

DEVELOPPEMENT DES METHODES D'ANALYSE DE METABOLITES ET PRODUITS DE DEGRADATION DU DICLOFENAC ET DU SULFAMETHOXAZOLE

Tâche 1.1 "ANALYSES DE METABOLITES" – Livrable 2

Rédacteur du rapport : Laure WIEST, Institut des Sciences Analytiques

Responsable du livrable : Emmanuelle VULLIET, Institut des Sciences Analytiques

Avec le soutien de :

Table des matières

1. Contexte et objectifs du projet	2
2. Matériel et méthode	4
2.1. Métabolites et produits de dégradation analysés	4
2.2. Méthodes d'extraction et analyse	4
2.3. Sites de prélèvement et échantillons analysés	5
3. Résultats	7
3.1. Métabolites et produits de dégradation détectés	7
3.2. Concentrations dans les effluents hospitaliers et urbains	8
4. Conclusions et perspectives	12
5. Références bibliographiques	12

1. Contexte et objectifs du projet

Parmi les polluants les plus étudiés dans l'eau, les médicaments sont des contaminants particuliers. D'une part, leurs concentrations dans l'environnement sont très faibles ; étant potentiellement toujours biologiquement actifs dans la gamme du ng/L, leur analyse nécessite des technologies très sensibles. D'autre part, les produits pharmaceutiques parents sont souvent excrétés du corps humain sous forme de métabolites qui doivent également être surveillés (Petrie et al. 2015). En effet, dans le corps humain et dès qu'ils sont introduits dans les réseaux et l'environnement, les produits pharmaceutiques subissent des processus de métabolisation et/ou de dégradation (Figure 1). Il est donc nécessaire de connaître le devenir des molécules parentes, ainsi que d'identifier et de suivre les produits résultant des dégradations.

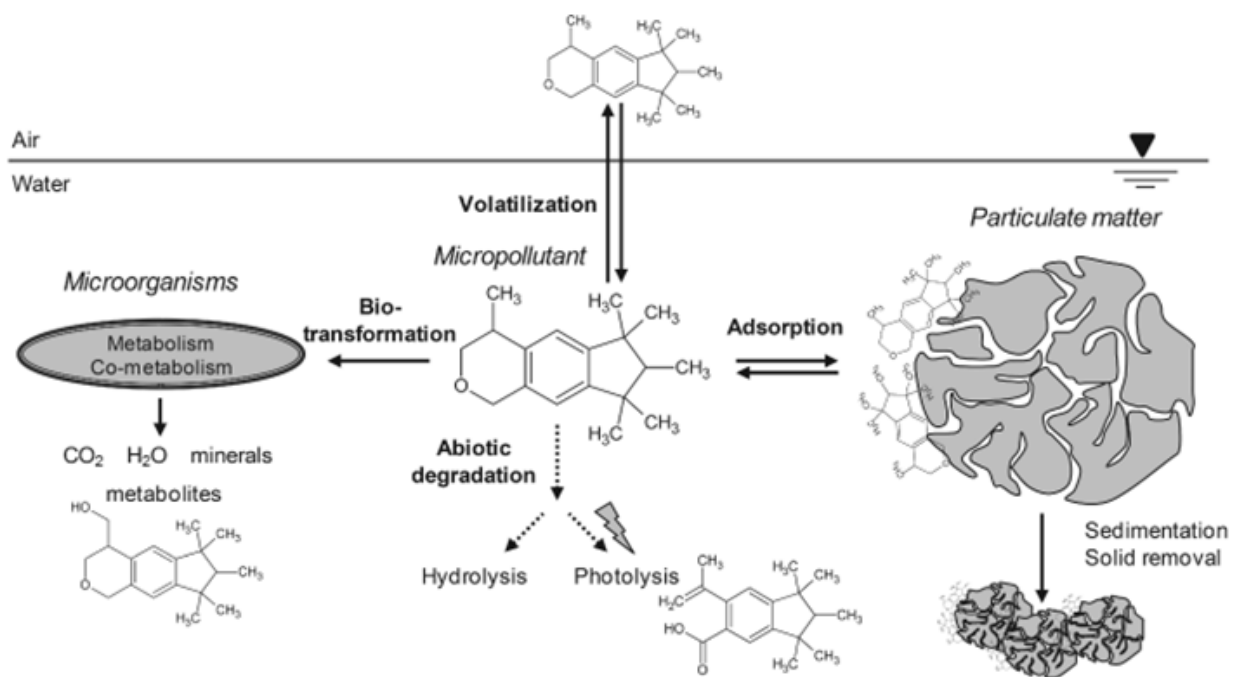


Figure 1: Différents phénomènes de dégradation et adsorption en jeu dans les eaux usées (Margot et al. 2015)

Depuis 2012 et la mise en service du Centre Hospitalier Alpes-Léman (CHAL), des études préliminaires ainsi que des campagnes de suivi mensuelles ont été mises en place afin d'évaluer les niveaux de contamination des effluents urbains et hospitaliers par les médicaments. Au total, 12 substances médicamenteuses ont été suivies dans le cadre de l'Observatoire Sipibel (Site Pilote de Bellecombe), parmi lesquelles des analgésiques (paracétamol et acide salicylique, qui est un métabolite de l'aspirine), des anti-inflammatoires (diclofénac, ibuprofène et kétoprofène), des bêtabloquants (aténolol et propranolol), un antifongique (éconazole), un anti-épileptique (carbamazépine), des antibiotiques (ciprofloxacine et sulfaméthoxazole) et une hormone (17 α -éthinyloestradiol). Aucun produit de dégradation n'a été recherché lors de ces campagnes.

La tâche 1.1 du projet SIPIBEL-RILACT prévoit le développement de méthodes d'identification de métabolites et produits de dégradation, mené sur 2 à 3 composés pharmaceutiques judicieusement ciblés en fonction des premiers résultats de l'observatoire et de travaux de recherche antérieurs. Les travaux menés dans le cadre de cette tâche permettront de mieux comprendre les rejets de substances médicamenteuses, en établissant des bilans matières complets. Pour ce faire, deux substances, un anti-inflammatoire non stéroïdien (diclofénac, nommé DCF par la suite)

et un antibiotique bactériostatique sulfamidé (sulfaméthoxazole, nommé SMX par la suite) ont été retenues. Le choix s'est porté sur ces deux molécules en raison de i) leur ubiquité dans plusieurs compartiments environnementaux (influent et effluent de STEP, eaux de surface, eaux souterraines, ...), ii) la présence du DCF dans la liste de vigilance de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE – 2000/60/CE ...), iii) leurs faibles taux d'excrétion comme médicament inchangé (Daouk et al. 2016), et iv) leur faisabilité analytique. Une étude approfondie de la littérature a permis de mettre en exergue 17 métabolites et produits de dégradation pertinents (8 pour SMX et 9 pour DCF), parmi lesquels des conjugués glucuronide, des substitués nitreux (NO ou NO₂) ou encore des substitués acides. Ce suivi des métabolites et des produits de dégradation est un complément scientifique et opérationnel indispensable qui permettra d'établir i) une relation fiable entre les consommations de médicaments et les rejets des résidus correspondants, y compris les métabolites (suivre uniquement la molécule mère est source d'erreur et d'incertitudes importantes), et ii) de mener une approche globale et complète des processus et cinétiques de dégradation des substances au sein des réseaux, les équilibres entre molécules mères et métabolites étant susceptibles d'évoluer pendant le transfert dans les réseaux d'assainissement.

