



**HAL**  
open science

# MISE EN OEUVRE DE L'ANALYSE NON CIBLEE COMME OUTIL DE CARACTERISATION DES EAUX

Solène Motteau, Marie Deborde, Bertrand Gombert, Nathalie Karpel Vel  
Leitner

► **To cite this version:**

Solène Motteau, Marie Deborde, Bertrand Gombert, Nathalie Karpel Vel Leitner. MISE EN OEUVRE DE L'ANALYSE NON CIBLEE COMME OUTIL DE CARACTERISATION DES EAUX. Journées Information Eaux 24ème Edition, Oct 2020, Poitiers, France. hal-03063824

**HAL Id: hal-03063824**

**<https://hal.science/hal-03063824>**

Submitted on 22 Dec 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.

## **MISE EN ŒUVRE DE L'ANALYSE NON CIBLEE COMME OUTIL DE CARACTERISATION DES EAUX**

Solène MOTTEAU, Marie DEBORDE, Bertrand GOMBERT,  
Nathalie KARPEL VEL LEITNER

Institut des Milieux et Matériaux de Poitiers IC2MP, UMR 7285, Université de Poitiers,  
ENSI Poitiers, Bâtiment B16, 7, rue Marcel Doré, TSA 41105, 86073 POITIERS Cedex 9  
Tél. : +33 (0)5 49 45 39 16, [solene.motteau@univ-poitiers.fr](mailto:solene.motteau@univ-poitiers.fr)

Mots-clés : analyse non ciblée, eaux usées, eaux de rivières, micropolluants organiques

### **I. INTRODUCTION**

Les micropolluants organiques font l'objet d'une attention renforcée, en raison de leur dissémination et de leurs impacts sur l'environnement et la santé humaine. Les stations d'épuration sont en charge d'éliminer ces micropolluants bien qu'elles ne soient pas conçues pour cet objectif au départ. La réglementation actuelle pour les eaux usées se focalise sur un nombre réduit de micropolluants. Cependant, ils ne représentent qu'une partie limitée de l'ensemble des contaminants dispersés dans les milieux. De plus, des contaminants pertinents vis-à-vis d'une problématique sanitaire ou environnementale donnée peuvent être non identifiés à ce jour. La nécessité d'analyser ces micropolluants s'est donc imposée pour comprendre la présence, l'origine et le devenir de ces molécules dans les stations d'épurations jusque dans le milieu récepteur.

Pour l'étude des micropolluants, l'approche classique des laboratoires est de développer des méthodes d'analyses spécifiques de molécules cibles et de quantifier ces composés dans les différentes matrices environnementales. Ces méthodes robustes sont transposables en routine et les résultats peuvent être utilisés pour la prise de décision. La limitation majeure de ces méthodes est qu'elles se basent sur des listes établies à l'avance. La pertinence et la représentativité des molécules choisies vis-à-vis de la problématique de départ sont à prendre en compte et ce type d'approche débute donc avec un « *a priori* » qui exclut les molécules inconnues, telles que par exemple les produits de transformation issus de réactions de métabolisation au cours de l'épuration biologique. Ainsi des substances potentiellement pertinentes peuvent passer inaperçues lors de ces analyses.

De nouvelles approches se sont développées pour prendre en compte ces limites. En effet l'apport de nouvelles technologies de type spectrométrie de masse haute résolution permet aujourd'hui de faire la distinction entre deux molécules dont le rapport masse sur charge

est très proche. Ces équipements de haute résolution permettent ainsi de réaliser l'analyse d'un grand nombre de composés à la fois et constituent un outil clé dans le développement des stratégies d'analyses non ciblées [1]. Ils permettent de réaliser des analyses sans *a priori*, donc sans listes de molécules définies à l'avance, pour apporter des données face à de nouvelles problématiques, notamment sur les micropolluants. L'analyse non ciblée est un outil pour générer de nouvelles connaissances sur la caractérisation chimique de matrices ainsi que pour identifier des molécules inconnues et pertinentes, pouvant être liées à des questions de toxicité.

L'objectif de ces présents travaux a été de montrer l'intérêt de cette approche non ciblée dans la caractérisation des eaux par l'exemple du développement et de l'application de cette méthode à plusieurs qualités d'eaux (eaux usées, eaux traitées et eaux de rivières).

## II. METHODOLOGIE

### II.1. Sites de prélèvements et méthode de prélèvements

Dans le but de comparer des eaux à l'échelle globale, des échantillons de différentes qualités d'eaux ont été prélevés : deux à la station d'épuration (STEP) de Poitiers et trois dans la rivière Clain dans laquelle sont rejetées les eaux épurées. Les prélèvements à la STEP ont été effectués en entrée dans le bassin de déshuilage/dégraissage et en sortie de la station après clarification. Les prélèvements d'eaux de rivière ont été réalisés à trois endroits : en amont à environ 2 km du rejet des eaux traitées de la STEP, dans le panache du rejet dans la rivière et également en aval à environ 30 m de la zone de rejet. Le mode de prélèvement utilisé pour toutes les eaux est le prélèvement ponctuel ou « grab sample ». Trois campagnes (A, B et C) de prélèvements ont été réalisées pendant un an.

