

Recherche de nouveaux contaminants le long de l'axe Seine, intérêt et mise au point des protocoles d'analyse : cas du métaldéhyde, de la metformine et des traitements potentiels à la Covid-19

Hélène Blanchoud^{1*} et Thomas Thiebault^{1*}, Fabrice Alliot¹, Sira Traoré¹, Vivien Raymond², Alexandre Bourdet², Gabriela Bernicard², Nils Fauchon²

¹ EPHE, PSL Research University, UMR METIS 7619 (SU/CNRS/EPHE), Paris

² Veolia Eau d'Ile-de-France DACE - Service Etudes, Recherche & Développement Protection de la ressource, Nanterre

* helene.blanchoud@ephe.psl.eu, * thomas.thiebault@ephe.psl.eu

Résumé

Dans le cadre de l'action « Recherche de nouveaux contaminants le long de l'axe Seine », nous avons procédé durant cette première année ; (i) au développement analytique visant à optimiser l'analyse de la metformine et du métaldéhyde, (ii) à l'implémentation de traitements potentiels à la Covid-19 dans le protocole d'analyse de routine pour le suivi de la contamination des eaux de surface et (iii) aux premières analyses des échantillons fournis par le SEDIF dans le cadre d'un suivi de la qualité des prises d'eau durant le confinement. L'addition de ces nouveaux contaminants au sein du protocole de quantification de la contamination des eaux de surface permettra d'évaluer les concentrations de ces molécules dans différentes actions de suivi menées dans le cadre du PIREN-Seine. La nécessité de développer des protocoles adaptés et spécifiques limite l'analyse de routine de ces molécules, et ce suivi apportera donc des informations précieuses sur le devenir de ces contaminants dans les cours d'eau franciliens.

Points clefs

- ✓ *Développement et validation des protocoles analytiques permettant la quantification de la metformine et du métaldéhyde dans les eaux de surface*
- ✓ *Implémentation de molécules testées pour l'accompagnement des patients atteints de la Covid-19 dans le protocole d'analyse multi-contaminants de routine*
- ✓ *Premières analyses des niveaux de contamination des eaux de surface des cours d'eau parisiens durant le confinement*

Abstract

This first year we realized; (i) an analytical development aiming to optimize the analytical protocol of metformin and metaldehyde, (ii) the implementation of potential Covid-19 medical treatments in the routine analysis protocol for the monitoring of surface waters contamination and (iii) the first analyses of the samples providing by the SEDIF as part of a monitoring of the chemical quality of the water supply of various drinking water treatment plants during the sanitary confinement. The addition of these new contaminants within the quantification protocol of the surface water contamination will allow to assess the occurrences of these molecules during various monitoring actions carried out in the frame of PIREN-Seine. The requirement of adapted and specific protocols hinder the routine analysis of these molecules, and this monitoring therefore bring valuable information on the fate of these contaminants within various water courses in the Paris region.

Key points

- ✓ Development and validation of analytical protocols allowing the quantification of metformine and metaldehyde in surface waters
- ✓ Implementation in the routine analytical protocol of several molecules, currently tested for the treatment of patients with Covid-19
- ✓ First analyses of the contamination levels of Parisian surface water during the sanitary confinement

1. Introduction

La contamination de la Seine et ses affluents par les micropolluants est toujours préoccupante. Les thèses menées sur le bassin versant au cours des précédentes phases du PIREN-Seine ont permis de mettre en évidence la contamination par de nombreux xénobiotiques et de mieux comprendre leur dynamique de transfert comme pour les HAPs (Gateuille, 2013), les pesticides (Botta, 2008), les antibiotiques (Tamtam, 2008 ; Dinh 2012), les phtalates (Dargnat, 2008) ou encore les polybromés (Tlili, 2011). En fonction des sources de contamination et des propriétés de ces molécules, il a été possible d'évaluer le risque de transfert vers le milieu naturel et les principales voies d'exposition des écosystèmes aquatiques et de l'Homme. Par ailleurs, différentes actions de modélisation ont été engagées avec les hydrogéologues et modélisateurs du PIREN-Seine pour simuler les transferts de pesticides sur le long terme (Queyrel, 2014).

Des nouveaux polluants émergents sont régulièrement rajoutés à la liste de surveillance en fonction des nouveaux matériaux synthétisés comme les chloroalcanes (Labadie *et al.*, 2017), les perfluorés (Labadie & Chevreuil, 2011), etc. Toutes ces nouvelles recherches permettent d'aborder la contamination globale de l'écosystème Seine.

La tendance actuelle est de privilégier les méthodes multi-résidus pour limiter le coût analytique du suivi de la qualité des masses d'eau. Ainsi, avec la MRM en mode dynamique, il est maintenant possible de rechercher plus de 300 substances dans un échantillon d'eau en une analyse de 13 min (Jadhav *et al.*, 2019). Cependant, d'anciennes substances nécessitant un développement analytique particulier présentent un intérêt émergent, soit parce que leur usage augmente, soit parce que leur présence reste difficile à expliquer. C'est le cas notamment du métaldéhyde et de la metformine qui feront l'objet d'un intérêt particulier dans cette phase du PIREN-Seine.

2. Nécessité de nouveaux développements analytiques

Les contaminants ci-après étudiés correspondent bien à la dénomination « émergente » telle qu'on l'entend en géochimie environnementale. En effet, ceux-ci sont mis sur le marché depuis longtemps, par exemple en 1936 pour le métaldéhyde, et pourtant la prise de conscience de niveaux de contamination significatifs des masses d'eau n'est que très récente. De même, la metformine utilisée pour le traitement du diabète de type II voit sa consommation augmenter en France en lien avec l'augmentation du nombre de cas. Par ailleurs, la crise sanitaire inédite cette année pose question quant aux possibilités de rejets d'antiviraux et autres traitements expérimentés (notamment antibiotiques) sur les patients atteints de Covid-19. Ceux-ci pourraient générer une antibiorésistance dans le milieu naturel et provoquer à terme l'inefficacité des traitements. Aussi, seront tout d'abord présentés ci-après ces molécules particulières (Tableau 1) ainsi que leurs éventuelles spécificités générant la nécessité de développer des protocoles analytiques dédiés.

Tableau 1. Principales propriétés physico-chimiques des contaminants d'intérêt, avec Ab. l'abréviation, M le poids moléculaire, Sol_{eau} la solubilité dans l'eau à 25°C. Les données de pKa (constante d'acidité) issues de drugbank.ca, les données de Kow (coefficient de partage octanol/eau), K_{OC} (coefficient de partage avec le carbone organique) de chemspider.com, NA pour non disponible.

