



HAL
open science

Applicabilité de la technique de "screening non ciblé" pour la surveillance prospective. Rapport final

Anne Togola, C Guillemain, François Lestremou, Charlotte Coureau, C Margoum, Coralie Soulier

► **To cite this version:**

Anne Togola, C Guillemain, François Lestremou, Charlotte Coureau, C Margoum, et al.. Applicabilité de la technique de "screening non ciblé" pour la surveillance prospective. Rapport final. BRGM/RP-70108-FR, Bureau de recherches géologiques et minières (BRGM); INERIS; IRSTEA. 2020. <hal-04346607>

HAL Id: hal-04346607

<https://hal.science/hal-04346607v1>

Submitted on 15 Dec 2023

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.



HAL Authorization

APPLICABILITE DE LA TECHNIQUE DE « SCREENING NON CIBLE » POUR LA SURVEILLANCE PROSPECTIVE

A. Togola, C. Guillemain, F. Lestremau, C. Coureau, C.
Margoum et C. Soulier

Avec la collaboration de S. Lardy-Fontan

Décembre 2020

Document final

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du Contrat de recherche et développement relatif au programme de travail 2018-2020 du Réseau national de Surveillance Prospective de la qualité chimique des milieux aquatiques entre OFB / BRGM / CNRS / ISA / Ifremer/ Ineris / INRAE / LNE / Université de Bordeaux et du programme AQUAREF.

Auteur (s) :

Anne Togola

BRGM

a.togola@brgm.fr

Céline Guillemain

INRAE

celine.guillemain@irstea.fr

François Lestremau

INERIS

Francois.lestremau@ineris.fr

Charlotte Coureau

BRGM

c.coureau@brgm.fr

Christelle Margoum

INRAE

christelle.margoum@irstea.fr

Coralie Soulier

BRGM

c.soulier@brgm.fr

Sophie Lardy-Fontan

LNE

Sophie.lardy-fontan@lne.fr

Vérification du document :

Jean-Philippe GHESTEM

BRGM

jp.ghestim@brgm.fr

Les correspondants

AFB : Pierre-François STAUB, pierre-francois.staub@ofb.gouv.fr

Référence du document : A. Togola, C. Guillemain, F. Lestremau, C. Coureau, C. Margoum, C. Soulier ; APPLICABILITE DE LA TECHNIQUE DE « SCREENING NON CIBLE » POUR LA SURVEILLANCE PROSPECTIVE. Réseau de Surveillance prospective-AQUAREF ; Rapport BRGM/RP-70108-FR.

Droits d'usage :	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

RESUME

Ce rapport présente les actions menées dans le cadre du Réseau français de Surveillance Prospective concernant les approches de screening non ciblé ou NTS. L'objectif de cette étude était d'évaluer, sur des échantillons réels et un panel d'échantillons représentatifs, l'applicabilité de ces approches (par le traitement suspect des données) pour acquérir de nouvelles connaissances sur la présence de micropolluants organiques dans des cours d'eau.

Le premier objectif est méthodologique : les approches, mises en œuvre par 3 laboratoires de recherche, sont comparées sur le même jeu d'échantillons issus de 20 stations de surveillance d'eau de surface, via deux approches d'échantillonnage : ponctuel (prélèvement d'eau et extraction sur phase solide) et intégratif (échantillonneurs intégratifs passifs de type POCIS-HLB).

Sur le plan méthodologique et de l'assurance qualité, l'action a mis en évidence des besoins métrologiques indispensables pour une mise en œuvre fiable de ces techniques de screening non ciblé (blanc, contrôles, traceurs). La comparaison des résultats obtenus par les 3 laboratoires a permis l'identification des critères clefs permettant d'assurer la validité et la comparabilité des données produites.

La complémentarité de différentes approches de traitements des données brutes et des différentes typologies de bases de données utilisables pour identifier les composés d'intérêt est mise en évidence. Cette étude montre le compromis nécessaire entre le temps de traitement et le degré de confiance dans les résultats obtenus. La possibilité d'utiliser de manière successive ces différentes approches est évaluée et permet d'optimiser les traitements tout en améliorant la confiance dans les résultats obtenus. L'utilisation à visée quantitative des analyses NTS est étudiée et montre la faisabilité d'obtenir une estimation de la concentration pour des composés d'intérêt.

D'un point de vue opérationnel, afin de faciliter la compréhension des rendus de résultats et d'intégrer au mieux l'incertitude associée aux différentes voies d'identification d'une substance, des schémas de décision sont proposés et éprouvés, permettant une communication transparente entre producteurs de données et utilisateurs.

Le second objectif vise l'**acquisition de connaissances nouvelles**. L'étude a montré qu'il était possible, de mettre en évidence jusqu'à 80% de molécules supplémentaires par rapport aux listes de substances réglementaires ou régulièrement surveillées. La réutilisation des données acquises a été éprouvée et permet d'améliorer, au fur et à mesure de l'acquisition de nouvelles informations, les connaissances. Cette approche permet donc d'améliorer la surveillance en l'orientant vers des molécules effectivement présentes.

Mots clés (thématique et géographique) :

Screening non ciblé, polluants émergents, méthodologie, surveillance prospective, FRANCE

APPLICABILITY OF NON TARGET ANALYSIS APPROACHES FOR PROSPECTIVE MONITORING

A. Togola, C. Guillemain, F. Lestremau, C. Coureau, C. Margoum, C. Soulier

Abstract

This report presents the actions carried out within the framework of the French Prospective Surveillance Network. The objective of this study was to assess, on real samples and a representative sample panel, the applicability of non-targeted screening approaches (as suspected data processing) to acquire new knowledge. The approaches, implemented by 3 research laboratories, are compared on the same set of 20 measuring stations, via two sampling approaches: spot sampling (water sampling and solid phase extraction) and integrative sampling (passive integrative samplers of the POCIS-HLB type). The results are discussed according to different aspects:

Methodological and quality assurance: by highlighting the metrological needs related to the use of these non-targeted screening techniques (blank, controls, tracers etc...). The comparison of the results obtained by the 3 laboratories allowed the identification of key criteria to ensure the validity and comparability of produced informations. The complementarity of the processing approaches of raw NTS data and the different types of databases that can be used to identify the compounds of interest is highlighted. This study shows the necessary compromise between processing time and degree of confidence in the obtained results. The possibility of successively using these different approaches is evaluated and makes it possible to optimize treatments while improving confidence in the results obtained. The quantitative use of NTS analyses is proven and shows the feasibility of obtaining an estimate of the concentration for compounds of interest.

From an operational point of view, in order to facilitate the understanding of the results reports and to better integrate the uncertainty associated with the different ways of identifying a substance, decision schemes are proposed and tested in this study, allowing transparent communication between data producers and users.

Finally, **from a "contribution to the acquisition of new knowledge"** point of view, this study allowed the identification of new substances of interest in comparison with conventional monitoring, sometimes with up to 80% of newly identified substances on the monitoring stations. This approach therefore makes it possible to improve surveillance by orienting it towards molecules actually present.

Key words (thematic and geographical area):

Non target screening, emerging contaminant, methodology, France

APPLICABILITE DE LA TECHNIQUE DE "SCREENING NON CIBLE" POUR LA SURVEILLANCE PROSPECTIVE



Rapport final
BRGM/RP-70108-FR
Décembre 2020

APPLICABILITE DE LA TECHNIQUE DE « SCREENING NON CIBLE » POUR LA SURVEILLANCE PROSPECTIVE

Rapport final
BRGM/RP-70108-FR
Décembre 2020

Étude réalisée dans le cadre des opérations
de Service public du BRGM

A. Togola, C. Guillemain, F. Lestremau, C. Coureau, C. Margoum, C. Soulier
Avec la collaboration de **S. Lardy-Fontan**

Vérificateur : Nom : JP GHESTEM Fonction : Chef de projet Date : 16/01/2021 Signature : 	Approbateur : Nom : L. Amalric Fonction : Resp. Unité Date : 19/01/2021 Signature : 
--	---

**Le système de management de la qualité et de l'environnement
est certifié par AFNOR selon les normes ISO 9001 et ISO 14001.**

SOMMAIRE

1	Contexte et objectifs de l'étude	17
2	Matériel et méthodes	18
2.1	SITES INVESTIGUES.....	18
2.2	ECHANTILLONNAGE.....	19
2.3	EXTRACTION.....	20
2.3.3.1	Blancs POCIS.....	22
2.3.3.2	Blancs d'extraction SPE.....	22
2.3.3.3	Traceurs d'extraction et d'injection	23
2.3.3.4	Contrôles qualité au cours de l'analyse.....	24
2.4	ANALYSES.....	24
2.5	TRAITEMENT DES DONNEES	27
2.5.4.1	Traitement suspect avec utilisation de bases de données (BDD) existantes.....	30
2.5.4.2	Traitement suspect avec utilisation d'une BDD externe établie avec des molécules d'intérêts	32
2.5.4.3	Approche semi quantitative	35
3	Bilan des contrôles qualité.....	37
3.1	TRACEURS D'EXTRACTION ET D'INJECTION.....	37
3.1.1.1	Identification des traceurs par les laboratoires	37
3.1.1.2	Suivi des traceurs dans les échantillons.....	39
3.1.2.1	Suivi des aires des traceurs internes.....	45
3.1.2.2	Suivi des temps de rétention des traceurs.....	46
3.1.2.3	Suivi des rapports m/z des traceurs	46
3.2	TRAITEMENT DES BLANCS.....	47
3.2.1.1	Molécules identifiées par analyse LC-HRMS.....	47
3.2.1.2	Molécules identifiées par analyse GC-HRMS.....	53
4	Identification des molécules recherchées avec les BDD pré-existantes	59
4.1	CARACTERISTIQUE DES MOLECULES RECHERCHEES ET DETECTEES	59

4.1.1.1	Identification par le laboratoire 1	59
4.1.1.2	Identification par le laboratoire 2	59
4.1.1.3	Identification par le laboratoire 3	61
4.1.1.4	Bilan des identifications par analyse LC-HRMS	61
4.2	CARACTERISTIQUES DES MOLECULES DETECTEES PAR METHODE D'ECHANTILLONNAGE	63
4.2.1.1	Molécules identifiées en LC-HRMS	63
4.2.1.2	Molécules identifiées en GC-HRMS	65
4.2.3.1	Molécules recherchées et non identifiées	70
4.2.3.2	Molécules recherchées et identifiées	70
4.2.3.3	Intérêt des différentes approches	74
5	Résultats : molécules identifiées par traitement suspect avec BDD interne	75
5.1	MOLECULES IDENTIFIEES	75
5.1.1.1	Par type de substance	75
5.1.1.2	Répartition des molécules identifiées	75
5.2	PROFIL PAR SITE	79
6	Apport du screening suspect à partir d'une BDD externe établie <i>a</i> <i>posteriori</i> .	81
7	Résultats des essais de quantification	85
7.1	TRAITEMENT QUANTITATIF DES DONNEES NTS	85
7.2	UTILISATION DES TRACEURS	85
7.3	COMPARAISON DES APPROCHES DE QUANTIFICATION	87
8	Conclusions de l'étude	89

Liste des annexes :

Annexe 1 : Détails des méthodes d'analyses utilisées par les 3 laboratoires.....	94
Annexe 2 : Détails de sélection de la liste des molécules d'intérêt pour traitement suspect des empreintes NTS par les laboratoires 1 et 2.	98
Annexe 3 Suivi du traceur d'extraction imidaclopride d4 dans les échantillons eau, POCIS et blanc par laboratoire	102
Annexe 4 : Suivi de traceurs d'injection dans les blancs laboratoires et les échantillons d'eau et de POCIS.....	104
Annexe 5 : Variation des temps de rétention pour 5 traceurs d'extraction	109
Annexe 6 : Variation des m/z pour l'ion moléculaire monoisotopique de 5 traceurs d'extraction	112
Annexe 7 : Variation des temps de rétention pour les étalons internes en GC-HRMS	115
Annexe 8 : Variation des m/z pour l'ion de base des étalons internes par GC-HRMS pour la totalité des échantillons (blanc laboratoire, eau, POCIS).....	117

Liste des figures :

Figure 1 : Localisation des sites investigués, d'après (4), modifié.....	18
Figure 2 : Schématisation des étapes d'extraction des POCIS	20
Figure 3 : Schématisation des étapes d'extraction des échantillons eaux.....	21
Figure 4: Logigramme utilisé pour la restitution des résultats LC-HRMS. BDD, Base de données ; m/z, masse exacte ; Tr, Temps de rétention ; HR, Haute résolution, BR, Basse résolution	29
Figure 5: Logigramme utilisé pour la restitution des résultats GC-HRMS.	29
Figure 6 : Bilan des traitements appliqués aux empreintes NTS par chaque laboratoire.....	29
Figure 7 : Répartition par famille des molécules recherchées pour analyse en LC-HRMS, tout laboratoire/BDD confondu	31
Figure 8 : Nombre de composés recherchés uniques et communs à plusieurs bases de données pour analyse en LC-HRMS.....	31
Figure 9 : Répartition des composés selon la réglementation, recherchés pour analyse en LC-HRMS	32
Figure 10 : Traceurs d'extraction et d'injection identifiés en analyse LC-HRMS en mode d'ionisation positif selon les laboratoires d'analyses. Les résultats reportés incluent les traceurs d'injection, à gauche des graphiques, et les traceurs d'extraction à droite.	37
Figure 11. Traceurs d'extraction et d'injection identifiés en analyse LC-HRMS en mode d'ionisation négatif selon les laboratoires d'analyses.....	39
Figure 12. Suivi du traceur d'extraction aténolol D7 en analyse LC-HRMS en mode d'ionisation positif dans les échantillons SPE, POCIS et blanc par laboratoire. 41	
Figure 13. Suivi du traceur d'extraction benzotriazole d4 en analyse LC-HRMS en mode d'ionisation négatif dans les échantillons eau, POCIS et blanc par laboratoire 42	
Figure 14. Boîte à moustache de la variation du rapport m/z de l'ion monoisotopique de certains traceurs lors de la mesure des échantillons et des blancs (n=.26.) (En trait pointillé noir, la valeur théorique) (mode positif pour aténolol d7, imidaclopride d4, oxazepam d5, mode négatif pour benzotriazole d4 et méthylparabène 6C13)	43
Figure 15. Traceurs d'extraction et d'injections identifiés en GC-HRMS, % de détection par type d'échantillon	44
Figure 16. Suivi des traceurs d'extraction chlorpyrifos d10, DEHP d4 et du traceur d'injection phénanthrène d10 dans les échantillons eau, POCIS et blanc par GC-HRMS 45	
Figure 17 : Nombre de molécules identifiées aux niveaux 1, 2B et 2A dans les blancs par analyse LC-HRMS	47
Figure 18 : Nombre de composés identifiés aux niveaux 1, 2A et 2B dans les blancs laboratoire par analyse GC-HRMS.....	53
Figure 19 : Répartition par famille des molécules identifiées en LC-HRMS par le Laboratoire 159	
Figure 20 : Répartition par famille des molécules identifiées selon le niveau de confiance associé en LC-HRMS par le Laboratoire 2.....	60
Figure 21 : Répartition par famille des molécules identifiées selon le niveau de confiance associé en LC-HRMS par le Laboratoire 3.....	61
Figure 22 : Répartition par famille des molécules identifiées en LC-HRMS, tous labos confondus.	62
Figure 23 : Répartition par famille des molécules identifiées en GC-HRMS	63

Figure 24: Nombre de molécules identifiées par le laboratoire 1 dans les POCIS et les SPE sur tous les sites par analyse LC-HRMS en modes d'ionisation positif et négatif	64
Figure 25 : Nombre de molécules identifiées par le laboratoire 2 dans les POCIS et les SPE sur tous les sites par analyse LC-HRMS en modes d'ionisation positif et négatif	64
Figure 26: Nombre de molécules identifiées par le laboratoire 3 dans les POCIS et les SPE sur tous les sites par analyse LC-HRMS en mode d'ionisation positif	64
Figure 27 : Nombre de molécules identifiées par le laboratoire 2 dans les POCIS et les SPE sur tous les sites par analyse GC-HRMS	65
Figure 28 : Complémentarité des analyses GC-HRMS et LC-HRMS (modes d'ionisation positif et négatif), résultats obtenus par le laboratoire 2	66
Figure 29 : Pourcentage de molécules identifiées par les 3 laboratoires sur les différents sites en analyse LC-HRMS, modes d'ionisation positif (ESI+) et négatif (ESI-), et GC-HRMS.....	67
Figure 30 : Comparaison des identifications, exemple de la carbamazépine, extrait POCIS.....	70
Figure 31: Comparaison des identifications, exemple de la Carbamazépine, extrait SPE	71
Figure 32 : Intensité des signaux, par station/laboratoire, exemple de la carbamazépine, extrait SPE.	71
Figure 33: Intensité des signaux, par station/laboratoire, exemple de la carbamazépine, extrait POCIS	71
Figure 34 : Comparaison des identifications par approche, exemple du diclofénac, extrait POCIS	72
Figure 35 : Intensité des signaux en ESI pos, par station/laboratoire, exemple du diclofénac, extrait POCIS	72
Figure 36 : Nombre de détection par laboratoire, exemple du 2,4 D, extrait SPE	73
Figure 37 : Intensité des signaux, par station/laboratoire, exemple du 2,4 D, extrait SPE	73
Figure 38 : Comparaison des détections par BDD interne (niv 1/2B) ou externe (2A)	74
Figure 39: Famille des composés détectés dans les POCIS et les SPE pour les analyses en GC et LC avec tous les modes d'ionisation, avec les niveaux d'identification 1, 2A et 2B et sans les deutérés par les 3 labos (n = 413 composés)	75
Figure 40 : Pourcentage de molécules identifiées, toutes matrices confondues, par les 3 laboratoires en fonction des diverses listes réglementaires.....	76
Figure 41: Comparaison des composés réglementés les plus détectés (dans au moins 20% des cas) dans les POCIS et les SPE sur les 20 sites étudiés.....	77
Figure 42 : Comparaison des composés émergents les plus détectés (dans au moins 50% des cas par échantillonnage) dans les POCIS et les SPE sur les 20 sites étudiés.	78
Figure 43 : profils par sites nombres molécules détectées en GC et LC en ESI + et ESI - , tout niveau de confiance confondu.....	79
Figure 44 : Nombre de composés détectés soumis à réglementation ou non par site par les 3 labos pour l'analyse en GC et LC en ESI (+) et ESI(-)	80
Figure 45 : Nombre de composés détectés par sites selon la famille d'usage, par les 3 labos pour l'analyse en GC et LC en ESI (+) et ESI(-).....	80
Figure 46 : Entités détectées, identifiées sans étalons et avec étalons. En noir, les entités identifiées sans étalons ; En rouge, les entités confirmées avec étalons analytiques. La taille des cercles et triangles est en lien avec le niveau de confiance accordé à l'identification.	83

- Figure 47 : Comparaison des résultats de quantification obtenus par analyse ciblée, NTS et NTS corrigée par les traceurs : extrait de POCIS, site de la Tréboul..... 87
- Figure 48 : Comparaison des résultats de quantification obtenus par analyse ciblée, NTS et NTS corrigé par les traceurs : extrait de POCIS, site de la Tréboul..... 88

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Sites échantillonnés en métropole (METRO) et Département d’Outre-Mer (DROM), en cours d’eau ou eaux côtières.	19
Tableau 2 : Sites sur lesquels des blancs terrains POCIS ont été exposés	22
Tableau 3. Traceurs utilisés pour les analyses par LC-HRMS. Les concentrations sont exprimées en ng/L dans l’extrait regroupé (aussi bien eau que POCIS).	23
Tableau 4. Traceurs utilisés pour les analyses par GC-HRMS.....	24
Tableau 5 : Conditions analytiques utilisées par les 3 laboratoires	25
Tableau 6 : Paramètres chromatographiques GC et spectrométriques.....	26
Tableau 7 : Nombre de molécules contenues dans les 5 bases de données pré-existantes utilisées pour le traitement suspect en LC-HRMS	30
Tableau 8 : Nombre de molécules contenues dans les 2 bases de données pré-existantes utilisées pour le traitement suspect en GC-HRMS	32
Tableau 9 : Liste des molécules d’intérêt sélectionnées pour le traitement suspect par les laboratoires 1 et 2	34
Tableau 10 : Liste des molécules considérées dans l’approche semi-quantitative.	36
Tableau 11 : Molécules identifiées, aux niveaux 1,2B et 2A, dans les blancs laboratoires par analyse LC-HRMS (n est le nombre d’identification par niveau d’identification)50	
Tableau 12 : Molécules identifiées, aux niveaux 1,2B et 2A, dans les blancs laboratoires par analyse GC-HRMS (n est le nombre d’identification par niveau d’identification)55	
Tableau 13 : Liste des molécules recherchées par plusieurs approches (n≥4).....	68
Tableau 14 : Nombre de candidats identifié dans les échantillons à partir de la BDD externe établie <i>a posteriori</i> , nombre de candidats confirmés par l’injection de l’étalon et nombre de faux-positifs. (nd : non détecté et ni : étalon non injecté).	84
Tableau 15 : Association des traceurs aux molécules d’intérêt	86

1 Contexte et objectifs de l'étude

Après des travaux de cadrage lors des programmes AQUAREF 2016-2018, portant, sur la description des outils¹, les initiatives européennes existantes², et une note de positionnement sur l'implémentation de l'analyse non ciblée (NTS) dans le champ de la surveillance³, ce travail présente la première étude de faisabilité sur le screening non ciblé sur une large campagne de surveillance. Ce travail s'inscrit dans le cadre du réseau national de surveillance prospective (RSP). L'objectif de cette action est de démontrer l'intérêt que peut avoir l'utilisation des données de screening non ciblé de type « suspect screening » dans l'identification de nouvelles substances d'intérêt. Depuis plusieurs années, différentes actions décrivent comment ces nouveaux outils pourraient apporter de nouvelles informations dans la connaissance environnementale. Cependant, ces approches de screening non ciblé et leurs utilisations dans les études environnementales sont encore très récentes et il est nécessaire d'éprouver leur mise en œuvre sur un nombre significatif d'échantillons, dans des conditions opérationnelles.

Cet exercice a pour but de démontrer l'apport de ces approches, de tester les méthodologies analytiques et d'identifier des points d'attention que ce soit dans les étapes de laboratoire (extraction/ analyses), de traitement des données mais aussi lors de la restitution des résultats et des échanges de données.

Ce travail étant orienté principalement sur les aspects méthodologiques, une attention toute particulière a été portée sur la mise en œuvre de nombreux points de contrôle. Les analyses ont été réalisées par 3 laboratoires (BRGM, INERIS et INRAE), ce qui permet à la fois de comparer les pratiques mais aussi d'étendre le champ des molécules investiguées.

Cette étude a bénéficié de la logistique d'un autre projet mené conjointement dans le réseau de surveillance prospectif et relatif à l'applicabilité de l'échantillonnage passif dans la surveillance.

Ce rapport a pour objectif d'effectuer un bilan et un retour d'expérience opérationnel de ces campagnes d'analyse ayant mis en œuvre la technique NTS : difficultés, points d'attention pour de futures campagnes. Il présente un aperçu des résultats nouveaux apportés par l'analyse non-ciblée non seulement sur les substances réglementaires et/ou régulièrement suivies, mais aussi et surtout sur de nouvelles substances non actuellement réglementées et/ou pas ou peu étudiées.

¹ Comparaison et impact de différentes méthodes d'extraction d'eau sur l'analyse non ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution 2020 AQUAREF

² Synthèse des actions européennes et nationales sur les techniques d'analyse chimique non ciblée. 2017-2018-2019-AQUAREF

³ Note de positionnement en appui au Réseau de Surveillance Prospective. 2017. Togola A., Tixier C., Lestremau F., Miège C., Lardy-Fontan S. AQUAREF.

2 Matériel et méthodes

2.1 SITES INVESTIGUES

Les sites investigués sont identiques à ceux de la campagne relative aux échantillonneurs passifs⁴. Ainsi, 20 sites répartis dans toute la France en métropole et dans les DROM ont été étudiés (figure 1). Ces différents sites représentaient aussi différentes pressions d'exposition (tableau 1).

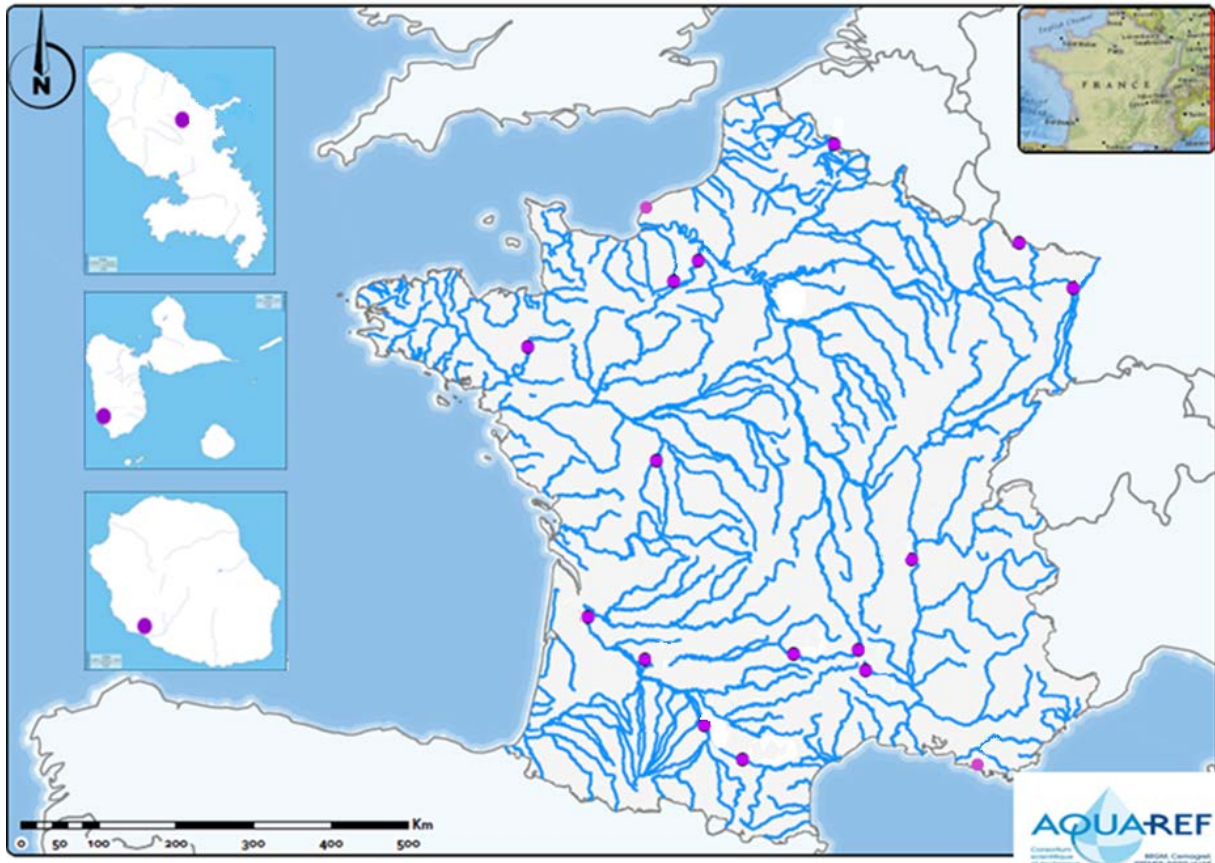


Figure 1 : Localisation des sites investigués, d'après (4), modifié

⁴ B. Mathon, A. Togola, N. Mazzella, S. Lardy-Fontan, A. Dabrin, J-P.Ghestem, C. Tixier, J-L. Gonzalez, C. Miège – Surveillance prospective – évaluation de la pertinence des échantillonneurs intégratifs passifs (EIP) pour la surveillance des milieux aquatiques –Campagnes in situ mises en œuvre - Rapport AQUAREF 2017 – 18 p.

Tableau 1 : Sites échantillonnés en métropole (METRO) et Département d'Outre-Mer (DROM), en cours d'eau ou eaux côtières.

Ordre	Code station	Nom de la station	Date début campagne	Date fin campagne	Type de station	Métropole/ DROM
1	ALL	L'Allier lieu-dit de Chabaliér	18 avril 2018	2 mai 2018	Référence	METRO
2	BOR	La Boralde Flaujaguèse en amont d'Espalion	10 avril 2018	24 avril 2018	Référence	METRO
3	LUE	Le Luech à Génolhac	18 avril 2018	2 mai 2018	Référence	METRO
4	ANT	Antifer	24 mai 2018	7 juin 2018	Eau côtière	METRO
5	LAZ	La baie du Lazaret (Rade Toulon)	23 avril 2018	16 mai 2018	Eau côtière	METRO
6	GOL	L'étang du Gol	6 juin 2018	20 juin 2018	Eau côtière	DROM
7	GAL	Grand Galion	7 mars 2018	22 mars 2018	COURS D'EAU	DROM
8	PER	Le Pérou	2 mars 2018	21 mars 2018	COURS D'EAU	DROM
9	ITO	L'iton a Normanville	27 mars 2018	10 avril 2018	COURS D'EAU	METRO
10	JAL	La Jalle de Blanquefort	21 novembre 2017	5 décembre 2017	COURS D'EAU	METRO
11	ROS	La Rosselle à Petite-Rosselle	26 mars 2018	9 avril 2018	COURS D'EAU	METRO
12	SOU	La Souffel à Mundolsheim	27 mars 2018	10 avril 2018	COURS D'EAU	METRO
13	VIL	La Vilaine à Guichen	22 novembre 2017	6 décembre 2017	COURS D'EAU	METRO
14	CLA	Le Clain en aval de Poitiers	21 novembre 2017	5 décembre 2017	COURS D'EAU	METRO
15	GIE	Le Gier à Givors	17 janvier 2018	31 janvier 2018	COURS D'EAU	METRO
16	ESC	L'Escaut canalisé Fresnes sur Escaut	16 mai 2018	31 mai 2018	COURS D'EAU	METRO
17	HER	L'Hers mort au niveau de St-Sauveur	22 mai 2018	5 juin 2018	COURS D'EAU	METRO
18	RIS	La Risle a Ambenay 2	28 mars 2018	11 avril 2018	COURS D'EAU	METRO
19	TOL	Le Tolzac à Varès	22 mai 2018	5 juin 2018	COURS D'EAU	METRO
20	TRE	Tréboul à Castelnaudary	10 avril 2018	24 avril 2018	COURS D'EAU	METRO

2.2 ECHANTILLONNAGE

Pour chaque campagne, des échantillons de prélèvements passifs par POCIS et par prélèvements ponctuels ont été effectués sur les 20 sites suivis. Les dates des campagnes sont précisées dans le Tableau 1.

