologique permet, entre autres, d'éliminer la plupart des RdM biodégradables (Margot et al., 2011; Yang et al., 2017). Par conséquent, l'élimination des RdM dans les STEP est un processus complexe, qui dépend d'aspects tels que, 1) les traitements spécifiques (biologiques ou chimiques) utilisés dans chacunes des STEP, 2) les propriétés physico-chimiques des RdM traités, comme la solubilité dans l'eau, la tendance à la volatilisation ou à l'adsorption dans les boues actives et la dégradation par des processus abiotiques et biotiques, 3) les conditions de fonctionnement telles que le temps de rétention hydraulique (HRT pour son acronyme en anglais), le temps de séjour des boues et la cinétique de biodégradation et 4) les conditions environnementales, telles que la température (efficacité moindre en période hivernale et dans les climats froids), les conditions d'oxydoréduction (différentes efficacités de suppression entre les conditions anaérobies et aérobies) et le pH (les variations du pH affectent la cinétique de réaction des RdM) (Evgenidou et al., 2015).

Dans les STEP conventionnelles, une partie des RdM est éliminée pendant le traitement biologique (boues activées), mais la plupart ne sont que partiellement ou pas complètement éliminées. À titre d'exemple, la revue bibliographique effectuée par Margot et al. (2015) a montré un taux d'élimination >80% pour les anti-inflammatoires/analgésiques ibuprofène et acetaminophène, des valeurs d'élimination entre le 30 et 70% pour le β-bloquant aténolol (41%), l'antidépresseur venlafaxine (40%) et les antibiotiques/anti-infectieux ciprofloxacine (69%), ofloxacine (58%) et sulfaméthoxazole (44%). Une élimination habituellement inférieure à 30 % a été observée pour l'antiépileptique carbamazépine (16%), l'anti-inflammatoire/analgésique diclofénac (20%) et le β-bloquant propanolol (28%). La plupart des RdM inclus dans cette revue ont une élimination moyenne inférieure à 50% (Margot et al., 2015). Ces composés ont une faible volatilité et la plupart ont une solubilité élevée, une faible hydrophobicité,

des coefficients de distribution octanol-eau (log Kow inférieurs à 3,0) qui montrent une faible adsorption sur les particules et des valeurs de constante de dissociation ionique (pKa) inférieures au pH des eaux usées qui favorisent la dissociation des RdM en phase aqueuse (Evgenidou et al., 2015; Margot et al., 2015).

En ce qui concerne les métabolites, les données disponibles dans la littérature scientifique sur le taux d'élimination dans les STEP sont rares et très ponctuelles. Par exemple, une étude réalisée au Canada a déterminé que les taux d'élimination des métabolites desmethylsertraline, O-desmethylvenlafaxine, desmethylmirtazepine et desmethylfluvoxamine ainsi que leurs molécules parentes étaient plus favorables avec les traitements secondaires qu'avec le traitement primaire (Lajeunesse et al., 2012). Dans le traitement primaire, le métabolite ayant le taux d'élimination le plus élevé était la desméthylsertraline (24%) et sa molécule parente sertraline (26%). Des taux d'élimination plus faibles ont été observés pour les métabolites desméthylmirtazépine (7,5%) et O-desméthylvenlafaxine (3%) et leurs molécules parentes mirtazapine (13%) et venlafaxine (14%) respectivement. Par contre, avec les traitements secondaires, la desméthylmirtazépine était le métabolite le plus éliminé (35%), suivie de la desméthylsertraline (23%), de la desméthylfluvoxamine (15%) et de l'O-desmethylvenlafaxine (10%).

Enfin, l'existence possible de processus de déconjugaison devrait être prise en compte dans l'interprétation des taux d'élimination d'un RdM. Les métabolites conjugués pourraient subir un clivage enzymatique dans les traitements secondaires en les convertissant sour la forme de la molécule parente ou en formant de nouveaux produits de dégradation. En effet, cela a notamment été reportée pour les hormones stéroïdiennes (Ascenzo et al., 2003; Ternes, 1998). Ces hormones, excrétées principalement sous forme conjuguée (glucuronide ou sulfate), perdent leur complexe au cours de leur transport dans le réseau d'assainissement et dans les eaux brutes en entrée de STEP, grâce aux enzymes glucuronidase et sulfatase qui sont produites naturellement dans ces environnements par diverses bactéries (Ascenzo et al., 2003). En revanche ce processus de déconjugaison est peu documenté pour les autres classes thérapeutiques. Des études ponctuelles ont mis en évidence la déconjugaison vers la molécule parente de l'anti-épileptique lamotrigine-N^2-glucuronide (Zonja et al., 2015) et l'analgésique/anti-inflammatoire diclofénac acyl glucuronide (Osorio et al., 2014) au cours d'un traitement biologique.

Compte tenu de ce qui précède, nous pouvons conclure qu'après les traitements des eaux usées dans les STEP, les rejets en sorties des STEP sont susceptibles de contenir des substances parentes, des métabolites, des produits de dégradation, constituant un mélange complexe de RdM (Bletsou et al., 2015; Tran et al., 2018; Yang et al., 2017) qui va être déversé dans l'environnement aquatique.

2.1.2 Occurrence des RdM dans les STEP

Le tableau 2 donne un aperçu des valeurs mesurées en entrées et sorties de STEP pour les classes thérapeutiques les plus étudiées par la communauté scientifique au cours de ces deux dernières décennies. Le tableau rassemble les données de revues de grands magazines disponibles dans la

littérature complétés par des travaux spécifiques afin de rendre compte de la distribution de données disponibles. Ces données sont rapportées pour 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe) où les usages de médicaments, la gestion des eaux usées et la disponibilité des données sont différents. La plus grande disponibilité de l'information provient des pays de l'hémisphère nord alors que dans l'hémisphère sud l'information reste encore aujourd'hui limitée (exemple les pays africains). Parmi les molécules étudiées, il apparaît que la connaissance sur les métabolites et les produits de transformation reste à renforcer. Seulement 18% des métabolites illustrés dans le tableau 2, ont fait l'objet d'une surveillance sur au moins deux continents. En Europe, 100% des métabolites cités ont fait l'objet d'au moins une publication.

Les classes thérapeutiques, analgésiques/anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et antibiotiques/anti-infectieux ont fait l'objet de nombreux travaux. L'ibuprofène, le kétoprofène et le diclofénac sont régulièrement mesurés dans les 4 continents à des concentrations d'une dizaine à des centaines d'µg/L en entrée de STEP. Les concentrations mentionnées peuvent être associées aux habitudes de consommation. Les analgésiques/AINS sont largement utilisés dans la population mondiale en raison de leur haute efficacité et de leur faible risque d'abus (He et al., 2017). Par exemple, l'ibuprofène, largement utilisé pour soulager la douleur ou supprimer l'inflammation (voir Tableau 1), est facilement accessible parce qu'il ne nécessite pas de prescription. Par contre, le diclofénac et le kétoprofène nécessitant une ordonnance, sont moins fréquemment utilisés et se retrouvent en plus faibles concentrations en entrées de STEP par rapport aux concentrations mesurées pour l'ibuprofène. En sorties de STEP, le continent africain présente des concentrations relativement élevées pour ces analgésiques/AINS par rapport aux concentrations mesurées dans des STEP européennes. Ceci peut être attribué au mauvais système d'assainissement ou à l'absence de système d'assainissement dans les pays concernés (Madikizela et al., 2017).

Dans le cas des antibiotiques/anti-infectieux, des données sur la ciprofloxacine et la sulfaméthoxazole sont disponibles sur les 4 continents. Des concentrations élevées de ciprofloxacine ont été mesurées en entrée de STEP en Asie et en Amérique du Nord avec des valeurs maximales de 140 µg/L et 246 µg/L respectivement. La sulfaméthoxazole montre la plus forte concentration en Afrique (60 µg/L à l'éntrée et 4,09 µg/L à la sortie de STEP). Dans le cas de l'ofloxacine, des concentrations similaires ont été mis en évidence entre les continents asiatique et européen tant à l'entrée qu'à la sortie de STEP.

Les molécules illustrées dans les autres classes thérapeutiques: anti-épileptiques, benzodiazépines, antidépresseurs, régulateurs des lipides sanguins, substitutifs aux opiaces et un des β-bloquants ont généralement montré des concentrations inférieures à la dizaine d'µg/L dans les 4 continents. Le β-bloquant aténolol a été l'exception car il a été trouvé de façon constante dans les entrées et sorties de STEP à des concentrations plus élevées dans 3 continents (sauf Afrique).

L'analyse des données révèle une variabilité des concentrations mesurées d'une région géographique à l'autre, ce qui peut être attribué aux différents profils de consommation de médicaments dans chaque région, aux conditions climatiques (humides, sèches, hivernales ou estivales), à la densité et à

Tableau 2. Les niveaux de concentration en ug/L [min-max] de RdM en entrées et sorties de STEP sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe)

		Asie			Amérique du Nord			Afrique			Europe		
Classe thérapeutique	**RdM**	**Entrée (ug/L)**	**Sortie (ug/L)**	**Références**	**Entrée (ug/L)**	**Sortie (ug/L)**	**Références**	**Entrée (ug/L)**	**Sortie (ug/L)**	**Références**	**Entrée (ug/L)**	**Sortie (ug/L)**	**Références**
Anti-épileptiques	Carbamazépine	<MQL-18,5	<MQL-0,90	(Subedi et al., 2017; Tran et al., 2018; Zhang et al., 2018)	<MQL-0,44	0,028-0,55	(Rivera-Jaimes et al., 2018; Skees et al., 2018; Tran et al., 2018)	0,350-5,37	0,320-2,13	(K'oreje et al., 2016; Matongo et al., 2015a, 2015b; Mayoudom et al., 2018)	<MQL-3,11	<MQL-4,60	(Gómez et al., 2007; Paíga et al., 2019; Radjenovic et al., 2007; Tran et al., 2018)
Analgésiques/ Anti-inflammatoires	Codéine	<MQL-0,28	<MQL-0,21	(Subedi et al., 2017; Tran et al., 2018)	0,077-5,70	0,080-3,30	(Skees et al., 2018; Tran et al., 2018)	-	-	-	0,08-32,30	0,0097-15,59	(Bijlsma et al., 2012; Brieudes, 2014; Gómez et al., 2007; Oliveira et al., 2015; Östman et al., 2014; Tran et al., 2018)
	Codéine 6βD glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,002-0,038	(Brieudes, 2014)
	Ibuprofène	<MQL-55,97	<MQL-1,94	(Subedi et al., 2017; Tran et al., 2018)	0,37-45,00	0,016-14,60	(Rivera-Jaimes et al., 2018; Tran et al., 2018; Yu et al., 2006)	1,36-221	0,34-67,9	(Madikizela et al., 2017; Madikizela and Chimuka, 2017, 2016; Matongo et al., 2015a; Mayoudom et al., 2018)	<MQL-168	<MQL-28	(Ferrando-Climent et al., 2012; Gómez et al., 2007; Paíga et al., 2019; Radjenovic et al., 2007; Tran et al., 2018; Weigel et al., 2004)
	1-hydroxy-ibuprofène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND-6,840	ND-1,41	(Evgenidou et al., 2015; Ferrando-Climent et al., 2012; Weigel et al., 2004)
	carboxy-ibuprofène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND-38,40	ND-10,65	(Evgenidou et al., 2015; Ferrando-Climent et al., 2012; Weigel et al., 2004)
	Kétoprofène	<MQL-7,88	<MQL-1,71	(Tran et al., 2018; Zhang et al., 2018)	0,06-1,2	0,04-0,28	(Tran et al., 2018; Yu et al., 2006)	0,31-6,4	0,16-4,3	(Madikizela et al., 2017)	<MQL-5,7	<MDL-1,6	(Paíga et al., 2019; Radjenovic et al., 2007; Tran et al., 2018)
	Diclofénac	0,013-1,03	<MQL-0,24	(Tran et al., 2018; Zhang et al., 2018)	0,14-2,47	<MQL-2,18	(Rivera-Jaimes et al., 2018; Tran et al., 2018; Yu et al., 2006)	0,85-104	<LOQ-20,8	(K'oreje et al., 2016; Madikizela et al., 2017; Madikizela and Chimuka, 2017, 2016)	<MQL-4,87	<MQL-5,16	(Gómez et al., 2007; Paíga et al., 2019; Radjenovic et al., 2007; Tran et al., 2018)
	Acetaminophène	<MQL-99,6	<MQL-11	(Archana et al., 2017; Shraim et al., 2017; Subedi et al., 2017; Zhang et al., 2018)	0,96-14,9	<MDL	(Rivera-Jaimes et al., 2018; Yu et al., 2006)	13,6	< MDL-6,51	(Matongo et al., 2015a, 2015b)	0,68-512,8	<LOD-4,3	(Gómez et al., 2007; Paíga et al., 2019; Petrie et al., 2017; Radjenovic et al., 2007)
Antibiotiques/ Anti-infectieuse	Ciprofloxacine	0,015-140	<MQL-58	(Archana et al., 2017; Tran et al., 2018)	<MQL-246,10	<MQL-0,62	(Tran et al., 2018)	ND-27	0,07	(K'oreje et al., 2016; Madikizela et al., 2017; Mayoudom et al., 2018)	<MQL-13,62	<MQL-5,69	(Paíga et al., 2019; Tran et al., 2018)
	Ofloxacine	0,055-1,27	0,013-7,87	(Tran et al., 2018)	0,47-1,00	<MQL-0,51	(Tran et al., 2018)	-	-	-	<MDL-0,50	0,071-8,64	(Paíga et al., 2019; Radjenovic et al., 2007; Tran et al., 2018)
	Sulfaméthoxazole	0,003-1,39	<MQL-0,56	(Subedi et al., 2017; Tran et al., 2018; Zhang et al., 2018)	<MQL-4,20	<MQL-1,80	(Rivera-Jaimes et al., 2018; Tran et al., 2018)	0,162-60	<LOD-4,09	(Madikizela et al., 2017; Matongo et al., 2015a, 2015b; Mayoudom et al., 2018)	<MQL-11,55	<MDL-0,54	(Paíga et al., 2019; Radjenovic et al., 2007; Tran et al., 2018)

MQL: limite de quantification de la méthode; MDL: limite de détection de la méthode; LOQ: limite de quantification; LOD: limite de détection; ND: non détectable

Suite Tableau 2. Les niveaux de concentration en ug/L [min-max] de RdM en entrées et sorties de STEP sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe)

		Asie			Amérique du Nord			Afrique			Europe		
Classe thérapeutique	**RdM**	**Entrée (ug/L)**	**Sortie (ug/L)**	**Références**	**Entrée (ug/L)**	**Sortie (ug/L)**	**Références**	**Entrée (ug/L)**	**Sortie (ug/L)**	**Références**	**Entrée (ug/L)**	**Sortie (ug/L)**	**Références**
Benzodiazépines	Diazepam	<MDL-0,085	0,006-0,10	(Subedi et al., 2017)	0,0045-0,005,3	<LOQ-0,030	(Skees et al., 2018)	D-0,09	D	(K'oreje et al., 2016)	<MQL-0,10	0,01-0,02	(Oliveira et al., 2015)
	Oxazepam	<MQL-0,21	<MDL-0,21	(Subedi et al., 2017; Wang et al., 2017)	0,048-0,060,4	0,047-0,061	(Skees et al., 2018)	-	-	-	<MQL-0,28	0,05-4,305	(Bijlsma et al., 2012; Brieudes, 2014; Oliveira et al., 2015; Östman et al., 2014)
	Oxazepam glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<MQL-0,03	0,002-0,006	(Brieudes, 2014; Oliveira et al., 2015)
	Lorazepam	<MDL-0,095	<MDL-0,047	(Subedi et al., 2017)	0,024-0,036	0,017	(Skees et al., 2018)	-	-	-	<MQL-0,05	<MQL-0,05	(Oliveira et al., 2015)
Antidépresseurs	Venlafaxine	<MDL-0,076	<MDL-0,018	(Subedi et al., 2017)	0,30-2,99	0,34-5,50	(Lajeunesse et al., 2012; Metcalfe et al., 2010; Skees et al., 2018; Writer et al., 2013)	D	D	(K'oreje et al., 2016)	0,12-0,64	0,17-1,560	(Brieudes, 2014; Paíga et al., 2019; Petrie et al., 2017)
	N-desmethyl venlafaxine	-	-	-	ND-0,277	ND-0,227	(Evgenidou et al., 2015; Metcalfe et al., 2010)	-	-	-		-	-
	O-desmethyl venlafaxine	-	-	-	ND-2,816	ND-1,87	(Evgenidou et al., 2015; Metcalfe et al., 2010; Oliveira et al., 2015; Writer et al., 2013)	-		-	1,01-1,48	0,189-1,87	(Brieudes, 2014; Oliveira et al., 2015)
Régulateurs des lipides sanguins	Pravastatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,060-0,30	<0,060-0,125	(Kasprzyk-Hordern et al., 2009; Radjenovic et al., 2007)
	Fenofibric acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND-0,117	<0,008-0,349	(Evgenidou et al., 2015)
β-Bloquants	Aténolol	<MQL-294,7	<MQL-7,10	(Shraim et al., 2017; Subedi et al., 2017; Tran et al., 2018)	0,50-2,64	<MQL-14,2	(Tran et al., 2018)	0,427	-	(Mayoudom et al., 2018)	<MQL-33,11	<MQL-7,60	(Radjenovic et al., 2007; Tran et al., 2018)
	Propanolol	-	-	-	-	-	-	0,298	-	(Mayoudom et al., 2018)	0,12-1,97	0,12-0,40	(Kasprzyk-Hordern et al., 2009)
Substitutifs aux opiaces	Buprenorphine	-	-	-	0,011-0,016	< LOQ	(Skees et al., 2018)	-	-	-	<MQL-0,02	0,004-0,015	(Brieudes, 2014; Oliveira et al., 2015; Östman et al., 2014)
	Buprénorphine glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	(Brieudes, 2014)
	Norbuprénorphine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<MQL-0,43	<MQL-0,30	(Oliveira et al., 2015)
	Norbuprénorphine glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<MQL	-	(Östman et al., 2014)

MQL: limite de quantification de la méthode; MDL: limite de détection de la méthode; LOQ: limite de quantification; LOD: limite de détection; ND: non détectable; D: détectable

la taille de la population, au type d'échantillonnage et aux modalités de gestion des eaux usées (Tran et al., 2018). Les travaux de recherche menés en la présence des RdM dans les eaux usées traités temoiggent d'une occurrence ubiquitaire de RdM quelque soit le lieu de l'échantillonage. Les résultats rapportés ici attestent que les RdM sont quantifiés en sorties de STEP sur les 4 continents, ce qui indique que leur élimination est incomplète.

2.2 Autres sources potentielles de contamination par les RdM dans l'environnement aquatique

Comme indiqué au début de la section 2, les sites d'enfouissement ou centre de stockage de déchets ultimes sont considérées une source potentielle de RdM dans l'environnement (Fig. 4). Les sites d'enfouissement sont les dépôts définitifs de divers déchets solides et semi-solides qui peuvent contenir des RdM. Une fois éliminés dans l'enfouissement, les RdM peuvent être dégradés par les micro-organismes, adsorbés par les déchets solides, mais la plupart se dissolvent dans les lixiviats (Musson and Townsend, 2009). Les conditions anaérobies dans l'enfouissement conventionnel retardent la biodégradation des résidus de médicaments dans les lixiviats, favorisant leur persistance (Erses et al., 2008). Une étude menée à Taïwan a identifié 19 RdM dans 4 lixiviats d'enfouissement. Parmi les RdM, l'aténolol (concentration maximale (Cnmax) : 69,6 ng/L), l'ibuprofène (Cnmax : 834,5 ng/L), le kétoprofène (Cnmax : 206,1 ng/L), le diclofénac (Cnmax : 734,4 ng/L), la carbamazépine (Cnmax : 45,6) et la codéine (Cnmax : 797,8 ng/L) ont été trouvés (Lu et al., 2016). Les lixiviats provenant des sites d'enfouissement sont considérés comme une source de contamination des eaux souterraines. Peng et ses collaborateurs (2014) ont montré la présence de RdM dans les eaux souterraines près de deux sites d'enfouissement municipales au sud de la Chine. Les RdM comprenant des antibiotiques/anti-infectieux sulfaméthoxazole et ofloxacine ainsi que des analgésiques/anti-inflammatoires ibuprofène et naproxène dont les concentrations maximales étaient respectivement de 124,5 ng/L ; 44,2 ng/L ; 57,9 ng/L et 86,9 ng/L (Peng et al., 2014).

Les eaux souterraines peu profondes peuvent être contaminées par l'infiltration d'eaux de surface contenant des RdM. L'échange hydraulique latéral ou vertical permet de transférer les RdM vers les eaux souterraines par la zone hyporhéique (la zone de transition entre les eaux de surface des cours d'eau et les eaux souterraines) (Lewandowski et al., 2011). Une étude de Bradley et al (2014) a montré que l'infiltration d'eaux de surface contaminées causait la présence des RdM comme la carbamazépine et le sulfaméthoxazole dans les eaux souterraines peu profondes à des concentrations supérieures à 20 ng/L (Bradley et al., 2014).

3. Le transfert et la transformation des RdM dans l'environnement aquatique par des processus abiotiques et biotiques

Comme nous l'avons écrit précédemment, en sortie de station d'épuration, tous les RdM ne sont donc pas éliminés. Les eaux traitées et les eaux non traitées, déversées systématiquement dans le milieu récepteur (eaux superficielles), introduisent un grand nombre de molécules (des parents, des métabolites et des produits de transformation), dont beaucoup ne sont pas clairement identifiées. Le devenir de ces RdM dans l'environnement aquatique est dépendant de leurs propriétés physico-

chimiques (solubilité, log Kow, pKa,...), ainsi que des processus abiotiques et biotiques susceptibles d'entraîner leurs transformations. Ces processus jouent un rôle central dans l'atténuation naturelle des RdM, comme nous allons le décrire ci-dessous.

3.1 Des processus abiotiques

Les RdM vont être naturellement atténués avec les processus de dilution et diffusion, hydrolyse, volatilisation et principalement par adsorption et photodégradation.

3.1.1 L'adsorption

Les processus d'adsorption sont complexes et font intervenir différents mécanismes en fonction des caractéristiques des molécules et des matières solides. Si le compartiment liquide a été le plus étudié pour les RdM en raison de leur caractéristique hydrophile pour beaucoup d'entre eux, il apparaît que le compartiment solide est aussi à considérer pour certaines molécules et qu'il contribue au transport et au piégeage de certains RdM. Une étude réalisée par Yang et al. (2011) a montré que les colloïdes peuvent adsorber jusqu'à 40% de la concentration présente dans le milieu, des molécules propranolol, tamoxifène et iodométhacine. Des pourcentages plus faibles d'adsortion ont été déterminés pour le sulfaméthoxazole (maxim. 12%) et diclofénac (maxim. 18%) (Yang et al., 2011). Dû au caractère ionisable des RdM, leur adsorption dans les matières solides est régie par plusieurs interactions telles que des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, des interactions d'échange ionique et des interactions hydrophobes (Lara-martín et al., 2014). Ferreira da Silva et al. (2011) ont mis en évidence que les RdM famotidine, timolol et nadolol ont eu une forte tendance à se lier aux matières en suspension. Les valeurs élevées de pKa indiquent que ces composés sont chargés positivement aux conditions de pH de l'eau de rivière et que des interactions cationiques, des complexations et des liaisons hydrogénique peuvent favoriser leur liaison avec les matières en suspension (Ferreira da Silva et al., 2011). Cependant, il ne faut pas oublier que ce processus d'adsorption dépend aussi des propriétés des matières solides tels que la dimension des particules, la teneur en carbone organique, d'argile et de métal, entre autres, ainsi que des conditions du milieu comme la salinité, le température et le pH (Al-Khazrajy and Boxall, 2016). Wang et al. (2010) ont étudié l'adsorption de la tétracycline dans les sédiments marins à différentes conditions (pH, salinités et températures). Ils ont déterminé qu'en augmentant les valeurs de pH, salinité et température, le processus d'adsorption diminue dans les sédiments marins (Wang et al., 2010). Dans l'ensemble, les résultats démontrent la complexité des processus qui entraînent l'adsorption des RdM dans les matières solides et mettent en évidence la difficulté d'évaluer le devenir environnemental de ces molécules.

3.1.2 La photodégradation

La photodégradation causée par l'irradiation solaire est considérée comme une voie majeure de l'élimination des RdM dans l'environnement et en particulier ceux qui ont été conçus pour être résistants à l'hydrolyse (Nikolaou et al., 2007). Deux types de processus de phototransformation peuvent être distingués: directe ou indirecte. Dans la photolyse directe, la molécule est excitée par l'absorption d'un photon résultant en une réaction chimique, généralement une oxydation (Dąbrowska

and Namieśnik, 2004). Au cours de la photodégradation indirecte, un photosensibilisateur naturel (exemple des nitrates et des acides humiques) absorbe la lumière et forme des intermédiaires radicalaires très réactifs ($O^{\bullet}$, $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$) ou encore des peroxydes (R-O-O-R) qui réagissent sur les composés ciblés (Remucal, 2014). Les photosensibilisateurs peuvent fonctionner comme activateurs ou comme protecteurs selon la molécule ciblée. Par exemple, les substances humiques présentes dans l'eau accélèrent la photodégradation de la fluoxétine (Kwon and Armbrust, 2006), le sulfaméthoxazole, l'acide clofibrique, l'ofloxacine et le propranolol (Andreozzi et al., 2003) mais ralentissent celle de la paroxétine (Kwon and Armbrust, 2004), la carbamazépine et le diclofénac (Andreozzi et al., 2003). Les deux mécanismes de photolyse dépendent des variations de l'intensité du rayonnement solaire selon la latitude et la saison (Andreozzi et al., 2003; Jasper and Sedlak, 2013). Des études ont mis en évidence que des RdM comme le diclofénac (Kim and Tanaka, 2009), le kétoprofène (Kim and Tanaka, 2009; Lin and Reinhard, 2005), le sulfaméthoxazole (Baena-nogueras et al., 2017) et le lorazépam (Calisto et al., 2011) sont rapidement photodégradables (temps de 1/2 vie: $t_{1/2}$ < 1 jour). Une résistance modérée à la photodégradation a été observée pour les molécules oxazépam ($t_{1/2}$: 4 jours) et diazépam ($t_{1/2}$: 7 jours) (Calisto et al., 2011) tandis que les molécules comme la carbamazépine et l'acide clofibrique sont très difficiles à photodégrader (t1/2: > 100 jours) (Andreozzi et al., 2003). Il est à noter que divers produits de transformation pouvant résulter du processus de photodégradation d'un composé ciblé, peuvent être plus toxiques et biologiquement actifs que leurs molécules parentes (Bergheim et al., 2014). Par example l'acridine, produit de la photodégradation de la carbamazépine est connue pour avoir une activité mutagène et cancérogène (Chiron et al., 2006).

3.2. Des procesus biotiques: la biodégradabilité

En plus de l'adsorption et de la photodégradation (processus abiotiques), la biodégradabilité est considérée comme un important atténuateur naturel des RdM.

Les bactéries ou microorganismes naturels du milieu récepteur consomment les produits organiques, en l'occurrence des RdM, et s'en servent comme une source d'énergie pour se développer. Dans ce processus, les RdM subissent des réactions qui entraînent la formation de produits de transformation (Ebele et al., 2017). Étant donné que la biodégradabilité implique des réactions enzymatiques spécifiques aux structures chimiques, ce processus est très variable entre les RdM (Onesios et al., 2009). Par exemple, une étude faite dans les eaux estuariennes et côtières a montré que les molécules comme la carbamazépine ($t_{1/2}$: > 96 jours) et le sulfaméthoxazole ($t_{1/2}$: > 85 jours) ont une résistance élevée à la dégradation bactérienne tandis que l'acétaminophène ($t_{1/2}$: < 11 jours) est plus labile (Benotti and Brownawell, 2009). Baena-Nogueras et al. (2017) ont determiné une demi-vie similaire pour l'acétaminophène (8 jours) dans l'eau de mer (Baena-nogueras et al., 2017). Dans la même étude, les molécules kétoprofène et carbamazépine se sont révélées non biodégradables. Compte tenu des données ci-dessus, la carbamazépine et le sulfaméthoxazole ont montré une forte persistance dans les eaux de surface. Dans les eaux souterraines, les microorganismes sont limités en nombre, en diversité et en activité biologique en raison de l'existence de conditions redox variables par rapport aux eaux de surface (Lapworth et al., 2012). Par conséquent, les RdM peuvent subir une

dégradation incomplète dans ce milieu et devenir des produits de transformation potentiellement dangereux, ou même rester inaltérés dans les eaux souterraines pendant de longues périodes (Sui et al., 2015). Par exemple, le diazépam peut subir une biodégradabilité partielle générant de l'oxazépam, du témazépam, du nordazépam et deux autres produits (Kosjek et al., 2012). Ainsi, les produits résultant de ce processus biotique peuvent eux-mêmes être persistants ou labiles, actifs ou non actifs. Cela augmente le nombre de molécules présentes dans le milieu.

En général, bien que l'atténuation naturelle soit l'un des processus essentiels pour éliminer la concentration de RdM dans l'environnement, le résultat est insatisfaisant. Certains d'entre eux peuvent être partiellement éliminées par atténuation naturelle, tandis que certains RdM sont résistants à la dégradation et persistants dans l'environnement.

4. Occurrence des RdM dans les eaux de surface et les eaux souterraines

4.1 Les eaux de surface

Malgré les différents types de dégradation susceptibles de se produire dans l'environnement, ces processus ne suffisent pas à compenser l'apport continu des RdM dans les eaux de surface, leur présence dans ce milieu ayant montré dans l'ensemble des continents. Le tableau 3 illustre les concentrations maximales rapportées pour les classes thérapeutiques les plus étudiées par la communauté scientifique dans ce milieu selon 4 continents (Europe, Afrique, Amérique du Nord et Asie). Ces données démontrent que le niveau de contamination des eaux de surface et la diversité des molécules rencontrées sont différents selon les continents. Par exemple, parmi les RdM appartenant à la classe thérapeutique analgésique/AINS, en Asie, les concentrations variaient de 0,4 ng/L (kétoprofène) à 1 417 ng/L (ibuprofène), tandis qu'en Europe, la variation était de 1,8 ng/L (codéine) à 2382 ng/L (acétaminophène), en Amérique du Nord de 0,050 ng/L (kétoprofène) à 508 ng/L (acétaminophène) et en Afrique de 730 ng/L (diclofénac) à 84600 ng/L (ibuprofène). L'Ibuprofène, le diclofénac et l'acétaminophène sont les molécules les plus étudiées de cette classe thérapeutique sur les 4 continents avec au moins trois publications chacune. En Afrique, de plus hauts niveaux de contamination de ces trois molécules par rapport aux autres continents ont été signalés. Les concentrations maximales d'ibuprofène, diclofénac et acétaminophène rencontrées dans les eaux de surface africaine étaient ~113 fois, ~3 fois et ~44 fois plus élevées que les concentrations maximales rapportées dans les études européennes. Dans le cas de l'ibuprofène, une étude de Matongo et al. (2015b) suggère que la forte concentration de ce médicament (84 600 ng/L) dans les eaux de surface de Msunduzi est associée au nombre élevé d'habitants dans les zones urbaines (300 000 habitants), à la facilité d'accès à ce médicament et donc de son utilisation car il peut être acheté sans ordonnance et par conséquence à son faible taux d'élimination dans la STEP dû aux hautes concentrations présentes dans le traitement des eaux usées urbaines. Cette analyse n'est pas exhaustive mais reflète des disparités entre continents tant en terme d'accessibilité de médicaments, de pression anthropique et de saturation des systèmes de traitements. Des molécules pourtant biodégradables se retrouvent aussi à des concentrations élevées.

Tableau 3. Concentrations en ng/L de RdM dans les eaux superficielles sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe)

		Asie			Amérique du Nord			Afrique			Europe		
Classe thérapeutique	**RdM**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**
Anti-épileptiques	Carbamazépine	8,80	Bangldesh (riv Brahmaputra)	(Hossain et al., 2018)	9,39	Etats Unis (riv Delaware)	(Bean et al., 2018)	430	Kenya (riv Ngong')	(K'oreje et al., 2016)	8	Espagne (Mer Méditerranée)	(Gros et al., 2012)
		12	Japon (riv Tone)	(Nakada et al., 2007)	14,8	Etats Unis (riv Tennessee)	(Conley et al., 2008)	1650	Afrique du Sud (riv Umgeni)	(Matongo et al., 2015a)	81	Allemagne (plusieurs riv)	(Hummel et al., 2006)
		16,1	Inde (riv Ganges)	(Sharma et al., 2019)	130	Etats Unis (stream New Jersey)	(Alvarez et al., 2005)	3240	Afrique du Sud (riv Msunduzi)	(Matongo et al., 2015b)	41	Espagne (riv Onyar)	(Gros et al., 2012)
		3,83	Taiwan (estu)	(Jiang et al., 2014)	147	Etats Unis (plusieurs riv Colorado	(Ferrer et al., 2010)	-	-	-	4,9	Espagne (Lagune Mar menor)	(Moreno-González et al., 2015)
		75,5	Chine (riv Huangpu)	(Wu et al., 2015)	87,7	Etats Unis (ruisseau et riv Four)	(Skees et al., 2018)	-	-	-	11,9	Espagne (riv Ebro)	(López-Serna et al., 2012)
		68	Corée du Sud (riv Han)	(Yoon et al., 2010)	36	Mexique (riv Apatlaco)	(Rivera-Jaimes et al., 2018)	-	-	-	178,7	Espagne (riv Llobregat)	(López-Roldán et al., 2010)
		ND	Chine (riv Pearl)	(Xie et al., 2019)	0,650	Canada (riv Detroit, et autres)	(Metcalfe et al., 2010)	-	-	-	31,8	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
		-	-	-	114	Etats Unis (riv Mississippi)	(Zhang et al., 2007)	-	-	-	684	Royaume-Uni (riv Taff et riv Ely)	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	178	Italie (estuaire Douro)	(Madureira et al., 2010)
Analgésiques/ Anti-inflammatoires	Codéine	63,6	Taiwan (estu)	(Jiang et al., 2014)	<240	Etats Unis (stream New Jersey)	(Alvarez et al., 2005)	-	-	-	13,8	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
		-	-	-	ND	Etats Unis (plusieurs riv Colorado	(Ferrer et al., 2010)	-	-	-	4,0	Croatie (riv Sava)	(Krizman-Matasic et al., 2018)
		-	-	-	45,9	Etats Unis (ruisseau et riv Four)	(Skees et al., 2018)	-	-	-	2	Espagne (Mer Méditerranée)	(Gros et al., 2012)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	Espagne (riv Onyar)	(Gros et al., 2012)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	Espagne (Lagune Mar menor)	(Moreno-González et al., 2015)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	94	Allemagne (plusieurs riv)	(Hummel et al., 2006)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	815	Royaume-Uni (riv Calder)	(Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	599	Royaume-Uni (riv Taff et riv Ely)	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)

ND: non détectable

Suite Tableau 3. Concentrations en ng/L de RdM dans les eaux superficielles sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe)

		Asie			Amérique du Nord			Afrique			Europe		
Classe thérapeutique	**RdM**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**
Analgésiques/ Anti-inflammatoires	Codéine 6βD glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,17	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
	Ibuprofène	51	Corée du Sud (riv Han)	(Yoon et al., 2010)	<18	Etats Unis (stream New Jersey)	(Alvarez et al., 2005)	11400	Afrique du Sud (riv Mbokodweni)	(Madikizela and Chimuka, 2016)	16	Espagne (Mer Méditerranée)	(Gros et al., 2012)
		12,1	Taiwan (estu)	(Jiang et al., 2014)	248	Mexique (riv Apatlaco)	(Rivera-Jaimes et al., 2018)	84600	Afrique du Sud (riv Msunduzi)	(Matongo et al., 2015b)	380	Espagne (riv Onyar)	(Gros et al., 2012)
		22,85	Inde (riv Ganges)	(Sharma et al., 2019)	ND	Etasts Unis et Canada (riv Mississippi et lac Pontchartrain)	(Boyd et al., 2003)	62000	Afrique du Sud (riv Umgeni)	(Matongo et al., 2015a)	750	Espagne (riv Ter)	(Ferrando-Climent et al., 2012)
		< LOQ	Japon (riv Tone)	(Nakada et al., 2007)	0,790	Canada (riv Detroit, Hamilton Harbour et autres)	(Metcalfe et al., 2010)	2570	Afrique du Sud (estuaire Umgeni)	(Gumbi et al., 2017)	100	Royaume-Uni (riv Taff et riv Ely)	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)
		ND	Chine (riv Pearl)	(Xie et al., 2019)	34	Etats Unis (riv Mississippi)	(Zhang et al., 2007)	17440	Kenya (riv Ngong')	(K'oreje et al., 2016)	23,7	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
		1417	Chine du Sud (riv Pearl Delta)	(Peng et al., 2008)	-	-	-				490,4	Espagne (riv Llobregat)	(López-Roldán et al., 2010)
	1-hydroxy-ibuprofène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	560	Espagne (riv Ter)	(Ferrando-Climent et al., 2012)
	carboxy-ibuprofène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3950	Espagne (riv Ter)	(Ferrando-Climent et al., 2012)
	carboxy-ibuprofène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
	Kétoprofène	23,3	Taiwan (estu)	(Jiang et al., 2014)	ND	Mexique (riv Apatlaco)	(Rivera-Jaimes et al., 2018)	9220	Afrique du Sud (riv Henley dam)	(Gumbi et al., 2017)	36,5	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
		107	Inde (riv Ganges)	(Sharma et al., 2019)	0,050	Canada (riv Detroit, Hamilton Harbour et autres)	(Metcalfe et al., 2010)	-	-	-	14	Royaume-Uni (riv Taff et riv Ely)	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)
		0,4	Chine (riv Pearl)	(Xie et al., 2019)	-	-	-	-	-	-	ND	Espagne (riv Llobregat)	(López-Roldán et al., 2010)

LOQ: limite de quantification; ND: non détectable

Suite Tableau 3. Concentrations en ng/L de RdM dans les eaux superficielles sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe)

		Asie			Amérique du Nord			Afrique			Europe		
Classe thérapeutique	**RdM**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**
Analgésiques/ Anti-inflammatoires	Diclofénac	32,7	Taiwan (estu)	(Jiang et al., 2014)	<MDL	Etats Unis (riv Delaware)	(Bean et al., 2018)	730	Kenya (riv Ngong')	(K'oreje et al., 2016)	4	Espagne (Mer Méditerranée)	(Gros et al., 2012)
		41,3	Inde (riv Ganges)	(Sharma et al., 2019)	352	Mexique (riv Apatlaco)	(Rivera-Jaimes et al., 2018)	< LOQ	Afrique du Sud (riv Mbokodweni)	(Madikizela and Chimuka, 2016)	52	Espagne (riv Onyar)	(Gros et al., 2012)
		ND	Chine (riv Pearl)	(Xie et al., 2019)	0,194	Canada (riv Detroit, Hamilton Harbour et autres)	(Metcalfe et al., 2010)	1010	Afrique du Sud (riv Nagle dam)	(Gumbi et al., 2017)	59,4	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
		3,3	Japon (riv Tone)	(Nakada et al., 2007)				-	-	-	358,1	Espagne (riv Llobregat)	(López-Roldán et al., 2010)
		30	Corée du Sud (riv Han)	(Yoon et al., 2010)	42	Etats Unis	(Deo, 2014)	-	-	-	261	Royaume-Uni (riv Taff et riv Ely)	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)
	Acetaminophène	4,17	India (riv Ganges)	(Sharma et al., 2019)	ND	Etats Unis (plusieurs riv Colorado	(Ferrer et al., 2010)	106970	Kenya (riv Ngong')	(K'oreje et al., 2016)	23	Espagne (Mer Méditerranée)	(Gros et al., 2012)
		16,7	Taiwan (estu)	(Jiang et al., 2014)	<MDL	Etats Unis (riv Delaware)	(Bean et al., 2018)	1740	Afrique du Sud (riv Msunduzi)	(Matongo et al., 2015b)	243	Espagne (riv Onyar)	(Gros et al., 2012)
		52	Japon (riv Tone)	(Nakada et al., 2007)	508	Mexique (riv Apatlaco)	(Rivera-Jaimes et al., 2018)	1780	Afrique du Sud (riv Umgeni)	(Matongo et al., 2015a)	542	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
		-	-	-	31	Etats Unis (stream New Jersey)	(Alvarez et al., 2005)	-	-	-	96,5	Espagne (riv Llobregat)	(López-Roldán et al., 2010)
		-	-	-	65	Etats Unis (riv Mississippi)	(Zhang et al., 2007)	-	-	-	2382	Royaume-Uni (riv Taff et riv Ely)	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)
Antibiotiques/ Anti-infectieuse	Ciprofloxacine	ND	Chine (riv Pearl)	(Xie et al., 2019)	<10	Etats Unis (stream New Jersey)	(Alvarez et al., 2005)	509	Kenya (riv Nairobi)	(Ngumba et al., 2016)	37.5	Italie (riv Po et riv Arno)	(Zuccato et al., 2010)
		108	Liban (plusieurs riv)	(Mokh et al., 2017)	ND	Etats Unis (plusieurs riv Colorado	(Ferrer et al., 2010)	-	-	-	20	Espagne (bassin de Xuquer)	(Vazquez-Roig et al., 2011)
		28,8	Inde (riv Ganges)	(Sharma et al., 2019)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ofloxacine	26	Chine (riv Pearl)	(Xie et al., 2019)	ND	Etats Unis (plusieurs riv Colorado	(Ferrer et al., 2010)	-	-	-	78,6	Espagne (riv Ebro)	(López-Serna et al., 2012)
		148	Liban (plusieurs riv)	(Mokh et al., 2017)	281	Etats Unis	(Deo, 2014)	-	-	-	1903,6	Espagne (riv Llobregat)	(López-Roldán et al., 2010)
		112	Chine (riv Haihe)	(Gao et al., 2012)	-	-	-	-	-	-	10.88	Italie (riv Po et riv Arno)	(Zuccato et al., 2010)

ND: non détectable; MDL: limite de détection de la méthode; LOQ: limite de quantification

Suite Tableau 3. Concentrations en ng/L de RdM dans les eaux superficielles sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe)

		Asie			Amérique du Nord			Afrique			Europe		
Classe thérapeutique	**RdM**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**
Antibiotiques/Anti-infectieuse	Sulfaméthoxazole	7,2	Japon (riv Tone)	(Nakada et al., 2007)	10,1	Etats Unis (riv Tennessee)	(Conley et al., 2008)	9640; 49562; 53828; 10568	riv urban: Ghana; Kenya; Monzambique; Afrique du Sud	(Segura et al., 2015)	3,03	Espagne (riv Ebro)	(López-Serna et al., 2012)
		7,24	Bangldesh (riv Brahmaputra)	(Hossain et al., 2018)	34	Etats Unis (stream New Jersey)	(Alvarez et al., 2005)	5320	Afrique du Sud (riv Msunduzi)	(Matongo et al., 2015b)	2	Royaume-Uni (riv Taff et riv Ely)	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)
		ND	Taiwan (estu)	(Jiang et al., 2014)	14,73	Etats Unis (riv Delaware)	(Bean et al., 2018)	6010	Afrique du Sud (riv Umgeni)	(Matongo et al., 2015a)	11.4	Italie (riv Po et riv Arno)	(Zuccato et al., 2010)
		27,5	Inde (riv Ganges)	(Sharma et al., 2019)	210	Etats Unis (plusieurs riv Colorado	(Ferrer et al., 2010)	33100	Kenya (riv Ngong')	(K'oreje et al., 2016)	119,3	Espagne (riv Llobregat)	(López-Roldán et al., 2010)
		61	Corée du Sud (riv Han)	(Yoon et al., 2010)	502	Mexique (riv Apatlaco)	(Rivera-Jaimes et al., 2018)	13765	Kenya (riv Nairobi)	(Ngumba et al., 2016)	53,3	Italie (estuaire Douro)	(Madureira et al., 2010)
		ND	Liban (plusieurs riv)	(Mokh et al., 2017)	-	-	-	-	-	-	144	Espagne (bassin de Xuquer)	(Vazquez-Roig et al., 2011)
		3,5	Chine (riv Pearl)	(Xie et al., 2019)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzodiazépines	Diazepam	75,5	Chine (riv Huangpu)	(Wu et al., 2015)	ND	Mexique (riv Apatlaco)	(Rivera-Jaimes et al., 2018)	100	Kenya (riv Kisat)	(K'oreje et al., 2016)	0,38	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
		0,65	Corée du Sud (riv Han)	(Yoon et al., 2010)	8	Etats Unis (ruisseau et riv Four)	(Skees et al., 2018)	-	-	-	2	Allemagne (plusieurs riv)	(Hummel et al., 2006)
		-	-	-	2,6	Etats Unis	(Deo, 2014)	-	-	-	3,65	Italie (estuaire Douro)	(Madureira et al., 2010)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	Royaume-Uni (riv Calder)	(Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011)
	Oxazepam	5,5	Chine (riv Huangpu)	(Wu et al., 2015)	34,5	Etats Unis (ruisseau et riv Four)	(Skees et al., 2018)	-	-	-	17,4	Royaume-Uni (riv Calder)	(Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011)
		-	-	-	42,9	Etats Unis (ruisseau et riv Four)	(Skees et al., 2018)	-	-	-	40	Allemagne (plusieurs riv)	(Hummel et al., 2006)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	51,0	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)

ND: non détectable

Suite Tableau 3. Concentrations en ng/L de RdM dans les eaux superficielles sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe)

		Asie			Amérique du Nord			Afrique			Europe		
Classe thérapeutique	**RdM**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**
Benzodiazépines	Oxazepam glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48,8	Espagne (riv Ebro)	(López-Serna et al., 2012)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	< LOQ	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
	Lorazepam	5,7	Chine (riv Huangpu)	(Wu et al., 2015)	19,7	Etats Unis (ruisseau et riv Four)	(Skees et al., 2018)	-	-	-	17,4	Espagne (riv Ebro)	(López-Serna et al., 2012)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	41,8	Espagne (Lagune Mar menor)	Moreno-González et al., 2015
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,02	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
Antidépresseurs	Venlafaxine	-	-	-	48	Canada (riv Saint Laurent)	(Lajeunesse et al., 2008)	D	Kenya (riv Ngong', Kisat et Auji)	(K'oreje et al., 2016)	52	Espagne (Mer Méditerranée)	(Gros et al., 2012)
		-	-	-	1000	Etats-Unis (riv South Platte)	(Schultz and Furlong, 2008)	-	-	-	45	Espagne (riv Onyar)	(Gros et al., 2012)
		-	-	-	690	Etats-Unis (Fourmile Ck)	(Schultz et al., 2010)	-	-	-	26,6	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
		-	-	-	340	Etats Unis (ruisseau et riv Four)	(Skees et al., 2018)	-	-	-	71,6	Royaume-Uni (riv Calder)	(Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011)
		-	-	-	1310	Etats Unis	(Deo, 2014)	-	-	-	27	Allemagne (bas. vers. Rhin)	(Schlüsener et al., 2015)
	N,O-didesmethyl venlafaxine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,4	Allemagne (bas. vers. Rhin)	(Schlüsener et al., 2015)
	O-desmethyl venlafaxine glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< LOQ	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
	O-desmethyl venlafaxine	-	-	-	69	Canada (riv Saint Laurent)	(Lajeunesse et al., 2008)	-	-	-	40	Allemagne (bas. vers. Rhin)	(Schlüsener et al., 2015)
		-	-	-	84	Etats Unis	(Deo, 2014)	-	-	-	33,9	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)

D: détectable; LOQ: limite de quantification

Suite Tableau 3. Concentrations en ng/L de RdM dans les eaux superficielles sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe)

		Asie			Amérique du Nord			Afrique			Europe		
Classe thérapeutique	**RdM**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**	**Cn max. (ng/L)**	**Lieu (rivière, mer, estuaire)**	**Références**
Régulateurs des lipides sanguins	Pravastatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75,5	Espagne (riv Ebro)	(López-Serna et al., 2012)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	77,7	Espagne (riv Llobregat)	(López-Roldán et al., 2010)
	Fenofibric acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70,3	Italie (estuaire Douro)	(Madureira et al., 2010)
β-Bloquants	Aténolol	ND	Taiwan (estu)	(Jiang et al., 2014)	10	Mexique (riv Apatlaco)	(Rivera-Jaimes et al., 2018)	-	-	-	11,2	Espagne (riv Ebro)	(López-Serna et al., 2012)
		46	Japon (riv Tone)	(Nakada et al., 2007)	859	Etats-Unis	(Deo, 2014)	-	-	-	6	Espagne (Mer Méditerranée)	(Gros et al., 2012)
		1,3	Inde (riv Ganges)	(Sharma et al., 2019)	1850	Etats-Unis (Denver)	(Bai et al., 2018)	-	-	-	26	Espagne (riv Onyar)	(Gros et al., 2012)
		150	Corée du Sud (riv Han)	(Yoon et al., 2010)	-	-	-	-	-	-	199,7	Espagne (riv Llobregat)	(López-Roldán et al., 2010)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	560	Royaume-Uni (riv Taff et riv Ely)	(Kasprzyk-Hordern et al., 2008)
	Propanolol	-	-	-	ND	Mexique (riv Apatlaco)	(Rivera-Jaimes et al., 2018)	-	-	-	0,5	Espagne (Lagune Mar menor)	(Moreno-González et al., 2015)
Substitutifs aux opiaces	Buprenorphine	-	-	-	ND	Etats Unis (riv Delaware)	(Bean et al., 2018)	-	-	-	ND	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
		-	-	-	< LOQ	Etats Unis (ruisseau et riv Four)	(Skees et al., 2018)	-	-	-	<MDL	Croatie (riv Sava)	(Krizman-Matasic et al., 2018)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	<MDL	Royaume-Uni (riv Calder)	(Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011)
	Buprénorphine glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	France (riv Seine)	(Brieudes et al., 2017)
	Norbuprénorphine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	Croatie (riv Sava)	(Krizman-Matasic et al., 2018)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	<MDL	Royaume-Uni (riv Calder)	(Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011)

Des disparités de concentrations et de molécules rapportées ont également été mis en évidence dans la classe thérapeutique des antibiotiques/anti-infectieux. La plus grande variation de concentration (de 509 ng/L à 53 828 ng/L) entre les molécules de cette classe thérapeutique a été enregistré en Afrique, suivie par l'Europe (de 2 ng/L à 1904 ng/L), l'Amérique du Nord (de < 10 ng/L à 502 ng/L) et l'Asie (de 3 ng/L à 148 ng/L). Le sulfaméthoxazole a fait l'objet de nombreuses études sur les 4 continents (au moins 5 publications par continent) et sa plus haute concentration a été trouvée en Afrique. Par contre, le plus haut niveau de contamination par l'ofloxacine a été constaté sur le continent européen et à ce jour, à notre connaissance, aucune étude ne l'a suivi en Afrique.

Dans le cas de la classe thérapeutique anti-épileptique, la carbamazépine a été étudiée sur les 4 continents et la concentration la plus élevée a été identifiée en Afrique. Les classes thérapeutiques benzodiazépines, antidépresseurs, régulateurs de lipides sanguins, β-bloquants et substitutifs aux opiaces ont principalement été surveillées en Europe et en Amérique du Nord.

Dans l'analyse des données issues du continent africain, il faut considérer que les informations sont rares et très récentes. Les études ont débuté en 2012 et ont été menées dans des pays comme le Ghana, le Kenya, le Mozambique, l'Afrique du Sud et l'Algérie (Fekadu et al, 2019). Les concentrations élevées de RdM dans les eaux de surface rapportées sur ce continent tendent à être similaires et dans certains cas supérieures à celles indiquées à la sortie des STEP (tableau 2). K'oreje et al (2016) suggèrent que des rejets domestiques directs provenant d'établissements informels sans installations sanitaires adéquates et les sorties industrielles (production pharmaceutique) sont potentiellement responsables de ce type de pollution. Ceci est réaffirmé par Segura et al. (2015) qui indiquent que la rareté des STEP dans des pays comme le Ghana, le Kenya, le Mozambique et l'Afrique du Sud pour traiter les eaux usées de zones à forte densité de population (urbaines et suburbaines) est une voie importante de contamination de RdM dans les eaux de surface.