Usage	Famille	Molécule	Ab.	Formule chimique	M g.mol ⁻¹	pKa	LogK _{ow}	LogK _{OC}	Sol _{eau} mg L ⁻¹
Antibiotique	β-lactamines	Ampicilline	AMP	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	349,4	7,3	1,4	2,7	439
		Tazobactam	TZB	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅ S	300,3	2,1	-1,7	1,7	1769
	Macrolide	Azithromycine	AZM	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	749,0	8,5	3,0	3,5	3
	Urédopénicilline	Pipéracilline	PIP	C ₂₃ H ₂₇ N ₅ O ₇ S	517,5	4,1	0,3	NA	120
Anti-inflamm.	Glucocorticoïde	Prednisolone	PRE	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360,4	12,6	1,6	1,5	221
Antipaludéen	4-aminoquinoléine	Chloroquine	CHL	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃	319,9	10,1	4,6	5,8	10,6
		Hydroxychloroquine	HCH	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O	335,9	9,7	3,0	4,5	198
Antirétroviral	Inh. de protéase	Lopinavir	LOP	C ₃₇ H ₄₈ N ₄ O ₅	628,8	13,4	5,9	NA	0,8
		Ritonavir	RIT	C ₃₇ H ₄₈ N ₆ O ₅ S ₂	720,9	13,7	5,2	NA	1
Antidiabétique	Biguanide	Metformine	MTF	C ₄ H ₁₁ N ₅	129,2	12,4	-1,4	2,1	>10 ⁶
		Guanyl-urée*	GUA	C ₂ H ₆ N ₄ O	102,1	10,3	-3,6	2,0	>10 ⁶
Molluscicide	Cyclo-octane	Métaldéhyde	MTH	C ₈ H ₁₆ O ₄	176,2	-	0,85	1,0	1076

2.1. Le métaldéhyde

Le métaldéhyde (Figure 1) est un molluscicide utilisé depuis 1936 pour la protection des cultures telles que les céréales, le colza et les pommes de terre (Castle *et al.*, 2017). C'est une molécule aux propriétés physico-chimiques originales. En effet, c'est un composé très soluble et polaire (Tableau 1), qui présente très peu d'affinités pour les surfaces organiques et inorganiques, et qui est donc très mobile dans les sols puis dans les environnements aquatiques. C'est également un composé peu sensible à la photolyse et à l'hydrolyse, et qui présente un temps de demi-vie de 67 jours, illustrant sa rémanence.

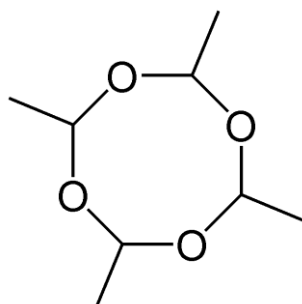


Figure 1. Formule développée du métaldéhyde

Présentant un point de fusion à 47°C, cette molécule était originalement utilisée comme combustible pour les réchauds portatifs, usage désormais très limité au profit de son utilisation pour la protection des cultures. Sa période d'application sur culture est généralement entre la fin de l'automne et le début de l'hiver. Sa détection dans la Marne à Charenton-le-Pont est en cohérence avec la période d'application, montrant notamment des pics de contamination en période automnale (Figure 2). Cependant, des usages peuvent également se produire au printemps au cours des années particulièrement humides. C'est le cas de ceux réalisés par les particuliers et jardiniers amateurs dont la consommation d'antimousses pouvait être conséquente avant la mise en place de la loi Labbé en 2014 interdisant les produits phytosanitaires (hors produit de biocontrôle) en zone non agricole.

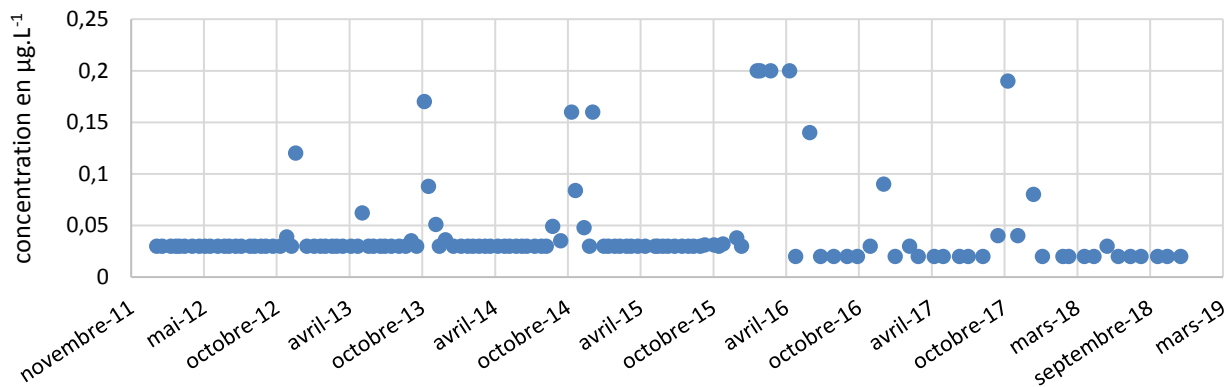


Figure 2. Evolution de la contamination par le métaldéhyde dans la Marne à Charenton-le-Pont entre 2011 et 2018. Les limites de quantification sont de 0,03 de 2011 à 2015 et de 0,02 à partir de 2016 (source Naiades, 2020).

Au-delà de son effet sur les mollusques, cette molécule présente également une toxicité significative pour les mammifères, qui peuvent consommer involontairement les granulés ou ingérer le principe actif par la consommation de mollusques contaminés (Gupta, 2012).

Par exemple, la dose létale chez le chien est estimée autour de 100 mg.kg⁻¹ (Dolder, 2003), alors que la concentration en métaldéhyde des granulés est généralement comprise entre 3 et 6%. Concernant l'Homme, la toxicité est considérée comme modérée (cette substance est classée en classe 2 par l'OMS), quelques cas d'intoxication pour des expositions inférieures à 100 mg.kg⁻¹ (Ellenhorn and Barceloux, 1997), voire des décès en cas d'ingestion > à 400mg.kg⁻¹, ont été observés (Thompson *et al.*, 1995). Dans les milieux aquatiques la NQE est de 60,6 µg.L⁻¹ les essais récents menés sur et certains gastéropodes et bivalves n'ont toutefois pas montré d'effet significatif à des concentrations environnementales (Gething *et al.*, 2020).

L'intérêt pour cette molécule dans les analyses environnementales est assez récent. Ainsi la première étude démontrant la présence de métaldéhyde en eau de rivière date de moins de dix ans (Gillman *et al.*, 2012; <http://www.naiades.eafrance.fr>). Plusieurs études se sont succédées, notamment dans les eaux de surface au Royaume-Uni, démontrant la présence de ce composé à des concentrations supérieures à 100 ng.L⁻¹ durant la période d'application du produit (Castle *et al.*, 2018; Kay and Grayson, 2014; Lu *et al.*, 2017), voire supérieures au µg.L⁻¹ dans certains contextes particuliers (Lazartigues *et al.*, 2012). Ce composé étant particulièrement hydrophile et résistant, il pose un problème important pour le traitement de l'eau, notamment potable, les traitements aux charbons actifs n'étant que moyennement efficaces pour abattre les concentrations en ce composé. Au Royaume Uni en 2010, des concentrations de l'ordre de 1 µg.L⁻¹ dans l'eau traitée ont été relevées (Tao et Fletcher, 2016) et une alternative de traitement par transformation en acétaldéhyde puis fixation sur résine échangeuse d'ion est étudiée. D'autres alternatives sont également à l'étude au Royaume Uni afin de limiter l'utilisation de métaldéhyde, cet usage présentant le risque le plus important de non-conformité dans 102 bassins d'alimentation de captage (Mohamad Ibrahim *et al.*, 2020).

Cette molécule pose donc question sur les possibilités de transfert vers les cours d'eau et sa détection dans les matrices environnementales à des limites de contamination acceptables relève encore aujourd'hui du défi analytique.