2. Matériel et méthode

2.1. Métabolites et produits de dégradation analysés

A la suite de l'optimisation de la méthode (livrable 1, Tâche 1.2), les métabolites et les produits de dégradation du diclofénac et du sulfaméthoxazole ci-dessous (Tableau 1) ont pu être suivis à des limites de détection (LD) entre 0,3 et 33 ng/L et des limites de quantification entre 1 et 100 ng/L.

Tableau 1 : Métabolites et produits de dégradation suivis et leurs limites de détection (LD) et de quantification (LQ)

Molécule	LD (ng/L)	LQ (ng/L)	Molécule	LD (ng/L)	LQ (ng/L)
SMX impurity A	0,3	1	DCF HO4'	1,7	5
SMX hydroxylamine	33,3	100	DCF HO5'	33,3	100
SMX-NO ₂	16,7	50	DCF COOH	1,7	5
SMX glucuronide	3,3	10	DCF glucuronide	33,3	100
SMX impurity F	1,7	5	DCF CPAB	1,7	5
			DCF impurity B	3,3	10
			DCF lactam	0,3	1
			DCF impurity C	16,7	50
			DCF impurity E	3,3	10

2.2. Méthodes d'extraction et analyse

Après prélèvement et conservation à 4°C, les échantillons d'eaux sont traités dans les 24h suivant le prélèvement. Ils sont tout d'abord filtrés sur filtre en fibre de verre à 0,7 µm, ce qui signifie que seule la contamination de la fraction dissoute est prise en compte dans cette étude. Les échantillons sont ensuite acidifiés avec 0,1% d'acide acétique. Chaque échantillon est ensuite dopé avec des standards internes (sulfaméthoxazole-d4 et diclofénac-d4) avant l'étape d'extraction SPE. Cette dernière est réalisée sur un extracteur automatique de la marque Caliper nommé AutoTrace SPS Workstation, sur des cartouches SPE HR-X (60 mg – 3 mL – Macherey-Nagel). Un volume de 100 mL d'échantillon est percolé à 10 mL/min sur les cartouches préalablement conditionnées avec 5 mL de méthanol, puis 5 mL d'eau ultra-pure. Les cartouches sont ensuite rincées avec 5 mL d'eau ultra-pure, séchées puis éluées avec 5 mL de méthanol puis 5 mL d'acétate d'éthyle. Un volume de 100 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO) est ajouté et l'extrait obtenu est ensuite évaporé, repris dans 900 µL d'eau et congelé jusqu'à analyse.

L'appareillage utilisé pour l'analyse est de marque Agilent – série 1290 – pour la chromatographie liquide (LC) et ABSciex – 3200 QTRAP – pour la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Les données sont acquises et retraitées grâce au logiciel Analyst (version 1.5.2). L'analyse est réalisée en phase inverse (gradient d'élution) sur une colonne Poroshell EC-120 C18 2.7µm, 75 x 2,1 mm (Agilent), chauffée à 50°C. Le volume injecté est de 50 µL, la phase aqueuse utilisée consiste en de l'eau ultra-pure avec de l'acide acétique (100 µL dans 1L) et la phase organique du méthanol. Le diclofénac, le sulfaméthoxazole et leurs métabolites et produits de dégradation sont tous analysés en mode positif. Chaque molécule est identifiée par son temps de rétention, par 2 transitions MRM (ion parent → ion fils) et des rapports d'ions de l'ordre de +/- 30% par rapport à l'étalon.

Afin de pallier aux effets de matrice, dus à la présence d'interférents dans l'extrait injecté, une méthode de quantification par calibration interne dans une matrice synthétique a été utilisée : chaque molécule mère et métabolite est quantifié par étalonnage interne, avec le standard interne marqué du composé parent (i.e. diclofénac-d4 et sulfaméthoxazole-d10). Pour plus d'informations concernant ces protocoles, se référer au livrable 1 de la tâche 1.2.

2.3. Sites de prélèvement et échantillons analysés

Les méthodes optimisées ont été appliquées à des échantillons réels provenant du :

- Site SIPIBEL (Lecomte 2016) :
 - Prélèvement moyenné 24h sur eaux usées brutes : 2 campagnes sur effluents hospitaliers (EB Hop) et 2 campagnes sur effluents urbains (EB Urb)
 - Pollutogrammes 24 h sur eaux usées brutes : 1 campagne sur effluents hospitaliers (EB Hop) et 1 campagne sur effluents urbains (EB Urb) (cf. Tâche 2.1, livrable 1)
- Site franco-suisse de la galerie de Chouilly : 6 campagnes en réseau d'assainissement de juillet 2016 à mai 2017 avec prélèvement en entrée et en sortie du tronçon (Figure 2). Il s'agit d'un effluent urbain (60000 EH). Une campagne représente 4 ou 6 échantillons : 2 ou 3 prélèvements en entrée correspondants à 2 ou 3 prélèvements en sortie, en tenant compte du temps de séjour de l'effluent dans le réseau (environ 30 à 45 minute entre l'amont et l'aval) dans des conditions aérobies