2.2.1 Echantillonnage passif

Sur chaque station des duplicats de POCIS (type pharmaceutique) ont été exposés pendant 15 jours. Des blancs terrain ont été réalisés sur certaines station (cf paragraphe 2.3.3.1). Les duplicats ont été extraits séparément, puis regroupés pour transmettre à chaque laboratoire un aliquote homogène par station (Figure 2).

2.2.2 Echantillonnage ponctuel

Des prélèvements d'eau (2 L) ont été effectués au dépôt T0 et retrait T15 des POCIS. Ces échantillons d'eau ont été congelés dès réception. Les prélèvements ont ensuite été

décongelés avant d'être regroupés afin de constituer un échantillon composite, combinaison d'un volume identique des prélèvements T0 et T15 (Figure 3).
Il n'y a pas eu de blancs liés aux prélèvements ponctuels d'eau réalisés au cours de cette étude.

2.3 EXTRACTION

La réception des échantillons et l'ensemble des étapes d'extraction ont été réalisés dans un seul laboratoire.

2.3.1 Extractions des POCIS

Chaque POCIS est démonté afin de récupérer la phase OASIS HLB. Celle-ci est transférée dans une cartouche avec de l'eau MilliQ puis séchée sous vide environ une heure.

L'élution est ensuite réalisée avec 5mL de méthanol puis 5mL d'un mélange 50/50 (v:v) de méthanol/dichlorométhane et enfin 5mL de dichlorométhane. Les solutions de traceurs d'extraction LC et GC sont ajoutées à l'éluat. Leur liste et les concentrations dans l'extrait de chaque échantillon sont données dans les Tableau 3 et Tableau 4.

L'extrait est ensuite évaporé sous vide sans évaporation à sec jusqu'à obtenir un volume de 1mL. Le facteur de concentration est de 30 entre le volume de l'éluat et celui de l'extrait.

Les extraits de chaque duplicat sont regroupés afin de constituer un extrait regroupé de POCIS par site, puis partagé volumétriquement entre les 3 laboratoires.

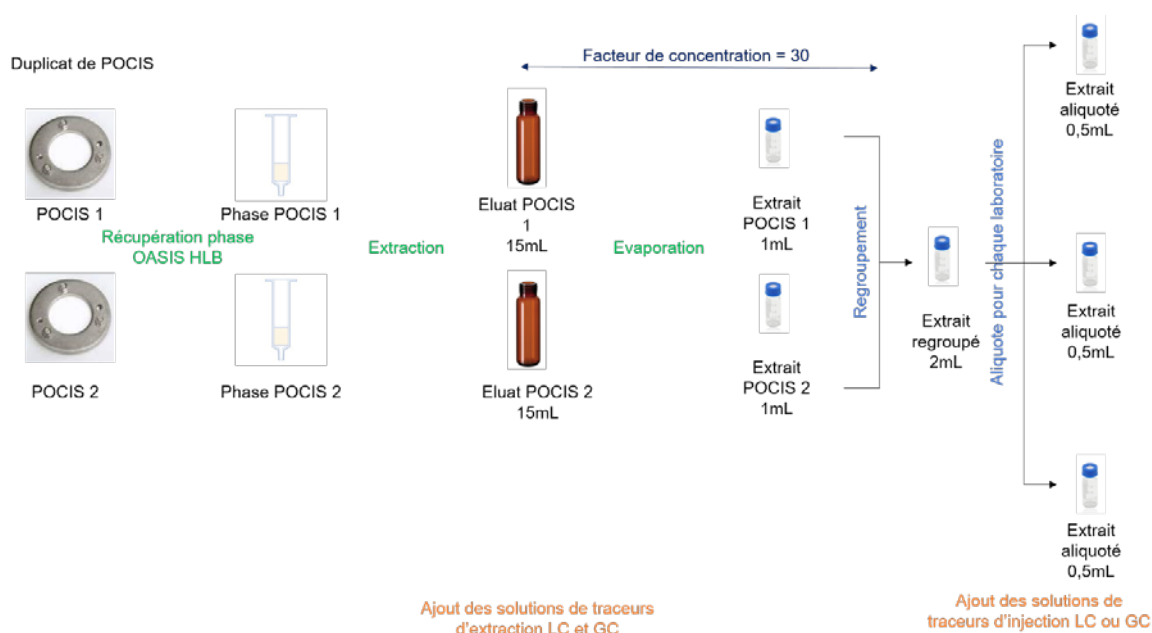


Figure 2 : Schématisation des étapes d'extraction des POCIS

2.3.2 Extraction des échantillons d'eau

Les échantillons ponctuels d'eau (1,5L du mélange des échantillons T0 et T15 d'un même site), sont filtrés sur des filtres GF/F préalablement pyrolysés dans des unités de filtration en verre. L'échantillon composite est ensuite divisé en 3. Pour chaque sous échantillon (Figure 3), le pH est ajusté à $pH7 \pm 0,5$, avec de l'acide chlorhydrique dilué, et les solutions de traceurs

d'extraction LC et GC sont ajoutées. Leur liste et les concentrations dans l'extrait de chaque échantillon composite (Figure 3) sont données dans les Tableau 3 et Tableau 4.

Les extractions sont réalisées sur des cartouches OASIS HLB 200 mg ; cette phase est de même nature que celle des POCIS exposés. Celles-ci sont préalablement conditionnées avec 5mL de dichlorométhane, puis 5mL de méthanol et enfin 5mL d'eau HPLC à pH7 avant de faire percoler les 500mL d'échantillon composite. La phase OASIS HLB est ensuite séchée pendant environ 1 heure sous vide. L'élution est réalisée avec le même protocole d'élution que celui des POCIS soit : 5mL de méthanol, puis 5mL d'un mélange 50/50 (v:v) de méthanol/dichlorométhane puis 5mL de dichlorométhane.

Les éluats des sous échantillons composites sont rassemblés avant évaporation sous vide (éluat regroupé, Figure 3) jusqu'à 1,5mL (extrait regroupé), puis aliquotés (en volume) entre 3 laboratoires.

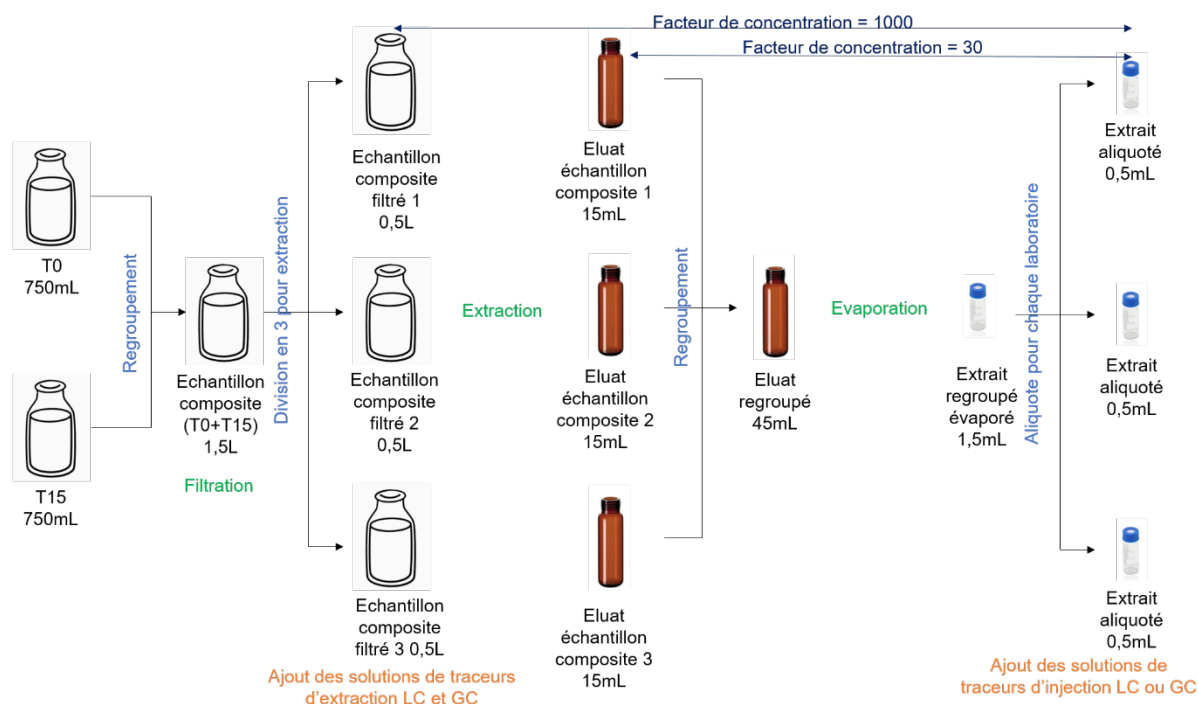


Figure 3 : Schématisation des étapes d'extraction des échantillons eaux

2.3.3 Contrôles qualité

Il est primordial d'introduire des contrôles qualité au cours des différentes étapes allant de l'échantillonnage à l'analyse.

Au niveau de l'échantillonnage et de la préparation des échantillons, diverses pollutions peuvent altérer les échantillons. Les caractériser est tout aussi important que les résultats dans les échantillons. Pour cela des « blancs » peuvent être réalisés au cours de différentes étapes : échantillonnage et extraction. Des solutions de traceurs d'extraction peuvent être utilisées afin de se rendre compte de la bonne réalisation de l'extraction.

Au niveau de l'analyse plusieurs contrôles peuvent être réalisés : des blancs d'injection, des solutions de traceurs d'injection, des solutions d'étalons.

2.3.3.1 Blancs POCIS

Deux types de « blancs » ont été pratiqués lors des campagnes d'échantillonnage passif : des blancs terrain et des blancs d'extraction.

Les blancs terrain sont des POCIS qui subissent les mêmes étapes de transport, stockage, manipulation, facteur de concentration que les échantillons, hormis la période d'exposition (pendant la période d'exposition des POCIS, les blancs terrains sont stockés à -20°C). Au total, 8 blancs terrains ont été réalisés sur les 20 campagnes réalisées (Tableau 2).

Tableau 2 : Sites sur lesquels des blancs terrains POCIS ont été exposés

Ordre	Code station	Site	Type de station
3	LUE	Le Luech à Génomhac	Référence
7	GAL	Grand Galion	DROM
8	PER	Le Pérou	DROM
13	VIL	Vilaine à Guichen	METRO
14	CLA	Le Clain en aval de Poitiers	METRO
16	ESC	Escaut canalisé Fresnes sur Escaut	METRO
17	HER	L'Hers mort au niveau de St-Sauveur	METRO
19	TOL	Le Tolzac à Varès	METRO

Ces blancs terrains permettent de qualifier une pollution potentielle apportée par le stockage, le transport, l'air ambiant sur le site et le manipulateur. Ces blancs terrains ont été considérés comme des échantillons. Ils ont été pris en charge par le laboratoire 1 qui a réalisé les extractions de la même manière que les POCIS exposés (Figure 2). Un aliquote de chaque extrait de blanc POCIS a été réceptionné par les 3 laboratoires.

Des blancs d'extraction POCIS ont aussi été réalisés par le laboratoire 1 lors de chaque série d'extraction (n=3). La détermination du blanc extraction se fait sur des POCIS non exposés. Il s'agit de POCIS pour lequel l'emballage est ouvert uniquement lors de l'extraction et qui suivent le même protocole d'extraction que les POCIS exposés (Figure 2). Les 3 extraits blanc d'extraction POCIS ont été aliquotés en 3 afin que chaque laboratoire ait un aliquote identique. Ces blancs permettent de qualifier une pollution potentielle du laboratoire, du matériel et du manipulateur lors de l'extraction.

2.3.3.2 Blancs d'extraction SPE

Des blancs d'extraction SPE ont été réalisés au cours de chaque série d'extraction (n=3). Ces blancs d'extraction ont été réalisés sans percolation d'eau dans les mêmes conditions que pour l'échantillon et en employant les mêmes quantités de réactifs que pour l'échantillon. Cette pratique permet de prendre en compte les pollutions éventuelles liées au matériel utilisé (pipettes, solvants d'extraction, cartouche d'extraction, flaconnage), à l'évaporation, au stockage et au manipulateur. Celle-ci ne permet pas de prendre en compte l'impact de la filtration et du flaconnage d'échantillonnage sur une pollution éventuelle des échantillons.

Un triplicat de blancs a été réalisé au cours de chaque série d'extraction (n=3). Les extraits des triplicats sont rassemblés avant évaporation sous vide jusqu'à 1,5mL, puis aliquotés entre les 3 laboratoires (Figure 3).

2.3.3.3 Traceurs d'extraction et d'injection

Afin d'évaluer la bonne réalisation des étapes de préparation d'échantillon et d'analyse instrumentale, des traceurs d'extraction et d'injection ont été utilisés.

2.3.3.3.1 Analyses par LC-HRMS

Les analyses en LC-HRMS ont été réalisées par les 3 laboratoires. Les traceurs utilisés sont présentés dans le Tableau 3.

Deux types de solutions de traceurs peuvent être distingués :

- 26 traceurs d'extraction qui ont été ajoutés aux échantillons d'eaux et de POCIS avant l'extraction au laboratoire et qui sont donc communs pour tous les laboratoires.
- 6 traceurs d'injection au maximum qui ont été ajoutés aux extraits avant les injections par LC-HRMS. Chaque laboratoire a utilisé ses propres traceurs d'injection. L'ajout de ces traceurs à concentration connue dans les extraits permet de s'assurer de la bonne injection des extraits et également de s'assurer de la comparabilité des résultats entre les opérateurs. Les numéros mentionnés dans le tableau pour cette colonne indique quels traceurs ont été utilisés selon le laboratoire (1= labo 1 ; 2= labo 2 ; 3 = labo 3).

Tableau 3. Traceurs utilisés pour les analyses par LC-HRMS. Les concentrations sont exprimées en ng/L dans l'extrait regroupé (aussi bien eau que POCIS).

Molécules	Traceurs d'extraction - mode d'ionisation	Traceurs injection - mode d'ionisation	Concentration traceurs extraction (ng/l)	Log Kow
Acide fénofibrique D6	+		75	4
Aténolol D7	+		75	0,4
Acétochlore ESA D5	-		150	0,79
Alachlore OXA D3	-		144	2,3
Atrazine D5	+		78	2,6
Carbamazépine 13C6	+		75	2,3
Carbétamide 13C6	+		75	1,78
Clarithromycine 13C-D3	+		72	3,16
Beflubutamide D7	+		72	4,96
Benzotriazole D4	-		150	1,4
DEA D6	+		72	1,5
Furosémide D5	-		144	2
DEDIA 13C3	+		75	-0,1
Diclofénac 13C6		+/- (1, 2)		4,3
Diuron D6		+/- (1, 2, 3)		2,7
Diazinon D10	+		78	3,69
MCPA 13C6	-		147	-0,8
Méthylparabène 13C6	-		126	2
Gemfibrozil D6		- (1)		3,4
DMST D3	+		75	1,2
Erythromycine 13C-D3	+		75	2,5
Mecoprop D3		- (1)		-0,2
Metsulfuron méthyl D3	+/-		144	-2
Imidaclopride D4	+		72	0,3
Metoprolol D7	+		75	0,6
Sucralose D6	-		147	-1,5
NBBS D9	+		75	2,1
Norfloxacine D5	+		69	-2
Simazine D10		+ (1, 2)		2,2
Oxazépam D5	+		81	2,2
Sotalol D7	+		75	0,24
Sulfadiméthoxine D6		+ (1)		0,6

Les indications fournies ici (+ / -) concernent le mode préférentiel de détection des molécules selon leur ionisation. Certaines molécules de cette liste sont en effet détectables mais avec une sensibilité moindre dans l'autre mode d'ionisation (par exemple pour l'atrazine D5 qui est également détectable en mode d'ionisation négatif).

2.3.3.3.2 Analyse par GC-HRMS

Pour rappel, les analyses par GC-HRMS ne sont réalisées que dans un seul laboratoire, pour comparaison avec les résultats LC-HRMS. Les traceurs utilisés pour cette étude sont présentés dans le Tableau 4.

Comme pour les analyses par LC-HRMS, des traceurs d'extraction et des traceurs d'injection ont été utilisés.

Tableau 4. Traceurs utilisés pour les analyses par GC-HRMS

Molécules	Traceurs d'extraction	Traceurs injection	Log K _{ow}
4,4'-DDT		x	6,9
BDE 99-13C12	x		7,2
Chlorpyrifos D10	x		4,9
DEHP D4	x		7,9
Naphtalène D8	x		3,3
PCB 52-13C12	x		7,4
Phénanthrène D10		x	4,4

Certains traceurs prévus pour être analysés en LC-HRMS peuvent également être analysés en GC-HRMS (atrazine D5) et vice versa (DEHP D4).

2.3.3.4 Contrôles qualité au cours de l'analyse

Plusieurs contrôles qualité peuvent être utilisés au cours de l'analyse ; chaque laboratoire en charge de l'analyse a appliqué ses propres contrôles. Ceux-ci peuvent différer d'un laboratoire à l'autre car ils s'appuient sur l'expérience acquise en analyse quantitative, à l'expertise technique sur l'instrument analytique et en traitement des données.

Des blancs d'injection ont été réalisés par tous les laboratoires ; il s'agit de solvant ou mélange de solvants identique aux extraits injectés. Ces contrôles permettent de vérifier une contamination potentielle de la méthodologie analytique : solvants d'injection, colonnes, tuyaux, pompes, sources d'ionisation, contaminations croisées dans la séquence, effet mémoire, etc. Pour cela plusieurs blancs d'injection sont injectés au cours de la séquence.

Afin de faciliter les traitements et suivre la sensibilité des instruments, deux laboratoires ont injecté des solutions d'étalons analytiques (pesticides, composés pharmaceutiques, produits de soin corporel, composés industriels, etc.). Le choix des étalons est généralement fait à partir de plusieurs critères : disponibilité de l'étalon analytique au laboratoire, masse moléculaire de la substance choisie comme étalon comprise dans la gamme analysée, couverture de toute la gamme de masse moléculaire (c'est-à-dire choisir des substances étalons de masses moléculaires différentes permettant de couvrir toute la gamme de masse moléculaire analysée) et couverture de toute la durée du chromatogramme (choisir des substances étalons ayant des temps de rétention chromatographique étendus sur la durée de l'analyse).

2.4 ANALYSES

Le principe de l'exercice est une comparaison des pratiques et des résultats entre les 3 laboratoires participant sur l'analyse LC-HRMS. En complément, une analyse par GC-HRMS est réalisée sur le même extrait par le laboratoire 2 uniquement afin de couvrir une gamme plus large de substances identifiables (hydrophiles vs hydrophobes), de vérifier l'applicabilité de certaines des recommandations sur une autre approche de couplage, de

confirmer/comparer les informations obtenues par LC et GC pour les molécules analysables par ces deux approches.

2.4.1 Conditions LC-HRMS

Les conditions chromatographiques et spectrométriques appliquées par les 3 laboratoires ayant utilisé la chromatographie liquide sont synthétisées dans le Tableau 5. Le détail des méthodes est donné en Annexe 1.

Tableau 5 : Conditions analytiques utilisées par les 3 laboratoires

Paramètre	Labo 1	Labo 2	Labo 3
Appareil utilisé : type	UPLC-HRMS (QTOF)	UHPLC-HRMS(QTOF)	UPLC-HRMS-QTOF
Appareil utilisé : marque	Waters : UHPLC I-Class + Xevo-G2s-QToF	Agilent : UHPLC-QTOF 6550	Waters : UHPLC H-Class + Xevo-G2s-QToF
Source d'ionisation	Electrospray (ESI)	Electrospray (ESI)	Electrospray (ESI)
Mode d'ionisation	ESI+ et ESI-	ESI+ et ESI-	ESI+
Logiciel d'acquisition des données LC-HRMS	Waters MassLynx	Agilent MassHunter	Waters MassLynx
Pré-traitement des extraits reçus du Labo 1	NA	Filtration sur filtre PTFE 0,2 µm	Evaporation et reprise en eau/acétonitrile (95/5), même volume
Volume injecté	2 µL	5 µL	5 µL
Chromatographie, phase stationnaire (colonne)	Phase inverse type C18, colonne Acquity BEH C18 2,1mm x 15cm x 1,7µm, (Waters)	Phase inverse type C18, colonne ZORBAX SB-Aq 2,1*150mm, 1,8µm (Agilent).	Phase inverse type C18, colonne HSS T3 2,1 mm x 10 cm ; 1,8 µm (Waters).
Température du four	ESI+ : 35°C ESI- : 45°C	40°C	30°C
Chromatographie, phase mobile et gradient (ESI +)	Eau acidifiée / acétonitrile (ACN) acidifié. Gradient en ACN de 2% à 99%. Débit : 0,45mL/min Durée : 25min	Eau avec 0,1mM Acétate d'Ammonium/Méthanol. Gradient en MeOH de 0 (plateau 2 min) à 98%. Débit à 0,4 mL/min. Durée : 20 min	Eau/acétonitrile acidifié. Gradient de 2% à 99% en acétonitrile. Débit : 0,5 mL/min. Durée : 20 min
Chromatographie, phase mobile et gradient (ESI -)	Eau acidifiée / méthanol (MeOH) acidifié. Gradient en MeOH de 2% à 99%. Débit : 0,3mL/min Durée : 25min	Eau avec 0,1mM Acétate d'Ammonium/Méthanol. Gradient en Méthanol de 0 (plateau 2 min) à 98%. Débit à 0,4 mL/min. Durée : 20 min	NA
HRMS : mode d'acquisition	Data independant (MSe), profile (Continuum), mode Resolution	All ion (MS + MS/MS en data independant)	Data independant (MSe), profile (Continuum), mode Resolution
HRMS : gamme de masses acquises	50-1200 uma	100 à 1000 uma (MS/MS de 50 à 1000 uma)	50-1200 uma
HRMS : énergie de collision	Rampe de 6 à 45eV	Energie fixe à 20 et 40 eV	Rampe de 10 à 45 eV
HRMS vitesse d'analyse (scan rate)	4 Hz	2 Hz	4 Hz

Logiciel de retraitement des données HRMS	Waters UNIFI	Agilent MassHunter	Waters UNIFI
--	--------------	--------------------	--------------

2.4.2 Conditions GC-HRMS

Les extraits filtrés, utilisés pour les analyses par LC-HRMS, ont été utilisés pour les analyses par GC-HRMS. Un aliquote de 100 µL a été mis à sec puis redissous dans du dichlorométhane et les étalons d'injection ajoutés. La liste et les concentrations dans l'extrait sont données dans le Tableau 3 et Tableau 4.

Les analyses ont été effectuées par GC/QTOF 7250 (Agilent).

Les paramètres chromatographiques et spectrométriques sélectionnés sont présentés dans le Tableau 6. Les analyses des échantillons ont été effectuées en mode « Haute ionisation », à 70eV.

Tableau 6 : Paramètres chromatographiques GC et spectrométriques

	Volume d'injection	2 µL
	Type d'injection	Standard
Injecteur	Type	Split Splitless
	Température	280°C
	Mode d'injection	Splitless pendant 1,81min puis purge à 60 mL/min
Liner	Référence	Agilent 5190-2293 ultra inert (splitless single taper, wool)
Colonnes (C1 C2)	Type	HP-5ms UI, 15 m x 250 µm x 0.25 µm (19091S-431UI)
	Débit	*2 C1: 1.061 mL/min , C2: 1.261 mL/min
Four	Température	40 °C (1,8'), puis > 325°C @ 10°C/min (10')
Ligne de transfert	Température	280°C
Paramètres spectrométriques	T°C de source	230°C (HEI), 150 °C (LEI)
	courant d'émission	5 µA (HEI), 1 µA (LEI)
	Mode d'ionisation	EI : Standard (HEI), 70 eV ; Low (LEI), 18 eV
	data storage	profile et centroid
	délai de solvant	7,8 minutes
	Quad TTI cutoff mass	40 amu
	Mass Range	40 – 650 m/z
	Acquisition rate/time	5 spectres/s ou 200 ms/spectre
	transients/spectre	1776
	Cellule de Collision N2	1 ml/min
	Quench gas He	4 ml/min
Logiciel de retraitement des données HRMS		Agilent Unknowns.

Des contrôles qualité sous la forme de blancs solvants et d'une solution d'une centaine de composés (alcanes, HAP, PCB, pesticides, PBDE, répartis sur le chromatogramme) ont été analysés en début, pendant et en fin de séquence d'analyse pour s'assurer du bon fonctionnement du système analytique lors des séquences analytiques (effets mémoires, pertes ou changement de signal...).

2.5 TRAITEMENT DES DONNEES

2.5.1 Informations disponibles avec une analyse HRMS

Les analyses non-ciblées HRMS couplées à la chromatographie liquide ou gazeuse permettent de détecter des entités dans les échantillons sans *a priori*. Une entité correspond à un couple {masse (m/z), temps de rétention}. Des milliers d'entités sont détectées dans un seul échantillon. Le résultat HRMS, empreinte NTS, est une liste de toutes ces entités détectées dans chaque échantillon. L'intérêt du traitement est d'identifier les entités à l'aide de paramètres d'identification tels que masse exacte, temps de rétention, profil isotopique et fragmentation ; cela permet d'associer un nom de molécule à l'entité en question. Pour cela deux voies de traitement des empreintes NTS sont possibles : suspecte (par comparaison de candidats avec les informations présentes dans une source « référente ») et non-ciblée (identification sans pré-sélection de candidats). Pour l'étude décrite dans ce rapport, seul le traitement « suspect » est abordé.

Pour les traitements suspects, les paramètres d'identification présents dans une base de données (BDD) sont comparés à ceux des entités. Dans un premier temps il faut une correspondance avec la masse puis avec le temps de rétention (Tr) et les fragments en fonction des bases. Différentes BDD peuvent être utilisées :

- Des BDD « internes », constituées par le laboratoire, dans ses conditions analytiques à partir d'injection d'étalons analytiques. Elles ont comme principale limite leur faible étendue, entre 200 et 450 molécules selon les laboratoires de cette étude.
- Des BDD « externes », fournies par les fournisseurs des instruments analytiques, construites à partir de la littérature ou en ligne (MassBank...). Dans ces bases certains paramètres d'identification sont manquants tels que le Tr et/ou les fragments. Ces BDD externes sont beaucoup plus larges en termes de familles et de nombre de composés. La qualité de ces bases est cependant très hétérogène (données expérimentales ou *in silico*).

2.5.2 Identification

Dans le but d'identifier des molécules, chaque laboratoire a utilisé les logiciels fournisseurs pour détecter les entités dans les échantillons puis comparer leurs paramètres d'identification à celles des BDD.

Pour comparer les paramètres d'identification des entités et ceux présents dans les bases de données, des filtres sont appliqués sur la masse de la molécule et sur ces fragments, et les temps de rétention. Dans cette étude le choix des filtres est de 10 ppm sur la masse et 0,2 min sur le Tr ; ce qui permet de limiter les mauvaises identifications et diminue le temps de traitement de chaque échantillon.

Cette étape d'identification est réalisée pour toutes les injections : contrôles qualité et échantillons. Il est ensuite possible de comparer les molécules identifiées dans chaque échantillon, blancs laboratoires et contrôles qualité.

Le premier niveau de contrôle porte sur l'identification des étalons d'injection et d'extraction, qui permet de s'assurer du bon déroulement des analyses et de suivre la sensibilité de l'appareil au cours du temps.

Les échantillons et les blancs sont ensuite comparés. Pour une molécule identifiée dans un blanc laboratoire et un échantillon, les aires (ou moyenne des aires si elles avaient été retrouvées dans plusieurs blancs), sont comparées et la molécule est rapportée comme

détectée, au sens de « significativement présente dans l'échantillon » si le ratio entre ces aires est supérieur à 10.

2.5.3 Restitution des résultats

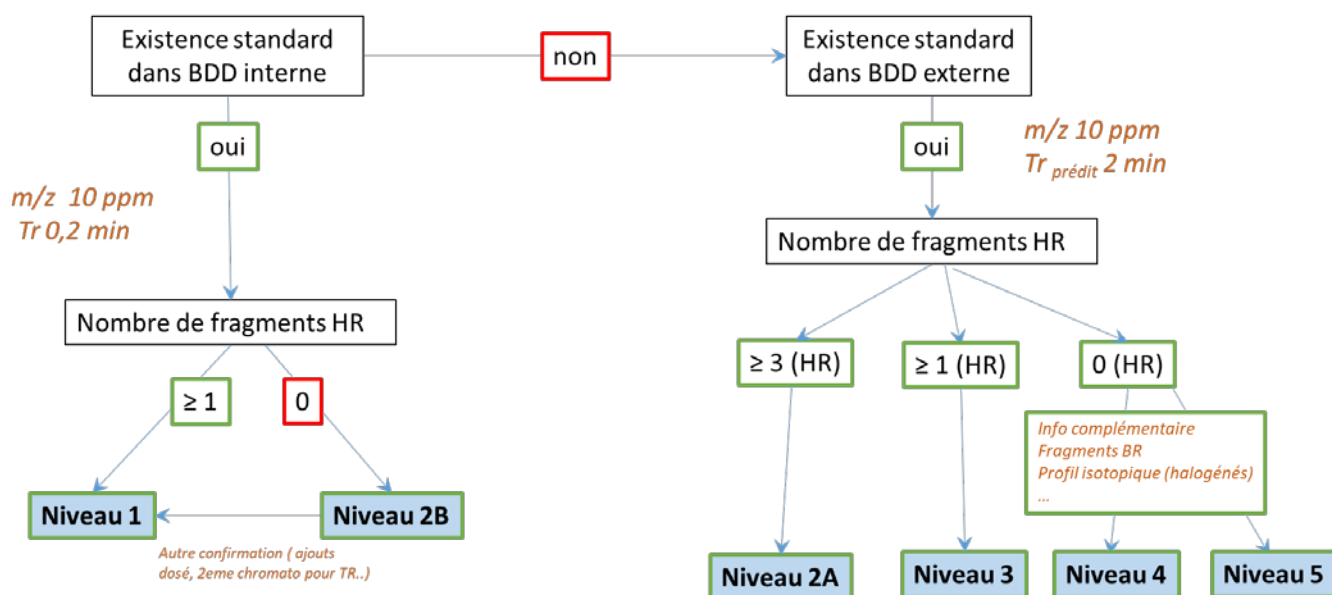
Afin d'harmoniser la restitution des résultats par les différents laboratoires, un logigramme a été construit. Basé sur l'arbre décisionnel élaboré par Schymanski et al⁵, il attribue des niveaux de confiance accordée à l'identification des molécules selon les critères d'identification disponibles et/ou validés (Figure 4). Ce logigramme est appliqué sur l'intégralité des données.