### II.2. Préparation d'échantillons

Dans un premier temps, les échantillons ont été filtrés sur un filtre en microfibre de verre GF/F de porosité 0,7  $\mu\text{m}$  en général après une centrifugation préalable pendant 10 min à 5 000  $\text{t}\cdot\text{min}^{-1}$  lorsqu'une phase particulaire a été jugée trop importante. Pour chacun des échantillons, un volume de 2 mL de solution filtrée a été conservé pour analyse sans autre étape de préparation.

Afin de concentrer les micropolluants et de tenter d'atténuer l'effet matrice, les échantillons ont ensuite été traités par une extraction sur phase solide (SPE) avec successivement trois cartouches différentes dans l'ordre suivant : une phase d'échange d'anions Oasis MAX (Waters), une phase d'échange de cations Oasis MCX (Waters) et une phase Oasis HLB (Waters). Les trois cartouches ont été préalablement conditionnées par 6 mL de méthanol puis par 6 mL d'eau ultra-pure. Après filtration de l'échantillon, les cartouches ont été rincées par 2 mL d'un mélange d'eau ultra pure/hydroxyde d'ammonium 95 :5 et 2 mL d'un mélange eau ultra-pure/acide formique 98 :2 pour, respectivement, la cartouche anionique et la cartouche cationique. Un séchage sous flux d'azote pendant 15 min a ensuite été appliqué sur les cartouches anioniques et cationiques. L'élution a alors été réalisée par 6 mL d'un mélange méthanol/acétate d'éthyle/acide formique 69 :29 :2 ou un mélange méthanol/acétate d'éthyle/hydroxyde d'ammonium 67,5 :27,5 :5 ou 6 mL de méthanol seul, respectivement pour les cartouches Oasis MAX, Oasis MCX et Oasis HLB. Après évaporation à sec, les extraits sont repris par un volume déterminé de phase mobile.

La SPE permet de diminuer les effets matrices et concentrer les échantillons afin d'en augmenter la sensibilité. Néanmoins, l'utilisation de la SPE implique une perte acceptable

de certains composés au cours de la préparation d'échantillons. Cette méthode a été choisie comme compromis entre sensibilité et exhaustivité de l'analyse. La combinaison des cartouches Oasis MAX et Oasis MCX a été précédemment développée par Deeb et al. [2] et mise en application pour de l'analyse non ciblée sur des eaux usées par Stephan et al. [3]. L'ajout d'une cartouche Oasis HLB a été décidé dans le but de retenir les composés pouvant ne pas être retenus par les cartouches échangeuses d'ions. L'utilisation de trois phases différentes permet de pouvoir effectuer également un fractionnement des molécules présentes en fonction des propriétés acide, basique ou neutre des analytes.

### **II.3. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution**

Les analyses ont été réalisées avec une chaîne UHPLC Accela 1250 équipée d'un passeur d'échantillons automatique PAL HTC (Thermo Fisher Scientific) couplée à un spectromètre de masse de type trappe orbital de la gamme Q-Exactive® (Thermo Fisher Scientific, les Ulis, France) avec une source HESI II (Heated Electrospray Ionisation). La colonne utilisée pour les analyses a été une colonne Acquity UPLC HSS T3 (2,1 mm x 100 mm, 1,8 µm, Waters), équipée d'un support de pré-filtre avec des filtres de 0,2 µm. La température du four colonne a été réglée à 30 °C et le débit à 400 µL/min. Le volume injecté a été défini à 20 µL. Une phase mobile composée d'eau ultra-pure (solvant A) et de méthanol (solvant B) avec ajout de 0,1% d'acide formique dans les deux solvants a été utilisée. La phase mobile initiale était composée de 10% de B. Après 1 min d'analyse, des augmentations progressives et linéaires de B jusqu'à 70% puis jusqu'à 100% ont été réalisées respectivement en 5 et 2 min. Un maintien de la phase mobile à 100% de B pendant 2 min a alors été appliqué avant un retour aux conditions initiales en 3 min et le maintien pendant 5 min à ces conditions. Les analyses ont été effectuées en mode Full Scan avec une résolution de 70 000. Les débits de sheath gas et de gaz auxiliaire ont été fixés aux unités arbitraires de respectivement 40 et 20. Les températures du capillaire de transfert et de la source ont été réglées à respectivement 350 °C et 400 °C. La précision en masse après calibration est inférieure à 2 ppm au m/z 200.

### **II.4. Traitement des données par Compound Discoverer**

Les données raw ont été traitées par le logiciel Compound discoverer 3.1. Le traitement des données consiste à l'alignement, la détection et le groupement automatique des pics puis à la comparaison de masses détectées avec des bases de données.

Les échantillons de STEP et de rivières ont été traités séparément. Le workflow utilisé est présenté en Figure 1.