2,3 km (+ 385 m) , $\varnothing = 2.9$ m

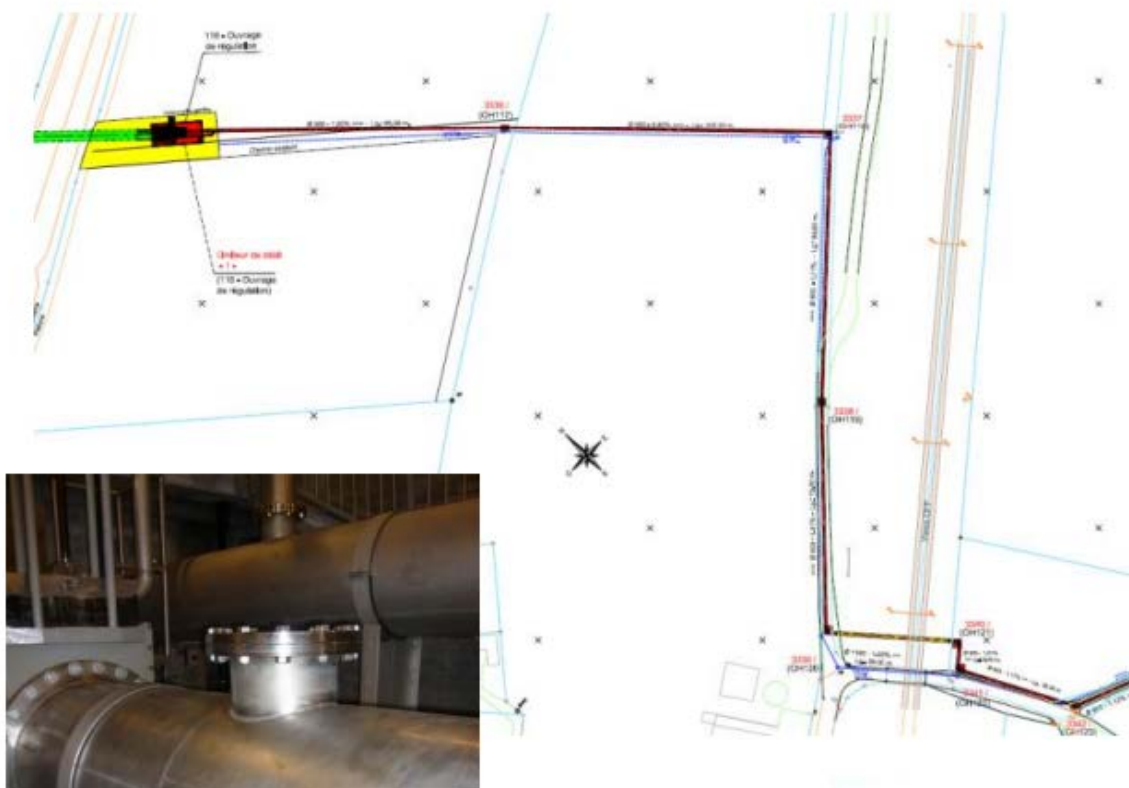


Figure 2: Site de la galerie de Chouilly (Temps de séjour approximatif 45 min)

- Site Pôle Santé à Arcachon (PSA), en collaboration avec le projet REMPLAR : 1 campagne en réseau d'assainissement de 5 prélèvements en amont du tronçon et 5 prélèvements aval en juin 2017 (Figure 3). Il s'agit d'un effluent hospitalier provenant du Pôle Santé d'Arcachon en conditions anaérobies avec un temps de séjour entre l'amont et l'aval dans le poste de pompage et la canalisation de refoulement de l'ordre de 3h en journée et de l'ordre de 8h à 10h la nuit.

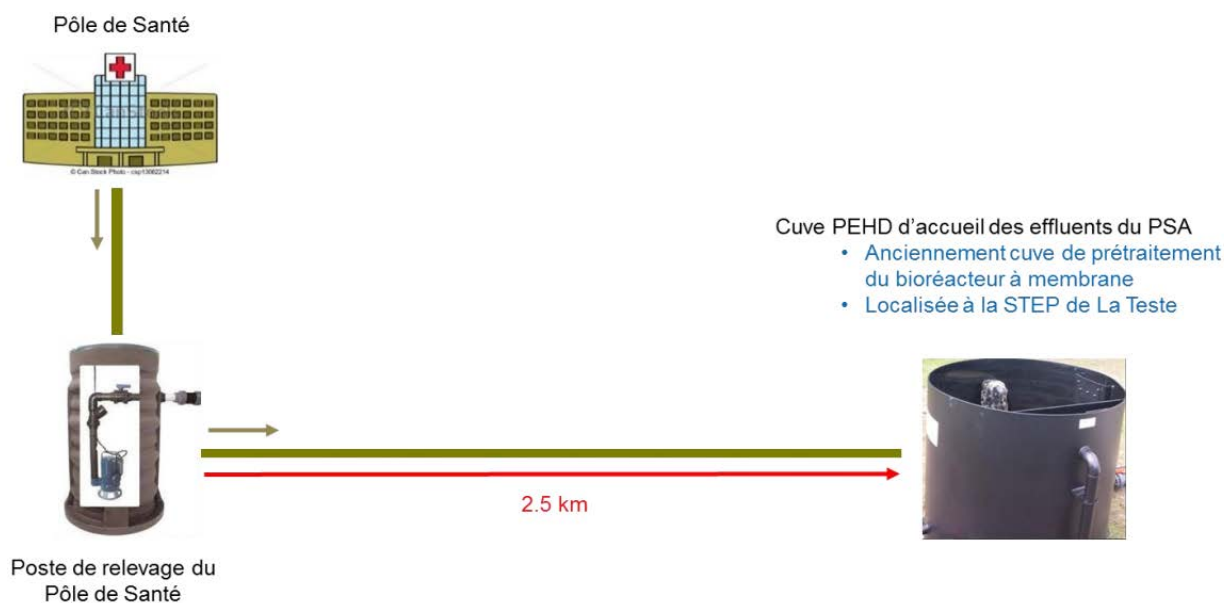


Figure 3: Site Pôle Santé à Arcachon (Temps de séjour approximatif : Jour (3 h), Nuit (10h))

Pour l'ensemble des sites, cela représente **un total de 50 échantillons** (sans compter les pollutogrammes et les études de dégradation en pilote).