Le logigramme permet de visualiser le niveau de confiance relatif à l'identification d'une molécule selon la BDD utilisée pour la comparaison (interne ou externe) et le nombre de paramètres et d'informations disponibles pour effectuer la comparaison.

On identifie ainsi 5 niveaux (et deux sous-niveaux pour le niveau 2) permettant d'explicitier au mieux ce niveau de confiance, du niveau 5, considéré comme peu fiable (faible nombre de point de validation entre entité et référence), au niveau 1 considéré comme le plus fiable (référence très fiable et plusieurs points de vérification confirmés).

Compte-tenu de ces différents niveaux de confiance sur l'identification des molécules, il est choisi pour cet exercice :

- De ne pas considérer les molécules identifiées au « niveau 5 »
- De présenter les molécules identifiées aux « niveaux 1/2A/2B », pour lesquelles un niveau de confiance élevé et considéré comme suffisant est associé, séparément des molécules « niveaux 3 et 4 » pour lesquelles un niveau de confiance plus faible est associé.



HR Haute résolution ///BR basse Résolution

⁵ Schymanski et al. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, 4, 2097–2098

Figure 4: Logigramme utilisé pour la restitution des résultats LC-HRMS. BDD, Base de données ; m/z, masse exacte ; Tr, Temps de rétention ; HR, Haute résolution, BR, Basse résolution

Pour la GC-HRMS, le logigramme utilisé pour cette étude est présenté sur la Figure 5.

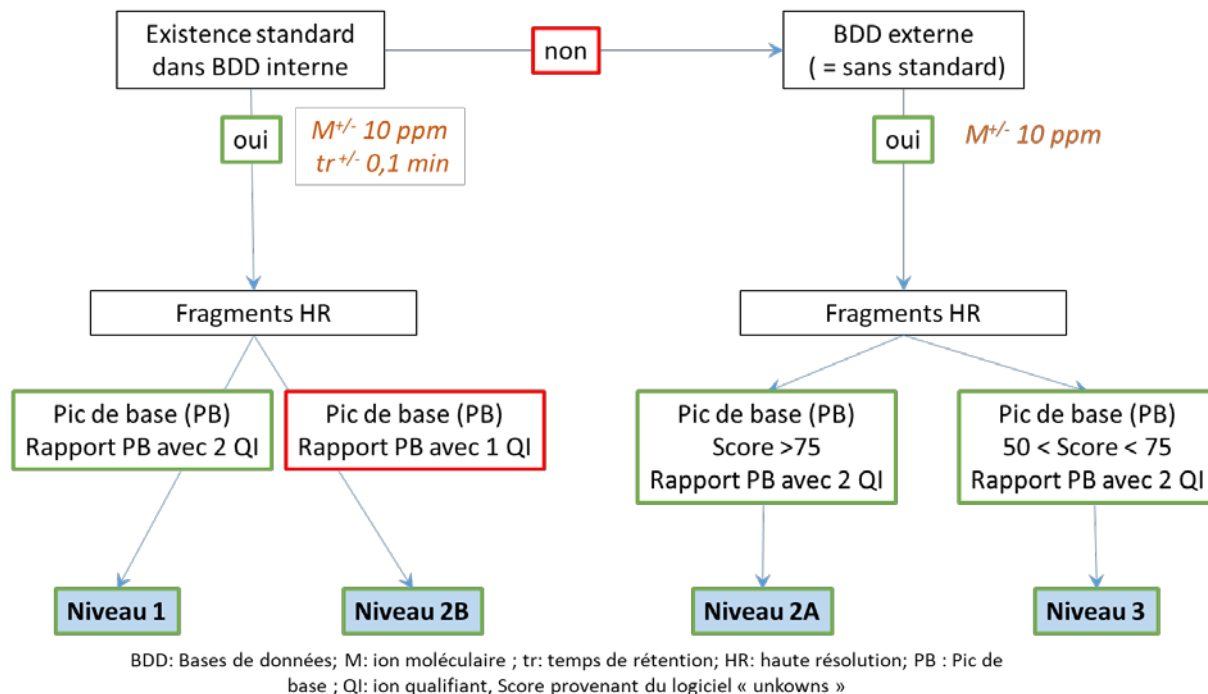


Figure 5: Logigramme utilisé pour la restitution des résultats GC-HRMS.

2.5.4 Traitements appliqués aux données de l'étude

Trois traitements ont été appliqués aux empreintes NTS (Figure 6) et sont détaillés dans les paragraphes suivants.

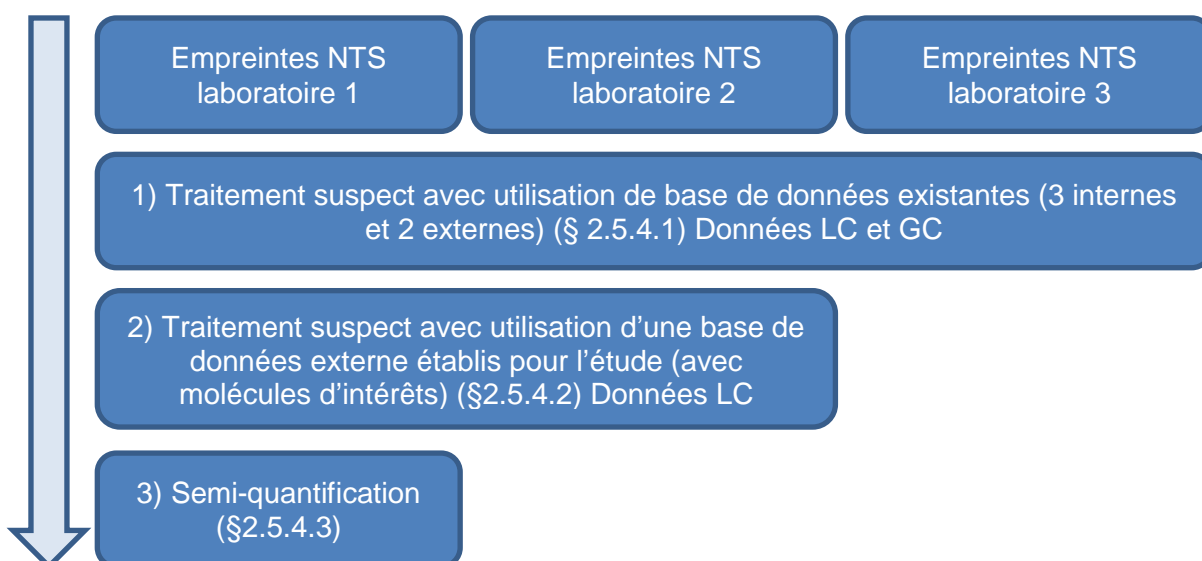


Figure 6 : Bilan des traitements appliqués aux empreintes NTS par chaque laboratoire.

2.5.4.1 Traitement suspect avec utilisation de bases de données (BDD) existantes

L'objectif général de l'utilisation de ce traitement suspect est, à partir des différentes bases de données préexistantes dans chacun des 3 laboratoires, d'identifier des molécules dans les empreintes NTS obtenues par analyse LC-HRMS et GC-HRMS.

La complémentarité des 3 laboratoires et de leur BDD permettra de rechercher/identifier un plus grand nombre de molécules dans les échantillons.

Les objectifs sont :

- De confronter les résultats issus de l'exploitation des différentes BDD afin de discuter les avantages et inconvénients des différents types de bases.
- De s'appuyer sur ces résultats pour établir une nomenclature en termes de rendus de résultats pour introduire la notion de niveaux de confiance associés à l'identification.

2.5.4.1.1 Les bases de données

Un total de 5 BDD a été utilisé pour traiter les données obtenues en LC-HRMS et 2 pour les données GC-HRMS. Dans la suite du document, une approche signifie le traitement suspect des empreintes NTS issues d'une analyse LC ou GC par une BDD ; il y a donc au maximum 7 approches possibles dans cette étude (5 en LC-HRMS et 2 en GC-HRMS).

2.5.4.1.1.1 Bases de données utilisées en LC-HRMS

Les 3 laboratoires ont utilisé leurs approches habituelles, BDD internes et/ou externes, pour traiter les empreintes NTS acquises en LC-HRMS. Les détails relatifs à chaque BDD sont donnés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Nombre de molécules contenues dans les 5 bases de données pré-existantes utilisées pour le traitement suspect en LC-HRMS

	BDD interne Labo 1	BDD interne Labo2	BDD externe Labo 2	BDD interne Labo 3	BDD externe Labo 3
Pharmaceutiques	95	32	553	63	977
Métabolites pharmaceutiques	11	2	38	1	125
Pesticides	163	26	366	195	1557
Métabolites pesticides	51	5	25	8	28
Autres	22	34	122	1	130
Métabolites autres	2	0	14	0	7
TOTAL molécules	344	99	1118	268	2824

Au total, 3501 composés différents ont été recherchés dans les échantillons analysés en LC-HRMS. Plus de la moitié des composés recherchés sont des pesticides et métabolites (Figure 7).

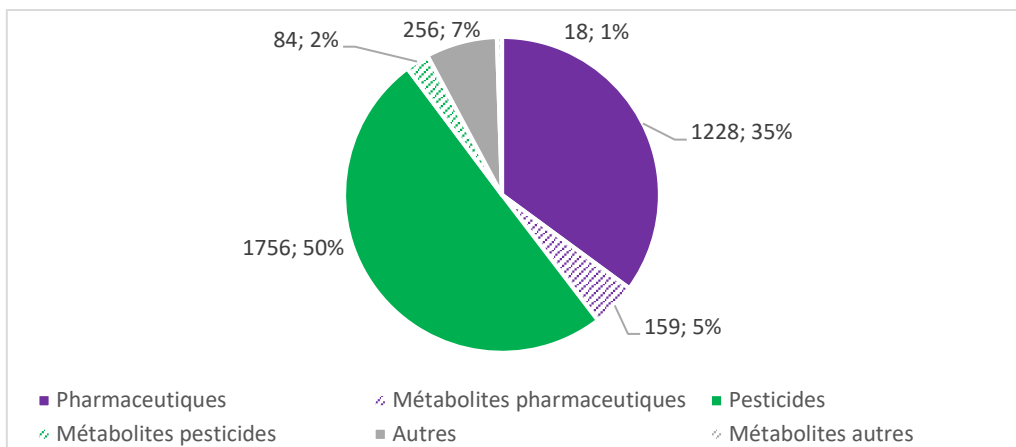


Figure 7 : Répartition par famille des molécules recherchées pour analyse en LC-HRMS, tout laboratoire/BDD confondu

Parmi ces 3501 composés, 2642 ne sont présents que dans une seule BDD et 859 sont communs à plusieurs BDD (Figure 8).

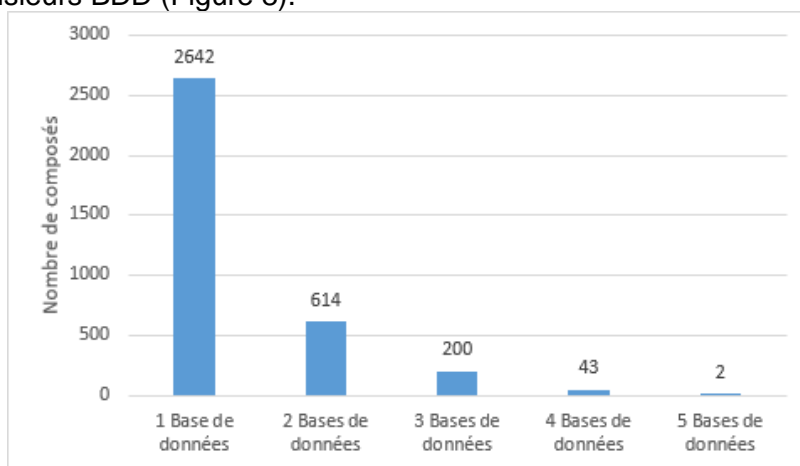


Figure 8 : Nombre de composés recherchés uniques et communs à plusieurs bases de données pour analyse en LC-HRMS

La combinaison de ces 5 BDD a permis de rechercher 117 composés réglementés (composés inscrits dans la surveillance européenne ou nationale), 1544 pesticides, et 1840 composés n'appartenant à aucune liste de surveillance réglementaire (Figure 9).

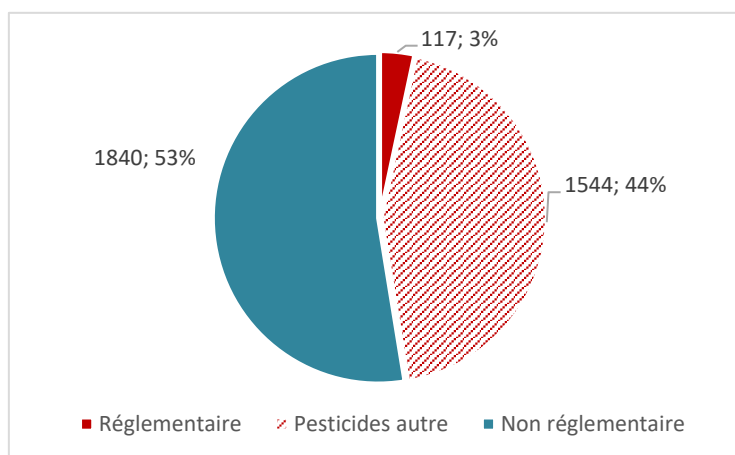


Figure 9 : Répartition des composés selon la réglementation, recherchés pour analyse en LC-HRMS

2.5.4.1.1.2 Bases de données utilisées en GC-HRMS

Le laboratoire 2 a recherché un total de 1145 composés en analyse par GC-HRMS répartis sur deux BDD dont 79 composés en commun (Tableau 8).

Tableau 8 : Nombre de molécules contenues dans les 2 bases de données pré-existantes utilisées pour le traitement suspect en GC-HRMS

	BDD interne	BDD externe
Pharmaceutiques	1	7
Métabolites pharmaceutiques	0	0
Pesticides	54	746
Métabolites pesticides	3	23
Autres	152	238
TOTAL	210	1014

2.5.4.2 Traitement suspect avec utilisation d'une BDD externe établie avec des molécules d'intérêts

Au-delà des listes de molécules présentes dans les BDD des différents laboratoires, une recherche complémentaire de molécules d'intérêt a été effectuée sur les empreintes NTS obtenues en LC-HRMS. Pour cela une liste complémentaire de molécules d'intérêt a été construite à partir d'informations recueillies dans la littérature et avis d'expert par les laboratoires 1 et 2.

Les paramètres d'identification disponibles sont moindres (pas de données de fragmentation ou de temps de rétention disponibles). De plus, en absence de comparaison à un étalon analytique, les molécules sont, au mieux, identifiées avec un niveau de confiance 2A (Figure 4). Pour améliorer ce niveau, les étalons analytiques de certaines molécules identifiées ont été achetés, analysés (répartition entre les 2 laboratoires) et les résultats comparés afin de confirmer l'identification des molécules et la robustesse de l'approche « suspect ».

Pour établir cette liste, différentes sources d'information ont été compilées :

- La liste NORMANEWS constituée par le consortium NORMAN⁶ ; celui-ci identifie des molécules d'intérêt, soit parce que déjà recherchées et retrouvées dans un pays à des teneurs préoccupantes comparativement aux PNEC⁷, soit parce que priorisées par leur large volume utilisé, etc..., mais sans prise en compte d'une quelconque faisabilité analytique.

⁶ www.norman-network.com

⁷ Predicted No Effect Concentration : valeur définissant le seuil utilisé en évaluation des risques environnementaux des substances chimiques.

- Les molécules priorisées pour la campagne prospective biocides et surfactants (action EMNAT du RSP⁸)
- Les molécules identifiées par les experts écotoxicologues comme « pouvant induire les effets constatés sur les échantillons ».
- Les principaux produits de transformation de substances actives pesticides décrits dans les travaux AQUAREF⁹. Le choix s'est porté sur les substances actives identifiées dans les analyses, complétées par le prosulfocarb et le chlortoluron, non retrouvés mais cependant très utilisés (source BNVD).
- Les métabolites de substances identifiées comme non stables dans des études AQUAREF et pour lesquelles la recherche des métabolites avait été identifiée comme pertinente (ex : la famille des parabènes) ainsi que ceux identifiés dans les travaux de Kiefer et al ¹⁰.

A partir de ces différentes listes, une sélection de molécules à rechercher a été faite à dire d'experts selon la pertinence et la faisabilité analytique. Les molécules répondant aux critères suivants ont été retirées :

- Déjà présentes dans les BDD utilisées lors du traitement suspect par les bases de données préexistantes dans les 3 laboratoires
- Pas analysables par les méthodologies analytiques retenues pour l'exercice comme par exemple les molécules très polaires, ou très apolaires non extractibles par le protocole EAU ou non accumulables dans les POCIS et/ou non analysables en LC-HRMS
- Biocides très peu quantifiés et à de très faibles teneurs dans la campagne EMNAT biocides et surfactants
- Molécules de type surfactant PEG, de par leur ubiquité car les problématiques analytiques et la question délicate des blancs sont connus et trop importants pour pouvoir de manière pertinente interpréter des résultats si l'exercice n'a pas été spécifiquement dimensionné pour les rechercher. Néanmoins, quelques surfactants de l'étude EmNat ont été maintenus.

Au final, une liste de 58 molécules d'intérêt a ainsi été établie. Elle est présentée dans le Tableau 9 et les précisions des sources d'informations sont présentées en Annexe 2. La recherche de ces molécules dans les empreintes NTS a été répartie entre les laboratoires 1 et 2.

⁸ A Prospective Surveillance Network for improved identification of contaminants of emerging concern (CECs) and testing of innovative monitoring tools in France, Pierre-François Staub et al., Norman Bulletin | Issue 6 | October 2019

⁹ MOREAU P., YARI A., GHESTEM J-P. (2016) – Etude de stabilité de 46 pesticides dans des échantillons d'eau de surface. Rapport final. BRGM/RP-65034-FR, 93 p

¹⁰ Kiefer, K., A. Müller, H. Singer and J. Hollender (2019). "New relevant pesticide transformation products in groundwater detected using target and suspect screening for agricultural and urban micropollutants with LC-HRMS." Water Research **165**: 114972.

Tableau 9 : Liste des molécules d'intérêt sélectionnées pour le traitement suspect par les laboratoires 1 et 2

Nom composé	n°CAS	Formule brute	Famille
Acide parahydroxybenzoïque (PHBA)	99-96-7	C7H6O3	Parabènes, Produit transformation
1,2,4-triazole	288-88-0	C2H3N3	Pesticides, produits de transformation
1-OH-isoproturon	189500-72-9	C12H18N2O2	Pesticides, produits de transformation
2,2-bisphenol F	246702-09	C13H12O2	Industriels
2,3,6-trichloro-5-cyano-4-hydroxybenzamide (SYN507900)		C8H3Cl3N2O2	Pesticides, produits de transformation
2,4,4- Trihydroxybenzophénone	1470-79-7	C13H10O4	Filtres UV
2,4,5-trichloro-6-hydroxy-benzene-1,3-dicarboxamide (SYN548580)		C8H5Cl3N2O3	Pesticides, produits de transformation
2,4-dicarbamoyl-3,5,6-trichlorobenzene-1-sulfonate (R471811)		C8H5Cl3N2O5S	Pesticides, produits de transformation
2,5,6-trichloro-4-hydroxyphthalonitrile (DSD-3701 ou R182281)		C8HCl3N2O	Pesticides, produits de transformation
2-carbamoyl-3,5,6-trichloro-4-cyanobenzene-1-sulfonic acid (R417888)		C8H3Cl3N2O4S	Pesticides, produits de transformation
2-OH-isoproturon		C12H18N2O2	Pesticides, produits de transformation
3-carboxy-2,5,6-trichlorobenzamide (SDS-46851 ou R611965)		C8H4Cl3NO3	Pesticides, produits de transformation
4-carbamoyl-2,5-dichloro-6-cyanobenzene-1,3-disulfonic acid (R419492)		C8H4Cl2N2O7S2	Pesticides, produits de transformation
4-n-butoxyphenol	122-94-1	C10H14O2	Industriels
4-Nonylphenol diethoxylate	27167-93-8	C19H32O3	Industriels
Bisphénol AF	1478-61-1	C15H10F6O2	Industriels
Bisphénol AP	1571-75-1	C20H18O2	Industriels
Bisphénol B	77-40-7	C16H18O2	Industriels
Bisphénol BP	1844-01-5	C25H20O2	Industriels
Bisphénol C	79-97-0	C17H20O2	Industriels
Bisphénol E	2081-08-5	C14H14O2	Industriels
Bisphénol F	620-92-8	C13H12O2	Industriels
Bisphénol FL	3236-71-3	C25H18O2	Industriels
Bisphénol G	127-54-8	C21H28O2	Industriels
Bisphénol M	13595-25-0	C24H26O2	Industriels
Bisphénol P	2167-51-3	C24H26O2	Industriels
Bisphénol TMC	129188-99-4	C21H26O2	Industriels
Bisphénol Z	843-55-0	C18H20O2	Industriels
Chlortoluron TP (CGA15140)		C10H11ClN2O3	Pesticides, produits de transformation
Citalopram amide	64372-56-1	C20H23FN2O2	Pharmaceutiques, produits de transformation
Citalopram carboxylic acid	440121-09-5	C20H22FNO3	Pharmaceutiques, produits de transformation
citalopram-N-oxide	63284-72-0	C20H21FN2O2	Pharmaceutiques, produits de transformation
Clobetasone butyrate	25122-47-8	C26H32ClFO5	Pharmaceutiques
Coumestrol	479-13-0	C15H8O5	Phytoestrogènes
Daidzéine	486-66-8	C15H10O4	Phytoestrogènes
Difluprednate	23674-86-4	C27H34F2O7	Pharmaceutiques
DMSA	304-55-2	C4H6O4	Pesticides, produits de transformation

Fluticasone	90566-53-3	C22H27F3O4S	Pharmaceutiques
Fluticasone furoate	397864-44-7	C27H29F3O6S	Pharmaceutiques
Genistein	446-72-0	C15H10O5	Phytoestrogènes
Nom composé	n°CAS	Formule brute	Famille
Hydroxyflutamide	52806-53-8	C11H11F3N2O4	Pharmaceutiques, produits de transformation
Irbesartan_446	748812-53-5	C25H30N6O2	Pharmaceutiques, produits de transformation
LAS-C10			Surfactants
LAS-C11			Surfactants
LAS-C12			Surfactants
LAS-C13			Surfactants
Losartan carboxylic acid	124750-92-1	C22H21ClN6O2	Pharmaceutiques, produits de transformation
Metolachlor mercapturate	159956-64-6	C20H30N2O5S	Pesticides, produits de transformation
N-Desmethyl Venlafaxine	149289-30-5	C16H25NO2	Pharmaceutiques, produits de transformation
Prosulfocarb sulfoxide		C14H21NO2S	Pesticides, produits de transformation
R234886 compound 2 o-demethyl azoxystrobin	1185255-09-7	C21H15N3O5	Pesticides, produits de transformation
R401553 Compound 28 SYN 501657	240802-59-9	C11H7N3O2	Pesticides, produits de transformation
R402173	951009-69-1	C18H11N3O4	Pesticides, produits de transformation
RH-24580	29918-41-0	C12H13Cl2NO2	Pesticides, produits de transformation
RH-24644	29918-40-9	C12H11Cl2NO	Pesticides, produits de transformation
Sulisobenzone (Bp-4)	6628-37-1 / 4065-45-6	C14H12O6S	Filtres UV
TCEP / Tris(2-chloroethyl)phosphate	5961-85-3	C6H12Cl3O4P	Industriels
Valsartan acid	164265-78-5	C14H10N4O2	Pharmaceutiques

2.5.4.3 Approche semi quantitative

L'objectif principal des approches de screening non ciblé est l'identification de substances d'intérêt par une approche qualitative (présence/absence). Néanmoins, la question de pouvoir bénéficier d'une approximation de la teneur de molécules identifiées dans les empreintes NTS est importante à considérer. Il est apparu important de voir si une estimation des concentrations était possible *a posteriori*, dans l'objectif par exemple de rajouter un critère de priorisation (pour la surveillance prospective par exemple) des molécules identifiées par analyse non ciblée (comparaison à l'ordre de grandeur de critère de toxicité par exemple).

La démarche incluant une comparaison avec les données d'analyses ciblées obtenues dans le cadre de l'exercice RSP-EIP, une liste de substances éligibles à une approche semi-quantitative a été établie à partir des résultats disponibles (fréquences de quantification élevées et niveaux de concentration compatibles avec l'analyse non ciblées). Cette liste est présentée dans le Tableau 10.

Pour ces molécules, une gamme d'étalonnage a été injectée 1 an après l'analyse des échantillons de l'exercice par LC-HRMS, permettant d'estimer une concentration dans les échantillons rétrospectivement.

Tableau 10 : Liste des molécules considérées dans l'approche semi-quantitative.

Molécules considérées pour l'approche semi-quantitative	
Acide fénofibrique	Diuron
Alachlore	Epoxiconazole
Atrazine	Erythromycine
Atrazine deisopropyl (DIA)	Flurtamone
Atrazine desethyl (DEA)	Imidaclopride
Azoxystrobine	Isoproturon
Boscalide	Linuron
Carbamazépine	Métazachlore
Carbamazépine 10,11 epoxide	Metformine
Chlortoluron	Métolachlore
Clarithromycine	Ofloxacine
Cyclophosphamide	Oxazépam
Diazépam	Paracétamol
Diclofénac	Simazine
Diméthénamide	Sulfaméthoxazole
	Tébuconazole

Les échantillons de POCIS analysés dans cet exercice et dans celui du RSP-EIP sont comparables (même période d'exposition, peu de différences dans les protocoles d'extraction et d'analyses). Les échantillons d'eau sont eux différents puisque dans la présente étude, l'extrait est constitué des échantillons T0 et T15 mélangés alors que dans RSP-EIP un échantillon pour chaque temps a été analysé. De ce fait la valeur estimée par ce travail est comparée à la moyenne des deux résultats « ciblés ».

Cette approche semi-quantitative a été appliquée : pour les POCIS et les eaux à tous les échantillons et blancs terrains.

Pour l'estimation des concentrations, deux méthodes ont été comparées :

- Une méthode utilisant les traceurs ayant été ajoutés aux extraits (comme cela est recommandé pour les approches ciblées).
- Une méthode sans considérer les traceurs, ce qui empêche tout contrôle qualité (mode dégradé)

L'objectif de cette comparaison d'approches (présentée dans le chapitre 7) est de pouvoir à terme établir des recommandations sur la mise en œuvre de traceurs dans les approches NTS.

3 Bilan des contrôles qualité

3.1 TRACEURS D'EXTRACTION ET D'INJECTION

3.1.1 Suivi des traceurs utilisés en LC-HRMS

3.1.1.1 Identification des traceurs par les laboratoires

3.1.1.1.1 Mode d'ionisation positif

Les résultats des traceurs internes retrouvés dans les échantillons et les blancs laboratoires (eau et POCIS) en LC-HRMS en mode d'ionisation positif sont présentés dans la Figure 10 par laboratoire. Les résultats sont exprimés en % de détection selon les échantillons considérés. Les traceurs d'extraction ou d'injection jamais retrouvés par les laboratoires ne sont pas inclus dans les graphiques. Les échantillons nommés « EAU » correspondent aux extraits obtenus après extraction en phase solide (SPE) par opposition aux extraits de POCIS.