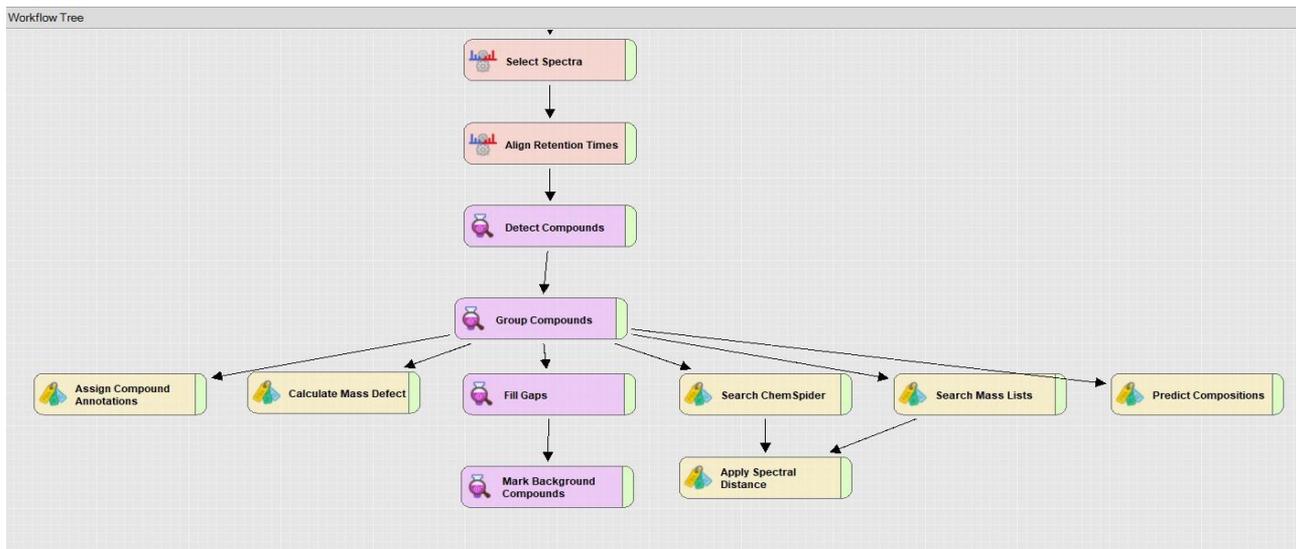


Figure 1 : Capture d'écran du Workflow utilisé pour le traitement des données brutes des échantillons de STEP et de rivières.

Les tolérances en masse ont été fixées à 5 ppm pour les étapes d'alignement, de détection des pics et de fill gaps et à 10 ppm pour l'étape de groupement des pics. La tolérance sur les temps de rétention a été réglée à 1 minute pour l'alignement et 0,4 minutes pour le groupement des pics. C, H, O, N, P, S, Cl et Br ont été pris en compte pour la détection des massifs isotopiques et la prédiction de formules brutes. Les adduits ont été regroupés sur l'adduit  $[M+H]^+$ . Après exécution du workflow, des filtres supplémentaires ont été appliqués sur le tableau listant les signaux détectés afin de diminuer le taux de faux positif. La liste finale a été exportée sur Excel. Une soustraction des blancs analytiques et des blancs de préparation a été effectuée et seuls les pics ayant une intensité cinq fois supérieures aux blancs ont été conservés. Le coefficient de variation de chaque pic a été calculé en prenant en compte l'ensemble des réplicas de chaque échantillon et seuls les pics ayant un coefficient inférieur à 30% ont été gardés. Ces différentes étapes ont permis d'éliminer le bruit et les pics artéfacts, de conserver les pics pouvant être pertinents et de réduire le volume de données.

### III. Résultats expérimentaux

#### III.1. Application de l'analyse non ciblée aux eaux de STEP

L'objectif principal du traitement des eaux usées est de dépolluer les eaux avant de les rendre au milieu naturel et le procédé impacte donc la composition chimique des eaux. L'analyse non ciblée a été utilisée afin de déterminer les changements pouvant s'opérer à plusieurs niveaux : polarité, taille et concentration des molécules présentes ou encore production de nouveaux composés par le procédé de traitement. Après traitement des données, les empreintes combinées des entrées et des sorties de STEP ont été réalisées après calculs des tendances que suivent les aires des signaux détectés. Les empreintes sont la représentation visuelle des signaux détectés où chaque point correspond à un signal avec son temps de rétention et sa masse moléculaire propre. Cinq tendances de variation des aires ont été définies en fonction de la valeur en sortie par rapport à l'entrée : élimination, formation, abattement >50%, augmentation supérieure à 50% et variation comprise entre 0-50%.

Les empreintes d'entrées ont été prises comme références auxquelles ont été ajoutés les signaux apparaissant dans les sorties. La Figure 2 montre les empreintes des échantillons de Poitiers selon les 3 campagnes de prélèvements.