3. Résultats

3.1. Métabolites et produits de dégradation détectés

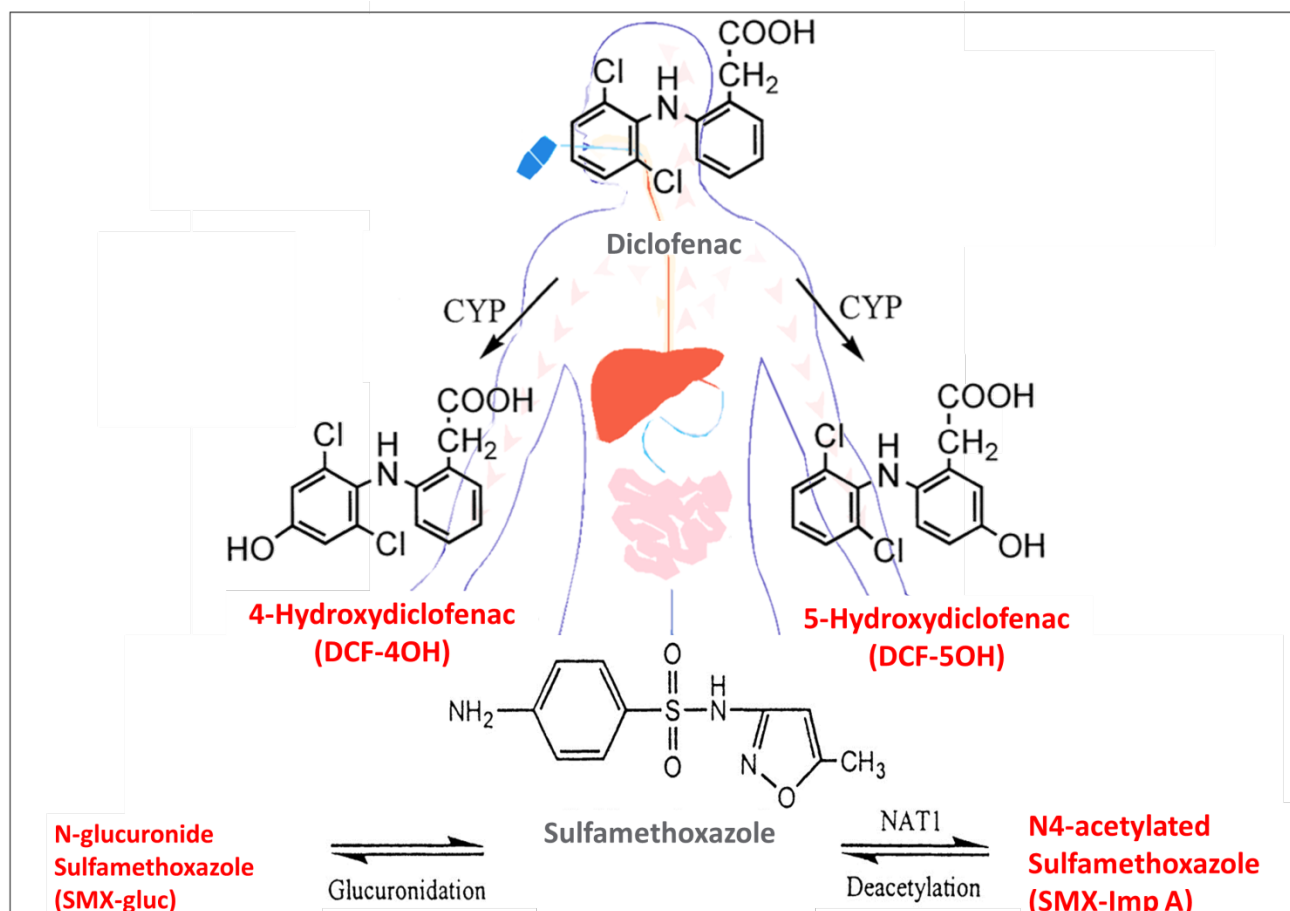


Figure 4: Principaux métabolites détectés dans les effluents urbains et hospitaliers

Nous rappelons tout d'abord que seule la fraction dissoute des échantillons a été analysée. En effet, le diclofénac et le sulfaméthoxazole sont hydrophiles, de par leur formule chimique. Ceci a été vérifié en laboratoire (Carballa et al. 2008) et dans l'environnement (Ferreira da Silva et al. 2011) : le pourcentage de diclofénac et sulfaméthoxazole dans la phase dissoute est supérieure à 80 et 90%, respectivement. Par définition, les métabolites de ces deux substances ont un caractère encore plus hydrophile. En effet, le métabolisme est une des phases de l'élimination d'un composé exogène : les différentes étapes du métabolisme conduisent à la formation de substances hydrosolubles plus facilement éliminées par les milieux aqueux que sont les urines, la bile, la salive ou la sueur.

Sept molécules dont 5 métabolites ont été détectées et quantifiées: le diclofénac et ses deux métabolites issus de son hydroxylation (DCF-4OH et DCF-5OH), l'oxindole (DCF impurity E), le sulfaméthoxazole, son métabolite acétylé (SMX-ImpA) et son conjugué glucuronidé (SMX-gluc) (Figure 4). Effectivement, le DCF-4OH est le principal métabolite humain du diclofénac (30%) suivi du 5-hydroxy (10%) (Lonappan et al. 2016). SMX-ImpA et SMX-gluc font également partie des **métabolites humains majoritaires** (Vanderven et al. 1995) et ont été identifiés par (Wang & Gardinali 2014) dans de l'eau recyclée.

L'**oxindole** ou DCF impurity E, a également été quantifié dans 100% des échantillons et à des teneurs élevées, entre 4 et 178 µg/L. Cependant, ce composé **n'est pas uniquement un métabolite du diclofénac** : il peut provenir de la

dégradation d'autres molécules, comme les acides aminés (Carpenedo et al. 1998) et les indoles qui sont produits en grande quantité dans les industries de cosmétique, agrochimie, pharmacie, désinfectant. Ces indoles peuvent s'avérer écotoxiques (Arora et al. 2015, Katapodis et al. 2007). Comme la présence de ce composé ne permet pas de compléter le bilan de matière du diclofénac, ce qui est la problématique de cette tâche, nous n'irons pas plus loin dans l'interprétation de ces concentrations.

3.2. Concentrations dans les effluents hospitaliers et urbains

Sur les sept molécules détectées, cinq ont été quantifiées dans 100% des échantillons à des concentrations allant de 30 à 178 000 ng/L. Seuls le DCF-5OH et le SMX-Gluc n'ont pas été détectés dans la totalité des effluents. En ce qui concerne le DCF-5OH, il n'a pas été retrouvé uniquement dans les échantillons provenant du Pôle Santé d'Arcachon. Le **SMX-Gluc** a été quantifié dans 48% des échantillons : **dans 100 % des effluents hospitaliers**, qu'ils proviennent du Centre Hospitalier Alpes Léman (Site SIPIBEL) ou du Pôle Santé d'Arcachon et seulement lors de 2 campagnes de prélèvement d'effluents urbains (novembre et décembre 2016) sur le site de Chouilly. Cette différence peut s'expliquer par la différence de temps de séjour des effluents hospitaliers et urbains dans le réseau, avant le prélèvement. En effet, contrairement aux effluents urbains, les effluents hospitaliers sont prélevés près des hôpitaux, pratiquement à la source. Suite à un temps de séjour plus long de l'effluent urbain dans le réseau, il est possible que **le SMX-Gluc se déconjugue pour redonner du SMX**, mais que ce phénomène n'ait pas le temps de se produire dans les effluents hospitaliers. Deux études confirment cette hypothèse : d'une part, Jelic et al. 2015 ont montré une augmentation de concentration du SMX lors du passage en réseau et d'autre part, Gao et al. 2017 ont observé en réseau la déconjugaison des métabolites glucuronidés de la morphine et de la codéine.