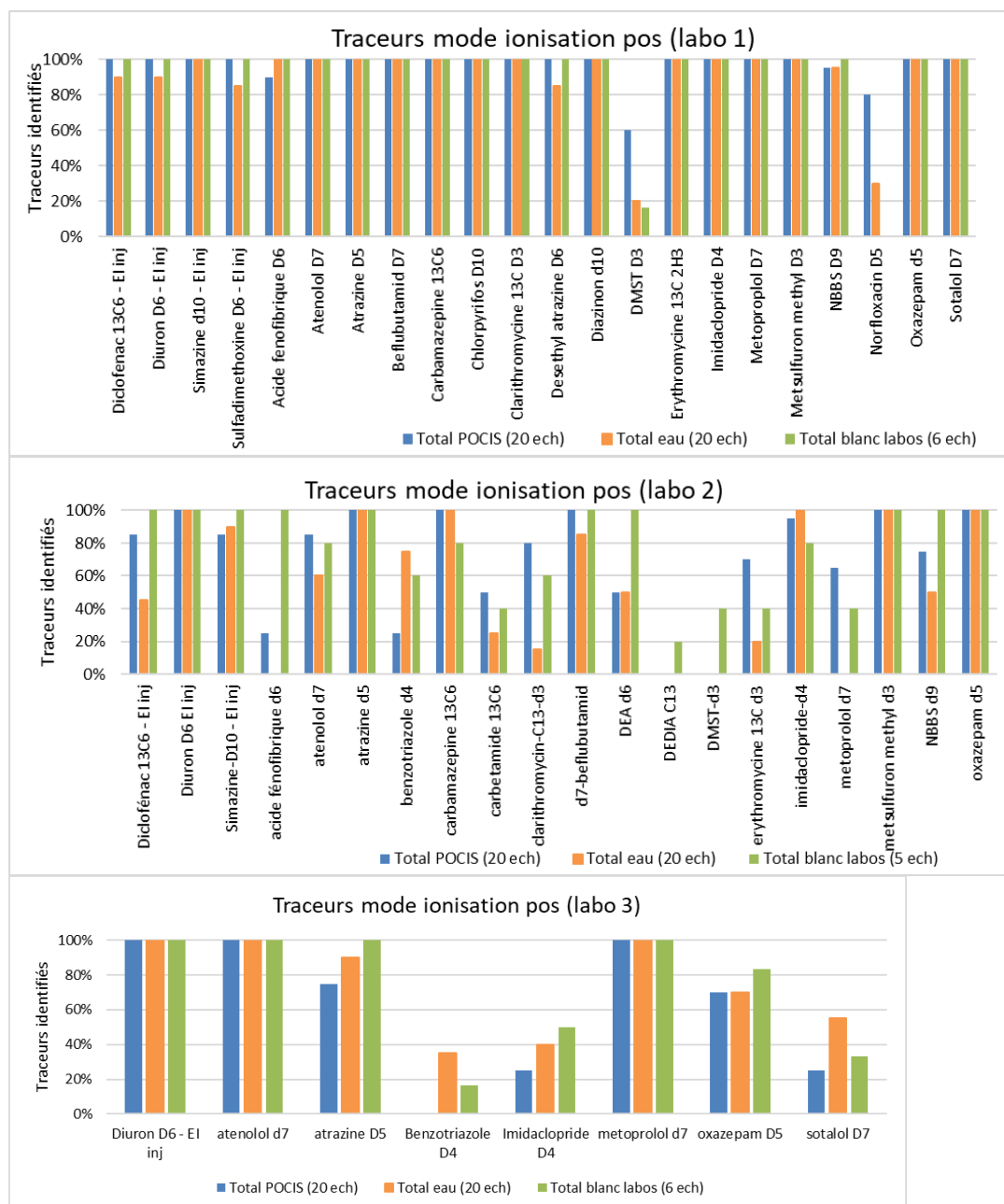


Figure 10 : Traceurs d'extraction et d'injection identifiés en analyse LC-HRMS en mode d'ionisation positif selon les laboratoires d'analyses. Les résultats reportés incluent les traceurs d'injection, à gauche des graphiques, et les traceurs d'extraction à droite.

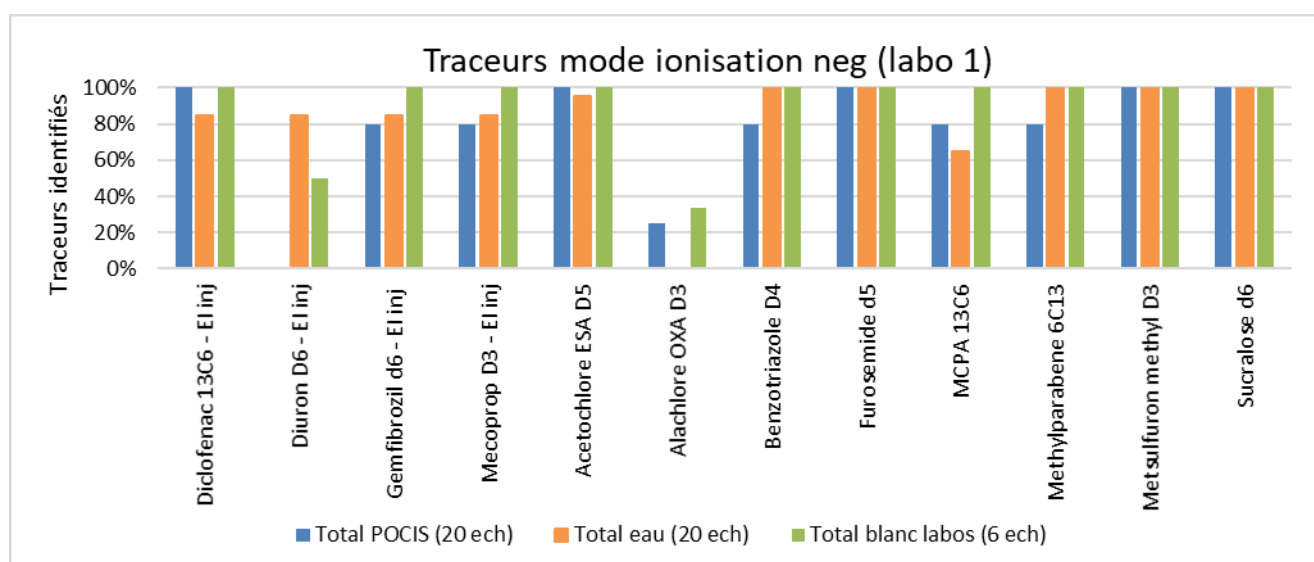
Les traceurs d'injection reflètent la sensibilité analytique des appareils utilisés et les effets matrices liés à la matrice de l'échantillon lors de l'analyse. Ils sont majoritairement retrouvés par les laboratoires 1 et 2. Le laboratoire 3 n'a utilisé qu'un seul traceur d'injection (le diuron d6) et l'a retrouvé dans tous les cas.

Les traceurs d'extraction incluent les pertes subies lors de l'étape de préparation des échantillons en plus des effets instrumentaux. Pour ces traceurs, le laboratoire 1 a retrouvé les traceurs d'extraction ajoutés dans la quasi-totalité des échantillons et des blancs. Seules des pertes importantes sont constatées pour le DMST d3 et la norfloxacin d5. La carbétamide d3 n'a quant à elle jamais été retrouvée. Le laboratoire 3 qui utilise un matériel de la même marque que le laboratoire 1 (mais avec des conditions analytiques différentes et une sensibilité de l'appareil diminuée au moment de l'analyse de cet exercice) a reporté un nombre de traceurs d'extraction beaucoup moins important (7 sur 19, probablement en relation avec des pertes de sensibilité). Seuls les traceurs d'extraction aténolol d7, métoprolol d7 et atrazine d5 ont été totalement ou majoritairement retrouvés dans les échantillons. Les autres traceurs ont été reportés dans 17 à 83% des cas. Malgré le problème de sensibilité évident constaté par le laboratoire 3, l'exploitation qualitative des résultats a pu être réalisée avec une précision en masse tout à fait acceptable et la présence de fragments pour de nombreux composés, permettant ainsi leur identification.

Le laboratoire 2 a reporté 17 traceurs d'extraction sur les 19. Des différences importantes peuvent être constatées selon les traceurs. Certains ont été observés dans pratiquement tous les échantillons (comme les metsulfuron méthyl d3, imidaclopride d4 et atrazine d5) alors que d'autres ont été faiblement reportés notamment uniquement dans les blancs. Le matériel de ce laboratoire étant différent, l'hypothèse d'effets de matrices différents peut être avancée pour expliquer ces différences.

3.1.1.1.2 Mode d'ionisation négatif

Les résultats des traceurs (d'injection à gauche puis d'extraction) sont présentés dans la Figure 11 pour le mode d'ionisation négatif (pour rappel, le laboratoire 3 n'a pas effectué d'analyse en mode d'ionisation négatif à cause d'un souci de sensibilité sur l'appareillage).



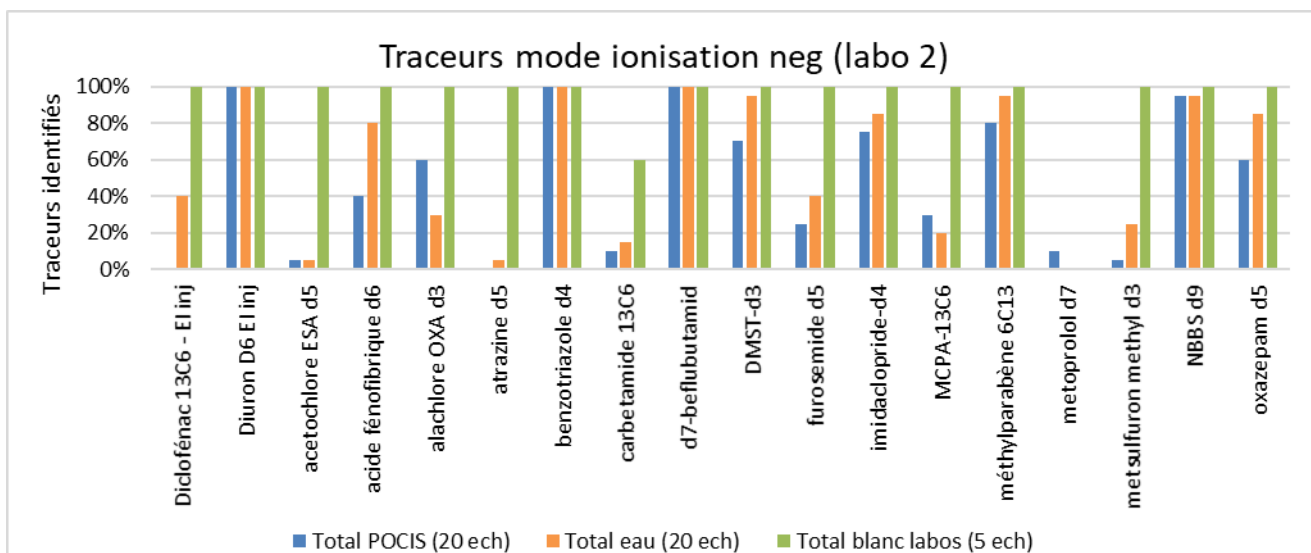


Figure 11. Traceurs d'extraction et d'injection identifiés en analyse LC-HRMS en mode d'ionisation négatif selon les laboratoires d'analyses

Le laboratoire 1 a retrouvé la totalité des traceurs ajoutés avec certaines pertes constatées principalement pour l'alachlore OXA d3. La moitié des composés n'a pas été reporté par ce laboratoire pour environ 20% des échantillons dans ce mode d'acquisition. Pour les substances listées dans le Tableau 3 en tant que traceurs d'extraction pour le mode d'ionisation négatif, seul le sucralose d6 n'a pas été reporté. Comme pour le mode d'ionisation positif, certains traceurs sont retrouvés dans tous les échantillons (ou presque) comme le benztotriazole d4, le béflubutamid d7 et le NBBS d9 alors que les autres présentent des différences importantes selon les échantillons. Ainsi, de nombreux traceurs sont beaucoup plus fréquemment retrouvés dans les blancs que dans les échantillons. Les résultats du laboratoire 2 confirment cette disparité de comportement entre les traceurs et les matrices.

3.1.1.2 Suivi des traceurs dans les échantillons

Le traitement des résultats effectué dans la partie précédente a mis en évidence que selon les modes d'analyse et les instruments utilisés, les traceurs n'étaient pas systématiquement retrouvés dans tous les échantillons. Afin de pouvoir obtenir plus d'informations sur l'influence du matériel/conditions analytiques/effets matrices sur les résultats obtenus par chaque laboratoire, 5 traceurs d'extraction (3 en mode d'ionisation positif et 2 en négatif), parmi les plus retrouvés et communs au 3 laboratoires ont été suivis et comparés pour chaque échantillon.

3.1.1.2.1 Suivis des traceurs d'injection

Le suivi de certains traceurs d'injection pour les laboratoires 1, 2 et 3 est présenté en Annexes 3 et 4. Les observations pour les traceurs d'injection sont globalement les mêmes que pour les traceurs d'extraction. Ainsi, pour le laboratoire 1, les mêmes observations pour le mode d'ionisation positif sont observées mais avec plus d'intensité, facteur ~2 pour les échantillons d'eaux par rapport aux POCIS. Pour le mode d'ionisation négatif, les différents traceurs étudiés montrent tous une intensité beaucoup plus importante pour les échantillons de POCIS que pour les eaux avec un effet de matrice plus marqué pour ces derniers.

Pour le laboratoire 2, les résultats sont également semblables à ceux observées pour les traceurs d'extraction. Ainsi, des différences importantes de sensibilités sont constatées entre le blanc et les échantillons et entre les échantillons entre eux. Ces différences sont atténuées en mode négatif par rapport au mode positif.

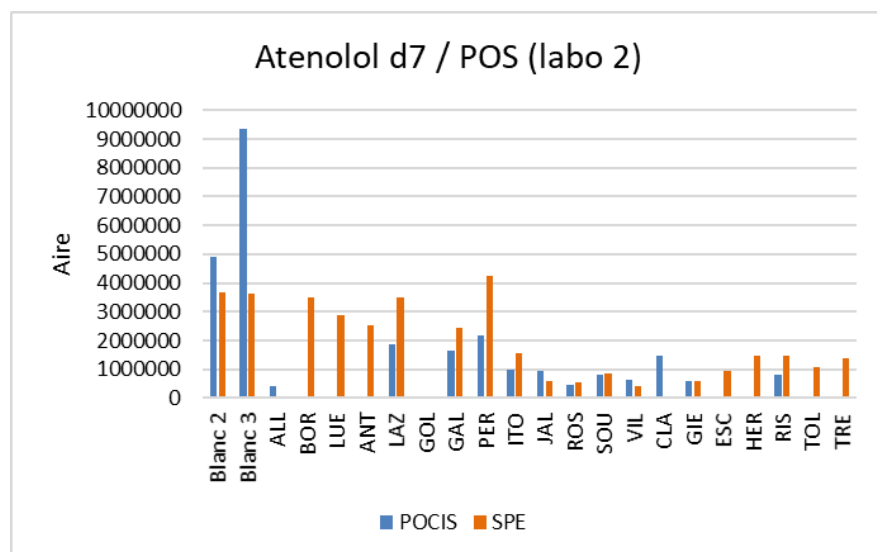
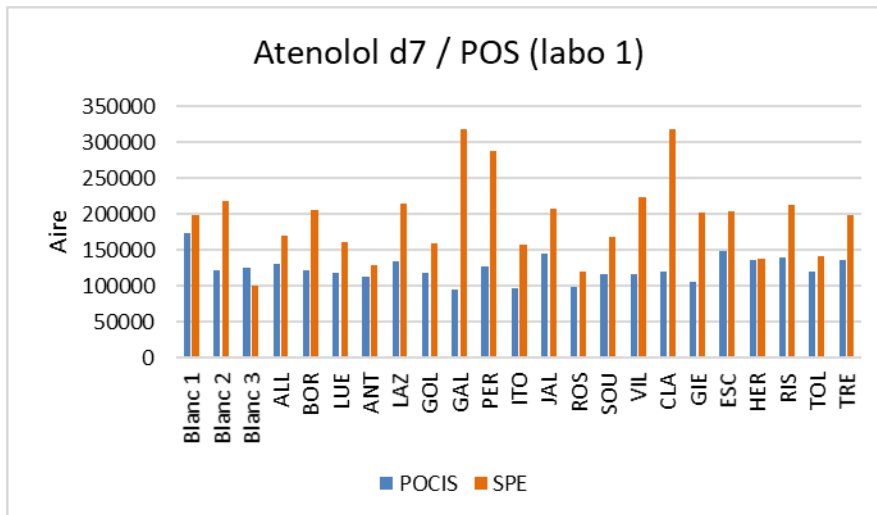
Pour le laboratoire 3, des résultats comparables sont obtenus entre les échantillons de POCIS et d'eau pour un même site mais avec une différence beaucoup plus marquée entre échantillons que celle observée pour le labo 1 (bien que ces deux laboratoires disposent d'équipements similaires).

3.1.1.2.2 Suivi plus fin d'une sélection de traceurs d'extraction

3.1.1.2.2.1 Mode d'ionisation positif

Pour le mode d'ionisation positif, 3 substances (aténolol d7, oxazepam d5, imidaclopride d4) ont été suivies dans chaque échantillon et blancs laboratoire. Les résultats sont présentés dans la Figure 12 (aténolol d7) et en Annexe 3 (imidaclopride d4 et oxazepam d5).

Les blancs permettent la comparaison avec les aires obtenues pour les échantillons (le laboratoire 2 n'a pas effectué l'analyse du blanc 1 eau). Les aires entre les laboratoires ne sont pas comparables entre elles car les analyses ont été réalisées sur des équipements différents.



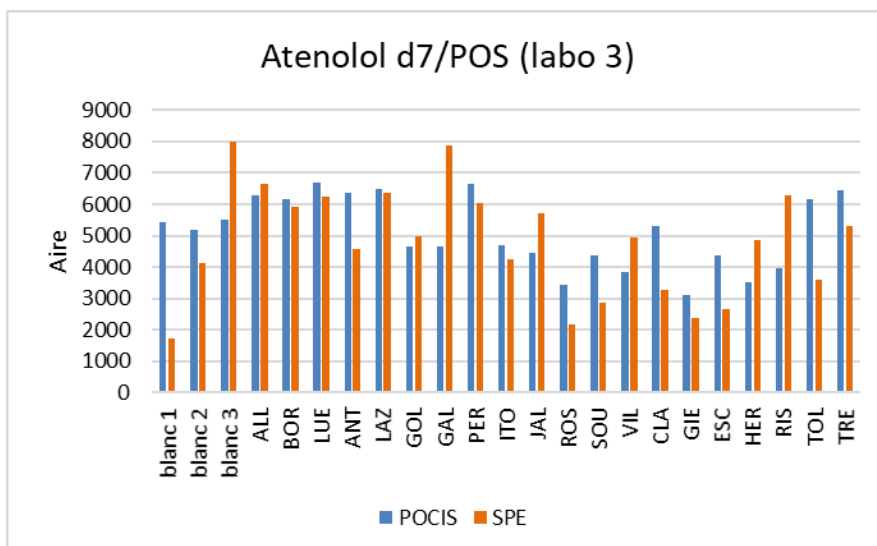


Figure 12. Suivi du traceur d'extraction aténolol D7 en analyse LC-HRMS en mode d'ionisation positif dans les échantillons SPE, POCIS et blanc par laboratoire.

Pour le laboratoire 1, la même tendance peut être observée pour les 3 composés suivis. Il ne semble pas qu'il y ait des différences très marquées en termes d'aires mesurées entre les blancs et les échantillons. Cependant, des abondances beaucoup moins importantes sont observées pour les traceurs d'extraction dans les échantillons de POCIS que dans ceux des eaux. Une hypothèse pourrait être des effets de matrices plus importants pour les échantillons de POCIS. Des différences d'un rapport d'aires maximum d'environ 3 peuvent être observées entre les aires mesurées pour les échantillons d'une même catégorie (SPE ou POCIS) ce qui met en évidence des effets de matrices différents selon les échantillons.

Le laboratoire 2 présente des différences particulièrement marquées pour les échantillons de POCIS entre les blancs et les échantillons. Cette différence est très atténuée pour les échantillons d'eaux ce qui semble montrer une complexité matricielle plus forte pour les échantillons de POCIS. Les influences matricielles entre les différents échantillons sont beaucoup plus marquées entre eau et POCIS pour ce laboratoire avec des rapports d'aires parfois supérieurs à 10, montrant un impact plus fort sur cet équipement.

Le laboratoire 3 ne présente pas pour l'aténolol d7 les mêmes rapports d'aires entre blancs, échantillons d'eau et de POCIS comme constaté pour le laboratoire 1. Pour les 2 autres traceurs d'extraction qui semblent se situer aux limites de détection analytique, les mêmes tendances que celles observées pour le laboratoire 1 peuvent être dressées (effets de matrices relativement limités entre les échantillons et de des aires plus élevées pour les échantillons d'eaux par rapport à ceux de POCIS). Les faibles intensités obtenues comparées au laboratoire 1 peuvent être potentiellement attribués i) au fait d'avoir évaporé à sec les extraits reçus du laboratoire 1 pour changer de solvant de reprise et ii) à un problème de détecteur qui a été découvert au cours de l'analyse des échantillons de cette campagne. Le détecteur a été changé ensuite, mais la série analytique n'a pas pu être ré-analysée puisque les extraits avaient été congelés/décongelés plusieurs fois.

3.1.1.2.2.2 Mode d'ionisation négatif

Pour le mode d'ionisation négatif, 2 traceurs d'extraction (benzotriazole d4, méthyl parabène 13C6,) ont été suivis. Les résultats sont présentés dans la Figure 13 pour le benzotriazole d4.

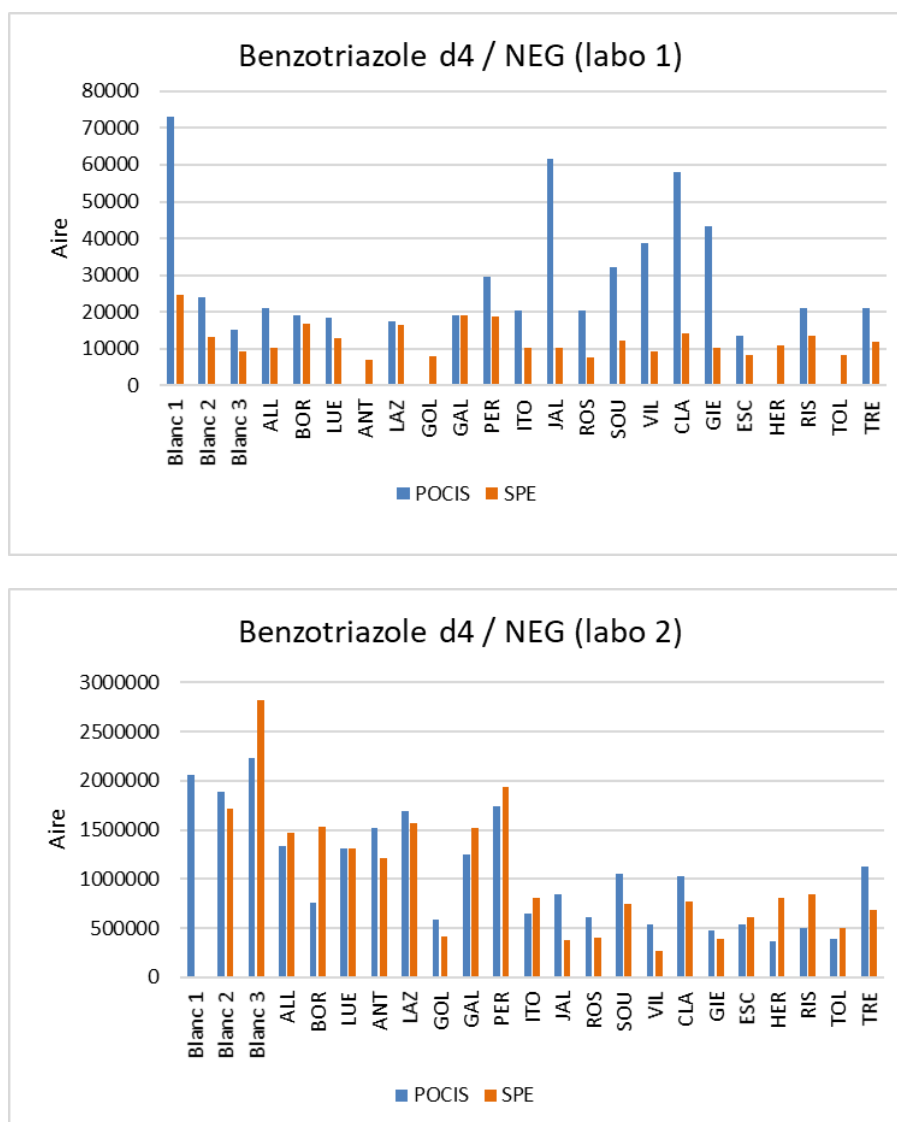


Figure 13. Suivi du traceur d'extraction benzotriazole d4 en analyse LC-HRMS en mode d'ionisation négatif dans les échantillons eau, POCIS et blanc par laboratoire

Globalement, pour le laboratoire 1, les mêmes constatations sur les différences d'intensité de signal entre les blancs et les échantillons peuvent être effectuées par rapport à celles du mode positif (rapport d'aires maximum de 3 environ).

Pour le laboratoire 2, les différences observées entre les aires sont atténuées par rapport au mode positif que ce soit pour la différence avec les blancs/échantillons et pour les effets matrices entre les échantillons (mais qui restent important, d'un facteur jusqu'à 6 entre blanc/échantillons). Les écarts de signal entre les échantillons d'eaux et de POCIS semblent également réduits.

3.1.1.2.3 Suivi des temps de rétention des traceurs

Les temps de rétention des 5 traceurs d'extraction dans les différents blancs et échantillons ont été étudiés. Les résultats sont présentés en détails en Annexe 5. Il est globalement

constaté des écarts de temps de rétention pour les composés considérés relativement faibles, tous dans la tolérance habituellement considérés de $\pm 0,2$ min pour la validation de l'identité d'une molécule.

Ces résultats confortent l'utilisation des temps de rétention chromatographiques comme un critère fort pour l'identification des molécules.

3.1.1.2.4 Suivi des rapports m/z des traceurs

Les rapports m/z pour l'ion moléculaire monoisotopique des 5 traceurs d'extraction dans les différents blancs et échantillons ont été étudiés. Les résultats sont présentés en détails en Annexe 6 et dans la Figure 14 et notamment la comparaison par rapport à la valeur théorique.

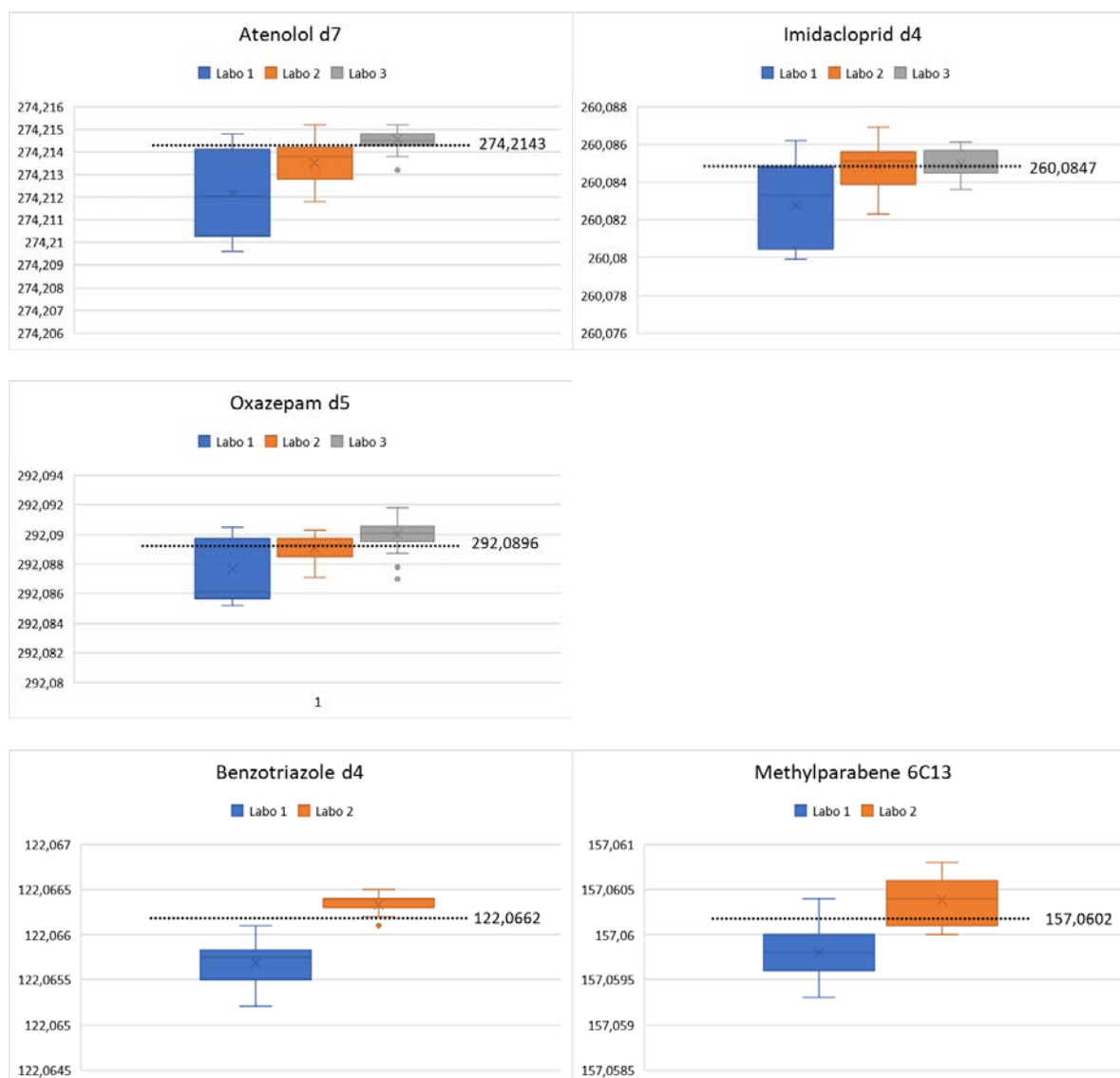


Figure 14. Boîte à moustache de la variation du rapport m/z de l'ion monoisotopique de certains traceurs lors de la mesure des échantillons et des blancs (n=.26.) (En trait pointillé noir, la valeur théorique) (mode positif pour aténolol d7, imidaclopride d4, oxazepam d5, mode négatif pour benzotriazole d4 et méthylparabène 6C13)

Globalement, les laboratoires 2 et 3 présentent des écarts relativement acceptables par rapport à la valeur théorique pour les composés détectés en mode d'ionisation positif et négatif et sont systématiquement dans un écart <10 ppm.