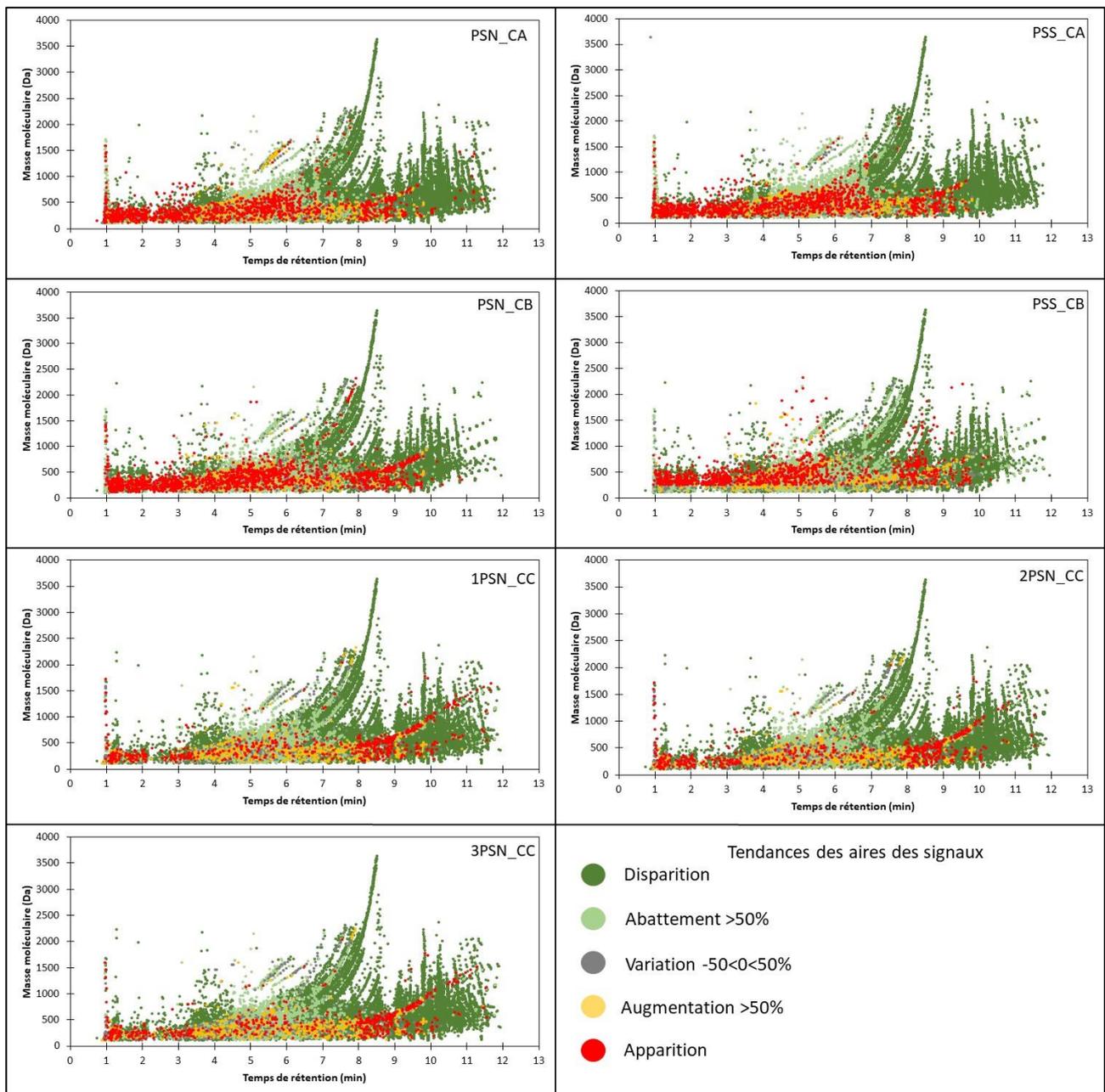


Figure 2 : Empreintes montrant les signaux détectés en fonction de leur tendance associée. Les couleurs vert foncé, vert clair, grise, jaune et rouge représentent les signaux qui, respectivement, disparaissent, diminuent, varient « peu » (entre 0-50%), augmentent et apparaissent. PSN : Poitiers Sortie Nord, CA : campagne A, CB : campagne B, CC : campagne C. Pour la campagne C, 3 prélèvements ont été faits au niveau de la sortie PSN, respectivement : 1PSN, 2 PSN et 3 PSN. Mode positif

Ces figures montrent l'effet du traitement des eaux par la réduction du nombre de signaux entre un échantillon d'entrée et un échantillon de sortie de la station d'épuration, en cohérence avec les objectifs du traitement des eaux usées. En effet, les signaux disparaissant entre l'entrée et les sorties de la STEP représentent la majorité (>70%) des signaux sur cette figure. La seconde tendance la plus représentée est l'abattement supérieur à 50%. Ces 2 tendances comprennent à elles-seules, plus de 94% des signaux initialement présents en entrée. On constate plus particulièrement une élimination accentuée des signaux masse moléculaire supérieure à 600 et des signaux ayant un temps de rétention supérieur à 9 minutes, traduisant ainsi une augmentation de la polarité globale des composés des eaux traitées avec une majorité de molécules de petites ou moyennes

tailles. Les composés moins polaires et plus grands semblent donc mieux éliminés que d'autres composés plus polaires et plus petits. L'adsorption préférentielle sur les boues de ce type de molécules peut contribuer à expliquer ce résultat sur les empreintes [6]. En confrontant l'ensemble des campagnes, on constate la reproductibilité de la gamme de signaux associés à ces tendances d'élimination et d'abattement supérieur à 50% et donc de la reproductibilité du procédé de traitement. Parmi ces catégories de signaux, la présence visible d'homologues dont la signature caractéristique est constituée de plusieurs points de temps de rétention et de masse croissante avec la longueur des chaînes des dits homologues. Certains surfactants ou les polyéthylènes glycols peuvent par exemple donner ce type de motif [7].