Les habitudes de consommation peuvent également aider à comprendre les concentrations de RdM présentes dans les eaux de surface. Par exemple, dans le cas des antibiotiques/anti-infectieux, en 2008, seule la région de Nairobi, au Kenya, consommait environ 13 tonnes, ce qui est comparable aux 14 tonnes par an (maximum) consommées en Italie (K'oreje et al., 2012). Au Kenya, le sulfaméthoxazole est parmi les médicaments les plus consommés de cette classe thérapeutique en raison de sa facilité d'accès (sans ordonnance) et de son utilisation dans le traitement de diverses infections bactériennes (Ngumba et al., 2016). Par contre, dans le cas de l'analgésique codéine en Europe, Fekadu et ses collaborateurs (2019) ont indiqué que des pays comme l'Espagne, le Royaume-Unis et la France figurent parmi les 11 premiers pays où la codéine est le plus fréquemment signalée dans les milieux aquatiques. La même étude indique que la présence de ce RdM dans les eaux de surfaces européennes peut être liée à des facteurs tels que sa consommation (en fonction de la préférence de la population pour les analgésiques, des politiques de prescription et des stratégies marketing des entreprises pharmaceutiques) et sa faible biodégradabilité (taux d'élimination de 42% avec le traitement de boues activées) (Kasprzyk-Hordern et al., 2009).

.

En ce qui concerne les métabolites, les données disponibles dans la littérature scientifique sont limitées, comme c'est le cas dans les eaux usées, les pays européens mettant en avance la surveillance la plus importante.

Enfin, ces données confirment la présence d'une grande diversité des RdM dans les eaux de surface à des concentrations très variables dans les continents dûe principalement aux différences dans les habitudes de consommation et à l'existence ou non de modalités de gestion des eaux usées. Les données, bien qu'en croissance, restent encore parcellaires dans le continent africain.

4.2 Les eaux souterraines

Les eaux souterraines représentent la source d'eau douce pérenne la plus importante et la plus fiable de la planète et, dans de nombreuses régions du monde, c'est la plus importante source d'eau potable. Malgré son importance vitale, sa qualité est menacée par diverses sources de pollution, notamment l'infiltration d'eau polluée et la lixiviation des sites d'enfouissement comme nous l'avons mentionné dans la section 2 (figure 5). Au cours de la dernière décennie, de multiples études ont montré la présence de RdM dans les eaux souterraines de plusieurs pays, mais les informations disponibles sont rares par rapport aux autres systèmes aqueux (des eaux usées et des eaux de surface). Le tableau 4 illustre les concentrations maximales rencontrées pour les classes thérapeutiques les plus surveillés par la communauté scientifique dans ce milieu selon 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe).

Un peu plus de la moitié des molécules illustrées ont été identifiées au moins sur trois continents, principalement en Asie, Amérique du Nord et Europe. L'information sur les eaux souterraines du continent africain a été ponctuelle, spécifiquement dans la ville de Nairobi et Kisumu (K'oreje et al., 2016). Les anti-épileptiques, les analgésiques/AINS et les antibiotiques/anti-infectieux ont été les classes thérapeutiques les plus couramment surveillées sur les 4 continents. A partir des données du tableau 4, nous pouvons dire que la grande majorité des sources d'eau souterraine étudiées ont montré des concentrations en RdM faibles et similaires entre les continents, possiblement en raison des mécanismes naturels d'atténuation et de dilution. Toutefois, des concentrations de RdM de l'ordre de centaines de ng/L, parfois même des milliers peuvent être signalés, dues à la proximité de sources contaminées directes (exemple recharge artificielle) et indirectes (exemple eaux de surface) (Lapworth et al., 2012). Par exemple, des concentrations importantes rapportées par Barnes et al. (2008) pour les analgésiques/AINS ibuprofène (3110 ng/L), acétaminophène (380 ng/L) et l'antibiotique/anti-infectieux sulfaméthoxazole (1110 ng/L) sont dues au fait que les zones d'échantillonnage étaient sensibles à la contamination par des eaux usées animales ou humaines (c'est-à-dire sur la pente d'un enfouissement, dans un développement résidentiel sans égout ou dans un parc d'engraissement pour animaux) (Barnes et al., 2008). Similairement, l'étude de López-Serna et al. (2013), sur des eaux souterraines sous-jacentes à la métropole de Barcelone, en Espagne indique des niveaux de contamination très élevés d'une centaine à plusieurs centaines de ng/L de carbamazépine (136 ng/L), ibuprofène (988 ng/L), diclofénac (380 ng/L), ciprofloxacine (443 ng/L) et ofloxacine (367 ng/L).

Tableau 4. Concentrations en ng/L de RdM dans les eaux souterraines sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe)

		Asie			Amérique du Nord			Afrique			Europe		
Classe thérapeutique	**RdM**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Références**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Références**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Références**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Références**
Anti-épileptiques	Carbamazépine	41	Serbie	(Radović et al., 2015)	99,7	Mexique	(Lesser et al., 2018)	40	Kenya (Kisumu)	(K'oreje et al., 2016)	83	France	(Lopez et al., 2015)
		27,2	Inde	(Sharma et al., 2019)	72	États-Unis (Massachusetts)	(Schaider et al., 2014)	-	-	-	136	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)
		86	Inde	(Lapworth et al., 2018)	48,2	Canada (Alberta et Ontario)	(Stempvoort et al., 2013)	-	-	-	n.d.	Italie	(Meffe and Bustamante, 2014)
Analgésiques/ Anti-inflammatoires	Codéine	-	-	-	ND	États-Unis	(Barnes et al., 2008)	-	-	-	12	France	(Lopez et al., 2015)
		-	-	-	214	États-Unis	(Deo and Halden, 2013)	-	-	-	24	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)
	Ibuprofène	57,9	Chine (Guangzhou)	(Peng et al., 2014)	ND	Mexique	(Lesser et al., 2018)	-	-	-	67	France	(Lopez et al., 2015)
		49,4	Inde	(Sharma et al., 2019)	25,1	Canada (Alberta et Ontario)	(Stempvoort et al., 2013)	-	-	-	ND	Italie	(Meffe and Bustamante, 2014)
		-	-	-	3 110	États-Unis	(Barnes et al., 2008)	-	-	-	988	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)
	1-hydroxy-ibuprofène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	France	(Lopez et al., 2015)
	carboxy-ibuprofène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	274	France	(Lopez et al., 2015)
	Kétoprofène	23,4	Inde	(Sharma et al., 2019)	-	-	-	-	-	-	354	France	(Lopez et al., 2015)
		4,1	Chine	(Li et al., 2015)	-	-	-	-	-	-	8	Suisse (Système karstique)	(Morasch, 2013)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	Italie	(Meffe and Bustamante, 2014)
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	215	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)
	Diclofénac	1.56	Inde	(Sharma et al., 2019)	46	États-Unis	(Deo and Halden, 2013)	-	-	-	380	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)
		<LOQ	Chine (Guangzhou)	(Peng et al., 2014)	-	-	-	-	-	-	24	France	(Lopez et al., 2015)
		9,2	Inde	(Lapworth et al., 2018)	-	-	-	-	-	-	ND	Italie	(Meffe and Bustamante, 2014)
		17	Singapour	(Tran et al., 2014)	-	-	-	-	-	-	3	Suisse (Système karstique)	(Morasch, 2013)

LOQ: limite de quantification. ND: non détect

Suite Tableau 4. Concentrations en ng/L de RdM dans les eaux souterraines sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe)

		Asie			Amérique du Nord			Afrique			Europe		
Classe thérapeutique	**RdM**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Références**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Références**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Références**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Références**
Analgésiques/ Anti-inflammatoires	Acetaminophène	1,92	Inde	(Sharma et al., 2019)	ND	Mexique	(Lesser et al., 2018)	30	Kenya (Kisumu)	(K'oreje et al., 2016)	481	France	(Lopez et al., 2015)
		4,689	Singapour	(Tran et al., 2014)	380	États-Unis	(Barnes et al., 2008)	-	-	-	9	Suisse Système karstique)	(Morasch, 2013)
		-	-	-	1,890	États-Unis	(Deo and Halden, 2013)	-	-	-	ND	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)
Antibiotiques/ Anti-infectieuse	Ciprofloxacine	ND	Chine (Guangzhou)	(Peng et al., 2014)	ND	Mexique	(Lesser et al., 2018)	-	-	-	43	France	(Lopez et al., 2015)
		5,4	Chine (Plaine Jianghan)	(Tong et al., 2014)	71,1	Canada (Alberta et Ontario)	(Stempvoort et al., 2013)	-	-	-	443	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)
		-	-	-	45	États-Unis		-	-	-	-	-	-
	Ofloxacine	7,6	Chine (Plaine Jianghan)	(Tong et al., 2014)	27,8	Canada (Alberta et Ontario)	(Stempvoort et al., 2013)	-	-	-	367	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)
		44,2	Chine (Guangzhou)	(Peng et al., 2014)	1,85	Mexique	(Lesser et al., 2018)	-	-	-	28	France	(Lopez et al., 2015)
	Sulfaméthoxazole	ND	Serbie	(Radović et al., 2015)	46,6	Mexique	(Lesser et al., 2018)	30	Kenya (Kisumu)	(K'oreje et al., 2016)	17	Suisse (Système karstique)	(Morasch, 2013)
		124,5	Chine (Guangzhou)	(Peng et al., 2014)	458	Canada (Alberta et Ontario)	(Stempvoort et al., 2013)	-	-	-	42,8	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)
		0,8	Chine (Plaine Jianghan)	(Tong et al., 2014)	113	États-Unis (Massachusetts)	(Schaider et al., 2014)	-	-	-	43	France	(Lopez et al., 2015)
		4,13	Inde	(Sharma et al., 2019)	1 110	États-Unis	(Barnes et al., 2008)	-	-	-	80	Italie	(Meffe and Bustamante, 2014)
		34	Inde	(Lapworth et al., 2018)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzodiazépines	Diazepam	ND	Serbie	(Radović et al., 2015)	ND	Mexique	(Lesser et al., 2018)	D	Kenya (Kisumu)	(K'oreje et al., 2016)	23,5	Italie	(Meffe and Bustamante, 2014)
		-	-	-	ND	États-Unis	(Deo and Halden, 2013)	-	-	-	35,1	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)
	Oxazepam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42,02	France	(Lopez et al., 2015)
	Oxazepam glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)
	Lorazepam	ND	Serbie	(Radović et al., 2015)	-	-	-	-	-	-	54	Espagne (Barcelone)	(López-serna et al., 2013)

ND: non détectable; D: détectable

Suite Tableau 4. Des concentrations en ng/L de RdM dans les eaux souterraines sur 4 continents (Asie, Amérique du Nord, Afrique et Europe)

		Asie			Amérique du Nord			Afrique			Europe		
Classe thérap.	**RdM**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Référ.**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Référ.**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Référ.**	**Cn max (ng/L)**	**Lieu**	**Référ.**
Antidépresseur	Venlafaxine	-	-	-	-	-	-	D	Kenya (Kisumu)	(K'oreje et al., 2016)	-	-	-
	O-desmethyl venlafaxine	-	-		-	-	-	-	-	-	62	France	(Lopez et al., 2015)
Régulateurs des lipides sanguins	Pravastatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,2	Espagne	(López-serna et al., 2013)
	Fenofibric acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	149	France	(Lopez et al., 2015)
β-Bloquants	Aténolol	<MDL	Inde	(Sharma et al., 2019)	ND	Mexique	(Lesser et al., 2018)	-	-	-	10	France	(Lopez et al., 2015)
		0,3	Inde	(Lapworth et al., 2018)	0,8	États-Unis	(Schaider et al., 2014)	-	-	-	ND	Espagne	(López-serna et al., 2013)
		-	-	-	NA	États-Unis	(Deo and Halden, 2013)	-	-	-	ND	Italie	(Meffe and Bustamante, 2014)

ND: non détectable; D: détectable; MDL: limite de détection de la méthode

Il faut souligner que pour comprendre le devenir des RdM dans les eaux souterraines, il faut tenir compte de l'interaction entre les facteurs suivants: temps de séjour, population microbienne ainsi que les propriétés physico-chimiques des RdM.

Cet aperçu met en évidence la présence des RdM dans les eaux souterraines, parfois avec des hautes concentrations. Par rapport à autres systèmes aqueux, l'occurrence et la distribution des RdM dans les eaux souterraines sont peu caractérisées et particulièrement pour le continent Africain.

5. Bioaccumulation et occurrence des RdM dans le biote

Les données présentées au cours de ce chapitre confirment l'ubiquité des RdM dans les milieux aquatiques pour une large gamme de concentrations et de molécules. L'exposition continue des organismes aquatique (exemple les bivalves) à ces substances peut favoriser leur bioaccumulation et interroge quant à leurs impacts sur ces organismes non cibles.

La bioaccumulation est le processus qui tient compte de l'accumulation dans le temps des RdM dans le biote (plantes et animaux) par différents mécanismes comme l'absorption directe dans l'eau par les branchies ou la peau (bioconcentration), par l'absorption des particules en suspension (ingestion) et par consommation d'aliments contaminés (biomagnification). Une étude réalisée par Howard et Muir (2011) a évalué le potentiel de bioaccumulation de 3193 RdM dans les organismes, en utilisant des relations quantitatives de propriété de structure (QSPR) et le jugement scientifique. Sur les 3193

RdM, 275 composés de différentes classes thérapeutiques comme des antibiotiques, des anti-inflammatoires non stéroïdiens, des antidépresseurs, des antihypertenseurs, des antiépileptiques et des contraceptifs ont été détectés dans l'environnement et parmi ceux-ci, 92 RdM ont été classés comme potentiellement bioaccumulables (Howard et Muir, 2011). Des études ont montré que l'accumulation de RdM dans les organismes dépend de multiples facteurs tels que l'habitat, la stratégie respiratoire, l'état reproducteur, le stade de vie, le contenu lipidique et la taille de l'organisme ainsi que les conditions environnementales (pH, température et présence de colloïdes) (Arnot and Gobas, 2006; Liu et al., 2011; Meredith-Williams et al., 2012; Yang et al., 2011) et le coefficient de distribution octanol-eau (Kow) du RdM, ce dernier étant le facteur principal à prendre en compte pour expliquer la bioaccumulation (OECD, 2008).

Plusieurs études ont montré que certains antidépresseurs (example: fluoxétine, sertraline, venlafaxine, citalopram entre autres) s'accumulaient dans différents tissus (principalement le foie et le cerveau) des espèces comme le poisson-chat (*Ictalurus punctatus*) (Brooks et al., 2005), le cappie noir (*Pomoxis nigromaculatus*) (Brooks et al., 2005), le bluegill (*Lepomis macrochirus*) (Brooks et al., 2005; Ramirez et al., 2007), la carpe commune (*Cyprinus carpio*) (Brooks et al., 2005; Ramirez et al., 2009), le poisson-castor (*Amia calva*) (Ramirez et al., 2009), le meunier noir (*Catostomus commerson*) (Ramirez et al., 2009; Schultz et al., 2010), le buffle à petite bouche (*Ictiobus bubalus*) (Ramirez et al., 2009) et la truite (*Salmo trutta*) (Du et al., 2012) qui vivent dans des cours d'eau ou des estuaires dominés par les sorties de STEP.

D'autres classes thérapeutiques de RdM ont également tendance à se bioaccumuler dans les poissons d'eau douce. Par exemple, une étude de Liu et al. (2015) ont évalué l'accumulation de certains antibiotiques (roxithromycine, érythromycine et kétoconazole), anti-inflammatoires (ibuprofène et diclofénac); β-bloquant (propranolol), antiépileptique (carbamazépine) et hormones stéroïdes (17 α-éthinylestradiol) dans différents tissus (muscle, branchies, foie et cerveau) de deux espèces de poissons sauvages (*Hemiculter leucisculus et Carassius auratus*) recueillies dans des rivières en aval de quatre STEP en Chine (Nanjing) (Liu et al., 2015). Les auteurs ont détecté les RdM: roxithromycine (1,2 ng/g poids humide (wet weight (ww) en anglais) - 41,2 ng/g ww), érythromycine (0,3 ng/g ww - 25,7 ng/g ww), carbamazépine (< LOQ - 1,6 ng/g ww) et diclofénac (0,1 ng/g ww - 8,6 ng/g ww) dans tous les tissus étudiés. Le 17 α-éthinylestradiol a été principalment détecté dans le foie (ND - 57,1 ng/g ww) et le cerveau (ND - 23,4 ng/g ww) tandis que le kétoconazole n'a été trouvé que dans le muscle (ND - 5,0 ng/g ww).

Dans le cas des organismes marins, la disponibilité des données sur la bioaccumulation de RdM est limitée. Les études ont porté principalement sur les mollusques comme les bivalves (Pazdro et al., 2015) (Tableau 5). Les bivalves, tels que les moules sont des organismes sédentaires qui se nourrissent par filtration et sont largement répandues sur les côtes maritimes (Wille et al., 2011). La moule est considérée comme une excellente sentinelle pour la surveillance de RdM biodisponibles puisqu'elle peut bioaccumuler ces substances par ses branchies et/ou son tube digestif (Gomez et al., 2012). Cet organisme marin a fait l'objet d'études récentes (Tableau 5). Les antibiotiques/anti-infectieux ont été la classe thérapeutique la plus étudiée par nombre de composés et de publications.

Tableau 5. Concentrations les plus élevées de RdM signalées dans les organismes marins dans la littérature (ng/g poids sec (dw en anglais) ou poids humide* (ww en anglais))

Classe thérapeutique	RdM	Cn max (ng/g) dw or ww *	Organisms	Espèces	Lieu	References
Anti-épileptiques	Carbamazépine	11	bivalve	*Mytilus edulis*	Belge	(Wille et al., 2011)
		2,3	Coquille spiralée, bivalve	*Murex trunculus, Pinna nobilis, Cerastoderma glaucum*	Espagne	(Moreno-González et al., 2016)
		2,1	Oyster, bivalve	*Crassostrea gigas, Chamelea gallina, Mytilus galloprovincialis*	Espagne	(Alvarez-Muñoz et al., 2015a)
	10-11-epoxy carbamazepine	1,3	Oyster, bivalve	*Crassostrea gigas, Chamelea gallina, Mytilus galloprovincialis*	Espagne	(Alvarez-Muñoz et al., 2015a)
	2-hydroxy carbamazepine	1,3	Oyster, bivalve	*Crassostrea gigas, Chamelea gallina, Mytilus galloprovincialis*	Espagne	(Alvarez-Muñoz et al., 2015a)
Analgésiques/ Anti-inflammatoires	Acetaminophène	115	bivalve	*Mytilus edulis*	Belge	(Wille et al., 2011)
	acide salicylique	490	bivalve	*Mytilus edulis*	Belge	(Wille et al., 2011)
Antibiotiques/ Anti-infectieuse	Sulfaméthazine	430	bivalve	*Mytilus* spp.	États-Unis	(Dodder et al., 2014)
		3,93*	Oyster, bivalve	*Crassostrea gigas, Patinopecten yessoensis, Chlamys farreri*	Chine	(Na et al., 2013)
	Sulfaméthoxazole	2,27*	Oyster, bivalve	*Crassostrea gigas,Patinopecten yessoensis, Chlamys farreri*	Chine	(Na et al., 2013)
	Azithromycin	3,1	Oyster, bivalve	*Crassotrea gigas, Chamelea gallina, Mytilus galloprovincialis*	Espagne	(Alvarez-Muñoz et al., 2015a)
		13,6	bivalve	*Mytilus galloprovincialis*	Italie	(Álvarez-Muñoz et al., 2015b)
		12,0	bivalve	*Mytilus spp.*	Portugal	(Álvarez-Muñoz et al., 2015b)
	Sulfameter	42,97*	Oyster, bivalve	*Crassostrea gigas, bivalve Patinopecten yessoensis, Chlamys farreri*	Chine	(Na et al., 2013)
	Sulfamerazine	16,69*	Oyster, bivalve	*Crassostrea gigas, Patinopecten yessoensis,Chlamys farreri*	Chine	(Na et al., 2013)
	Oxytetracycline	9,45*	Oyster, bivalve	*Crassostrea gigas, Patinopecten yessoensis, Chlamys farreri*	Chine	(Na et al., 2013)
	Chloramphenicol	3,23*	Oyster, bivalve	*Crassostrea gigas, Patinopecten yessoensis,Chlamys farreri*	Chine	(Na et al., 2013)
	Loméfloxacine	170	bivalve	*Mytilus* spp.	États-Unis	(Dodder et al., 2014)
	Ofloxacin	65	bivalve	*Mytilus edulis*	Belge	(Wille et al., 2011)
		18	bivalve	*Mytilus* spp.	États-Unis	(Dodder et al., 2014)
β-Bloquants	Aténolol	13	bivalve	*Mytilus* spp.	États-Unis	(Dodder et al., 2014)
	Propranolol	52	bivalve	*Mytilus edulis*	Belge	(Wille et al., 2011)
Antidépresseurs	Sertraline	5,5	bivalve	*Mytilus* spp.	États-Unis	(Dodder et al., 2014)
	Venlafaxine	2,7	bivalve	*Mytilus galloprovincialis*	France	(Martínez Bueno et al., 2014)
		40,1	bivalve	*Mytilus galloprovincialis*	Italie	(Álvarez-Muñoz et al., 2015b)
		9,2	bivalve	*Mytilus spp.*	Portugal	(Álvarez-Muñoz et al., 2015b)
		3,4	Oyster, bivalve	*Crassostrea gigas, Chamelea gallina, Mytilus galloprovincialis*	Espagne	(Alvarez-Muñoz et al., 2015a)
		2,7	Coquille spiralée, bivalve	*Murex trunculus, Pinna nobilis, Cerastoderma glaucum*	Espagne	(Moreno-González et al., 2016)
	N-desmethylvenlafaxine	3,0	bivalve	*Mytilus galloprovincialis*	France	(Martínez Bueno et al., 2014)
	N,O-didesmethylvenlafaxine	3,5	bivalve	*Mytilus galloprovincialis*	France	(Martínez Bueno et al., 2014)
	O-desmethylvenlafaxine	3,7	bivalve	*Mytilus galloprovincialis*	France	(Martínez Bueno et al., 2014)
		4,4	bivalve	*Mytilus galloprovincialis*	Italie	(Álvarez-Muñoz et al., 2015b)
		4,9	bivalve	*Mytilus spp.*	Portugal	(Álvarez-Muñoz et al., 2015b)
		1,4	Oyster, bivalve	*Crassostrea gigas, Chamelea gallina, Mytilus galloprovincialis*	Espagne	(Alvarez-Muñoz et al., 2015a)

dw: dry weight; ww: wet weight

Cette classe thérapeutique a montré des concentrations entre 2,1 ng/g dw et 430 ng/g dw ou entre 2,27 ng/g ww et 42,97 ng/g ww. La carbamazépine avec des concentrations maximales de 2,3 ng/g dw ((Moreno-González et al., 2016) et la venlafaxine à 40,1 ng/g dw ((Álvarez-Muñoz et al., 2015b) étaient les plus fréquemment signalés, parmi les RdM. Les composés qui présentent les concentrations les plus élevées sont l'acide salicylique (490 ng/g dw) dans les moules *Mytilus edulis* de la marina d'Ostende en Belgique (Wille et al., 2011) et la sulfaméthazine (430 ng/g ww) dans les moules de la côte californienne en l'Etats-Unis (Dodder et al., 2014). Par ailleurs, la présence de métabolites de carbamazépine (Alvarez-Muñoz et al., 2015a) et de venlafaxine (Alvarez-Muñoz et al., 2015a,b; Martínez Bueno et al., 2014) a été mise en évidence dans les tissus de moules. Dans le cas de la venlafaxine, Martínez Buenos et al. (2014) ont évalué les cinq métabolites de phase I identifiés chez l'homme (voir section 1.2) dans les moules *Mytilus galloprovincialis* en France. Quatre métabolites ont été détectés: ODV (3,7 ng/g dw), NODDV (3,5 ng/g dw), NNDDV (3,8 ng/g dw) et NDV (3,0 ng/g dw), ce dernier étant le plus fréquemment détecté. Les preuves de l'accumulation de ces métabolites dans les moules mettent en évidence la nécessité de déterminer si l'origine de ces composés est le résultat de l'absorption directe d'eau ou de la métabolisation par cet organisme marin. Comme tout être vivant, la moule possède un système métabolique et la glande digestive est l'organe responsable de son activité métabolique. Une étude réalisée par Howell et al. (1993) a démontré que le profil métabolique de la venlafaxine variait considérablement d'une espèce à l'autre. L'ODV est le principal métabolite chez l'homme, mais pas chez la souris, le rat, le chien ou le singe (Howell et al., 1993). Par conséquent, il n'est pas approprié de supposer les mêmes réactions métaboliques chez les moules et chez l'homme. Jusqu'à présent, les études des métabolites de la venlafaxine chez la moule ont été éffectuée par l'approche ciblée, sur la base des métabolites déjà renseignés dans la littérature, notamment du métabolisme chez l'homme. Toutefois, pour déterminer si la moule exposée à la venlafaxine est capable de générer d'autres métabolites de phase I ou de phase II, autres que ceux identifiés chez l'homme, une approche non ciblée doit être appliquée.

6. Conclusions associées à la présence des RdM dans l'environnement aquatique et perspectives de recherche

L'étude de la bibliographie effectuée dans ce chapitre nous a permis de mettre en évidence que les RdM sont présents dans les eaux superficielles et souterraines des deux hémispheres de la planète, générant une exposition chronique des organismes du milieu aquatique. La surveillence de ces composés dans les matrices aquatiques a commencé il y a deux dizaines d'années, notamment dans les pays développés (des continents d'Amérique du Nord et Europe). Plus récemment, les études de ces composés se sont multipliées en Asie, tandis que sur le continent africain les informations scientifiques restent très rares et ponctuelles. Les classes thérapeutiques les plus couramment suivies sont les analgésiques/AINS et les antibiotiques/anti-infectieux avec des concentrations entre quelques ng/L et plusieurs centaines de ng/L en Asie, Amérique du Nord et Europe tandis qu'en Afrique, particulièrement dans les eaux de surface, les concentrations maximales signalées atteignent plusieurs dizaines de milliers de ng/L. Les habitudes de consommation et l'existence ou non de modalités de gestion des eaux usées sont des facteurs qui pourraient justifier ces différences de concentration des RdM entre les continents. En fait, les concentrations élevées des résidus de médicaments mesurées dans les eaux de surface africaines, par rapport à d'autres retrouvées en Europe, témoignent de situations avec de fortes pressions anthropiques sur ses ressources d'eau et soulèvent la question de l'exposition potentielle des populations humaines aux RdM et les risques sanitaires associés.

Dans le biote, la disponibilité de l'information sur l'occurrence de RdM dans les organismes marins est limitée par rapport à celle rapportée dans les matrices aqueuses. Les efforts plus importants pour renseigner sur la présence de ces composés dans les organismes marins, notamment les bivalves, sont concentrés dans des pays européens tels que: Espagne, Belgique, Italie, Portugal et France. La majorité des études réalisées sur les bivalves indique une capacité de bioaccumulation des antibiotiques/anti-infectieux et des antidépresseurs. La question soulevée alors est les risques pour les organismes exposés sachant que les cibles biologiques, cibles d'action du médicament, peuvent être partagées avec des organismes non cibles. A titre d'exemple, la sérotonine et la dopamine sont des neurotransmetteurs retrouvés chez beaucoup d'organismes aquatiques. L'impact des inhibiteurs de la recapture de la serotonine et de la noradrenaline suite des organismes non cibles est à étudier. Des études ont démontré que l'antedépresseur fluoxétine affecte le frai et la libération larvaire chez les bivalves (Hazelton et al., 2013; Lazzara et al.2012). Cela pose la question sur les effets potentiels des autres antidepresseur capables de se bioccumuler dans les bivalves. Les invertébrés aquatiques, comme les bivalves, possèdent des transporteurs et des récepteurs sensibles à la sérotonine, la dopamine et la noradrénaline et pourraient être affectés par les antidépresseurs, qui sont conçus pour moduler certains de ces systèmes. Par ailleurs, très peu d'études se sont intéressées à la métabolisation des RdM chez les bivalves. Dans le cas de l'antidépresseur venlafaxine, à notre connaissance, seule deux études de sa métabolisation ont été réalisées chez la moule, par approche ciblée permettant le suivi les métabolites de phase I connus, déjà renseignés dans la littérature, notamment chez l'homme.

La diversité de RdM (entre des molécules mères, des métabolites et des produits de transformation) présent dans l'environnement aquatique pose des enjeux pour les méthodologies d'analyse et les équipements de laboratoire. La variété des propriétés physico-chimiques de ces composés ainsi que leur faible concentration (des traces) et les matrices complexes sont des facteurs qui compliquent le développement d'outils fiables permettant leur identification et leur analyse dans différents compartiments du milieu aquatique (eaux et organismes). Les approches ciblées et plus récemment, les approches non ciblées à l'aide de la chromatographique liquide couplée à la spectrométrie de masse sont utilisées pour renseigner l'état de contamination des eaux et des organismes marins sur les produits pharmaceutiques. Ces aspects seront dévéloppés en détail au chapitre 2.

Dans ce contexte, ce travail doctoral avait deux objectifs: 1) renseigner les niveaux de contamination des eaux de surface et des eaux souterraines par les résidus de médicaments dans une ville africaine soumise à une forte pression antrophique et de rechercher les modalités d'exposition indirecte des populations humaines en fonction des usages de l'eau. Ce travail a été réaliser dans la ville africaine Yaoundé, au Cameroun et 2) d'améliorer les connaissances sur le métabolisme de l'antidépresseur venlafaxine dans un organisme marin, la moule afin d'identifier des métabolites qui pourraient être impliqués dans des effets qui pourraient être observés. La problématique effet n'est pas abordée dans ce projet de thèse.

Pour répondre au premier objectif, une méthode d'analyse ciblée, contenant des produits pharmaceutiques et des métabolites appartenant à huit classes thérapeutiques, a été développé dans des matrices aqueuses et appliquée dans les eaux de surface et souterraines de la ville de Yaoundé, Cameroun. Cette méthode avait pour objectif de rendre compte de la diversité des classes thérapeutiques et de rendre compte de la présence de métabolites souvent absents des travaux de présence des RdM dans les eaux.

Pour répondre au deuxième objectif, une approche non ciblée a été développée afin de caractériser sans a priori le métabolisme de la venlafaxine chez la moule meditteranéenne. En complément de cette approche non ciblée, une approche ciblée a été conduite afin d'optimiser les méthodes d'extraction tissulaire sur les métabolites renseignés à ce jour chez l'homme et chez la moule.

Chapitre 2: Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse: analyse des résidus de médicaments et des métabolites par approche ciblée et non ciblée

1. Introduction

L'identification et la quantification des RdM, leurs métabolites et leur produits de transformation dans l'environnement aquatique (milieu et organismes) sont complexes, cela est en partie due à la variabilité des structures et des propriétés physico-chimiques de ces molécules, sans négliger leurs faibles concentrations rapportées dans les publications scientifiques, parfois à l'état de traces voire d'ultra-traces et les difficultés inhérentes aux matrices environnementales (ex: pH, présence de colloïdes et contenu lipidique) comme il a été évoquée dans la chapitre précédent.

Cependant, grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes analytiques et de l'équipement des laboratoires permettant de mesurer les RdM en matrices aqueuses et en biota ainsi que l'évolution des outils informatiques de prédiction et de traitement des données; un développement constant des approches ciblées et non ciblées généralement effectuées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a été observé ces dernières années.

L'approche ciblée est une analyse quantitative qui permet d'identifier et quantifier des molécules préalablement sélectionnées par des méthodes analytiques à l'aide des standards analytiques. Cette approche est largement utilisée dans la surveillance de la qualité de l'eau à l'aide d'une liste de RdM considérés comme prioritaires. Dans le cas de l'approche non ciblée, les analyses sont qualitatives et permettent d'identifier la présence de molécules qui n'étaient pas préalablement ciblées. Récemment, cette approche a gagné en pertinence dans l'élucidation de petites molécules comme les RdM, leurs métabolites et leurs produits de transformation dans les matrices environnementales. L'une des applications de cette approche est mise en évidence dans la caractérisation du métabolisme de RdM dans le biote.

Dans les sections suivantes, nous allons développer plus en détail ces deux approches.

2. Approche ciblée

2.1 Généralites

Le but de l'approche ciblée est d'identifier et de quantifier des molécules connues et présélectionnées dans une matrice donnée. Cette approche est basée sur des développements et optimisations analytiques à partir de standards analytiques qui garantissent des niveaux de sensibilité, de spécificité, de répétabilité et des intervalles de linéarité optimaux. Des étapes telles que la préparation des échantillons, la séparation et l'analyse sont inhérentes au processus de mesure des RdM. Des exemples de méthodologies analytiques développées pour étudier la présence de RdM et leurs metabolites dans les eaux de surface et les tissus des organismes marins tels que les bivalves sont résumés dans le tableau 6.

2.1.1 Préparation des échantillons: prétraitement et extraction/purification

La détection des RdM dans les eaux et les tissus nécessite leur extraction et leur préconcentration préalables dans les matrices données en raison des faibles concentrations auxquelles elles sont présentes dans l'environnement et d'éliminer les composants non désirés de la matrice. Cette étape est connue comme la préparation de l'échantillon, qui comprend à son tour les processus de prétraitement et d'extraction/purification comme illustré par le tableau 6.

Un des prétraitements pour les matrices aqueuses est l'élimination des matières en suspension principalement par filtration à l'aide de différents matériaux et tailles de pores, parfois en combinaison avec l'acidification pour stabiliser la forme ionisée des analytes et aussi l'ajout d'un agent chélatant. Dans le cas des échantillons de tissus d'organismes, les techniques d'homogénéisation et de séchage, principalement par lyophilisation, sont essentielles pour assurer la représentativité des résultats. L'ajout d'une quantité connue de molécules deutérées avant et/ou après le processus d'extraction est la démarche la plus souvent réalisé dans des matrices aqueuses et tissulaires. Ces molécules deutérées sont utilisées comme des étalons internes dans le processus de quantification pour corriger les potentielles pertes des RdM étudiés pendant le processus d'extraction et pour corriger l'effet matrice (Brieudes et al., 2017).

Dans le cas de l'extraction/purification, les procédures retenues dépendent du RdM étudié et de la matrice d'intérêt. La technique d'extraction en phase solide (SPE) est la plus utilisée pour isoler et concentrer les RdM des échantillons d'eau avec les cartouches Oasis® HLB. Le succès de ce type d'adsorbant s'explique par son greffage de N-vinylpyrrolidone-divinylbenzène, constitué d'un site hydrophile (N-vinylpyrrolidone) et d'un site hydrophobe (divinylbenzène), qui permet des mécanismes de rétention favorables pour ces deux interactions (Fontanals et al., 2005). Dans certains cas, des adsorbants ayant des propriétés d'échanges cationiques (exemple la cartouche OASIS MCX) sont utilisés. L'échantillon aqueux est alors chargé en conditions acides afin que les RdM d'intêrets puissent être retenus et l'élution est effectuée dans des conditions basiques (Togola and Budzinski, 2008).

Les échantillons de tissus nécessitent des procédures d'extraction/purification plus poussées par rapport aux échantillons d'eau, en raison d'une part de la haute complexité de la matrice biologique, notamment riche en composants indésirables (lipides, protéines et pigments) qui pourraient interférer avec l'analyse, et d'autre part de la faible concentration des RdM, qui sont généralement présents à des niveaux de traces. Les techniques d'extraction par liquide pressurisé (PLE en anglais) et/ou par agitation sont souvent utilisées, les deux utilisant des solvants organiques tels que l'acétonitrile ou le méthanol utilisées (tableau 6). Ces techniques d'extraction ont été combinées avec diverses techniques de purification, notamment SPE et QuEChERS, cette dernière technique est un acronyme pour Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe. Elle consiste à rajouter des sels à la matrice d'intérêt qui aura été mélangée au préalable dans un solvant apolaire.

2.1.2 Analyse: séparation et détection

Le Tableau 6 montre que l'analyse des RdM dans les eaux de surface et les organismes marins (bivalves) est couramment effectuée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Pour les composés polaires, non volatiles et thermolabiles comme les RdM, les méthodes de séparation par LC sont plus adaptées par rapport aux méthodes par la chromatographie en phase gazeuze. La séparation des RdM est fréquemment réalisée par chromatographie en phase inverse à l'aide de colonnes de chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Björlenius et al., 2018; Dodder et al., 2014) ou de chromatographie liquide ultra performance (UPLC) (Gros et al., 2012; Wille et al., 2011). L'acétonitrile (ACN) et le méthanol (MeOH) sont largement utilisés dans les phases mobiles pour la séparation chromatographique des RdM (Boleda et al., 2013; Brieudes et al., 2017; Serra-Compte et al., 2018), souvent accompagnés de modifiants tels que l'acide formique ou l'acétate d'ammonium. Ces modifiants sont utilisés pour stabiliser le pH et obtenir une meilleure forme de pic et reproductibilité, ainsi que pour favoriser l'ionisation lorsque la spectrométrie de masse (MS) est utilisée comme méthode de détection. La MS permet de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur masse et de fragments spécifiques et ainsi de caractériser leur structure chimique. Des ions moléculaires des RdM susceptibles d'être détectés par la MS sont principalement produits par ionisation par électrospray (ESI) en mode positif et négatif (Álvarez-Muñoz et al., 2015). Les ions formés dans la source d'ionisation ou dans la chambre de collision sont séparés selon leur rapport masse (m) sur charge (z) avant d'arriver au détecteur qui compte et amplifie le signal émis par les ions. Ce signal est alors traité informatiquement afin d'obtenir un spectre de masse qui correspond à un graphique représentant l'intensité des ions en fonction de leur rapport m/z. La détermination par MS de ces ions est réalisée avec différents analyseurs tels que le triple quadripôle, la trappe d'ions et l'analyseur à temps de vol (Menet, 2011). Le triple quadripôle (QqQ) est l'analyseur le plus couramment utilisé ((Björlenius et al., 2018; Boleda et al., 2013; Dodder et al., 2014). Il est réalisé dans les modes SRM (Select Reaction Monitoring) ou MRM (Multiple Reaction Monitoring) qui consistent à suivre la réaction de transition d'un ion parent vers un ou plusieurs ion(s) fils. Le développement récent des spectromètres de masse haute résolution (HRMS) permet la création de méthodes d'analyse ciblée hautement sélective grâce à l'utilisation d'une fenêtre de tolérance de masse de 5 ppm. Les analyseurs hybrides HRMS tels que quadripôle-temps de vol (Q-ToF) (Baz-Lomba et al., 2016), triple quadipôle-trappe d'ions linéaire (QqQ(LIT)) (Serra-Compte et al., 2018) et quadripôle-Orbitrap (Q-Orbitrap) (Pugajeva et al., 2017) sont de plus en plus utilisés dans la détection de produits pharmaceutiques.

La performance de ces méthodes d'analyse est évaluée à l'aide de divers paramètres, notamment la linéarité, les rendements bruts, les effets matrice, les limites de détection et de quantification, cette dernière étant illustrée au tableau 6. Les variations des données rapportées pour ce paramètre mettent en évidence que l'analyse simultanée de molécules de classes thérapeutiques différentes ayant des propriétés physico-chimiques différentes impose souvent un compromis dans le choix des conditions expérimentales pour leur extraction, leur séparation et leur détection. Ce compromis a un impact sur la sensibilité des méthodes analytiques developpées de telle façon que la réponse de certaines molécules peut être plus favorisée par rapport à d'autres.

Tableau 6. Méthodes d'analyse utiliées pour mesurer des produtis pharmaceutiques dans les eaux de surface et les tissus des organismes marins tels que les bivalves.

			Préparation d'échantillon		Chromatographie liquide		Spectrométrie de masse		Méthode
Références	Matrice (mL pour le volume et g pour la masse (dw: dry weight ou ww: wet weight))	Classe thérapeutique (total de composés analysé entre RdM et leur métabolites selon notre liste d'intérêt)	Prétraitement	***Extraction***/ purification	Type de colonne	Phase mobile	Détecteur	Mode acq.	LOQ (ng/L dans les eaux et ng/g dw ou ww* dans les tissus de bivalves)
Brieudes et al., 2017	ES (1000 mL)	Anti-épileptiques (1) Analgésiques/ Anti-inflammatoires (7) Benzodiazépines (4) Antidépresseurs (3) Substitutifs aux opiaces (2)	filtration (FV 0,7 µm) EDTA (1,4 mM) pH 3,0 ± 0,1 (AF) addition e.i	Oasis MCX (60 mg, 3cc)	Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm)	A: H_2O (0,1% AcA) B: ACN (0,1 % AcA)	QqQ (ESI + / -)	MRM	0,2 0,1-9,7 0,1-0,8 0,2-16,3 0,3-1,8
Petrovic et al., 2014	ES (500 mL)	Anti-épileptiques (1) Analgésiques/ Anti-inflammatoires (6) Antibiotiques/ Anti-infectieuse (3) Benzodiazépines (1) Antidépresseurs (1) Régulateurs des lipides sanguins (1) β-Bloquants (1)	Filtration (Nylon, 0,45 µm) addition e.i	Oasis HLB (60 mg, 3cc)	ESI+ Acquity UPLC HSS T3 (50 x 2,1 mm; 1,8 µm) ESI- Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7µm)	ESI+ A: 10 mM AF/FA à pH 3,2 B: MeOH ESI- A: 5 mM AA/A à pH 8 B: ACN	QqQ(LIT) (ESI + / -)	MRM	2,4 3,4 - 30,1 2,1 - 18,3 17,7 0,7 1,9 1,0
Boleda et al., 2013	ES (200 mL)	Analgésiques/ Anti-inflammatoires (4) Antibiotiques/ Anti-infectieuse (1) Régulateurs des lipides sanguins (1)	ES (addition 1% MeOH)	Oasis HLB (200 mg, 6 mL)	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7µm)	ESI+ A: ACN/MeOH (2:1) B: AA/AcA (6,5 mM, pH 5,2) ESI- A: MeOH B: AA/AcA (6,5 mM, pH 5,2)	QqQ (ESI + / -)	SRM	1,4-30,0 1,1 30,0

ES: eaux de surface; FV: filtre en fibre de verre; AF: acide formique; FA: formiate d'ammonium; A: ammoniac; AA: acétate d'ammonium; AcA: acide acetique; ACN: acetonitrile; MeOH: methanol; ESI: électrospray; QqQ: triple quadrupôle; QqQ(LIT): hybride triple quadripôle-trappe d'ions; MRM: multiple reaction monitoring; SRM: select reaction monitoring.

SuiteTableau 6. Méthodes d'analyse utiliées pour mesurer des produtis pharmaceutiques dans les eaux de surface et les tissus des organismes marins tels que les bivalves.

			Préparation d'échantillon		Chromatographie liquide		Spectrométrie de masse		Méthode
Références	Matrice (mL pour le volume et g pour la masse (dw: dry weight ou ww: wet weight))	Classe thérapeutique (total de composés analysé entre RdM et leur métabolites selon notre liste d'intérêt)	Prétraitement	***Extraction***/ purification	Type de colonne	Phase mobile	Détecteur	Mode acq.	LOQ (ng/L dans les eaux et ng/g dw ou ww* dans les tissus de bivalves)
Björlenius et al., 2018	ES (1000 mL)	Anti-épileptiques (1) Analgésiques/ Anti-inflammatoires (3) Antibiotiques/ Anti-infectieuse (3) Benzodiazépines (1) Antidépresseurs (1) β-Bloquants (1) Substitutifs aux opiaces (1)	Filtration (filtre à membrane Millipore 0,45 µm) pH 3 (acide sulfurique) addition e.i	Oasis HLB (200 mg, 6 mL)	Hypersil Gold (50 x 2,1 mm; 3µm)	A: MeOH (0,1% AF) B: ACN (0,1 % AF) C: H_2O (0,1 % AF)	QqQ (HESI +/-)	SRM	0,1 0,05-1,0 0,5-1,0 0,5 0,05 0,5 1,0
Gros et al., 2012	ES (100 mL les eaux de rivière et 500 ml les eaux de mer)	Anti-épileptiques (1) Analgésiques/ Anti-inflammatoires (5) Antibiotiques/ Anti-infectieuse (3) Benzodiazépines (2) Antidépresseurs (1) Régulateurs des lipides sanguins (1) β-Bloquants (1)	Filtration: -rivière (FV 1 µm plus Nylon, 0,45 µm) -mer (Nylon, 0,45 µm) Na_2EDTA (concentration final dans les échantillons 0,1%) addition e.i	Oasis HLB (200 mg, 6 mL) dans les eaux de mer Oasis HLB (60 mg, 3 mL) dans les eaux de rivière	ESI+ Acquity UPLC HSS T3 (50 x 2,1 mm; 1,8 µm) ESI- Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7µm)	ESI+ A: 10 mM AF/FA à pH 3,2 B: MeOH ESI- A: 5 mM AA/A à pH 8 B: ACN	QqQ(LIT) (ESI +/-)	MRM	0,5-2,4 0,8-30,1 0,7-18,3 0,4-17,7 0,2-0,7 1,5-9,1 0,3-1,0
Alvarez-Muñoz et al., 2015b	Tissu 0,5 g dw. Des espèces: -Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) -Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) - Striped venus clam (*Chamele gallina*)	Anti-épileptiques (1) Analgésiques/ Anti-inflammatoires (1) Antibiotiques/ Anti-infectieuse (1) Antidépresseurs (2)	échantillon composé broyé, homogénéisé, lyophilisé maintenu à -20°C jusqu'à l'analyse	***PLE avec MeOH/H_2O (1:2 v/v)*** Oasis HLB (200 mg, 6 mL) addition e.i après de la reprise de l'échantillon	ESI+ Acquity UPLC HSS T3 (50 x 2,1 mm; 1,8 µm) ESI- Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7µm)	ESI+ A: 10 mM AF/FA à pH 3,2 B: MeOH ESI- A: 5 mM AA/A à pH 8 B: ACN	QqQ(LIT) (ESI +/-)	SRM	0,07-0,18 0,06-0,08 0,02-0,09 0,03-0,18

ES: eaux de surface; FV: filtre en fibre de verre; AF: acide formique; FA: formiate d'ammonium; A: ammoniac; AA: acétate d'ammonium; ACN: acetonitrile; MeOH: methanol; PLE: extraction par liquide pressurisé; ESI: électrospray; HESI: heat electrospray ionization; QqQ: triple quadrupôle; QqQ(LIT): hybride triple quadripôle-trappe d'ions; MRM: multiple reaction monitoring; SRM: select reaction monitoring.

Suite Tableau 6. Méthodes d'analyse utiliées pour mesurer des produtis pharmaceutiques dans les eaux de surface et les tissus des organismes marins tels que les bivalves.

			Préparation d'échantillon		Chromatographie liquide		Spectrométrie de masse		Méthode
Références	Matrice (mL pour le volume et g pour la masse (dw: dry weight ou ww: wet weight))	Classe thérapeutique (total de composés analysé entre RdM et leur métabolites selon notre liste d'intérêt)	Prétraitement	***Extraction***/ purification	Type de colonne	Phase mobile	Détecteur	Mode acq.	LOQ (ng/L dans les eaux et ng/g dw ou ww* dans les tissus de bivalves)
Martinez Bueno et al., 2014	Tissu 2g dw. De l'espèce: -Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*)	Antidépresseurs (6)	échantillon composé broyé, homogénéisé, lyophilisé maintenu à -20°C jusqu'à l'analyse. Jour de l'analyse: Réhydratation + addition e.i	***Solvent d'extraction ACN*** ***QuEChERS avec les sels Na_2SO_4 anh, NaCl, $Na_3Cit:2H_2O$ et $Na_2HCit:3H_2O$*** Centrifugation Z-sep+ AF	ZORBAX XDB (100 x 2,1 mm; 1,8µm)	A: H2O (0,1% AF) B: ACN(0,1 % AF)	Orbitrap (HESI +)	MS et MS/MS	2,5-3,8
Will et al., 2011	Tissu 1g dw. De l'espèce: Blue mussel (*Mytilus edulis)*	Anti-épileptiques (1) Analgésiques/ Anti-inflammatoires (3) Antibiotiques/ anti-infectieuse (1) β-Bloquants (1)	échantillon composé broyé, homogénéisé, lyophilisé maintenu à 4°C jusqu'à l'analyse. Jour de l'analyse: addition e.i	***PLE avec ACN/H_2O (3:1 v/v avec 1% AF)*** Strata-X (200 mg, 6 mL)	Nucleodur C18 Pyramid UHPLC (100 x 2 mm; 1,8µm)	A: H2O (0,08 % AF) B: ACN(0,08 % AF) C: Isopropanol	QqQ (HESI +)	SRM	1 2,5-5 5 1
Serra-Compte et al., 2018	Tissu 0,5 g dw. De l'espèce: -Mediterranean mussel (Mytilus galloprovincialis)	Anti-épileptiques (1) Antibiotiques/ Anti-infectieuse (1) Antidépresseurs (6)	échantillon composé homogénéisé, lyophilisé maintenu à -80°C jusqu'à l'analyse. Jour de l'analyse: Réhydratation	***Solvent d'extraction ACN*** ***QuEChERS avec les sels: acétate de sodium, sulfate de magnésium.*** dSPE avec PSA, C 18 et sulfate de magnésium Vortex et centrifugation	Acquity UPLC HSS T3 (50 x 2,1 mm; 1,8 µm) Pour les métabolites: Hypersil Gold PFP (10 x 2,1 mm; 1,9 µm)	A: 10 mM AF/FA à pH 3,2 B: MeOH	QqQ(LIT) (ESI +)	MRM	0,43 0,07 0,21-1,0

AF: acide formique; FA: formiate d'ammonium; ACN: acetonitrile; MeOH: methanol; PSA: amine primaire et secondaire; dSPE: extraction dispersive en phase solide; PLE: extraction par liquide pressurisé; QuEChERS: quick, easy, cheap, effective, rugged et safe; ESI: électrospray; HESI: heat electrospray ionization; QqQ: triple quadrupôle; QqQ(LIT): hybride triple quadripôle-trappe d'ions; MRM: multiple reaction monitoring; SRM: select reaction monitoring.

Suite Tableau 6. Méthodes d'analyse utiliées pour mesurer des produtis pharmaceutiques dans les eaux de surface et les tissus des organismes marins tels que les bivalves.

			Préparation d'échantillon		Chromatographie liquide		Spectrométrie de masse		Méthode
Références	Matrice (mL pour le volume et g pour la masse (dw: dry weight ou ww: wet weight))	Classe thérapeutique (total de composés analysé entre RdM et leur métabolites selon notre liste d'intérêt)	Prétraitement	***Extraction***/ purification	Type de colonne	Phase mobile	Détecteur	Mode acq.	LOQ (ng/L dans les eaux et ng/g dw ou ww* dans les tissus de bivalves)
Dodder et al., 2014	Tissu 2,5 g ww pour l'extraction acide 1g ww pour l'extraction basique De l'espèce: *Mytilus spp.*	Anti-épileptiques (1) analgésiques/ anti-inflammatoires (3) Antibiotiques/ anti-infectieuse (2) Benzodiazépines (1) β-bloquants (1)	addition e.i	***Extraction acide: ACN, buffer aqueux , pH2*** ***Extraction basique: ACN, NH_4OH aqueux, pH 10*** OASIS HLB	ESI + Waters Xterra C18 (10 x 2,1 mm; 3,5 µm) ou Waters Atlantis HILIC (10 x 2,1 mm; 3,0 µm) ESI - Waters Xterra C18 (10 x 2,1 mm; 3,5 µm)	ESI+ A: 0,1% AF et 0,1 % FA en H_2O B: ACN:MeOH (1:1) ou A: 0,1 % AcA / AA buffer en H2O B: ACN ESI- A: 0,1 % AA et 0,1% AcA en H_2O B: ACN:MeOH (1:1)	QqQ (ESI +/-)	MRM	0,595* 3,80-6,48* 0,324-0,596* 0,194* 0,741*

AF: acide formique; FA: formiate d'ammonium; AA: acétate d'ammonium; AcA: acide acetique; ACN: acetonitrile; MeOH: methanol; ESI: électrospray; QqQ: triple quadrupôle; MRM: multiple reaction monitoring; SRM: select reaction monitoring.