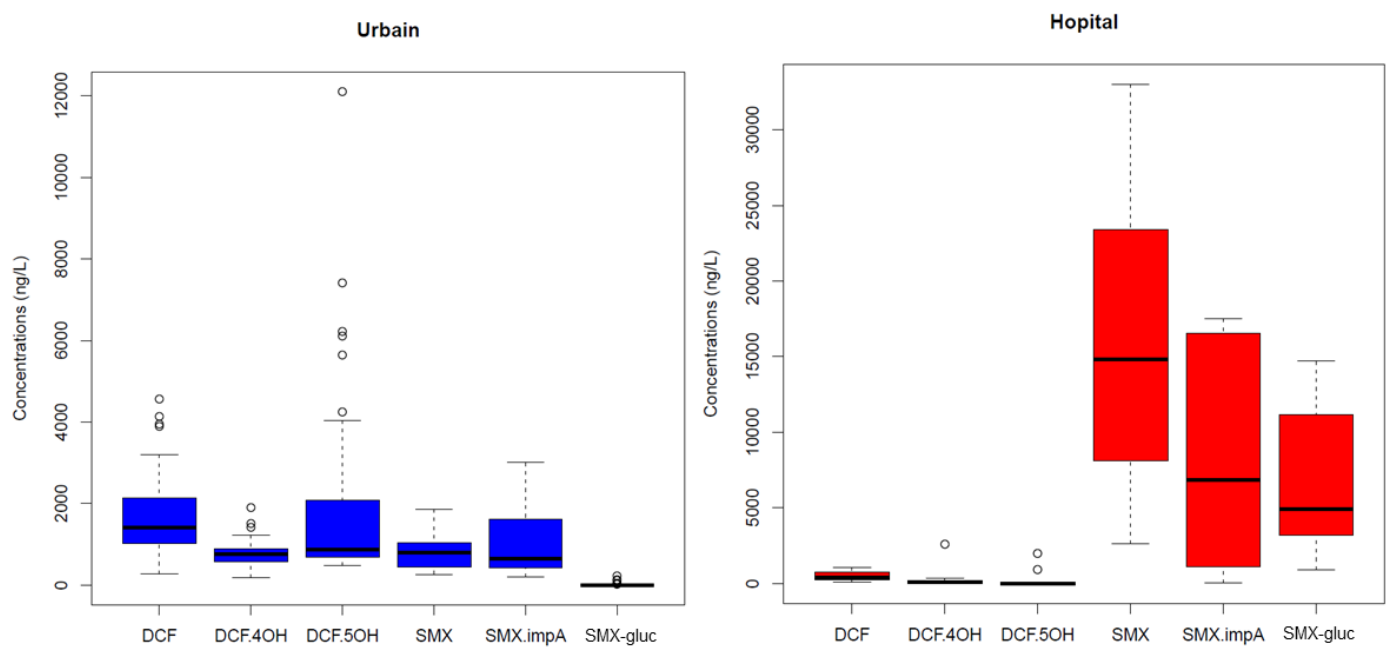


Figure 5: Concentrations en médicaments et métabolites en ng/L dans les effluents urbains (bleu, n=34) et hospitaliers (rouge, n=12) Juillet 2016 à Juin 2017

Les concentrations en médicaments et métabolites dans les effluents urbains et hospitaliers sont représentés dans la Figure 5. La première observation est la différence de concentrations en DCF et SMX dans les effluents urbains et hospitaliers. En effet, si l'on fait la somme des concentrations [médicaments + métabolites], dans les effluents hospitaliers, les médianes se situent à 794 et 31428 ng/L pour le DCF et le SMX, respectivement et à 3910 et 1585 ng/L dans les effluents urbains, soit environ **20 fois plus de SMX dans les effluents hospitaliers et 5 fois plus de DCF**

dans les effluents urbains. Ceci peut refléter la différence de consommation domestique/hospitalière de ces médicaments : en effet, les antibiotiques, tels que le SMX, sont plus consommés en milieu hospitalier et donc en concentrations supérieures dans les effluents, comme déjà observé par Tuc et al. 2017 et Wiest et al. 2017. A l'inverse, le DCF, comme d'autres anti-inflammatoires tels que l'ibuprofène et l'aspirine, font partie des 30 substances à usage domestique les plus vendues en France (Cavalié 2014).

Les concentrations en métabolites du DCF et du SMX sont difficiles à comparer avec de précédentes études car ces 4 métabolites sont encore très rarement recherchés dans les eaux usées brutes. Garcià-Galàn et al. 2016 ont analysé DCF et DCF-4OH et SMX et SMX-impA dans différents effluents urbains : les concentrations retrouvées se situent entre 441 et 1090 ng/L pour le DCF et entre 396 et 12398 ng/L pour le DCF-4OH, ce qui correspond aux ordres de grandeur de notre étude. Egalement en accord avec nos résultats, les concentrations en SMX s'échelonnent entre 119 et 977 ng/L et entre 95 et 1557 ng/L pour le SMX-ImpA. Par ailleurs, Kosma et al. 2017 ont également étudié l'occurrence d'une substance pharmaceutique et ses métabolites et produits de dégradation dans des effluents hospitaliers et urbains : l'omeprazole, un antisécrétoire gastrique. En accord avec nos résultats, cette étude montre des concentrations supérieures en molécule parente dans l'effluent hospitalier, et également la présence de certains métabolites uniquement dans l'effluent provenant de l'hôpital.

3.3. Dégradation des médicaments et de leurs métabolites

La dégradation du DCF et du SMX et de leurs métabolites a été étudiée dans trois conditions différentes : en réseau d'assainissement, dans un effluent urbain (site franco-suisse de Chouilly) et dans un effluent hospitalier (Pôle Santé d'Arcachon), et en pilote, dans l'effluent urbain provenant de la station d'épuration Feysine. Dans le paragraphe suivant, uniquement les différences de concentrations seront discutées. Les flux et bilans de masse seront évalués dans un futur livrable de la tâche 2.1., ainsi que les protocoles détaillés de prélèvements.

La Figure 6 représente les concentrations en médicaments et métabolites en **entrée et sortie de réseau urbain** aux différentes campagnes sauf celle de novembre 2016. En effet, cette dernière campagne présente des concentrations significativement supérieures en DCF-5OH, que nous détaillerons par la suite.