Les deux autres importantes tendances sont l'apparition de nouveaux signaux en sorties et l'augmentation à plus de 50% de l'aire en sortie. Ces nouveaux signaux correspondent à de moyennes et faibles masses pour la majorité (>600 Da) et couvrent un panel de polarité au regard de leur dispersion le long de l'empreinte. Ceux-ci constituent entre 17 et 33% du total de signaux en sortie, représentant ainsi une part non négligeable. La comparaison entre ces données obtenues pour les différentes campagnes souligne des variations entre elles, indiquant une reproductibilité plus faible en comparaison de ce qui a été constaté pour les signaux disparaissant ou diminuant fortement. Plusieurs hypothèses sont possibles dont une variation des concentrations de certains de ces signaux sous la limite de détection, la modification de la composition en composés parents de ces nouveaux signaux avant le procédé de traitement en entrée de STEP ou encore des voies réactionnelles variables. Cette figure renseigne donc sur la nature des molécules à cibler dans le cas d'un ajout de traitement complémentaires.

Dans le but de comparer les échantillons selon la dispersion des signaux et l'évolution de la composition selon trois paramètres caractérisant les signaux : temps de rétention, masse moléculaire et logarithme en base 10 de l'aire, les statistiques descriptives (médianes, moyennes, quartiles, valeurs minimales et maximales) ont été représentés sous forme de boîtes à moustaches (Figure 3).