En conclusion, l'approche ciblée a couramment été utilisée pour détecter et quantifier de nombreux RdM dans l'environnement aquatique. Le développement de méthodes analytiques témoigne de la complexité analytique parce qu'il est fortement dépendant du type de matrice et des propriétés physico-chimiques des molécules d'intérêt.

2.2 Développement analytique

Au cours de cette thèse doctorale, différentes méthodes d'analyse ont été développées pour la recherche de RdM et leurs métabolites dans des matrices environnementales selon les objectifs scientifiques.

Pour répondre à la question des niveaux de contamination en RdM dans un pays de l'hémisphère Sud, le Cameroun (notamment autour de sa capitale, Yaoundé), travaux présentés au chapitre 3, une analyse multirésidus a été développée. La grande majorité des méthodes analytiques publiées dans la littérature concentrent leur attention sur les molécules mères et, de façon plus rare, sur les métabolites et/ou les produits de transformation. Nous avons décidé de développer une méthode multi-résidus contenant des molécules méres mais aussi des métabolites appartenant à différentes classes thérapeutiques. Cette méthode qui comprend seize molécules mére appartenant à huit classes thérapeutiques différentes et neuf métabolites, a été dévelopée sur des matrices aqueuses.

Pour répondre à la question du métabolisme de la venlafaxine chez la moule méditerranéene, travaux présentés au chapitre 4, une approche ciblée a été conduite afin d'optimiser les méthodes d'extraction tissulaire sur les métabolites renseignés à ce jour chez l'homme et chez la moule. En complément de cette approche ciblée, une approche non ciblée a été développé dans la section 3.2. La méthode de traitement tissulaire a été mise au point en tenant compte les propriétés physico-chimiques des métabolites connus de la venlafaxine (5 phase I et 2 phase II). La venlafaxine et ses métabolites ont un groupe fonctionnel amine dans leurs structures. Une valeur de pH inférieur à la valeur de pKa, en au moins 2 unités, favorise la présence d'une charge positive sur l'azote du groupe amine de ces composés. Développer la méthode de traitement tissulaire en utilisant cette propriété, nous a permis d'augmenter la probabilité de détection des métabolites connus mais aussi des métabolites non connus de la venlafaxine chez la moule méditerranéenne (*M. galloprovincialis*) exposées, dans des conditions contrôlées, à une concentration connue de cet antidépresseur. De plus, cette méthode traitement tissulaire nous a permis de diminuer la prise d'essai de l'échantillon par rapport aux autres méthodes existent dans la littérature. Par ailleurs, cette approche ciblée a été adaptée pour mesurer les mêmes molécules (venlafaxine et ses métabolites) dans l'eau de mer utilisée lors de l'exposition des moules en conditions contrôlées. Cette dernière approche nous a permis de calculer la concentration réelle d'exposition des organismes à la venlafaxine.

Plusieurs axes de développement ont été menés pour ces différentes méthodes d'analyse: 1) l'optimisation de l'extraction/purification, 2) l'optimisation de la mesure spectrométrique, 3) l'optimisation de la mesure chromatographique et 4) l'évaluation de la performance des méthodes. La description de ces axes ainsi que la présentation des molécules sélectionnées seront abordées ci-dessous.

2.2.1 Choix des molécules

En Europe, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), représente le plus important cadre législatif dans l'évaluation de la qualité des eaux. Cette directive dans son rapport "Directive 2013/39/EU" considère la pollution des eaux par les produits pharmaceutiques comme une préoccupation environnementale émergente et a inclus dans la première "liste de surveillance" certaines RdM des classes thérapeutiques telles que des hormones et des anti-inflammatoires. En France, l'arrêté du 7 août 2015 a permis de mettre à jour la liste de substances pertinentes à surveiller dans les eaux de surface et inclus une quinzaine de médicaments et métabolites. Dans ce contexte, notre sélection des molécules a pris en compte l'arrête du 7 août 2015 et l'occurrence de molécule déjà renseignée dans la littérature. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, la disponibilité d'information des métabolites dans l'environnement aquatique reste très limité indépendamment du continent et de la classe thérapeutique, ce qui les rend intéressants à inclure dans nos études. Les métabolites déjà identifiés dans les eaux de surface et certains peu documentés (glucuronides) ont été sélectionnés. Le choix final a été fait selon la disponibilité des standards analytiques. En conséquence, 16 produits pharmaceutiques appartenant à huit classes thérapeutiques différentes et 16 métabolites ont été sélectionnés. Cette liste de molécules considérées comme les plus pertinentes à inclure dans nos études est présentée au tableau 7.

Les propriétés et usages thérapeutiques des molécules sélectionnées ont été résumées dans le tableau 1 (section 1.1) selon les huit classes thérapeutiques identifiées.

En raison de la diversité des proprietés physico-chimiques des molécules sélectionnées, le développement des méthode ciblées a été la recherche du meilleur compromis analytique pour attendre la meilleure sensibilité possible dans l'analyse de l'ensemble de molécules.

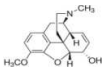
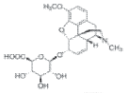
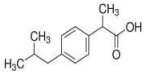
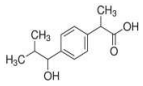
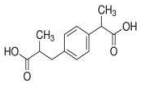
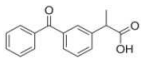
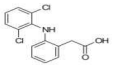
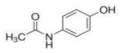
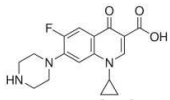
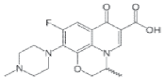
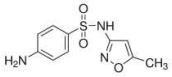
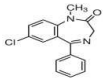
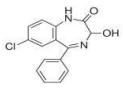
2.2.2 L'optimisation de l'extraction/purification

Comme nous l'avons indiqué au début de cette section (2.2), les méthodes analytiques développées au cours de cette thèse sont diverses en molécules et en matrice, donc, pour chaque approche ciblée, un protocole d'extraction/purification le plus adapté pour l'ensemble des molécules de l'étude a été déterminé.

2.2.2.1 Méthode multi-résidus dans des matrices aqueuses

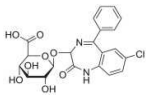
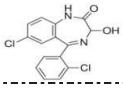
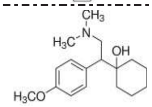
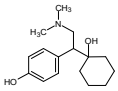
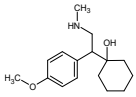
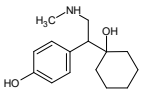
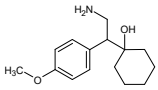
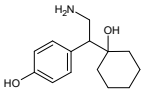
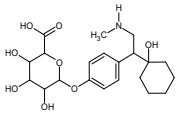
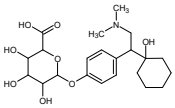
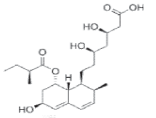
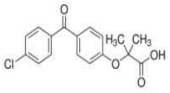
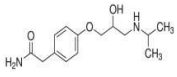
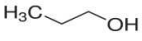
Les molécules du tableau 7, sauf les métabolites de la venlafaxine, sont utilisées dans la méthode multi-résidus mise au point pour les matrices aqueuses. Pour cette méthode, nous utilisons un protocole développé au sein du laboratoire. Ce protocole effectue la purification de l'échantillon aqueux avec la technique SPE. Les cartouches OASIS HLB (6cc, 200 mg, 30 µm) sont préalablement conditionnées avec (2 x 5 mL) de MeOH suivi de (2 x 5 mL) d'eau ultra-pure à un débit d'environ 5 mL/min. Des prises d'essai de 500 mL d'eau milliQ enrichis avec l'ensemble des analytes à 100 µg/L (10 ng) sont déposées sur les cartouches. Après le passage des échantillons d'eau sur les cartouches, elles sont rincées avec 5 mL d'eau utlra-pure et séchées sous vide pendant 1h. Les analytes sont élués avec 10 mL de MeOH. Les extraits sont évaporés à sec à 35°C sous azote et reconstitué avec 200 µL d'ACN:eau ultra-pure (2:98, v/v).

Tableau 7. Classe thérapeutique, CAS, structure chimique, formule brute, pKa et log Kow des médicaments et des métabolites sélectionnés.

Classe thérapeutique	Médicaments	CAS	Structure chimique	Formule brute	pKa [a]	log Kow [b]
Anti-épileptique	Carbamazépine	298-46-4		C15H12N2O	13,94	1,89
Analgésiques/ Anti-inflammatoires	Codéine	1422-07-7		C18H21NO3	8,23 et 13,40	1,39
	Codéine 6βD glucuronide	20736-11-2		C24H29NO9	2,79; 8,08; 12,87; 14,10 et 14,96	1,21
	Ibuprofène	15687-27-1		C13H18O2	4,41	3,5
	1-hydroxyibuprofène	53949-53-4		C13H18O3	4,39 et 14,46	2,06
	carboxyibuprofène	15935-54-3		C13H16O4	4,39 et 4,73	0,87
	Kétoprofène	22071-15-4		C16H14O3	4,23	2,91
	Diclofénac	15307-86-5		C14H11Cl2NO2	4,18	4,55
	Acetaminophène	103-90-2		C8H9NO2	1,7; 9,86 et 15,32	0,48
Antibiotiques/ Anti-infectieuse	Ciprofloxacine	85721-33-1		C17H18FN3O3	6,43 et 8,68	1,63
	Ofloxacine	82419-36-1		C18H20FN3O4	5,19 et 7,37	1,86
	Sulfaméthoxazole	723-46-6		C10H11N3O3S	1,39 et 5,81	0,66
Benzodiazépines	Diazepam	439-14-5		C16H13ClN2O	3,40	2,8
	Oxazepam	604-75-1		C15H11ClN2O2	1,17; 10,94 et 12,75	2,22

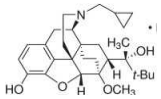
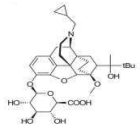
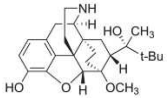
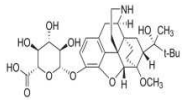
[a, b] valeurs pédites avec le logiciel ACD/ChemSketch

Suite Tableau 7. Classe thérapeutique, CAS, structure chimique, formule brute, pKa et log Kow des médicaments et des métabolites sélectionnés.

Classe thérapeutique	Médicaments	CAS	Structure chimique	Formule brute	pKa [a]	log Kow [b]
Benzodiazépines	Oxazepam glucuronide	6801-81-6		C21H19ClN2O8	2,26; 2,77; 10,62; 12;85; 14,09 et 14,95	2,43
	Lorazepam	846-49-1		C15H10Cl2N2O2	0,17; 10,08 et 12,68	2,38
Antidépresseurs	Venlafaxine (VEN)	99300-78-4		C17H27NO2	9,26 et 14,84	2,47
	O-desmethyl venlafaxine (ODV)	93413-62-8		C16H25NO2	9,23; 10,04 et 15,01	1,74
	N-desmethyl venlafaxine (NDV)	149289-30-5		C16H25NO2	10,44 et 14,83	2,55
	N,O-didesmethyl venlafaxine (NODDV)	135308-74-6		C15H23NO2	9,83; 10,59 et 15,00	1,81
	N,N-didesmethyl venlafaxine (NNDDV)	130198-05-9		C15H23NO2	9,85 et 14,75	2,04
	N,N-didesmethyl-o-desmethyl venlafaxine (NNDDODV)	135308-76-8		C14H21NO2	9,72; 10,38 et 14,92	1,31
	NODDV-glucuronide	1021933-99-2		C21H31NO8	2,78; 10,24; 12,86; 14,10; 14,83 et 14,95	-0,68
	ODV-glucuronide	1021933-98-1		C22H33NO8	2,78; 9,26; 12,86; 14,10; 14,84 et 14,95	-0,76
Régulateurs des lipides sanguins	Pravastatin	81093-37-0		C23H36O7	4,31; 13,61; 14,77 et 15,18	2,21
	Fenofibric acid	42017-89-0		C17H15ClO4	3,09	3,99
β-Bloquants	Aténolol	29122-68-7		C14H22N2O3	9,43; 13,88 et 16,26	0,33
	1-Propanolol	71-23-8		C3H8O	15,24	0,33

[a, b] valeurs pédites avec le logiciel ACD/ChemSketch

Suite Tableau 7. Classe thérapeutique, CAS, structure chimique, formule brute, pKa et log Kow des médicaments et des métabolites sélectionnés.

Classe thérapeutique	Médicaments	CAS	Structure chimique	Formule brute	pKa [a]	log Kow [b]
Substitutifs aux opiaces	Buprenorphine	52485-79-7		C29H41NO4	8,31; 9,47 et 15,00	2,83
	Buprénorphine glucuronide	101224-22-0		C35H49NO10	2,77; 8,29; 12,86; 14,10; 14,95 et 14,99	0,4
	Norbuprénorphine	78715-23-8		C25H35NO4	9,14; 9,77 et 15,00	1,2
	Norbuprénorphine glucuronide	469887-29-4		C31H43NO10	2,77; 9,50; 12,86; 14,10; 14,95 et 14,99	-1,23

[a, b] valeurs pédites avec le logiciel ACD/ChemSketch

L'évaluation de ce protocole d'extraction/purification a été fait avec des triplicats sur la base des critères suivants: 1) le rendement brut, calculé par comparaison de l'aire du signal de chaque analyte dans les échantillons dopés avants et après le processus d'extraction/purification injectés dans les mêmes conditions d'analyse et 2) l'effect matrice, calculé par comparaison de l'aire du signal de chaque analyte dans les échantillons dopées après extraction/purification par rapport à l'aire du signal de chaque analyte mesuré dans le mix des standards injectés aux mêmes conditions d'analyse.

Les résultats du rendement brut et de l'effet matrice obtenus pour les molécules de la méthode multi-résidus sont montrés dans le tableau 8.

Concernant les rendements d'extraction bruts, des valeurs satisfaisantes entre 80 et 112 % ont été obtenus pour une majorité de molécules à l'exception de la codéïne, ofloxacine et sulfaméthoxazole qui ont montré des valeurs entre 53 et 57 % ainsi que la ciprofloxacine et la pravastatine qui ont présenté un rendement inférieur à 35%. En raison du mauvais rendement brut obtenu par la ciprofloxacine, elle n'a pas été incluse dans l'étude menée dans les eaux de surface et souterraines du Yaoundé, Cameroun.

Des effets matrice faibles (inférieur à 30 %) ont été observés pour la plupart des analytes excepté pour les molécules suivantes: carboxy-ibuproféne, diclofénac, oxazepam, lorazepam, pravastatine et norbuprenorphine qui présentent des effets de suppression de signal compris entre 36 et 59 %. La molécule sulfaméthoxazole a montré une augmentation du signal (34%).

Tableau 8. Rendements bruts et Effets matrice des molécules dans l'application du protocole d'extraction/purification dans les échantillons d'eau milliQ

Classe Thérapeutique	Molécules	Rendement bruts (%) (n=3)	Effet matrice (%) (n=3)
Anti-épileptique	Carbamazépine	112 ± 15	-7 ± 5
analgésiques/ AINS	Codéine	53 ± 3	-16 ± 5
	Codéine 6βD glucuronide	92 ± 9	-14 ± 2
	Ibuprofène	90 ± 15	-6 ± 5
	1-hydroxy-ibuprofène	94 ± 9	-27 ± 10
	carboxy-ibuprofène	98 ± 6	-36 ± 6
	Kétoprofène	92 ± 17	-24 ± 9
	Diclofénac	80 ± 15	-38 ± 5
	Acetaminophène	88 ± 12	-15 ± 7
Antibiotiques/anti-infectieuse	Ciprofloxacine	26 ± 6	-29 ± 6
	Ofloxacine	57 ± 7	-12 ± 6
	Sulfaméthoxazole	56 ± 8	34 ± 15
Benzodiazépines	Diazepam	106 ± 15	–13 ± 3
	Oxazepam	83 ± 21	–51 ± 6
	Oxazepam glucuronide	103 ± 5	–7 ± 1
	Lorazepam	85 ± 23	–56 ± 5
Antidépresseurs	Venlafaxine	95 ± 8	–16 ± 5
Régulateurs des lipides sanguins	Pravastatine	32 ± 2	-37 ± 8
	Acide fénofibrique	87 ± 14	-24 ± 5
β bloquants	Aténolol	102 ± 5	-4 ± 3
	Propanolol	99 ± 38	-14 ± 9
Substitutifs aux opiaces	Buprénorphine glucuronide	91 ± 15	-8 ± 4
	Norbuprénorphine	82 ± 41	-59 ± 17
	Norbuprénorphine glucuronide	85 ± 2	-11 ± 5

2.2.2.2 Méthode venlafaxine et ses métabolites dans des tissus de la moule

Dans le cas de la méthode développée pour déterminer la venlafaxine et ses métabolites dans les tissus de la moule, suite à l'analyse des méthodologies décrite dans la littérature (section 2.1) le protocole d'extraction/purification comprend plusieurs étapes en raison de la complexité de cette matrice, notamment riche en lipides (environ 9% dans la moule entière *M.galloprovincialis*) (Alvarez-Muñoz et al., 2015). Cette analyse nous a conduit à sélectionner des tests qui comprennent la prise d'essai, la température d'extraction, l'adsorbant lipidique, les cartouches SPE et QuEChERS pour déterminer la technique d'extraction/purification la plus adaptée aux molécules d'intérêt en tenant compte des outils disponibles dans le laboratoire. La figure 5 illustre les différents tests effectués (détails dans les carrés rouges) pour établir le protocole final d'extraction/purification.

Une attention particulière a été portée aux métabolites de phase II (glucuronides) en raison de : 1) leur polarité élevée par rapport à leur molécule mère (venlafaxine) et les métabolites de phase I et de 2) leur haute sensibilité à subir une hydrolyse, des caractéristiques qui les rendent difficiles à retenir. Pour cela, différentes températures ont été testées dans l'extraction.

Les techniques QuEChERS et SPE combinées avec différents adsorbants lipidiques supplémentaires ont été évaluées pour la purification. Dans la technique SPE, deux cartouches OASIS avec différents greffages ont été testés: HLB et MCX. Comme nous l'avons dit précédemment (section 2.1), le

greffage de la cartouche HLB conduit à des interactions hydrophiles et lipophiles qui permettent de retenir des composés acides, basiques et neutres (figure 6). Par contre, la cartouche MCX obtient une rétention sélective de composés basiques avec des groupes échangeurs de cations à la surface de l'adsorbant, caractéristique qui est présente dans la venlafaxine et ses métabolites pour avoir dans leur structures un groupe amine. À pH bas, il y a deux points de rétention dans cette cartouche: un fort mécanisme d'échange d'ions et une faible contribution de phase inverse (figure 6).

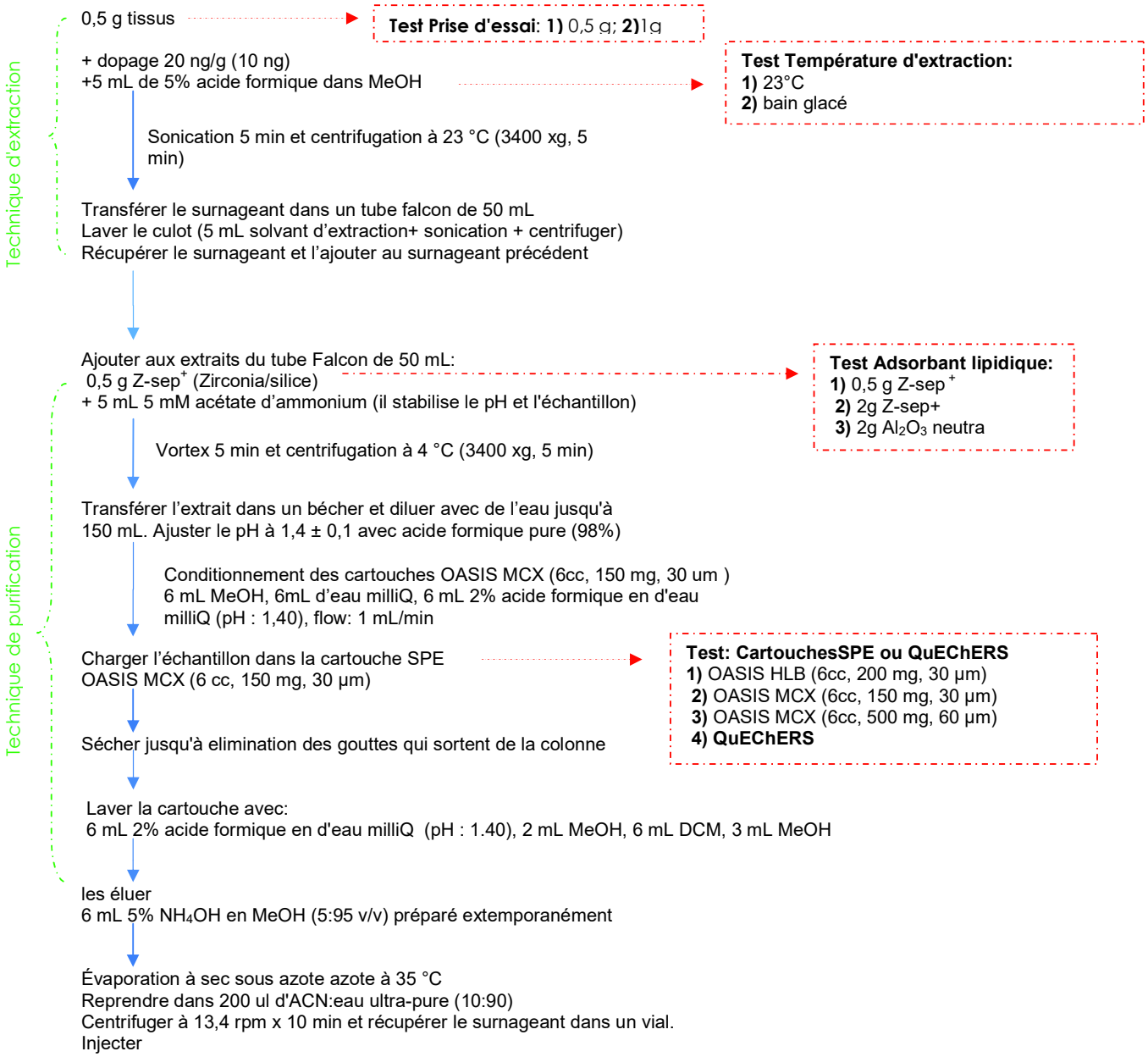


Figure 5. Tests realisés et protocole définitif d'extraction de la venlafaxine et ses métabolites dans les tissus de la moule.

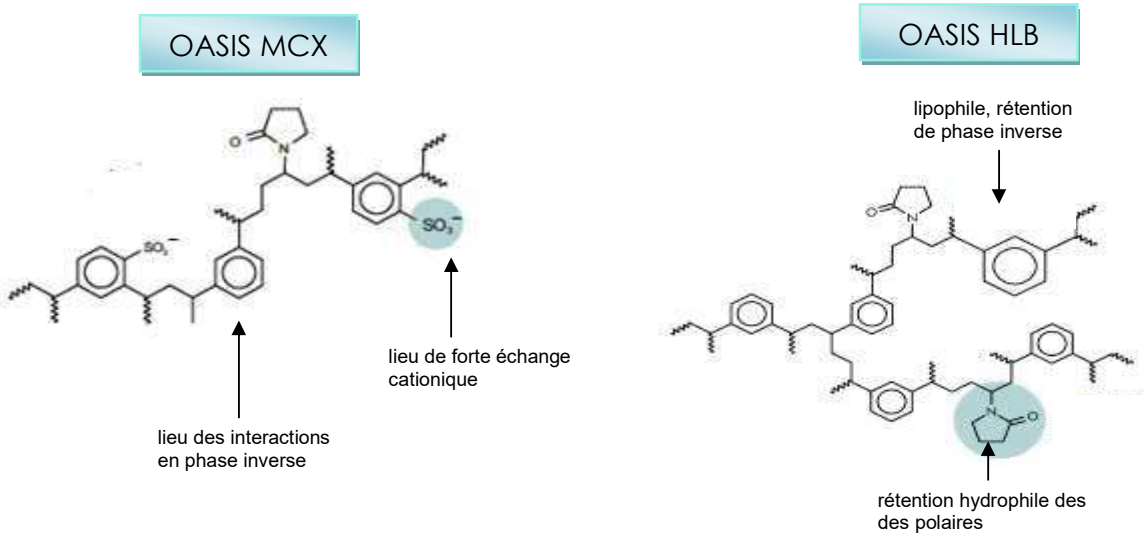


Figure 6. Types d'interactions présentes dans les cartouches OASIS HLB et MCX

Un test a porté sur la comparaison des techniques QuEChERS et SPE avec les cartouches HLB et MCX. Le protocole de la figure 5 a été suivi pour les cartouches HLB et MCX avec les conditions indiquées dans la figure 7.

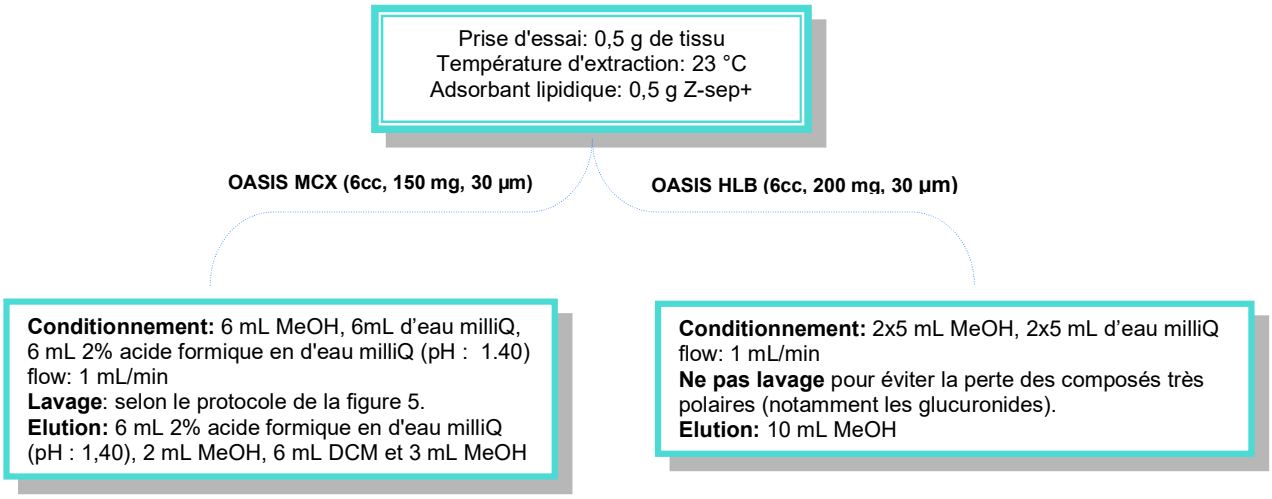


Figure 7. Conditions générales pour l'application du protocole d'extraction/purification: comparaison des cartouches HLB et MCX

Le protocole QuEChERS a été adapté selon la méthode décrite par Martínez Bueno et al. (2014) avec une prise d'essai de 0,5 g. Le résumé de ce protocole se trouve dans le tableau 9.

Tableau 9. Résumé du protocole QuEChERS selon Martínez Bueno et al. (2014) adapté à une prise d'essai de 0,5 g

Conditions	Description
Prise d'essai	0,5 g
Dopage	50 ng
Hydratation et extraction	2,5 mL d'eau ultrapure 2,5 mL d'ACN Agitation vigoureuse 2 min
Purification	Ajouter des sels: 1g Na_2SO_4 anh 0,250 g NaCl 0,250 g $Na_3Cit{:}2H_2O$ 0,125 g $Na_2HCit{:}3H_2O$ Agitation vigoureuse 1 min Centrifuger 5 min à 3500 rpm Préléver 1,250 mL du surnageant ajouter Z-sep $^+$ + 50 µL d'acide formique vortex 1 min et centrifuger 5 min à 5000 rpm
Volumen final à prélever	0,5 mL
Evaporation	à l'azote à 40 °C
Reprise	0,5 mL avec la phase mobile
Filtration	Nanosep 0,2 µm, à 10 000 rpm, 10 min

Les différents essais ont été faits en triplicat et ils ont été évalués sur un témoin de moules entières (préalablement broyées et lyophilisées) dopée avec l'ensemble des analytes sur la base des critères suivants: le rendement brut et l'effet matrice.

Les résultats obtenus par la technique SPE avec les deux cartouches (MCX et HLB) et QuEChERS sont présentés dans la figure 8. Les rendements bruts ne sont pas homogènes pour l'ensemble des molécules dans les techniques évaluées. Les métabolites de phase I, à exception du NNDDODV dans QuEChERS, ont des rendements bruts proches à la valeur rapportée par sa molécule mère dans chaque technique étudiée, ce qui n'est pas le cas des métabolites de phase II. La plus faible variation entre les valeurs de rendement brut rapportés par la venlafaxine et ses métabolites de phase I a été observée dans la cartouche MCX (des valeurs entre 92%-113%), suivie par la cartouche HLB (des valeurs entre 85%-108%) et QuEChERS (des valeurs entre 43%-79%). La cartouche MCX a permis d'isoler environ 50% des deux glucuronides de l'étude, tandis que la cartouche HLB n'a isolé que l'ODV glucuronide au même pourcentage. Aucun métabolite de phase II n'a été retenu avec la technique QuEChERS. En général, les meilleurs rendements bruts ont été obtenus avec la technique SPE en utilisant la cartouche MCX. En ce qui concerne l'effet matrice, la cartouche HLB a montré les valeurs les plus basses, suivie par QuEChERS et la cartouche MCX, cette dernière avec des valeurs moyennes. Ce comportement peut être attibué à une présence plus importante de traces de

composés indésirables (solvents de lavage, solvent d'élution, etc.) dans l'extrait final de ce type de cartouche par rapport aux autres techniques.

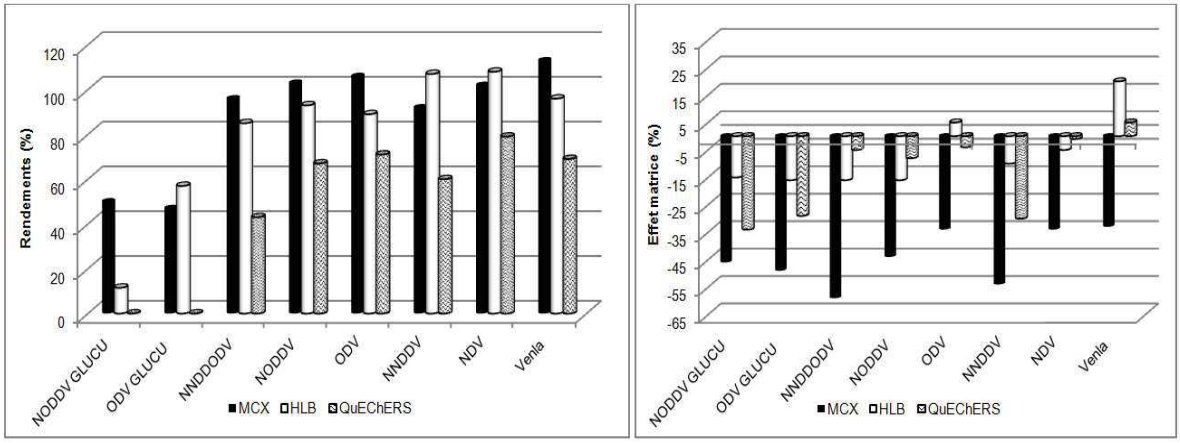


Figure 8. Rendements bruts et effets matrice obtenus dans la première expérience: comparaison entre les techniques SPE avec les cartouches MCX et HLB et QuEChERS

Nous pouvons conclure que le succès de la rétention des composés d'intérêt sur la cartouche MCX est dû à la forte interaction d'échange cationique générée avec le groupe amine présent dans les structures de ces composés. Bien que la rétention des composés glucuronides soit un défi, non seulement en raison de leur polarité élevée mais aussi en raison de leur haute possibilité d'hydrolyse, les conditions d'extraction sélectionnées (notamment le solvant MeOH) et la purification SPE avec la cartouche MCX ont permis de les isoler.

Dans le but d'essayer d'améliorer le rendement brut des glucuronides sans affecter les valeurs rapportées pour les autres analytes de l'étude et de diminuer l'effet matrice obtenu avec la technique SPE avec la cartouche MCX, des tests ont été réalisés. Les tests effectués comprenaient: 1) une extraction à basse température (bain de glace) car des publications menées avec d'autres types de glucuronides ont montrés que l'hydrolyse de ces composés peut être minimisée en travaillant à des faibles températures (Karinen et al., 2009; Ketola and Hakala, 2010), 2) l'utilisation d'alumine (2 g) comme une alternative à l'adsorbant Z-sep^{+}, étant donné que des travaux scientifiques l'ont utilisé comme un agent de rétention lipidique dans les tissus de bivalves et de poissons (Álvarez-Muñoz et al., 2015; Arnnok et al., 2017), 3) une augmentation de la quantité de l'adsorbant Z-sep+ (à 2 g) compte tenu de la possibilité que la dose de 0,5 g utilisée précédemment ne soit pas suffisante pour éliminer l'ensemble des lipides (interférant avec l'analyse) présents dans les échantillons, 4) l'usage d'une prise d'essai plus grande (1 g) et finalement 5) une augmentation de la quantité du support de la cartouche MCX (6cc, 500 mg, 60 µm) avec la prise d'essai de 1g, ces deux derniers tests ont été proposés en envisageant la possibilité de trouver de très faibles concentrations de venlafaxine et de ses métabolites dans les tissus. Tous les tests ont suivi le protocole de la figure 5 avec les conditions indiquées dans la figure 9.

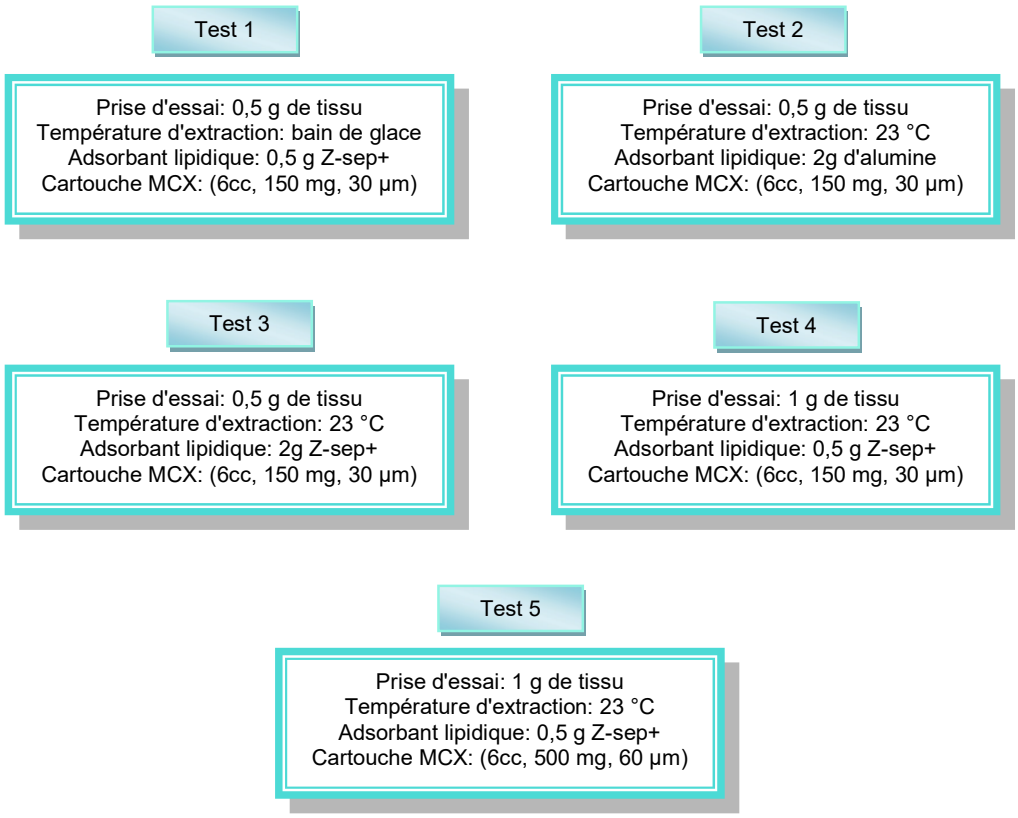


Figure 9. Conditions générales d'optimisation pour améliorer l'extraction des glucuronides.

Tous les différents essais ont été faits en triplicat et ont été évalués sur un témoin de moules entières dopée avec l'ensemble des analytes sur la base des critères: le rendement brut et l'effet matrice.

Les résultats obtenus de ces différents tests sont montrés dans les figures 10 et 11. Afin de faciliter l'analyse des données obtenues dans le cadre de cette expérience, nous illustrons également dans chaque figure (10 et 11) les rendements bruts et les effets matrice obtenus à partir du processus d'extraction/purification jugé le plus approprié pour isoler la venlafaxine et ses métabolites dans la première expérience, identifié comme MCX. Parmi les différents tests présentées dans la figure 10, aucun des trois tests (extraction à basse température en utilisant un bain de glace, changement d'adsorbant par l'alumine et augmentation de la quantité de l'adsorbant Z-sep^{+}) ne parvient à retenir le ODV glucuronide, alors que le NODDV glucuronide est retenu à basse température, se récupérant presque au double de la valeur rapportée dans la première expérience (MCX).

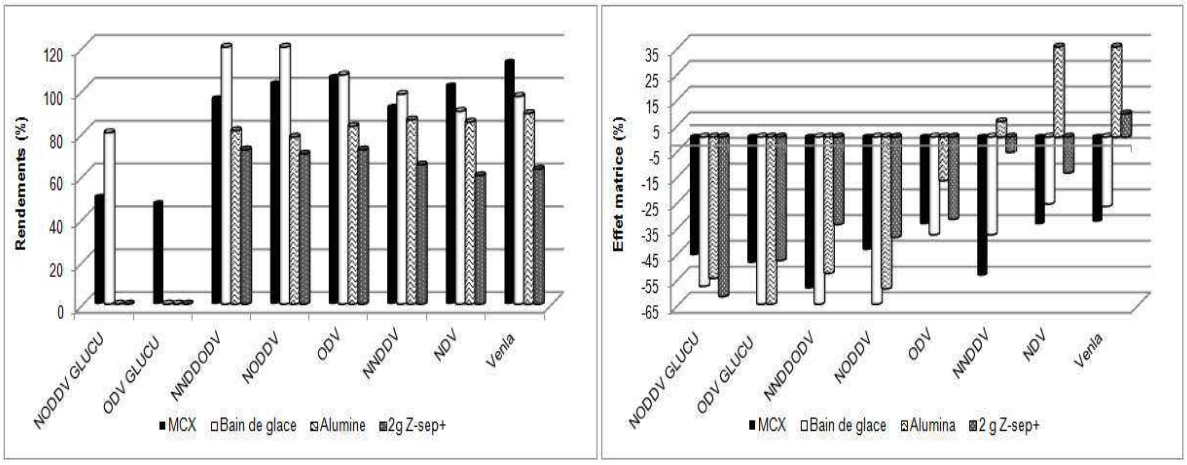


Figure 10. Rendements bruts et effets matrice obtenus dans les tests d'extraction à basse température, de purification avec l'alumine et Z-sep+ (2 g) et de la cartouche SPE OASIS MCX.

L'extraction à basse température conduit à des rendements bruts proches de ceux obtenus lors de la première expérience (MCX) pour la plupart des molécules de l'étude tandis que les tests avec les deux adsorbants: alumine et Z-sep$^+$ (à 2 g) ont montré des rendements bruts inférieurs pour toutes les molécules. L'utilisation du bain de glace a amelioré la rétention d'au moins 4 molécules (50 %) sur les 8 incluses dans l'étude, avec les analytes NODDV glucuronide, NNDDODV et NODDV les mieux extraits. Malgré des résultats prometteurs avec l'extraction à basse temperature, la molécule ODV glucuronide n'a pas été retenue. En ce qui concerne à l'effet matrice, aucun des trois tests n'a permis de réduire ce critère pour l'ensemble des molécules d'intérêt. Des cas ponctuels d'une forte réduction d'effet matrice ont été observés pour les molécules Venla et NDV avec l'augmentation de la quantité de l'adsorbant Z-sep$^+$ (à 2 g) et ainsi que la molécule ODV avec l'utilisation de l'alumine tandis que la molécule NNDDV a eu une forte réduction de l'effet matrice dans les deux conditions.

Nous pouvons conclure que, les trois tests (extraction à basse température, purification avec les adsorbants lipidiques alumine et Z-sep$^+$ (à 2 g)) n'ont pas conduit à une augmentation du rendement brut et à une diminution de l'effet matrice pour l'ensemble de molécules d'intérêt, seuls des cas spécifiques ont atteint cet objectif. La procédure qui montre le processus d'extraction/purification le plus adapté à notre recherche est celui qui a été choisi initialement (des conditions: -prise d'essai 0,5 g de tissu, température d'extraction 23 °C, adsorbant lipidique 0,5 g Z-sep$^+$ et SPE avec la cartouche OASIS MCX (6cc, 150 mg, 30 µm)).

Pour finir, nous avons évalué l'effet de l'augmentation de la prise d'essai (à 1 g) et de la quantité de support dans la cartouche MCX (figure 11). Toutes les molécules ont été observées avec la prise d'essai de 1 g de tissu, cependant leurs récupérations étaient inférieures à celles rapportées avec une plus petite quantité d'échantillon (0,5 g), probablement en raison de l'accroissement des composés indésiderables comme les lipides qui interfèrent avec l'analyse. Les rendements bruts obtenus avec

l'augmentation de la prise d'essai ont été entre 72 % et 85 % pour les métabolites de phase I et entre 21 % et 22 % pour les métabolites de phase II, tandis que les valeurs déterminées par la condition choisie dans la première expérience (MCX) se trouvent entre 92 % et 106 %, et entre 47 % et 50 % respectivement. De plus, les effets matrice ont été très similaires à ceux du test sélectionné lors de la première expérience. Pour la plupart des molécules (à l'exception de venlafaxine), la variation des données d'effets matrice a été comprise entre les valeurs négatives 32-54% dans la prise d'essai de 1 g tandis que dans le test sélectionné lors de la première expérience, les variations ont été entre les valeurs négatives 33-59%.

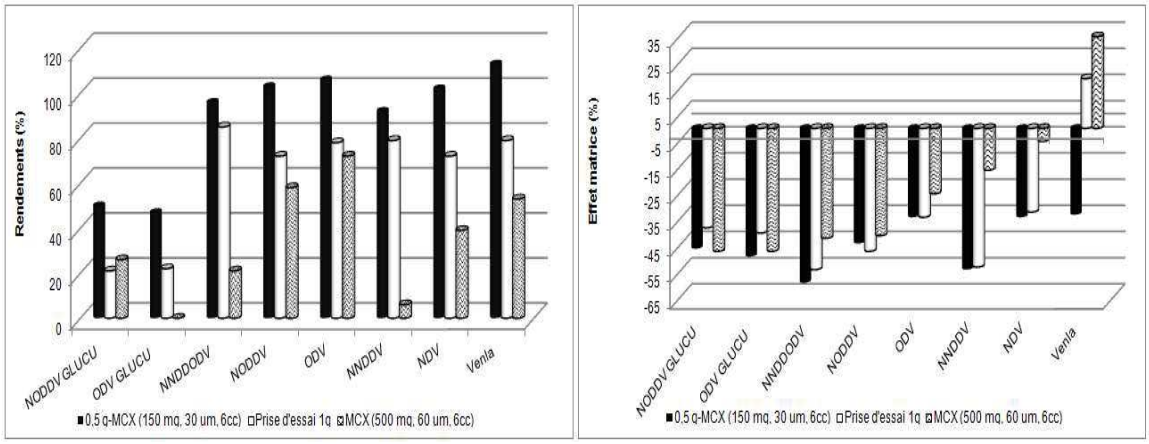


Figure 11. Rendements bruts et effets matrice obtenus dans les tests avec l'augmentation de la prise d'essai (à 1 g) et de la quantité du support de la cartouche MCX (500 mg): comparaison avec la condition sélectionnée dans la première expérience.

Le fait d'utiliser la cartouche MCX (500 mg, 60µm, 6cc) n'a généré aucune amélioration des rendements bruts des molécules étudiées par rapport aux données obtenues avec la cartouche MCX (150 mg, 30 µm, 6cc). Par contre, pour les molécules telles que NNDDODV, NNDDV et ODV glucuronide, la rétention a été faible ou nulle selon la molécule. Les effets matrices sont restés similaires entre les trois tests (augmentation de la prise d'essai et les deux cartouches MCX) pour NNDDODV, NODDV et les glucuronides. Une amélioration est observée pour ODV, NNDDV et NDV lors de l'utilisation de la cartouche MCX avec la plus haute quantité de support (500 mg) et une prise d'essai de 1 g. Malgré cette amélioration de l'effet matrice pour certaines molécules, nous avons décidé de ne pas retenir ce dernier test car son rendement brut n'est pas le plus pertinent pour l'ensemble des molécules de l'étude.

En définitive, après d'avoir évalué tous les tests, nous trouvons le meilleur compromis pour l'ensemble de molécules avec la condition initiale: prise d'essai 0,5 g de tissu, température d'extraction 23 °C, adsorbant lipidique 0,5 g Z-sep$^+$ et SPE avec la cartouche OASIS MCX (6cc, 150 mg, 30 µm). Le protocole retenu est illustré dans la figure 5 et un rappel des données obtenues dans les critères d'évaluation (des rendements bruts et des effets matrice) pour ce protocole est résumé au tableau 10.

Tableau 10. Rendements bruts et effets matrice obtenus dans l'application du protocole d'extraction/purification de la venlafaxine et ses métabolites dans les tissus de la moule.

Composé	Rendement bruts (%) (n=3)	Effet matrice (%) (n=3)
NODDV GLUCU	50 ± 7	-48 ± 3
ODV GLUCU	49 ± 19	-51 ± 8
NNDDODV	96 ± 4	-59 ± 6
NODDV	98 ± 6	-41 ± 9
ODV	100 ± 5	-32 ± 8
NNDDV	97 ± 6	-55 ± 8
NDV	108 ± 12	-32 ±12
Venla	105 ± 7	-32 ± 11

Ces données montrent que le protocole d'extraction et de purification mis au point pour les tissus est efficace dans la rétention des métabolites de phase I et II de la venlafaxine. De plus, des valeurs modérées de l'effet de matrice ont été mises en évidence avec l'application de ce protocole.

2.2.2.3 Méthode venlafaxine et ses métabolites dans l'eau de mer.

Pour finir, ce dernier protocole a été adapté pour être appliqué en eau de mer. Un résumé de ce protocole est présenté ci-dessous. Les cartouches MCX ont été préalablement conditionnées avec 6 mL MeOH, 6 mL d'eau milliQ et 6 mL 2 % d'acide formique en d'eau milliQ (pH: 1,40) à un débit d'environ 1 mL/min. Des prises d'essai de 18 mL d'eau de mer enrichis avec l'ensemble des analytes à 2 µg/L (20 ng) ont été ajustées à pH 1,40 et déposées sur les cartouches. Après avoir passé les échantillons d'eau de mer sur les cartouches, elles ont été rincées avec 6 mL 2 % d'acide formique en d'eau milliQ (pH: 1,40) et 5 mL MeOH et elles ont été séchées jusqu'à l'élimination des gouttes qui sortent de la colonne. Les analytes ont été éluées avec 6 mL 5 % de NH_4OH en MeOH (5:95 v/v) préparé extemporanément. Les extraits ont été évaporés à sec à 35 °C sous azote et reconstitué avec 200 µL d'ACN:eau ultra-pure (10:90, v/v). L'évaluation de ce protocole a été réalisée en triplicat sur la base des critères suivants: le rendement brut et l'effet matrice. Les résultats de ces critères sont montrés dans le tableau 11.

Les rendements bruts sont homogènes et favorables pour l'ensemble des molécules de notre étude, notamment les glucuronides. Dans l'eau de mer, les glucuronides sont mieux retenus pour la cartouche MCX par rapport aux tissus, ce qui est cohérent à la moindre complexité de cette matrice et la simplicité du protocole d'extraction/purification utilisé. Les effets matice pour l'ensemble de molécules sont faibles avec des valeurs compris entre 7 et 22 %.

Tableau 11. Rendements bruts et effets matrice obtenus dans l'application du protocole d'extraction/purification de la venlafaxine et ses métabolites dans les eaux de mer utilisées dans l'exposition de la moule.

	Rendement bruts (%) (n=3)	Effet matrice (%) (n=3)
NODDV GLUCU	91 ± 8	22 ± 18
ODV GLUCU	94 ± 15	15 ± 12
NNDDODV	104 ± 9	7 ± 3
NODDV	113 ± 6	14 ± 2
ODV	109 ± 11	17 ± 11
NNDDV	99 ± 10	10 ± 5
NDV	108 ± 10	16 ± 3
Venla	105 ± 11	14 ± 3

Les résultats obtenus montrent que l'adaptation du protocole d'extraction/purification pour l'eau de mer permet une rétention favorable des composés étudiés dans cette matrice.

2.2.3 L'optimisation de la séparation chromatographique

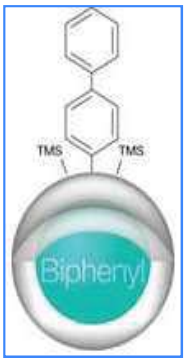
L'optimisation de la séparation chromatograpique est également un axe essentiel dans le développement des méthodes analytiques et implique des étapes telles que la sélection de la colonne chromatographique, la détermination de la phase mobile et du gradient.

2.2.3.1 Méthode multi-résidus

Dans le cas de la méthode multi-résidues, dans un premier temps trois colonnes analytiques C18 ont été comparées pour optimiser la séparation chromatographique: Nucleoshell RP Plus (100 x 2,1 mm; 2,7μm) (fournisseur Macherey Nagel), Zorbax Eclipse XDB (100 x 2,1 mm; 1,8 μm) (fornisseur Agilent Technologies) et ACE Excel PFP (100 x 2,1 mm; 1,7 μm) (fornisseur ACE) (figure 12). Àfin d'illustrer cette comparaison, des exemples de chromatogrammes obtenus pour quatre molécules en mode ionisation négatif, à une concentration proche de la limite de détection (15 pg injectées) en utilisant ces trois colonnes sont présentés à la figure 13. Ces chromatogrammes montrent que les meilleures formes de pics gaussiens et résolution chromatographique ont été obtenues avec la colonne ACE. Cette colonne utilise une fonctionnalité pentafluorophenyl qui permet une meilleure rétention et résolution des composés hydrophiles dû aux multiples mécanismes de rétention. Toutefois, cette colonne n'a pas fait preuve d'une grande robustesse lors de grandes séquences d'injection. Compte tenu de ce qui précède, une quatrième colonne a été testée: Kinetex Biphenyl (100 x 2,1 mm; 2,6 µm) (fournisseur Phenomenex, Inc.). Cette colonne de biphenyl a montré des performances très similaires à ceux de la colonne ACE en termes de forme de pic et de résolution chromatographique. Cependant, en termes de robustesse, la colonne Kinetex a montré un comportement largement favorable par rapport à la colonne ACE, en grandes séquences d'injection. La colonne Kinetex permet d'avoir une résolution très similaire à celle des colonnes utra-performantes (taille de particule inférieure à 2 µm)

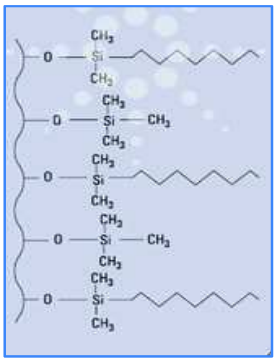
Kinetex Biphenyl

Dimension: 100 x 2,1 mm; 2,6 µm
Technologie: Core-shell
Forniseur: Phenomenex
Phase stationnaire: fonctionnalité biphenyl



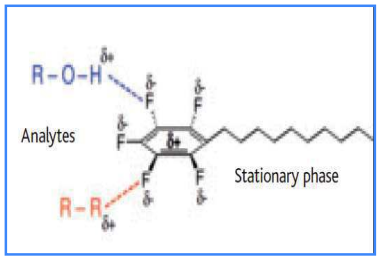
ZORBAX Eclipse XDB C18

Dimension: 100 x 2,1 mm; 1,8µm
Technologie: poreux
Forniseur: Agilent
Phase stationnaire: dimethyl-noctadecylsilane



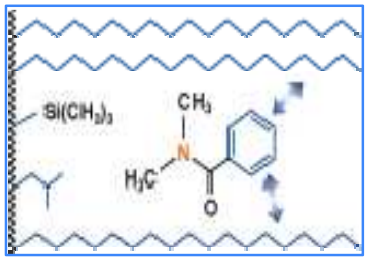
ACE Excel PFP C18

Dimension: 100 x 2,1 mm; 1,7µm
Technologie: poreux
Forniseur: ACE Hichrom
Phase stationnaire: chaîne C18 avec une fonctionnalité pentafluorophenyl



NUCLEOSHELL RP Plus C18

Dimension: 100 x 2,1 mm; 2,7µm
Technologie: Core-Shell
Forniseur: Macherey-Nagel
Phase stationnaire: Octadécyl(monomère) multi-endcapping



Discovery HS F5

Dimension: 100 x 2,1 mm; 3 µm
Technologie: poreux
Forniseur: Sigma-Aldrich
Phase stationnaire: pentafluorophenyl propyl

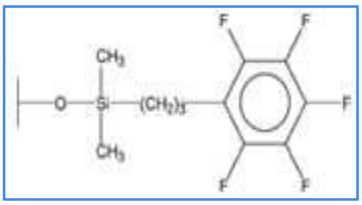


Figure 12. Caractéristiques des colonnes chromatographiques utilisées.