2.2. La metformine

La metformine est une molécule utilisée chez les patients atteints de diabète de type II, consommée seule ou en association avec des gliptines ou des sulfamides. C'est actuellement le composé pour lequel le tonnage vendu annuellement en France est le second, derrière le paracétamol, ceci s'expliquant à la fois par la bonne tolérance et le coût modéré de ce traitement, par la forte augmentation des cas de diabètes de type II depuis les 30 dernières années, ainsi que la dose journalière assez élevée utilisée, en moyenne 2 grammes, consommée de manière chronique. A titre d'exemple, pour l'année 2019, plus de 26 millions de boîte de 30 comprimés de metformine ont été remboursées en France (pour un montant de 98 millions d'euros) pour des dosages allant de 500 à 1000 mg de principe actif (SNDS, 2020).

La prise de conscience de la contamination des milieux aquatiques par la metformine date d'une vingtaine d'année avec le premier article scientifique sur le sujet publié par Kolpin *et al.* (2002). La concentration des eaux de surface en metformine est mesurée depuis 2016 dans les suivis de la qualité des eaux de surface françaises (naiades.eaufrance.fr). Toutefois, son seuil de quantification est de 1 µg.L⁻¹, soit une concentration assez élevée pour la mesure d'un contaminant présent à l'état de trace dans les eaux de surface. A titre d'exemple, cette molécule n'a par exemple jamais été détectée dans la Seine, au niveau du pont de Bercy. Cette absence de protocole optimisé se retrouve également dans la littérature scientifique (e.g. Kong *et al.*, 2015; Papageorgiou *et al.*, 2019). Or, cette molécule est très polaire : l'extraction et analyse en phase inverse, classiquement utilisée pour les suivis de produits pharmaceutiques dans les eaux, ne sont donc pas très adaptées pour sa quantification. L'utilisation, pour l'extraction en phase solide, de phase hydrophile/lipophile ne permet pas d'avoir des coefficients de récupération importants de la molécule (<5%, Kosma *et al.*, 2015), et l'utilisation de colonnes chromatographiques avec des phases modérément polaires et d'un mélange de solvant composé majoritairement d'eau en début d'analyse, interdisent une quelconque rétention de la molécule, qui est donc éluée de la colonne juste après le volume mort.

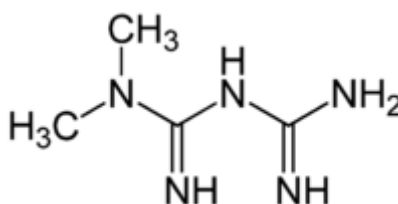


Figure 3. Formule développée de la metformine

Or, la molécule de metformine étant de poids moléculaire très modeste en comparaison aux autres produits pharmaceutiques (Tableau 1, Figure 3), la non-rétention de celle-ci sur la colonne enlève un élément important de la spécificité de son identification, le temps de rétention. Si les transitions MRM sont censées être spécifiques à une molécule donnée, la présence d'un pic chromatographique large de sortie de colonne, notamment après l'analyse de matrices naturelles, fait douter des résultats ainsi produits, et de la précision de la quantification.

A ce sujet, de nombreuses études déterminent des concentrations très élevées de metformine sans utiliser de protocole adapté (e.g. Shraim *et al.*, 2017). Sans remettre en cause le sérieux de ces études, plusieurs auteurs ont révélé la nécessité d'adapter un protocole pour l'analyse de ce produit dans les matrices naturelles (Boulard *et al.*, 2019; Scheurer *et al.*, 2009; van Nuijs *et al.*, 2010), remettant en question ces premiers résultats avec notamment la probabilité très élevée de co-élution et/ou de faux positifs en matrice.

Il faut tout de même préciser que les concentrations très élevées relevées en metformine dans certains contextes, tels les eaux usées brutes par exemple (Oosterhuis *et al.*, 2013), ne sont pas une anomalie étant donné son utilisation très importante et son ratio d'excrétion proche de 100% (Pentikäinen *et al.*, 1979). C'est pourquoi, dans ce rapport, seront présentés les tests préliminaires permettant d'optimiser la quantification de la metformine dans les solutions aqueuses, ainsi que son principal produit de dégradation, la guanylurée (Tisler and Zwiener, 2018).

2.3. Antibiotiques, antiviraux et autres produits pharmaceutiques

Dans le contexte associé à la pandémie mondiale de Covid-19, de nombreux médicaments, dont certains utilisés depuis 40 ans, ont été testés de manière plus ou moins coordonnée afin d'évaluer leur effet sur les patients atteints de formes symptomatiques et/ou graves du virus. Parmi ces médicaments, nombre d'entre eux ne sont généralement pas ou peu implémentés dans les suivis de la qualité chimique des masses d'eau, car représentant un usage peu significatif (antirétroviraux) ou assez exotique par rapport aux problématiques de santé de l'Europe continentale (antipaludéens), ou étant de manière générale considérés comme peu rémanents dans les environnements aquatiques (β -lactamines). A titre d'exemple, la très médiatisée hydroxychloroquine a connu durant les mois de mars et avril une anomalie positive de personnes traitées de l'ordre de 41 000 sur le territoire national (Weill *et al.*, 2020).

A l'inverse, cette période particulière a également entraîné une baisse générale des volumes de médicaments prescrits, comme certains antibiotiques, mais aussi les anti-inflammatoires non stéroïdiens, avec par exemple une baisse très significative, de l'ordre de 80%, des quantités prescrites d'ibuprofène au profit du paracétamol (+ 400 000 personnes traitées/jour) durant le mois de mars (Weill *et al.*, 2020).

Aussi, durant cette période charnière, il est apparu opportun d'implémenter dans le protocole d'analyse de la contamination des eaux, en supplément des molécules généralement suivies, les traitements proposés en accompagnement pour les personnes touchées par le virus. Parmi ceux-ci figurent notamment l'hydroxychloroquine et la chloroquine (antipaludéen), le ritonavir et le lopinavir (antirétroviraux), le tazobactam, la pipéracilline, l'ampicilline et l'azithromycine (antibiotiques) ou encore la prednisolone (anti-inflammatoire stéroïdien). Pour la plupart de ces molécules, peu de données sont présentes dans la littérature, notamment sur leur devenir depuis leur excrétion jusque dans les environnements aquatiques ainsi que sur la contamination des eaux de surface qu'elles sont susceptibles de générer.

3. Résultats préliminaires

3.1. Implémentation dans le protocole de routine de suivi multi-contaminants

Dans un premier temps, les nouvelles substances à analyser ont été ajoutées au protocole analytique multi-contaminants, réalisé en routine. Ce dernier est un protocole assez classique (les deux solvants utilisés sont de l'acétonitrile (AcN) à 0,1% d'acide formique et de l'eau Milli-Q (EMQ) à 0,1% d'acide formique) pour les contaminants organiques de polarité moyenne, permettant une bonne résolution analytique pour plus d'une cinquantaine de molécules. Les paramètres de quantification en MRM sont indiqués Tableau 2. Ces paramètres (notamment les transitions de quantification et de qualification) ont été optimisés pour chaque composé. A l'exception de la metformine, on observe une rétention chromatographique pour les autres molécules, indiquant que la colonne utilisée (i.e. Nucleoshell biphényl, Macherey Nagel) est adaptée à leur analyse.

L'extraction en phase solide (SPE) est réalisée sur des cartouches HLB-Chromabond (Macherey-Nagel), qui présentent une polarité intermédiaire et permettent théoriquement une bonne récupération des composés à la fois hydrophiles et hydrophobes. L'extraction est réalisée en phase inverse, avec une phase stationnaire moins polaire que la phase mobile. Brièvement, la phase est conditionnée avec 2 x 5 mL de méthanol (MeOH) puis 2 x 5 mL d'EMQ. Ensuite, 200 mL d'échantillon sont déposés sur la cartouche, avant un rinçage avec 5 mL d'EMQ. Après un séchage sous vide de 30 minutes, l'élution est réalisée avec 2 x 5 mL de MeOH.