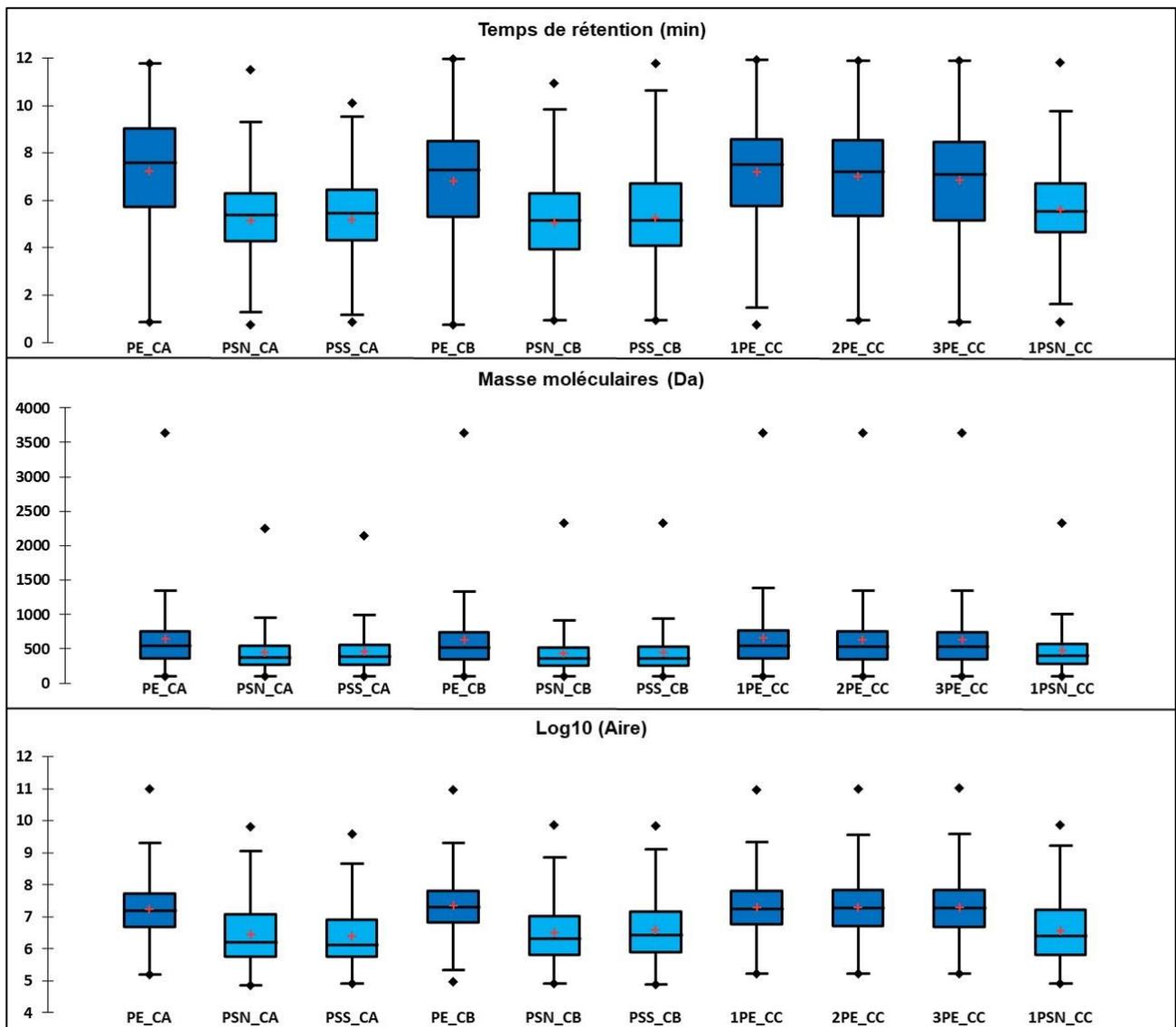


Figure 3 : Box plots ou boîtes à moustaches résumant les échantillons par leurs statistiques descriptives. La croix rouge, les limites inférieures et supérieures de la boîte et les points noirs symbolisent respectivement la moyenne, les premiers et troisièmes quartiles, les valeurs maximales et minimales. Les échantillons d'entrées sont en bleu foncé, les sorties en turquoise. PE : entrée Poitiers, PSN : sortie Nord Poitiers, PSS : sortie SUD Poitiers, CA : campagne A, CB : campagne B, CC : campagne C. Mode positif.

Cette Figure 3, appuie les observations réalisées sur les empreintes :

- augmentation globale de la polarité de la composition des sorties en raison de la diminution des temps de rétention ;
- élimination des plus grandes molécules de par l'abaissement des masses moléculaires ;
- diminution des aires des signaux liée à l'élimination ou la réduction de la concentration d'une grande partie des composés présents en entrée de STEP.

De plus, on peut constater l'homogénéité des résultats d'une part entre les 2 sorties de Poitiers et d'autre part entre les campagnes.

### III.2. Application de l'analyse non ciblée aux eaux de rivières

Avec comme objectif de visualiser l'impact des rejets de la STEP de Poitiers dans les eaux du Clain, trois zones de prélèvements ont été analysés : à 2 km en amont des rejets de la STEP, dans le panache des rejets dans le Clain et enfin en aval immédiat du panache à environ 30 m. Comme avec les échantillons de STEP, les empreintes des eaux de rivières ont été réalisées. Les comparaisons de l'amont et du panache ainsi que du panache et de l'aval ont été effectués. Les empreintes superposées sont présentées en Figure 4.