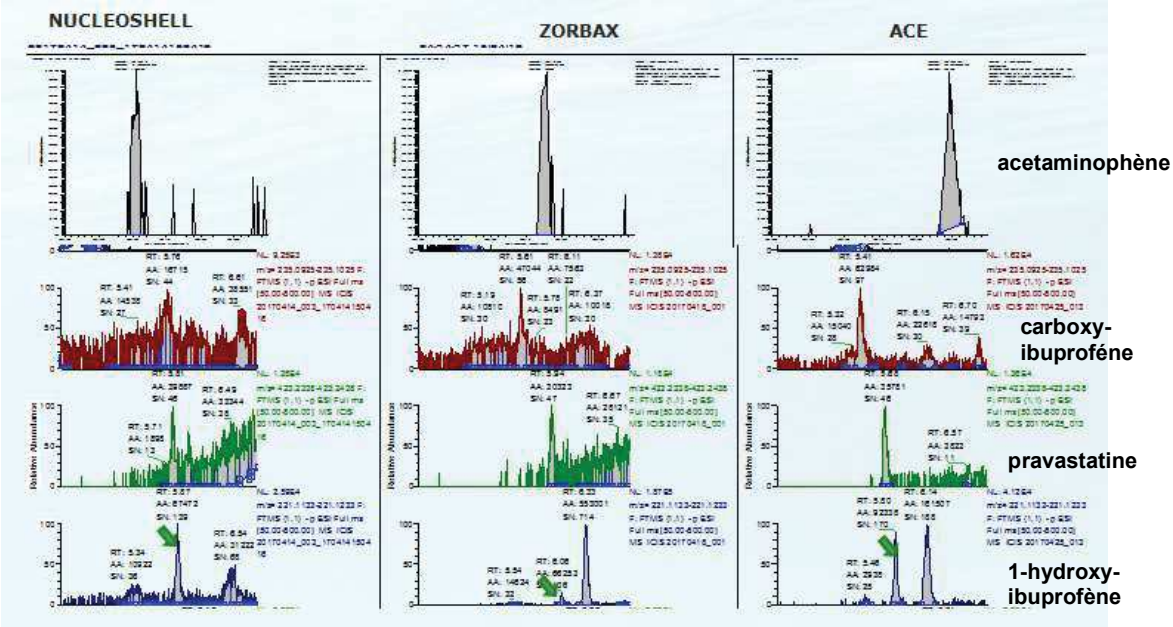


Figure 13. Exemples de chromatogrammes obtenus pour quatre molécules en mode d'ionisation négatif en utilisant trois colonnes C18 différentes: Nucleoshell, Zorbax et ACE

avec l'avantage de travailler à la moitié de la pression et sans le problème de la diffusion intra-particule, cette colonne est donc choisie par la suite de notre étude.

La phase mobile est composée d'eau milliQ et d'acétonitrile (avec un modifiant, l'acide formique) pour le mode d'ionisation positif. En mode d'ionisation négatif, nous avons pu constater de très mauvais rendements d'ionisation pour l'ibuprofène et ses métabolites liées à la présence d'acide formique (Figure 14). Le choix a donc été fait de supprimer le modifiant pour ce mode en particulier. Par la suite, plusieurs modèles de gradient (différents débits et pentes) ont été testés afin d'obtenir une séparation maximale des analytes sur la colonne.

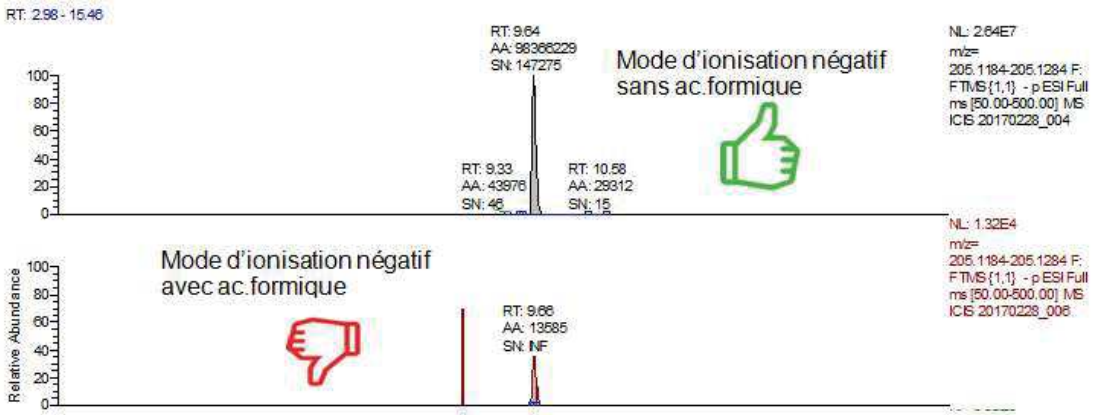


Figure 14. Chromatogrammes obtenus pour l'ibuprofène en utilisant la phase mobile avec et sans l'acide formique.

Le gradient optimal démarre avec une forte proportion en eau (98%) afin de retenir les composés les plus polaires et a une durée de 17 min.

2.2.3.2 Méthode venlafaxine et ses métabolites

Dans le cas de la métode venlafaxine et ses métabolites, deux colonnes analytiques ont été comparées pour optimiser la séparation chromatographique: Kinetex Biphenyl (100 x 2,1 mm; 2,6 µm) et Discovery HS F5 (100 mm x 2,1 mm; 3 µm) (fournisseur Sigma-Aldrich, Inc.) (Figure 12). Les deux colonnes analytiques ont présenté des performances (formes de pics gaussiens et résolution chromatographique) similaires. Cependant, la colonne Kinetex a généré des pics très fins par rapport à la colonne Discovery, ce qui peut compromettre la détection de métabolites connus et inconnus dans l'analyse non ciblée. Il faut se rappeler que cette méthode ciblée est un complément à l'analyse non ciblée appliquée aux tissus de la moule et pour cette raison, nous avons alors choisi de réaliser les analyses avec la colonne Discovery.

2.2.4 L'optimisation de la mesure spectrométrique de masse

L'optimisation de la mesure spectrométrique est un autre axe essentiel dans le développement d'une méthode ciblée et implique des paramètres de sensibilité et de spécificité à valider. En vue de trouver la meilleure sensibilité, définie comme la plus haute valeur d'intensité possible, pour chacun des analytes, nous avons déterminé le mode d'ionisation (positif ou négatif) le plus efficace pour chaque molécule sur deux analyseurs différents: l'orbitrap dans le cas de la méthode multi-residues et le Q-orbitrap dans la méthode venlafaxine et ses métabolites.

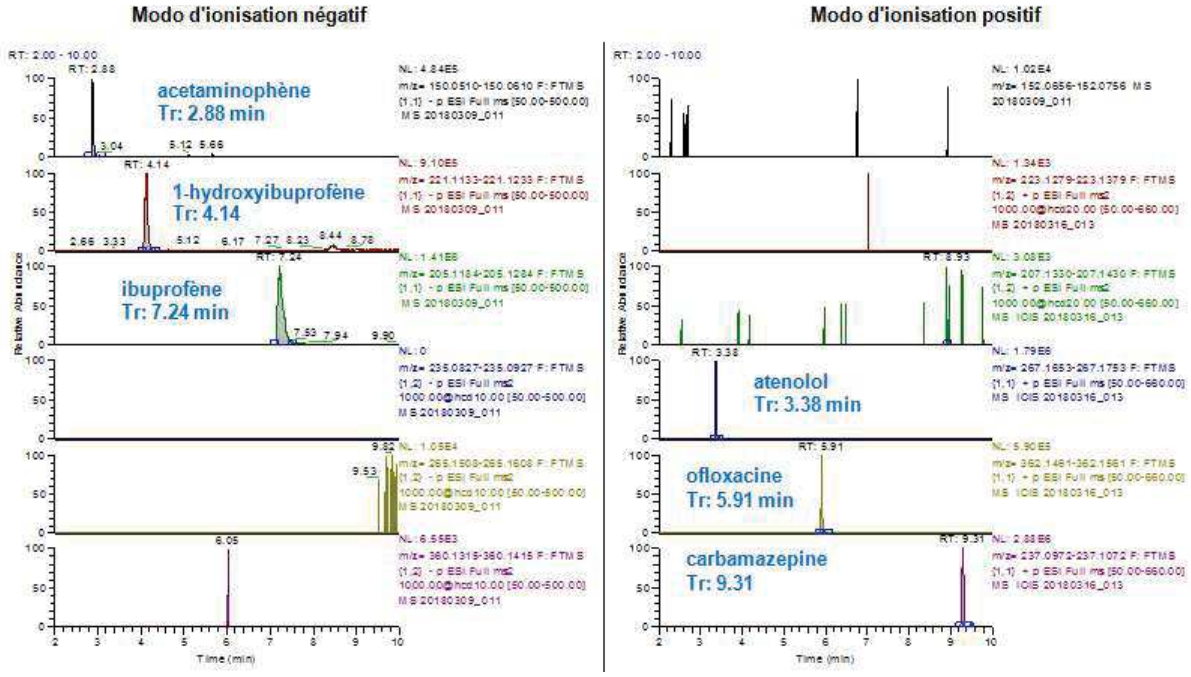


Figure 15. Chromatogrammes obtenus pour 6 molécules (acetaminophène, 1-hydroxyibuprofène, ibuprofène, aténolol, ofloxacine et carbamzépine) dans deux modes d'ionisation: positif et négatif avec l'analyseur Orbitrap.

Pour illustrer cette détermination, des chromatogrammes de 6 molécules en mode d'ionisation négatif et positif acquis avec l'analyseur orbitrap sont présentés à la figure 15. Les molécules acétaminophène, 1-hydroxy ibuprofène et ibuprofène n'ont été détectées qu'en mode d'ionisation négatif, tandis que le deuxième groupe de molécules, dont l'aténolol, l'ofloxacine et la carbamazépine, a été identifié uniquement en mode d'ionisation positive. Compte tenu de ce qui précède, deux modes d'ionisation ont été établis pour l'analyse de l'ensemble des molécules de notre étude.

Des valeurs moyennes des paramètres MS résultant d'un compromis pour atteindre la meilleure sensibilité possible ont ensuite été déterminées. Les valeurs moyennes des paramètres de la MS retenues pour les molécules de la méthode multi-residue et de la méthode de l'antidépresseur la venlafaxine et ses métabolites sont montrées dans le tableau 12.

Tableau 12. Valeurs moyennes pour les paramètres de la MS déterminées pour les différentes molécules selon la méthode ciblée.

	Méthode multi-résidus (analyseur orbitrap)		**Méthode venla/métabolites (analyseur Q-orbitrap)**
Paramètres	**Mode d'ionisation négative**	**Mode d'ionisation positive**	**Mode d'ionisation positive**
Shealth gas	55	55	55
Aux gas	10	10	10
Spray voltage (kV)	4,00	4,00	4,00
Capillary temp. (°C)	275	275	275
S-lens radio frequency (RF)	-	-	100
Capillary voltage (V)	-50	35	-
Tube lens voltage (V)	-100	110	-
Skimmer voltage (V)	-16	25	-
Heater (°C)	200	200	200

En vue de répondre aux critères de spécificité des méthodes d'analyse de détection et de confirmation des résidus pharmaceutiques proposés par la décision de la Commission européenne 2002/657/CE, des ions fragments pour chaque molécule ont par la suite été déterminés par fragmentation dans la cellule HCD du MS. Ces critères de spécificité ont été appliqués dans le développement de la méthode multi-residus, mais pas dans la méthode de la venlafaxine et ses métabolites, car la finalité de cette dernière méthode est l'approche non ciblée qui a été appliquée dans les tissus de la moule.

Pour la plupart des composés de la méthode multi-résidus, au moins deux ions fragments ont été identifiées après l'application des différentes énergies de collision dans la cellule HCD pour chacun de modes d'ionisation (10, 20, 30 eV en mode négatif et 10, 20, 30, 40 eV en mode positif). En vue de réaliser une acquisition en mode balayage complet et une acquisition avec fragmentation au cours de la même analyse, la vitesse de balayage de l'instrument a été optimisée et le pouvoir résolutif de l'analyseur de masse abaissé à 10000 (10 Hz, plus le pouvoir résolutif est important et plus le temps d'acquisition est long). Cette valeur du pouvoir résolutif nous a permis d'assurer l'obtention d'au moins 10 points par pic chromatographique, un des critères qui permet l'identification et la

confirmation des analytes, mais en même temps cette valeur a sacrifié la précision de masse, donc la spécificité de la méthode, comme cela a été évoqué par Pugajeva et al. (2017).

Une première expérience d'application de la méthode multi-résidus sur les eaux de surface et souterraines du Cameroun, a mis en évidence des possibles co-élutions avec la plupart des molécules d'intérêt, mettant en cause sa spécificité. Pour cette raison, nous avons alors choisi réaliser la quantification en utilisant les ions fragmentés, comme l'illustre le tableau 13, ce qui a amélioré la spécificité de la méthode et entraîné une perte de sensibilité.

Tableau 13. Mode d'ionisation et ions de quantification et de confirmation retenues pour chaque molécule étudiée dans l'analyseur Orbitrap.

Classe Thérapeutique	Molécules	Type d'ionisation	Ion quantification (energie eV)		Ion de confirmation (energie eV)	
Anti-épileptique	Carbamazépine	+	**237.1022**	10	**194.0962**	20
analgésiques/AINS	Codéine	+	**300.1594**	20	**243.1010**	20
	Codéine 6βD glucuronide	+	**476.1915**	20	**300.1587**	20
	Ibuprofène	-	**159.1170**	10	**205.1234**	10
	1-hydroxy-ibuprofène	-	**157.1010**	10	**221.1183**	10
	carboxy-ibuprofène	-	**191.1070**	10	**235.0975**	10
	Kétoprofène	-	**197.0600**	10	**253.0870**	10
	Diclofénac	-	**250.0190**	10	**252.0160**	10
	Acetaminophène	-	**150.0560**	10	**107.0360**	20
Antibiotiques/anti-infectieuse	Ciprofloxacine	+	**332.1405**	10	**288.150**	20
	Ofloxacine	+	**362.1511**	10	**318.1604**	20
	Sulfaméthoxazole	-	**156.0120**	20	**252.0448**	10
Benzodiazépines	Diazepam	+	**285.0789**	20	**257.0836**	20
	Oxazepam	-	**285.0436**	10	**257.0480**	10
	Oxazepam glucuronide	+	**287.0578**	20	**463.0903**	10
	Lorazepam	-	**283.028**	10	**319.0050**	10
Antidépresseurs	Venlafaxine	+	**278.2114**	10	**260.2003**	10
Régulaterurs des lipides sanguins	Pravastatine	-	**423.2388**	10	**321.1710**	20
	Acide fénofibrique	-	**231.0210**	20	**233.0180**	20
β bloquants	Aténolol	+	**267.1703**	10	**190.0861**	20
	Propanolol	+	**260.1645**	10	**183.0801**	20
Substitutifs aux opiaces	Buprénorphine glucuronide	+	**644.3429**	20	**468.3099**	20
	Norbuprénorphine	+	**414.2639**	20	**414.2639**	10
	Norbuprénorphine glucuronide	+	**590.2960**	20	**414.2632**	20

La figure 16 montre des exemples de chromatogrammes obtenus pour certaines molécules de l'étude multi-résidus en mode d'ionisation positive selon les paramètres présentés dans le tableau 13. Ces chromatogrammes ont été générés à partir de solutions standards de concentration de 200 ng/L de chaque molécule. L'intensité du signal obtenu pour la plupart des molécules illustrées correspond à l'ordre de grandeur de 5. L'acquisition en mode de balayage complet de ces molécules a montré des valeurs d'intensité de signal avec des ordres de grandeur de 7. La perte évidente de sensibilité est due à la fragmentation des molécules.

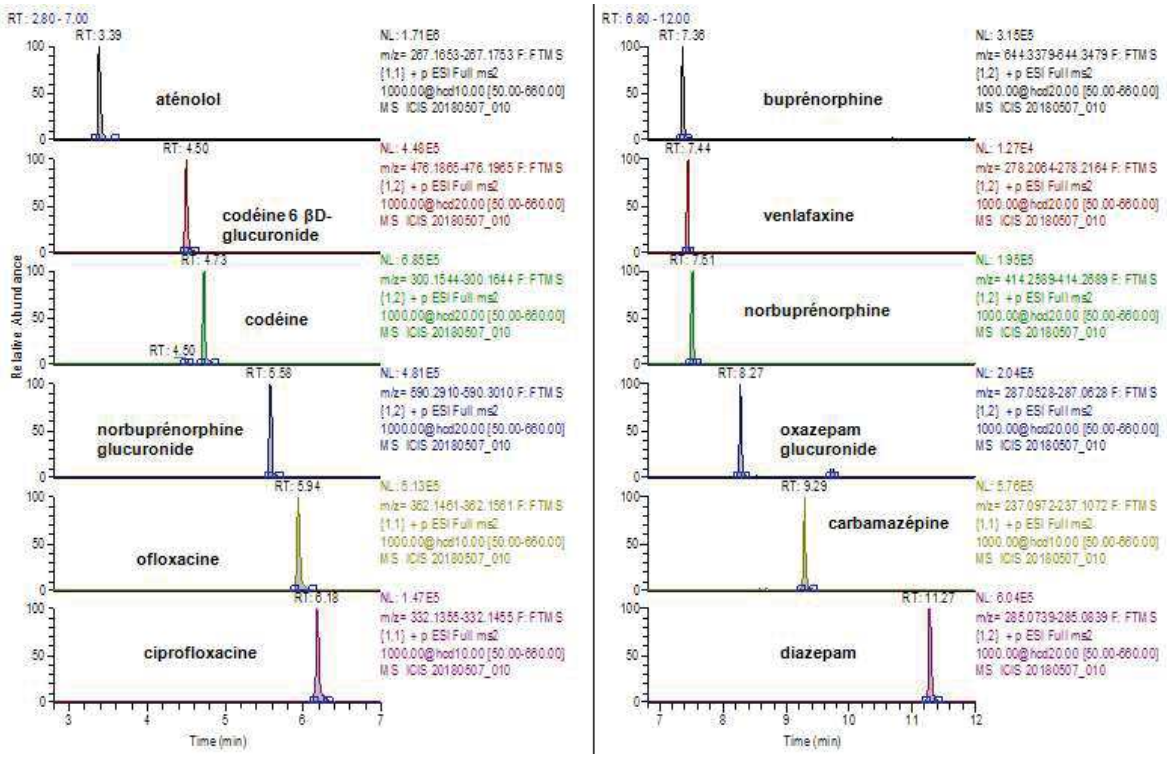


Figure 16. Exemples de chromatogrammes obtenus pour les molécules aténolol, codéine 6βD-glucuronide, codéine, norbuprénorphine glucuronide, ofloxacine, ciprofloxacine, buprénorphine, venlafaxine, norbuprénorphine, oxazepam glcuronide, carbamazépine et diazepam en mode d'ionisation positif en utilisant leurs ions de quantification et énergies de collision définies pour cette étude.

2.2.5 La validation des protocoles retenus

Les critères de validation des méthodes ont été les suivants: la linéarité, les limites de détection (MDL) et de quantification de la méthode (MQL), les rendements et les effets matrice obtenus pour chacun des analytes. Nous avons retenu seulement les molécules avec lesquelles nous avons obtenu des valeurs supérieures à 30 % de rendement brut, inférieurs à 80 % de suppression ou d'augmentation de signal pour l'effet matrice, inférieurs à 30 ng/L de MDL et inférieurs à 60 ng/L de MQL. Le choix des limites a pris en compte les valeurs rapportées dans la littérature et la rigueur analytique établie dans notre laboratoire. Le résumé des valeurs obtenues est montré dans les tableaux 14 et 15.

2.2.5.1 La linéarité

Les trois méthodes ciblées ont démontré une bonne linéarité sur les standards dans les intervalles de concentration compris entre: 1) 1 à 150 ng/mL pour toutes les molécules (entre mères et métabolites) inclues dans l'étude multi-résidus dans matrices aqueuses; 2) entre 5 à 80 ng/g pour les métabolites de venlafaxine et entre 100 à 3000 ng/g pour la molécule mère dans l'étude sur le tissu de la moule et 3) entre 0,1 à 10 ng/mL pour tous les molécules inclues dans l'étude sur l'eau de mer. Les courbes d'étalonnage du type linéaire ont eu des coefficients de corrélation (R^2) supérieurs à 0,98 pour l'ensemble de molécules de chaque méthode (Tableau 14 et 15).

2.2.5.2 Les limites de détection et de quantification

Les limites de quantification de la méthode multi-résidus sont pour certaines molécules de notre étude, plus élevées d'un facteur de 2 à 50 selon la molécule, par rapport aux valeurs retrouvées dans certaines publications récentes (López-Serna et al., 2011; Mokh et al., 2017). Il est difficile de comparer ces différences en raison des différentes méthodes d'extraction et d'analyse faites. Avec la méthode multi-résidus développée, les plus faibles limites de quantification ont été celles des anti-épileptiques, les antibiotiques/anti-infectieux, les benzodiazépines, l'antidépresseur et les hypolipémiants avec des valeurs égales ou inférieures à 25 ng/L (Tableau 14). Sur la base d'une étude récente de l'occurrence de RdM en point d'eau de Afrique (Madikizela et al., 2017), les limites de quantification de notre méthode restent en accord avec l'objectif de notre étude pour ce premier travail d'exploration .

Dans le cas des méthodes (tissu de la moule et eau de mer) développées pour détecter la venlafaxine et ses métabolites, les valeurs des limites de détection et quantification sont proches de celles rapportées dans la littérature (Tableau 6 et Tableau 15) (Martínez Bueno et al., 2014; Serra-Compte et al., 2018). Les valeurs ont indiqué que la MDL des métabolites de la phase II (notamment les glucuronides) étaient légèrement moins sensibles que les MDL des métabolites de la phase I et la molécule parente.

2.2.5.3 Les rendements et les effets matrice

Dans le cas de la méthode multi-résidus, les valeurs de rendement et d'effet de matrice étaient favorables pour la plupart des composés de l'étude (Tableau 14). La ciprofloxacine a été la seule molécule exclue de l'application de cette méthode développée pour le diagnostic de l'état de pollution des eaux au Cameroun.

La méthode mise au point pour détecter la venlafaxine et ses métabolites dans les tissus de la moule a montré une rétention très favorable des composés étudiés (Tableau 15). De plus, les différentes étapes de purification appliquées à l'échantillon ont réduit les effets de matrice des tissus.

Dans le cas de l'adaptation faite à la méthode de traitement tissulaire pour son application dans des matrices aqueuses, notamment l'eau de mer, les valeurs d'effet de matrice obtenues étaient faibles, ce qui est cohérent avec le type de matrice (Tableau 15). De plus, cette méthode a montré une très bonne rétention pour toutes les molécules de l'étude.

Tableau 14. Résumé des valeurs obtenues pour chacun des analytes selon les critères d'évaluation: linéarité, rendements bruts, effet matrice, limite de détection et de quantification de la méthode multi-résidus de médicaments

Classe Thérapeutique	Molécules	Etalon interne	Linearité (R^2)	Rendement (%)	Effet matrice (%)	LOD inst (pg)	LOD inst (pg)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
Anti-épileptique	Carbamazépine	Carbamazepine D8	0.9926	112 ± 15	-7 ± 5	10	30	5	10
analgésiques/ AINS	Codéine	Codéine D6	0,9972	53 ± 3	-16 ± 5	5	10	2	10
	Codéine 6βD glucuronide	Codéine 6βD glucuronide D3	0,9970	92 ± 9	-14 ± 2	30	50	5	10
	Ibuprofène	Ibuprofène D3	0.9996	90 ± 15	-6 ± 5	10	20	25	50
	1-hydroxy-ibuprofène	Ibuprofène D3	0.9982	94 ± 9	-27 ± 10	10	20	10	25
	carboxy-ibuprofène	Ibuprofène D3	0.9914	98 ± 6	-36 ± 6	10	50	2	10
	Kétoprofène	Oxazepam D5	0.9992	92 ± 17	-24 ± 9	10	20	5	10
	Diclofénac	Diclofénac D4	0.9942	80 ± 15	-38 ± 5	10	20	10	15
	Acetaminophène	Acetaminophène D4	0.9960	88 ± 12	-15 ± 7	10	20	5	10
Antibiotiques/ anti-infectieuse	Ciprofloxacine	Ofloxacine D3	0.9937	26 ± 6	-29 ± 6	5	10	5	10
	Ofloxacine	Ofloxacine D3	0,9944	57 ± 7	-12 ± 6	5	10	5	10
	Sulfaméthoxazole	Sulfaméthoxazole D4	0.9985	56 ± 8	34 ± 15	5	10	2	5
Benzodiazépines	Diazepam	Diazepam D5	0.9980	106 ± 15	–13 ± 3	5	10	5	10
	Oxazepam	Oxazepam D5	0.9952	83 ± 21	–51 ± 6	5	10	2	10
	Oxazepam glucuronide	Oxazepam glucuronide D5	0.9984	103 ± 5	–7 ± 1	30	50	5	10
	Lorazepam	Oxazepam D5	0.9951	85 ± 23	–56 ± 5	3	10	5	10
Antidépresseurs	Venlafaxine	Venlafaxine D6	0.9969	95 ± 8	–16 ± 5	5	10	5	10
Hypolipémiants	Pravastatine	Ibuprofène D3	0.9858	32 ± 2	-37 ± 8	10	20	10	25
	Acide fénofibrique	Acetaminophène D4	0.9984	87 ± 14	-24 ± 5	10	20	2	5
B bloquants	Aténolol	Aténolol D7	0.9982	102 ± 5	-4 ± 3	5	10	< 2	5
	Propanolol	Aténolol D7	0.9905	99 ± 38	-14 ± 9	5	10	25	75
Substitutifs aux opiaces	Buprénorphine glucuronide	Codéine 6βD glucuronide D3	0.9952	91 ± 15	-8 ± 4	30	50	10	10
	Norbuprénorphine	Norbuprenorphine D3	0.9951	82 ± 41	-59 ± 17	50	100	10	50
	Norbuprénorphine glucuronide	Codéine 6βD glucuronide D3	0,9990	85 ± 2	-11 ± 5	30	50	5	15

Tableau 15. Résumé des valeurs obtenues pour chacun des analytes selon les critères d'évaluation: linéarité, rendements bruts, effet matrice, limite de détection et de quantification de la méthode

	Soft tissu					L'eau de mer				
	Linéarité	Rendement bruts (%)	Effet matrice (%)	MDL (ng/g)	MQL (ng/g)	Linéarité	Rendement bruts (%)	Effet matrice (%)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
NODDV GLUCU	0,9923	50 ± 7	-48 ± 3	8,0	10,0	0,9967	91 ± 8	-47 ± 6	10,	15
ODV GLUCU	0,9993	49 ± 19	-51 ± 8	8,0	10,0	0,9945	94 ± 15	-41 ± 7	10	15
NNDDODV	0,9832	96 ± 4	-59 ± 6	3,0	4,0	0,9962	104 ± 9	-72 ± 3	6	10
NODDV	0,9988	98 ± 6	-41 ± 9	2,0	4,0	0,9995	113 ± 6	-73 ± 3	2	8
ODV	0,9886	100 ± 5	-32 ± 8	5,0	7,0	0,9996	109 ± 11	-69 ± 2	1	5
NNDDV	0,9987	97 ± 6	-55 ± 8	<1	2,5	0,9952	99 ± 10	-81 ± 3	5	10
NDV	0,9945	108 ± 12	-32 ± 12	1,5	3,5	0,9974	108 ± 10	-82 ± 2	1	5
Venla	0,9998	105 ± 7	-32 ± 11	<1	2,5	0,9992	105 ± 11	-84 ± 1	1	5

Nous pouvons conclure qu'en évaluant la performance des méthodes ciblées développées, elles sont optimales pour leur application dans les matrices environnementales correspondantes.

3. Approche non ciblée

3.1 Généralites

Nous avons montré dans la section précédente que l'approche ciblée est une analyse quantitaitve où les molécules sont identifiées par des méthodes analytiques utilisant des listes de molécules préalablement sélectionnées pour lequelles des standards analytiques sont disponibles. L'analyse non ciblée est qualitative conduisant à identifier la présence de molécules non préalablement ciblées. Récemment, l'élucidation de petites molécules telles que les produits pharmaceutiques, leurs métabolites et leurs produits de transformation en utilisant l'analyse non ciblée sur la base de la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS en anglais) gagne en pertinence dans les matrices environnementales. Dans cette approche, la HRMS est largement utilisée en raison de sa grande capacité résolutive (capacité à distinguer des ions présentant des rapports m/z voisins mais différents) et de sa sensibilité (Menet, 2011). Cependant, la confiance dans les identifications avec ce type d'approche varie selon les études et les substances, puisqu'il n'est pas toujours possible ni même significatif de synthétiser chaque molécule ou de les confirmer par des méthodes complémentaires (exemple la résonance magnétique nucléaire) (Schymanski et al., 2014). Pour cette raison, Schymanski et al. (2014) ont mis en place un système de niveaux pour faciliter la communication de la confiance dans ces identifications, impliquant cinq degrés où la confiance maximale se situe au Niveau 1 et la plus faible au Niveau 5 (figure 17).

Confiance en l'identification	Données minimales requises
Niveau 1: Structure confirmée (standard de réference disponible)	Ms, MS^2, temps de rétention, standard de réference
Niveau 2: Structure probable a) Par correspondance aux bases de données	MS, MS^2, Librairie MS^2
b) Par diagnostic logique	MS, MS^2, données expérimentales
Niveau 3: Candidat(s) potentiel(s) suspect , substructure(s), classes	MS, MS^2, données expérimentales
Niveau 4: Formule brute irrévocable (mais pas d'information structurale)	MS isotope/adduit
Niveau 5: Masse exacte d'intérêt (des milliers de molécules possibles)	MS

Figure 17. Niveaux de confiance proposés pour l'identification dans l'analyse non ciblée par HRMS

S'il existe suffisamment d'information sur la MS (exemple masse exacte, isotope, adduit), sur la MS^2 (fragmentation) et sur les données expérimentales (exemple comportement de rétention) de l'analyte non ciblé, il peut gagner en confiance jusqu'au Niveau 2 (correspondances en librairies, littérature et fragments diagnostiqués) et même au Niveau 1 après l'achat du standard correspondant pour les identifications. Au Niveau 3, il existe des preuves de structures possibles, mais l'information est insuffisante pour établir une structure exacte, unique. Un exemple de cela est le produit de transformation du principal métabolite de la cocaïne, la benzoylecgonine identifié par Bijlsma et al. (2013) où la position des substituants -OH et $-NO_2$ sur le cycle aromatique n'a pas pu être clarifiée (Bijlsma et al., 2013). Dans le cas du Niveau 4, une formule moléculaire peut être attribuée sans ambigüité à l'aide d'informations spectrales (exemple les adduits, isotopes) mais les preuves sont insuffisantes pour proposer des structures possibles. Au Niveau 5, la masse exacte (m/z) peut être mesurée dans un échantillon, mais il manque des informations pour attribuer une formule.

En considérant les niveaux de confiance décrits ci-dessus, plusieurs stratégies pour l'identification des analytes non ciblés ont été élaborées et mises en œuvre dans des études récentes. Pour traiter le grand volume de données obtenues à partir de la HRMS, différents logiciels gratuits (exemple XCMS, MZmine et EnviMass) et commerciaux (Waters MassLynx and MetaboLynx, Thermo Scientific Metworks and Sieve et Agilent MassHunter) sont utilisés pour leur extraction et leur traitement (Bletsou et al., 2015). La première étape est toujours la sélection des signaux. Dans cette étape, il est important de comparer l'échantillon avec des témoins pour exclure les signaux non pertinents. Par la suite, divers critères de discrimination de candidats sont utilisés pour l'identification des molécules non ciblées comprenant les modèles de prédiction du temps de rétention (Chiaia-Hernandez et al., 2014; Hug et al., 2014), la prédiction par fragmentation in

silico avec des méthodes de dissociation des liaisons, par exemple MetFrag (Wolf et al., 2010) ou des approches fondées sur des règles comme MassFrontier (Highchem, 2014), ainsi que le nombre de références disponibles pour une molécule dans les bases de données telles que ChemSpider ou SciFinder comme mesure d'importance relative dans l'environnement (Little et al., 2012, 2011). Finalement, la confirmation de l'identité avec un standard de référence est conduite lorsque cela est possible. Des études récentes ont proposé des schémas détaillés pour le traitement de données utilisant ce type d'approche (Hug et al., 2014; Jeon et al., 2013). Ces schémas démontrent que l'analyse non ciblée des échantillons environnementaux devient de plus en plus complexe. Ils soulignent la nécessité de définir des paramètres d'exclusion et des filtres pour prioriser les signaux et ainsi éliminer les faux positifs et négatifs. Compte tenu des informations qui précèdent, nous pouvons conclure que cette approche se trouve à un stade précoce de son développement en raison des améliorations constantes apportées tant aux instruments qu'aux programmes de traitement des données. Il est donc clair aujourd'hui que l'application de cette méthodologie dans les matrices environnementales pose des défis en raison de la complexité des matrices et du nombre encore limité de molécules déterminées dans les bases de données disponibles.

3.2 Développement de l'analyse non ciblé dans les tissus de la moule

Dans cette thèse doctorale, une approche non ciblée basée sur la génération de profils chimiques obtenus par LC-HRMS a été appliqué dans des extraits de moules méditerranéennes (*M. galloprovincialis*) pour caractériser les métabolites connus (déjà renseignés dans la littérature chez l'homme et chez la moule) et rechercher des métabolites non connus de l'antidépresseur venlafaxine. Afin d'augmenter la probabilité de détection des métabolites des phases I et phases II (connus et non connus) dans la moule, une méthode de traitement tissulaire a été développée en utilisant les propriétés physico-chimiques de ces composés, notamment la charge sur le groupe fonctionnel amine. Cette approche ciblée a été validée avec 7 métabolites connus de la venlafaxine chez l'homme et elle a été décrite en détail à la section 2.2. Le développement de l'analyse non ciblée comprend trois étapes: le design expérimental, l'acquisition des données et la métodologie de recherche des métabolites. Ces étapes sont décrites ci-dessous.

3.2.1 Design expérimental

Le design expérimental appliqué à l'exposition de moules à la venlafaxine en conditions contrôlées a été réalisé dans le but de nous renseigner sur les métabolites (connus et non connus) qui pourraient être produits chez la moule lorsqu'elles sont exposées à une concentration semblable à celle rapportée pour la VEN dans les eaux de surfaces.

Au laboratoire, les moules *(M. galloprovincialis)*, fournies par un conchyliculteur de Bouzigues (34, France), ont été nettoyées et la taille des coquilles a été mesurée (entre 6,0 et 7,2 cm). Deux groupes d'aquariums (5 aquariums par groupe; 2 L d'eau de mer/ 5 moules/aquarium) ont été préparés: un groupe contrôle solvant (le véhicule pour la VEN étant le méthanol, SC) et un groupe exposé (Ex) à 10 ng/L (concentration nominale). Après une période d'acclimatation de 7 jours, chaque groupe a été exposé durant 3 jours et 7 jours avant dissection. Pendant les périodes d'acclimatation et d'exposition, l'eau de mer a été renouvelée tous les jours (renouvellement statique) dans les deux groupes (control et exposé), la température ambiante a été régulée à 15 ± 2 °C et les moules ont été nourries avec une suspension d'algue *Tetraselmis suecica* (Greensea, Mèze, 34, France) à une concentration de 10,000 cell/mL.

3.2.2 L'acquisition des données

La méthode ciblée décrite dans la section 2 pour déterminer la venlafaxine et ses métabolites dans les tissus mous des moules a été appliquée dans les échantillons de cette étude. Après le processus d'extraction/purification des tissus, les échantillons ont été analysés par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse hybride Q-Orbitrap (Q-Exactive, Thermo Sicentific) qui permet d'allier sélectivité et résolution. L'utilisation de Q-Orbitrap en mode Full MS à double polarité (switch) a permis d'obtenir la masse exacte (<5 ppm) et la formule brute de chaque molécule d'intérêt présent dans les échantillons tandis que l'utilisation en mode MS^2 (fragmentation) a permis de sélectionner et fragmenter les molécules d'intérêt afin d'obtenir leurs spectres de fragmentation et des informations sur leur structure. En vue de réaliser deux événements au cours de la même acquisition (exemple: balayage complet à double polarité (positive et négative) ou balayage complet à polarité positive et fragmentation), le pouvoir résolutif a été fixé à 35000. Le choix de faire les acquisitions à double polarité au cours de la même analyse a été réalisée afin: 1) d'augmenter les possibilités de trouver des métabolites en utilisant les deux types d'ionisation et 2) d'éliminer le décalage potentiel du temps de rétention des signaux d'intérêt entre les deux modes d'ionisation.

3.2.3 Stratégie de recherche de métabolites

Après l'acquisition des données, une comparaison des profils métaboliques obtenues pour chacun des deux groupes (SC et Ex) a été réalisée afin de mettre en évidence des signaux présents dans les moules exposées et absents dans les moules non exposées à la VEN, donc susceptibles de correspondre à la VEN ou à ses produits de métabolisation. Pour cette première étape, nous avons décidé d'utiliser le logiciel R avec le script XCMS. Ce script identifie dans un premier temps l'ensemble des pics chromatographiques présents dans chaque échantillon soumis au retraitement. Il regroupe ensuite les pics chromatographiques possédant un rapport masse sur charge (m/z) et un temps de rétention similaire entre les différents échantillons. Enfin, le script recherche les données manquantes éventuelles dans un ou plusieurs échantillons de la série. Les signaux ainsi détectés sont réunis dans un fichier unique permettant une meilleure vue d'ensemble des informations acquises. Des indicateurs statistiques tels que le fold change (calculé comme le rapport entre l'intensité moyenne du signal dans les échantillons exposés et l'intensité moyenne du signal dans les échantillons contrôle) et la valeur p-value sont également montrés pour chacun des signaux dans ce fichier. Seuls les signaux ayant un fold change supérieur à 10 en mode d'ionisation négative ou positive ont été conservés et traités pour élucider leurs structures. De plus, les chromatogrammes ioniques extraits (EIC en anglais) ont été vérifiés pour tous les signaux potentiels associés aux métabolites afin de confirmer l'absence de tout signal dans les témoins. Afin d'illustrer, nous avons pris comme exemple deux chromatogrammes ioniques extraits obtenus en mode d'ionisation positive pour les signaux suspects avec les valeurs moyennes m/z expérimentales de A) 260,2008 et B) 264,1957 (figure 18). Les deux signaux se trouvent uniquement dans les échantillons exposés (Ex) et sont absents dans les échantillons contrôle (SC).

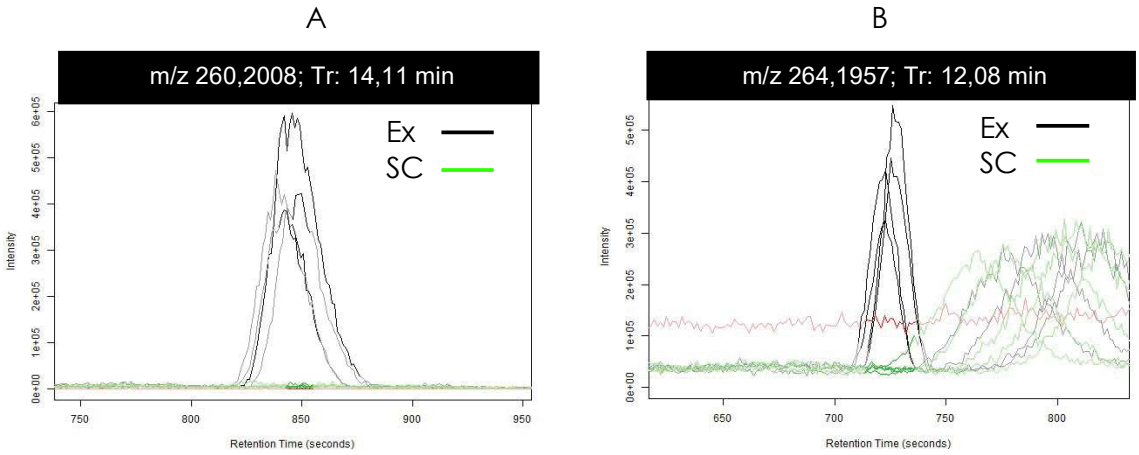


Figure 18. Exemples d'EIC de deux signaux potentiels à être des métabolites

Dans une deuxième étape, nous avons verifié le temps de rétention et la forme de pic des signaux suspects en utilisant le "layout' du logiciel ThermoXcalibur Qual Browser (Xcalibur 3.0, Thermo Fisher Scientific Inc.) pour déterminer si les signaux potentiels sont associés à la molécule mère VEN (exemple dimère ou isotopes de cette molécule) ou sont des métabolites potentiels. Afin d'illustrer, nous avons pris comme exemple le signal de la VEN et les deux signaux potentiels montrés précédement dans la figure 18. En comparant le pic de la VEN avec le premier signal suspect (A), le temps de rétention et la forme des pics sont très similaires, ce qui indique que ces signaux peuvent être associés (figure 19). Au contraire, en comparant la VEN et le deuxième signal suspect (B), les deux paramètres évalués (temps de rétention et forme du pic) ne sont pas très semblables. Le signal B peut potentiellement être un métabolite.

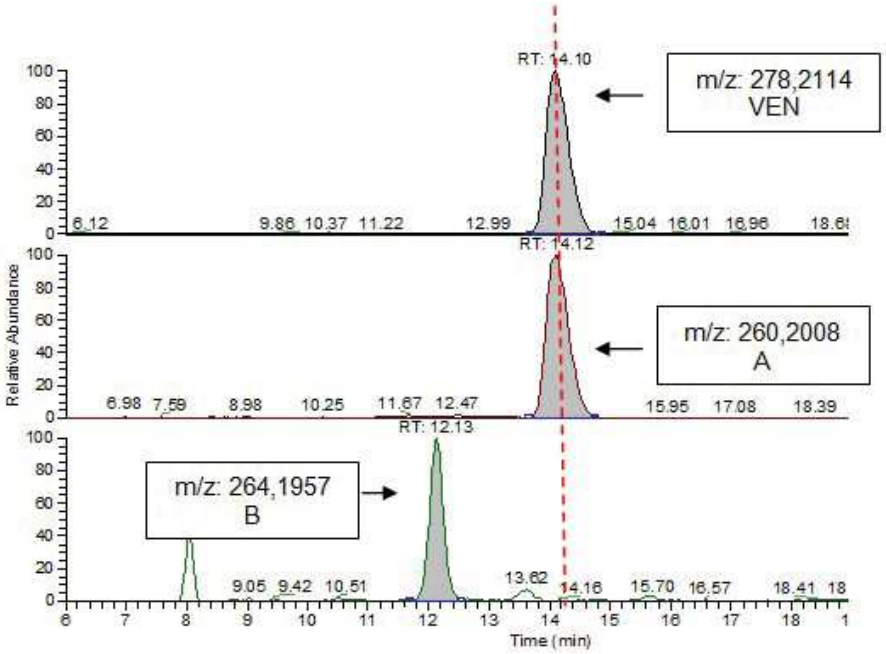


Figure 19. Exemple d'évaluation de temps de rétention et forme du pic entre les signaux suspects et le signal de la VEN

Une troisième étape a consisté à déterminer la différence de masse moyenne expérimentale entre les signaux suspects et le signal VEN afin d'identifier le fragment correspondant à l'aide du logiciel ThermoXcalibur Qual Browser en utilisant les outils de composition élémentaire et de simulation isotopique. Avec les informations précédentes, nous avons pu proposer des structures candidats pour les signaux potentiels. Un calcul final a été effectué, la différence entre la masse théorique et la masse expérimentale de chaque structure candidat proposée. La valeur de la différence doit être inférieure à 5 mmu pour qu'il y ait coïncidence et à ce moment-là, s'il existe une coïncidence, nous avons appliqué l'analyse ciblée pour confirmer et quantifier le métabolite. Cette strategie de recherche de métabolites a été appliquée à tous les signaux suspects.

Plus de détails sur les résultats obtenus dans cette étude seront développés au chapitre 4.

Chapitre 3: Diagnostic de la contamination des eaux superficielles et souterraines par les médicaments dans la région de Yaoundé (Cameroun) par approche ciblée.

Ce chapitre a été rédigé sous la forme d'un article scientifique (STOTEN - 660 (2019)886–898). Un résumé en Français décrit le contexte, les principales questions scientifiques et les résultats associés.

1. Antropic impacts on Sub-Saharan urban water resources through their pharmaceutical contmination (Yaoundé, Center Region, Cameroon)

1.1 Contexte

Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre 1, les données d'occurrence de RdM dans les eaux naturelles dans les pays africains sont très récentes (depuis 2012) et les études restent rares et ponctuelles. Dans les quelques travaux disponibles de la littérature scientifique, les antibiotiques/anti-infectieux, les analgésiques/AINS et les antiépileptiques font partie des classes thérapeutiques les plus recherchées. Les concentrations maximales rapportées atteignent plusieurs milliers de ng/L pour la plupart des molécules étudiés dans les eaux superficielles de ce continent, notamment dans l'Afrique subsaharienne. Les quelques études disponibles dans la zone subsaharienne indiquent que l'absence d'élimination et de traitement des eaux usées et des déchets solides et liquides provenant principalment des établissements de santé avec une forte densité de population et des effluents d'industries pharmaceutiques sont la principale cause des concentrations élevées de RdM retrouvées dans les cours d'eau (K'oreje et al., 2016; Segura et al., 2015). En plus, ces eaux usées brutes ou partiellement traitées contenant un mélange complexe de RdM peuvent être rejetées dans des ressources utilisées comme eau potable présentant un risque d'exposition pour la population (Gwenzi and Chaukura, 2018). Compte tenu de ce qui précède, il est justifié de poursuivre les efforts pour renseigner l'état de contamination par les produits pharmaceutiques des milieux aquatique dans les pays africains. Les pays africains particulièrement les villes africaines sont soumis à une pression anthropique majeure avec des infrasctures de gestion de l'eau insuffisante. Parmi les villes africaines, la ville de Yaoundé, Région Centre, Cameroun a été retenue. Cette capitale, avec près des deux millions et demi d'habitants et une croissance démographique de 2% par an entre 2015 et 2020 (Dirección General de Comunicación e Información Diplomática, 2019), est confrontée à de fortes pressions sur ses ressources d'eau, notamment le bassin versant du Méfou, et à un manque de crucial de réseaux d'assainissement. Cette ressource hydrographique est dense et largement utilisée par la population dans des activités telles que l'irrigation, le lavage, la baignade, la cuisine, etc. Ces utilisations multiples génèrent une exposition potentielle des populations aux polluants et pose des questions sur les riques sanitaires.

1.2 Objectif et principaux résultats

L'objectif principal du travail a été de fournir des informations de base sur i) la vulnérabilité des ressources d'eau (de surface et souterraines) à travers l'analyse de la pollution par les RdM, ii) l'exposition de la population à ces RdM à travers leur eau potable et iii) l'évaluation de la pertinence des produits pharmaceutiques comme indicateurs de pressions anthropiques sur les milieux aquatiques (l'anthropisation) dans le contexte spécifique du bassin versant du Méfou. Pour répondre à cet objectif et compte tenu de la rareté des données disponibles sur l'hydrologie, l'occupation des sols, l'utilisation de l'eau, la gestion des déchets et la consommation de médicaments par les habitants de Yaoundé, une approche multidisciplinaire a été appliquée. Avec l'aide des données disponibles dans les sources suivantes: i) les fichiers matriciels et vectoriels topographiques fournis par shuttle radar topography mission (SRTM) pour l'hydro-

géomorphologie, ainsi que ii) l'initiative de l'Agence spatiale européenne sur le changement climatique (ESA-CCI en anglais) en ce qui concerne à l'usage du sol et iii) les bases de données en libre accès concernant les bâtiments du projet Open Street Map, la zone d'étude a été divisée en 10 sous-bassins (situés tout au long du bassin du Méfou et de l'un de ses principaux affluents, le Mfoundi) caractérisés par leur environnement urbain ou périurbain. Pour une meilleure compréhension sur les usages de l'eau, la gestion des eaux usées et la perception de la pollution environnementale et de l'état de la santé de la population de Yaoundé, une enquête a été réalisée auprès de la population locale autour des points d'échantillonage des eaux de surface et souterraines des 10 sous-bassins versants identifiés pour cette étude. Afin d'effectuer une première caractérisation des niveaux de contamination en RdM dans les milieux aquatiques de la zone d'étude, une méthode d'analyse ciblée a été appliquée aux échantillons prélevés dans chacun des bassins versants pour connaitre les niveaux de contaminantion et discuter des variations spatio-temporelles de la contamination. Une description détaillée du développement de cette méthode a été présentée au chapitre 2.

Parmi les résultats obtenus, les données issues de la SRTM (2014), de l'ESA-CCI (2015) et d'OSM (2017) ont permis de compléter la caractérisation des sous-bassins versants. Par example, bien que les pentes soient plus abruptes dans les sous-bassins péri-urbains (11-21%), les vitesses d'écoulement sont plus faibles (0.1 à 0.4 m/s) et les temps de réponse hydrologiques sont élevés (5-10h) par rapport aux sous-bassains urbains. A priori, cela signifie que le transport des polluants tend à être plus ralenti dans les zones périurbaines. La part des constructions dans les sous-bassins péri-urbains varie entre 2 et 53%, tandis que dans les sous-bassins urbains la part des constructions atteint 88 % avec une densité de construction élevée (jusqu'à 1551 bâtiments/km^2). L'enquête sociologique a mis en évidence que l'habitat dans les sous-bassins urbains est caracterisé par des maisons de bas standing et que jusqu'à 79% des toilettes sont des latrines à canon. En outre, 80% des ménages déversent leurs eaux usées dans leur environnement immédiat (égouts, rivières et cours d'eau) et 71% des personnes interrogées ont indiqué qu'elles jetaient les médicaments périmés dans des toilettes ou des décharges car il n'existe au Cameroun aucun système de recyclage des médicaments périmés. En plus, 68% des personnes interrogées ont indiqué utiliser les ressources en eau souterraine provenant de puits (13%), de forages (45%) et de sources (10%) comme source d'eau potable.