Tableau 2. Conditions analytiques optimisées pour les contaminants d'intérêt, avec Stds Int. le standard interne utilisé, MRM_{quanti} la transition de quantification, CE l'énergie de collision, MRM_{qualif} la transition de qualification, Frag le fragmentateur et TR le temps de rétention.

Usage	Molécule	Stds Int.	MRM _{quanti}	CE V	MRM _{qualif}	CE V	Frag V	TR min
Antibiotique	Ampicilline	AMP-d5	350,4 > 160,1	9	350,4 > 114,1	29	100	3,5
	Tazobactam	RIT-d6	301,4 > 168,1	9	301,4 > 74,1	9	100	2,3
	Azithromycine	AZM-d3	750,0 > 116,2	45	750,0 > 591,5	25	160	4,5
	Pipéracilline	RIT-d6	518,5 > 333,1	9	518,5 > 143,0	25	160	5,0
Anti-inflamm.	Prednisolone	RIT-d6	361,4 > 343,2	9	361,4 > 147,1	21	100	4,8
Antipaludéen	Chloroquine	RIT-d6	320,0 > 247,1	17	320,0 > 142,2	21	130	3,0
	Hydroxychloroquine	RIT-d6	336,1 > 247,1	17	336,1 > 158,2	21	130	2,8
Antirétroviral	Lopinavir	RIT-d6	629,8 > 155,1	49	629,8 > 120,1	33	100	6,9
	Ritonavir	RIT-d6	721,9 > 140,1	60	721,9 > 197,1	41	130	6,8
Antidiabétique	Metformine	MTF-d16	130,2 > 60,1	9	130,2 > 71,1	17	70	0,4
Molluscicide	Métaldéhyde	MTH-d16	215,0 > 39,0	9	199,2 > 67,0	9	100	3,2

Des tests sur des matrices variées ont été effectués, mais afin de se rapprocher des matrices environnementales, un test de rendement d'extraction sur des matrices (eau de l'Orgeval) dopées à 500 ng.L⁻¹ a été effectué. Cette évaluation des rendements d'extraction a été réalisée à deux valeurs de pH, 4 et 7, afin de déterminer si l'acidité de l'échantillon avait un impact important sur le taux de récupération des molécules.

Tableau 3. Validation des protocoles d'extraction et de quantification, avec Rdt SPE le rendement d'extraction, LOQ la limite de quantification en ng.L⁻¹.

Usage	Molécule	Rdt SPE (%) pH=7	Rdt SPE (%) pH=4	Linéarité	Gamme	LOQ
Antibiotique	Ampicilline	182 ± 92	391 ± 10	0,997	5-200	103,8
	Tazobactam	2 ± 125	33 ± 9	0,985	5-500	54,0
	Azithromycine	132 ± 8	112 ± 11	0,999	50-500	2,8
	Pipéracilline	41 ± 47	39 ± 62	0,999	50-500	112,5
Anti-inflamm.	Prednisolone	78 ± 6	96 ± 8	0,998	2-500	16,3
Antipaludéen	Chloroquine	93 ± 32	46 ± 4	0,996	5-500	5,4
	Hydroxychloroquine	71 ± 14	83 ± 3	0,994	5-500	5,0
Antirétroviral	Lopinavir	80 ± 17	69 ± 8	0,998	0.5-500	1,0
	Ritonavir	58 ± 9	54 ± 10	0,984	0.5-200	1,7
Antidiabétique	Metformine	32 ± 23	14 ± 21	0,999	5-500	7,5
Molluscicide	Métaldéhyde	x	x	0,119	x	x

Les rendements observés s'échelonnent de 2% pour le tazobactam à pH = 7 à 182% pour l'ampicilline à pH = 7 (Tableau 3). Ces valeurs indiquent que le protocole utilisé n'est pas adapté à l'ensemble des molécules, ou que d'importants effets de matrice se produisent pour l'analyse de certaines d'entre elles. A l'inverse, les rendements des molécules telles que les antipaludéens et les antirétroviraux sont satisfaisants, notamment à pH = 7. De plus, la quantification de ces composés est correcte, avec à la fois une large gamme de linéarité et un facteur de réponse significatif, permettant d'obtenir des limites de quantification inférieures à 5 ng.L⁻¹. A contrario, pour d'autres molécules telles que l'ampicilline ou la pipéracilline, l'étape d'extraction et/ou l'étape de quantification ne donne pas des résultats très satisfaisants, générant des limites de quantifications très élevées autour de la centaine de ng.L⁻¹. Pour le métaldéhyde, les sorties chromatographiques ne permettent pas de montrer une réponse proportionnelle aux concentrations (R² = 0.119) et un développement analytique complémentaire est nécessaire.

En conclusion, l'implémentation directe dans le protocole d'analyse multi-contaminants donne des résultats très satisfaisants pour 6 des 11 composés que nous souhaitons ajouter.

Aucun développement spécifique ne sera réalisé pour optimiser l'analyse de l'ampicilline, le tazobactam et la pipéracilline pour lesquels les résultats devront être pris avec précaution. A l'inverse, les deux molécules identifiées comme cibles prioritaires de l'action, soit la metformine et le métaldéhyde, nécessitent des protocoles dédiés pour différentes raisons. La metformine présente des rendements de récupération limités, du fait de sa forte affinité avec l'eau. Il est donc très probable qu'une partie importante des molécules de metformine ne soit pas retenue sur la phase de SPE lors du passage de l'échantillon.

De plus, la metformine n'est pas retenue par la phase stationnaire de la colonne chromatographique utilisée, et est donc éluée très rapidement, juste après le volume mort de la colonne. Cette absence de rétention fait naître des doutes sur le caractère spécifique de l'analyse. Concernant le métaldéhyde, également très polaire, c'est plutôt la faible stabilité de son analyse qui pose problème. Cette molécule est en effet très sensible au milieu dans lequel elle est injectée, et se complexe avec différents types d'adduits, nuisant très fortement à une bonne réplicabilité de l'analyse.

3.2. Développement analytique spécifique pour la metformine

Comme évoqué précédemment, la metformine est une molécule atypique parmi les produits pharmaceutiques, car elle est petite et très polaire. Comme observé précédemment, l'application d'un protocole standard (hydrophile/hydrophobe) n'est pas adaptée pour ce composé, qui n'est retenu que très faiblement sur la phase d'extraction, et pas du tout sur la colonne chromatographique. Des auteurs ont proposé une légère adaptation du protocole d'extraction, en utilisant un tensioactif anionique, le sodium dodécyl sulfate (SDS) (Kosma *et al.*, 2015).

L'utilisation du SDS, qui va se sorber par interactions hydrophobes sur la phase de SPE, a pour but de libérer des charges négatives (le SDS étant anionique), ce qui devrait permettre de retenir les molécules de metformine, chargées positivement. Ensuite, l'éluion du SDS, faiblement retenu par la phase de SPE, permettrait de concert l'éluion de la metformine.

Bien que séduisante car ne nécessitant pas de développement méthodologique très important, cette technique n'a pas apporté de résultats satisfaisants car la présence de tensioactif en concentration importante dans l'échantillon au moment de l'injection a considérablement impacté le signal (d'un facteur 1000). En conséquence, la présence de tensioactif, dans les conditions utilisées, ne permet pas de maintenir une performance analytique adéquate.