Pour le laboratoire 1, des écarts plus importants sont constatés et sont mêmes supérieurs à 10 ppm dans certains cas en mode d'ionisation positif. Ce biais est dû à une mauvaise correction au cours de ces injections par la solution de référence corrigeant les déviations de masse en cours d'injection. Pour ce laboratoire, une tolérance plus importante a donc été appliquée pour l'identification des molécules en fonction de la tolérance moyenne appliquée pour l'identification des traceurs, sans que cela remette en cause les résultats.

Les écarts par rapport au m/z théorique sont, sur les exemples traités, moins importants pour le mode d'ionisation négatif que pour le positif et cela est constaté pour les 2 laboratoires ayant effectué ce type d'analyse malgré la différence de matériel.

3.1.2 Suivi des traceurs utilisés en GC-HRMS

Les résultats des traceurs utilisés pour l'analyse en GC-HRMS des échantillons (eau et POCIS) et des blancs laboratoires (eau et POCIS) sont présentés dans la Figure 15. Les résultats sont exprimés en % de détection selon les échantillons considérés. Les résultats reportés incluent les traceurs d'extraction et les traceurs d'injection.

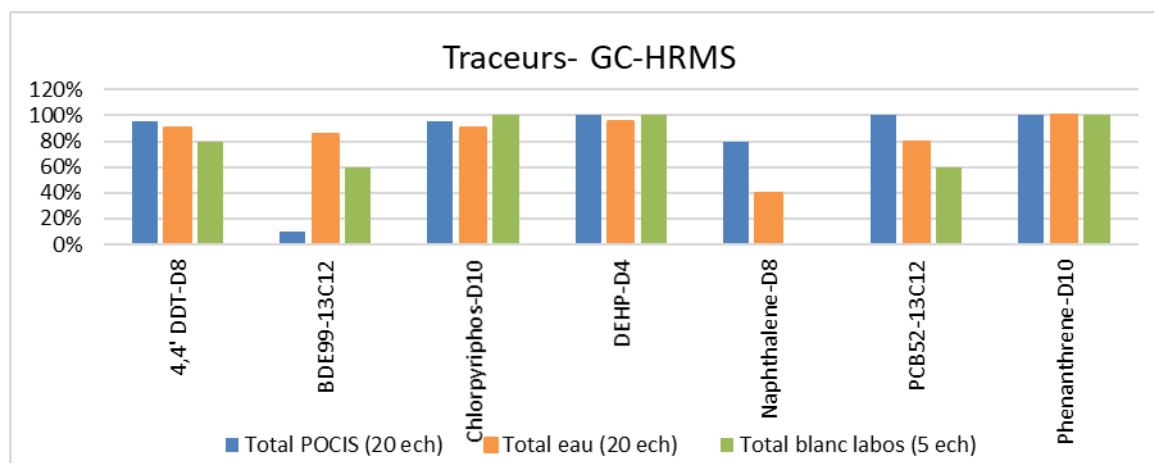


Figure 15. Traceurs d'extraction et d'injections identifiés en GC-HRMS, % de détection par type d'échantillon

Certains traceurs comme le 4,4' DDT d8, phénanthrène d10, le chlorpyrifos d10 et le DEHP d4 sont majoritairement retrouvés dans tous les échantillons. Le naphtalène est faiblement retrouvé dans les échantillons et dans aucun blanc. Ce composé est volatil et a pu être en partie perdu lors de la préparation d'échantillon (notamment le changement de solvant). De plus, ce composé est un HAP. Les composés de cette famille sont faiblement fragmentés ce qui peut entraîner des problèmes de reconnaissance par l'algorithme de détection (il n'a pas été effectué de recherche spécifique (ciblée) afin de rester dans une configuration identique à une recherche de suspect). Pour les BDE 99 13C12 et PCB 13C12, c'est l'effet inverse. Ces composés sont extrêmement fragmentés, cependant, ils sortent chromatographiquement dans des régions où de nombreux composés sont présents. En GC-HRMS, tous les composés présents entraînent de nombreux fragments, le logiciel peut avoir des difficultés à recombinaison tous les fragments ce qui entraîne une mauvaise identification. Les temps de rétention étaient légèrement décalés par rapport à ceux de la base de données, notamment pour le BDE 99 13C12 dans les analyses des échantillons de POCIS. Ce critère ayant été paramétré comme ayant un poids important dans le score de reconnaissance, cela a également contribué à des problèmes d'identification de ces substances. Ces exemples serviront à mettre une attention particulière afin d'améliorer le suivi et reconnaissance des traceurs et substances d'intérêt en mode suspect par GC-HRMS.

Avec ces résultats, il n'est pas possible de déterminer de tendances sur les influences matricielles entre les blancs, les échantillons d'eau et de POCIS.

3.1.2.1 Suivi des aires des traceurs internes

Pour les analyses par GC-HRMS, 2 traceurs d'extraction (chlorpyrifos d10, DEHP d4) et 1 traceur d'injection (phénanthrène d10) ont été suivis dans chaque échantillon et blancs laboratoire. Les résultats sont présentés dans la Figure 16 en fonction de l'aire mesurée pour les 2 composés suivis.

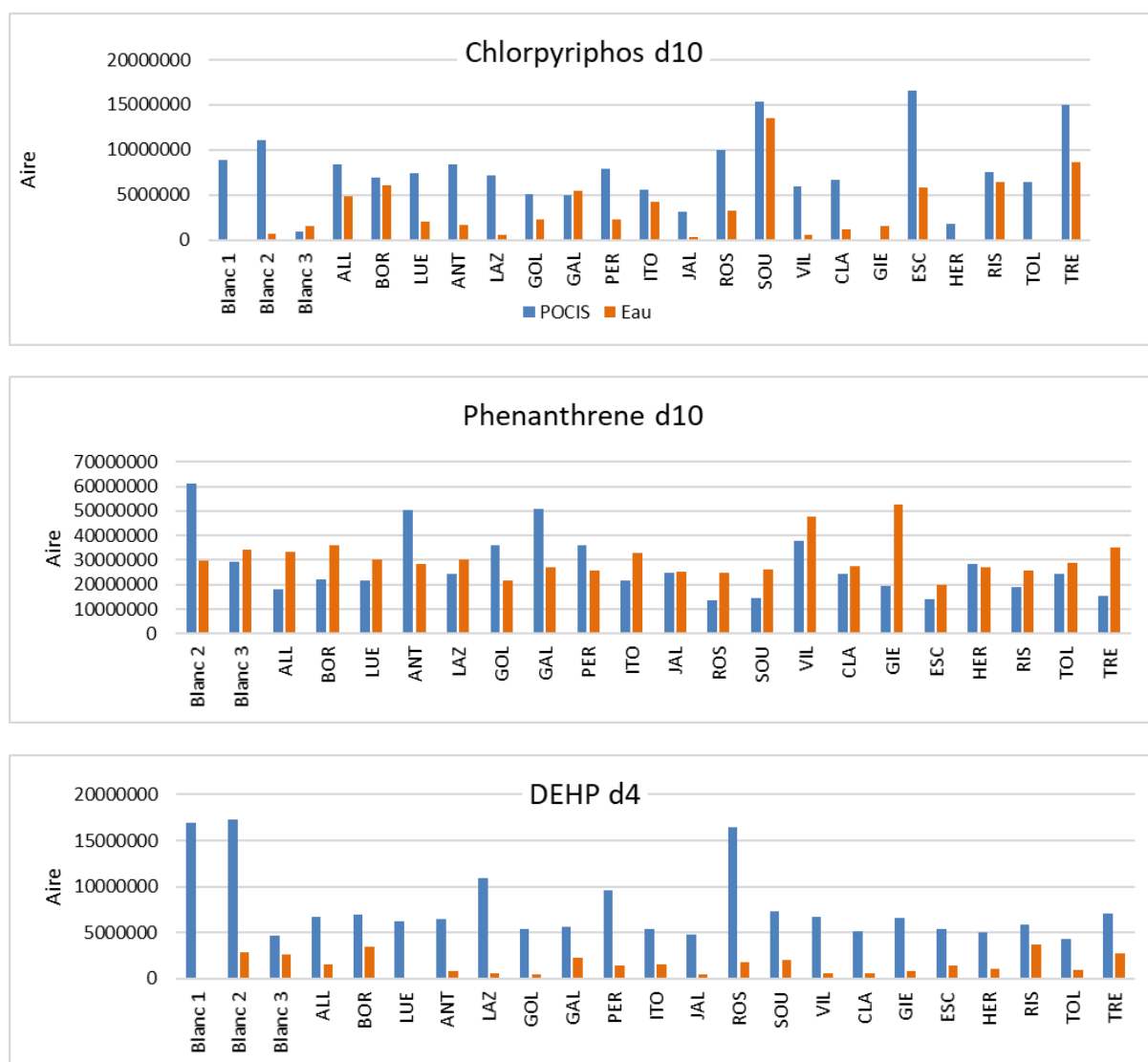


Figure 16. Suivi des traceurs d'extraction chlorpyrifos d10, DEHP d4 et du traceur d'injection phénanthrène d10 dans les échantillons eau, POCIS et blanc par GC-HRMS

Le traceur d'injection phénanthrène d10 montre peu de différences entre les injections de blancs, d'eau ou de POCIS ce qui montre que les effets de matrices semblent relativement limités lors de l'analyse instrumentale.

Les résultats pour les traceurs d'extraction présentent des différences beaucoup plus importantes particulièrement pour les échantillons de POCIS pour le cas du DEHP d4. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées. La préparation d'échantillon différente pour les

échantillons d'eau et de POCIS aurait pu favoriser la perte par adsorption, lors du traitement des échantillons d'eau, des composés hydrophobes comme ceux analysés en GC-HRMS. Les échantillons étaient initialement dans un mélange méthanol/dichlorométhane. Ils ont été mis à sec puis repris dans du dichlorométhane (ce qui a notamment entraîné la perte importante de naphthalène d10). Cette étape a pu entraîner des discriminations entre les échantillons. Il est donc difficile de pouvoir établir des conclusions sur cette partie car de nombreux facteurs ont pu conduire aux variabilités observées pour les résultats obtenus pour les différents échantillons. Mais cette forte variabilité, notamment sur le DEHP D4 ou le chlorpyrifos d10 doit être explorée afin de pouvoir par la suite donner des recommandations quant à sa pertinence comme traceur.

3.1.2.2 Suivi des temps de rétention des traceurs

Les temps de rétention des différents traceurs dans les différents blancs et échantillons (lorsqu'ils ont été détectés) ont été étudiés et les résultats sont présentés en détails en Annexe 7. Il est globalement constaté que les écarts de temps de rétention sont acceptables, tous inférieurs à la tolérance $\pm 0,1$ min. Les analyses en GC ont été effectuées en 2 séquences distinctes (globalement, une pour les échantillons d'eaux et une pour ceux de POCIS). Entre ces 2 séquences, une maintenance du système a été effectuée et notamment un changement des colonnes analytiques. Le système a été recalibré pour obtenir les mêmes temps de rétention mais cela a néanmoins entraîné un léger décalage pour tous les composés ce qui explique les dispersions observées. Les résultats, présentés en Annexe 7 démontrent que les temps de rétention sont très similaires au sein d'une même séquence et peu influencés par des effets de matrices. Cette variabilité devra être inclus dans la tolérance admise pour valider les résultats.

3.1.2.3 Suivi des rapports m/z des traceurs

Les rapports m/z pour l'ion de base (le fragment présentant l'intensité la plus importante,) des traceurs d'extraction et d'injection dans les différents blancs et échantillons ont été étudiés. Les résultats sont présentés en détails en Annexe 8. Les résultats démontrent la très bonne stabilité du système avec une déviation de la mesure massique extrêmement faible (moins de 10 ppm pour tous les composés).

3.1.3 Conclusion sur les traceurs

L'utilisation des traceurs d'injection et d'extraction dans l'analyse non-ciblée est indispensable afin de pouvoir contrôler et évaluer la qualité de la donnée produite. En effet, les différents traceurs permettent d'indiquer les pertes subies lors de la préparation d'échantillon ou de suivre l'évolution de la mesure instrumentale (temps de rétention, sensibilité et précision sur la masse mesurée) ou les effets de matrices induits par les extraits.

Le laboratoire 1 (6/6 traceurs d'injection et 25/27 traceurs d'extraction en considérant tous les échantillons) et dans une moindre mesure le laboratoire 2 (3/3 traceurs d'injection et 20/27 traceurs d'extraction en considérant tous les échantillons) ont retrouvé la grande majorité des étalons utilisés en LC-HRMS que ce soit en mode d'ionisation positif ou négatif. Pour ces analyses, le suivi des traceurs a notamment montré que l'équipement utilisé par le laboratoire 2 semblait plus sensible à des effets de matrices que celui des 2 autres laboratoires.

Le laboratoire 3 a détecté en LC-HRMS mode d'ionisation positif un nombre limité de traceurs d'extraction internes (7/19) ; le traceur d'injection utilisé (diuron d6) a été retrouvé dans tous les cas. Ces résultats montrent un manque de sensibilité instrumentale lors de l'analyse des

échantillons. Par conséquent, les résultats obtenus par ce laboratoire comme constaté pour les traceurs ne vont refléter que les polluants présents en relative haute concentration (ce niveau est difficile à estimer étant donné qu'il n'y a pas de données quantitatives) ou produisant une bonne réponse analytique/ionisation par substance.

Les extraits LC-HRMS du laboratoire 3 et GC-HRMS du laboratoire 2 ont été évaporés à sec et repris dans un solvant différent pour être compatibles avec les protocoles d'analyses de ces laboratoires. Cette étape supplémentaire a entraîné des pertes (exemple du naphthalène d10 en GC-HRMS) et une baisse de réponse des traceurs. Il convient donc d'être très vigilant quant au protocole de préparation pour limiter ces étapes.

Globalement, les résultats de cette étude vont permettre d'affiner les sélections des étalons internes pour les futures campagnes d'analyses non-ciblées en mode suspect. Ils permettront d'établir des critères de contrôle qualité pour « valider » la bonne acquisition des analyses et ainsi pondérer les résultats en termes d'identification (et surtout non-identification d'une substance dans un échantillon). La sélection des étalons les plus robustes permettra d'établir des critères de contrôles, tandis que des étalons plus sensibles permettront de mieux caractériser les étapes analytiques. Les étalons jamais détectés ne seront quant à eux, pas retenus.

3.2 TRAITEMENT DES BLANCS

3.2.1 Blancs laboratoire

3.2.1.1 Molécules identifiées par analyse LC-HRMS

Au total 67 molécules ont été identifiées par LC-HRMS dans les blancs (POCIS, extraction et terrain, et SPE) dont 34 avec des niveaux d'identification 1, 2B et 2A et parmi elles, seules 2 sont communes entre deux laboratoires, le bisphénol A et la clarithromycine (Figure 17). Le laboratoire 3 a identifié 19 molécules dans un blanc laboratoire SPE, ces résultats ne sont pas pris en compte dans la suite du rapport ; un doute subsiste quant à la possibilité d'une inversion entre le blanc laboratoire SPE et l'extrait SPE du site de la Jalle de Blanquefort (JAL) pour ce laboratoire.

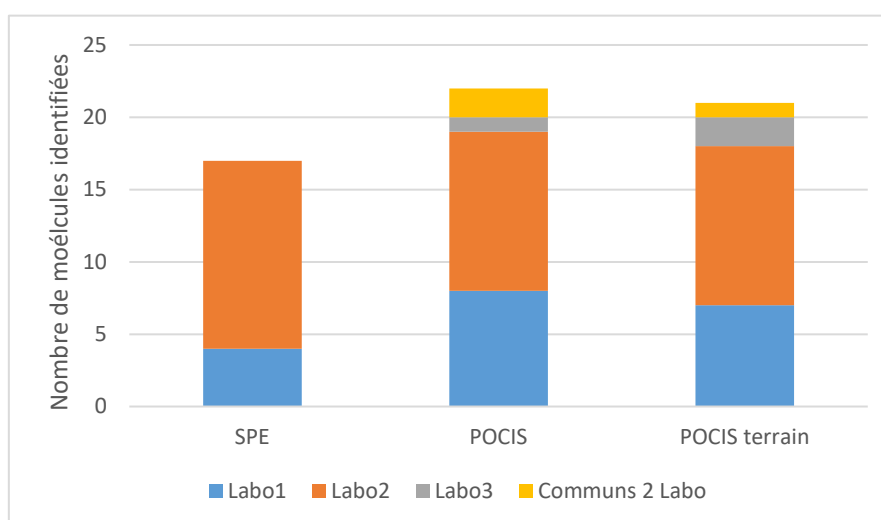


Figure 17 : Nombre de molécules identifiées aux niveaux 1, 2B et 2A dans les blancs par analyse LC-HRMS

Les molécules identifiées aux niveaux 1, 2A et 2B dans les blancs laboratoire par analyse LC-HRMS sont listées dans le Tableau 11.

Pour rappel au cours de l'étude, 3 blancs laboratoires ont été considérés (§2.3.3) : les blancs d'extraction SPE (n=3), les blancs d'extraction POCIS (n=3) et les blancs terrain POCIS (n=8).

Aucune molécule n'est identifiée dans tous les blancs laboratoire et tous les réplicas n=14 (Tableau 11).

Certaines molécules sont identifiées dans les trois types de blancs laboratoire comme le bisphénol A, le DEHP, le DEP, le dibutylphthalate, l'irganox 1076, la sébuthylazine, le TCEP et le TCPP (Tableau 11). La majorité de ces molécules sont des plastifiants connus pour être assez ubiquistes et sont fréquemment identifiées dans les blancs laboratoire. Le bisphénol A est identifié selon 2 approches dans les blancs POCIS ; une approche par le laboratoire 1 et l'autre par le laboratoire 2. Le laboratoire 2 semble avoir une méthode analytique plus sensible pour la détection du bisphénol A car il est identifié dans un plus grand nombre d'échantillons.

D'autres molécules telles que des plastifiants, composés perfluorés, pesticides et composés pharmaceutiques sont identifiées uniquement dans les blancs extraction SPE. Seul le 2-isodecylphthalate est identifié de façon certaine (niveau 1) et les autres composés le sont au niveau 2B. L'identification au niveau 2B indique que les fragments n'ont pas pu être comparés entre ceux de la base de données et ceux de l'échantillon ; il n'y a donc pas de fragments détectables pour ces molécules dans les blancs extraction SPE. Il se peut qu'elles soient réellement présentes dans les échantillons ou il s'agisse de « faux positifs ». Pour différencier ces 2 hypothèses il serait nécessaire de faire des ajouts dosés¹¹.

Certaines molécules ont été identifiées uniquement dans les blancs d'extraction POCIS comme des pesticides, des composés perfluorés et pharmaceutiques. Leur identification n'a eu lieu que sur un des 3 blancs d'extraction et par un seul laboratoire sauf la clarithromycine qui a été identifiée par deux laboratoires (1 et 3) dans un même blanc d'extraction POCIS. Ces molécules n'ont pas été identifiées dans les blancs terrain qui ont pourtant subi la même extraction.

Cinq molécules ont été uniquement identifiées dans les blancs terrains POCIS. Il s'agit de produits de soin corporel, dibutyl adipate (utilisé dans les cosmétiques) et dioxybenzone (filtres UV), d'un composé pharmaceutique (drospirenone utilisé en tant que progestatif), de pesticides tels que l'éthyl-N-acétyl-N-butyl- β -alaninate (IR3535, insecticide utilisé en tant qu'anti-moustiques) et le pyrimethanil.

La présence de certaines molécules est non expliquée et problématique car retrouvées à plusieurs reprises dans les blancs laboratoire avec des réponses parfois largement supérieures à celles des échantillons. Certains conservateurs notamment (parabènes, phtalates), des composés industriels (phénols), et des pesticides sont fréquemment identifiés dans les blancs laboratoire. Ces molécules sont connues pour être ubiquistes, il est donc important de comparer les intensités présentes dans les blancs par rapport à celle des échantillons.

Les contaminations au cours de l'échantillonnage et de l'extraction sont inévitables et variables en fonction de l'opérateur, du matériel, solvant et lieu d'extraction, etc ...; le cas du bisphénol

¹¹ Ajout de volumes connus d'un étalon de concentration connue dans l'échantillon pour modifier la sensibilité de la méthode

A en est un très bon exemple. Il s'avère important de consolider les résultats issus de l'analyse non-ciblée à l'aide de contrôles qualité adaptés.

Comme indiqué dans le paragraphe 2.5.2, la limite fixée pour affirmer qu'un composé est vraiment présent dans un échantillon est que l'intensité du signal soit supérieure à 10 fois celle du blanc. Le premier travail d'exploitation des résultats est donc de comparer les molécules identifiées dans les blancs et les échantillons. Cette étape permet de travailler uniquement sur les molécules réellement présentes dans les échantillons. Pour les analyses LC-HRMS, la présence dans les blancs n'étant pas reproductible, il a été choisi de ne pas supprimer systématiquement les identifications de molécules dans les résultats présentés dans la suite du rapport.

Tableau 11 : Molécules identifiées, aux niveaux 1,2B et 2A, dans les blancs laboratoires par analyse LC-HRMS (n est le nombre d'identification par niveau d'identification)

Molécules	Famille	Nombre de base de données LC incluant le composé	Niveau ID Blanc extraction SPE (n=3)			Niveau ID Blanc extraction POCIS (n=3)			Niveau ID Blanc terrain POCIS (n=8)		
			Labo 1	Labo 2	Labo 3	Labo 1	Labo 2	Labo 3	Labo 1	Labo 2	Labo 3
2-Nitrophénol	Autres	1		2B (n=1)							
4-tert-octylphénol	Autres	2				1 (n=1)			1 (n=2)		
Acide Benzoïque	Pharmaceutiques	2				2B (n=1)			2B (n=4)		
Bisphénol A	Autres	3		1 (n=2)		1 (n=2)	1 (n=3)		1 (n=2)	1 (n=6)	
Clarithromycine	Pharmaceutiques	3				1 (n=1)		2B (n=1)			
DEET	Pesticides	3				1 (n=1)			1 (n=3)		
DEHP	Autres	3		2A (n=1) 1 (n=1)			2A (n=1) 1 (n=2)			2A (n=1) 1 (n=6)	
DEP / Diethyl phthalate	Autres	2		2B (n=2)			2B (n=3)			2B (n=6)	
Dexaméthasone	Pharmaceutiques	3	2B (n=3)								
Dibutyl adipate	Autres	1								2B (n=1)	
Dibutyl phthalate	Autres	2		1 (n=2)			1 (n=3)			1 (n=6)	
Di-isodecyl phthalate	Autres	1		1 (n=1)							
Dinoterb	Pesticides	3				1 (n=1)			2B (n=1) 1 (n=1)		
Dioxybenzone	Autres	1								2B (n=1)	
Drospironone	Pharmaceutiques	2							1 (n=2)		
Ethyl N-acetyl-N-butyl-β-alaninate	Autres	2								2B (n=1)	

Molécules	Famille	Nombre de base de données LC incluant le composé	Niveau ID Blanc extraction SPE (n=3)			Niveau ID Blanc extraction POCIS (n=3)			Niveau ID Blanc terrain POCIS (n=8)		
			Labo 1	Labo 2	Labo 3	Labo 1	Labo 2	Labo 3	Labo 1	Labo 2	Labo 3
Fenpropimorph	Pesticides	3				1 (n=1)					
Irganox 1076	Autres	1		1 (n=1)			1 (n=1)			1 (n=3)	
Mefenacet	Pesticides	2						2B (n=1)			2B (n=2)
Melamine	Autres	1		2B (n=1)							
Méthylparabène	Pharmaceutiques	3				1 (n=2)					
PFBS	Autres	2					2A (n=1)				
PFoA	Autres	3		2A (n=1) 1 (n=1)			2A (n=1)				
PFOS	Autres	3					2A (n=1)				
Phosalone	Pesticides	3	2B (n=1)								
Propazine	Pesticides	3		2B (n=1)						2B (n=3)	
Prosulfocarb	Pesticides	3				1 (n=1)					
Pyrimethanil	Pesticides	2									2B (n=1)
Sebuthylazine	Pesticides	3	1 (n=3)			1 (n=3)			1 (n=5)		
Sulfachinoxaline	Pharmaceutiques	3	2B (n=1)								
TBP Tributylphosphate	Autres	1		2B (n=1)							
TCEP Tris(2-chloroethyl)phosphate	Autres	1		2B (n=2)			2B (n=3)			2B (n=5)	
TCPP Trichloroisopropyl)phosphate	Autres	1		2B (n=2)			2B (n=3)			2B (n=6)	
TEP Triethyl phosphate	Autres	1					2B (n=2)			2B (n=3)	
TPPA Triphenyl phosphate	Autres	2					2B (n=1)			2B (n=1)	

3.2.1.2 Molécules identifiées par analyse GC-HRMS

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier au total 48 molécules dans les blancs aux niveaux 1, 2A et 2B dans les blancs laboratoires (Figure 18).

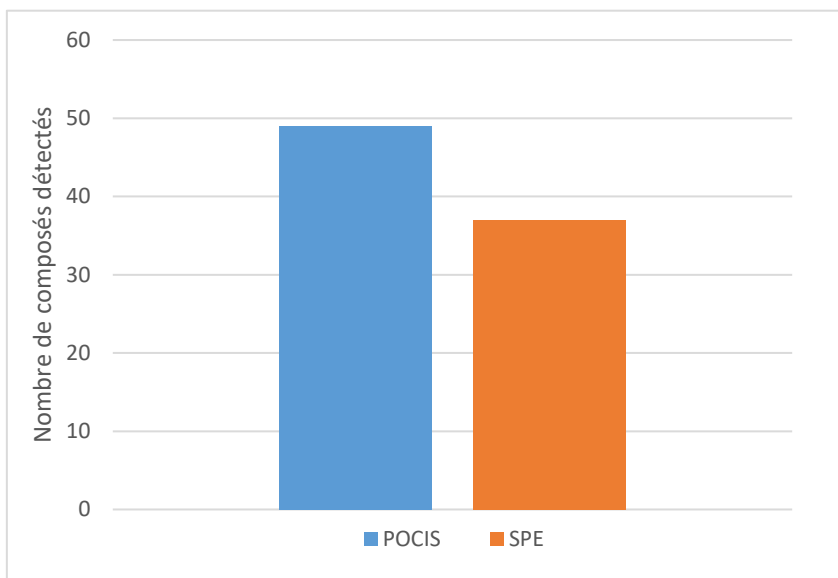


Figure 18 : Nombre de composés identifiés aux niveaux 1, 2A et 2B dans les blancs laboratoire par analyse GC-HRMS

Les molécules retrouvées dans les blancs GC-HRMS sont couramment présentes dans les atmosphères de laboratoires. Ainsi, de nombreuses molécules de la famille des alcanes, des HAPs, des phtalates ou des retardateurs de flamme ont été identifiées avec les bases de données utilisées. Ces molécules sont listées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Molécules identifiées, aux niveaux 1,2B et 2A, dans les blancs laboratoires par analyse GC-HRMS (n est le nombre d'identification par niveau d'identification)

Molécules	Famille	Approche	Niveau ID Blanc extraction SPE (n=3)	Niveau ID Blanc extraction POCIS (n=3)	Niveau ID Blanc terrain POCIS (n=8)
1,2,4-Trichlorobenzene	Autres	1		2B (n=1)	2B (n=1)
1-Tetradecene	Autres	1		1 (n=1)	
2,3,5-Trimethylnaphthalene	Autres	1			2B (n=2)
2,6-Diisopropylnaphthalene	Autres	1	2B (n=1)		2B (n=4)
2,6-Dimethylnaphthalene	Autres	1	2B (n=1)		2B (n=3)
2-Undecanone	Autres	1			2B (n=3)
3,4-Dichlorophenylisocyanate	Métabolites pesticides		2B (n=2)	2B (n=2)	2B (n=3)
3,5,5-Trimethylcyclohexenone (Isophorone)	Autres	1			2B (n=1)
4-Nonylphenol	Autres	1	1 (n=1)	1 (n=1)	1 (n=1) 2A (n=1)
Acenaphthene	Autres	2			1 (n=4)
Acetophenone	Autres	1	2B (n=2)		2B (n=5)
Anthracene	Autres	2		1 (n=1) 2B (n=1)	1 (n=6)
Bensulide	Pesticides	1	2B (n=1)	2B (n=3)	2B (n=6)
Benz[a]anthracene	Autres	2			2B (n=1)
Benzo[a]pyrene	Autres	2		2B (n=1)	1 (n=2)
Benzo[j]fluoranthene	Autres	1			2B (n=1)
Benzyl alcohol	Autres	1	2B (n=2)		
Biphenyl	Pesticides	1	2B (n=1)		2B (n=4)
Caprolactam	Pharmaceutique	1	2B (n=1)		2B (n=2)

Molécules	Famille	Approche	Niveau ID Blanc extraction SPE (n=3)	Niveau ID Blanc extraction POCIS (n=3)	Niveau ID Blanc terrain POCIS (n=8)
Chrysene	Autres	2		1 (n=1)	1 (n=1)
Cyclohexane, tetradecyl-	Autres	1			1 (n=1)
DBP (Dibutyl phthalate)	Autres	2	1 (n=2)	1 (n=3)	1 (n=6)
DEET	Pesticides	1		2B (n=2)	2B (n=4)
DEHA / Di(2-ethylhexyl) adipate	Autres	1			2B (n=4)
DEHP (Bis(2-ethylhexyl) phthalate)	Autres	2	1 (n=2)	1 (n=3)	1 (n=6)
DEP (Diethyl phthalate)	Autres	2	1 (n=2)	1 (n=3)	1 (n=6)
Dibenzofuran	Autres	1	2B (n=1)		2B (n=1)
DIBP (Diisobutyl phthalate)	Autres	2	1 (n=2)	1 (n=2)	1 (n=6)
Diphenyl ether (Diphenyl oxide)	Autres	1			2B (n=4)
DMP (Dimethyl phthalate)	Autres	2	1 (n=2)	1 (n=1)	1 (n=5)
DNOP (Di-n-octyl phthalate)	Autres	2		1 (n=1)	
DNP / Dinonyl phthalate	Autres	1		2B (n=1)	
Docosane	Autres	1		1 (n=3)	1 (n=6)
Dodecane	Autres	1	1 (n=2)	1 (n=3)	1 (n=4)
Dodecylcyclohexane	Autres	1			2A (n=1)
DPP / Dipentyl phthalate	Autres	1	2B (n=2)	2B (n=3)	2B (n=6)
DUP (Diundecyl phthalate)	Autres	1		1 (n=1)	
Eicosane	Autres	1	2A (n=1)	1 (n=3)	1 (n=6)
Ethiolate	Pesticides	1			
Fluoranthene	Autres	2		1 (n=1)	1 (n=1)
Fluorene	Autres	2	1 (n=1) 2A (n=1)	1 (n=1)	1 (n=4) 2A (n=1)