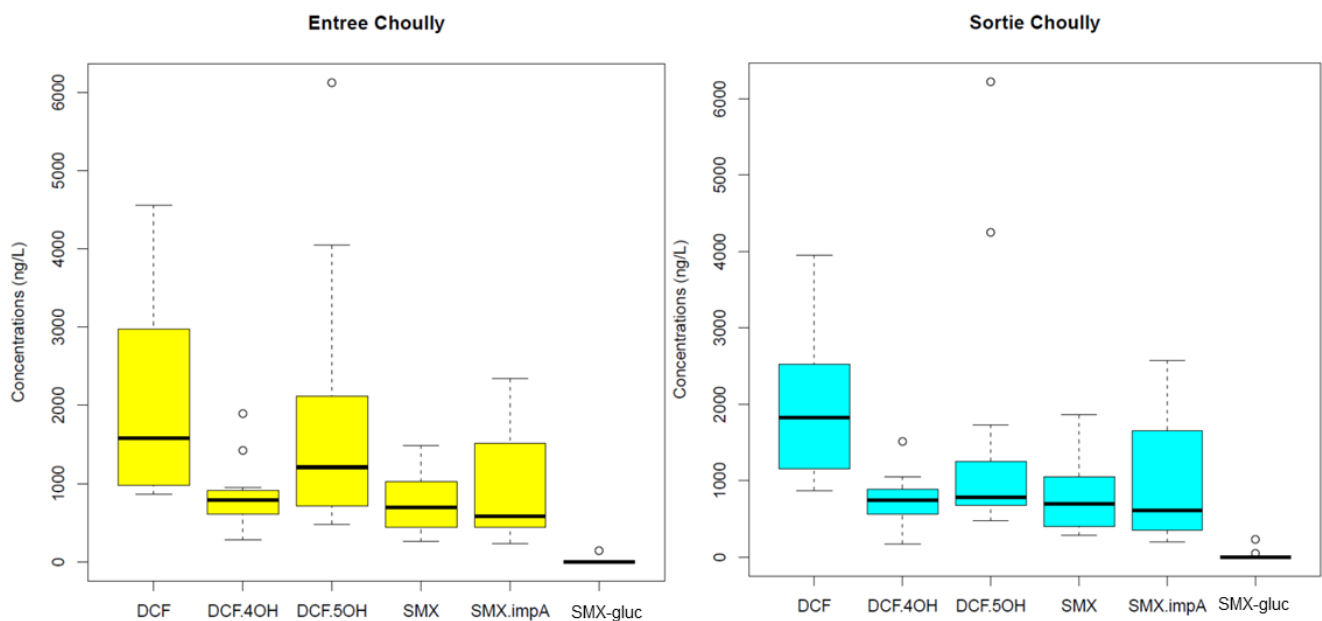


Figure 6: Concentrations en médicaments et métabolites en ng/L en entrée (jaune, n=15) et sortie (cyan, n=19) de réseau urbain Juillet 2016 à Mai 2017

En ce qui concerne le SMX et ses métabolites, on n'observe aucune différence entre l'entrée et la sortie en réseau. Il n'y a pas de variation significative non plus pour le DCF et ses métabolites hormis lors de la campagne de novembre 2016 : des concentrations jusqu'à dix fois supérieures aux autres campagnes, en **DCF-5OH**, ont été observées ainsi qu'une **diminution significative** entre l'entrée et la sortie (cf. Figure 7).

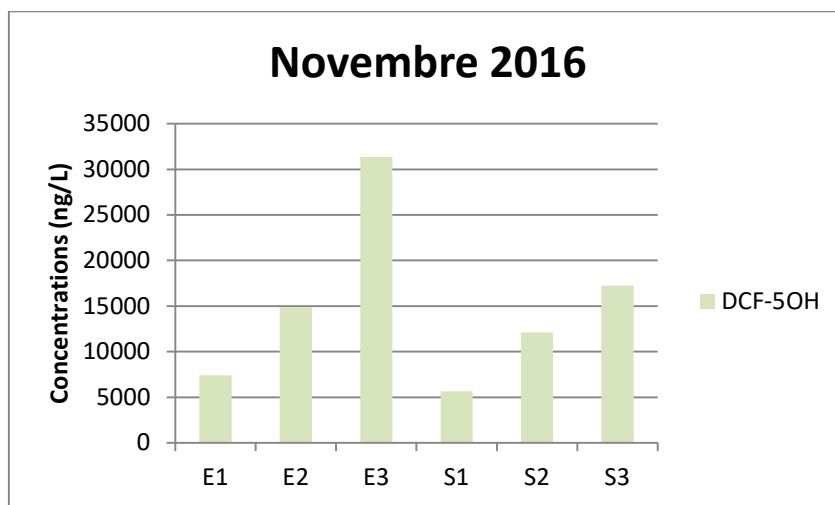


Figure 7: Concentrations en DCF-5OH en entrée (E1 à E3) et sortie (S1 à S3) du réseau de Chouilly

La dégradation du DCF et du SMX et de leurs métabolites a également été étudiée en **réseau d'effluent hospitalier** lors d'une campagne sur le site Pôle Santé d'Arcachon. Comme évoqué dans le paragraphe 3.2, les concentrations en DCF sont bien inférieures et celles en SMX bien supérieures aux effluents urbains. Les concentrations en SMX et ses métabolites et la somme des concentrations sont représentées en Figure 8.