De plus, cette technique ne permet pas d'agir sur l'absence de rétention chromatographique. Nous avons en effet testé plusieurs colonnes de type phase inverse, avec des phases plus ou moins polaires (C18, biphényles, amines, *etc.*) et les temps de rétention étaient compris entre 0,4 et 0,8 min en fonction de la longueur de la colonne utilisée.

Il a donc été décidé d'adapter un protocole correspondant aux propriétés physico-chimiques de la metformine. Plusieurs auteurs ont proposé des méthodes d'analyse de type HILIC (chromatographie à interaction hydrophile), bien adaptées pour les molécules petites et très polaires (Buszewski and Noga, 2012). Ce type de chromatographie se distingue de la chromatographie en phase inverse classiquement utilisée pour l'analyse des contaminants organiques dans les eaux par le fait que les phases stationnaires sont plus hydrophiles et que les conditions sont donc intermédiaires entre la phase normale et la phase inverse. La guanylurée, l'un des principaux produits de dégradation de la metformine, a été ajoutée à ce développement analytique.

Tableau 4. Conditions analytiques optimisées pour l'analyse de la metformine et de la guanylurée, avec MRM_{quanti} la transition de quantification, CE l'énergie de collision en V, MRM_{qualif} la transition de qualification, Frag le fragmentateur en V et TR le temps de rétention en min.

Molécule	MRM_{quanti}	CE	MRM_{qualif}	CE	Frag	TR
Metformine	130,2 > 71,1	9	130,2 > 60,1	17	70	3,7
Guanylurée	103,1 > 60,1	6	103,1 > 43,1	30	100	3,5
Metformin-d6	136,6 > 60,1	9	136,6 > 77,1	21	100	3,7

Les premiers tests chromatographiques sur une colonne de type HILIC (Poroshell, Agilent) que la metformine et la guanylurée sont effectivement retenues par la colonne, avec des temps de rétention autour de 3,5 minutes. La phase choisie est une silice vierge, donc constituée de groupes silanols chargés négativement, permettant la rétention de la metformine et de la guanylurée, chargées positivement. Contrairement à la phase inverse, le gradient de solvant en HILIC est tout d'abord majoritairement composé du solvant le moins polaire (AcN + 0.1% acide formique), puis progressivement le plus polaire (EMQ + 0.1% Acide formique).

Le protocole d'analyse chromatographique étant optimisé (Tableau 4), l'étape de SPE doit être validée

afin de pouvoir quantifier la molécule dans les matrices environnementales. Deux types de cartouche SPE, dites à échange cationique faible, ont été utilisés selon un protocole inspiré de Scheurer *et al.* (2009). Brièvement, la colonne (3 mL x 30 mg) est conditionnée avec 3 x 3 mL de MeOH et 3 x 3 mL d'EMQ. 10 mL d'échantillons ajustés à pH 7 sont ensuite déposés sur la cartouche. Enfin, après 30 minutes de séchage, l'élution est réalisée avec 2 x 2,5 mL de MeOH/AcN (20 :80) à 2% d'acide formique.

Les deux cartouches utilisées sont la Nexus WCX (Agilent) et la Strata X-CW (Phenomenex) qui présentent des caractéristiques théoriques équivalentes. Le protocole d'extraction a été réalisé sur 10 mL d'eau d'Evian dopée à 100 ng (10 µg.L⁻¹) en metformine, guanylurée et standard interne (Tableau 5).

Tableau 5. Validation du protocole d'extraction, avec Rdt SPE le rendement d'extraction et LOQ la limite de quantification en ng.L⁻¹.

	Nexus WCX		Strata X-CW	
	Rdt SPE (%) n=4	LOQ ng.L ⁻¹	Rdt SPE (%) n=4	LOQ ng.L ⁻¹
Metformine	75 ± 4	104,3	47 ± 4	22,6
Guanylurée	51 ± 8	1065,1	49 ± 9	161,8

Bien que présentant des propriétés théoriques similaires, les résultats obtenus sur les deux cartouches sont assez différents. En effet, si les coefficients de récupération des deux molécules sont assez proches pour les deux phases testées, il existe un facteur ~5 sur les limites de quantification déterminées. On obtient donc un rapport signal/bruit bien supérieur pour la Strata X-CW en comparaison à la Nexus WCX, qui nous fait favoriser cette première, malgré des coefficients de récupération légèrement plus faibles. Des tests d'extraction avec une eau de rivière (eau de l'Orgeval) a priori vierge de tout rejet urbain ont donc été menés sur la phase Strata X-CW. Deux niveaux de dopage de la solution (50 et 100 ng) ont été testés et les analyses ont été dupliquées (Tableau 6).

Tableau 6. Rendements d'extraction en SPE (en %) en utilisant une eau de rivière dopée à 50 et 100 ng en contaminant.

Dopage	50 ng		100 ng	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
Metformine	84%	89%	61%	59%
Guanylurée	55%	51%	33%	35%

Ces résultats démontrent que l'extraction des molécules est sensible à la matrice de l'échantillon, mais également à la concentration de l'analyte en solution. En effet, les rendements d'extraction diffèrent des tests réalisés sur l'eau d'Evian (Tableau 5), mais on peut également observer des rendements nettement supérieurs en utilisant un dopage moins important (concentration autour de 5 µg.L⁻¹, Tableau 6).

Des développements restent donc à mener afin de valider la méthodologie de quantification de la metformine et son principal produit de dégradation, la guanylurée, dans les matrices environnementales. Notamment, les tests d'extraction utilisant des matrices variées (i.e. eau usée, eau de rivière, etc.) seront à approfondir afin de déterminer plus précisément l'impact de l'effet de matrice sur la quantification et sur les coefficients de récupération des molécules lors de l'étape de concentration (i.e. SPE). Enfin, l'utilisation d'une solution aqueuse tamponnée type formiate d'ammonium en lieu et place de l'eau Milli-Q pourrait permettre d'améliorer encore les paramètres de quantification de ces molécules (Boulard *et al.*, 2018), en stabilisant le signal et limitant la multiplication du potentiel de complexation pour ces molécules très réactives.

3.3. Métaldéhyde

Le métaldéhyde est une molécule de faible poids moléculaire, stable et très polaire. Elle est quantifiable en GC ou LC couplée à une spectrométrie de masse. Cependant, la particularité de la molécule ne permet pas son implémentation dans la méthode multirésidus développée pour l'analyse des pesticides. En effet, il est nécessaire de purifier les échantillons, d'utiliser des phases spécifiques en SPE voire de réaliser une étape de dérivation préalablement à l'analyse (Environmental Agency, 2009). Cependant, des développements plus récents ont montré la possibilité de quantifier le métaldéhyde en LC/MS² dans des eaux naturelles en

utilisant une méthode plus simple et plus sensible basée sur l'utilisation d'une solution tamponnée à l'acétate d'ammonium (Li *et al.*, 2010). Schumacher *et al.* (2016) précisent cependant que la formation d'adduits multiples avec ce tampon ne permet pas une bonne sensibilité et propose d'ajouter plutôt la méthylamine dans la phase mobile. Ainsi, seul l'adduit de méthylamine formé avec le métaldéhyde est présent et la sensibilité est 5 fois plus forte qu'en utilisant l'acétate d'ammonium (Schumacher *et al.* 2016).