Molécules	Famille	Approche	Niveau ID Blanc extraction SPE (n=3)	Niveau ID Blanc extraction POCIS (n=3)	Niveau ID Blanc terrain POCIS (n=8)
Flurochloridone	Pesticides	1		2B (n=1)	
Gallex	Autres	1			2B (n=1)
Heneicosane	Autres	1			1 (n=1)
Hentriacontane	Autres	1			1 (n=1)
Heptadecane	Autres	1			1 (n=2)
Hexacosane	Autres	1		1 (n=2)	1 (n=4)
Hexadecane	Autres	1	1 (n=1)	1 (n=3)	1 (n=5)
Isoxadifen	Pesticides	1	2B (n=2)	2B (n=1)	2B (n=5)
Musk Ambrette	Autres	1	2B (n=1)	2B (n=2)	2B (n=3)
Naphthalene	Pesticides	2	1 (n=1) 2B (n=1)	1 (n=2)	1 (n=6)
Naphthalene, 1-methyl-	Autres	2	1 (n=2)	1 (n=1)	1 (n=3)
Naphthalene, 2-methyl-	Autres	2	1 (n=2)	1 (n=1)	1 (n=6)
Nicotine	Pharmaceutique	1	2B (n=1)		
Nonacosane	Autres	1			1 (n=3)
Nonadecane	Autres	1		1 (n=2)	1 (n=3)
Octadecane	Autres	2			1 (n=1) 2A (n=1)
Pentadecane	Autres	2	1 (n=1) 2A (n=1)		1 (n=2)
Perylene	Autres	1		2B (n=2)	2B (n=2)
Phenanthrene	Autres	2	1 (n=1) 2A (n=1)	1 (n=1)	2B (n=4)
Phenol	Autres	2		2B (n=1)	
Phthalic anhydride	Autres	1		2B (n=3)	

Molécules	Famille	Approche	Niveau ID Blanc extraction SPE (n=3)	Niveau ID Blanc extraction POCIS (n=3)	Niveau ID Blanc terrain POCIS (n=8)
Phthalimide	Autres	2		2B (n=2)	2B (n=5)
Promecarb	Pesticides	1		2B (n=1)	2B (n=2)
Propazine	Pesticides	2	1 (n=2)	1 (n=2)	1 (n=4)
Prosulfocarb	Pesticides	1		2B (n=1)	
Pyrene	Autres	2			2B (n=2)
Pyrimethanil	Pesticides	2	2B (n=1)		
Quinoline (Leucoline)	Autres	1			2B (n=1)
TCEP / Tris(2-chloroethyl)phosphate	Autres	1	2B (n=2)	2B (n=2)	2B (n=2)
TCPP / Tri-(2-chloroisopropyl)phosphate	Autres	1	2B (n=2)	2B (n=3)	2B (n=6)
TEP / Triethyl phosphate	Autres	1		2B (n=1)	2B (n=5)
terbucarb	Pesticides	2	2B (n=1)	2B (n=2)	2B (n=3)
Terbutylazine	Pesticides	2		1 (n=1)	
Tetradecane	Autres	1	1 (n=2)	1 (n=3)	1 (n=6)
Tributyl phosphate	Autres	2	1 (n=1) 2B (n=1)	1 (n=3)	1 (n=6)
Tricosane	Autres	2			1 (n=4) 2A (n=1)
Tridecane	Autres	1	1 (n=2)		1 (n=1)
Tri-iso-butyl phosphate	Autres	2	2B (n=2)		2B (n=2)
Tris(3-Chloropropyl)phosphate	Autres	1		2B (n=1)	2B (n=1)
Undecane	Autres	1		2A (n=1)	
UndecylCyclohexane	Autres	1			1 (n=4)

Compte-tenu des résultats dans les blancs, la procédure suivante a été appliquée aux analyses GC-HRMS : si une molécule a été identifiée dans les échantillons et les blancs laboratoire à un ratio (Aire ech/Aire Blc) inférieur à 10, l'identification de la molécule dans l'échantillon n'a pas été conservée.

Après évaluation de ce ratio, la totalité des HAP et des alcanes identifiés dans les échantillons ont été considérés comme des faux positifs (contamination des blancs).

Dans le cas des extraits SPE, 15 substances présentes dans les blancs sont confirmées dans les échantillons: le DEP (diéthyl phtalate), des retardateurs de flamme (tri-iso-butyl phosphate et tributyl phosphate) ou la nicotine.

Pour les extraits de POCIS, 21 composés ont été confirmés dans les échantillons, malgré leur présence dans les blancs, notamment la caprolactam, les retardateurs de flamme ou la nicotine.

4 Identification des molécules recherchées avec les BDD pré-existantes

4.1 CARACTERISTIQUE DES MOLECULES RECHERCHEES ET DETECTEES

4.1.1 Classes de molécules identifiées en LC-HRMS

Dans toutes les figures ci-dessous les traceurs ont été exclus et les molécules identifiées en mode d'ionisation positif et négatif ont été rapportées une seule fois.

4.1.1.1 Identification par le laboratoire 1

Le laboratoire 1 a identifié 128 molécules dans l'ensemble des échantillons (Figure 19). La confiance accordée à leur identification selon la classification Schymanski et le logigramme (Figure 4) est au niveau 1 et 2B. Si l'on classe les composés identifiés par famille, on retrouve une répartition très proche de la BDD de recherche (Tableau 7) .

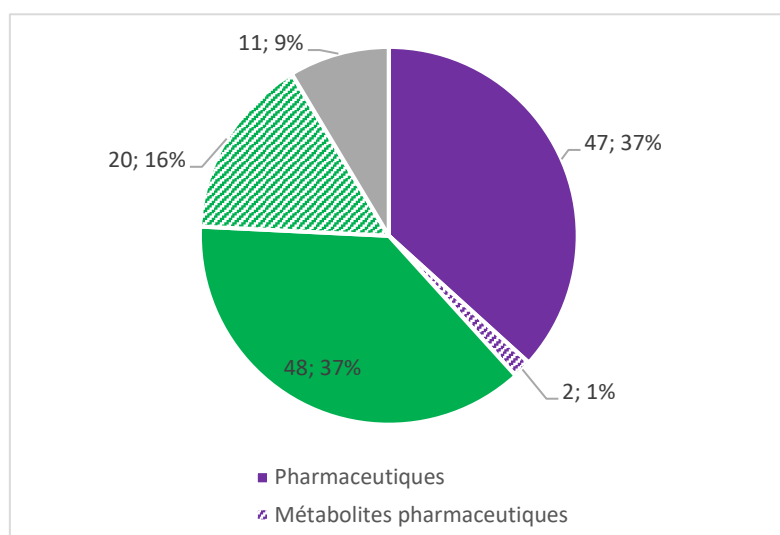


Figure 19 : Répartition par famille des molécules identifiées en LC-HRMS par le Laboratoire 1

4.1.1.2 Identification par le laboratoire 2

Le laboratoire 2 a identifié 217 molécules dans l'ensemble des échantillons ; 145 avec un niveau d'identification 1, 2B ou 2A et 72 avec un niveau d'identification 3 ou 4 (Figure 20).

La répartition des molécules identifiées est là aussi très similaire à celle des bases de données utilisées (Tableau 7).

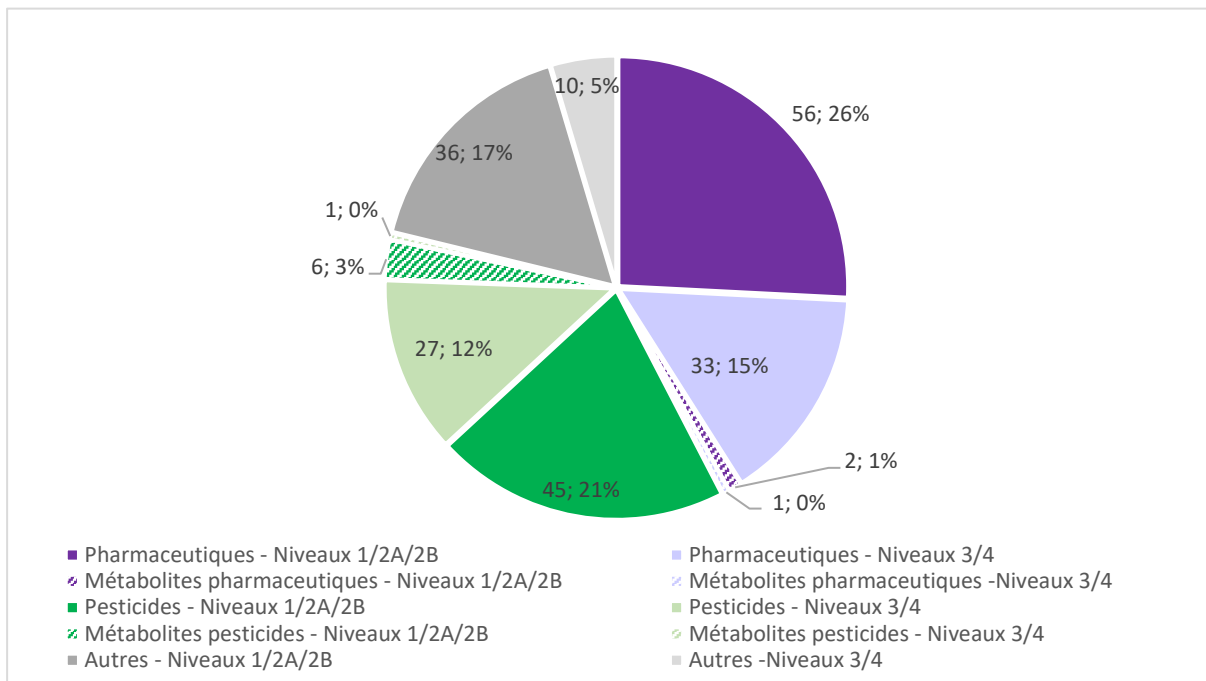


Figure 20 : Répartition par famille des molécules identifiées selon le niveau de confiance associé en LC-HRMS par le Laboratoire 2

4.1.1.3 Identification par le laboratoire 3

Le laboratoire 3 a identifié 268 molécules dans l'ensemble des échantillons ; 90 avec un niveau d'identification 1, 2B ou 2A et 178 avec un niveau d'identification 3 ou 4 (Figure 21). De plus le manque de sensibilité de l'appareillage donc la perte d'informations sur les fragments notamment peut expliquer la proportion plus importante de molécules identifiées en niveau 3 et 4. La répartition des molécules identifiées est très similaire à celle des bases de données utilisées (Tableau 7).

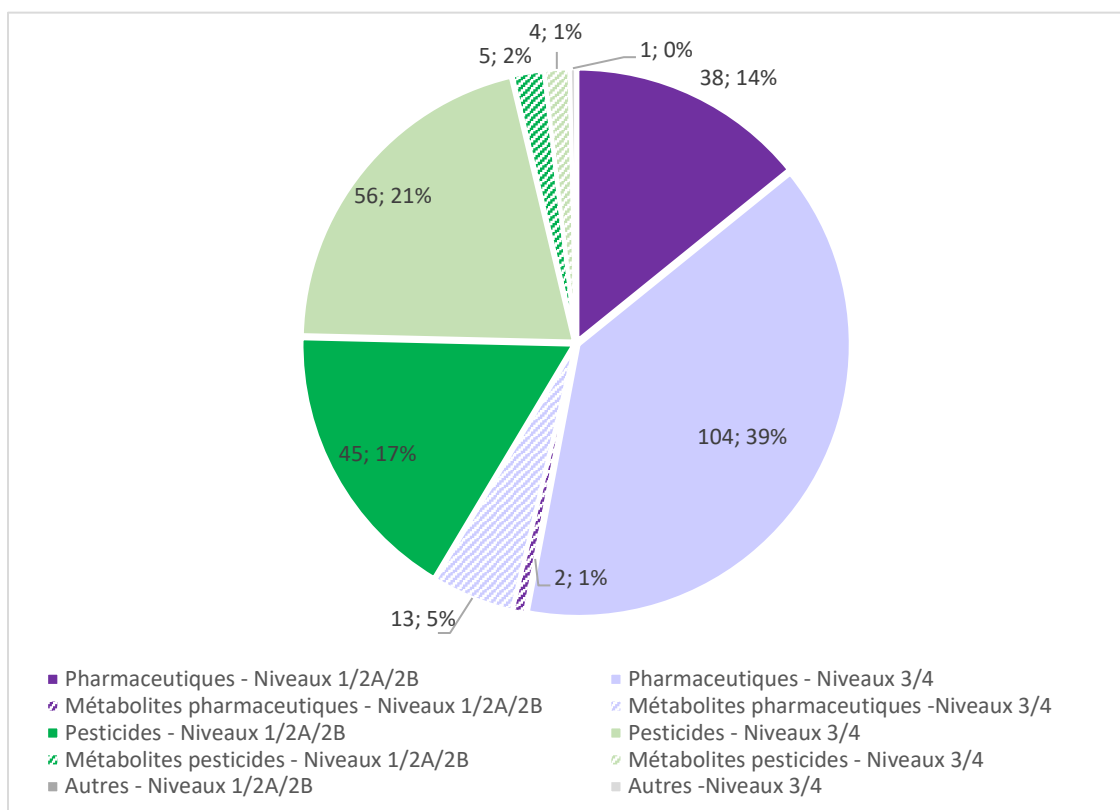


Figure 21 : Répartition par famille des molécules identifiées selon le niveau de confiance associé en LC-HRMS par le Laboratoire 3

4.1.1.4 Bilan des identifications par analyse LC-HRMS

Toutes bases de données LC confondues, 456 molécules ont été identifiées dans les échantillons (Figure 22) dont 261 avec un niveau d'identification assez élevé, niveaux 1, 2B ou 2A selon le logigramme (Figure 4), et 195 avec un niveau d'identification plus faible (niveaux 3 ou 4). La majorité des molécules identifiées fait partie de la famille des composés pharmaceutiques et métabolites avec 49% de la totalité des molécules identifiées, ce qui représente 221 molécules ; suivi des pesticides et métabolites avec 41% de la totalité des molécules identifiées, ce qui représente 184 molécules puis les 10% de molécules restants concernent d'autres familles de composés.

La répartition des molécules identifiées est quasiment similaire à celle des molécules des BDD ; les composés pharmaceutiques semblent être un peu plus identifiés que les pesticides (Figure 7) dans cette étude. Il faut rappeler ici que les périodes de prélèvements (Tableau 1) ne sont pas optimisées selon les périodes d'application et donc de présence de pesticides dans les cours d'eau .

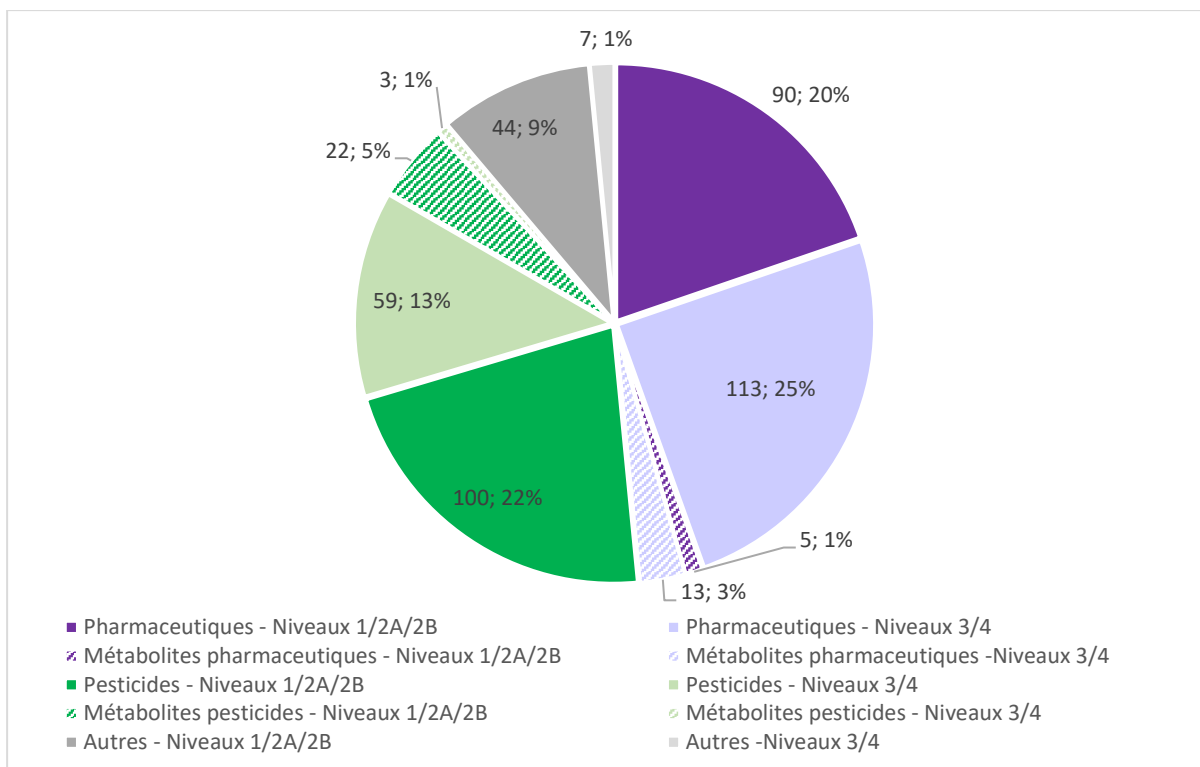


Figure 22 : Répartition par famille des molécules identifiées en LC-HRMS, tous labos confondus.

4.1.2 Classes de molécules identifiées en GC-HRMS

Toutes bases de données GC confondues, 158 molécules ont été identifiées dans les échantillons (Figure 23) dont 122 avec un niveau d'identification assez élevé, niveaux 1, 2B ou 2A selon le logigramme (Tableau 4), et 36 avec un niveau d'identification plus faible, niveau 3 ou 4. La majorité des molécules identifiées fait partie de la famille des pesticides (et métabolites) avec 61% de la totalité des molécules identifiées, ce qui représente 98 substances ; suivis des composés « autres » avec 33% de la totalité des molécules identifiées, ce qui représente 53 substances puis les 5% de composés pharmaceutiques.

La répartition des molécules identifiées est quasiment similaire à celle de la base de recherche en GC-HRMS (Tableau 8).

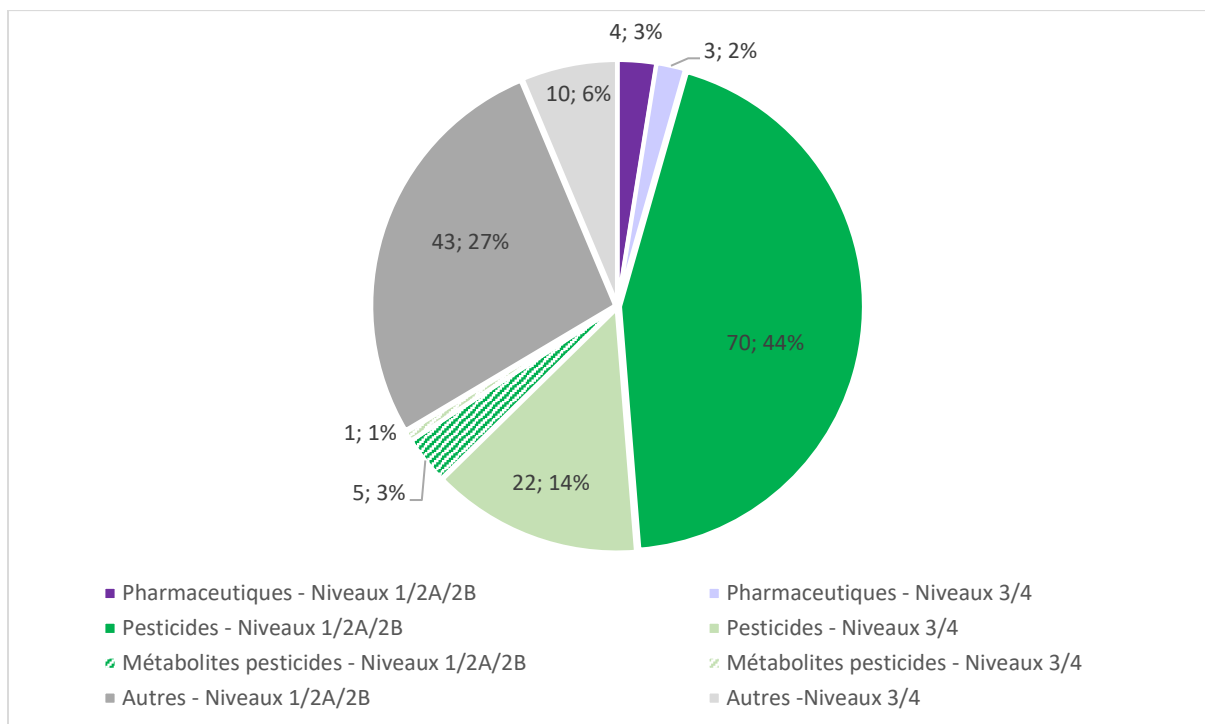


Figure 23 : Répartition par famille des molécules identifiées en GC-HRMS

Globalement, pour les résultats LC et GC/HRMS, chaque laboratoire a identifié des molécules à l'aide de ses BDD internes et/ou externes ; celles-ci semblent fortement orienter les résultats. Plus la proportion d'une famille de molécules à rechercher sera importante dans la BDD, plus il y aura plus de chance d'avoir un nombre élevé de molécules identifiées appartenant à cette famille.

4.2 CARACTERISTIQUES DES MOLECULES DETECTEES PAR METHODE D'ECHANTILLONNAGE

Dans toutes les figures ci-dessous seules les molécules avec des niveaux d'identification 1, 2A et 2B ont été prises en compte, les traceurs ont été exclus et les molécules identifiées en mode d'ionisation positif et négatif ont été rapportées une seule fois.

4.2.1 Nombre de molécules identifiées dans les POCIS et les SPE par laboratoire

4.2.1.1 Molécules identifiées en LC-HRMS

Par site d'étude, les laboratoires 1 (Figure 24) et 2 (Figure 25) ont identifié jusqu'à 68 molécules et le laboratoire 3 (Figure 26) jusqu'à 30.

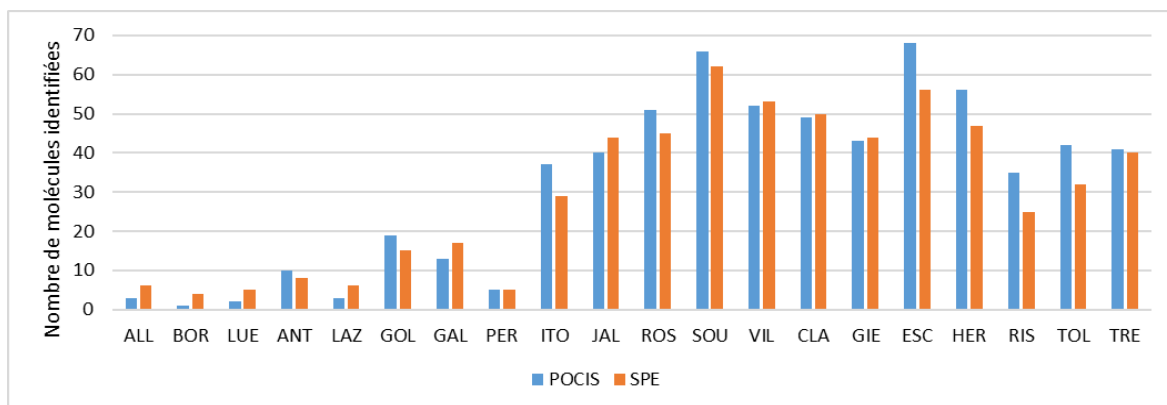


Figure 24: Nombre de molécules identifiées par le laboratoire 1 dans les POCIS et les SPE sur tous les sites par analyse LC-HRMS en modes d'ionisation positif et négatif

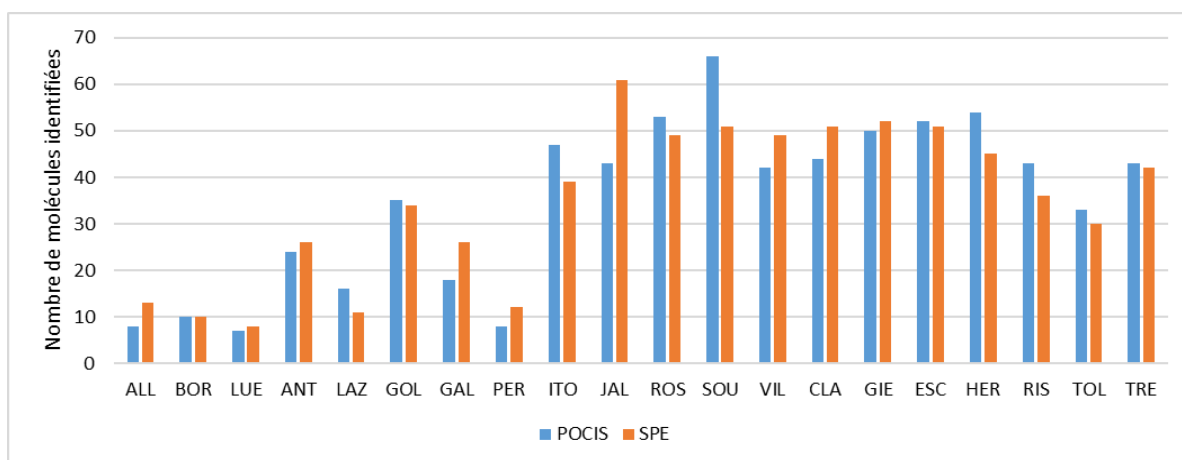


Figure 25 : Nombre de molécules identifiées par le laboratoire 2 dans les POCIS et les SPE sur tous les sites par analyse LC-HRMS en modes d'ionisation positif et négatif

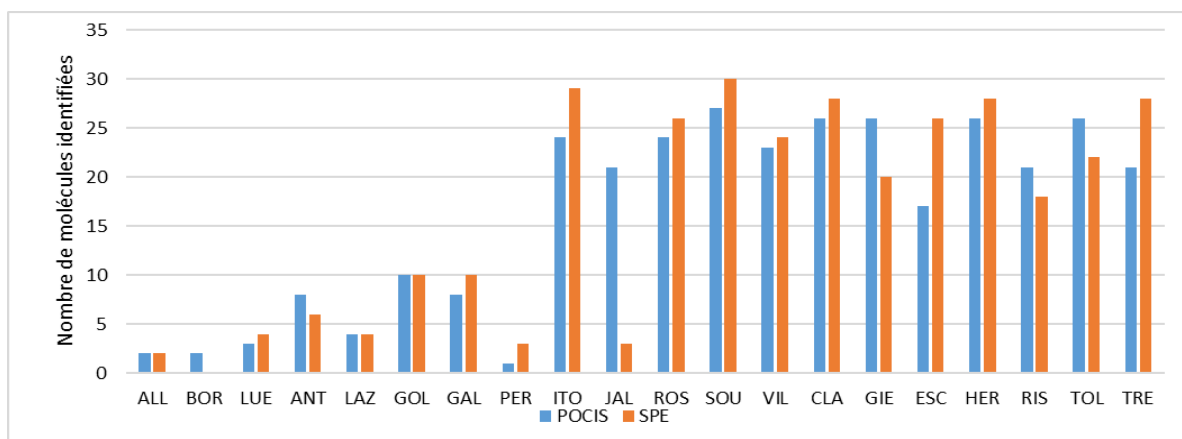


Figure 26: Nombre de molécules identifiées par le laboratoire 3 dans les POCIS et les SPE sur tous les sites par analyse LC-HRMS en mode d'ionisation positif

On constate le même profil de contamination en nombre de molécules identifiées pour les différents sites entre les sites de référence (ALL, BOR et LUE) et côtiers (ANT, LAZ, GOL) pour lesquels moins de molécules sont identifiées par rapport aux sites urbains et agricoles.

Pour les 3 laboratoires, les sites les moins contaminés sont respectivement la Boralde (BOR), le Luech (LUE) et le Pérou (PER) pour les extraits de POCIS et la Boralde (BOR) pour les laboratoires 1 et 3 et le Luech (LUE) pour le laboratoire 2 concernant les extraits de SPE.

Les sites les plus contaminés pour les extraits de POCIS sont l'Escaut (ESC) pour le laboratoire 1 et la Souffel (SOU) pour les laboratoires 2 et 3 ; et pour les extraits de SPE ces sites sont la Souffel (SOU) pour les laboratoires 1 et 3 et la Jalle (JAL) pour le laboratoire 2.

4.2.1.2 Molécules identifiées en GC-HRMS

Pour les analyses en GC-HRMS réalisées par le laboratoire 2, un maximum de 38 molécules est détecté par site. Sur la Figure 27, on constate que les sites les moins contaminés sont l'Allier (ALL) dans l'extrait de POCIS et l'Etang de Gol (GOL) dans l'extrait de SPE.

L'Hers (HER) et l'Escaut (ESC) présentent le plus de molécules identifiées dans les extraits de POCIS et SPE.