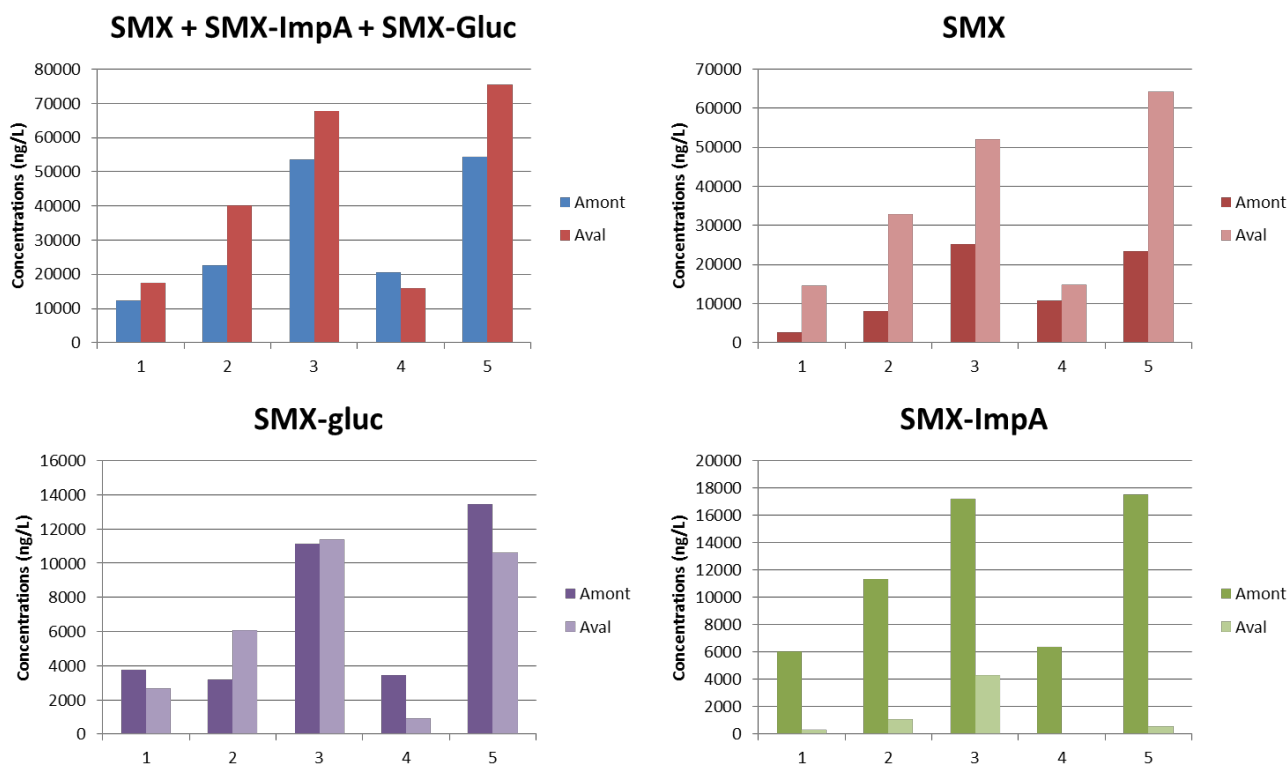


Figure 8: Concentration totale (en haut à droite) et concentrations individuelles en SMX et métabolites en réseau (amont-aval) (Pôle santé Arcachon)

Le graphe représentant la somme des concentrations montre une grande variabilité en fonction du temps de prélèvement, ce qui a déjà été observé sur l'effluent hospitalier du site SIPIBEL, sur les pollutogrammes 24h (cf. Tâche 2.1, livrable 1). Mais, à chaque prélèvement, on remarque tout de même une augmentation de la somme des concentrations sauf pour le prélèvement 4. En effet, la concentration en SMX (graphe rouge) augmente très significativement, entre l'amont et l'aval. Celle-ci provient en partie de la **déacétylation du SMX-ImpA**, dont on voit les concentrations (graphe vert) drastiquement diminuer entre l'amont et l'aval. Ce phénomène a déjà été observé après traitement par boues activées, primaire et secondaire (Gobel et al. 2005). Cette étude a également montré une dégradation très rapide du SMX-ImpA, en solution en présence de boues activées. L'augmentation de la concentration provient également probablement de la transformation en molécule mère d'autres métabolites du SMX que nous n'avons pas pu analyser avec notre méthode (cf. livrable 1 de la tâche 1.2) en particulier les métabolites nitrosés. En effet, Bonvin et al. 2013 ont mis en évidence la production de SMX à partir du 4-nitroso-SMX, lors d'une étude de dégradation en laboratoire du SMX et de ses métabolites. Enfin, les concentrations en **SMX-gluc** (graphe violet) apparaissent **relativement stables** entre l'amont et l'aval. Des tests de dégradation à l'interface « eau-sédiment » en conditions aérobies (Radke et al. 2009) ont montré la prédominance des phénomènes de biodégradation dans l'élimination du SMX-gluc, ce qui est en accord avec nos résultats. Or, le suivi du potentiel redox a montré que l'effluent du Pôle Santé était en conditions anaérobies. Une campagne en réseau en conditions aérobies pourrait confirmer cette hypothèse.

Contrairement au SMX, aucune différence significative n'a été observée entre l'amont et l'aval pour le DCF. Cette observation est sûrement liée aux conditions anaérobies. En effet, plusieurs études ont montré le caractère persistant du DCF, en l'absence d'oxygénation (Ghattas et al. 2017), la réaction chimique majoritaire de dégradation étant la déchlorination, qui ne peut se faire sans l'oxygénation préalable du cycle benzénique chloré.

Enfin, une première **étude de dégradation en pilote** sur 24h a été réalisée sur un effluent urbain, en présence ou non de biofilm. Le suivi du potentiel redox a montré que cette expérience a été réalisée en conditions anaérobies, contrairement à ce qui était souhaité. Aucune dégradation du DCF et SMX n'a été observée. En ce qui concerne les métabolites, une dégradation significative du SMX-gluc a été observée. La Figure 9 représente sa concentration à t0, t1 (t0+30min), t2 (t0+1h30), t3 (t0+4h), t4 (t0+6h), t5 (t0+8h), t6 (t0+24h). En 24h, sa concentration est passée de 100 à 45 ng/L, et de 100 à 30 ng/L en présence de biofilms. Cette différence de concentrations est trop faible pour observer une augmentation de la concentration en SMX, qui est de l'ordre de 800 ng/L. Bien qu'une dégradation ait été observée, la cinétique apparaît relativement lente, ce qui est en accord avec la stabilité amont-aval observée dans le réseau Pôle-Santé.

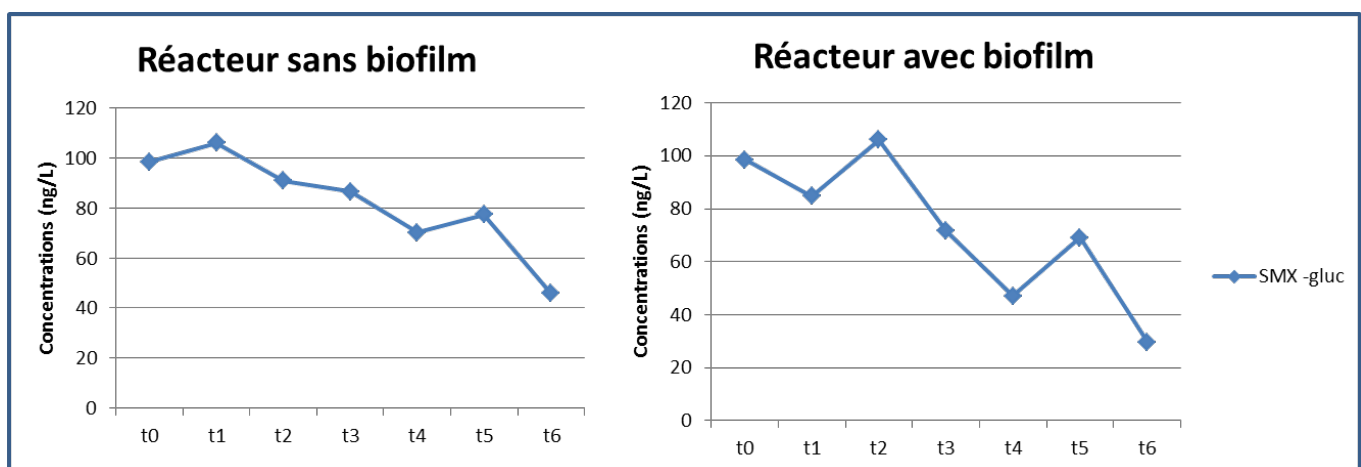


Figure 9: Evolution de la concentration en SMX-gluc lors de la première étude de dégradation en pilote

Cette étude met en évidence non seulement la dégradation du SMX-gluc mais également l'influence de la présence de biofilm. La diminution moins régulière en présence de biofilm peut -être due à un phénomène d'adsorption, en plus de celui de dégradation (Figure 1). Des taux de dégradation plus rapides en réseau, en présence de biofilms ont également été mis en évidence par Thai et al. 2014 sur plusieurs substances pharmaceutiques. Ces résultats sont préliminaires et des études en pilote sont prévues en 2017-2018 pour les compléter et confirmer les hypothèses.