Cette méthode a été utilisée pour le dosage spécifique du métaldéhyde par LC/MS² avec une source d'ionisation électrospray en mode positif. Dans un premier temps, les transitions du métaldéhyde et de l'étalon interne (métaldéhyde D₁₆) ont été optimisées en injection directe, puis la détection et les temps de rétention ont été validés par injection de standards sur colonne Zorbax C18 (Agilent) en utilisant au départ un mélange 50% tampon à 2,5 mM de méthylamine acidifié à 0,05 % d'acide acétique et 50% d'acétonitrile puis 100% d'acétonitrile en 4 min (Tableau 7).

Tableau 7. Conditions analytiques optimisées pour l'analyse du métaldéhyde et du métaldéhyde D16, avec MRM_{quanti} la transition de quantification, CE l'énergie de collision en V, MRM_{qualif} la transition de qualification, Frag le fragmentateur en V et TR le temps de rétention en min

Molécule	MRM_{quanti}	CE	MRM_{qualif}	CE	Frag	TR
Métaldéhyde	208,2 > 76,1	2	208,2 > 45	17	70	2,7
Métaldéhyde d16	224,2 > 80	3	224,2 > 32	6	70	3,7

Afin de valider la méthode depuis la préparation des échantillons jusqu'à l'analyse, une eau de rivière (Orgeval) a été dopée en triplicat à 0,5 µg.L⁻¹ de métaldéhyde avec ajout de l'étalon interne (50 ng). L'extraction de 200 mL d'eau dopée filtrée à 0,7 µm a été réalisée sur cartouche SPE HLB Chromabond à pH = 4 suivie d'une élution au méthanol puis concentrée à 400 µL. Le rendement de récupération a ainsi été calculé, de même que la limite de quantification (LOQ) à partir du rapport signal / bruit de fond (S/N) (Tableau 8).

Tableau 8. Validation du protocole d'extraction (n=3), avec le rendement d'extraction et LOQ la limite de quantification.

	Rendement d'extraction en %	LOQ en ng.L ⁻¹
Métaldéhyde	97 ± 3	1

A ce stade, la méthode utilisée comprend des étapes communes à la méthode multirésidus, notamment pour l'extraction. Il sera cependant nécessaire de réaliser une seconde analyse en changeant la phase mobile pour l'analyse du métaldéhyde. Cette méthode prometteuse pour le dosage du métaldéhyde à faible concentration dans les matrices environnementales doit encore être confirmée par un dopage plus faible, l'analyse des incertitudes sur 10 réplicats et la détermination de la LOQ par la méthode des blancs (BRGM, 2009).

3.4. Tests sur des eaux de surface

Durant la période de confinement, des échantillons hebdomadaires ont été prélevés en différents sites du SEDIF, et notamment sur les prises d'eau de trois stations de traitement d'eau potable, Méry-sur-Oise, Neuilly-sur-Marne et Choisy-le-Roi. Les prises d'eau de ces stations sont réalisées dans trois cours d'eau, respectivement l'Oise, la Marne et la Seine. D'autres types d'échantillons ont également été prélevés, comme par exemple un échantillon d'eau usée de la station de traitement des eaux résiduaires de Butry-sur-Oise, situé en amont de la prise d'eau de Méry-sur-Oise.

Dans le cadre des tests menés au cours de cette action du PIREN-Seine, le choix a été fait de tester le protocole analytique développé et optimisé pour les « nouveaux contaminants » ainsi que pour les contaminants suivis en routine. Lors de ce test, permettant d'apprécier le cortège de contaminants organiques présents dans ces masses d'eau, un échantillon de chaque prise d'eau, ainsi que l'échantillon d'eau usée traitée, ont été sélectionnés. Trois protocoles distincts ont été utilisés pour l'analyse de chaque échantillon : le

protocole multi-contaminants, le protocole optimisé pour la metformine et la guanylurée, et le protocole spécifique au métaldéhyde. Les résultats sont présentés Tableau 9.

Au-delà des nouveaux contaminants, particulièrement d'intérêt dans le cadre du présent rapport, on retrouve un cortège de contaminants assez classique dans les échantillons analysés. Les concentrations les plus élevées pour les produits pharmaceutiques sont logiquement mesurées dans l'eau usée traitée, notamment pour le paracétamol ou l'amoxicilline (respectivement 27 et 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$), et on observe pour ces composés une baisse très significative de 1 à 2 ordres de grandeur des concentrations dans les cours d'eau.

De manière générale, les pesticides ne présentent pas de concentrations significativement différentes entre l'eau usée traitée et les eaux de surface. Les échantillons étant prélevés au mois d'avril, les pesticides n'ont pas encore été exportés vers les cours d'eau. Parmi ceux-ci, les concentrations les plus importantes sont mesurées pour le métolachlor dans la Marne (35 ng.L^{-1}). Cet herbicide est particulièrement présent dans l'Orgeval qui est suivi en continu depuis 2008 (Blanchoud *et al.*, 2018). La carbendazime, la bentazone, le nicosulfuron, la terbuthylazine ainsi que l'atrazine et ses sous-produits sont également des herbicides quantifiés de par leur usage sur le bassin versant et leur caractère hydrophile. Les biocides comme l'irgarol mais aussi le tébuconazole (qui est également employé comme tel) sont quantifiés dans l'eau usée à de faibles concentrations. En revanche, les insecticides sont généralement employés à de faibles doses et sont plutôt lipophiles, ce qui justifie l'absence de détection dans les échantillons, particulièrement dans les grands cours d'eau où les apports agricoles sont dilués.

Concernant les molécules ajoutées à ce suivi dans le cadre du développement analytique effectué, deux d'entre elles sont systématiquement quantifiées : la metformine et le métaldéhyde. Du fait de leurs usages distincts, ces deux molécules présentent des tendances différentes, à savoir que la metformine est environ cinquante fois plus concentrée dans l'effluent de station d'épuration (5 $\mu\text{g.L}^{-1}$) que dans les eaux de surface (autour de 100 ng.L^{-1}), tandis que la concentration en métaldéhyde est moins variable en fonction des matrices avec une concentration autour de 3 ng.L^{-1} en période printanière. Ces deux tendances différentes sont comparables avec celles des autres molécules, qu'il s'agisse des produits pharmaceutiques ou des pesticides. La détection systématique de ces deux molécules indique que le développement mené mérite d'être poursuivi, car ces composés semblent contaminer les masses d'eau de manière récurrente.

Tableau 9. Concentrations (en ng.L⁻¹) en contaminants dans les effluents de la station d'épuration de Butry-sur-Oise et les prises d'eau de 3 stations de traitement d'eau potable de la couronne parisienne (Oise, Seine et Marne pour Méry-sur-Oise, Choisy-le-Roi et Neuilly-sur-Marne, respectivement). <LOQ pour inférieur à la limite de quantification et <LOD pour inférieur à la limite de détection. Les contaminants décrits dans ce rapport sont surlignés en gras.