Le diagnostic de l'état de la contamination a mis en évidence la présence de huit RdM appartenant à quatre classes thérapeutiques (anti-épileptique, analgésiques/AINS, antibiotique/anti-infectieux et β-bloquant) dans les eaux de surface et souterraines, en particulier dans les sous-bassins versants urbains. Dans ce contexte, les résidus de médicaments sont des indicateurs pertinents pour étudier l'impact de l'anthropisation sur les bassins versants de cette étude. En particulier, l'anti-épileptique carbamazépine a été détecté et quantifié dans 100% des échantillons d'eau en milieu urbain et dans 75% des échantillons d'eau dans les zones péri-urbaines tandis que l'analgésique acétaminophène a été détecté dans 100% des échantillons dans les zones urbaines et péri-urbaines, mais il a été quantifié plus fréquemment dans les zones urbaines (85%) que dans les zones péri-urbaines (75%). En général, la zone urbaine présentait des concentrations plus élevées de résidus de médicaments mesurés que la zone périurbaine. Cela prouve que les milieux aquatiques de la zone péri-urbaine subissent une pression anthropique inférieure à celle de la zone urbaine. Cette tendance est cohérente avec les activités humaines plus marquées dans la zone urbaine (urbanisation). Dans les eaux souterraines, certains résidus pharmaceutiques présentent de fortes

concentrations, cela pose des questions sur les dynamiques de flux d'eau et les relations nappe/rivière, des sujets encore peu renseignés sur le bassin versant de notre étude.

En conclusion, les composés ciblés ont été des traceurs appropriés pour démontrer que les latrines, les décharges, l'augmentation des zones construites et l'urbanisme exercent une forte pression sur les cours d'eau urbains de Yaoundé et ont un impact sur les ressources en eau destinées à la consommation humaine. Les eaux de surface et souterraines ont été contaminées par des RdM et les niveaux de contamination correspondent à ceux rapportés dans des études antérieures dans des masses d'eau subsahariennes avec des pics de pollution des analgésiques/AINS et une contamination plus ubiquitaire par l'anti-épileptique carbamazépine. La contamination des eaux souterraines rend les populations très vulnérables car elles dépendent de cet approvisionnement en eau comme alternative à un réseau officiel d'eau potable et pour compenser le manque d'infrastructures dans la capitale du Cameroun. Enfin, la dynamique urbaine augmente la pression sur les ressources en eau, c'est pourquoi Yaoundé doit adapter les usages de l'eau et les autorités publiques doivent protéger les ressources en eau, la santé humaine et l'environnement.

Title

Anthropic impacts on Sub-Saharan urban water resources through their pharmaceutical contamination (Yaoundé, Center Region, Cameroon)

P. Branchet [a,*,1], N. Ariza Castro[b,c,**,1], H. Fenet [b,2], E. Gomez [b,c,2], F. Courant [b,2], D. Sebag [d,2], J. Gardon [b,2], C. Jourdan [e,f,2], B. Ngounou Ngatcha [g], I. Kengne [h], E. Cadot [b,2], C. Gonzalez [a,3]

(a) Laboratoire de Génie de l'Environnement Industriel, IMT Mines Alès, University of Montpellier, Alès, France

(b) HydroSciences Montpellier, IRD, CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France

(c) Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago 159-7050, Costa Rica

(d) Normandie Univ, UNIROUEN, UNICAEN, CNRS, M2C, Rouen, France

(e) Observatoire de Recherche Méditerranéen de l'Environnement (OREME), University of Montpellier, Montpellier, France

(f) Laboratoire d'étude des Interactions entre Sol, Agrosystème et Hydrosystème (LISAH), INRA, Montpellier, France

(g) Department of Earth Sciences, Faculty of Sciences, University of Ngaoundéré, Ngaoundéré, Cameroon

(h) Wastewater Research Unit, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

* Correspondence to: P. Branchet, LGEI, 6, avenue de Clavières, 30 100 Alès, France.

**Correspondence to: N. Ariza, HydroSciences Montpellier, CC 057 – 163, rue Auguste Broussonnet, 34090 Montpellier, France.

1 Co-first authors and corresponding authors.

2 HydroSciences Montpellier, CC 057 – 163, rue Auguste Broussonnet, 34090 Montpellier, France.

3 LGEI, 6, avenue de Clavières, 30 100 Alès, France.

Abstract

Sub-Saharan urban centers have to tackle high population growth, lack of sanitation infrastructures and the need for good quality water resources. To characterize the impacts of anthropization on the water resources of the capital of Cameroon (Yaoundé), a multi-disciplinary approach was used in ten sub-watersheds (peri-urban and urban) of the Méfou watershed. Pharmaceutical residues were used as tracers of surface and groundwater contamination caused by the release of domestic wastewater from pit latrines and landfills. A water use survey was conducted in the vicinity of the sampling sites to better assess water use, treatment and management. Available land use and hydro-geomorphological data completed characterization of the sub-watersheds. The combined data showed that natural features (elevation, slope, and hydrography) and human activities (land use) favor rainfall-runoff events and hence surface water contamination. Pharmaceutical monitoring revealed contamination of both surface and groundwater especially in the urban sub-watersheds. Analgesics/anti-inflammatory drugs and anti-epileptic carbamazepine were the most frequently found compounds (in up to 91% of water samples) with concentrations of acetaminophen reaching 5,660 ng/L. In urban sub-watersheds, 50% of the groundwater sites used for drinking water were contaminated by diclofenac (476-518 ng/L), carbamazepine (263-335 ng/L), ibuprofen (141-276 ng/L), sulfamethoxazole (<2-1,285 ng/L) and acetaminophen (110-111 ng/L), emphasizing the need for a deeper understanding of the interactions between surface and groundwater. The use of groundwater as drinking water by 68% of the total population surveyed raises concerns about population exposure and potential health risks. This case study highlights the need for strategies to limit contamination of the water resource given the predicted future expansion of Sub-Saharan urban centers.

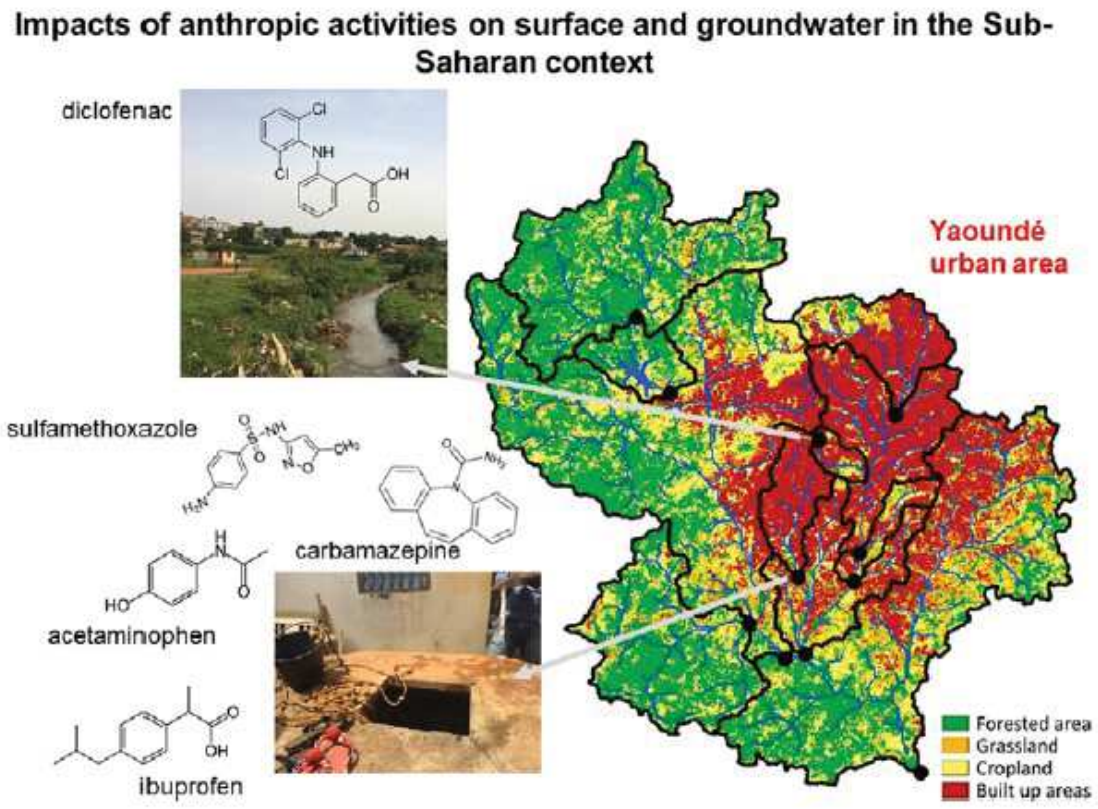
Keywords

Pharmaceutical residues, water resources, water use, urbanization, wastewater, Sub-Saharan Africa

Highlights

- Evidence of anthropic impacts on water resources with a multi-disciplinary approach.
- High pharmaceutical contamination of surface and groundwater in Yaoundé.
- Groundwater contamination suggests population exposure to pharmaceutical residues.

Graphic abstract



I. Introduction

Since the middle of the 19th century anthropization has had an impact on the aquatic environment and resources through land use modifications, environmental planning and the development of agriculture thereby altering the composition, functions and services provided by ecosystems (Guetté et al., 2018; Leduc et al., 2017; Misson et al., 2016). In highly anthropized areas like metropolises, increasing urbanization implies changes in water uses, an increase in water demand and degradation of water quality (Echart et al., 2012). Human activities in particular involve the release of anthropogenic contaminants into surface and groundwater resources (Archundia et al., 2017; Hayzoun et al., 2015; Mottes et al., 2015; Schaider et al., 2016).

Among anthropogenic contaminants, pharmaceutical residues have been the subject of numerous studies in recent decades all over the world (Beek et al., 2016; Carvalho and Santos, 2016; Gogoi et al., 2018; Madikizela et al., 2017). Improvement in analytical techniques has allowed their detection and quantification not only in waste water effluents but also in surface and groundwater including drinking water resources (Mompelat et al., 2009). Pharmaceutical residues are considered as anthropogenic tracers of the “urbanizing global water cycle” (Castiglioni et al., 2018).

Global pharmaceutical contamination of the aquatic environment has both specific and higher implications in developing countries particularly in sub-Saharan Africa. Both the increasing human pressure on water resources and the growing demand for freshwater in urban settlements lead to the risk of exposure of population and environmental exposure to a cocktail of urban contaminants including pharmaceutical residues (Gwenzi and Chaukura, 2018; Madikizela et al., 2017).

In sub-Saharan metropolises the main problem is the lack of disposal and treatment of wastewater and of solid and liquid waste. The lack and/or inadequate removal of pharmaceuticals during standard treatment of wastewater means raw or partially treated wastewater can be discharged into drinking water resources (Gwenzi and Chaukura, 2018). These risks have been poorly documented in sub-Saharan African and pioneer studies are currently being conducted to better understand the sources, occurrence and fate of pharmaceuticals in water bodies (Ebele et al., 2017; Madikizela et al., 2017). According to these reviews only pharmaceutical contamination of water bodies in South Africa, Kenya, Ghana, Mozambique and Nigeria have been partially monitored.

This aim of this study was thus to characterize the impact of anthropization on surface and groundwater using pharmaceuticals as tracers of urban contamination in a sub-Saharan capital city, Yaoundé, Center Region, Cameroon. With almost two million inhabitants and 6% demographic growth a year between 2000 and 2005 (BUCREP, 2010) Yaoundé faces heavy pressures on its water resources (Branchet et al., 2018; Djuikom et al., 2009; Menye et al., 2012; Naah, 2013) and a crucial lack of sewage systems (Wethé et al., 2003). Waste management issues and the related occurrence of solid and liquid wastes in the urban streams were reported by previous literature (Lieunang Letche et al., 2009; Menye et al., 2012).

The main objective of this research is to provide baseline information on (i) the vulnerability of surface and groundwater resources by analyzing pharmaceutical contamination, (ii) population exposure to pharmaceuticals through their drinking water, and at the same time, (iii) to assess the suitability of pharmaceuticals as anthropic tracers in the specific context of the Méfou watershed.

Due to the scarcity of data concerning hydrology, land use, water use, waste management, and the consumption of pharmaceutical drugs by the inhabitants of Yaoundé, we used a multidisciplinary approach. Available land use and hydro geomorphological data from the shuttle radar mission topography (STRM) enabled us to understand and describe local features. Exploration of water use (drinking and/or corporal (hygiene) and/or domestic (cooking, washing-off., etc.) uses) in the households in the vicinity of the groundwater water sampling sites was conducted in March 2018. Information on local water uses, waste water management and sanitation was collected to understand the specificities of this sub-Saharan African capital city. For an overview of the occurrence of pharmaceuticals, surface water and groundwater in the upper Méfou basin that drains Yaoundé and its outskirts were monitored in February/March, 2018. Given the lack of information on pharmaceutical consumption in Yaoundé, the targeted analytes were selected based on their reported occurrence in the aquatic environment in Sub-Saharan water bodies (Madikizela et al., 2017) on their various physicochemical characteristics and in order to include some metabolites poorly documented. This multidisciplinary approach provides an integrated assessment of human impacts on the aquatic resources linked to the environment and water use features.

II. Material and methods

II.1. Local settings

II.1.1. Location of the study area

The Méfou watershed is located in the Center Region of Cameroon (latitude 3°30' to 3°58'; longitude 11°20' to 11°40'), and covers an area of 840 km^2 (Olivry, 1986). The Mfoundi River is one of the major tributaries of the Méfou River and drains the city of Yaoundé (latitude 3°52'; longitude 11°31') comprising an area of 180 km^2. The Méfou and Mfoundi watersheds are described in detail in a previous paper (Branchet et al., 2018). The region has a Guinean climate characterized by two rainy seasons (March-June and September-November) and two dry seasons (December-February and July-August). Annual rainfall is around 1,600 mm (Moffo et al., 2016; Olivry, 1986; Srang, 1972). The study area comprised the upper Méfou watershed and the Mfoundi watershed (Fig.1).

The source of Yaoundé's tap drinking water is surface water. The Camwater catchment station is located on the Méfou artificial lake in the upper part of the Méfou basin and is surrounded by a peri-urban area. A second water catchment is located downstream from the confluence between the Méfou and Nyong Rivers.

In addition, shallow aquifers are pumped to supply water to the local population for different uses (domestic use, drinking water, irrigation, etc.). This pumped groundwater is constituted by the upper unconfined porous aquifer in the lateritic soil.

The basement comprises metamorphic rocks including paragneiss, migmatite gneiss and schists with the abrasion products laterites on the top. Soils at the top of the hills and on the slopes are ferralitic. The soils in the lowlands are hydromorphic clay and sand and originate from slope colluvium and river alluvium (Bachelier, 1959). Networks of fractures and fissures enable the existence of unconfined porous ferralsol aquifers (Bon et al., 2016). In this sandy silty clay, fluctuations in the water table range from 0.49 m in the

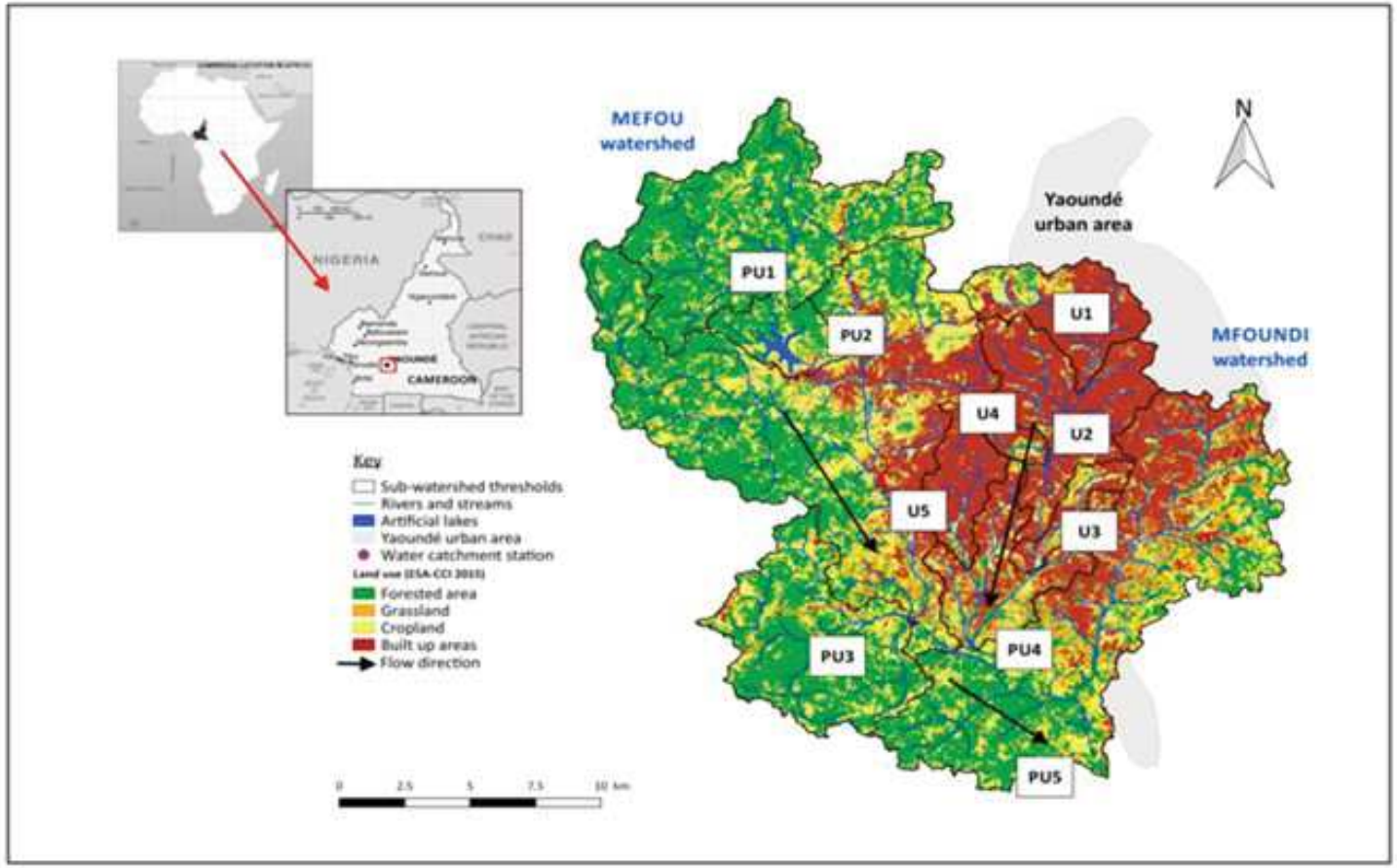


Figure 1: Land use (ESA-CCI 2015; resolution 20 meters), hydrographic network (SRTM 2014), Yaoundé urban area (Open Street Map) and the 10 sub-watersheds of the upper Méfou and the Mfoundi watersheds studied

PU_x: peri-urban; $U:_x$urban environment of the sub-watershed concerned. The map of the whole Méfou watershed is available in (Branchet et al., 2018).

valleys to 1.3 m on the plateau according to Ntep et al. (2014). Deeper aquifers (> 20 m) are located in the fractured gneiss.

Thus “groundwater” from wells, boreholes and sources is from surface water infiltrated in the upper meters of soil up to 20 meters according to litterature (Kringel et al., 2016). In the study area, the mean well depth is 4.2±3.1 meters (n=21 wells). These aquifers are known to receive inputs from innumerable pit latrines and septic tanks (Tabué Youmbi et al., 2009) which has not been listed during the present work.

II.1.2. Sub-watershed characterization

Available data on the study area were used to assess land use, geomorphological and hydrological specificities. The data came from a digital elevation model (DEM) from the shuttle radar topographic mission (SRTM) (Farr et al., 2007) at a resolution of 30 m for geomorphology (slope, elevation, topography) and hydrology (lag-time, flow velocity); the European spatial agency climate change initiative (ESA-CCI) (ESA, 2016) for land use at resolutions of 20 m and 300 m depending on the shapefiles; and open access data concerning buildings from the Open Street Map project (OpenStreetMap Contributors, 2018); completed by field measurements.

The main land uses in the study area (source ESA-CCI, 2015) are forests (39%), built up areas (27%) and croplands (24%) (Fig. 1). Based on the SRTM data, the upper Méfou and Mfoundi watersheds were divided into 10 sub-watersheds (Table 1 and Fig. 1). These sub-watersheds are characterized by their peri-urban or urban environment. The peri-urban sub-watersheds are PU1 (Etoud Village), PU2 (Camwater), PU3 (Ossongoé), PU4 (Oil Palm) and PU5 (Nsimalen). The urban sub-watersheds are U1 (Merchandise station), U2 (Sofavinc), U3 (Messamendongo), U4 (Melen) and U5 (Biyeme-Assi).

II.1.3. Design of the water use survey

A qualitative exploration on water use of the general population of Yaoundé was conducted in March 2018. The local population in the vicinity of the surface and groundwater sampling points of the 10 sub-watersheds was surveyed. Systematic sampling was done of all the households located next to the water sampling point, and then of every two or three houses, depending on local features. People were interviewed face to face. The head of the household was questioned but if he was absent, his wife (or family member that was more than 15 years old, or the cleaning lady) was questioned. Between two and 15 households were surveyed depending on the location, giving a total of 73 households.

The survey tool was a questionnaire adapted from (Kringel et al. 2016) and from (INS et BGR 2013). It is based on the knowledge, aptitude, perception and behaviour (KAPB) (WHO, 2008)survey towards the urban environment. The survey questionnaire comprised five sections: (i) the socio demographic characteristics of the household including the housing standing as defined in the literature (Franqueville, 1984; Tanawa et al., 2002; Tchotsoua, 1994), (ii) water use: water source, water treatment and identification of potential sources of pollution, (iii) sanitation: type of toilet, excreta management, (iv) perception of pollution and (v) self-rated perception of health: health problems and pharmaceutical consumption and waste management. Questions concerning water use focused on drinking water and domestic water uses.

Participation to the survey was volunteer and the respondents could withdrawal at any time during the questionnaire administration. We insured that the collected data will be anonymous and particularly that: the name of the respondents were not written down; the paper questionnaires will be kept in a closed and

secured wardrobe, beyond reach of the public, during the research duration (2 years) then during 5 years. Then, they will be destroyed.

II.2. Environmental analysis

II.2.1. Sampling sites and sampling procedure

Sampling sites were located in 10 sub-watersheds selected for their spatial distribution across the hydrographic network (Table 1 and Fig. 2). For surface water, five sampling sites (U1, U2, U4up, U4-Do and U5) were located on urban rivers (three sites on the Mfoundi River, one site on the Biyeme River and one site on the Olézoa River). Five sampling sites (PU2 to PU5) were located on peri-urban rivers (three sites on the Méfou River, one site on the Ossongoé River and one site on the Mfoundi River). Every surface water outlet in the sub-watersheds was sampled for pharmaceutical analyses except PU1, U3 and U4 sub-watersheds. At U4, the Olézoa River was sampled upstream (U4-Up) and downstream (U4-Do) from where the university hospital discharges its effluent into the Olézoa River. PU2 corresponds to the Camwater water treatment station on the Méfou River. Samples water were collected from the influent (raw water) entering the station (PU2-Up) and from the effluent (treated water) leaving the station (PU2-Do).

Eleven sites corresponded to sampled groundwater (seven boreholes, three wells and one spring). No wells, boreholes or sources were present at PU2 and PU3 so we couldn't sampled groundwater at these sites. In U4 (Melen) and U5 (Nsimalen), several groundwater sites were used for drinking, corporal and domestic uses so two wells in U4, and two boreholes and one well in U5 were sampled (Table 1).

Surface water samples were collected on several occasions (one to three times depending on local authority authorization) in the rainy season in February and March 2018 (Table 1). Groundwater samples were collected once in March 2018. Glass bottles were used to retrieve grab samples. Before use, the bottles were cleaned with a potassium hydroxide solution (Neodisher® LM3 from Dr.Weigert, France) and Milli-Q water to avoid cross contamination. At the river sampling sites, grab samples were retrieved at a depth of about 1 meter. Water from wells was collected in the bucket that was usually used, after first rinsing it. In the case of boreholes, the pump was left running until we were sure of reaching the groundwater to avoid sampling water that had accumulated in the pipes. Water from sources were directly collected in sampling glass bottles, after first rising it. After sampling, the glass bottles were immediately stored in the shade at 4 °C and treated within 24 h. All water samples were analyzed in duplicate. The physicochemicals properties of the samples in situ are shown in the SupplementaryMaterials (SM2).

II.2.2. Pharmaceutical analysis

II.2.2.1. Chemicals and materials

Fifteen pharmaceuticals belonging to eight different therapeutic classes and nine metabolites were selected and corrected by fourteen internal standards with purities equal to or greater than 98% (Table 2).Individual stock standard and isotopically labelled standard solutions were prepared at a concentration of 100 mg/L in methanol, with the exception of ofloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin-d3 that were dissolved in methanol: water (50:50, v/v) by adding 0.2 % hydrochloric acid. All the standard solutions were stored at -20 °C. Working solutions (range of 5-500 ng/L), containing all the pharmaceuticals, were prepared by appropriate dilution of the stock solution in methanol. A mixture with all isotopically labeled internal standards was prepared at a concentration of 1 mg/L in methanol. Ultrapure water was generated by a Simplicity UV system

Table 1: Links between the names of the sub-watersheds and the names of the surface and groundwater sampling sites; and related rivers and environment

Sub-watersheds were named according to their environment, i.e. PU_x: peri-urban or U_x: urban. For groundwater sampling sites, B corresponds to boreholes, S to springs and W to wells. PU2 was sampled upstream (PU2-Up) and downstream (PU2-Do) the raw water treatment at the Camwater station. Site U4 was sampled upstream (U4-Up) and downstream (U4-Do) from the point source of the university hospital effluents (around 0.5 km from the university hospital)

Numbers in brackets (n=x) refer to the number of samples taken at a given site. Groundwater was sampled once during the water use survey (see II.1.3).

The last column in the table lists the names of sampling points used in the related study by Branchet et al. (2018) on pesticide contamination of the Méfou watershed.

Name of the sub-watershed in the present study	Name of the surface water sampling site (n=1 to 3)	Name of the groundwater sampling site (n=1)	Name of the river/tributary	Environment	Name of the sampling point used to monitor pesticides in Branchet et al. (2018)
PU1 - Etoud Village	/	PU1-B1	Méfou	Peri-urban	Méfou1
PU2 – Camwater	PU2-Up (n=1) PU2-Do (n=1)	/	Méfou	Peri-urban	Méfou2
PU3 – Ossongoé	PU3 (n=2)	/	Ossongoé (Méfou tributary)	Peri-urban	/
PU4 - Oil Palm	PU4 (n=2)	PU4-B1	Mfoundi	Peri-urban	Mfoundi4
PU5 – Nsimalen	PU5 (n=2)	PU5-B1	Méfou	Peri-urban	Méfou5
U1 - Merchandise station	U1 (n=3)	U1-S1	Mfoundi	Urban	Mfoundi1
U2 – Sofavinc	U2 (n=3)	U2-B1	Mfoundi	Urban	Mfoundi2
U3 – Messamendongo	/	U3-B1	Mfoundi	Urban	Mfoundi3
U4 – Melen	U4-Up (n=3) U4-Do (n=3)	U4-W1 U4-W2	Olézoa (Mfoundi tributary)	Urban	/
U5 – Biyeme-Assi	U5 (n=3)	U5-B1 U5-B2 U5-W1	Biyeme (Mfoundi tributary)	Urban	Biyeme1

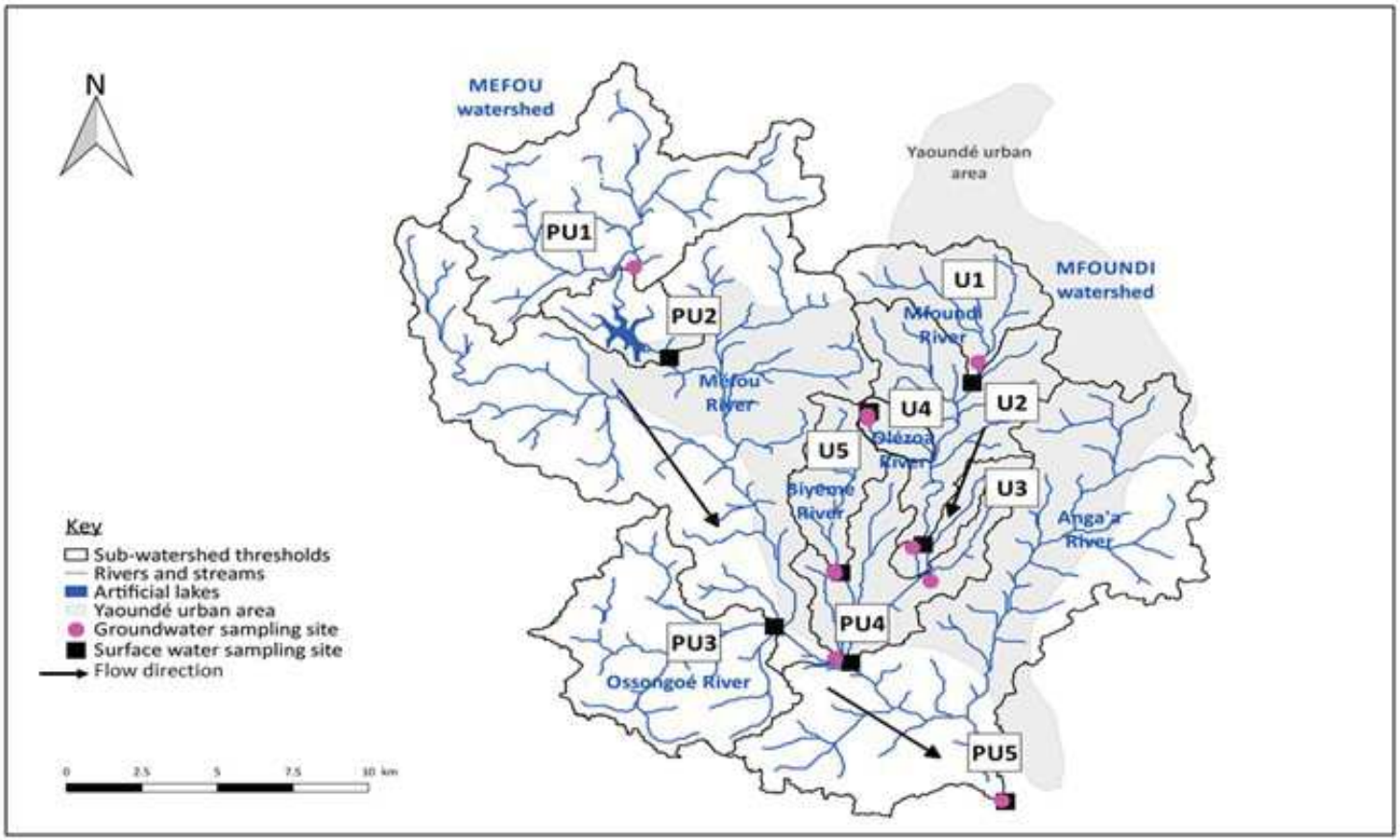


Figure 2: Location of surface and groundwater sampling sites on the 10 sub-watersheds of the upper Méfou and Mfoundi watersheds

U_x sites are located on the Mfoundi River, PU_x on the Méfou River, U4 on the Olézoa River, U5 on the Biyeme River. PU3 is located on the Ossongoé River

from Millipore (Bedford, MA, USA) with a specific resistance of 18.2 MΩ.cm at 25°C. HPLC/MS-grade solvents (methanol and acetonitrile - ACN) were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Formic acid (purity, 98%) was purchased from Fisher Labosi (Elancourt, France). All chromatographic solvents were filtered through a 0.22 µm nylon membrane filter (Nylaflo^{TM}, Michigan, USA). Glass-fiber filters (GF/F) (with 0.7 µm pore size) purchased from Whatman (Maidstone, UK) were used to filter the water samples. Oasis® HLB 6cc (200 mg) cartridges, purchased from Waters Corporation (Mildford, USA), and a Visiprep^{TM} DL Solid Phase Extraction (SPE) vacuum manifold purchased from Supelco (Bellefonte, USA) were used for solid phase extraction. Nanosep® MF 0.22 µm centrifuge filters purchased from PALL Life Sciences (Michigan, USA) were used to filter the extracts before chromatography injection.

II.2.2.2. Water sample extraction and analysis

Filtered surface and groundwater samples (500 mL) were spiked with the mixture of isotopically labeled standard to reach a final concentration of 100 ng/L. Waters were extracted using Oasis HLB cartridges, previously conditioned with (2x5 mL) of methanol followed by (2x5 mL) of ultra-pure water at a flow rate of approximately 5 mL/min.

The cartridges were rinsed with 5 mL ultrapure water and dried under vacuum for 1 h. Analytes were eluted with 10 ml of methanol. Extracts were evaporated to dryness at 35 °C under a gentle stream of nitrogen, reconstituted with 200 µL of acetonitrile: ultrapure water (2:98, v/v) and filtered before analysis.

Analyses were carried out on an Exactive LC-HRMS (Thermo Fisher Scientific) using an HPLC Accela 1250 Pump and a degasser (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with an analytical column (KinetexBiphenyl, 100 x 2.1 mm; 2.6 µm particle size, Phenomenex). ACN and water were used as mobile phases. Addition of 0.1% formic acid was preferred in positive ionization mode. The optimal separation was achieved at a flow rate of 400 µL/min. The optimized gradient elution program started with 2% of ACN isocratic for 0.5 min, increased to 50% of ACN at 12 min, followed a linear gradient to 100% ACN at 14 min, remained at this level for 3 min, and then decreased to 2% ACN for equilibration of the column for 7 min. The injection volume was set to 10 µl. The Exactive HRMS was turned to a mass resolution of 10,000 (FWHM, m/z 200) with a mass spectrum range of 50-650 m/z. A heated electrospray ionization probe (HESI) source in positive (pos) and negative (neg) mode was used. The HESI parameters were as follows: heater temperature 200 °C; capillary temperature 275 °C; electrospray voltage 4 kV; sheath gas flow 55 arbitrary units; auxiliary gas flow 10 arbitrary units. The following parameters were used in positive and negative ionization modes, respectively; capillary voltage 35V and -50V; tube lens voltage 110 V and-100 V; finally skimmer voltage 25 V and -16 V. "All ion fragmentation" MS/MS mode was applied with high energy collision dissociation (HCD) cell set to 10 and 20 eV. Analytical results were calculated with Thermo Scientific Xcalibur software. Each compound was identified according to: (1) retention time; (2) mass accuracy (max 5 ppm deviation) of protonated $(M-H)^+$ or deprotonated $(M-H)^-$ molecules in MS/MS mode; (3) identification of at least one ion fragment at a mass accuracy < 5 ppm in MS/MS mode and (4) ion ratio fulfilled between the ion fragment and the parent ion for each molecule.

.

Table 2: Therapeutic classes, internal standards, supplier, purity, ionization type, quantification and confirmation ions, instrumental LODs and LOQs, methods LODs and LOQs and absolutes recoveries observed for each molecule in LC-MS Orbitrap

Therapeutic classes	Molecules[1ou 2]/ internal standards	Supplier	Purity	Ionisation type	Quantification ion (energie eV)		Confirmation ion (energie eV)		RT (min)	LOD^{inst} (pg)	LOQ^{inst} (pg)	LOD^{Meth} (ng/L)	LOQ^{Meth} (ng/L)	Absolute Recovery (%)
Anti-epileptic	Carbamazepine[1]/Carbamazepine D8	Sigma-Aldrich	≥99.0%/ ≥98.5%	+	**237.1022**	10	**194.0962**	20	9.30	10	30	5	10	112±15
Analgesic/anti-inflammatory and their metabolites	Codeine[1]/Codeine D6	Sigma-Aldrich	99.9%/99.2%	+	**300.1594**	20	**243.1010**	20	4.75	5	10	2	10	53±3
	Codeine 6βD glucuronide[2]/ Codeine 6βD glucuronide D3	Sigma-Aldrich/LGC	>99.9%/99%	+	**476.1915**	20	**300.1587**	20	4.53	30	50	5	10	92±9
	Ibuprofen[1]/Ibuprofen D3	Sigma-Aldrich	≥98.0%	-	**159.1170**	10	**205.1234**	10	11.31	10	20	25	50	90±15
	1-hydroxy-ibuprofen[2]/Ibuprofen D3	LGC/Sigma-Aldrich	99.3%/ ≥98.0%	-	**157.1010**	10	**221.1183**	10	6.80	10	20	10	25	94±9
	carboxy-ibuprofen[2]/Ibuprofen D3	Sigma-Aldrich	99.4%/ ≥98.0%	-	**191.1070**	10	**235.0975**	10	1.78	10	50	2	10	98±6
	Ketoprofen[1]/Oxazepam D5	Santa Cruz Biotechnology/ Sigma-Aldrich	>99%/99.4 %	-	**197.0600**	10	**253.0870**	10	8.83	10	20	5	10	92±17
	Diclofenac[1]/Diclofenac D4	LGC	99.5%/98%	-	**250.0190**	10	**252.0160**	10	10.72	10	20	10	15	80±15
	Acetaminophen[1]/Acetaminophen D4	Sigma-Aldrich	>99.9%/99.8%	-	**150.0560**	10	**107.0360**	20	2.96	10	20	5	10	88±12
Antibiotics/anti-infective	Ofloxacin[1]/Ofloxacin D3	LGC	99.7%/98.5%	+	**362.1511**	10	**318.1604**	20	5.96	5	10	5	10	57±7
	Sulfamethoxazole[1]/ Sulfamethoxazole D4	LGC	99.8%/99.5%	-	**156.0120**	20	**252.0448**	10	7.17	5	10	2	5	56±8
Benzodiazepine and their metabolites	Diazepam[1]/Diazepam D5	LGC	99.9%/99.5%	+	**285.0789**	20	**257.0836**	20	11.29	5	10	5	10	106±15
	Oxazepam[1,2]/Oxazepam D5	LGC/Sigma-Aldrich	99.9%/99.4 %	-	**285.0436**	10	**257.0480**	10	9.87	5	10	2	10	83±21
	Oxazepam glucuronide[2]/ Oxazepam glucuronide D5	LGC	99%/98.2%	+	**287.0578**	20	**463.0903**	10	8.28	30	50	5	10	103±5
	Lorazepam[1]/Oxazepam D5	LGC/Sigma-Aldrich	99.9%/99.4 %	-	**283.0280**	10	**319.0050**	10	10.05	3	10	5	10	85±23
Antidepressant	Venlafaxine[1]/Venlafaxine D6	Sigma-Aldrich/LGC	≥98.5%/98.7%	+	**278.2114**	10	**260.2003**	10	7.45	5	10	5	10	95±8
Lipid lowering and their metabolites	Pravastatin[1]/Ibuprofen D3	LGC/Sigma-Aldrich	98.9%/≥98.0%	-	**423.2388**	10	**321.1710**	20	7.87	10	20	10	25	32±2
	Fenofibric acid[2]/Acetaminophen D4	Sigma-Aldrich	≥98.0%/99.8%	-	**231.0210**	20	**233.0180**	20	8.20	10	20	2	5	87±14
Beta-blockers	Atenolol[1]/Atenolol D7	LGC/Sigma-Aldrich	99.3%/≥95%	+	**267.1703**	10	**190.0861**	20	3.42	5	10	<2	5	102±5
	Propanolol[1]/Atenolol D7	LGC/Sigma-Aldrich	99.9%/≥95%	+	**260.1645**	10	**183.0801**	20	8.54	5	10	25	75	99±38
Opiate substitutes and their metabolites	Buprenorphine glucuronide[2]/ Codeine 6βD glucuronide D3	Sigma-Aldrich/LGC	99.2%/99%	+	**644.3429**	20	**468.3099**	20	7.38	30	50	10	10	91±15
	Norbuprenorphine[2]/ Norbuprenorphine D3	Sigma-Aldrich	99.1%/99.7%	+	**414.2639**	20	**414.2639**	10	7.52	50	100	10	50	82±41
	Norbuprenorphine glucuronide[2]/ Codeine 6βD glucuronide D3	Sigma-Aldrich	98.2%/99%	+	**590.2960**	20	**414.2632**	20	5.60	30	50	5	15	85±2

[1]correspond to parent compounds; [2]correspond to metabolites; Absolute Recovery[3] calulated without correction by internal standard.

II.2.2.3. Quality assurance/quality control

The linearity of the method was estimated in both solvent and matrix (using ultrapure water), with a blank test and calibration curves (6 levels) spiked with from 2 to 200 ng/L of the compounds including a fixed amount of internal standard. Absolutes recoveries, matrix effects and repeatability of the method were evaluated by spiking ultrapure water with 100 ng/L of all compounds (n=5). The LOD and LOQ of each analyte were determined as the concentration resulting in a signal to noise ratio of 3 and 10 respectively. Before each analysis and during the sequence, a standard mixture (100 ng/L including internal standards) of the molecules of interest and a blank mobile phase were analyzed to check the LC-MS/MS performance.

III. Results and discussion

III.1. Characterization of the sub-watersheds

III.1.1. Hydro geomorphological characterization

Differences in hydro geomorphology (Supplementary Material), land use (Fig. 1) and anthropic pressures were observed between peri-urban and urban sub-watersheds.

The steepest basin slopes (11-21%) and lowest flow velocity (0.1-0.4 m/s) were measured in the peri-urban sub-watersheds. PU1 and PU2 had the highest basin slopes (21% and 14% respectively) and the highest related hydrologic response times (5-10 hours). The north-western peri-urban part of the study area has steep slopes but relatively natural river banks and meandering rivers. The peri-urban sub-watersheds are mostly covered by woodland (9-72%), 21-31% croplands and 2-53% built-up area. Between 1992 and 2015, built-up areas increased by 29% at PU4 and by 10% at PU5 (ESA-CCI data). The urban area only extends to the south-east because of the natural barrier formed by the relief in the north-western part of the basin that limits urbanization (Dauvergne, 2011).

In contrast, although the basin slope of the urban sub-watersheds ranges between only 11% and 13%, these watersheds have the highest flow velocity (0.2-0.8 m/s) and relatively short hydrological response (<5-10 h). Urban sub-watersheds comprise 27-88% of built-up area and 6-24% of croplands. In particular, U1, U2 and U5 have more than 70% of impervious (built-up) area (ESA-CCI 2016) (Fig. 1). The urban area crossed by the Mfoundi River is currently channeled with artificial river banks to reduce recurrent floods in downtown Yaoundé; this increased urban river flow velocities and reduced the extent of wetlands in the south of the Méfou basin (Moffo et al., 2011). Assuming the building density in Open Street Map 2017 data reflects population density, the upper Mfoundi watershed is under the highest anthropic pressure with high building density in particular at U5 (1,551 buildings/km^2), U2 (1,087 buildings/km^2) and U1 (1,079 buildings/km^2) (Fig. 3). The city dynamics could emphasize urbanization in the study area. Indeed, according to ESA-CCI data, built up area increased from 21% to 27% while forested land decreased from 19% to 15% from 1992 to 2015.

Urban areas are subject to anthropic pressure. In particular, reports in the literature state that there are only four waste water treatment plants (WWTP) in Yaoundé for almost two millions inhabitants. The type of WWTP treatments are activated sludges, lagoon system, sand filtration or macrophyte-based waste water treatment system. According to Naah (2013), the capacity of the WWTP were comprised between 650 and 30,000 population equivalent but the truly functioning WWTP were covering around 6,300 population equivalent in total which represent 0,3% of Yaoundé population. Consequently most untreated domestic

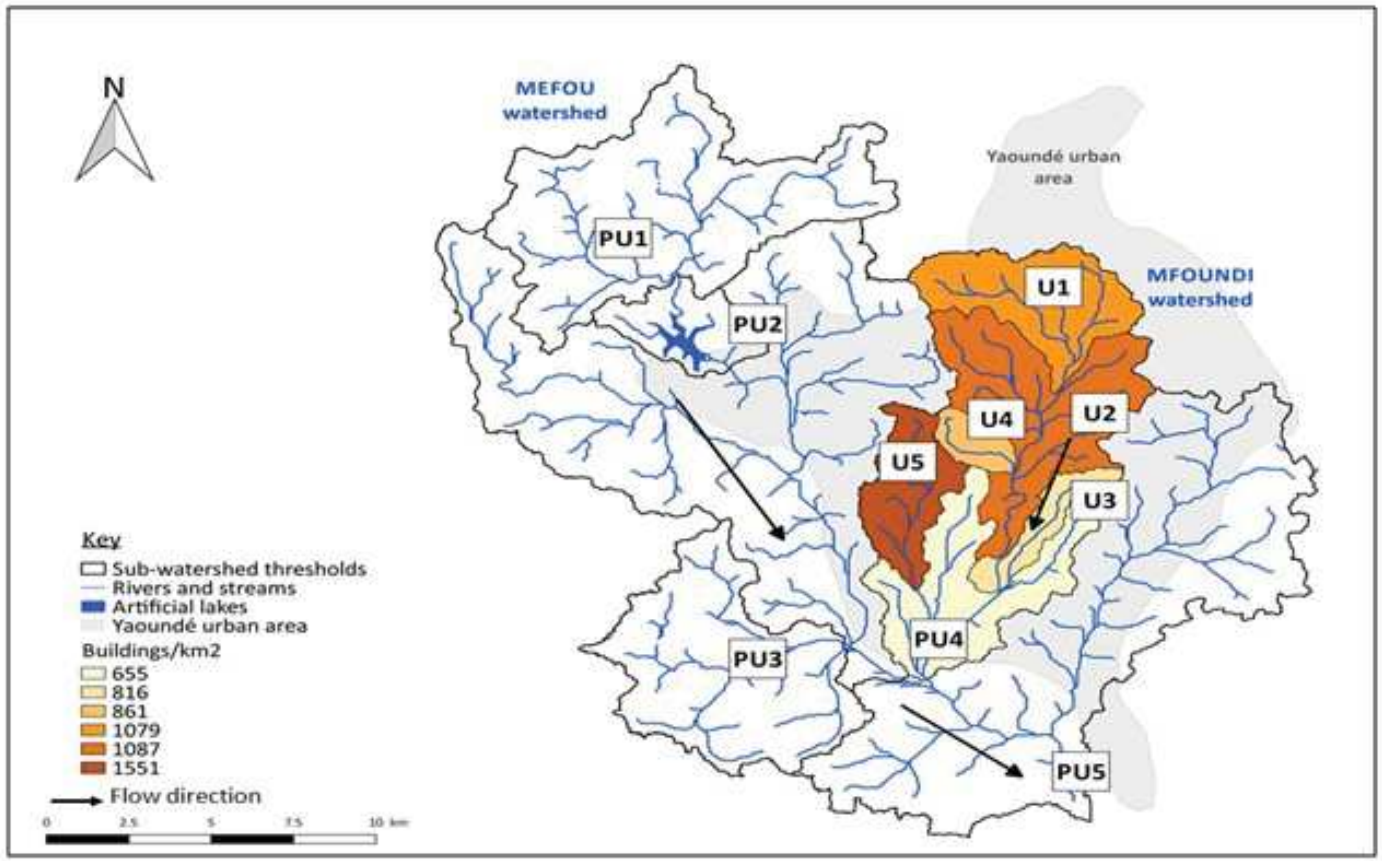


Figure3: Map showing building density in the Mfoundi sub-watersheds (Open Street Map 2017, ESA-CCI 2015)

No Open Street Map data were available for the peri-urban sub-watersheds shown in grey on the map, which consequently only provides data for the urban Mfoundi basin sub-watersheds delimited in Fig. 1.

wastewater is released into the surface waters of the upper Méfou basin (Kenmogne et al., 2010; Wethé et al., 2003). Microbiological analyses revealed fecal contamination of all urban streams (Djuikom et al., 2008, 2006). In Yaoundé, landfills are constituted by the unemerous and sometimes ephemeral waste heaps distributed in all the urban area. These waste heaps are mostly constituted by domestic solid waste that has been reported as an additional pharmaceutical contamination source adding to domestic wastewater (Bu et al., 2016; Peake et al., 2015).

The Méfou watershed is also subject to anthropic pressure due to urbanization, mostly in the Mfoundi sub-watershed (U1-U5). Urbanization accentuates the natural tendency of the relief to favor rainfall-runoff events because it increases the extent of impervious land surface (Moffo et al., 2011). It may also accelerate upstream to downstream water flow by channeling the streams in the urban area. Runoff could also be at the origin of the drainage of contaminants, i.e. pharmaceuticals, pesticides, bacteria, adsorbed on urban surfaces (Blanchoud et al., 2007; Wilkinson et al., 2017).

The natural features (elevation, slope, hydro-geomorphology) favor rainfall-runoff processes in particular in the north-western part of the peri-urban area (PU1 and PU2). The combination of these hydrological features, the lack of sanitation and the continuous increase in built up areas raises concerns about sources of contamination in particular sources of pollutants including pharmaceuticals in wastewaters and landfills that can reach surface waters.

III.1.2. Wastewater management and groundwater characterization

Disparities were observed in housing quality, water use and wastewater management around the urban water sampling sites during the interviews on water use. At U1, U2 and U5, 43-47% of the respondents lived in low quality housing; in particular at U4, where the proportion increased to 67%. On the other hand at U3, only 18% of respondents lived in low quality housing, and 36% and 27% lived in medium and high quality housing, respectively. Low quality housing implies no proper infrastructure enabling access to water and sanitation (OMS and ONU-Habitat, 2010).

Considering the water use survey as a whole, pit latrines were reported as the main type of sanitation (36-79% of households). Again U3 stood out as 55% of the respondents reported using a WC (toilets with water flush) and only 36% pit-latrines. The population survey showed that 80% of the households throw out their wastewater in their immediate surroundings (into drains, rivers and yards). A total of 71% of the respondents in the water use survey said they throw away drugs whose use-by-date has expired into landfills and 11% into pit latrines because no system for recycling of expired drugs exists in Cameroon like the Cyclamed network in France, for example.

The U4 survey site was also where drinking water shortages were the most frequent (67%) followed by U2 with 64% of households concerned. At U3, only 18% of the respondents reported drinking water shortages. The most regularly flooded homes were located in U2, with 82% of the respondents affected. Around the sampling points, 68% of the all respondents reported they used groundwater for drinking (45% boreholes, 13% wells, 10% springs); 78% that they used groundwater for domestic purposes including cooking and washing clothes (12% boreholes, 65% wells, 1% springs); and 79% for bathing, personal hygiene, etc. (14% boreholes, 62% wells, 3% springs). Differences were observed in the urban area in the sources of groundwater used for drinking water. In particular in the U4 district, 100% of the respondents reported they relied on groundwater for drinking, 43% from boreholes and 57% from wells. In the U3 district, a very high

proportion (91%) of the respondents reported they used boreholes for drinking water. Water is treated if the groundwater comes from a well in 70% of the households surveyed; whereas drinking water from boreholes and springs is less frequently treated (43% and 24%, respectively). Information concerning the type of treatment was difficult to obtain, but 14% of the respondents said they used filtration and 8% bleach to eliminate bacteria or other pollutants.

The well at U4 (U4-W1) was typical of wells in Yaoundé. In particular, this well can be qualified as “partially equipped” because the safety slab is cracked and a latrine is present at a distance of less than 5 meters from the well. In contrast, boreholes are generally “well equipped” because they are completely concreted and access is restricted. Springs that emerge from rocks are poorly equipped; only a platform is installed to allow water collection. The immediate surroundings of groundwater supply points are crucial to limit contamination from pollutants from the soil through runoff or infiltration. It is usually recommended that a protected area is established around wells (i.e. at least ten meters from a latrine and a soil thickness of at least four meters between the bottom of the latrine and the aquifer) (Tabué Youmbi et al., 2009). This is not always the case in Yaoundé in particular in unplanned districts (INS and BGR, 2013; Kringel et al., 2016; Takounjou et al., 2009; Youmbi et al., 2013).

These observations are in agreement with observations made in a previous study of the nitrogen and phosphorus mass balance in Yaoundé groundwater (Kringel et al., 2016). First, these authors also reported that waste management based on pit latrines and septic tanks increases the likelihood of groundwater contamination by wastewater. They provided evidence that the amount of wastewater could recharge the aquifer leading to an “anthropic groundwater type”. At certain locations, wastewater can infiltrate the porous ferralsol aquifer. The authors argued that wastewater can determine groundwater quality. Their study confirmed that the management of wastewater we identified around our sampling points is widespread in Yaoundé and that, in general, the aquifers of the urban sub-watersheds are likely to receive contaminants from human excreta i.e. fecal bacteria and possibly also pharmaceuticals. The widespread use of groundwater accentuates the importance of monitoring groundwater.