4. Conclusions et perspectives

Cette étude fournit les premières informations sur la contamination en diclofénac, sulfaméthoxazole et leurs métabolites et produits de dégradation des effluents urbains et hospitaliers. Elle met en évidence **la présence de processus de métabolisation des molécules mères entre l'absorption du médicament, son élimination de l'organisme et le transport dans le réseau d'assainissement**. Ces résultats mettent en exergue la nécessité de travailler non plus sur une seule molécule (la molécule parente) mais sur l'ensemble des molécules issues de la transformation, biotique et / ou abiotique, de cette molécule depuis son émission jusqu'à son élimination.

Il est maintenant évident que des processus de métabolisation et / ou de dégradation s'effectuent dans le réseau d'assainissement. Ce rapport constitue un tout premier pas vers l'interprétation des résultats. Les données concernant les métabolites vont maintenant devoir être confrontées aux autres données physico-chimiques, aux concentrations d'autres micropolluants analysés, afin de comprendre plus finement les phénomènes observés. Enfin, des campagnes supplémentaires en pilote vont également permettre de compléter ces résultats et de valider les hypothèses.

5. Références bibliographiques

Arora PK, Sharma A, Bae H (2015): Microbial Degradation of Indole and Its Derivatives. *Journal of Chemistry* 2015, 1-13

Bonvin F, Omlin J, Rutler R, Schweizer WB, Alaimo PJ, Strathmann TJ, McNeill K, Kohn T (2013): Direct Photolysis of Human Metabolites of the Antibiotic Sulfamethoxazole: Evidence for Abiotic Back-Transformation. *Environmental Science & Technology* 47, 6746-6755

Carballa M, Fink G, Omil F, Lema JM, Ternes T (2008): Determination of the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. *Water Research* 42, 287-295

Carpeneo R, Mannaioni G, Moroni F (1998): Oxindole, a sedative tryptophan metabolite, accumulates in blood and brain of rats with acute hepatic failure. *Journal of Neurochemistry* 70, 1998-2003

Cavalié P (2014): Analyse des ventes de médicaments en France en 2013. <http://www.ansm.fr>

Daouk S, Chevre N, Vernaz N, Widmer C, Daali Y, Fleury-Souverain S (2016): Dynamics of active pharmaceutical ingredients loads in a Swiss university hospital wastewaters and prediction of the related environmental risk for the aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* 547, 244-253

Ferreira da Silva BF, Jelic A, Lopez-Serna R, Mozeto AA, Petrovic M, Barcelo D (2011): Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* 85, 1331-1339

Gao J, Banks A, Li J, Jiang G, Lai FY, Mueller JF, Thai PK (2017): Evaluation of in-sewer transformation of selected illicit drugs and pharmaceutical biomarkers. *Science of the Total Environment* 609, 1172-1181

Ghattas A-K, Fischer F, Wick A, Ternes TA (2017): Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. *Water Research* 116, 268-295

Gobel A, Thomsen A, McArdell CS, Joss A, Giger W (2005): Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environmental Science & Technology* 39, 3981-3989

Jelic A, Rodriguez-Mozaz S, Barcelo D, Gutierrez O (2015): Impact of in-sewer transformation on 43 pharmaceuticals in a pressurized sewer under anaerobic conditions. *Water Research* 68, 98-108

Jesus Garcia-Galan M, Petrovic M, Rodriguez-Mozaz S, Barcelo D (2016): Multiresidue trace analysis of pharmaceuticals, their human metabolites and transformation products by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 158, 330-341

Katapodis P, Moukouli M, Christakopoulos P (2007): Biodegradation of indole at high concentration by persolvent fermentation with the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 60, 267-272

Kosma CI, Lambropoulou DA, Albanis TA (2017): Photochemical transformation and wastewater fate and occurrence of omeprazole: HRMS for elucidation of transformation products and target and suspect screening analysis in wastewaters. *Science of the Total Environment* 590, 592-601

Lecomte V (2016): Rapport SIPIBEL 2011-2015 : résultats de quatre années de suivi, d'études et de recherches, sur le site pilote de Bellecombe, accessed in www.graie.org/Sipibel/publications

Lonappan L, Brar SK, Das RK, Verma M, Surampalli RY (2016): Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. *Environment International* 96, 127-138

Margot J, Rossi L, Barry DA, Holliger C (2015): A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Water* 2, 457-487

Mengellers MJB, Kleter GA, Hoogenboom LAP, Kuiper HA, VanMiert A (1997): The biotransformation of sulfadimethoxine, sulfadimidine, sulfamethoxazole, trimethoprim and aditoprim by primary cultures of pig hepatocytes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 20, 24-32

Petrie B, Barden R, Kasprzyk-Hordern B (2015): A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research* 72, 3-27

Radke M, Lauwigi C, Heinkele G, Muerdter TE, Letzel M (2009): Fate of the Antibiotic Sulfamethoxazole and Its Two Major Human Metabolites in a Water Sediment Test. *Environmental Science & Technology* 43, 3135-3141

Thai PK, Jiang G, Gernjak W, Yuan Z, Lai FY, Mueller JF (2014): Effects of sewer conditions on the degradation of selected illicit drug residues in wastewater. *Water Research* 48, 538-547

Tuc DQ, Elodie MG, Pierre L, Fabrice A, Marie-Jeanne T, Martine B, Joelle E, Marc C (2017): Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network. *Science of the Total Environment* 575, 758-766

Vanderven A, Vree TB, Kolmer E, Koopmans PP, Vandermeer JWM (1995): Urinary recovery and kinetics of sulfamethoxazole and its metabolites in HIV-seropositive patients and healthy-volunteers after a single oral dose of sulfamethoxazole. *British Journal of Clinical Pharmacology* 39, 621-625

Wang J, Gardinali PR (2014): Identification of phase II pharmaceutical metabolites in reclaimed water using high resolution benchtop Orbitrap mass spectrometry. *Chemosphere* 107, 65-73

Wiest L, Chonova T, Bergé A, Baudot R, Vulliet E (2017), Two-year survey of specific hospital wastewater treatment and its impact on pharmaceutical discharges. *Environmental Science and Pollution Research*, accepted, online