		Sortie STEP Butry 17/04	Méry-sur-Oise 02/04	Choisy-le-Roi 07/04	Neuilly-sur-Marne 14/04
Produits pharmaceutiques					
Analgésique	Acétylaniline	Paracétamol	27042,0	37,5	32,3
	Opiacé	Codéine	209,2	<LOQ	6,1
Antibiotique	β-lactamine	Tramadol	134,6	49,0	12,7
		Amoxicilline	4036,4	130,8	100,8
		Ampicilline	<LOD	<LOD	<LOD
		Tazobactam	<LOD	<LOQ	<LOD
	Cycline	Tétracycline	2921,4	64,2	<LOD
	Diaminopyrimidine	Triméthoprime	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Fluoroquinolone	Ciprofloxacine	49,6	<LOD	<LOD
		Enrofloxacin	<LOQ	<LOD	<LOD
		Norfloxacin	<LOQ	<LOD	<LOD
		Ofloxacin	61,9	<LOQ	<LOQ
	Macrolide	Azithromycine	<LOQ	11,8	<LOQ
		Erythromycine	<LOD	10,7	1,3
	Quinolone	Acide oxolinique	<LOQ	<LOQ	<LOQ
		Enoxacin	<LOD	<LOD	<LOD
Fluméquine		<LOQ	<LOD	<LOD	
Sulfonamide	Sulfaméthoxazole	15,9	<LOQ	<LOQ	
Urédopénicilline	Pipéracilline	203,1	<LOD	<LOD	
Antidiabétique	Biguanide	Metformine	5007,3	77,2	78,3
		Guanylurée*	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Fibrate	Bezafibrate	24,6	<LOD	26,9
Antiépileptique	Dibenzazépine	Carbamazépine	43,5	7,1	7,2
Anti-inflammatoire	Non-stéroïdien	Diclofénac	58,1	4,0	1,8
		Ibuprofène	165,1	<LOQ	<LOQ
		Kétoprofène	95,0	<LOD	<LOQ
	Stéroïdien	Prednisolone	<LOD	<LOD	<LOD
Antipaludéen	4-aminoquinoléine	Chloroquine	<LOD	<LOD	<LOD
		Hydroxychloroquine	<LOQ	<LOQ	<LOD
Antirétroviral	Inhibiteur de protéase	Lopinavir	1,5	<LOQ	<LOQ
		Ritonavir	<LOQ	<LOQ	<LOQ
β-bloquant	Ethanolamine	Aténolol	152,7	8,5	2,4
		Métoprolol	8,5	<LOQ	<LOQ
		Propranolol	32,1	3,0	<LOQ
Psychotrope	Benzodiazépine	Diazépan	<LOQ	<LOD	<LOD
		Oxazépan	102,2	17,7	14,0
	Dériv. Diphenhydramine	Fluoxétine	<LOD	<LOD	<LOD
	Dériv. Phénétylamine	Venlafaxine	34,6	<LOQ	<LOQ
Tricyclique	Doxépine	<LOQ	<LOD	<LOD	
Pesticides					
Biocide	Triazine	Irgarol	1,1	<LOD	<LOD
Molluscicide		Métaldéhyde	2,6	3,1	2,7
Fongicide	Benzimidazole	Carbendazime	10,7	19,5	17,7
	Triazole	Tébuconazole	6,3	3,2	<LOQ
Insecticide	Néonicotinoïde	Tébufénozide	<LOQ	<LOD	<LOD
		Imidaclopride	<LOQ	<LOQ	<LOQ
		Imidaclopride oléfin*	<LOD	<LOD	<LOD
		Imidaclopride urée*	<LOD	<LOD	<LOD
Herbicide	Diazine	Bentazone	22,7	<LOQ	17,0
		Phénoxyacétanilide	Diflufenican	4,0	3,3
	Organo-chlorés	Métazachlore	<LOD	<LOQ	<LOQ
		Métolachlore	<LOQ	8,7	4,5
		Métolachlore OXA*	<LOQ	<LOD	<LOD
		Oxadiazole	Oxadiazon	<LOQ	<LOD
	Sulfonylurées	Nicosulfuron	4,8	9,7	4,4
		Prosulfuron	<LOQ	<LOQ	<LOQ
		Triazines	Atrazine	6,7	4,1
		Déséthylatrazine*	17,3	18,6	17,4
		Déisopropylatrazine*	3,9	<LOQ	<LOQ
		Hydroxyatrazine*	2,2	2,3	1,9
		Simazine	<LOQ	<LOQ	<LOQ
		Terbutylazine	<LOD	<LOD	<LOQ
	Urées substituées	3,4-dichloroaniline*	<LOD	<LOD	0,8
		Chlortoluron	4,9	<LOQ	3,5
		Isoproturon	2,8	<LOQ	<LOQ

Les concentrations en contaminants associés au traitement de la Covid-19 sont nettement plus disparates. Cinq molécules sont détectées dans l'effluent de la station d'épuration, dont le lopinavir (1,5 ng.L⁻¹) et la pipéracilline (203,1 ng.L⁻¹), et trois molécules n'ont pas pu être quantifiées (ritonavir, azithromycine et hydroxychloroquine). Les autres molécules ne sont pas détectées dans les différents échantillons, à l'exception du tazobactam dans l'Oise, mais non quantifiable. Aussi, les tendances de ces molécules sont identiques à celles des autres produits pharmaceutiques, à savoir que leurs concentrations, lorsque détectables, sont plus importantes dans l'effluent de la station d'épuration. Toutefois, certains de ces composés, comme l'azithromycine, sont quantifiés également dans les eaux de surface, motivant le suivi des concentrations en ce type de contaminants dans le cadre des travaux menés dans cette action.

4. Conclusion et perspectives

L'ensemble de ces résultats préliminaires démontre le bien-fondé de la démarche de développement analytique qui a été menée avec comme résultats principaux, (i) la détection systématique des deux principaux composés d'intérêt, metformine et métaldéhyde, dans les échantillons d'eaux analysés (eau usée traitée et eaux naturelles), (ii) les premières détections de quelques composés peu étudiés, mais associés aux traitements potentiels de la Covid-19 et (iii) le cortège de contamination obtenu en analyse multi-contaminant et la résolution analytique associée. Ces résultats permettent d'envisager avec confiance l'analyse des échantillons fournis par le SEDIF durant cette période charnière d'un point de vue de la santé publique, mais également du point de vue de la contamination des milieux.

Au-delà des échantillons collectés durant la première période de confinement, l'objectif principal de cette action sera d'appliquer les différents protocoles analytiques sur les échantillons collectés dans les campagnes menées sur l'axe Seine (Marnay, Bougival, Triel et Poses), travail qui débutera dès les premières campagnes réalisées en fin d'année 2020.

Bibliographie

- Blanchoud H., Tallec G., Desportes A., Ansart P. 2018. Suivi à long terme des pesticides pour la compréhension de leurs processus de transfert à l'échelle du bassin versant. PIREN-Seine phase VII - rapport 2018, 9p.
- Botta F., EPHE, 2009. Contamination des eaux de surface du bassin versant de l'Orge par les pesticides : étude de la contribution des rejets urbains et des apports agricoles. Thèse de doctorat.
- Boulard, L., Dierkes, G., Schlüsener, M.P., Wick, A., Koschorreck, J., Ternes, T.A., 2019. Spatial distribution and temporal trends of pharmaceuticals sorbed to suspended particulate matter of German rivers. *Water Res.* 115366.
- Boulard, L., Dierkes, G., Ternes, T., 2018. Utilization of large volume zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography for the analysis of polar pharmaceuticals in aqueous environmental samples: Benefits and limitations. *J. Chromatogr. A* 1535, 27–43.
- BRGM, 2009 Conséquences de la directive européenne 2009/90/CE sur l'estimation des limites de quantification des méthodes d'analyse chimique, Rapport final BRGM/RP-58049-FR, 96p. <https://infoterre.brgm.fr/rapports/RP-58049-FR.pdf>
- Buszewski, B., Noga, S., 2012. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 231–247.
- Castle, G.D., A. Mills, G., Bakir, A., Gravell, A., Schumacher, M., Snow, K., R. Fones, G., 2018. Measuring metaldehyde in surface waters in the UK using two monitoring approaches. *Environ. Sci. Process. Impacts* 20, 1180–1190.
- Castle, G.D., A. Mills, G., Gravell, A., Jones, L., Townsend, I., G. Cameron, D., R. Fones, G., 2017. Review of the molluscicide metaldehyde in the environment. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 3, 415–428.
- Dargnat C., UPMC 2008. Sources, transfert et devenir des phtalates sur le bassin versant de la Seine. Caractérisation des dangers pour l'environnement et les écosystèmes. Thèse de doctorat.