III.2. Pharmaceutical contamination of surface and groundwater and related issues

III.2.1. Pharmaceutical detection and quantification

Some pharmaceuticals are widely used as markers of wastewater inputs, for example carbamazepine for surface waters (Pongmala et al., 2015); sulfamethoxazole, sulfanilamide and carbamazepine for groundwater, as in the study case of Varanasi in India (Lapworth et al., 2018); atenolol, carbamazepine and diclofenac in different catchments in Switzerland (Epting et al., 2018).

In this study, among the 23 molecules of interest, eight pharmaceuticals belonging to four therapeutic classes (anti-epileptics, NSAIDs/analgesics, antibiotics/anti-infective and beta-blockers) were detected at least twice across all samples (Table 3). Pharmaceuticals belonging to benzodiazepines, antidepressants, lipid-lowering drugs and opiate substitutes were not detected either in groundwater or in samples of surface water.

The antiepileptic carbamazepine and the analgesic acetaminophen were the most frequently detected and quantified compounds in surface waters (Fig. 4). Carbamazepine was detected and quantified in up to 100% of water samples. Acetaminophen was also detected in up to 100% and was quantified in up to 85%.

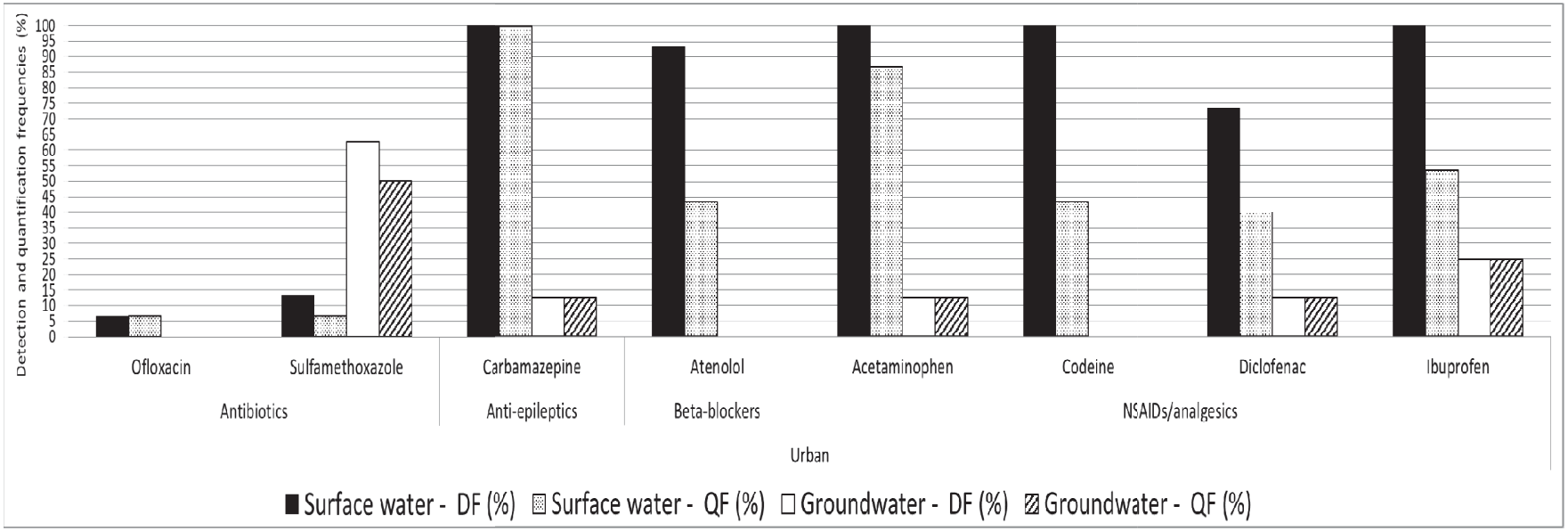


Figure 4: Detection and quantification frequencies of pharmaceutical compounds in surface water and groundwater in urban areas (U1 to U5) during the sampling campaign in March/April 2018 in the upper Méfou watershed

Carbamazepine is usually taken as a continuous treatment for epilepsy and trigeminal neuralgia. Once discharged into wastewaters and/or in effluents from WWTP from which it is poorly removed (<10%) (Hai et al., 2018) by conventional treatment it is relatively persistent and widespread in the aquatic environment (Andreozzi et al., 2002; Hai et al., 2018). In the surface waters of Yaoundé and due to the almost total absence of sanitation, carbamazepine remains a relevant anthropogenic tracer. Acetaminophen belongs to the therapeutic class of NSAIDs which is the most widely consumed class of drugs in the world. They are easy to acquire and are included in the formulation of several medical drugs combined with other active ingredients, which may partly explain their wide occurrence in water (He et al., 2017) and consequently the presence of acetaminophen in the water samples.

Differences in pharmaceutical occurrence were observed between peri-urban and urban sub-watersheds in addition to differences in the type of water (surface and groundwater) (Table 2 and Fig. 4).

Among the targeted compounds, the NSAID/analgesic codeine, the antibiotic ofloxacin and the beta-blocker atenolol were detected and quantified in surface waters in the urban area but not in the surface waters in the peri-urban area. All the compounds detected in the peri-urban surface waters were also found in the urban surface waters. The fewest molecules were detected and quantified in the subwatershed PU2 (at the Camwater treatment station).

Carbamazepine was detected and quantified in 100% of the water samples in the urban area and in 75% of the water samples in the peri-urban areas. Acetaminophen was detected in 100% of the samples in both the urban and the peri-urban areas but was more frequently quantified in the urban area (85%) than in the peri-urban area (75%). Ibuprofen and diclofenac followed the same trend with up to 95% and 75% of detection frequency in the urban area and up to 55% and 45% of quantification frequencies, respectively. In the peri-urban area, their detection frequencies were 75% but diclofenac was quantified more (75%) than ibuprofen (50%). The anti-infective sulfamethoxazole differed, it was more often quantified in the peri-urban area (50%) than in the urban area (6%).

III.2.2. Pharmaceutical concentrations

In terms of surface water contamination levels, urban sub-watersheds (U1 to U5) were more polluted with pharmaceuticals (range < 2 to 5,660 ng/L) than peri-urban sub-watersheds (PU1 to PU5) (range < 2 to 367 ng/L).

The highest concentrations of NSAIDs/analgesics acetaminophen, diclofenac, ibuprofen were measured in urban areas, with median concentrations of 24-2,994 ng/L, <10-318 ng/L and 25-259 ng/L, respectively. The highest concentrations were measured at the U1 sub-watershed, with a peak concentration of acetaminophen of 5,660 ng/L. Peak concentrations of ibuprofen were 516 ng/L at U2 and for diclofenac 419 ng/L at U1. Although it was detected in all the samples, carbamazepine was quantified between 73 ng/L and 163 ng/L (median concentrations) with the highest concentration (193 ng/L) measured at U5.

In contrast to urban sub-watersheds, lower concentrations were measured in the peri-urban sub-watersheds. Codeine and acetaminophen were the only two molecules detected at PU2 (Camwater treatment station), both in the raw and in the treated surface water resource of the Méfou River. The maximum measured concentrations in PU3 sub-watershed were 72 ng/L of ibuprofen, 30 ng/L of diclofenac, 15 ng/L of carbamazepine and 14 ng/L of acetaminophen. The highest concentrations were measured at PU4 with median concentrations of ibuprofen, diclofenac and sulfamethoxazole of 224 ng/L, 166 ng/L and 120 ng/L,

Table 3: Minimum, maximum and median concentrations (ng/L) of the pharmaceutical compounds detected in surface water and groundwater according to the area

SURFACE WATER ng/L																			
Peri-urban area																			
Pharmaceuticals	PU3-Ossongoé				PU2 – Upstream Camwater				PU2 –Downstream Camwater				PU4 – Oil palm				PU5 –Nsimalen			
	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N
Anti-epileptic																				
Carbamazepine	13	17	15	4	< 5	< 5	< 5	2	< 5	< 5	< 5	2	45	82	59	4	27	46	35	4
NSAIDs/analgesics																				
Codeine	< 2	< 10	< 2	4	< 2	< 2	< 2	2	< 2	< 2	< 2	2	< 2	< 2	< 2	4	< 2	< 10	< 2	4
Ibuprofen	71	74	72	4	< 25	<25	< 25	2	< 25	<25	< 25	2	100	367	224	4	< 25	< 25	< 25	4
Diclofenac	29	31	30	4	< 10	<10	< 10	2	< 10	<10	< 10	2	121	212	166	4	59	65	62	4
Acetaminophen	<10	23	14	4	< 5	< 5	< 5	2	< 5	< 5	< 5	2	30	62	33	4	<10	12	11	4
Antibiotics								2				2								
Sulfamethoxazole	< 2	< 2	< 2	4	< 2	< 2	< 2	2	< 2	< 2	< 2	2	115	124	120	4	35	104	58	4
Beta-blockers								2				2								
Atenolol	< 2	< 5	< 2	4	< 2	< 2	< 2	2	< 2	< 2	< 2	2	< 2	< 5	< 2	4	< 2	< 2	< 2	4

Table 3. (continued)

SURFACE WATERS																				
Urban area ng/L																				
Pharmaceuticals	U1 - Merchandise station				U2 – Sofavinc				U4 – Upstream Melen				U4 – Downstream Melen				U5 – Biyeme-Assi			
	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N
Anti-epileptic																				
Carbamazepine	91	136	109	6	42	95	73	6	63	102	74	6	62	99	91	6	39	193	163	6
NSAIDs/analgesics																				
Codeine	<10	14	12	6	< 10	17	13	6	< 10	12	< 10	6	< 10	< 10	< 10	6	< 10	14	<10	6
Ibuprofen	<50	<50	<50	6	< 50	516	<50	6	70	385	190	6	86	414	259	6	< 50	198	<50	6
Diclofenac	189	419	318	6	<15	215	156	6	<10	<10	< 10	6	<10	267	228	6	<10	76	<15	6
Acetaminophen	1728	5660	2993	6	36	1614	155	6	<10	366	24	6	<10	671	192	6	25	615	89	6
Antibiotics																				
Ofloxacin	21	29	25	6	< 5	< 5	< 5	6	< 5	< 5	< 5	6	< 5	< 5	<5	6	< 5	< 5	< 5	6
Sulfamethoxazole	< 2	< 2	< 2	6	< 2	< 2	< 2	6	< 2	< 2	< 2	6	< 2	< 2	< 2	6	80	111	96	6
Beta-blockers																				
Atenolol	< 5	7	< 5	6	< 5	9	< 5	6	< 2	16	< 5	6	< 5	< 5	< 5	6	< 5	12	7	6

Table 3. (continued)

GROUNDWATER																						
Urban area ng/L																						
Pharmaceuticals	U1-S1Merchandise station				U4-W1 Melen				U4-W2 Melen				U5-B1 Biyeme-Assi				U5-B2 Biyeme-Assi				U5-W1 Biyeme-Assi			
	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N	Min	Max	Median	N
Anti-epileptic																								
Carbamazepine	< 5	< 5	< 5	2	< 5	< 5	< 5	2	263	335	299	2	< 5	< 5	< 5	2	< 5	< 5	< 5	2	< 5	< 5	< 5	2
NSAIDs/analgesics																								
Ibuprofen	< 25	< 25	< 25	2	265	276	271	2	< 25	< 25	<25	2	141	154	147	2	< 25	< 25	<25	2	< 25	< 25	<25	2
Diclofenac	<10	<10	< 10	2	<10	<10	< 10	2	476	518	497	2	<10	<10	< 10	2	<10	<10	< 10	2	<10	<10	< 10	2
Acetaminophen	< 5	< 5	< 5	2	< 5	< 5	< 5	2	110	111	110	2	< 5	< 5	< 5	2	< 5	< 5	< 5	2	< 5	< 5	< 5	2
Antibiotics																								
Sulfamethoxazole	69	73	71	2	< 2	< 2	< 2	2	899	1285	1092	2	< 2	< 2	< 2	2	312	390	351	2	116	134	125	2

respectively. At PU5, median concentrations at Nsimalen were 11 ng/L, 35 ng/L, 58 ng/L and 62 ng/L respectively for acetaminophen, carbamazepine, sulfamethoxazole and diclofenac.

At this stage, we can confidently affirm that the surface waters of Yaoundé are contaminated by relatively higher levels of pharmaceuticals in urban wastewaters than in the peri-urban area whose surface waters may be under less anthropic pressure (Fig.1 and Fig. 3). The results of this monitoring campaign can be put in parallel with building density (Fig. 3). The highest measured concentrations and peak contaminations were evidenced in particular in U1 (highest global pharmaceutical concentrations), U2 (diclofenac peak concentration) and U5 (carbamazepine peak concentration) which are the sub-watersheds with the highest building density (861, 1087 and 1551 buildings/km2 respectively). This situation is in agreement with anthropic pressures from domestic wastewaters and adds supplementary information on these “pollution hotspots” previously identified in Yaoundé (Branchet et al., 2018).

In the PU4 sub-watershed; the environment is wetlands and oil palm plantations, however it drains the whole urban Mfoundi watershed, explaining why at this peri-urban point, measured concentrations were higher than in PU2, PU3 and PU5. The PU5 sub-watershed receives waters both from the peri-urban area and from the urban area because it is at the downstream confluence of the upper Méfou River and of the Mfoundi River. We expected pharmaceutical concentrations to be higher than in PU2 and PU3 because of the discharge of the urban contamination into the Méfou River as previously reported (Branchet et al., 2018). However concentrations were the same as in PU3 for example, which may be explained by dilution.

In contrast to the peri-urban sub-watersheds, the U1, U4 and U5 urban sub-watersheds were affected by groundwater contamination. The highest concentrations were of diclofenac and sulfamethoxazole, with concentrations ranging from 476 to 518 ng/L and 69 to 1285 ng/L, respectively. The most polluted sub-watershed was U4 due to contamination of the U4-W2 well with carbamazepine (up to 335 ng/L), the diclofenac (up to 518 ng/L) and acetaminophen (up to 111 ng/L) followed by sulfamethoxazole (up to 1,285 ng/L). Concentrations of ibuprofen of up to 154 ng/L were quantified in the U5-B1 borehole. Up to 390 ng/L of sulfamethoxazole was measured in the U5-B2 borehole and up to 134 ng/L in the U5-W1 well. A spring in U1 was contaminated by between 69 and 73 ng/L of sulfamethoxazole.

III.2.3. Questions concerning the fate of pharmaceuticals in the Méfou hydrosystem

Variations in the contamination profiles of surface and groundwater sampling sites raising questions about (i) the mobility of these compounds and (ii) interactions between surface and groundwater in the Méfou hydrosystem.

No relation were found between physico-chemical properties (log Kow and Koc) (Supplementary Material) of the quantified compounds and their occurrence and concentration trends in surface and groundwater. Then, acetaminophen and sulfamethoxazole displayed opposite behaviours. Median acetaminophen concentrations ranged 5 -5,660 ng/L in surface waters whereas the compound was quantified only once in groundwater at a concentration of 110 ng/L. Conversely, sulfamethoxazole concentrations were lower in surface waters (median concentration range < 2 to 120 ng/L) than in groundwater (median concentration range: < 2 to 1,092 ng/L). It has been shown that

sulfamethoxazole is a highly mobile compound in surface waters, soils and groundwater. Physico-chemical soil properties (pH, composition) might also affect its fate (Archundia Peralta 2016) suggesting the need for deeper studies on the local environment to understand its occurrence.

Interactions between surface and groundwater depend on local features (geology, climatic conditions, pedology, etc. and the scale of observation). At the local scale, surface water can recharge groundwater and allow the mixing of the waters at the subsurface thanks to geomorphological and hydrodynamic features. Also the variability of the hydrological conditions over time (turbulent flow, high rainfall, flood, etc.) affect the interactions and flow dynamics between surface water and groundwater. Consequently they remain highly variable and relatively complex (Epting et al., 2018; McLachlan et al., 2017; Vu et al., 2018).

The effect of human activities, in particular pumping groundwater for drinking water, can modify the flow dynamics and cause a reversal in fluxes from groundwater to surface waters or increase vertical migration of contaminants (Lapworth et al., 2018; Vu et al., 2018). Some contaminants including pharmaceuticals can be used as tracers to better define these interactions (Epting et al., 2018). For example, in a case study of the city of Varanasi in India, the concentrations of sulfamethoxazole in the groundwater mirrored those in the surface waters, but were lower and depended on the origin and depth of the groundwater (Lapworth et al., 2018). The vulnerability of the groundwater was underlined. In particular, the authors reported that long-term intensive pumping increased the hydraulic gradient thereby enabling the contaminants to reach deeper aquifers. Pumping also controls the nature of groundwater recharge.

Thus, like in Yaoundé, the increase in groundwater withdrawal through wells and boreholes and the potential for groundwater vulnerability were evidenced. Pharmaceutical concentrations measured in the present study, in particular those of acetaminophen and sulfamethoxazole, add a novel issue concerning surface and groundwater relations as a component of this vulnerability. The need for further study and, for example, the use of modeling (Takounjou et al., 2009) could help explain how the aquifers are recharged by wastewater and local issues related to groundwater contamination.

III.3. Comparison with the international context and local issues

Before the present study, sub-Saharan water bodies in nine therapeutic classes (NSAIDs/analgesics, antibiotics, beta-blockers, lipid-lowering drugs, antiretroviral drugs, antimalarial drugs, anti-epileptics, benzodiazepines and vascular dilatation drugs) were monitored in five different countries (most frequently in South-Africa followed by Ghana, Kenya, Mozambique and Nigeria) starting in 2012 (Ebele et al., 2017; Madikizela et al., 2017). The global contamination profile for the common monitored therapeutic classes is similar in previous studies and in the upper Méfou basin, with the predominance of the NSAIDs/analgesics (acetaminophen, codeine, diclofenac, ibuprofen), the anti-epileptic carbamazepine then antibiotics/ anti-infective (ofloxacin, sulfamethoxazole,). Concentration ranges in the present study were slightly lower than those measured in other African surface waters (Madikizela et al., 2017). For example, NSAIDs ranged from a few micrograms per liter to more than 100 µg/L in Kenya (K'oreje et al., 2016) whereas carbamazepine reached 500 ng/L in South Africa (Matongo et al., 2015). However concentrations varied considerably with the local context. Only two

studies in Sub-Saharan Africa provide pharmaceutical contamination of groundwater from wells. In Nigeria acetaminophen was measured in the range of 102 ng/L to 18 420 ng/L in wells and diclofenac concentrations ranged 118-13,480 ng/L (Olatunde et al., 2014). In Kenya pharmaceutical concentrations from antibiotics, antiretroviral, NSAIDs and antipsychotic were comprised between 5 ng/L and 1,600 ng/L in wells.

As sources, the local context and drug management and consumption differ among monitored areas, so it is very hard to compare the presence of pharmaceuticals in water bodies in different countries or regions (Jjemba, 2008). It is also risky to link patterns of contamination in rivers to drug consumption because of the spatial scale (local, national) and the season, and the mode of consumption of a drug (i.e. for chronic or infectious diseases) (Thiebault et al., 2017). In Cameroon, the problem is exacerbated by the existence of an informal drug sector (Angbo-Effi et al., 2011; Mendo et al., 2015): the high costs of public health institutions (hospitals, clinics) mean that the poorest population have limited access to health care (Commeyras et al., 2006; OMS and ONU-Habitat, 2010). Consequently, 71% of the population of Yaoundé resort to informal health care units (Geest, 2017) as their main solution or as a complement to the formal pharmaceutical sector and only 30% of formally prescribed drugs are actually taken by the patients (Commeyras et al., 2006). The informal drug sector provides less expensive drugs, but the drugs are of lower quality (concentrations of active substance are uncertain, the types of active substance are uncertain, false drugs, etc.) making an assessment of Cameroonian drug consumption very difficult. However the survey by Commeyras et al. (2006) listed acetaminophen as the most widely prescribed and consumed drug in Yaoundé. This survey and reports in the literature suggest that a cocktail of pharmaceutical compounds are possibly present in-stream, in line with results of monitoring of other sub-Saharan water bodies (Ebele et al., 2017; Madikizela et al., 2017).

« Down-the-drain » modeling approaches are widely used (e.g., LF2000-WQZ (Williams et al., 2009), GRETER-ER (Archundia et al., 2018), STREAM-UE (Lindim et al., 2017), etc.) to predict in stream pharmaceutical concentrations according to the hydrologics, the hydraulics, the consumption patterns and WWTP effluents. However, limited in the specific context of sub-Saharan urban centers, the use of a modeling approach would be limited because, added to the difficult assessment of pharmaceutical consumption, the absence of sanitation makes it hard to include effluents from WWTP in the model. Models would need to be adapted to predict concentrations in water, and to assess environmental risks and health impacts.

High urbanization pressures have environmental impacts (Carvalho et al., 2014; Kotyza et al., 2010), by increasing population vulnerability and related health risks (Dos Santos et al., 2017; Gracia-Lor et al., 2017; Whitehead and Dahlgren, 1991). Living conditions are considered as environmental determinants of health (Whitehead and Dahlgren, 1991). The quality of housing, access to drinkable water and sanitation along with educational level can increase health inequalities among urban populations (OMS and ONU-Habitat, 2010). Our water use survey partly emphasized these inequalities through living conditions and the links between groundwater contamination and use in the urban area raises questions about population exposure and potential health risks in Yaoundé.

Groundwater in three urban sub-watersheds (U1, U4 and U5) was found to be contaminated by pharmaceuticals belonging to the anti-epileptic, antibiotic and NSAID therapeutic classes (Table 2). Yet in these areas, the survey population reported using groundwater sources in particular for drinking water purposes. In U1, 47% of the respondents rely on springs, and the spring we sampled was found to contain sulfamethoxazole. In U4, only 8% of the households reported using wells for drinking water, but the wells were contaminated by carbamazepine, ibuprofen, diclofenac and acetaminophen. In U5, 43% of the households used boreholes for drinking water and the one we sampled was found to be contaminated by ibuprofen. Even if health risks due to the presence of pharmaceuticals in drinking water have not been not evidenced so far, these results suggest that in some areas, the population is exposed to these compounds.

IV. Conclusion

The aim of the present study was to provide baseline information and to identify patterns of pharmaceutical contamination of surface and groundwater resources in a sub-Saharan capital city according to land use, hydro-geomorphological and water use features.

The targeted compounds were suitable tracers to demonstrate that pit-latrines, landfills, the increase in built-up areas and urban planning all put heavy pressure on urban streams in Yaoundé and have an impact on water resources destined for human consumption. Both surface and groundwater were contaminated by pharmaceuticals and the levels of contamination correspond to those reported in previous studies in sub-Saharan water bodies with peak pollutions of NSAIDs and homogeneous contamination by the anti-epileptic carbamazepine. The contamination is diffuse and persistent. Groundwater is contaminated at some urban locations in particular by NSAIDs, tackling the issue of the fate of pharmaceuticals in the hydrosystem. Groundwater contamination makes populations highly vulnerable because they rely on this water supply as an alternative to a formal tap water network and to compensate for the lack of infrastructure in the capital city of Cameroon. As the city dynamics favor an increase in pressures on water resources, Yaoundé needs to adapt water uses, and public authorities need to protect water resources, the health of the inhabitants and the environment.

The following are the supplementary data related to this article.

SM1. Physicochemical properties of the compounds detected at the sampling sites.

Quantified pharmaceutical	Therapeutical class	log Kow	Koc	Solubility at 25°C (mg/L)
Ofloxacin	Antibiotics	-0.39	44	28
Sulfamethoxazole	Antibiotics	0.89	72	610
Carbamazepine	Anti-epileptics	2.45	510	35
Atenolol	Beta-blockers	0.16	67	13,300
Acetaminophen	NSAIDs/analgesics	0.46	21	14
Codeine	NSAIDs/analgesics	1.19	700	9,000
Diclofenac	NSAIDs/analgesics	4.51	245	2
Ibuprofen	NSAIDs/analgesics	3.97	3,400	21

Source: Pubchem https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

SM 2. Physicochemical properties of field samples

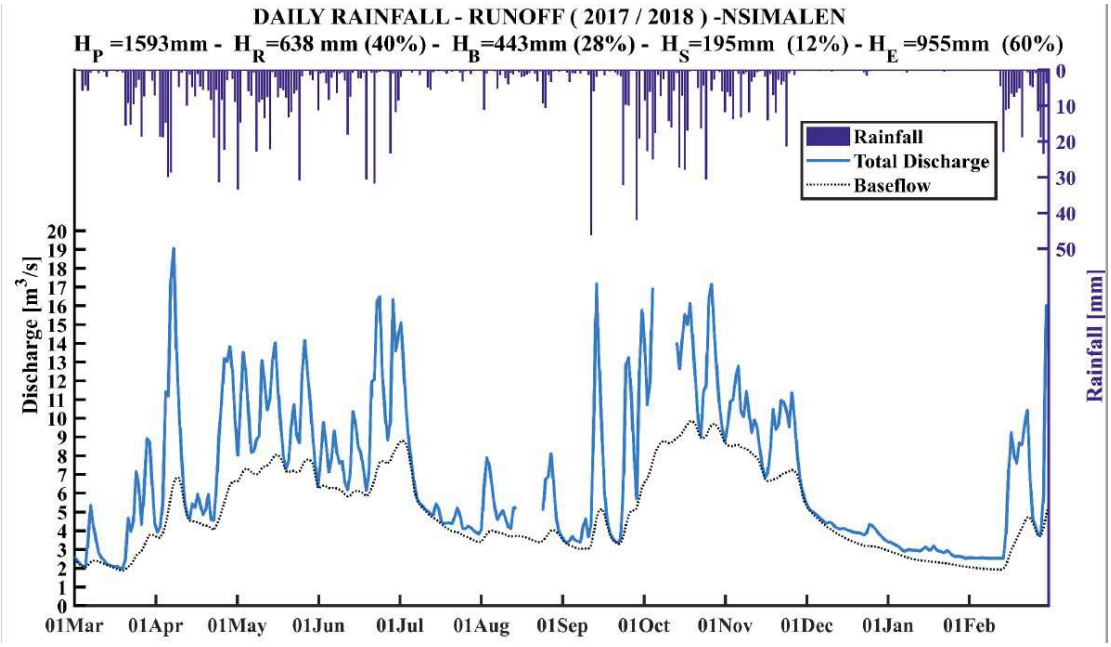
In situ measurements: YSI Professional Plus multi-parameter probe

Sampling site	Water type	Sampling date	pH	Temperature (°C)	Conductivity (µS/cm2)	Dissolved oxygen (%)
U2	Surface water	27/02/2018	7.52	25.5	346.5	NA
U4-Do	Surface water	27/02/2018	7.17	22.8	216.0	NA
U5	Surface water	27/02/2018	7.70	23.4	273.8	NA
PU3	Surface water	02/03/2018	6.90	22.2	24.3	84.1
PU4	Surface water	02/03/2018	NA	NA	NA	NA
PU5	Surface water	02/03/2018	NA	NA	NA	NA
U1	Surface water	02/03/2018	6.99	23.6	328.6	30.2
U4-Up	Surface water	02/03/2018	7.30	22.5	236.0	3.5
U4-W1	Well	07/03/2018	5.70	25.6	270.0	25.5
U4-W2	Well	07/03/2018	6.30	24.6	517.0	13.0
U2-B1	Borehole	08/03/2018	6.33	24.9	38.2	65.4
U1-S1	Source	09/03/2018	5.94	24.8	93.2	37.4
PU1-B1	Borehole	12/03/2018	5.50	24.2	36.9	54.0
U5-B1	Borehole	12/03/2018	6.63	24.3	214.1	41.7
U5-B2	Borehole	12/03/2018	6.14	26.1	105.6	39.1
U5-W1	Well	12/03/2018	6.73	28.2	56.7	74.6
U3-B1	Borehole	13/03/2018	6.42	23.9	159.8	40.0
F01-NSI	Borehole	14/03/2018	6.00	25.4	48.2	58.5
PU4-B1	Borehole	14/03/2018	6.20	25.1	65.4	55.1
PU5-B1	Borehole	14/03/2018	6.00	25.4	48.2	58.5
U1	Surface water	19/03/2018	7.49	25.8	300.0	9.3
U2	Surface water	19/03/2018	8.05	29.5	354.5	66.4
U4-Do	Surface water	19/03/2018	6.90	23.0	201.0	2.5
U4-Up	Surface water	19/03/2018	6.85	23.3	232.7	13.1
U5	Surface water	19/03/2018	7.12	24.5	297.5	7.2
PU3	Surface water	21/03/2018	6.83	23.3	40.5	12.0
PU4	Surface water	21/03/2018	7.49	24.8	267.9	21.3
PU5	Surface water	21/03/2018	7.12	24.5	175.7	28.4
U1	Surface water	26/03/2018	7.68	24.8	316.3	12.0
U2	Surface water	26/03/2018	8.03	26.6	321.5	31.5
U4-Do	Surface water	26/03/2018	7.50	22.9	251.8	6.2
U4-Up	Surface water	26/03/2018	7.16	23.2	253.5	13.0

Continuation SM2. Physicochemical properties of field samples

Sampling site	Water type	Sampling date	pH	Temperature (°C)	Conductivity (µS/cm2)	Dissolved oxygen (%)
U5	Surface water	26/03/2018	7.50	24.0	343.2	8.7
PU2-Up	Raw water	28/03/2018	7.90	25.9	34.4	24.3
PU2-Do	Treated water	28/03/2018	7.82	26.3	64.7	25.8

SM 3. Information on hydrology and hydrogeomorphology of the sites.



Sub-watershed	Basin slope (%)	Lag time (h)	Flow velocity (m/s)
PU1	21.0	05-oct	0.1-0.2
PU2	17.0	NA	NA
PU3	14.0	05-oct	0.2-0.4
PU4	11.0	20	0.1-0.2
PU5	11.0	50	0.2-0.4
U1	13.0	<5	0.2-0.8
U2	11.0	08-oct	0.2-0.8
U3	11.0	08-oct	0.5-1
U4	11.0	NA	0.3-0.5
U5	11.0	5	NA

Acknowledgments

The authors thank Valentin Mvondo (University of Nganoundéré), Christelle Fouedjio, Yvan Ngandjui and Guy Valery Djumyom (University of Yaoundé I) for participating in the water use survey in Yaoundé in March 2018; Jean-Claude Ntonga and Henriette Ateba Massussi (Cameroonian Institute of Geological and Mineral Researches) for their hospitality; Jean-Jacques Braun (French Research and Development Institute) for his support; Pierre Boutet, Murielle Avezac, Sylvie Spinelli (IMT Mines Alès), and Bénédicte, Marion and Céline Roques (University of Montpellier) for their technical assistance and help in the field. We acknowledge the IMT Mines Alès, HydroSciences Montpellier and *Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica* for funding.

References

Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G., Pollio, A., 2002. Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. Water Res. 36, 2869–2877. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00500-0

Angbo-Effi, K.O., Kouassi, D.P., Yao, G.H.A., Douba, A., Secki, R., Kadjo, A., 2011. Facteurs déterminant la consommation des médicaments de la rue en milieu urbain, Determinants of street drug use in urban areas. Santé Publique 23, 455–464. https://doi.org/10.3917/spub.116.0455

Archundia, D., Boithias, L., Duwig, C., Morel, M.-C., Flores Aviles, G., Martins, J.M.F., 2018. Environmental fate and ecotoxicological risk of the antibiotic sulfamethoxazole across the Katari catchment (Bolivian Altiplano): Application of the GREAT-ER model. Sci. Total Environ. 622–623, 1046–1055. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.026

Archundia, D., Duwig, C., Spadini, L., Uzu, G., Guédron, S., Morel, M.C., Cortez, R., Ramos Ramos, O., Chincheros, J., Martins, J.M.F., 2017. How Uncontrolled Urban Expansion Increases the Contamination of the Titicaca Lake Basin (El Alto, La Paz, Bolivia). Water. Air. Soil Pollut. 228. https://doi.org/10.1007/s11270-016-3217-0

Archundia Peralta, D., 2016. Etude du devenir et de l'impact des antibiotiques à l'échelle d'un bassin versant : application au bassin versant du Katari (Bolivie) (phdthesis). Université Grenoble Alpes.

Bachelier, G., 1959. Etude pédologique des sols de Yaoundé : contribution à l'étude de la pédologie des sols ferralitiques. ORSTOM.

Beek, T. aus der, Weber, F.-A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2016. Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. Environ. Toxicol. Chem. 35, 823–835. https://doi.org/10.1002/etc.3339

Blanchoud, H., Moreau-Guigon, E., Farrugia, F., Chevreuil, M., Mouchel, J.M., 2007. Contribution by urban and agricultural pesticide uses to water contamination at the scale of the Marne watershed. Sci. Total Environ. 375, 168–179. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.12.009

Bon, A., Ndam Ngoupayou, J., Ewodo Mboudou, G., Ekodeck, G., 2016. Caractérisation hydrogéologique des aquifères de socle altéré et fissuré du bassin versant de l'Olézoa à Yaoundé,

Cameroun. Rev. Sci. L'eau J. Water Sci. 29, 149–166. https://doi.org/10.7202/1036545ar

Branchet, P., Cadot, E., Fenet, H., Sebag, D., Ngatcha, B.N., Borrell-Estupina, V., Ngoupayou, J.R.N., Kengne, I., Braun, J.-J., Gonzalez, C., 2018. Polar pesticide contamination of an urban and peri-urban tropical watershed affected by agricultural activities (Yaoundé, Center Region, Cameroon). Environ. Sci. Pollut. Res. 1–26. https://doi.org/10.1007/s11356-018-1798-4

Bu, Q., Shi, X., Yu, G., Huang, J., Wang, B., Wang, J., 2016. Pay attention to non-wastewater emission pathways of pharmaceuticals into environments. Chemosphere 165, 515–518. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.078

BUCREP, 2010. La population du Cameroun en 2010 (3ème RGPH) (Technical Report). BUCREP, Yaoundé.

Carvalho, I.T., Santos, L., 2016. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. Environ. Int. 94, 736–757. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025

Carvalho, P.N., Basto, M.C.P., Almeida, C.M.R., Brix, H., 2014. A review of plant–pharmaceutical interactions: from uptake and effects in crop plants to phytoremediation in constructed wetlands. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 11729–11763. https://doi.org/10.1007/s11356-014-2550-3

Castiglioni, S., Davoli, E., Riva, F., Palmiotto, M., Camporini, P., Manenti, A., Zuccato, E., 2018. Mass balance of emerging contaminants in the water cycle of a highly urbanized and industrialized area of Italy. Water Res. 131, 287–298. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.047

Commeyras, C., Ndo, J.R., Merabet, O., Kone, H., Rakotondrabe, F.P., 2006. Caractéristiques de la consommation de soins et de médicaments au Cameroun. Cah. Détudes Rech. Francoph. Santé 16, 13–19. https://doi.org/10.1684/san.2006.0002

Dauvergne, S., 2011. Les espaces urbains et péri-urbains à usage agricole dans les villes d'Afrique sub-saharienne (Yaoundé et Accra) : une approche de l'intermédiarité en géographie. Ecole Nationale Supérieure de Lyon, Lyon.

Djuikom, E., Jugnia, L.B., Nola, M., Foto, S., Sikati, V., 2009. Physicochemical water quality of the Mfoundi River watershed at Yaoundé, Cameroon, and its relevance to the distribution of bacterial indicators of faecal contamination. Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 60, 2841–2849. https://doi.org/10.2166/wst.2009.702

Djuikom, E., Njiné, T., Nola, M., Kemka, N., Togouet, S.H.Z., Jugnia, L.-B., 2008. Significance and suitability of Aeromonas hydrophila vs. fecal coliforms in assessing microbiological water quality. World J. Microbiol. Biotechnol. 24, 2665–2670. https://doi.org/10.1007/s11274-008-9793-4

Djuikom, E., Njine, T., Nola, M., Sikati, V., Jugnia, L.-B., 2006. Microbiological water quality of the Mfoundi River watershed at Yaoundé, Cameroon, as inferred from indicator bacteria of fecal contamination. Environ. Monit. Assess. 122, 171–183. https://doi.org/10.1007/s10661-005-9172-7

Dos Santos, S., Adams, E.A., Neville, G., Wada, Y., de Sherbinin, A., Mullin Bernhardt, E., Adamo, S.B., 2017. Urban growth and water access in sub-Saharan Africa: Progress, challenges, and emerging research directions. Sci. Total Environ. 607–608, 497–508.

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.157

Ebele, A.J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harrad, S., 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. Emerg. Contam. 3, 1–16. https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004

Echart, J., Ghebremichael, K., Khatri, K., Mutikanga, H., Sempewo, J., Tsegaye, S., Vairavamoorthy, K., 2012. The Future of Water in African Cities : Why Waste Water? Integrated Urban Water Management, Background Report (Integrated Urban Water Management, Background Report). World Bank, Washington, DC.

Epting, J., Huggenberger, P., Radny, D., Hammes, F., Hollender, J., Page, R.M., Weber, S., Bänninger, D., Auckenthaler, A., 2018. Spatiotemporal scales of river-groundwater interaction – The role of local interaction processes and regional groundwater regimes. Sci. Total Environ. 618, 1224–1243. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.219

ESA, 2016. ESA CCI LAND COVER – S2 prototype Land Cover 20m map of Africa 2016 [WWW Document]. Eur. Spat. Agency. URL http://2016africalandcover20m.esrin.esa.int/ (accessed 11.10.18).

Farr, T.G., Rosen, P.A., Caro, E., Crippen, R., Duren, R., Hensley, S., Kobrick, M., Paller, M., Rodriguez, E., Roth, L., Seal, D., Shaffer, S., Shimada, J., Umland, J., Werner, M., Oskin, M., Burbank, D., Alsdorf, D., 2007. The Shuttle Radar Topography Mission. Rev. Geophys. 45. https://doi.org/10.1029/2005RG000183

Franqueville, A., 1984. Yaoundé: construire une capitale. IRD Editions.

Geest, S.V. der, 2017. Les médicaments sur un marché camerounais. Reconsidération de la commodification et de la pharmaceuticalisation de la santé. Anthropol. Santé Rev. Int. Francoph. Anthropol. Santé. https://doi.org/10.4000/anthropologiesante.2450

Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V.K., Tushara Chaminda, G.G., An, A.K., Kumar, M., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. Groundw. Sustain. Dev. 6, 169–180. https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009

Gracia-Lor, E., Castiglioni, S., Bade, R., Been, F., Castrignanò, E., Covaci, A., González-Mariño, I., Hapeshi, E., Kasprzyk-Hordern, B., Kinyua, J., Lai, F.Y., Letzel, T., Lopardo, L., Meyer, M.R., O'Brien, J., Ramin, P., Rousis, N.I., Rydevik, A., Ryu, Y., Santos, M.M., Senta, I., Thomaidis, N.S., Veloutsou, S., Yang, Z., Zuccato, E., Bijlsma, L., 2017. Measuring biomarkers in wastewater as a new source of epidemiological information: Current state and future perspectives. Environ. Int. 99, 131–150. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.016

Guetté, A., Godet, L., Robin, M., 2018. Historical anthropization of a wetland: steady encroachment by buildings and roads versus back and forth trends in demography. Appl. Geogr. 92, 41–49. https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2018.01.012

Gwenzi, W., Chaukura, N., 2018. Organic contaminants in African aquatic systems: Current knowledge, health risks, and future research directions. Sci. Total Environ. 619–620, 1493–1514. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.121

Hai, F.I., Yang, S., Asif, M.B., Sencadas, V., Shawkat, S., Sanderson-Smith, M., Gorman, J., Xu, Z.-Q., Yamamoto, K., 2018. Carbamazepine as a Possible Anthropogenic Marker in Water: Occurrences, Toxicological Effects, Regulations and Removal by Wastewater Treatment Technologies. Water 10, 107. https://doi.org/10.3390/w10020107

Hayzoun, H., Garnier, C., Durrieu, G., Lenoble, V., Le Poupon, C., Angeletti, B., Ouammou, A., Mounier, S., 2015. Organic carbon, and major and trace element dynamic and fate in a large river subjected to poorly-regulated urban and industrial pressures (Sebou River, Morocco). Sci. Total Environ. 502, 296–308. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.014

He, B., Wang, J., Liu, J., Hu, X., 2017. Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities. Chemosphere 181, 178–189. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.084

INS, BGR, 2013. Etude Pilote sur la Pollution des Eaux de Surface et Souterraines à Yaoundé et son Impact sur la Santé des Populations Riveraines (EPESS) (Rapport technique). Institut National de la Statistique du Cameroun, Yaoundé (Cameroun).

Jjemba, P.K., 2008. Pharma-Ecology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. https://doi.org/10.1002/9780470369340

Kenmogne, G.R.K., Rosillon, F., Mpakam, H.G., Nono, A., 2010. Enjeux sanitaires, socio-économiques et environnementaux liés à la réutilisation des eaux usées dans le maraîchage urbain : cas du bassin versant de l'Abiergué (Yaoundé-Cameroun). VertigO - Rev. Électronique En Sci. Environ. https://doi.org/10.4000/vertigo.10323

K'oreje, K.O., Vergeynst, L., Ombaka, D., De Wispelaere, P., Okoth, M., Van Langenhove, H., Demeestere, K., 2016. Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya. Chemosphere 149, 238–244. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.095

Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., Vaněk, T., 2010. Phytoremediation of pharmaceuticals--preliminary study. Int. J. Phytoremediation 12, 306–316. https://doi.org/10.1080/15226510903563900

Kringel, R., Rechenburg, A., Kuitcha, D., Fouépé, A., Bellenberg, S., Kengne, I.M., Fomo, M.A., 2016. Mass balance of nitrogen and potassium in urban groundwater in Central Africa, Yaounde/Cameroon. Sci. Total Environ. 547, 382–395. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.090

Lapworth, D.J., Das, P., Shaw, A., Mukherjee, A., Civil, W., Petersen, J.O., Gooddy, D.C., Wakefield, O., Finlayson, A., Krishan, G., Sengupta, P., MacDonald, A.M., 2018. Deep urban groundwater vulnerability in India revealed through the use of emerging organic contaminants and residence time tracers. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 240, 938–949. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.053

Leduc, C., Pulido-Bosch, A., Remini, B., 2017. Anthropization of groundwater resources in the Mediterranean region: processes and challenges. Hydrogeol. J. 25, 1529–1547. https://doi.org/10.1007/s10040-017-1572-6

Lieunang Letche, A.R., Fonteh, M.F., Ndam Ngoupayou, J.R., 2009. La Gestion Intégrée des Ressources en Eau (GIRE) au Cameroun. Préoccupations environnementales affectant la gestion des ressources en eau dans le bassin versant de la Méfou., Editions universitaires européennes. ed.

Lindim, C., van Gils, J., Cousins, I.T., Kühne, R., Georgieva, D., Kutsarova, S., Mekenyan, O., 2017. Model-predicted occurrence of multiple pharmaceuticals in Swedish surface waters and their flushing to the Baltic Sea. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 223, 595–604. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.062

Madikizela, L.M., Tavengwa, N.T., Chimuka, L., 2017. Status of pharmaceuticals in African water bodies: Occurrence, removal and analytical methods. J. Environ. Manage. 193, 211–220. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.022

Matongo, S., Birungi, G., Moodley, B., Ndungu, P., 2015. Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi River, KwaZulu-Natal, South Africa. Chemosphere 134, 133–140. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.093

McLachlan, P.J., Chambers, J.E., Uhlemann, S.S., Binley, A., 2017. Geophysical characterisation of the groundwater–surface water interface. Adv. Water Resour. 109, 302–319. https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2017.09.016

Mendo, E., Boidin, B., Donfouet, H.P.P., 2015. Le recours aux micro-unités de soins informelles à Yaoundé (Cameroun) : déterminants et perspectives, Access to informal micro-care units in Yaounde (Cameroon) : determinants and prospects. J. Gest. Déconomie Médicales 33, 73–90. https://doi.org/10.3917/jgem.151.0073

Menye, D.É., Zébazé Togouet, S.H., Menbohan, S.F., Kemka, N., Nola, M., Boutin, C., Nguetsop, V.F., Djaouda, M., Njiné, T., 2012. Bio-écologie des diatomées épilithiques de la rivière Mfoundi (Yaoundé, Cameroun) : diversité, distribution spatiale et influence des pollutions organiques. Rev. Sci. Eau 25, 203. https://doi.org/10.7202/1013103ar

Misson, B., Garnier, C., Lauga, B., Dang, D.H., Ghiglione, J.-F., Mullot, J.-U., Duran, R., Pringault, O., 2016. Chemical multi-contamination drives benthic prokaryotic diversity in the anthropized Toulon Bay. Sci. Total Environ. 556, 319–329. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.038

Moffo, M.O.Z., Tsalefac, M., Iaţu, C., 2011. Floods risks in the Mfoundi upstream drainage basin in Yaoundé: a response to climatic modifications or to human impacts? Present Environ. Sustain. Dev. 5.

Moffo, M.O.Z., Tsalefac, M., Ursu, A., Iatu, C., 2016. Contribution of Geographic Information Systems for the Mapping of Flooding Factors in Yaoundé: The Case Study of Mfoundi Upstream Watershed. Present Environ. Sustain. Dev. 10, 217–234. https://doi.org/10.1515/pesd-2016-0019

Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. Environ. Int., Pharmaceutical products in the environment: trends toward lowering presence and impact 35, 803–814. https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.10.008

Mottes, C., Lesueur-Jannoyer, M., Charlier, J.-B., Carles, C., Guéné, M., Le Bail, M., Malézieux, E., 2015. Hydrological and pesticide transfer modeling in a tropical volcanic watershed with the

WATPPASS model. J. Hydrol. 529, Part 3, 909–927. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.09.007

Naah, M., 2013. Impact temporel du développement urbain du bassin versant de la Mingoa sur la qualité du lac municipal de Yaoundé (Cameroun). Université Paris-Est, Ecole des Ponts Paris Tech.

Ntep, F., Kengne, I.M., Mboudou, G.E., Nyochembeng, N., Ekodeck, E., 2014. Influence of seasonal dynamics on groundwater resources quality in semitropical urban zone: case of the Biyémé upper stream catchment (Yaounde, Cameroon). Int. J. Biol. Chem. Sci. 8, 1319–1335. https://doi.org/10.4314/ijbcs.v8i3.44

Olatunde, J.O., Chimezie, A., Tolulope, B., Aminat, T.T., 2014. Determination of pharmaceutical compounds in surface and underground water by solid phase extraction-liquid chromatography. J. Environ. Chem. Ecotoxicol. 6, 20–26. https://doi.org/10.5897/JECE2013.0312

Olivry, J.-C., 1986. Fleuves et rivières du Cameroun, Monographies hydrologiques. MESRES-ORSTOM, Bondy.

OMS, ONU-Habitat, 2010. La Face cachée des villes : Mettre au jour et vaincre les inégaliés en santé en milieu urbain. OMS.

OpenStreetMap Contributors, 2018. OpenStreetMap [WWW Document]. OpenStreetMap. URL https://www.openstreetmap.org/ (accessed 11.10.18).

Peake, B.M., Braund, R., Tong, A., Tremblay, L.A., 2015. The Life-Cycle of Pharmaceuticals in the Environment. Elsevier.

Pongmala, K., Autixier, L., Madoux-Humery, A.-S., Fuamba, M., Galarneau, M., Sauvé, S., Prévost, M., Dorner, S., 2015. Modelling total suspended solids, E. coli and carbamazepine, a tracer of wastewater contamination from combined sewer overflows. J. Hydrol. 531, 830–839. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.10.042

Schaider, L.A., Ackerman, J.M., Rudel, R.A., 2016. Septic systems as sources of organic wastewater compounds in domestic drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. Sci. Total Environ. 547, 470–481. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.081

Srang, K., 1972. Hydrologie d'un bassin de zone urbaine. Le bassin versant de Yaoundé. (Mémoire de stage). Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer.

Tabué Youmbi, J.G., Ntamack, D., Feumba, R., Ngnikam, E., Wéthé, J., Tanawa, É., 2009. Vulnérabilité des eaux souterraines et périmètres de protection dans le bassin versant de la Mingoa (Yaoundé, Cameroun). Rev. L'Université Monct. 40, 71. https://doi.org/10.7202/1001389ar

Takounjou, A.F., Rao, V., Ngoupayou, J.N., Nkamdjou, L.S., Ekodeck, G.E., 2009. Groundwater flow modelling in the upper Anga'a river watershed, Yaounde, Cameroon. Afr. J. Environ. Sci. Technol. 3.

Tanawa, E., Tchapnga, H.B.D., Ngnikam, E., Temgoua, E., Siakeu, J., 2002. Habitat and protection of water resources in suburban areas in African cities. Build. Environ. 37, 269–275. https://doi.org/10.1016/S0360-1323(01)00024-5

Tchotsoua, M., 1994. Dynamique informelle de l'espace urbain et érosion accélérée en milieu tropical

humide : le cas de la ville de Yaoundé. Cah. O.-m. 47, 123–136. https://doi.org/10.3406/caoum.1994.3508

Thiebault, T., Boussafir, M., Le Milbeau, C., 2017. Occurrence and removal efficiency of pharmaceuticals in an urban wastewater treatment plant: Mass balance, fate and consumption assessment. J. Environ. Chem. Eng. 5, 2894–2902. https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.05.039

Vu, H.M., Shanafield, M., Batelaan, O., 2018. Flux dynamics at the groundwater-surface water interface in a tropical catchment. Limnologica, Special Issue on Aquatic interfaces and linkages: An emerging topic of interdisciplinary research 68, 36–45. https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.06.003

Wethé, J., Radoux, M., Tanawa, E., 2003. Assainissement des eaux usées et risques socio – sanitaires et environnementaux en zones d'habitat planifié de Yaoundé (Cameroun). VertigO - Rev. Électronique En Sci. Environ. https://doi.org/10.4000/vertigo.4741

Whitehead, M., Dahlgren, G., 1991. What can be done about inequalities in health? The Lancet 338, 1059–1063. https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91911-D

WHO, 2008. Advocacy, communication and social mobilization for TB control: a guide to developing knowledge, attitude and practice surveys. World Health Organization : Stop TB Partnership, Geneva.

Wilkinson, J., Hooda, P.S., Barker, J., Barton, S., Swinden, J., 2017. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. Environ. Pollut. 231, 954–970. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.032

Williams, R.J., Keller, V.D.J., Johnson, A.C., Young, A.R., Holmes, M.G.R., Wells, C., Gross-Sorokin, M., Benstead, R., 2009. A national risk assessment for intersex in fish arising from steroid estrogens. Environ. Toxicol. Chem. 28, 220–230. https://doi.org/10.1897/08-047.1

Youmbi, J.G.T., Feumba, R., Njitat, V.T., Marsily, G. de, Ekodeck, G.E., 2013. Pollution de l'eau souterraine et risques sanitaires à Yaoundé au Cameroun. C. R. Biol. 336, 310–316. http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2013.04.013

Chapitre 4: Caractérisation du métabolisme de la venlafaxine chez la moule (Mytilus Galloprovincialis)

Ce chapitre a été rédige sous la forme d'un article scientifique.

*1. Metabolism of Venlafaxine in the Mediterranean Mussel (*Mytilus Galloprovincialis*): Combinations of Targeted and Non-Targeted Approaches*

1.1 Contexte

Les résidus de médicaments constamment déversés dans les milieux aquatiques génèrent une exposition chronique dans les écosystèmes récepteurs. Ces composés biologiquement actifs sont susceptibles de se bioaccumuler et de se métaboliser dans les organismes aquatiques. Cela pose la question de leurs effets sur ces organismes non cibles. La plupart des travaux scientifiques disponibles ont identifié et quantifié l'accumulation de ces composés dans les organismes d'eau douce. Quelques travaux ont mis en évidence l'accumulation de molécules mères et de leurs métabolites dans les tissus des organismes marins, notamment les moules. Cependant, peu d'études permettent de déterminer si l'origine de ces composés est le résultat d'une absorption directe ou du métabolisme de la moule. Dans ce contexte, la caractérisation du métabolisme des résidus pharmaceutiques tels que la venlafaxine, un antidépresseur largement détecté en milieu aquatique, chez la moule méditerranéenne prend tout son sens.