Ces analyses GC-HRMS permettent de mettre en évidence le même profil de contamination en nombre de molécules identifiées que celui obtenu par les analyses LC-HRMS, même si les profils semblent cependant moins tranchés en GC-HRMS.

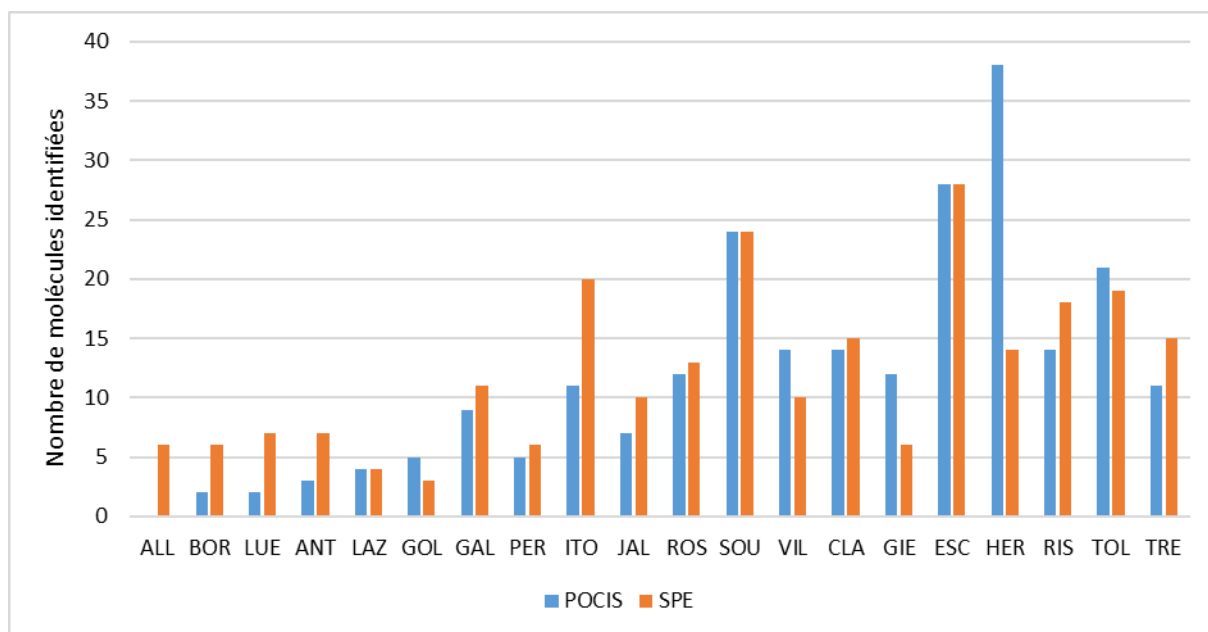


Figure 27 : Nombre de molécules identifiées par le laboratoire 2 dans les POCIS et les SPE sur tous les sites par analyse GC-HRMS

Les analyses réalisées en GC-HRMS permettent de détecter deux fois moins de molécules qu'en LC-HRMS. Cela est en partie dû aux conditions d'extractions POCIS et SPE, non adaptées pour ce mode d'analyse avec notamment l'obligation de changer de solvant des extraits pour l'analyse. Les molécules les plus apolaires, spécifiquement analysables par GC-HRMS (et non par LC-HRMS) qui pourraient être présentes sur les sites, ne sont pas extractibles avec les méthodes (POCIS et SPE) retenues dans cette étude.

Toutefois l'analyse GC-HRMS permet d'apporter en moyenne 20% d'information complémentaire à l'analyse en LC-HRMS (Figure 28). De même les analyses en LC-HRMS ESI(-) apportent en moyenne 20% d'information complémentaire par rapport à l'analyse en ESI(+). Ces trois modalités d'analyse (GC-HRMS, LC-HRMS/ESI(+)) et LC-HRMS/ESI(-)) sont donc complémentaires et présentent peu de composés en commun.

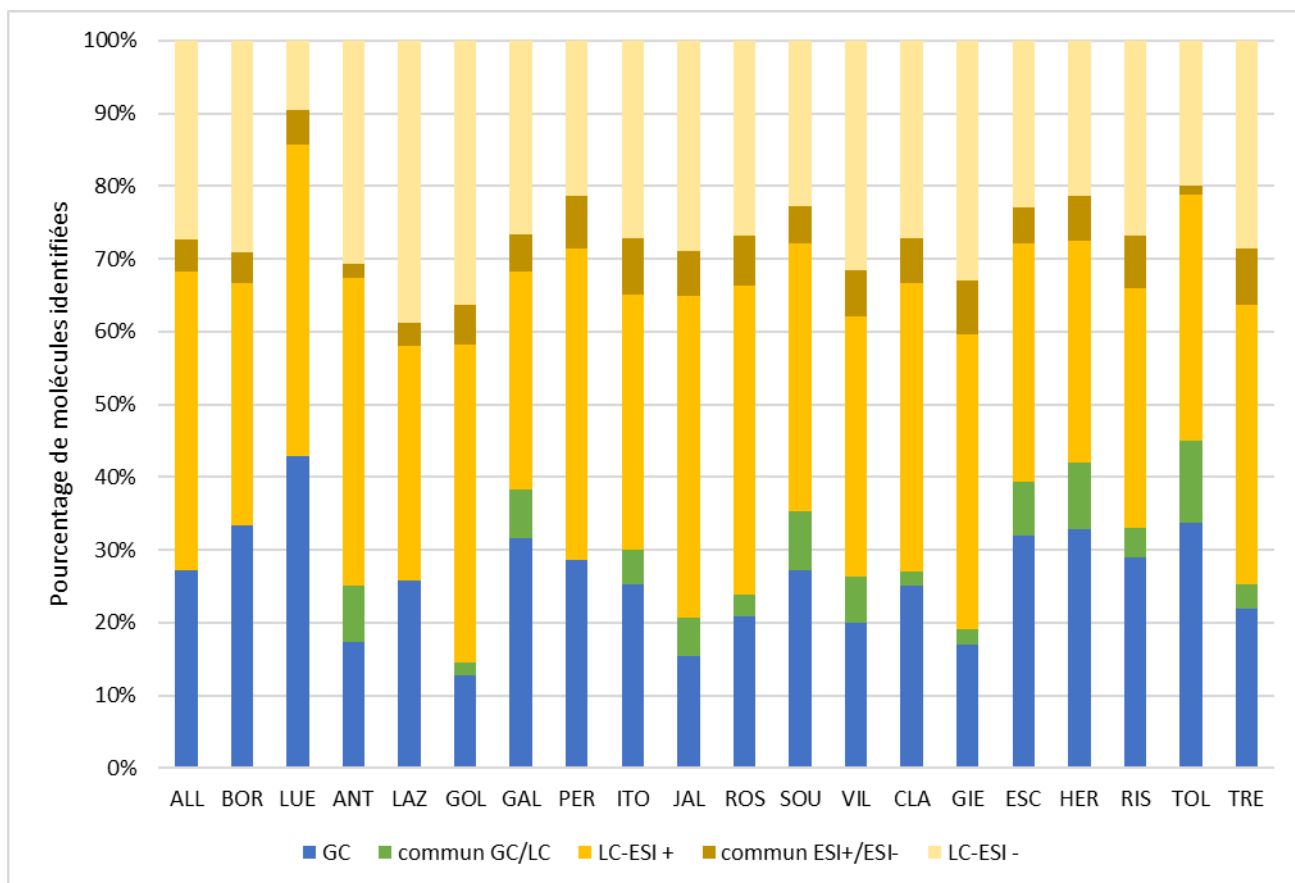


Figure 28 : Complémentarité des analyses GC-HRMS et LC-HRMS (modes d'ionisation positif et négatif), résultats obtenus par le laboratoire 2

4.2.2 Complémentarité des méthodes d'échantillonnage (SPE/POCIS)

Concernant les techniques d'échantillonnage testées dans cette étude, le nombre de molécules identifiées dans les différents extraits est sensiblement le même : 273 en POCIS et 268 en SPE.

De plus, ces deux techniques d'échantillonnage présentent les mêmes profils en termes de famille de composés identifiées (Figure 29).

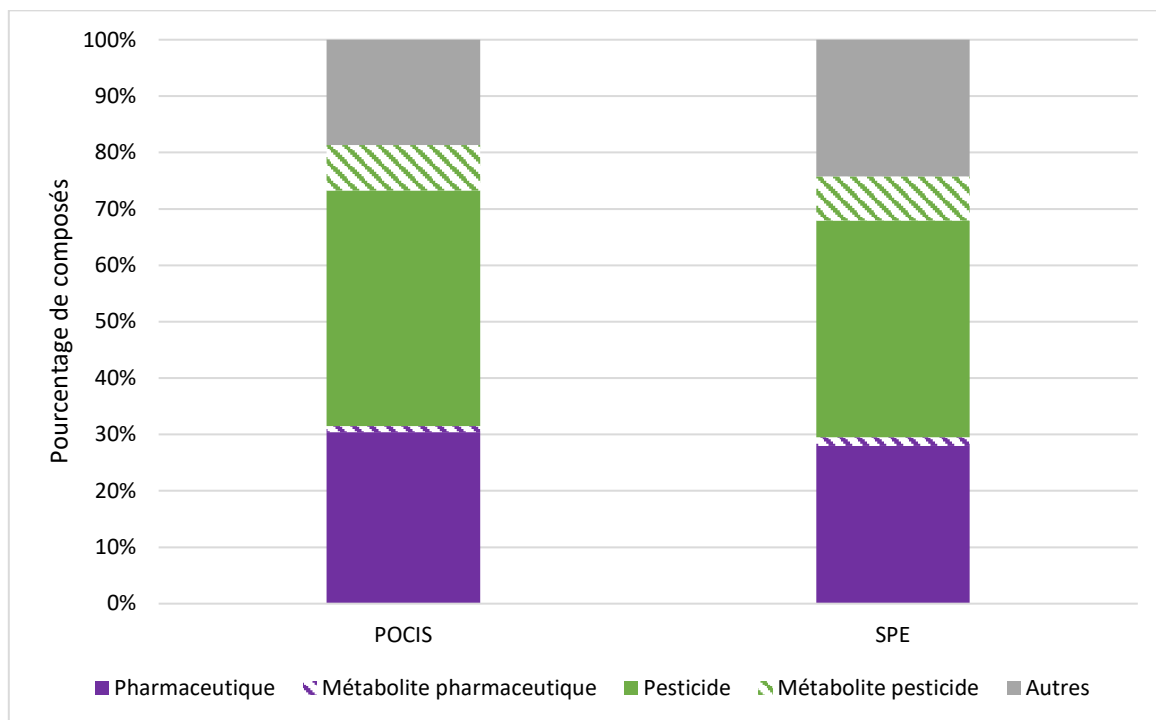


Figure 29 : Pourcentage de molécules identifiées par les 3 laboratoires sur les différents sites en analyse LC-HRMS, modes d'ionisation positif (ESI+) et négatif (ESI-), et GC-HRMS

4.2.3 Comparabilité des résultats par approche / laboratoire en LC-HRMS

Certaines molécules ont été recherchées par plusieurs approches, ce paragraphe a pour objectif de déterminer si ces molécules ont été identifiées par toutes les approches qui permettaient de les rechercher. Seules les substances recherchées par au moins 4 approches en LC-HRMS ont été prises en compte, ce qui correspond à 45 substances, décrites dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Liste des molécules recherchées par plusieurs approches (n≥4)

Molécule	Numéro CAS	Famille	Labo 1 BDD interne	Labo 2 BDD interne	Labo 2 BDD externe	Labo 3 BDD interne	Labo 3 BDDexterne	Nombre d'approche
Epoxiconazole	133855-98-8	Pesticide	oui	oui	oui	oui	oui	5
Metformine	657-24-9	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui	oui	5
2,4 D	94-75-7	Pesticide	oui	oui	oui		oui	4
2,4 MCPA	94-74-6	Pesticide	oui	oui	oui		oui	4
Acétamipride	135410-20-7	Pesticide	oui	oui	oui	oui		4
Asulam	3337-71-1	Pesticide	oui	oui	oui		oui	4
Aténolol	29122-68-7	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui		4
Atrazine	1912-24-9	Pesticide	oui	oui	oui	oui		4
Atrazine Deisopropyl (DIA)	1007-28-9	Pesticide	oui	oui	oui	oui		4
Atrazine desethyl (DEA)	6190-65-4	Pesticide	oui	oui	oui	oui		4
Bentazone	25057-89-0	Pesticide	oui	oui	oui		oui	4
Bromoxynil	1689-84-5	Pesticide	oui	oui	oui		oui	4
Carbamazépine	298-46-4	Pharmaceutique	oui	oui	oui		oui	4
Carbendazim	10605-21-7	Pesticide	oui		oui	oui	oui	4
Ciprofloxacine	85721-33-1	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui		4
Clotrimazole	23593-75-1	Pharmaceutique	oui	oui	oui		oui	4
Cyclophosphamide	50-18-0	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui		4
Cyproconazole	94361-06-5	Pesticide	oui		oui	oui	oui	4
Diclofénac	15307-86-5	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui		4
Diméthoate	60-51-5	Pesticide	oui	oui	oui	oui		4
Diuron	330-54-1	Pesticide	oui	oui	oui	oui		4
Erythromycine	114-07-8	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui		4
Estrone	53-16-7	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui		4
Fipronil	120068-37-3	Pesticide	oui	oui	oui	oui		4

Molécule	Numéro CAS	Famille	Labo 1 BDD interne	Labo 2 BDD interne	Labo 2 BDD externe	Labo 3 BDD interne	Labo 3 BDDexterne	Nombre d'approche
Flusilasole	85509-19-9	Pesticide	oui	oui	oui	oui		4
Isoproturon	34123-59-6	Pesticide	oui	oui	oui	oui		4
Lincomycine	154-21-2	Pharmaceutique	oui	oui	oui		oui	4
Losartan	114798-26-4	Pharmaceutique	oui	oui	oui		oui	4
Métalaxyl	57837-19-1	Pesticide	oui		oui	oui	oui	4
Métolachlor	51218-45-2	Pesticide, herbicide	oui		oui	oui	oui	4
Métolachlor OXA	152019-73-3	Pesticide	oui	oui	oui	oui		4
Métoprolol	51384-51-1	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui		4
Métronidazole	443-48-1	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui		4
Nicosulfuron	111991-09-4	Pesticide	oui	oui	oui		oui	4
Nordiazépan	1088-11-5	Pharmaceutique	oui		oui	oui	oui	4
Oxazépan	604-75-1	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui		4
Paracétamol	103-90-2	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui		4
Primidone	125-33-7	Pharmaceutique	oui	oui	oui		oui	4
Propamocarbe	24579-73-5	Pesticide, fongicide	oui		oui	oui	oui	4
Propiconazole	60207-90-1	Pesticide, fongicide	oui		oui	oui	oui	4
Sotalol	3930-20-9	Pharmaceutique	oui	oui	oui	oui		4
Sulfaméthazine	57-68-1	Pharmaceutique	oui	oui	oui		oui	4
Terbuthylazine	5915-41-3	Pesticide, herbicide	oui	oui	oui		oui	4
Tramadol	27203-92-5	Pharmaceutique	oui	oui	oui		oui	4
Trichlorfon	52-68-6	Pesticide, acaricide	oui	oui	oui	oui		4

4.2.3.1 Molécules recherchées et non identifiées

Parmi ces 45 substances théoriquement identifiables par les 5 méthodes appliquées, 12 substances n'ont jamais été identifiées: il s'agit de l'acétamipride, l'asulam, l'atrazine deisopropyl (DIA), la ciprofloxacine, le clotrimazole, le cyclophosphamide, l'estrone, le métronidazole, la primidone, la terbuthylazine, le trichlorfon, le diméthoate.

Ces molécules peuvent être réellement absentes des milieux, ou à des niveaux de concentrations non détectables par les techniques d'analyses employées.

La méthode d'extraction est une méthode exhaustive, visant à identifier le plus de substances possible. Cependant elle ne prend pas en compte les spécificités d'extraction de substances connues comme « difficilement analysables ». Cela peut expliquer la non-détection de certaines substances comme déjà montré dans une précédente étude Aquaref¹².

4.2.3.2 Molécules recherchées et identifiées

Certaines molécules ont été très largement retrouvées, dans un grand nombre d'échantillons et par la majorité des approches. C'est l'exemple de la carbamazépine présenté dans les figures suivantes

Exemple de la carbamazépine

Le traceur carbamazépine C13, homologue deutéré de la molécule d'intérêt, a été utilisé par les laboratoires, et a bien été identifié dans tous les échantillons.

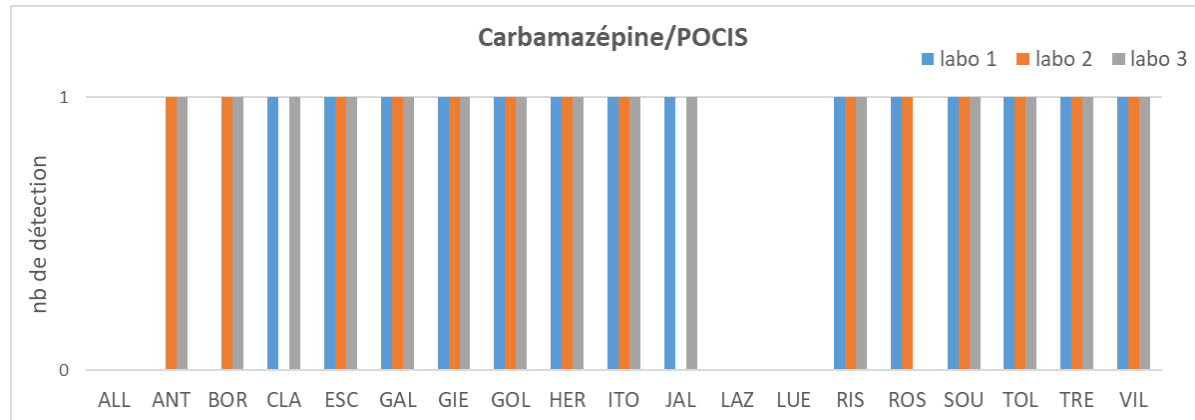


Figure 30 : Comparaison des identifications, exemple de la carbamazépine, extrait POCIS

Globalement, la carbamazépine est toujours retrouvée de manière assez similaire par les 3 laboratoires.

¹² C. Guillemain, F. Lestremau, C. Soulier, C. Coureau, A. Togola, C. Margoum – Comparaison et impact de différentes méthodes d'extraction d'eau sur l'analyse non ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution – Rapport AQUAREF 2019 – 24 p.

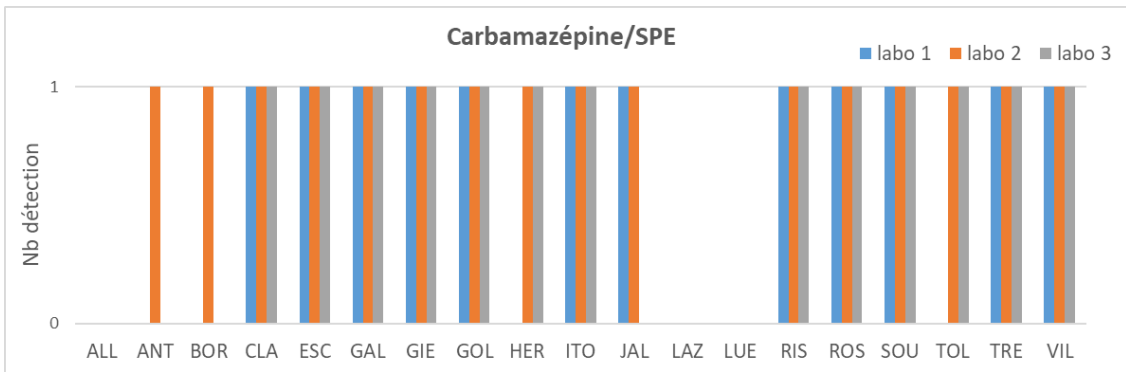


Figure 31: Comparaison des identifications, exemple de la Carbamazépine, extrait SPE

Dans le cas de la carbamazépine, tous les laboratoires ont la substance dans leur BDD interne, la molécule est assez facilement analysable et stable et les intensités sont élevées, ce qui facilite l'obtention de résultats comparables. Les résultats obtenus sur les deux extraits (SPE ou POCIS) sont relativement similaires, le critère « sensibilité » étant moins important pour ce type de substances.

Dans les figures ci-dessous, les intensités obtenues par les deux types d'équipements (« 1-3 » et « 2 ») sont présentées sur des axes indépendants, pour pouvoir être comparées en relatif.

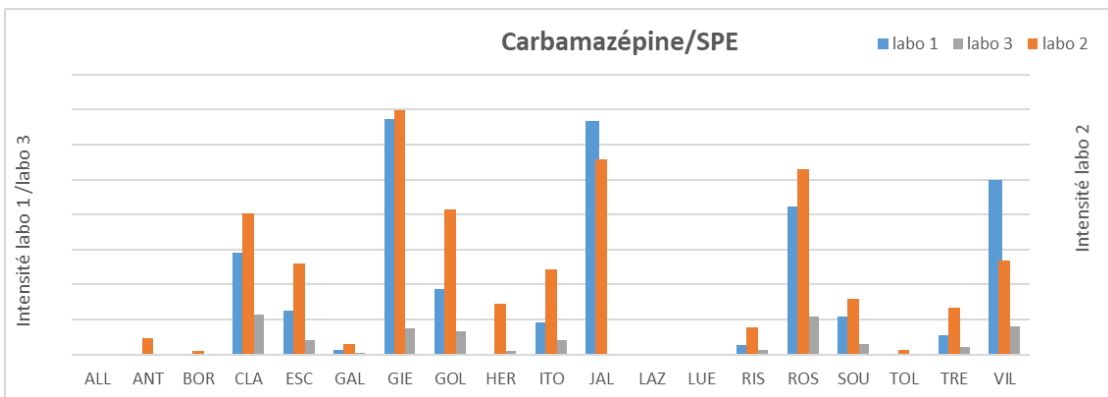


Figure 32 : Intensité des signaux, par station/laboratoire, exemple de la carbamazépine, extrait SPE.

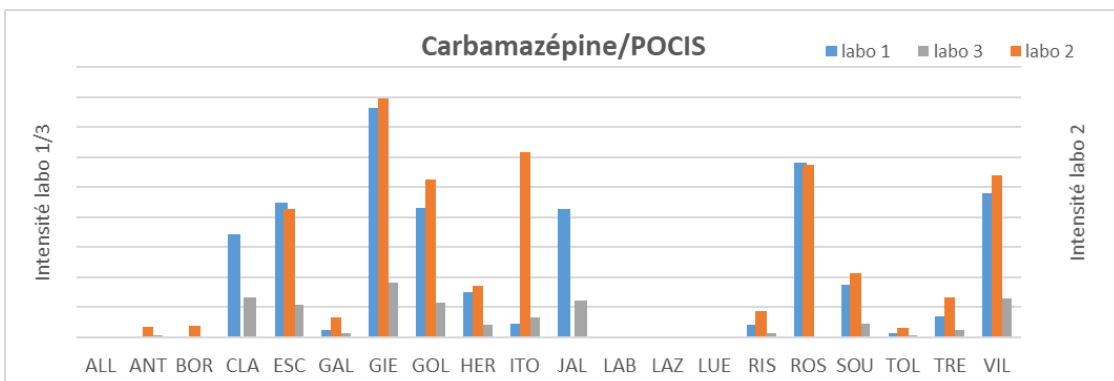


Figure 33: Intensité des signaux, par station/laboratoire, exemple de la carbamazépine, extrait POCIS

Globalement, les points de différences concernent les stations présentant les plus faibles intensités de signal : la sensibilité des équipements étant différente entre les laboratoires, la molécule peut être identifiée ou non.

Une différence notable est observée sur certaines stations, comme sur la Jalle (JAL) : la carbamazépine est détectée par 2 labo sur 3, mais pas toujours les mêmes selon les extraits SPE ou POCIS.

En se référant aux Figure 24, Figure 25 et Figure 26 portant sur le nombre de substances retrouvées sur cette station, on retrouve ces mêmes différences : le labo 1 avec des résultats équivalent entre les deux extraits, le labo 2 n'ayant que très peu de détection en POCIS, et le labo 3 n'obtenant que très peu de détection en SPE. La carbamazépine suit ce même profil. Différentes explications peuvent justifier ces résultats : effets matrices différents (cf. résultats sur les traceurs), sensibilité différente des équipements.... L'hypothèse d'une non prise en compte, dans l'algorithme d'identification, d'une entité par le logiciel, doit aussi être explorée.

Exemple du diclofénac

Pour ce composé, le nombre de recherches est encore plus important, car en plus des 5 approches potentielles, on a pour 2 labos sur 3 une recherche en mode positif et en mode négatif.

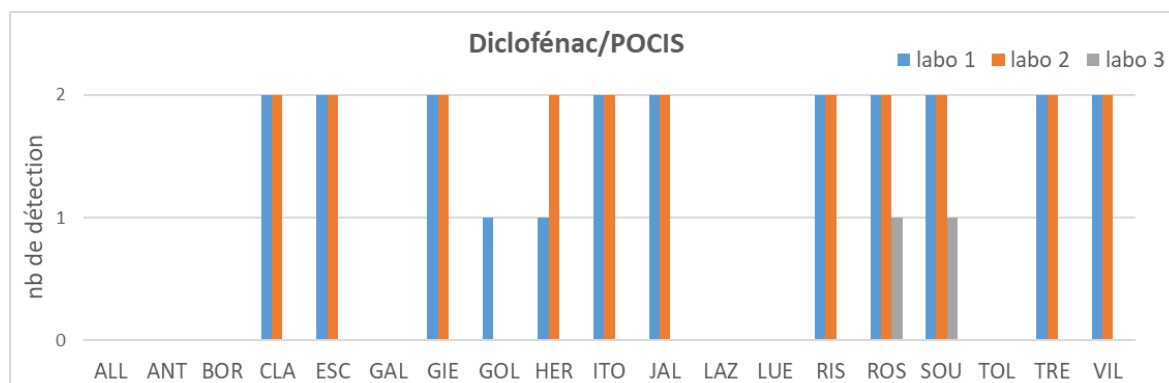


Figure 34 : Comparaison des identifications par approche, exemple du diclofénac, extrait POCIS

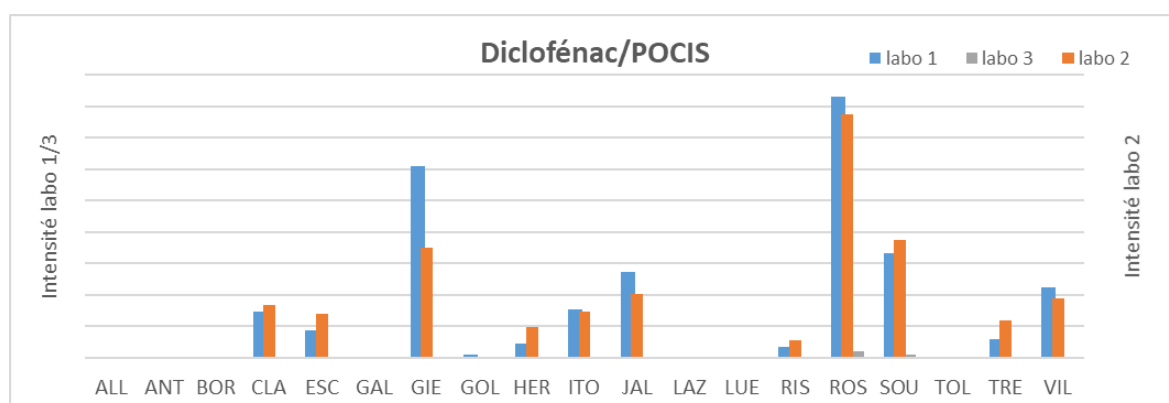


Figure 35 : Intensité des signaux en ESI pos, par station/laboratoire, exemple du diclofénac, extrait POCIS

Les différences notables de détection sur le diclofénac pour le labo 3 sont clairement dues à une différence de sensibilité, et ce, même sur extrait POCIS : les deux seules détections du labo 3 correspondent à la Rosselle (ROS) et la Souffel (SOU) qui sont les stations avec

les plus fortes intensités mesurées par les deux autres laboratoires. Pour les laboratoires 1 et 2, les résultats sont très similaires pour toutes les stations.

Exemple sur les molécules acides, 2,4 D, Bentazone, MCPA...

Ces molécules ne peuvent être détectées qu'en mode négatif. De ce fait, même si le laboratoire 3 (qui n'a effectué les recherches qu'en mode positif) les a recherchées, il n'y a pas de détection pour lui sur ces molécules.

Ces composés ont été très peu retrouvés : en effet le protocole d'extraction est peu favorable à ces substances et leur détection en mode ESI-, connu pour être moins sensible que le mode ESI+, rend moins performant la recherche de ces composés. De plus il y a moins de molécules de ce type dans les BDD.