- Dinh Quo T., EPHE, 2012. Transfert et comportement d'antibiotiques à l'échelle du bassin versant élémentaire, Thèse de doctorat.
- Dolder, L.K., 2003. Metaldehyde toxicosis. *Vet. Med.* 98, 213–215.
- Ellenhorn, M.J., Barceloux, D.G., 1997. Diagnosis and treatment of human poisoning. *Med. Toxicol.* 609–610.
- Environment Agency, 2009. The determination of metaldehyde in waters using chromatography with mass spectrometric detection. *Methods for examination of waters and associated materials.* <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140328084622/http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/Research/Metaldehyde-226b.pdf>
- Gateuille D., UPMC, 2013. Rémanence et transferts des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans le bassin amont de la Seine. Thèse de doctorat.
- Gething K. J., Pickwell A., Chadd R. P., Wood P. J., 2020, The effects of metaldehyde on non-target aquatic macroinvertebrates: Integrating field and laboratory-based evidence. *Environmental Pollution* 265 (2020) 115015.
- Gillman, S., Brown, P., Burgess, D., Bickle, B., Zyndul, A., Chapman, C., 2012. Pesticides in the River Ugie - developing a catchment management approach to protect a drinking water source. *Dundee Conf. Crop Prot. North. Br.* 2012 Dundee UK 28-29 Febr. 2012 31–36.
- Gupta, R.C., 2012. Chapter 53 - Metaldehyde, in: Gupta, R.C. (Ed.), *Veterinary Toxicology (Second Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 624–628.
- Jadhava RM., Pudale A., Raut P., Utture S., Shabeer T. P. A., Banerjee K. 2019. A unified approach for high-throughput quantitative analysis of the residues of multi-class veterinary drugs and pesticides in bovine milk using LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Chemistry* 272 (2019) 292–305.
- Kay, P., Grayson, R., 2014. Using water industry data to assess the metaldehyde pollution problem. *Water Environ. J.* 28, 410–417.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.
- Kong, L., Kadokami, K., Wang, S., Duong, H.T., Chau, H.T.C., 2015. Monitoring of 1300 organic micro-pollutants in surface waters from Tianjin, North China. *Chemosphere* 122, 125–130.
- Kosma, C.I., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2015. Comprehensive study of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylurea in Greek wastewaters. *Water Res.* 70, 436–448.
- Labadie, P., Chevreuil, M., 2011. Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). *Environ. Pollut.* 159, 391–397.
- Labadie P., Simonnet-Laprade C., Maciejewski K., Lachaux V., Le Menach K., Budzinski H., Alliot F., Chevreuil M., Santos R., Goutte A. 2017. Transferts de micropolluants dans les réseaux trophiques lotiques : exemple de l'Orge. PIREN-Seine phase VII.
- Lazartigues, A., Banas, D., Feidt, C., Brun-Bellut, J., Thomas, M., 2012. Pesticide pressure and fish farming in barrage pond in Northeastern France Part I: site characterization and water quality. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 2802–2812.
- Li C., Wu Y.-L., Yang T., Zhang Y., 2010. Determination of Metaldehyde in Water by SPE and UPLC-MS-MS. *Chromatographia*, 72, 987–991.
- Lu, Q., G. Whitehead, P., Bussi, G., N. Futter, M., Nizzetto, L., 2017. Modelling metaldehyde in catchments: a River Thames case-study. *Environ. Sci. Process. Impacts* 19, 586–595.
- Mohamad Ibrahim I.H., Gilfoyle L., Reynolds R., Voulvoulis N., 2019. Integrated catchment management for reducing pesticide levels in water: Engaging with stakeholders in East Anglia to tackle metaldehyde. *Science of the Total Environment* 656 (2019) 1436–1447
- Oosterhuis, M., Sacher, F., ter Laak, T.L., 2013. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. *Sci. Total Environ.* 442, 380–388.
- Papageorgiou, M., Zioris, I., Danis, T., Bikiaris, D., Lambropoulou, D., 2019. Comprehensive investigation of a wide range of pharmaceuticals and personal care products in urban and hospital wastewaters in Greece. *Sci. Total Environ.* 694, 133565.
- Pentikäinen, P.J., Neuvonen, P.J., Penttilä, A., 1979. Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 16, 195–202.

- Queyrel W., UPMC, 2014. Modélisation du devenir des pesticides dans les sols à partir d'un modèle agronomique : évaluation sur le long terme. Thèse de doctorat
- Scheurer, M., Sacher, F., Brauch, H.-J., 2009. Occurrence of the antidiabetic drug metformin in sewage and surface waters in Germany. *J. Environ. Monit.* 11, 1608–1613.
- Schumacher M., Castle G., Gravell A., Mills G. A., Fones, 2016. G. R. An improved method for measuring metaldehyde in surface water using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *MethodsX* 188–194.
- Shraim, A., Diab, A., Alsuhaime, 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.
- SNDS, 2020. Open Medic : base complète sur les dépenses de médicaments interrégimes - data.gouv.fr. URL [/fr/datasets/open-medic-base-complete-sur-les-depenses-de-medicaments-interregimes/](https://data.gouv.fr/datasets/open-medic-base-complete-sur-les-depenses-de-medicaments-interregimes/)
- Tamtam F., UPMC, 2008. Sources et devenir antibiotiques dans le Bassin de la Seine - Première approche pour une évaluation des risques environnementaux. thèse de doctorat.
- Tao B., Fletcher A. 2016. Development of a novel dual-stage method for metaldehyde removal from water. *Chemical Engineering Journal* 284, 741–749.
- Thompson, J., Casey, P., Vale, J., 1995. Pesticide incidents reported to the Health and Safety Executive 1989/90- 1991/92. *Hum. Exp. Toxicol.* 14, 630–633.
- Tisler, S., Zwiener, C., 2018. Formation and occurrence of transformation products of metformin in wastewater and surface water. *Sci. Total Environ.* 628–629, 1121–1129.
- Tlili K., UPMC, 2011. Contamination de l'environnement francilien par les ether de biphenyl polybromes (PBDE) : Impact sur la qualité de l'atmosphère et des écosystèmes aquatiques. Thèse de doctorat.
- van Nuijs, A.L.N., Tarcomnicu, I., Simons, W., Bervoets, L., Blust, R., Jorens, P.G., Neels, H., Covaci, A., 2010. Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 2211–2222.
- Weill, A., Drouin, J., Desplas, D., Cuenot, F., Dray-Spira, R., Zureik, M., 2020. Usage des médicaments de ville en France durant l'épidémie de Covid-19 : point de situation après les 8 semaines de confinement et une semaine de post-confinement (jusqu'au 17 mai 2020) - étude pharmaco-épidémiologique à partir des données de remboursement du SNDS (No. 3). GIS EPIPHARE - ANSM-CNAM, Saint Denis.