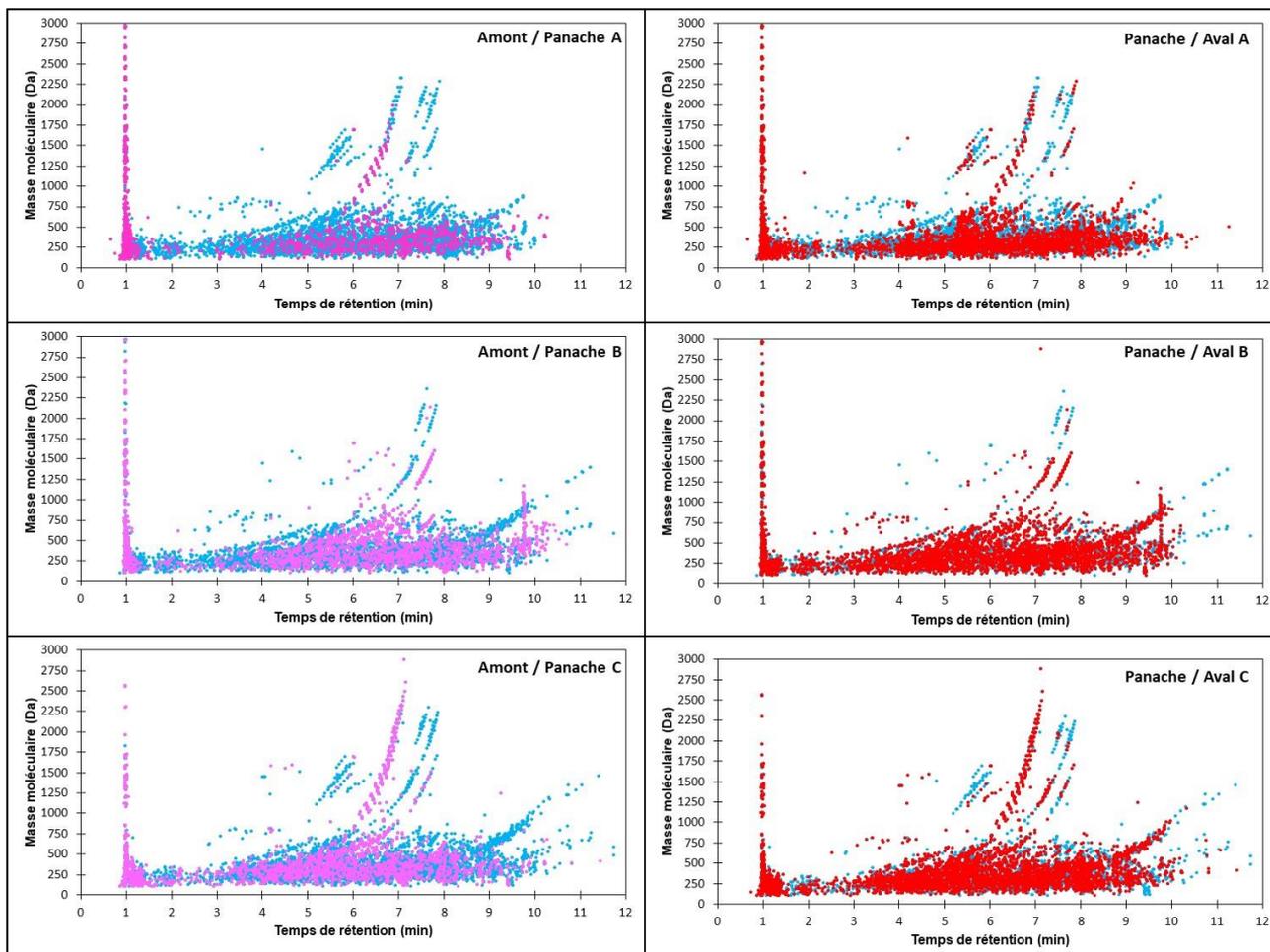


Figure 4 : « Empreintes » des échantillons d'eaux du Clain au niveau du panache du rejet des eaux traitées (point bleus), de l'amont de ce panache (points violets) et de l'aval du panache (points rouges). Empreintes issues d'échantillons concentrés avant analyse (SPE).

La figure 4 montre une augmentation du nombre de signaux visibles entre les deux empreintes amont et panache montrant un apport de nouveaux composés dans les eaux du Clain tandis que la superposition du panache et de l'aval montre une légère diminution du nombre de pics détectés entre panache et aval. Le rejet des eaux traitées apporte donc des composés absents de l'amont d'où une augmentation du nombre de signaux qui tend à diminuer en aval. Le point de prélèvement en aval se situant quelques mètres après le rejet des eaux, l'hypothèse qui peut être émise est celle d'un début d'effet de dilution dans le cours de la rivière, impliquant la diminution de la concentration. Une tendance au retour à une empreinte proche de l'amont peut être supposée avec des molécules dont la concentration passe sous le seuil de détection. Le rejet des eaux traitées, qui répond aux normes actuelles d'épuration, a donc un impact sur la qualité de l'eau de surface recevant ces eaux. Toutefois, en l'absence de données de toxicité, aucune conclusion ne peut être effectuée quant à la relation molécules-toxicité avec l'effet de dilution. Ainsi, des molécules toxiques pour le milieu pourraient être diffusées par la STEP sans nécessairement qu'un

effet de dilution ne soit suffisant pour en diminuer la toxicité. Les empreintes ainsi que des méthodes de priorisation des signaux mettent en relief des signaux dont une étude plus poussée peut aboutir à la détection de nouvelles molécules pertinentes quant à la qualité des eaux.

### III.3. Analyse en composantes principales ACP

L'analyse en composantes principales ACP est une méthode d'exploration de données pouvant servir de première approche pour la réduction du volume de données afin de mettre en évidence des corrélations et des signaux pertinents pour une tentative d'identification. Les figures 5A et 5B représentent les graphiques des individus (observations) et le graphique des individus et des variables (biplot) d'une ACP réalisée sur une campagne d'échantillonnage comprenant des eaux d'entrée de STEP, des eaux de sortie traitées ainsi que des échantillons prélevés dans le Clain au niveau du panache du rejet des eaux traitées dans la rivière, à l'amont et à l'aval.