1.2 Objectif et principaux résultats

L'objectif principal du travail de cet article a été de caractériser les métabolites de l'antidépresseur venlafaxine chez la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* à l'aide d'une approche non ciblée. Cette étude a identifié 4 métabolites de phase I. Deux métabolites ont résulté de la déméthylation de la VEN, notamment la NDV et l'ODV (métabolites déjà connu pour cet organisme). Les deux autres métabolites correspondent à des composés hydroxylés situées à différentes positions au niveau de la structure de la VEN. Le métabolite hydroxylé avec le groupe fonctionnel OH situé sur le carbone adjacent à l'hétéroatome de la structure de la venlafaxine, est le principal métabolite. À notre connaissance, ce métabolite n'a pas préalablement été rapporté. Les métabolites désalkylés sont formés au début du processus de détoxification des moules (majoritaires à J3), tandis que les métabolites hydroxylés sont formés plus tardivement (majoritaire à J7).

Cette étude nous a permis d'avancer dans la caractérisation du métabolisme de cet antidépresseur chez la moule et, en même temps, il a mis en évidence les différences dans le processus de biotransformation entre les humains (métabolite principal:ODV) et les moules (métabolite principal:OH-VEN).

Title

Elucidating the metabolism of Venlafaxine Metabolism in the Mediterranean Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by combining of Targeted and Non-Targeted Approaches

N. Ariza-Castro [1,3]*, F. Courant[1], T. Dumas[1], B. Marion[2], H. Fenet[1] and E. Gomez[1]

[1]HydroSciences, IRD, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier - *nariza@itcr.ac.cr
[2]Institut des biomolecules Max Mousseron, ENSCM, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier
[3]Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago 159-7050, Costa Rica

Abstract

Exposure of aquatic organisms to antidepressants is well documented today while little information is available on how wild organisms manage exposure to these pharmaceutical products. Studies on the biotransformation products can generate information on the detoxification pathways of exposed organisms and its pharmacokinetics. The goal of this work was to improve our knowledge on the metabolism of an antidepressant frequently found in aquatic ecosystems, venlafaxine (VEN) in *M. galloprovincialis,* a bivalve with a worldwide distribution. An original tissue extraction based on the cationic properties of VEN was developed for further analysis of VEN and its metabolites by targeted and non-targeted approaches. The extraction method was assessed in terms of recovery and matrix effect for the VEN metabolites with an analytical standard available and applied to caracterise metabolies found in mussel exposed to 10 µg/L VEN for 3 and 7 days. Targeted and non-targeted approaches using liquid chromatography (LC) combined with high-resolution mass spectrometry (HRMS) were used to respectively search for expected metabolites considering the literature on aquatique species and for metabolites not previously described in the literature.

Keywords

Bioaccumulation, pharmaceuticals, metabolites, mass spectrometry, bivalves

Highlights

- An extraction method based on the cationic properties of VEN was successfully developed.
- The approach combining target and non-target analysis was powerfull for discriminate expected metabolites and propose structure for supplementary metabolites.
- OH-VEN was the metabolite predominant in mussel exposed for 3 and 7 days

1 Introduction

Venlafaxine (VEN), an antidepressant prescribed for the treatment of clinical and anxiety disorders in humans, is one of the most commonly detected pharmaceutically active compounds (PhACs) in the aquatic environment (Brieudes et al., 2017; Moreno-González et al., 2016; Paíga et al., 2019). This contamination affects the coastal marine environment, where recent studies have shown the bioaccumulation of VEN, among other PhACs, in different species (Alvarez-Muñoz et al., 2015a,b; McEneff et al., 2013). Particularly, bivalves have shown the highest accumulation of VEN (up to 36.0 ng/g dw) in relation to other aquatic organisms such as microalgae and fish (Alvarez-Muñoz et al., 2015b). The Mediterranean mussel (Mytilus galloprovincialis) is a species commonly used in monitoring environmental contaminants in the marine environment, thaks to its wide geographical distribution, to its filter-feeding behavior, to its ability to bioaccumulate these contaminants (Gomez et al., 2012; Silva et al., 2016) and recently has been choosen for exploring VEN metabolism. Serra-Compte et al. (2018) and Gomez et al. (submitted) detected three (ODV: O-desmethyl venlafaxine, NDV: N-desmethyl venlafaxine and NODDV: N,O-didesmethyl venlafaxine) and four (ODV, NDV, NODDV and NNDDV: N,N-didesmethyl venlafaxine) phase I metabolites, respectively, in laboratory exposed Mediterranean mussels to VEN. The two previous studies were conducted on the basis of a targeted analysis allowing the monitoring of known phase I metabolites, already reported in the literature, particularly in humans. However, for a complete characterization of metabolism of VEN in the Mediterranean mussel, a non-targeted approach is promising. This approach is based on the generation of profiles of chemicals detected in exposed and nont exposed organisms to a xeniobitic, which allow to determine metabolites that are not yet described and to elucidate biotransformation pathways in mussels (Bonnefille et al., 2017). Jeon et al. (2013) made the first experiment to elucidate VEN metabolites in freshwater crustaceans with the non-targeted approach using LC-HMRS and suggesting biotransformation pathways (Jeon et al., 2013). They documented the structures of five VEN metabolites: three dealkylation products (ODV, NDV and NODDV, confirmed with reference standards) and two hydroxylation products (m/z 280 and m/z 294, both with tentatively identified structures). In this context, to our knowledge, there is no study of the metabolism of VEN on mussels, highlighting the question about whether the biotransformation processes known in humans are maintained in this type of invertebrates. Therefore, the goal of the present study was to investigate the potential of such a non-targeted approach for identifying VEN metabolites produced in mussels after exposure. To increase the probability of metabolite detection, a tissue treatment method based on the cationic properties of VEN and its metabolites (known in humans) was developed and assessed in terms of recovery and matrix effect.

2 Material and Methods

2.1 Chemicals and materials

VEN (≥ 98,5%), venlafaxine-d6 (VEN-d6, > 98%) and O-demethylvenlafaxine-d6 (ODV-d6, > 99,9%) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). NNDDODV (≥98%), ODV-glucu (> 98%) and NODDV-glucu (≥ 95%) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

while ODV, NDV, NNDDV and NODDV were obtained at analytical grade (purity ≥ 98%) from Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, ON, Canada). Stock standard solutions of individual compounds were prepared at a concentration of 100 mg/L in methanol. Subsequent stock standard dilutions were prepared with methanol. All the standard solutions were stored at -20°C.

Ultrapure water was generated by a Simplicity UV system from Millipore (Bedford, MA, USA) with a specific resistance of 18.2 MΩ.cm at 25°C. Dichloromethane (DCM) as pesticide analytical grade solvent, ammonia (NH_3, 28%) as ACS reagent grade solution and HPLC/MS-grade solvents (methanol-MeOH and acetonitrile - ACN) were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Formic acid (purity, 98%) was obtained from Fisher Labosi (Elancourt, France) and ammonium acetate (≥ 98%) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Dispersive SPE tubes containing Z-Sep-Plus (500 mg/12 mL) was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Oasis® MCX 6cc (150 mg, 30 µm, 6cc) cartridges, obtained from Waters Corporation (Mildford, USA), and a Visiprep™ DL Solid Phase Extraction (SPE) vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, USA) were used for solid phase extraction. All chromatographic solvents were filtered through a 0.22 µm nylon membrane filter (Nylaflo™, Michigan, USA). Glass-fiber filters (with 0.7 µm pore size) purchased from Whatman (Maidstone, UK) were used to filter the seawater.

2.2 Experimental design and sample preparation

Mytilus galloprovincialis mussels were purchased in February 2017 from Mediterranean mussel suppliers (Bouzigues, France) and immediately transported to the laboratory. After they were cleaned, the mussels were acclimatized in aerated (9.9 ± 0.4 mg/L) filtered natural seawater (salinity = 35 ± 3 g/L, pH = 8.2 ± 0.1 units) for 7 days before the experiment. During the acclimation and exposure periods, the seawater was renewed every day (static renewal), the room temperature was regulated at 15 ± 2 °C, and the mussels were fed *Tetraselmis suecica* (Greensea, Mèze, France) at constant density (10,000 cells/mL). 100 mussels (shell length 6.0 –7.2 cm) were randomly distributed in 20 glass aquaria at a density of 5 mussels per 2 liter. Two groups were constituted: solvent control (with the vehicle for VEN: MeOH) and exposed at nominal concentration of 10 µg/L of VEN. Each group consisted of 10 aquaria of 5 mussels each. During the exposure period, the VEN concentration was reestablished after daily water renewal. Seawater samples were taken daily to quantify VEN and its known metabolites. Mussels were sampled at days 3 and 7 of exposure (5 aquaria per condition). All mussels were dissected: digestive gland was frozen at −80 °C for further metabolics analysis (not within the scope of the present study), and the remaining soft tissues (the tissue of interest in our study) were frozen at −80 °C before freeze-drying (Heto Power dry LL 3000, Thermo). After lyophilisation, these tissues were homogenized and grounded into power using MM-2 vibrational mill (Retsch, Haan, Germany). Each sample was then placed inside a clean glass bottle and stored at room temperature in dark until extraction and analysis. The analysis of mussel soft tissues consisted of 5 replicates per group (solvent control and exposed) for each day of exposure (3 and 7 days).

2.3 Samples extraction and LC-MS analysis

2.3.1 Tissue extraction method

In order to increase the probability of detection of phase I and phase II (known and unknown) metabolites of VEN in the mussel, a tissue treatment method was developed using the

physicochemical properties of these compounds, especially the positive charge on the amine functional group. 500 mg (± 1 mg) dry weight (dw) of tissue samples obtained by pooling 2 individuals was weighed in a 50 mL polypropylene centrifuge tube and spiked with VEN-d6 (500 µg/kg) and ODV-d6 (20 µg/kg). Next, the tissue was extracted by sonication in 5 mL of the extraction solvent (5% formic acid in MeOH) for 5 min. Sample was centrifuged at 23 °C (3400 x g, 5 min) and the supernatant was decanted in another 50 mL polypropylene centrifuge tube. A re-extraction was applied to each sample and the supernatants obtained were combined. To the combined supernatant was added 0.5 g of lipid removal sorbent Z-Sep-plus and 5 mL of 5 mM ammonium acetate. Next, the sample was vortexed for 5 min and then centrifuged at 23 °C (3400 x g, 5 min). The extract obtained was transferred to a glass bottle (capacity 250 mL) and diluted with milliQ water to a final volume of 150 mL. After dilution, the pH value of the samples was adjusted to 1.4 ± 0.1. Next, water-diluted samples were loaded onto the SPE Oasis MCX cartridges that were pre-conditioned with MeOH (6 mL), milliQ water (6 mL) and 2% formic acid in water (6 mL, pH: 1.40) respectively. After all samples were loaded at a flow rate of 1 mL/min, the cartridges were dried (until the elimination of drops that come out of them) and then washed with 2% formic acid in water (6 mL, pH: 1.40), MeOH (2 mL), DCM (6 mL), MeOH (3 mL). The analytes were eluated with 6 mL of 5% ammonium hydroxide in MeOH (5:95, v/v), which was prepared extemporaneously, and then evaporated down to dryness under a gentle N_2 stream at 35 °C. The residues were diluted with 200 µL of ACN:water (10:90, v/v). Finally, the sample was centrifuged at 13.4 x 10^3 rpm for 10 min to separate the residual lipids. The clear solution was transferred to a vial for LC-MS analysis.

2.3.2 Seawater extraction method

To determine the real concentration of VEN in the seawater sampled during the mussel exposure period, an adaptation of the tissue extraction and cleaning method was applied. 18 mL of seawater was spiked with surrogate standard (VEN-d6 at 1 µg/L) and ajusted to pH 1.4 ± 0.1. Solid phase extraction was conducted with the same method used for the tissues, except for the washing step which was performed without the DCM (6 mL). The analyte was eluted with fresh prepared ammonium hydroxide in MeOH and then evaporated to dryness using N_2 stream. The residue was diluted with 200 µL of ACN: water (10:90, v/v) and transferred to a vial for LC-MS analysis.

2.3.3 Liquid chromatograpy and mass spectrometry conditions

Extracts were analyzed on an Agilent 1290 Infinity LC system (Thermo Fischer Scientific) for chromatographic separation and a Q-Orbitrap HRMS mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific) equipped with a heated electrospray ionization probe (HESI) source for detection. Chromatographic separation utilized a reverse phase PFPP analytical column (Discovery HS F5 100 mm x 2.1 mm; 3 µm particle size). Chromatography employed an injection volume of 10 µL, a flow rate of 0.35 mL/min and a binary gradient of ACN (A) and water (B), both containing 0.1% formic acid, as follows: 10% A at 0 min, 50% A at 4-6 min, 60% A at 8-10 min, 70% A at 14-16 min, 80% A at 17-19 min, 10% A at 21 min and stop time at 27 min. Over a 27 minute run, data acquisition was performed simultaneously in positive and negative ionisation mode and the HESI parameters were as follows: sheath gas, 55 arbitrary units (AU); auxiliary gas, 10 AU; capillary temperature, 275 °C; heater temperature 200 °C and electrospray voltage was set at 4.0/−4 kV. The S-lens radio frequency (RF) level was set at 100

AU. Full scan data using polarity switching mode were acquired at a resolution of 35,000 full width at half maximum (FWHM) with an automatic gain control (AGC) of 10^6 and 250 ms of maximum ion injection time. In addition, a MS^2 was achieved using a mass inclusion list composed of the mass of the precursor ion of the compounds of interest. A normalized collision energy of 10 and a resolution of 17,500 FWHM were used. The m/z scan range was set between 50-750.

2.4 Non-targeted analysis of metabolites strategy

Chemical profiles from 5 SC samples and 5 exposed samples at nominal concentration of 10 µg/L of VEN were generated by LC-HRMS for each day of exposure (3 and 7 days). The strategy used to data processing and signals identification were taken from Bonnefille et al. (2017). Briefly, the data obtained in positive and negative ionization mode were converted with the free software MS Convert (from *.raw to *mzxml) and extracted using an XCMS script (open source) on the base of the R software. An adaptation of the XCMS parameters was done to fit with our data: the m/z interval for peak picking was set at 0.01, the signal to noise ratio threshold was set at 5, the group band-width was set at 20, and the minimum fraction was set at 0.4. After data processing, a two dimensional table containing information on each peak was generated (Courant et al., 2014). The peaks detected only in the exposed samples (absent in the control samples) and found in all replicate, were considered as potential VEN metabolites. Confirmation of the resulting signals was performed with the fold change and the extracted ion chromatogram. The fold change was calculated as the ratio of the mean signal intensity in exposed samples versus the mean signal intensity in the control samples. Only signals with a fold change higher than 10 in negative or positive ionization mode were kept and further processed to elucidate the structures associated with the signals. Moreover, extracted ion chromatograms (EIC) were checked manually for all potential signals associated with metabolites so as to confirm the absence of any signal in the controls. The identification of the peaks associated to a same molecule (for example, isotopes and/or dimers) was performed by checking the retention times and the shapes of the peaks obtained in the chromatograms generated by Xcalibur QualAnalytical Browser (Xcalibur 3.0, Thermo Fisher Scientific Inc.). This same software was used to determine the elemental composition of unknown metabolites and those with the best fits, along with C, H, N and O compositions that could be related to VEN, are reported in this study. Chromatographic retention time prediction of unknown metabolites was conducted using the multiple linear regression model introduced by Jeon et al. 2013. With this model, an equation was obtained by plotting the retention time versus the molecular weight (MW) and the distribution coefficient (log D_{ow}) of the parent compound and its known metabolites. The MW and log Dow values were generated by ACD/ChemSketch (version 12.01).

2.5 Targeted analysis of metabolites

2.5.1 LC-MS analysis

In the targeted analysis, only data acquired in positive electrospray ionization mode were considered, this mode being the most sensitive for the molecules (VEN and its known metabolites) included in this section of the study. Confirmation of each compound was performed considering (1) retention time

and (2) mass accuracy (max 5 ppm deviation) of protonated molecule $[M+H]^+$ in full scan MS mode compared to values obtained for the analytical standards in the same analytical conditions.

2.5.2 Quantification of VEN and its known human metabolites in tissues

In order to quantify VEN and its known metabolites in the soft tissues of mussels, calibration curves were established in blank mussel tissues by adding a fixed amount of the internal standards: VEN-d6 (500 µg/kg dw) and ODV-d6 (20 µg/kg dw) and increasing quantities of the target analytes from 0 to 3000 µg/kg dw for VEN and from 0 to 80 µg/kg dw for its known phase I (ODV, NDV, NNDDV, NODDV and NNDDODV) and phase II (ODV-glucu and NODDV-glucu) metabolites before extraction.

2.5.3 Quantification of VEN in seawater

In addition, a seawater calibration curve was established by adding a fixed amount of internal standard VEN-d6 (at 1µg/L) and increasing quantities of the targeted analyte VEN from 0 µg/L to 15 µg/L in blank seawater.

2.5.3 Performance of the methods

Methods performances were evaluated taking into account aspects such as linearity, limits of detection (LOD) of the methods, absolute recoveries, matrix effects and repeatability for each analyte. Linearity was estimated with blank tests and calibration curves in tissues (5 levels) at the concentrations ranges of 250 to 3000 µg/kg dw for VEN and of 5 to 80 µg/kg dw for its known metabolites and in seawater (7 levels) at the concentrations ranges of 0,1 to 15 µg/L for VEN. LOD of the methods were determined as the concentration resulting in a signal to noise ratio of 3 for each analyte. Absolutes recoveries were studied by comparison of signal area of each analyte in blank samples spiked before and after the extraction/purification process, both injected under the same analytical conditions. Matrix effects were evaluated by comparison of signal area of each analyte in blank samples spiked after extraction/purification with the signal area of each analyte measured in a pure standard injected under the same analytical conditions. Absolutes recoveries, matrix effects and repeatability of the methods were evaluated by spiking tissues with 20 µg/kg (dw) and seawater with 1µg/L of all compounds in triplicates.

2.6 Bioconcentration factor of VEN

Finally, an apparent bionconcentration factor (BCFa) was calculated for VEN as the ratio of the measured concentration in the tissues and the measured concentration in seawater.

3. Results

3.1 Analytical performances

Performances of the methods are shown in Table1. Both methods demonstrated good linearity (r^2>0.98) in the concentration range defined in both matrices (tissue and seawater) for all compounds included in the study. Absolute recovery of phase I metabolites were higher than 91% in the tissues. Phase II metabolites had lower absolute recovery (approximately 50%) in this matrix. A medium matrix effect was observed in the tissues for all analytes evaluated (suppression between 32% and 59%). The average variability for all analytes evaluated never exceeded 21% in both matrices. The

sensitivity of the methods in terms of LOD was from <1.0 to 8.0 µg/kg dw in tissues and of 1 ng/L in seawater.

Table 1
Physicochemical properties, retention time, linearity, absolute recovery, matrix effets, average repetability and methods LODs and LOQs observed for each molecule in LC-MS Q-Orbitrap

					Tissues					
Analyte	[M][a]	$[M+H]^{+}$ [b]	pKa[c]	log D_{ow} at pH 2[d]	Retention time (min)	Linearity (r^2)	Absolute recovery (%)	Matrix effets (%)	Average variability (%)	LOD^{Meth} µg/kg dw)
NODDV-glucu	425.47274	426.2122	2,78; 10,24	-3.58	3.96	0.9923	50 ± 7	-48 ± 3	17	8.0
ODV-glucu	439.49932	440.2279	2,78; 9,26	-3.65	4.21	0.9993	49 ± 19	-51 ± 8	16	8.0
NNDDODV	235.32204	236.1645	9,72; 10,38	-1.79	6.96	0.9832	96 ± 4	-59 ± 6	21	3.0
NODDV	249.34862	250.1801	9,83; 10,59	-1.29	7.91	0.9988	98 ± 6	-41 ± 9	4	2.0
ODV	263.3752	264.1958	9,23; 10,04	-1.36	8.02	0.9886	100 ± 5	-32 ± 8	5	5.0
NNDDV	249.34862	250.1801	9,85; 14,75	-1.06	11.64	0.9987	97 ± 6	-55 ± 8	17	0.5
NDV	263.3752	264.1958	10,44; 14,83	-0.55	12.08	0.9945	108 ± 12	-32 ± 12	9	1.5
VEN	277.40178	278.2114	9,26; 14,84	-0.62	14.23	0.9998	105 ± 7	-32 ± 11	4	0.5
					Seawater					
VEN	-	-	-		14.18	0.9992	105 ± 11	14 ± 3	18	1

[a,b,c,d] predicted values with ACD / ChemSketch software.

3.2 Quantification of venlafaxine

The VEN concentrations were measured in water to control the exposure of mussels in aquaria. The results of this targeted analysis are presented in Table 2. The exposure concentrations measured in the exposed aquaria were quantified between 9.5 and 12.5 µg/L. No signal of the parent compound (VEN) was detected in the control samples (SC) of both matrices (seawater and tissues). Mean VEN concentrations in exposed mussel tissues were around 1.9 mg/kg dw and 2.5 mg/kg dw at day 3 and 7, respectively. Finally, considering the concentration of VEN measured in water and tissues of the exposed mussels, an apparent bioconcentration factor (BCFa) was calculated for both days of exposure. The values determined were 177 ± 27 L/kg dw and 229 ± 29 L/kg dw for exposure at day 3 and 7, respectively.

Table 2 Mean concentrations of VEN and its metabolites NDV and ODV measured in the different conditions and matrices (seawater and tissue) of the study.

		Analytes		
Matrix	Conditions	VEN (µg/L in water ou µg/kg dw in tissue) (n=5)	NDV (µg/L in water ou µg/kg dw in tissue) (n=5)	ODV (µg/L in water ou µg/kg dw in tissue) (n=5)
Seawater	SC	< LOD	-	-
	Exposure	11.0 ± 1.5	-	-
Tissues	SC	< LOD	-	-
	3rd day of exposure	1948 ± 493	50 ± 13	28 ± 7
	7th day of exposure	2517 ± 341	34 ± 13	24 ± 8

3.3 Non-targeted analysis of VEN and its metabolites in tissues

The application of the non-targeted approach allowed to detect four metabolites. All these molecules were detected in positive mode, while no signal in the negative mode could be identified as potential metabolite. The description of the process of identification of these metabolites as well as the parent compound is indicated below. Relevant information for the identification of these molecules is presented in the Table 3.

3.3.1 Venlafaxine

Among the signals detected only in exposed mussel (absent in control samples) and found in all replicas, the peak with molecular mass $[M+H]^+$ 278.2114 was identified at 14.23 min (i.e. M in the Table 3). The selection of this signal was confirmed by its fold change value of 132 (value >10) and its extracted ion chromatogram (Fig. 1). No peaks were identified in the control samples for this molecular mass. Xcalibur software allowed to determine the elemental composition of the signal and the suggestion with the smallest delta atomic mass unit (amu) was considered. The experimental mass $[M+H]^+$ 278.2114 associated with retention time (14.23 min) and elemental composition proposed ($C_{17}H_{27}NO_2$) coincided with the identification of VEN (Table 1). The experimental mass of VEN was compared with its theoretical mass and no difference was found (Table 3). The identification of the signal corresponding to the isotopic ion ^{13}C ($[M+H]^+$ 279.2148) at 14.26 min reaffirmed the presence of this molecule (VEN) (Fig. 2). HCD fragmentation (at 10 eV) demonstrated the presence of a fragment at m/z 260.2007 (Fig. 2, (1)). This fragment was associated with a loss of 18.0107 amu compared to the measured VEN m/z 278.2114, corresponding to a neutral loss of H_2O in the VEN structure. In addition, the signal corresponding to the isotopic ion ^{13}C ($[M+H]^+$ 261.2039) of this fragment was identified. A second fragment was observed at m/z 215.1427 (Fig. 2, (2)). This fragment corresponded to a loss of 45.0580 amu (equivalent to a loss of C_2H_7N) relative to the previously observed fragment in the VEN structure. A third fragment was found at m/z 121.0646 (Fig. 2, (3)). The elemental composition of this fragment corresponded to C_8H_9O. It should be highlighted that the signals corresponding to the fragments and the 13C isotopic ions presented very similar peak shapes and retention times to those of VEN, showing that they are related to each other. The identification of VEN was confirmed by the injection of the analytical standard under the same conditions reaching the maximum level of confidence (level 1) in the identification of elucidated signals from a non-directed analysis, according to the scale proposed by Schymanski et al. 2014.

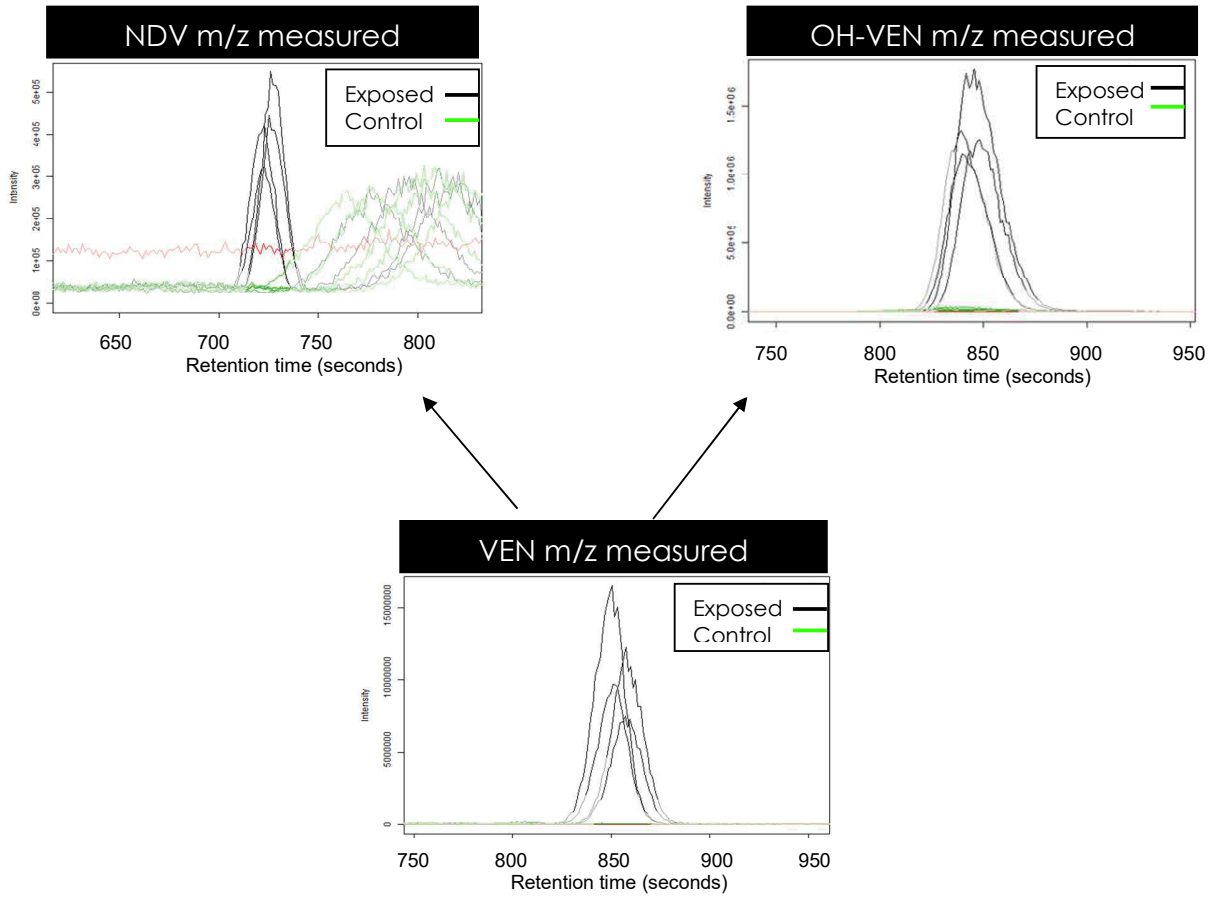


Figure 1.Examples of extracted ion chromatograms of metabolites (NDV and OH-VEN) and parent compound (VEN). The black peaks come from the exposed samples and the green peaks from the control samples. No peaks were identified in the control samples for these molecules.

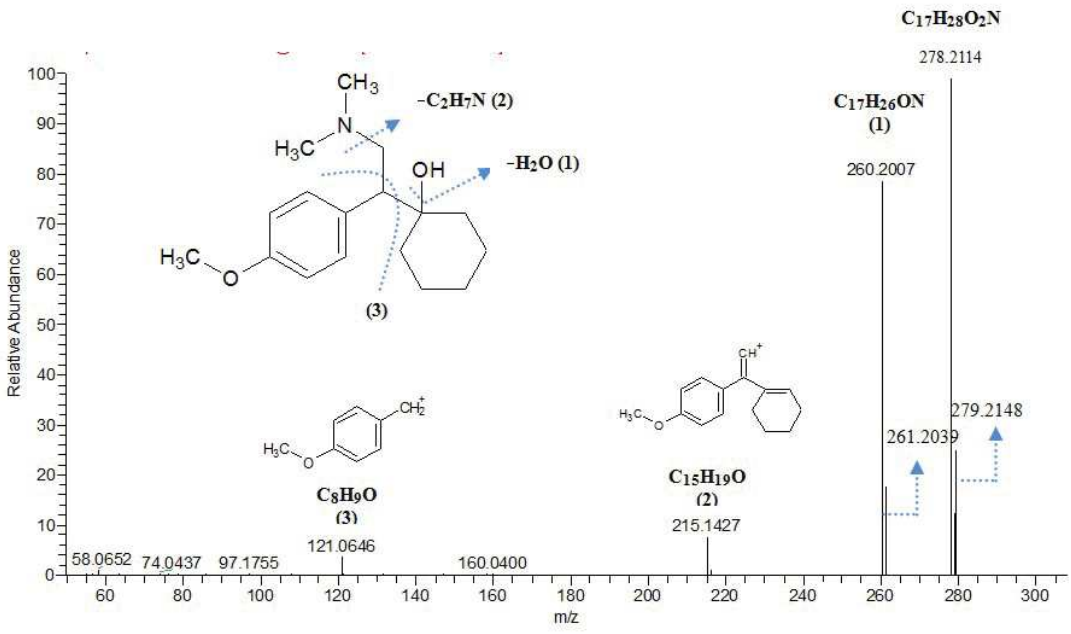


Figure 2. Relevant ions from the high resolution mass spectrum of fragmented VEN at 10 eV

3.3.2 Phase I metabolites

3.3.2.1 Oxidative metabolism-demethylation

Two metabolites identified as M1 and M2 (Table 3), displayed a $[M+H]^+$ of 264.1958. The signals of both metabolites demonstrated a fold change higher than 10 and were detected only in the exposed samples (Fig. 1). They presented a mass decrease of 14.0156 amu (equivalent to a loss of CH_2) compared to VEN structure, corresponding to a dealkylation in the structure of the parent compound. M1 and M2 exhibited different retention times indicating that demethylation occurred in different positions. N-demethylation allows a greater interaction of nitrogen free electron pairs with the pentafluorophenyl propyl groups of the stationary phase of the chromatographic column used.

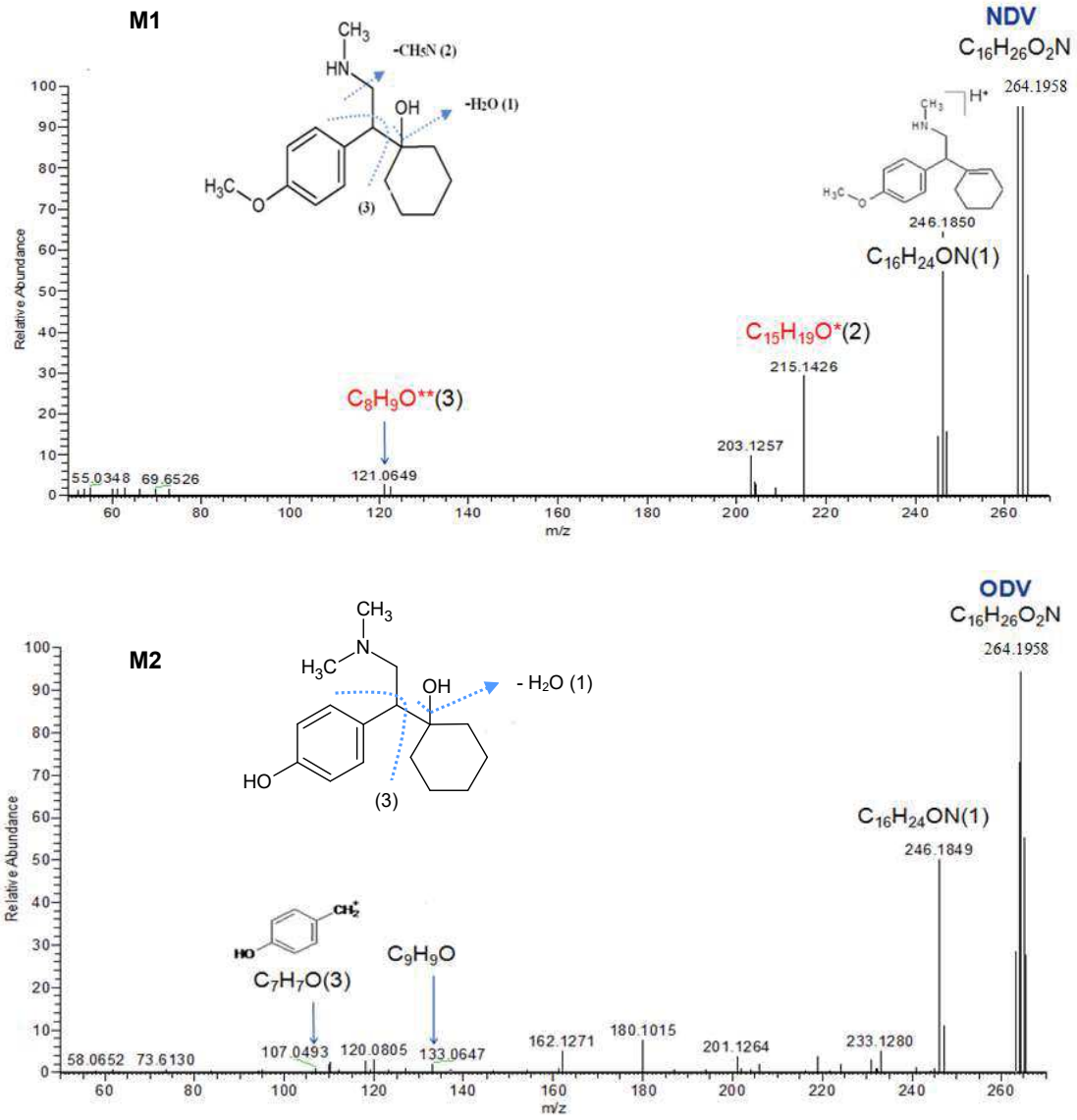
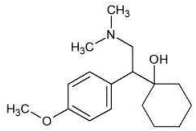
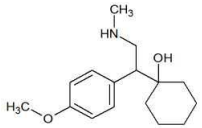
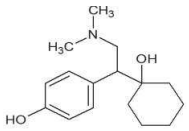
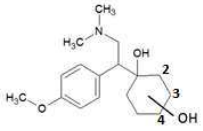


Figure 3. Relevant ions from the high resolution mass spectrum of fragmented NDV (**M1**) and ODV (**M2**) at 10 eV. The asterisks indicate fragments in common with the fragmented spectrum of VEN.

Table 3 Overview of VEN and its biotransformation products identified in mussel tissues by non-targeted analysis

Peak ID	Tr (min)	Assignement	Elemental composition	Chemical Structure	Measured [M+H]+ (Δm)	Fold change	Relevant $[M+H]^+$ fragment m/z, HCD 10 eV (Δm)	log D_{ow} at pH 2[c]	Tr predicted	ΔTr |observed-predicted|<2	Confiden level
M	14.23	VEN	$C_{17}H_{27}NO_2$		278.2114 (0,0 mmu)	132	260.2007 (0.7 mmu) 215.1427 (0.9 mmu) 121.0646 (0.7 mmu)	-0.62	13.15	1.08	Level 1
M1	12.08	NDV	$C_{16}H_{25}NO_2$		264.1958 (0,0 mmu)	24	246.1850 (0.8 mmu) 215.1426 (1.0 mmu) 121.0649 (0.4 mmu)	-0.55	13.02	0.94	Level 1
M2	8.02	ODV	$C_{16}H_{25}NO_2$		264.1958 (0,0 mmu)	43	246.1849 (0.9 mmu) 133.0647 (0.6 mmu) 107.0493 (0.4 mmu)	-1.36	9.20	1.18	Level 1
M3	14.11	OH-VEN	$C_{17}H_{27}NO_3$		294.2064 (0,0 mmu)	1214	276.1952 (1.1 mmu) 233.1530 (1.1 mmu) 215.1425 (1.1 mmu) 178.1222 (1.0 mmu) 121.0644 (0.9 mmu)	-0.86	12.53	1.58	Level 2
M4	4.85	OH-VEN	$C_{17}H_{27}NO_3$		294.2064 (0,0 mmu)	11	276.1955 (0.8 mmu) 121.0644 (0.9 mmu)	-2.05 (2) -2.06 (3) -1.98 (4)	6.93 (2) 6.88 (3) 7.26 (4)	2.1 (2) 2.0 (3) 2.4 (4)	Level 3

In this condition, greater chromatographic retention was observed for the N-demethylated metabolite (M1;Tr: 12.08 min) compared to the O-demethylated metabolite (M2;Tr: 8.02 min) (Table 3). For M1, three fragments were highlighted (Fig. 3), the first one at m/z 246.1850, corresponding to an H_2O loss. A second one at m/z 215.1426, correponding to the elemental composition $C_{15}H_{19}O$. This fragment resulted from the loss of a CH_5N consecutive to the water loss, as observed with VEN but for a dealkylated metabolite, confirming a N-dealkylation. The last fragment corresponded to m/z 121.0649, evidencing the elemental composition fragment C_8H_9O already observed for VEN (Figure 3).

Concerning M2, a fragment at m/z 246.1849 (equivalent to loss of H_2O) was observed. HCD fragmentation demonstrated the presence of a second fragment at m/z 133.0647. With the assistance of the Xcalibur software, the elemental composition proposed as the first option for this fragment was C_9H_9O (with a delta mm of -0.091). Finally, a fragment at m/z 107.0493 was evidenced and associated with the elemental composition fragment C_7H_7O, as observed with VEN but for a dealkylated metabolite. This fragment confirmed that a methyl group was detached from the oxygen of VEN structure. The injection of analytical standards of NDV and ODV allowed to confirm the identity of these metabolites at a confidence level of 1 in the mussel tissues.

3.3.2.1 Oxidative metabolism-hydroxylation

Two metabolites, i.e. M3 and M4, revealed a $[M+H]^+$ of 294.2064. The fold change value of M3 was higher than reported for M4, however both were greater than 10 (Table 3) and were detected only in the exposed samples (Fig. 1). The peak shapes and retention times of these signals (M3 and M4) differed from those observed for VEN, converting them into potential metabolites (Fig.1, Fig. 4 and Table 3). These metabolites presented a mass shift of +15.9950 compared to VEN. This mass shift could be associated with the biotransformation of an RH structure into an ROH structure leading to the formation of potential hydroxylated metabolites. A previous study evidenced the formation of this type of metabolites in organisms such as crustaceans (Jeon et al., 2013a). M3 and M4 exhibited shorter retention times than VEN, supporting the hypothesis of VEN hydroxylation.

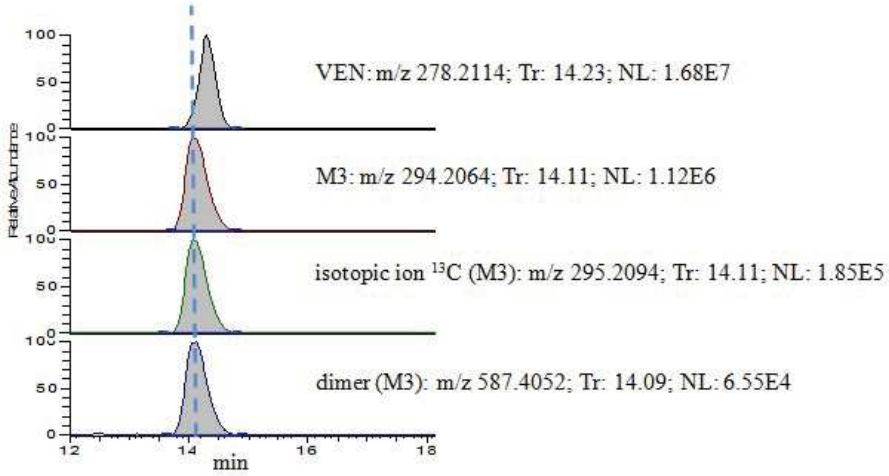


Figure 4. Chromatogram of the signals associated with M3 (^{13}C isotopic ion and dimer). Comparison with VEN.

The addition of an OH group increases the polarity of the molecule, leading to earlier elution of the molecule in the reverse phase liquid chromatography system used. M3 showed a retention time of 14.11 min while a lower chromatographic retention was evidenced for M4 (Tr: 4.85 min). The difference in retention times between M3 and M4 indicates that hydroxylation occurred in different positions of the parent compound (VEN).

For M3, two signals corresponding to (1) the ^{13}C isotopic ion ($[M+H]^+$ 295.2094) and (2) the molecular dimer ($[M+H]^+$ 587.4052) observed at 14.11 min and 14.09 min respectively, reaffirmed the presence of this potential metabolite (Fig. 4). HCD fragmentation of M3 showed a set de 5 fragments that allowed to elucidate the position of the group OH in its structure (Fig. 5). The fragment at m/z 276.1952 corresponded to the loss of H_2O from the initial molecule. The fragments observed at m/z 215.1425 and 121.0644 in M1 were common with VEN. These coincidences between fragments of M3 and VEN are evidences of the absence of the OH group on the aromatic ring and on the hexane cycle of the initial molecule. The elementary compositions $C_{15}H_{21}O_2$ and $C_{11}H_{16}ON$ associated to fragments m/z 233.1530 and 178.1222 respectively confirmed the position of the OH group in the carbon adjacent to the amino group of VEN.

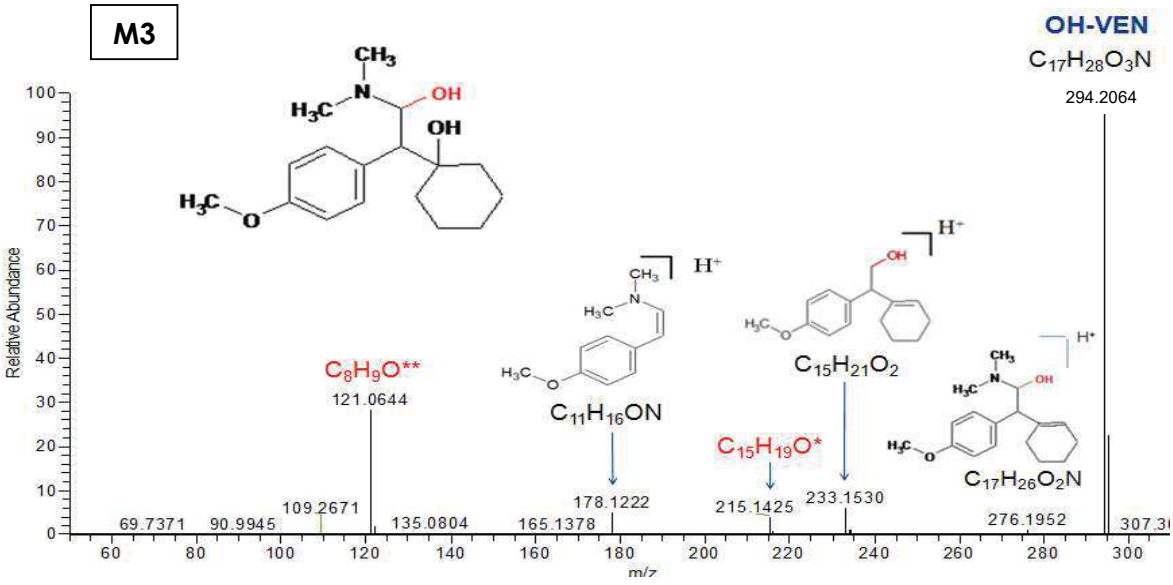


Figure 5. Relevant ions from the high resolution mass spectrum of fragmented M3 at 10 eV. The asterisks indicate fragments in common with the fragmented spectrum of VEN.

In addition, in the absence of an analytical standard to ensure the identity of M3 at the maximum confidence level (level 1), a predictive model of chromatographic retention time was applied to support our structure proposal for M3. This Tr prediction methodology was taken from Jeon et al. 2013. The chromatographic retention time was predicted using a multiple regression equation (Eq.1) developed

by plotting the retention time versus the molecular weight and the predicted log D_{ow} of each compound with available analytical standard (Table 1).

$$\text{Retention time (Tr)} = 4.7107x \log D_{ow} + 0.0324x\ M\ (g/mol) + 7.0762\ \ (r^2\text{: } 0.92)\ \text{(Eq.1)}$$

If the Tr predicted for the elucidated structure was within 2 minutes of the observed Tr, we consider it a viable structure. The proposed structure for M3 demonstrated a predicted log D_{ow} of -0.86 and a Tr prediction of 12.53 min, showing a difference of less than 2 min with respect to the observed Tr (Table 3). Therefore, the proposed structure for M3 is feasible and a level 2 confidence is achieved.

In the case of M4 the information available was limited. The signal intensity was very weak which make it difficult to identify the relevant fragments. Only two fragments were identified. The experimental mass $[M+H]^+$ 276.1955 was associated with the loss of H_2O. A second fragment was observed at m/z 121.0644 and its elemental composition was C_8H_9O as observed for VEN. This last fragment suggests that the additional OH group is not positioned in the aromatic ring. Applying the predictive model of chromatographic retention time, three possible positions of OH group were evidenced for M3 (Table 3). The M3 structure with the OH group in position 2 and 3 of the hexane cycle showed predicted retention times at 6.93 min and 6.88 min respectively (Table 3). Both positions had a delta of retention time (calculated considering the observed and predicted value) equal to 2 min and might fit a possible structure for M4. Due to the limited information available, the proposed structure for M4 reached a level 3 of confidence.

3.4 Quantification of venlafaxine metabolites

The two phase I metabolites generated by demethylation of VEN previously highlighted in mussel tissues were quantified on each day of exposure (days 3 and 7). Mean concentrations of NDV (50 ± 13 and 34 ± 13 µg/kg dw) and of ODV (28 ± 7 and 24 ± 8 µg/kg) were measured in tissues exposed to 3 and 7 days of VEN (Table 2). Considering the intensity obtained for hydroxylated M3 (i.e. $1{,}5*10^6$ versus $5*10^5$ for M1), it seems (hypothesis made in the absence of absolute quantification) that it is the most abundant metabolite of the metabolites identified in this study. However, due to the lack of a commercially available analytical standard, quantification of M3 was not possible.

4. Discussion

The tissue treatment method was developed considering the physicochemical properties of known VEN metabolites in the human body (5 phase I and 2 phase II). These compounds show a medium to high polarity, so the MeOH solvent is ideal for their extraction. VEN and its metabolites have a basic character due to the amine functional group present in their structures. A pH value lower than the pKa value, in at least 2 units, favors the presence of a positive charge on the nitrogen of the amine group of these compounds. Since the compounds of interest have this property, the sorbent SPE chosen combines two mechanisms to enhance their retention: a strong cation exchange and hydrophobic interactions. This double retention mechanism enabled the recovery not only of phase I metabolites, but also of glucuronide metabolites, which are highly complex due to their elevated polarity and sensitivity to hydrolysis during the extraction process (Karinen et al., 2009; Ketola and Hakala, 2010). The evaluation of the performance of the analytical method showed that the combination of the

conditions of extraction and purification of the tissues (LLE with MeOH, pH lower than pKa in at least 2 units and the use of SPE MCX cartridges), allowed high absolute recoveries for phase I metabolites and glucuronide metabolites along with moderate matrix effects.

The application of the tissue treatment method to the samples exposed to VEN allowed the generation of data to determine the accumulation of the parent compound in the mussel tissues. The BCF values obtained (177 ± 27 L/kg dw et 229 ± 29 L/kg dw for VEN exposure at day 3 and day 7, respectively) were in a range similar to those already obtained for mussels exposed to VEN. A first study conducted in mussels (*Mytilus Galloprovincialis*) exposed for 7 days to 1, 10 and 100 µg/L VEN reported BCF values of 178 ± 8.0 L/kg dw, 146 ± 35 L/kg dw and 189 ± 15 L/kg dw respectively (Gomez et al, submitted). In a second study, the BCF values reported for mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed for 20 days to 10.7 ± 1.6 µg/L of VEN were between 213.3-528.1 L/kg dw for the different treatments applied considering effects of water warming and acidification (Serra-Compte et al., 2018). Authors suggested that the positive ionized form of VEN facilitates its adhesion to the biological matrix, which could justify the high value of BCF determined.

The high biocentration of VEN combined with the presence of cytochrome P450 in mussels favours the enzymatic reactions involved in the metabolism of this xenobiotic compound in mussels (Snyder, 2000). The application of a non-targeted approach to samples collected in mussels exposed to VEN allowed the identification of 4 phase I metabolites. Two metabolites resulted from the demethylation process in two different positions of VEN: N-demethylation and O-demethylation. These metabolites have already been previously identified in laboratory exposed mussels (Serra-Compte et al., 2018; Gomez et al., submitted) and in mussels collected in coastal areas in France (Martínez Bueno et al., 2014), in Portugal, Italy and Spain (Álvarez-Muñoz et al., 2015). Quantification of these metabolites showed that the mussels have a slight preference for the detoxification pathway that generates dealkylation of venlafaxine in the nitrogen position, in both days of exposure. In human, ODV is the major metabolite compared to NDV (Sangkuhl et al., 2014). Finally, both metabolites were formed early during the detoxication process since both presented higher concentrations at day 3. This was already observed in a previous report (Gomez et al., submitted).

The other two metabolites identified are hydroxylated metabolites of VEN in two different positions: 1) on the carbon adjacent to the amine group and 2) on the hexane cycle. Hydroxylation is one of the two known mechanisms for performing N-dealkylation. This mechanism consists of a formal hydroxylation of a C-H bond on the carbon adjacent to the heteroatom (HAT, H-atom transfer) (Meunier et al., 2004). The above supports the hypothesis of the proposed structure for the hydroxylated metabolite (M3) of VEN, which to our knowledge has not been previously identified. This metabolite showed the highest intensities of all metabolites identified in the study, in both days of exposure. Hydroxylated metabolites were also shown as major metabolites of diclofenac in mussels (Bonnefille et al., 2017; Świacka et al., 2019). This also highlights the differences of biotransformation processes between humans (main metabolite: ODV) (Sangkuhl et al., 2014) and mussels (main metabolite: OH-VEN). In the case of the second hydroxylated metabolite (M4) of venlafaxine, its low intensity limited the possibility of determining sufficient fragments to increase the confidence level of

the suggested structure. This hydroxylated metabolite has been previously identified in crustaceans (Jeon et al., 2013). Both hydroxylated metabolites (M3 and M4) were formed later during the detoxification process since both showed higher intensities at day 7.

Despite the method demonstrated ability to retain glucuronide metabolites, none were detected. This suggests two possible hypotheses: 1) mussels are not capable of producing glucuronides or 2) the concentration at which these compounds are formed is below the detection limit of our method. A studie has shown that mussels are capable of generating glucuronide metabolites from xenobiotic benzo(a)pyrene (Michel et al., 1995). Therefore, we might expect that the mussel would be able to generate this type of metabolites from pharmaceuticals. The above suggests that the concentration of these metabolites in the tissues analyzed is lower than our detection limit.

Acknowledgments

Authors would like to thank the Agence Nationale de la Recherche (IMAP ANR-16-CE34-0006-01) and Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica for funding. The authors thank David Rosain and Céline Roques of University of Montpellier for their technical assistance in the laboratory.

References

Alvarez-Muñoz, D., Huerta, B., Fernandez-Tejedor, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2015a. Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves. Talanta 136, 174–182.

Álvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., Maulvault, A.L., Tediosi, A., Fernández-Tejedor, M., Van den Heuvel, F., Kotterman, M., Marques, A., Barceló, D., 2015b. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgaes, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. Environ. Res. 143, 56–64.

Boillot, C., Martinez Bueno, M.J., Munaron, D., Le Dreau, M., Mathieu, O., David, A., Fenet, H., Casellas, C., Gomez, E., 2015. In vivo exposure of marine mussels to carbamazepine and 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazepine: bioconcentration and metabolization. Sci. Total Environ. 532, 564–570.

Bonnefille, B., Arpin-Pont, L., Gomez, E., Fenet, H., Courant, F., 2017. Metabolic profiling identification of metabolites formed in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) after diclofenac exposure. Sci. Total Environ. 583, 257–268.

Brieudes, V., Lardy-Fontan, S., Vaslin-Reimann, S., Budzinski, H., Lalere, B., 2017. Development of a multi-residue method for scrutinizing psychotropic compounds in natural waters. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1047, 160–172.

Gomez, E., Bachelot, M., Boillot, C., Dominique, M., Chiron, S., Casellas, C., Fenet, H., 2012. Bioconcentration of pharmaceuticals (benzodiazepines) and two personal care products (UV filters) in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) under controlled laboratory conditions).Environ. Sci. Pollut. Res. 19:2561-2569.

Gomez, E., Boillot, C., Martinez Bueno, MJ., Munaron, D., Mathieu, O., Courant, F., Fenet, H. In vivo exposure of marine mussel to venlafaxine: bioconcentration and metabolization. Sumitted

Jeon, J., Kurth, D., Hollender, J., 2013. Biotransformation pathways of biocides and pharmaceuticals in freshwater crustaceans based on structure elucidation of metabolites using high resolution mass spectrometry. Chem. Res. Toxicol. 26, 313–324.

Karinen, R., Andersen, J.M., Ripel, Å., Hasvold, I., Hopen, A.B., Mørland, J., Christophersen, A.S., 2009. Determination of heroin and its main metabolites in small sample volumes of whole blood and brain tissue by reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Anal. Toxicol. 33, 345–350.

Ketola, R., Hakala, K., 2010. Direct analysis of glucuronides with liquid chromatography-mass spectrometric techniques and methods. Curr. Drug Metab. 11, 561–582.

Martínez Bueno, M.J., Boillot, C., Munaron, D., Fenet, H., Casellas, C., Gómez, E., 2014. Occurrence of venlafaxine residues and its metabolites in marine mussels at trace levels: Development of analytical method and a monitoring program. Anal. Bioanal. Chem. 406, 601–610.

McEneff, G., Barron, L., Kelleher, B., Paull, B., Quinn, B., 2013. The determination of pharmaceutical residues in cooked and uncooked marine bivalves using pressurised liquid extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 405, 9509–9521.

Meunier, B., de Visser, S.P., Shaik, S., 2004. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. Chem. Rev. 104, 3947–3980.

Michel, X.R., Beasse, C., Narbonne, J., 1995. In vivo metabolism of benzo (a) pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 28, 215–222.

Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Huerta, B., Barceló, D., León, V.M., 2016. Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon? Environ. Res. 146, 282–298.

Paíga, P., Correia, M., Fernandes, M., Silva, A., Carvalho, M., Vieira, J., Jorge, S., Silva, J., Freire, C., Delerue-Matos, C., 2019. Assessment of 83 pharmaceuticals in WWTP influent and effluent samples by UHPLC-MS/MS : Hourly variation. Sci. Total Environ. 648, 582–600.

Sangkuhl, K., Stingl, J., Turpeinen, M., Altman, R., Klein, T., 2014. PharmaGKB summary: venlafaxine pathway. Pharmacogenet Genom. 24, 62–72.

Serra-Compte, A., Maulvault, A.L., Camacho, C., Álvarez-Muñoz, D., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Marques, A., 2018. Effects of water warming and acidification on bioconcentration, metabolization and depuration of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Environ. Pollut. 236, 824–834.

Silva, L.J.G., Martins, M.C., Pereira, A.M.P.T., Meisel, L.M., Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., Lino, C.M., Pena, A., 2016. Uptake, accumulation and metabolization of the antidepressant fluoxetine by *Mytilus galloprovincialis*. Environ. Pollut. 213, 432–437.

Snyder, M.J., 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: Recent advances and future directions. Aquat. Toxicol. 48, 529–547.

Świacka, K., Szaniawska, A., Caban, M., 2019. Evaluation of bioconcentration and metabolism of diclofenac in mussels *Mytilus trossulus* - laboratory study. Mar. Pollut. Bull.141, 249–255.

Conclusion générale et perspectives

La présence de résidus de médicaments (RdM) dans les eaux continentales a été largement documentée, principalement en Europe et en Amérique du Nord. Au contraire, dans les pays de l'hémisphère sud, en particulier sur le continent africain, l'information est très limitée. Les quelques études disponibles en Afrique ont mis en évidence des concentrations élevées de RdM dans les eaux de surface, qui atteignent plusieurs dizaines de milliers de ng/L pour la plupart des molécules étudiées. Les habitudes de consommation et l'existence ou non de modalités de gestion des eaux usées sont des facteurs qui peuvent justifier ces différences de concentration des RdM entre les continents. Les concentrations élevées des RdM mesurées dans les eaux de surface africaines, par rapport à d'autres retrouvées en Europe, témoignent de situations avec de fortes pressions anthropiques sur les ressources en eau. De plus, dans les pays du Sud les traitements de potabilisation des eaux et l'accessibilité à une eau "potable" étant moins développés qu'en Europe, des ressources alternatives en eau peuvent être consommées. Il apparaît ici essentiel de bien identifier les usages de l'eau afin de renseigner les expositions potentielles des populations humaines et ainsi les risques sanitaires associés. Cette problématique, nous a conduit à fixer comme premier objectif de thèse l'étude des niveaux de contamination des eaux de surface et des eaux souterraines par les RdM dans une ville africaine, Yaoundé, au Cameroun, soumise à une forte pression anthropique et une faible gestion des eaux usées et de rechercher les modalités d'exposition indirecte de la population humaine en fonction des usages de l'eau.

Le développement d'une méthode d'analyse multi-résidus qui comprend des molécules mères et des métabolites choisies pour partie sur la base de l'arrêté du 7 août 2015, nous a permis de diagnostiquer l'état de la pollution des eaux. L'évaluation de la performance de cette méthode témoigne de valeurs satisfaisantes pour la plupart des molécules choisies dans l'étude pour les paramètres: linéarité, effets matrices et rendements bruts. Pour les limites de détection et quantification, les valeurs ont été pour certaines molécules plus élevées, d'un facteur de 2 à 50 selon la molécule, par rapport à celles rapportées dans d'autres méthodes multi-résidus disponibles dans la littérature. Il est difficile de comparer ces différence en raison des différentes méthodes d'extraction et d'analyse faites. Cependant, les limites de quantification de notre méthode restent en accord avec l'objectif de notre étude pour ce premier travail d'exploration. L'application de cette méthode dans les eaux de surface et souterraines échantillonnées pendant la saison des pluies en février et/ou mars 2018 selon le cas, a révélé de fortes concentrations pour certaines molécules des classes thérapeutiques analgésiques/AINS, anti-épileptique et antibiotique/anti-infectieux en milieu urbain. Les niveaux de concentration peuvent atteindre quelques microgrammes par litre comme il a été mis en évidence pour l'acétaminophène (dans les eaux de surface) et le sulfaméthoxazole (dans les eaux souterraines). La zone péri-urbaine est aussi contaminée, mais en moindre proportion par rapport à la zone urbaine, ce qui valide que la pression anthropique associée à l'urbanisation a un impact sur la qualité du milieu aquatique. Dans les eaux souterraines, des médicaments tels que carbamazépine, ibuprofène, diclofénac, acétaminophène et sulfaméthoxazole ont présenté des concentrations élevées. L'accessibilité aux médicaments (marché informel et formel), le mauvais fonctionnement des STEP existantes (non adaptées aux conditions climatiques locales), le rejet de médicaments dans les toilettes et dans l'environnement immédiat, les enfouissements à ciel ouvert sont des facteurs que

peuvent expliquer les fortes concentrations de RdM retrouvés dans ces milieux aquatiques. En plus, il est à noter que la population humaine de Yaoundé utilise les ressources en eau dans multiples activités telles que l'irrigation, le lavage, la baignade, etc, pour les eaux de surface. La population peut utiliser l'eau souterraine comme eau de boisson. Cela suggère que les populations dans les quartiers à Melen, à Biyeme et proche de la Gare Marchandises sont exposées aux médicaments présents dans les eaux souterraines utilisées comme eau de boisson.

Ces travaux nous ont permis de fournir, pour la première fois, des données sur les concentrations en RdM dans les ressources en eau de Cameroun et sur les usages de ces ressources qui peuvent générer une exposition potentielle des populations humaines à ces polluants. Cependant, des études complémentaires méritent d'être conduites afin de conforter et de développer les premières conclusions de cette thèse. Une étude complémentaire peut être de prioriser une liste de molécules à suivre en ciblant sur les médicaments consommés par la population. En Cameroun, aucune base nationale sur la consommation des médicaments n'est disponible et les prescriptions n'ont pas été renseignées. Une enquête préalable pour mieux connaitre les habitudes de prescriptions et d'usage serait nécessaire en raison de l'absence de base de données fiables. A partir de cette enquête, une hiérarchie des molécules à suivre peut être établie, en tenant compte des facteurs tells que la solubilité, la toxicité, la consommation et la représentativité des différents classe thérapeutiques. Cette liste devra être confrontée à la disponibilité de standards analytiques, déuterées et de l'équipement de laboratoire avant d'établir les molécules retenues de façon définitive. D'autres études complémentaires peuvent être: i) le développement d'une méthode multi-résidus pour les molécules de la liste établie précédemment qui permet d'avoir une meilleur sensibilité pour détecter et quantifier les molécules à basses concentrations et ii) la conception d'un plan d'échantillonnage national représentatif permettant d'estimer l'exposition des populations aux résidus de médicaments dans différents types d'eaux (eaux superficielles et eux souterraines) utilisées pour la production d'eaux destinées à la consommation humaine et pour la consommation. Seule une campagne d'analyse ciblée nous permettrait de répondre à la question des risques sanitaires pour la population de Yaoudé suite à une exposition indirecte aux RdM via l'eau de boisson.

Par ailleurs, le rejet continu de RdM dans les milieux aquatiques entraîne une exposition chronique dans les écosystèmes récepteurs. Ces composés biologiquement actifs sont susceptibles de se bioaccumuler et de se métaboliser dans les organismes aquatiques. Cela pose la question sur les risques potentiels pour les organismes exposés sachant que les cibles d'action du médicament peuvent être partagées avec ces organismes non cibles. La majorité des études concerne la détection et la quantification des RdM accumulés dans les organismes d'eau douce tandis que dans les organismes marins, les informations disponibles restent limitées. De plus, quelques travaux ont mis en évidence l'accumulation de molécules mères et leurs métabolites dans les tissus des organismes marins. Cependant, peu d'études permettent de déterminer si l'origine de ces composés est le résultat d'une absorption directe ou du métabolisme de l'organisme marin. Cette problématique, nous a conduit à fixer comme deuxième objectif de thèse: améliorer les

connaissances sur le métabolisme des médicaments sur des organismes non cibles, plus spécifiquement de l'antidépresseur venlafaxine chez *Mytilus galloprovincialis*.

Une approche non ciblée appliquée sur les tissus mous de moules exposées et de moules non exposées à la venlafaxine a permis de caractériser par une approche sans a priori le métabolisme de cet antidépresseur chez la moule méditerranéenne. En complément de cette approche non ciblée, une approche ciblée a été conduite afin d'optimiser les méthodes d'extraction tissulaire sur les métabolites renseignés à ce jour chez l'homme et chez la moule. Le développement de la méthode de traitement tissulaire a pris en compte la charge positive qui peut être générée sur l'azote du groupe fonctionnel amine présent dans la structure de la venlafaxine et ses métabolites, si la valeur de pH est inférieure à la valeur de la pKa de la molécule en au moins 2 unités. Cette propriété a permis d'avoir un double mécanisme de rétention des molécules sur la cartouche MCX utilisée pendant le processus d'extraction. Ce double mécanisme de rétention a assuré la récupération non seulement des métabolites de phase I, mais aussi des métabolites glucuronides, ces derniers sont difficiles à extraire en raison de leur polarité élevée et de leur sensibilité à l'hydrolyse pendant le processus d'extraction. De plus, l'évaluation de la performance de cette méthode de traitement tissulaire témoigne que la combinaison des conditions d'extraction et de purification sélectionnés a permis des rendements bruts élevés pour les métabolites de phases I et modérées pour les métabolites glucuronides, ainsi que des effets de matrice modérés pour l'ensemble de molécules (venlafaxine et ses métabolites). L'application de l'approche non ciblée sur les tissus mous de moules exposées et de moules non exposées a permis d'identifier 4 métabolites de phase I. Au delà des métabolites déjà renseignés (NDV et ODV), deux nouveaux métabolites hydroxylés à différentes positions au niveau de la structure de la venlafaxine ont été identifiés. Le métabolite hydroxylé avec le groupe fonctionnel OH situé sur le carbone adjacent à l'hétéroatome de la structure de la venlafaxine, est le principal métabolite. À notre connaissance, ce métabolite n'a pas préalablement été rapporté. Nos résultats ont mis en évidence des différences dans le processus de biotransformation entre les humains chez qui le métabolite principal est un métabolite déméthylé (ODV) et les moules, chez qui le métabolite principal est hydroxylé (OH-VEN).

Ces travaux nous a permis d'avancer dans la caractérisation du métabolisme des médicaments sur des organismes non cibles, plus spécifiquement de l'antidépresseur venlafaxine chez la moule méditerranéenne. L'identification de deux nouveaux métabolites hydroxylés soulèvent la question sur leur implication dans les effets qui pourraient être observés dans la moule. La métabolomique est un outil qui peut permettre d'étudier les effets potentiels de l'exposition aux RdM chez un organisme non cibles. De plus, dans le milieu aquatique, en particulier dans le milieu marin, un mélange complexe de produits pharmaceutiques existe et les organismes marins sont exposés à ces mélanges. Une autre étude complémentaire peut s'intéresser aux effets de mélange, soit de produits pharmaceutiques entre eux ou combinées à d'autres stress chimiques, physiques ou microbiologique, dans les organismes aquatiques.

Références bibliographiques

Abou-atmé, B., Lupien, J., Bussières, J., Thirion, D.J.G., 2006. Applicabilité du système de classification anatomique, thérapeutique et chimique et dose définie journalière aux établissements de santé québécois pour mesurer l'utilisation des médicaments. Pharmactuel 39, 37–43.

Académie National de Pharmacie. 2019. Médicaments et environnement. https://www.acadpharm.org/dos_public/Rapport_Medicaments_Environnement_2019.04.24_VF.pdf.

Al-Khazrajy, O.S.A., Boxall, A.B.A., 2016. Impacts of compound properties and sediment characteristics on the sorption behaviour of pharmaceuticals in aquatic systems. J. Hazard. Mater. 317, 198–209.

Alvarez-Muñoz, D., Huerta, B., Fernandez-Tejedor, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2015. Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves. Talanta 136, 174–182.

Álvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., Maulvault, A.L., Tediosi, A., Fernández-Tejedor, M., Van den Heuvel, F., Kotterman, M., Marques, A., Barceló, D., 2015. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgaes, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. Environ. Res. 143, 56–64.

Alvarez, D.A., Stackelberg, P.E., Petty, J.D., Huckins, J.N., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., 2005. Comparison of a novel passive sampler to standard water-column sampling for organic contaminants associated with wastewater effluents entering a New Jersey stream. Chemosphere 61, 610–622.

Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. Chemosphere 50, 1319–1330.

Archana, G., Dhodapkar, R., Kumar, A., 2017. Ecotoxicological risk assessment and seasonal variation of some pharmaceuticals and personal care products in the sewage treatment plant and surface water bodies (lakes). Environ. Monit. Assess. 189–446.

Arnnok, P., Singh, R.R., Burakham, R., Pérez-Fuentetaja, A., Aga, D.S., 2017. Selective Uptake and Bioaccumulation of Antidepressants in Fish from Effluent-Impacted Niagara River. Environ. Sci. Technol. 51, 10652–10662.

Arnot, J.A., Gobas, F.A., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. Environ. Rev. 14, 257–297.

Arpin-Pont L, Martinez Bueno MJ, Gomez E, Hélène F., 2016. Ocurrence of PPCPs in the marine environment: a review. Environ. Sci. Pollut. Res.

Ascenzo, G.D., Corcia, A. Di, Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi, R., 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities.

Sci. Total Environ. 302, 199–209.

Baena-nogueras, R.M., González-mazo, E., Lara-martín, P.A., 2017. Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters : photolysis vs biodegradation. Sci. Total Environ. 590–591, 643–654.

Bai, X., Lutz, A., Carroll, R., Keteles, K., Dahlin, K., Murphy, M., Nguyen, D., 2018. Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. Chemosphere 200, 133–142.

Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B., 2011. Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1218, 1620–1631.

Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B., 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I) Groundwater. Sci. Total Environ. 402, 192–200.

Baz-Lomba, J., Reid, M.J., Thomas, K., 2016. Target and suspect screening of psychoactive substances in sewage-based samples by UHPLC-QTOF. Anal. Chim. Acta 914, 81–90.

Bean, T.G., Rattner, B.A., Lazarus, R.S., Day, D.D., Burket, S.R., Brooks, B.W., Haddad, S.P., Bowerman, W.W., 2018. Pharmaceuticals in water, fish and osprey nestlings in Delaware River and Bay. Environ. Pollut. 232, 533–545.

Benotti, M.J., Brownawell, B.J., 2009. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. Environ. Pollut. 157, 994–1002.

Bergheim, M., Gminski, F.R., Spangenberg, A.B., Bu, D.A., Ku, K., 2014. Recalcitrant pharmaceuticals in the aquatic environment : a comparative screening study of their occurrence, formation of phototransformation products and their in vitro toxicity. Environ. Chem. 11, 431–444.

Besse, J.P., Barreto, C.K., Garric, J., 2008. Exposure Assessment of Pharmaceuticals and Their Metabolites in the Aquatic Environment : Application to the French Situation and Preliminary Prioritization To cite this version : HAL Id : hal-00454514.

Bijlsma, L., Boix, C., Niessen, W.M.A., Ibáñez, M., Sancho, J. V., Hernández, F., 2013. Investigation of degradation products of cocaine and benzoylecgonine in the aquatic environment. Sci. Total Environ. 443, 200–208.

Bijlsma, L., Emke, E., Hernández, F., De Voogt, P., 2012. Investigation of drugs of abuse and relevant metabolites in Dutch sewage water by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. Chemosphere 89, 1399–1406.

Björlenius, B., Ripszám, M., Haglund, P., Lindberg, R.H., Tysklind, M., Fick, J., 2018. Pharmaceutical residues are widespread in Baltic Sea coastal and offshore waters – Screening for pharmaceuticals and modelling of environmental concentrations of carbamazepine. Sci. Total Environ. 633, 1496–1509.

Bletsou, A.A., Jeon, J., Hollender, J., Archontaki, E., Thomaidis, N.S., 2015. Targeted and non-

targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. Trends Anal. Chem. 66, 32–44.

Boleda, M.R., Galceran, M.T., Ventura, F., 2013. Validation and uncertainty estimation of a multiresidue method for pharmaceuticals in surface and treated waters by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. 1286, 146–158.

Boyd, G.R., Reemtsma, H., Grimm, D.A., Mitra, S., 2003. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. Sci. Total Environ. 311, 135–149.

Bradley, P.M., Barber, L.B., Duris, J.W., Foreman, W.T., Furlong, E.T., Hubbard, L.E., Hutchinson, K.J., Keefe, S.H., Kolpin, D.W., 2014. Riverbank filtration potential of pharmaceuticals in a wastewater-impacted stream. Environ. Pollut. 193, 173–180.

Brieudes, V., 2014. Caractérisation de la contamination des systèmes aquatiques par les psychotropes : développement d'une méthode de référence incluant une démarche multifactorielle de hiérarchisation. Manuscrit de thèse. Université de Bordeaux.

Brieudes, V., Lardy-Fontan, S., Vaslin-Reimann, S., Budzinski, H., Lalere, B., 2017. Development of a multi-residue method for scrutinizing psychotropic compounds in natural waters. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1047, 160–172.

Brooks, B.W., Chambliss, C.K., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D., Lewis, R.J., 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. Environ. Toxicol. Chem. 24, 464–9.

Cabane, F., 2012. Lexique d'écologie, d'environnement et d'aménagement du littoral. Version 24. Ifremer : 1-342.

Calisto, V., Domingues, M.R.M., Esteves, V.I., 2011. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments e Kinetics and photodegradation products. Water Res. 45, 6097–6106.

Chiaia-Hernandez, A.C., Schymanski, E.L., Kumar, P., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Suspect and nontarget screening approaches to identify organic contaminant records in lake sediments. Anal. Bioanal. Chem. 7323–7335.

Chiron, S., Minero, C., Vione, D., 2006. Photodegradation Processes of the Antiepileptic Drug Carbamazepine, Relevant To Estuarine Waters. Environ. Sci. Technol 40, 5977–5983.

Conley, J.M., Symes, S.J., Schorr, M.S., Richards, S.M., 2008. Spatial and temporal analysis of pharmaceutical concentrations in the upper Tennessee River basin. Chemosphere 73, 1178–1187.

Dąbrowska, D., Namieśnik, J., 2004. The Importance of Degradation in the Fate of Selected Organic Compounds in the Environment . Part II . Photodegradation and Biodegradation. Polish J. Environ. Stud. 13, 617–626.

Deo, R.P., 2014. Pharmaceuticals in the Surface Water of the USA : A Review. Curr Envir Heal. Rpt 1, 113–122.

Deo, R.P., Halden, R.U., 2013. Pharmaceuticals in the built and natural water environment of the United States. Water (Switzerland) 5, 1346–1365.

Dirección General de Comunicación e Información Diplomática de España, 2019. Camerún [www. exteriores.gob.es] (accessed 10.26.19).

Dodder, N.G., Maruya, K.A., Lee Ferguson, P., Grace, R., Klosterhaus, S., La Guardia, M.J., Lauenstein, G.G., Ramirez, J., 2014. Occurrence of contaminants of emerging concern in mussels (Mytilus spp.) along the California coast and the influence of land use, storm water discharge, and treated wastewater effluent. Mar. Pollut. Bull. 81, 340–346.

Du, B., Perez-Hurtado, P., Brooks, B.W., Chambliss, C.K., 2012. Evaluation of an isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method for pharmaceuticals in fish. J. Chromatogr. A 1253, 177–183.

Ebele, A.J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harrad, S., 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. Emerg. Contam. 3, 1–16.

Erses, A.S., Onay, T.T., Yenigun, O., 2008. Comparison of aerobic and anaerobic degradation of municipal solid waste in bioreactor landfills. Bioresour. Technol. 99, 5418–5426.

Evgenidou, E.N., Konstantinou, I.K., Lambropoulou, D.A., 2015. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters : A review. Sci. Total Environ. 505, 905–926.

Ewelina Dziurkowska, M.W., 2012. Determination of venlafaxine and its metabolites in biological materials. Arch. Psychiatry Psychother. 14, 49–58.

Fenet, H., Arpin-Pont, L., Vanhoutte-Brunier, A., Munaron, D., Fiandrino, A., Martínez Bueno, M.-J., Boillot, C., Casellas, C., Mathieu, O., Gomez, E., 2014. Reducing PEC uncertainty in coastal zones: A case study on carbamazepine, oxcarbazepine and their metabolites. Environment International 68, 177–184.

Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodriguez-Roda, I., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. Sci. Total Environ. 438, 404–413.

Ferreira da Silva, B., Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A.A., Petrovic, M., Barceló, D., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. Chemosphere 85, 1331–1339.

Ferrer, I., Zweigenbaum, J.A., Thurman, E.M., 2010. Analysis of 70 Environmental Protection Agency priority pharmaceuticals in water by EPA Method 1694. J. Chromatogr. A 1217, 5674–5686.

Fontanals, N., Marcé, R.M., Borrull, F., 2005. New hydrophilic materials for solid-phase extraction. Trends Anal. Chem. 24, 394–406.

Gao, L., Shi, Y., Li, W., Cai, Y., 2012. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Haihe. J. Environ. Monit. 14, 1248–1255.

Gelsleichter, J., Szabo, N.J., 2013. Uptake of human pharmaceuticals in bull sharks (Carcharhinus leucas) inhabiting a wastewater-impacted river. Sci. Total Environ. 456–457, 196–201.

Godoy, A.L.P.C., Rocha, A., Da Silva Souza, C., Lanchote, V.L., 2016. Pharmacokinetics of venlafaxine enantiomers and their metabolites in psoriasis patients. J. Clin. Pharmacol. 56, 567–575.

Gomez, E., Bachelot, M., Boillot, C., 2012. Bioconcentration of two pharmaceuticals (benzodiazepines) and two personal care products (UV filters) in marine mussels (Mytilus galloprovincialis) under controlled laboratory conditions. Env. Sci Pollut Res 19, 2561–2569.

Gómez, E., Martínez Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. Chemosphere 66, 993–1002.

Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem. J. Chromatogr. A 1248, 104–121.

Gu, G., Black, M., Cookson, C., Fiorella, A., Li, Y., Gorman, S.H., Bakhtiar, R., 2018. Validation of an LC-MS/MS method for simultaneous quantification of venlafaxine and its five metabolites in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1087–1088, 29–35.

Gumbi, B.P., Moodley, B., Birungi, G., Ndungu, P.G., 2017. Detection and quantification of acidic drug residues in South African surface water using gas chromatography-mass spectrometry. Chemosphere 168, 1042–1050.

Gwenzi, W., Chaukura, N., 2018. Science of the Total Environment Organic contaminants in African aquatic systems : Current knowledge , health risks , and future research directions. Sci. Total Environ. 619–620, 1493–1514.

Hazelton, P.D., Cope, W.G., Mosher, S., Pandolfo, T.J., Belden, J.B., Barnhart, M.C., Bringolf, R.B., 2013. Fluoxetine alters adult freshwater mussel behavior and larval metamorphosis. Sci. Total Environ. 445–446, 94–100.

He, B. shu, Wang, J., Liu, J., Hu, X. min, 2017. Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities. Chemosphere 181, 178–189.

Highchem, 2014. Mass Frontier (No. 7th edn). HighChem Ltd./ThermoScientific, Bratislava.

Hossain, A., Nakamichi, S., Habibullah-Al-Mamun, M., Tani, K., Masunaga, S., Matsuda, H., 2018. Occurrence and ecological risk of pharmaceuticals in river surface water of Bangladesh. Environ. Res. 165, 258–266.

Howell, S.R., Husbands, G.E.M., Scatina, J.A., Sisenwine, S.F., 1993. Metabolic disposition of14c-venlafaxine in mouse, rat, dog, rhesus monkey and man. Xenobiotica 23, 349–359.

Hug, C., Ulrich, N., Schulze, T., Brack, W., Krauss, M., 2014. Identification of novel micropollutants in

wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. Environ. Pollut. 184, 25–32.

Hughes, S.R., Kay, P., Brown, L.E., 2013. Global Synthesis and Critical Evaluation of Pharmaceutical Data Sets Collected from River Systems. Environ. Sci. Technol. 47, 661–677.

Hummel, D., Löffler, D., Fink, G., Ternes, T.A., 2006. Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry. Environ. Sci. Technol. 40, 7321–7328.

Jasper, J.T., Sedlak, D.L., 2013. Phototransformation of Wastewater-Derived Trace Organic Contaminants in Open-Water Unit Process Treatment Wetlands. Environ. Sci. Technol. 47, 10781–10790.

Jeon, J., Kurth, D., Hollender, J., 2013. Biotransformation pathways of biocides and pharmaceuticals in freshwater crustaceans based on structure elucidation of metabolites using high resolution mass spectrometry. Chem. Res. Toxicol. 26, 313–324.

Jiang, J.J., Lee, C.L., Fang, M. Der, 2014. Emerging organic contaminants in coastal waters: Anthropogenic impact, environmental release and ecological risk. Mar. Pollut. Bull. 85, 391–399.

K'oreje, K.O., Demeestere, K., De Wispelaere, P., Vergeynst, L., Dewulf, J., Van Langenhove, H., 2012. From multi-residue screening to target analysis of pharmaceuticals in water: Development of a new approach based on magnetic sector mass spectrometry and application in the Nairobi River basin, Kenya. Sci. Total Environ. 437, 153–164.

K'oreje, K.O., Vergeynst, L., Ombaka, D., De Wispelaere, P., Okoth, M., Van Langenhove, H., Demeestere, K., 2016. Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya. Chemosphere 149, 238–244.

Kang, M., Song, W., Shim, B., Oh, S., Lee, H., Ghung, E., 2010. Pharmacologically active metabolites of currently marketed drugs: potential resources for new drug discovery and development. Yakugaku Zasshi 130, 1325–1337.

Karinen, R., Andersen, J.M., Ripel, Å., Hasvold, I., Hopen, A.B., Mørland, J., Christophersen, A.S., 2009. Determination of heroin and its main metabolites in small sample volumes of whole blood and brain tissue by reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Anal. Toxicol. 33, 345–350.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. Water Res. 42, 3498–3518.

Kasprzyk-Hordern et al., 2009, 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. Water Res. 43, 363–380.

Katrin Sangkuhl, Julia C. Stingl, Miia Turpeinen, Russ B. Altman, and T.E.K., 2014. NIH Public Access. Pharmacogenet Genom. 24, 62–72.

Ketola, R., Hakala, K., 2010. Direct Analysis of Glucuronides with Liquid Chromatography-Mass

Spectrometric Techniques and Methods. Curr. Drug Metab. 11, 561–582.

Kim, I., Tanaka, H., 2009. Photodegradation characteristics of PPCPs in water with UV treatment. Environ. Int. 35, 793–802.

Kosjek, T., Perko, S., Zupanc, M., Hren, M., Dragičević, T., Žigon, D., Kompare, B., Heath, E., 2012. Environmental occurrence , fate and transformation of benzodiazepines in water treatment. Water Res. 46, 355–368.

Krizman-Matasic, I., Kostanjevecki, P., Ahel, M., Terzic, S., 2018. Simultaneous analysis of opioid analgesics and their metabolites in municipal wastewaters and river water by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1533, 102–111.

Kwon, J.-W., Armbrust, K.L., 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. Environ. Toxicol. Chem. 25, 2561–2568.

Kwon, J.-W., Armbrust, K.L., 2004. Hydrolysis and photolysis of paroxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, in aqueous solutions. Environ. Toxicol. Chem. 23, 1394–1399.

Lajeunesse, A., Gagnon, C., Sauvé, S., 2008. Determination of Basic Antidepressants and Their N-Desmethyl Metabolites in Raw Sewage and Wastewater Using Solid-Phase Extraction and Liquid. Anal. Chem. 80, 5325–5333.

Lajeunesse, A., Smyth, S.A., Barclay, K., Sauvé, S., Gagnon, C., 2012. Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. Water Res. 46, 5600–5612.

Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater : A review of sources, fate and occurrence. Environ. Pollut. 163, 287–303.

Lapworth, D.J., Das, P., Shaw, A., Mukherjee, A., Civil, W., Petersen, J.O., Gooddy, D.C., Wake, O., Finlayson, A., Krishan, G., Sengupta, P., Macdonald, A.M., 2018. Deep urban groundwater vulnerability in India revealed through the use of emerging organic contaminants and residence time tracers. Environ. Pollut. 240, 938–949.

Lara-martín, P.A., González-mazo, E., Petrovic, M., Barceló, D., Brownawell, B.J., 2014. Occurrence, distribution and partitioning of nonionic surfactants and pharmaceuticals in the urbanized Long Island Sound Estuary (NY). Mar. Pollut. Bull. 1–10.

Lazzara, R., Blázquez, M., Porte, C., Barata, C., 2012. Low environmental levels of fluoxetine induce spawning and changes in endogenous estradiol levels in the zebra mussel Dreissena polymorpha. Aquat. Toxicol. 106–107, 123–130.

Lesser, L.E., Mora, A., Moreau, C., Mahlknecht, J., Hernández-Antonio, A., Ramírez, A., Barrios-Piña, H., 2018. Survey of 218 organic contaminants in groundwater derived from the world ' s largest untreated wastewater irrigation system : Mezquital. Chemosphere 198, 510–521.

Lewandowski, J., Putschew, A., Schwesig, D., Neumann, C., Radke, M., 2011. Fate of organic micropollutants in the hyporheic zone of a eutrophic lowland stream: Results of a preliminary field study. Sci. Total Environ. 409, 1824–1835.

Li, W.C., 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. Environ. Pollut. 187, 193–201.

Li, Z., Xiang, X., Li, M., Ma, Y., Wang, J., Liu, X., 2015. Occurrence and risk assessment of pharmaceuticals and personal care products and endocrine disrupting chemicals in reclaimed water and receiving groundwater in China. Ecotoxicol. Environ. Saf. 119, 74–80.

Lin, A.Y.-C., Reinhard, M., 2005. Photodegradation of common environmental pharmaceutical and estrogens in river water. Environ. Toxicol. Chem. 24, 1303–1309.

Little, J.L., Cleven, C.D., Brown, S.D., 2011. Identification of “known unknowns” utilizing accurate mass data and chemical abstracts service databases. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 22, 348–359.

Little, J.L., Williams, A.J., Pshenichnov, A., Tkachenko, V., 2012. Identification of “known unknowns” utilizing accurate mass data and chemspider. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 23, 179–185.

Liu, J., Lu, G., Xie, Z., Zhang, Z., Li, S., Yan, Z., 2015. Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants. Sci. Total Environ. 511, 54–62.

Liu, J., Wang, R., Huang, B., Lin, C., Wang, Y., Pan, X., 2011. Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China. Environ. Pollut. 159, 2815–2822.

López-Roldán, R., de Alda, M.L., Gros, M., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D., 2010. Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry. Chemosphere 80, 1337–1344.

López-serna, R., Jurado, A., Vázquez-suñé, E., Carrera, J., Petrovi, M., 2013. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona , Spain. Environ. Pollut. 174, 305–315.

López-Serna, R., Petrovi, M., Barceló, D., 2012. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). Sci. Total Environ. 440, 280–289.

López-Serna, R., Petrović, M., Barceló, D., 2011. Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)-tandem mass spectrometry (MS/MS). Chemosphere 85, 1390–1399.

Lopez, B., Ollivier, P., Togola, A., Baran, N., Ghestem, J., 2015. Science of the Total Environment Screening of French groundwater for regulated and emerging contaminants 519, 562–573.

Lu, M., Chen, Y.Y., Chiou, M., Chen, M.Y., Fan, H., 2016. Occurrence and treatment efficiency of pharmaceuticals in landfill leachates. Waste Manag. 55, 257–264.

Lüllmann, H., Mohr, K., Duval, D., & Wirth, J., 2003. Atlas de poche de pharmacologie, 3e édition. ed.

Lavoisier-Médecine sciences.

Madikizela, L., Chimuka, L., 2017. Simultaneous determination of naproxen , ibuprofen and diclofenac in wastewater using solid-phase extraction with high performance liquid chromatography. Water SA 43, 264–274.

Madikizela, L., Tavengwa, N., Chimuka, L., 2017. Status of pharmaceuticals in African water bodies: Occurrence, removal and analytical methods. J. Environ. Manage. 193, 211–220.

Madikizela, L.M., Chimuka, L., 2016. Determination of ibuprofen, naproxen and diclofenac in aqueous samples using a multi-template molecularly imprinted polymer as selective adsorbent for solid-phase extraction. J. Pharm. Biomed. Anal. 128, 210–215.

Madureira, T.V., Barreiro, J.C., Rocha, M.J., Rocha, E., Cass, Q.B., Tiritan, M.E., 2010. Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). Sci. Total Environ. 408, 5513–5520.

Margot, J., Magnet, A., Thonney, D., Chèvre, N., Alencastro, F., Rossi, L., 2011. Traitement des micropolluants dans les eaux usées - Rapport final sur les essais pilotes à la STEP de Vidy (Lausanne). Ed. Ville de Lausanne.

Margot, J., Rossi, L., Barry, D.A., Holliger, C., 2015. A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants. WIREs Water.

Martínez Bueno, M.J., Boillot, C., Munaron, D., Fenet, H., Casellas, C., Gómez, E., 2014. Occurrence of venlafaxine residues and its metabolites in marine mussels at trace levels: Development of analytical method and a monitoring program. Anal. Bioanal. Chem. 406, 601–610.

Maruya, K.A., Vidal-Dorsch, D.E., Bay, S.M., Kwon, J.W., Xia, K., Armbrust, K.L., 2012. Organic contaminants of emerging concern in sediments and flatfish collected near outfalls discharging treated wastewater effluent to the Southern California Bight. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 2683–2688.

Matongo, S., Birungi, G., Moodley, B., Ndungu, P., 2015a. Occurrence of selected pharmaceuticals in water and sediment of Umgeni River, KwaZulu-Natal, South Africa. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 10298–10308.

Matongo, S., Birungi, G., Moodley, B., Ndungu, P., 2015b. Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi River, KwaZulu-Natal, South Africa. Chemosphere 134, 133–140.

Mayoudom, E., Nguidjoe, E., Mballa, R., Tankoua, O., Fokunang, C., Anyakora, C., Blackett, K., 2018. Identification and quantification of 19 pharmaceutical active compounds and metabolites in hospital wastewater in Cameroon using LC / QQQ and LC / Q-TOF. Env. Monit Assess 1–10.

Meffe, R., Bustamante, I., 2014. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater : A fi rst overview of the situation in Italy. Sci. Total Environ. 481, 280–295.

Menet, M.C., 2011. Principes de la spectrométrie de masse. Rev. Francoph. des Lab. 2011, 41–53.

Meredith-Williams, M., Carter, L.J., Fussell, R., Raffaelli, D., Ashauer, R., Boxall, A.B.A., 2012. Uptake

and depuration of pharmaceuticals in aquatic invertebrates. Environ. Pollut. 165, 250–258.

Metcalfe, C.D., Chu, S., Judt, C., Li, H., Oakes, K.D., Servos, M.R., Andrews, D.M., 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. Environ. Toxicol. Chem. 29, 79–89.

Mokh, S., El Khatib, M., Koubar, M., Daher, Z., Al Iskandarani, M., 2017. Innovative SPE-LC-MS/MS technique for the assessment of 63 pharmaceuticals and the detection of antibiotic-resistant-bacteria: A case study natural water sources in Lebanon. Sci. Total Environ. 609, 830–841.

Morasch, B., 2013. Occurrence and dynamics of micropollutants in a karst aquifer. Environ. Pollut. 173, 133–137.

Moreno-González, R., Rodriguez-Mozaz, S., Gros, M., Barceló, D., León, V.M., 2015. Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (SE Spain). Environ. Res. 138, 326–344.

Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Huerta, B., Barceló, D., León, V.M., 2016. Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon? Environ. Res. 146, 282–298.

Musson, S.E., Townsend, T.G., 2009. Pharmaceutical compound content of municipal solid waste. J. Hazard. Mater. 162, 730–735.

Na, G., Fang, X., Cai, Y., Ge, L., Zong, H., Yuan, X., Yao, Z., Zhang, Z., 2013. Occurrence, distribution, and bioaccumulation of antibiotics in coastal environment of Dalian, China. Mar. Pollut. Bull. 69, 233–237.

Nakada, N., Komori, K., Suzuki, Y., Konishi, C., Houwa, I., Tanaka, H., 2007. Occurrence of 70 pharmaceutical and personal care products in Tone River basin in Japan. Water Sci. Technol. 56, 133–140.

Ngumba, E., Gachanja, A., Tuhkanen, T., 2016. Occurrence of selected antibiotics and antiretroviral drugs in Nairobi River Basin , Kenya. Sci. Total Environ. 539, 206–213.

Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. Anal. Bioanal. Chem. 387, 1225–1234.

OECD, 2008. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes. OECD Guidel. 315.

Oliveira, T.S., Murphy, M., Mendola, N., Wong, V., Carlson, D., Waring, L., 2015. Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. Sci. Total Environ. 518–519, 459–478.

Onesios, K.M., Yu, J.T., Bouwer, E.J., 2009. Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: A review. Biodegradation 20, 441–466.

Osorio, V., Imbert-Bouchard, M., Zonja, B., Abad, J.L., Pérez, S., Barceló, D., 2014. Simultaneous determination of diclofenac, its human metabolites and microbial nitration/nitrosation

transformation products in wastewaters by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1347, 63–71.

Östman, M., Fick, J., Näsström, E., Lindberg, R.H., 2014. A snapshot of illicit drug use in Sweden acquired through sewage water analysis. Sci. Total Environ. 472, 862–871.

Paíga, P., Correia, M., Fernandes, M., Silva, A., Carvalho, M., Vieira, J., Jorge, S., Silva, J., Freire, C., Delerue-Matos, C., 2019. Assessment of 83 pharmaceuticals in WWTP in fl uent and ef fl uent samples by UHPLC-MS/MS : Hourly variation. Sci. Total Environ. 648, 582–600.

Parkinson, A., 1995. Biotransformation of xenobiotics, in: Klaassen CD (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology. McGraw-Hill, New York, pp. 113–186.

Pazdro, K., Borecka, M., Siedlewicz, G., Bia.k-Bieli.ska, A., Stepnowski, P., 2015. Analysis of the Residues of Pharmaceuticals in Marine Environment: State-of-the-art, Analytical Problems and Challenges. Curr. Anal. Chem. 12, 202–226.

Peng, X., Ou, W., Wang, C., Wang, Z., Huang, Q., Jin, J., Tan, J., 2014. Occurrence and ecological potential of pharmaceuticals and personal care products in groundwater and reservoirs in the vicinity of municipal land fi lls in China. Sci. Total Environ. 490, 889–898.

Peng, X., Yu, Y., Tang, C., Tan, J., Huang, Q., Wang, Z., 2008. Occurrence of steroid estrogens , endocrine-disrupting phenols , and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta , South China. Sci. Total Environ. 397, 158–166.

Petrie, B., Proctor, K., Youdan, J., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2017. Critical evaluation of monitoring strategy for the multi-residue determination of 90 chiral and achiral micropollutants in ef fl uent wastewater. Sci. Total Environ. 579, 569–578.

Pugajeva, I., Rusko, J., Perkons, I., Lundanes, E., Bartkevics, V., 2017. Determination of pharmaceutical residues in wastewater using high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 133, 64–74.

Radjenovic, J., Petrovic, M., Barceló, D., 2007. Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. Anal. Bioanal. Chem. 387, 1365–1377.

Radović, T., Grujić, S., Petković, A., Dimkić, M., Laušević, M., 2015. Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia. Env. Monit Assess 187, 1–17.

Ramirez, A.J., Brain, R.A., Usenko, S., Mottaleb, M. a., O'Donnell, J.G., Stahl, L.L., Wathen, J.B., Snyder, B.D., Pitt, Jennifer, L., Perez-Hurtado, P., Dobbins, L.L., Brooks, B.W.B.W., Chambliss, C.K.K., 2009. Occurrence of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Fish: Results of a National Pilot Study in the United States. Environ. Toxicol. Chem. 28, 2587–2597.

Ramirez, A.J., Mottaleb, M.A., Brooks, B.W., Chambliss, C.K., 2007. Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal. Chem. 79, 3155–3163.

Remucal, C.K., 2014. The role of indirect photochemical degradation in the environmental fate of pesticides : a review. Environ. Sci. Process. Impacts 16, 628–653.

Rivera-Jaimes, J., Postigo, C., Melgoza-Alemán, R., Aceña, J., Barceló, D., López de Alda, M., 2018. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca , Morelos , Mexico : Occurrence and environmental risk assessment. Sci. Total Environ. 613–614, 1263–1274.

Schaider, L.A., Rudel, R.A., Ackerman, J.M., Dunagan, S.C., Brody, J.G., 2014. Pharmaceuticals , perfluorosurfactants , and other organic wastewater compounds in public drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. Sci. Total Environ. 468–469, 384–393.

Schlüsener, M.P., Hardenbicker, P., Nilson, E., Schulz, M., Viergutz, C., Ternes, T.A., 2015. Occurrence of venlafaxine, other antidepressants and selected metabolites in the Rhine catchment in the face of climate change. Environ. Pollut. 196, 247–256.

Schultz, M.M., Furlong, E.T., 2008. Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Environmental Matrices by LC / ESI / MS / MS a) b. Anal. Chem. 80, 1756–1762.

Schultz, M.M., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Werner, S.L., Schoenfuss, H., Barber, L., Blazer, V., Norris, D., Vajda, A., 2010. Antidepressant Pharmaceuticals in Two U . S . Effluent-Impacted Streams : Occurrence and Fate in Water and Sediment , and Selective Uptake in Fish Neural Tissue. Environ. Sci. Technol 44, 1918–1925.

Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ru, M., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. Environ. Sci. Technol. 48, 2097–2098.

Segura, P.A., Takada, H., Correa, J.A., El Saadi, K., Koike, T., Onwona-Agyeman, S., Ofosu-Anim, J., Sabi, E.B., Wasonga, O. V., Mghalu, J.M., dos Santos, A.M., Newman, B., Weerts, S., Yargeau, V., 2015. Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters: Impact of income inequality between countries. Environ. Int. 80, 89–97.

Serra-Compte, A., Maulvault, A.L., Camacho, C., Álvarez-Muñoz, D., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Marques, A., 2018. Effects of water warming and acidification on bioconcentration, metabolization and depuration of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in marine mussels (Mytilus galloprovincialis). Environ. Pollut. 236, 824–834.

Sharma, B.M., Bečanová, J., Scheringer, M., Sharma, A., Bharat, G.K., Whitehead, P.G., Klánová, J., Nizzetto, L., 2019. Health and ecological risk assessment of emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, and artificial sweeteners) in surface and groundwater (drinking water) in the Ganges River Basin, India. Sci. Total Environ. 646, 1459–1467.

Shraim, A., Diab, A., Alsuhaimi, A., Niazy, E., Metwally, M., Amad, M., Sioud, S., Dawoud, A., 2017. Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. Arab. J. Chem. 10, S719–S729.

Skees, A.J., Foppe, K.S., Loganathan, B., Subedi, B., 2018. Contamination profiles, mass loadings, and sewage epidemiology of neuropsychiatric and illicit drugs in wastewater and river waters from a community in the Midwestern United States. Sci. Total Environ. 631–632, 1457–1464.

Stempvoort, D.R. Van, Roy, J.W., Grabuski, J., Brown, S.J., Bickerton, G., Sverko, E., 2013. An artificial sweetener and pharmaceutical compounds as co-tracers of urban wastewater in groundwater. Sci. Total Environ. 461–462, 348–359.

Subedi, B., Balakrishna, K., Joshua, D.I., Kannan, K., 2017. Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products including psychoactives, antihypertensives, and antibiotics in two sewage treatment plants in southern India. Chemosphere 167, 429–437.

Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., Yu, G., 2015. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. Emerg. Contam. 1, 14–24.

Ternes, T., 1998. Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. Water Res. 32, 3245–3260.

Togola, A., Budzinski, H., 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. J. Chromatogr. A 1177, 150–158.

Tollier, C., Fusier, I., Husson, M., 2005. Classifications ATC et EphMRA : évolution entre 1996 et 2003 et analyse comparative. Therapie 60, 47–56.

Tong, L., Huang, S., Wang, Y., Liu, H., Li, M., 2014. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of Jianghan Plain , central China. Sci. Total Environ. 497–498, 180–187.

Tran, N., Reinhard, M., Gin, K., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. Water Res. 133, 182–207.

Tran, N.H., Li, J., Hu, J., Ong, S.L., 2014. Occurrence and suitability of pharmaceuticals and personal care products as molecular markers for raw wastewater contamination in surface water and groundwater. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 4727–4740.

Vazquez-Roig, P., Andreu, V., Onghena, M., Blasco, C., Picó, Y., 2011. Assessment of the occurrence and distribution of pharmaceuticals in a Mediterranean wetland (L'Albufera, Valencia, Spain) by LC-MS/MS. Anal Bioanal Chem 400, 1287–1301.

VIDAL France, 2019. VIDAL - Liste des médicaments indexés par substance active [WWW Document]. List. des Medicam. indexes par subtance Act. URL https://www.vidal.fr/Sommaires/Substances/ (accessed 1.19.19).

Wang, C., Hou, L., Li, J., Xu, Z., Gao, T., Yang, J., Zhang, H., Li, X., Du, P., 2017. Occurrence of diazepam and its metabolites in wastewater and surface waters in Beijing. Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 15379–15389.

Wang, J., Hu, J., Zhang, S., 2010. Studies on the sorption of tetracycline onto clays and marine sediment from seawater. J. Colloid Interface Sci. 349, 578–582.

Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., Hühnerfuss, H., 2004. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. Chemosphere 56, 583–592.

WHO, 2018. WHOCC - ATC/DDD Index [WWW Document]. Collab. Cent. Drug Stat. Methodol. URL https://www.whocc.no/atc_ddd_index/ (accessed 1.19.19).

WHO, 2013. WHO | National Medicines List/Formulary/Standard Treatment Guidelines [WWW Document]. Natl. Med. List. URL https://www.who.int/selection_medicines/country_lists/en/ (accessed 1.19.19).

Wille, K., Kiebooms, J.A.L., Claessens, M., Rappé, K., Vanden Bussche, J., Noppe, H., Van Praet, N., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., De Brabander, H.F., Vanhaecke, L., 2011. Development of analytical strategies using U-HPLC-MS/MS and LC-ToF-MS for the quantification of micropollutants in marine organisms. Anal. Bioanal. Chem. 400, 1459–1472.

Wolf, S., Schmidt, S., Müller-Hannemann, M., Neumann, S., 2010. In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. BMC Bioinformatics 11.

Writer, J.H., Ferrer, I., Barber, L.B., Thurman, E.M., 2013. Widespread occurrence of neuro-active pharmaceuticals and metabolites in 24 Minnesota rivers and wastewaters. Sci. Total Environ. 461–462, 519–527.

Wu, M., Xiang, J., Que, C., Chen, F., Xu, G., 2015. Occurrence and fate of psychiatric pharmaceuticals in the urban water system of Shanghai, China. Chemosphere 138, 486–493.

Xie, H., Hao, H., Xu, N., Liang, X., Gao, D., Xu, Y., Gao, Y., Tao, H., Wong, M., 2019. Pharmaceuticals and personal care products in water, sediments, aquatic organisms, and fish feeds in the Pearl River Delta: Occurrence, distribution, potential sources, and health risk assessment. Sci. Total Environ. 659, 230–239.

Yang, Y., Fu, J., Peng, H., Hou, L., Liu, M., Zhou, J.L., 2011. Occurrence and phase distribution of selected pharmaceuticals in the Yangtze Estuary and its coastal zone. J. Hazard. Mater. 190, 588–596.

Yang, Y., Sik, Y., Kim, K., Kwon, E.E., Fai, Y., 2017. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. Sci. Total Environ. 596–597, 303–320.

Yoon, Y., Ryu, J., Oh, J., Choi, B.G., Snyder, S.A., 2010. Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). Sci. Total Environ. 408, 636–643. 9

Yu, J.T., Bouwer, E.J., Coelhan, M., 2006. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. Agric. Water Manag. 86, 72–80.

Zhang, S., Zhang, Q., Darisaw, S., Ehie, O., Wang, G., 2007. Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water , in New Orleans , Louisiana , USA. Chemosphere 66, 1057–1069.

Zhang, Y., Wang, B., Cagnetta, G., Duan, L., Yang, J., Deng, S., Huang, J., Wang, Y., Yu, G., 2018. Typical pharmaceuticals in major WWTPs in Beijing , China : Occurrence , load pattern and

calculation reliability. Water Res. 140, 291–300.

Zonja, B., Perez, S., Barcelo, D., 2015. The human metabolite lamotrigine-N2-glucuronide is the principal source of lamotrigine-derived compounds in the WWTPs and surface water. Environ. Sci. Technol. 50, acs.est.5b03691.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Melis, M., Fanelli, R., 2010. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. J. Hazard. Mater. 179, 1042–1048.