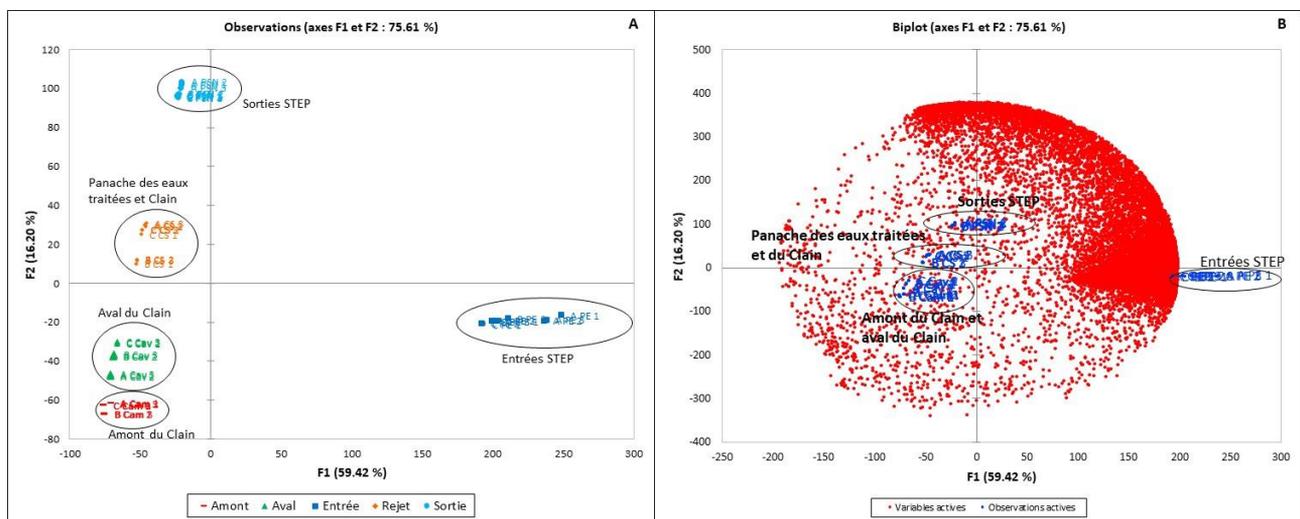


Figure 5A et 5B : En A, graphique des observations représentant les différents échantillons. En B, biplot représentant les échantillons et les variables analysés en mode positif.

Le graphique des observations montre une séparation claire des échantillons d'eaux usées par rapport aux eaux traitées et aux eaux de rivières qui sont à l'opposé du graphique selon l'axe F1. Donc plus la valeur sur l'axe F1 est élevée plus l'échantillon est pollué. L'axe F2 sépare les échantillons des eaux traitées et les points de prélèvement dans la rivière Clain. Plus la valeur est négative plus l'échantillon se rapproche de l'amont du Clain. L'axe F2 représente alors l'évolution de l'ensemble des signaux détectés des sorties de STEP vers l'amont du Clain montrant l'effet de dilution des eaux traitées dans la rivière. Ainsi, la figure 5A indique l'existence de signaux suffisamment discriminants pour observer un regroupement des échantillons de même nature entre eux. L'ACP corrobore les différences exprimées lors de la visualisation des empreintes.

Les échantillons et les signaux peuvent être représentés sur le même graphique, permettant de rechercher des liens entre eux ainsi que des variables significatives impliquées dans la séparation des échantillons en plusieurs groupes. Il est alors possible de désigner les signaux corrélés avec les entrées et ceux corrélés avec les sorties. Ce type de représentation est un outil pour rechercher des signaux potentiellement pertinents et représentatifs des individus et de groupes d'individus. La figure 5B met en évidence un grand nombre de signaux orientés vers les échantillons de l'entrée de la STEP. Ces signaux peuvent être ainsi sélectionnés pour des recherches plus approfondies quant à leur devenir dans les autres échantillons. Les signaux non corrélés pourront eux être écartés. Ces

biplots constituent, dans le cas des ACP sur les eaux traités/non traités un point de départ dans la recherche et l'identification de produits de transformations au cours du procédé de traitement [8].

#### **IV. Conclusions**

La représentation des empreintes ou signatures chimiques des échantillons constitue une première exploration des données. De manière générale, ces empreintes sont des représentations visuelles intéressantes de l'évolution de la composition chimique des prélèvements avec des comparaisons avant et après les traitements qui mettent en relief les changements découlant de ces traitements. Ainsi, les résultats préliminaires obtenus dans ce travail ont montré que la comparaison des empreintes entre les échantillons ainsi que l'ACP permettent de mieux visualiser l'impact des traitements des eaux usées et de leur rejet dans l'environnement. À l'aide d'une approche qui comprend des traitements statistiques et l'analyse des données, l'analyse non ciblée peut être utilisée pour rechercher des molécules dont la présence est corrélée à l'origine de la matrice, pour visualiser les changements entre les échantillons et pour mettre en évidence les caractéristiques d'intérêt. Ces résultats sont un point de départ de la recherche sur les contaminants nouvellement formés ou réfractaires aux traitements. Le développement des méthodes d'analyses non ciblées est une réponse au besoin de connaissances à l'échelle globale de l'évolution de la composition chimique des eaux considérées au sein des procédés de traitement et dans les milieux aquatiques.

#### **Références :**

- [1] Krauss, M., Singer, H. & Hollender, J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, 397, 943–951.
- [2] Deeb, A. A. & Schmidt, T. C. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, 408, 4219–4232.
- [3] Stephan, S., Hippler, J., Köhler, T., Deeb, A.A., Schmidt, T.C., Schmitz, O.J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, 408, 6545–6555.
- [4] Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Oresic, M. *BMC Bioinformatics*. 2010, 11, 395.
- [5] Myers, O. D., Sumner, S. J., Li, S., Barnes, S. & Du, X. *Anal. Chem.* 2017, 89, 8696–8703.
- [6] Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C.S., Ternes, T.A., Thomsen, A., Siegrist, H. *Water Research*. 2006, 40, 1686–1696.
- [7] Thurman, E.M., Ferrer, I., Blotvogel, J., and Borch, T. *Anal. Chem.* 2014, 86, 9653–9661.
- [8] Schollée, J. E., Schymanski, E. L., Avak, S. E., Loos, M. & Hollender, J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, 87, 12121–12129.

Les auteurs remercient l'Union Européenne (FEDER), la Région Nouvelle Aquitaine ainsi que la Communauté Urbaine Grand Poitiers pour leur soutien financier.