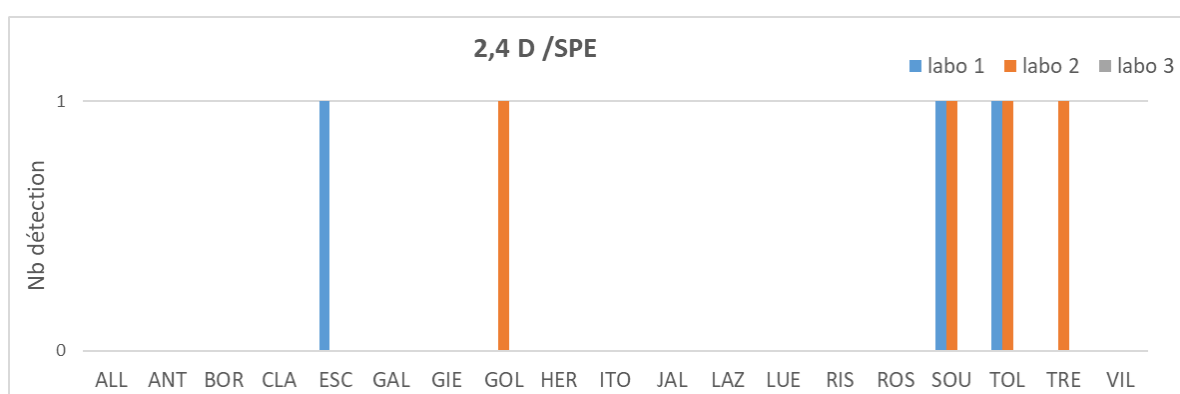


Figure 36 : Nombre de détection par laboratoire, exemple du 2,4 D, extrait SPE

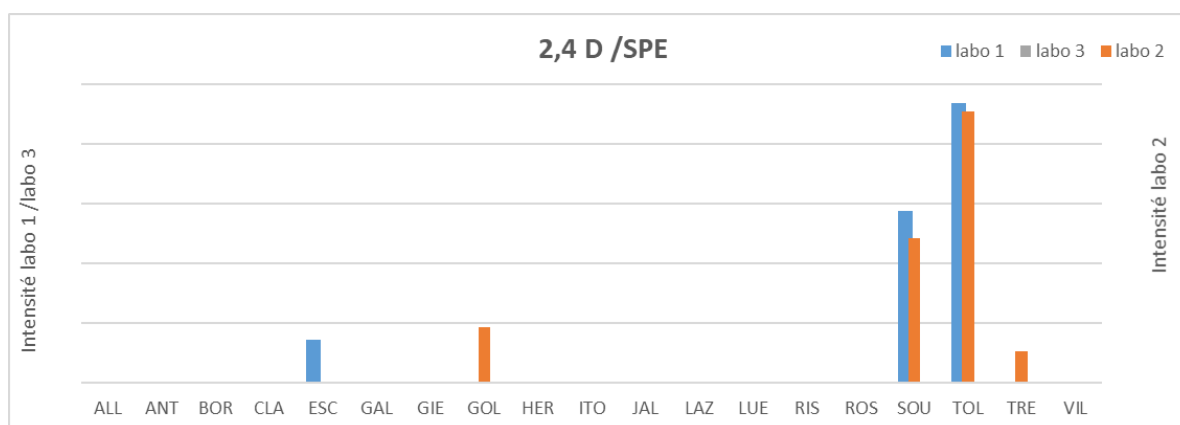


Figure 37 : Intensité des signaux, par station/laboratoire, exemple du 2,4 D, extrait SPE

La même conclusion que pour les substances précédentes peut être dressée : une homogénéité des réponses est observée pour les intensités les plus fortes, et des disparités pour les niveaux les plus faibles, quand le critère performance analytique (sensibilité) intervient.

4.2.3.3 Intérêt des différentes approches

Comparaison base de données interne/base de données externe

Il existe une potentielle plus-value importante à utiliser des bases de données externes qui sont beaucoup plus larges que les BDD internes, cependant ces bases présentent moins de critères d'identification. L'objectif est donc de vérifier la cohérence des résultats entre les deux types de bases. Dans l'exemple du tramadol (dans les extraits SPE) de la Figure 38, l'utilisation d'une base externe (résultats niv 2A) est systématiquement concordante avec une base interne (niveau 1/2B), confirmant l'intérêt de travailler avec cet outil. Ce résultat montre la pertinence d'utiliser des BDD externes en première approche, même si les résultats doivent être confirmés dans un second temps par l'injection d'un étalon. L'approche complète et sa validation sont présentées dans le chapitre 6.

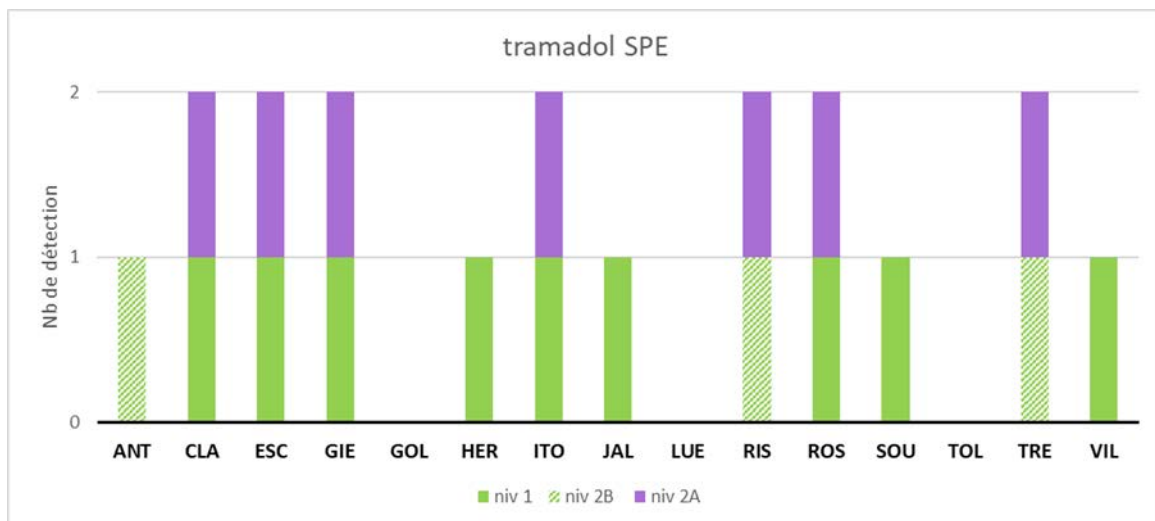


Figure 38 : Comparaison des détections par BDD interne (niv 1/2B) ou externe (2A)

5 Résultats : molécules identifiées par traitement suspect avec BDD interne

5.1 MOLECULES IDENTIFIEES

Dans toutes les figures ci-dessous seuls les composés avec des niveaux d'identification 1, 2A et 2B ont été pris en compte, les deutérés/marqués ont été exclus et les composés détectés en ESI(+) et ESI(-) et GC ont été rapportés une seule fois.

5.1.1 Typologie des molécules identifiées

5.1.1.1 Par type de substance

Si l'on regarde la répartition par grande famille de composés, on observe une répartition globalement équilibrée. La catégorie « autres » comprenant des substances industrielles, des produits de soin corporels, additifs alimentaires et autres composés. Encore une fois, l'impact de la constitution des BDD oriente fortement les identifications.

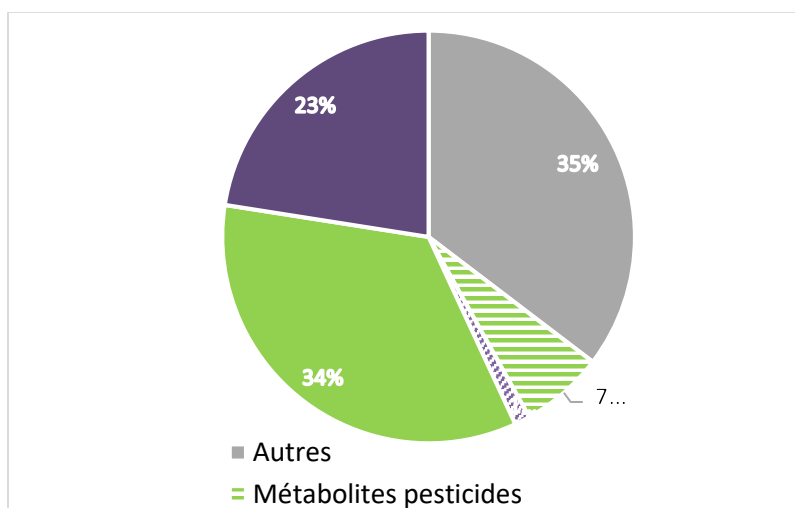


Figure 39: Famille des composés détectés dans les POCIS et les SPE pour les analyses en GC et LC avec tous les modes d'ionisation, avec les niveaux d'identification 1, 2A et 2B et sans les deutérés par les 3 labos (n = 413 composés)

5.1.1.2 Répartition des molécules identifiées

78% des molécules identifiées ne font pas partie d'une liste en lien avec la réglementation (Figure 40) et sont donc potentiellement moins ou pas recherchées. Cette approche d'analyse basée sur des listes de molécules suspectées permet donc d'identifier un grand nombre de molécules qui ne sont jamais investiguées dans les suivis réglementaires et donc pourrait permettre de faire évoluer les politiques de surveillance de la qualité des eaux.

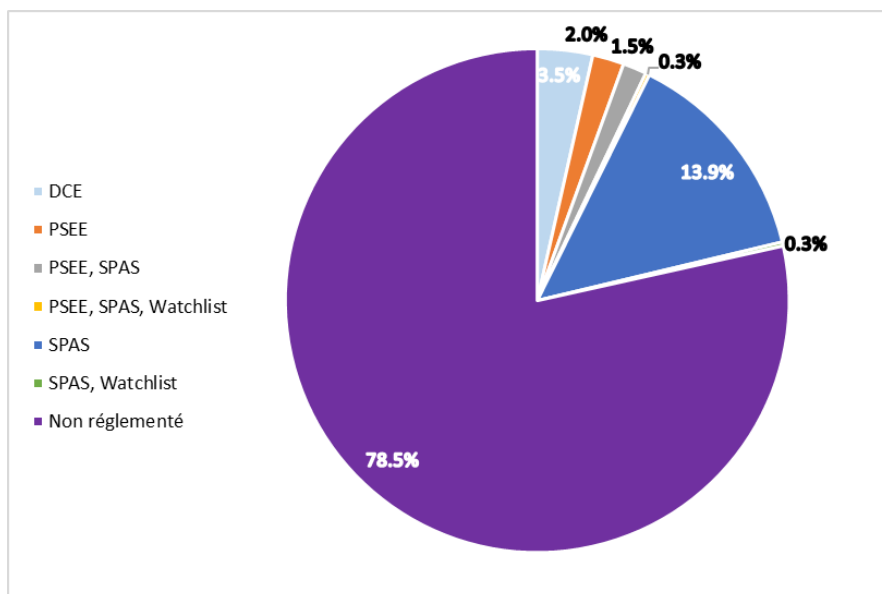


Figure 40 : Pourcentage de molécules identifiées, toutes matrices confondues, par les 3 laboratoires en fonction des diverses listes réglementaires

Parmi les composés réglementés, la Figure 41 présente les substances les plus fréquemment identifiées, toutes stations confondues. Ces substances appartiennent majoritairement aux suivis SPAS et PSEE. Les substances plus « historiques (« prioritaires ») sont peu identifiées : en effet les critères de sélection ciblaient des molécules selon des critères de Persistance, Bioaccumulation, donc moins bien analysables par les méthodes d'extractions SPE/POCIS. De plus, ce sont majoritairement des molécules interdites ou dont les usages sont censés diminuer. La Figure 44 met en évidence les substances non réglementées les plus fréquemment détectées. Parmi elles, de nombreux composés perfluorés ont été identifiés, ainsi que des substances pharmaceutiques. Ces résultats sont une source d'information d'intérêt pour une intégration dans la surveillance prospective, qui permettrait leur confirmation (ou pas) à une échelle nationale.

Comme déjà développé dans le paragraphe 4.2.2, des différences entre les méthodes d'échantillonnage (POCIS et SPE) sont visibles : l'échantillonnage passif permet d'accumuler les substances échantillonnables et donc peut s'avérer plus sensible. Pour d'autres substances, les capacités d'échantillonnage étant plus faibles, l'extraction par SPE

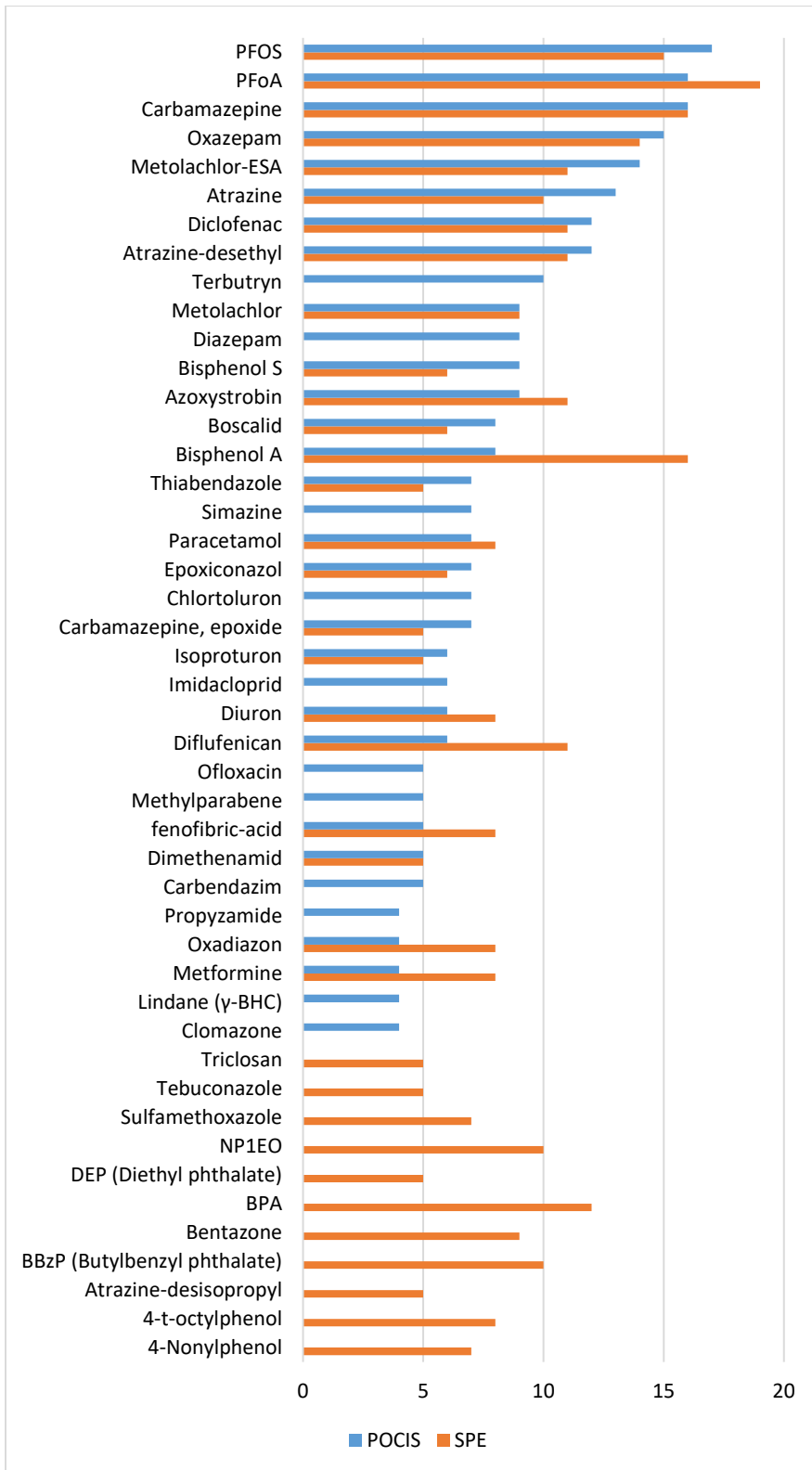


Figure 41: Comparaison des composés réglementés les plus détectés (dans au moins 20% des cas) dans les POCIS et les SPE sur les 20 sites étudiés.

En comparaison, la Figure 42 présente les substances d'intérêt émergent les plus fréquemment identifiées, toutes stations confondues.

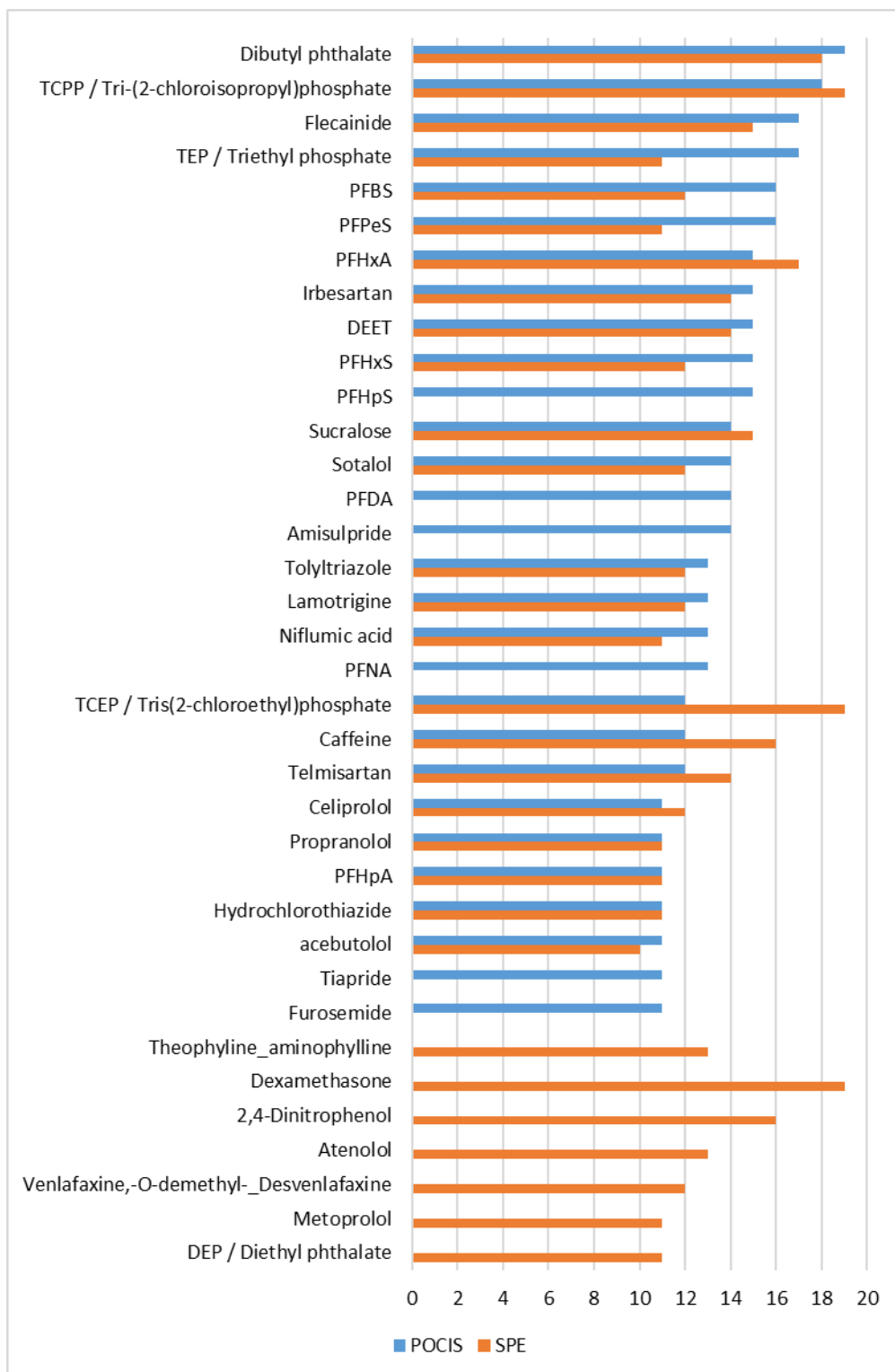


Figure 42 : Comparaison des composés émergents les plus détectés (dans au moins 50% des cas par échantillonnage) dans les POCIS et les SPE sur les 20 sites étudiés.

5.2 PROFIL PAR SITE

5.2.1 Nombres de substances détectées dans les POCIS et les SPE par sites

Au total, sur tous les sites et toutes analyses confondues, 1407 composés ont été détectés dans les extraits de POCIS et 1422 dans les extraits de SPE par au moins un des trois laboratoires. Entre 12 et 127 composés ont été détectés par site (figure 55). Le Luech (LUE) présente le moins de composés détectés dans les POCIS et la Boralde (BOR) dans les SPE. La Souffel (SOU) présente le plus de composés détectés dans les deux modes d'échantillonnages).

La figure suivante présente la répartition des substances par niveau de confiance. Elle présente de plus, les données « supplémentaires » apportées par les niveaux de confiance 3 et 4.

L'apport est de l'ordre de 20 à 30 % d'information en plus en intégrant ces deux niveaux, ce qui n'est pas si important. Par ailleurs avec une telle incertitude dans l'identification, la communication de ces résultats nous semble inenvisageable.

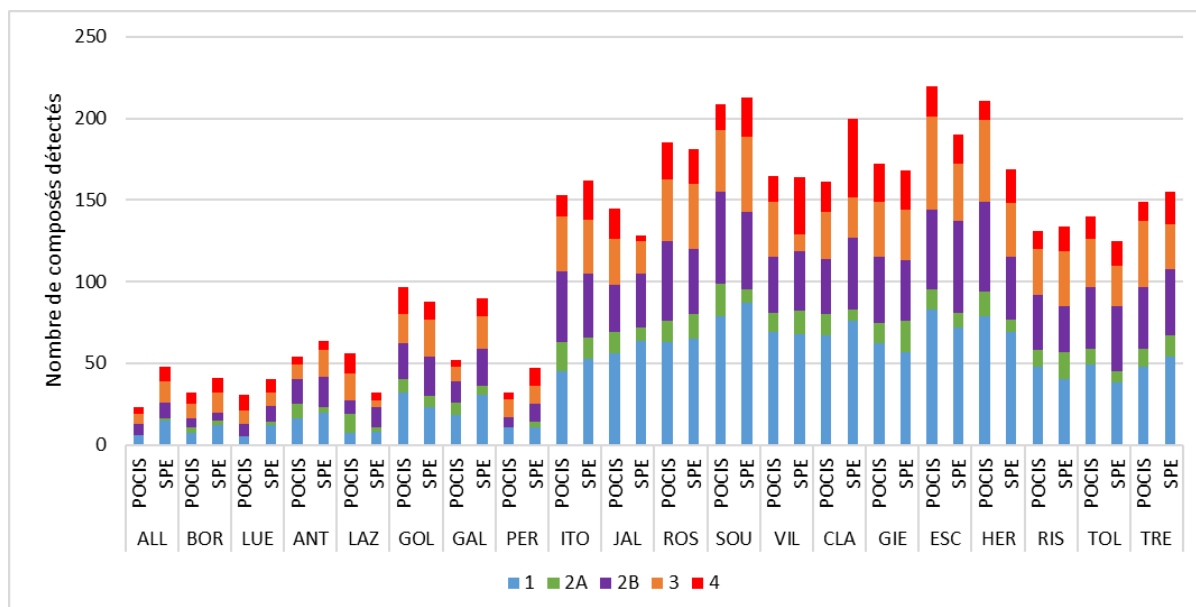


Figure 43 : profils par sites nombres molécules détectées en GC et LC en ESI + et ESI -, tout niveau de confiance confondu

5.2.2 Typologie des composés détectés par sites

L'intérêt des outils de screening non ciblé est mis en évidence, site par site : la majorité des composés détectés (de l'ordre de 80%) ne sont pas suivis réglementairement (donc rarement recherchés). Pour rappel (Figure 9), les molécules réglementées représentent environ 3% de la base globale de recherche.

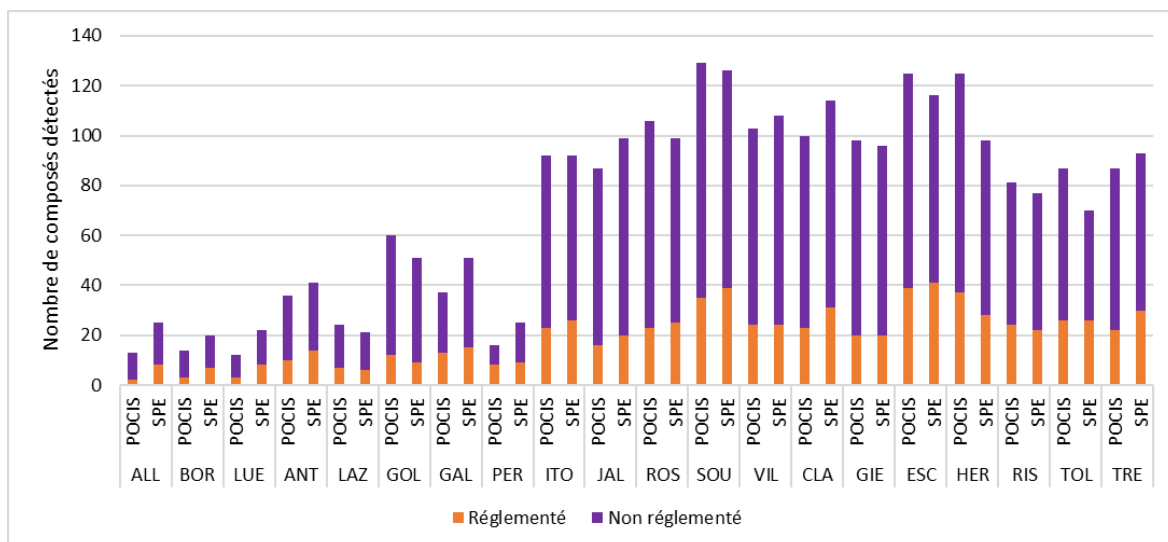


Figure 44 : Nombre de composés détectés soumis à réglementation ou non par site par les 3 labos pour l'analyse en GC et LC en ESI (+) et ESI (-)

Si l'on étudie la répartition des molécules par grandes familles d'usages (pharmaceutiques, pesticides et autres), les profils divergent selon les stations. Pour rappel, une seule campagne a été réalisée, sans que la période d'usage maximal des pesticides ne soit visée, ce qui peut entraîner une minoration des composés de cette famille d'usage pour certaines stations. Certaines stations ont cependant un profil très marqué, comme le Tolzac ou l'Hers (« profil pesticides ») ou la Jalle ou la Rosselle (« profil pharmaceutiques »).

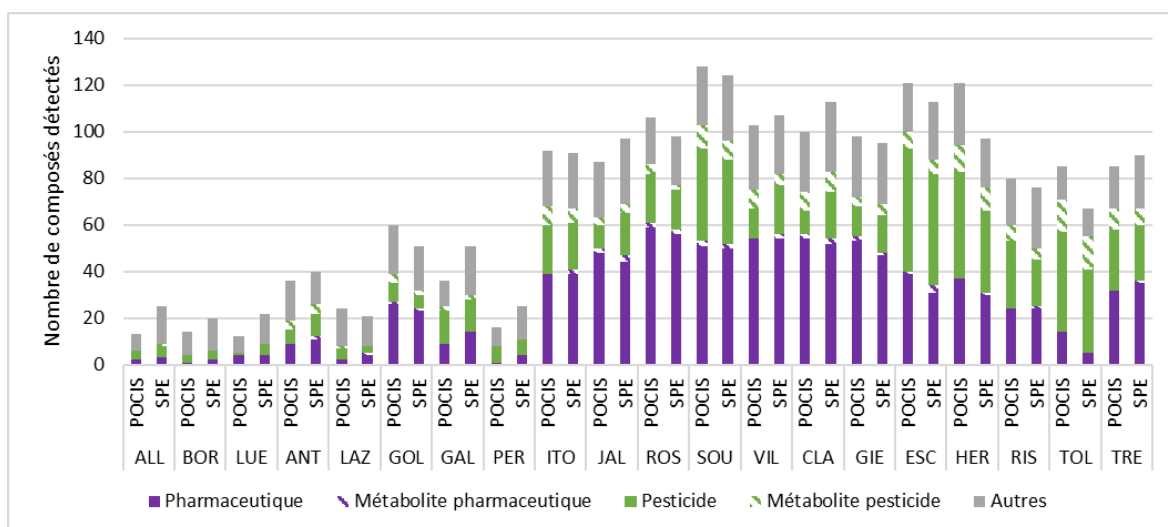


Figure 45 : Nombre de composés détectés par sites selon la famille d'usage, par les 3 labos pour l'analyse en GC et LC en ESI (+) et ESI (-)

L'analyse GC apporte beaucoup de molécules « autres » et présente à peu près le même nombre de composés détectés par sites, ce qui n'accroît pas la discrimination entre sites de référence ou côtiers ou agricoles et urbains. Comme explicité plus tôt, le contenu des bases de données influence fortement cette image et doit donc être toujours présenté en parallèle des résultats pour avoir une interprétation pertinente des profils.

Les travaux sur toutes les molécules identifiées pour chaque site peuvent être développés, afin d'identifier des molécules ubiquistes ou au contraire des molécules spécifiques de certains sites. Ce travail n'est pas développé dans ce rapport, mais peut être envisagé pour une suite, les données étant déjà acquises.

6 Apport du screening suspect à partir d'une BDD externe établie *a posteriori*.

Différents traitements ont été appliqués sur les échantillons à partir de BDD pré-existantes dans les 3 laboratoires (§2.5.4), cette partie du rapport aborde les résultats obtenus par screening suspect à partir d'une BDD établie spécifiquement avec des molécules d'intérêts pour le projet (§2.5.4.2). Parmi les 58 molécules présentes dans cette BDD, 43 ont été identifiées dans les échantillons avec des niveaux d'identification compris entre 2A et 5. Le critère temps de rétention ne pouvant être utilisé par cette approche, car pas d'étalons injectés avec la même méthodologie analytique, il existe dans chaque échantillon plusieurs candidats, c'est-à-dire plusieurs entités répondant aux critères de masse. Pour confirmer leur identification et discriminer la bonne entité, il est nécessaire d'acquérir l'étalon analytique afin de déterminer tous les paramètres d'identification dont le temps de rétention et les fragments. L'achat de 43 étalons analytiques n'étant pas envisageable, il a été choisi de se focaliser sur les molécules les plus fréquemment identifiées. Un facteur de fréquence d'identification a été déterminé pour toutes les entités (couple masse/temps de rétention) détectées afin de prioriser les étalons analytiques à acquérir.

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour déterminer ce facteur de fréquence d'identification :

- Les entités d'une même masse mais avec des temps de rétention différents peuvent être référencés lors du traitement de données comme correspondant à une même substance car le paramètre temps de rétention est inconnu dans la base de données employée pour cet exercice en premier lieu,
- Ces différentes entités identifiées comme étant une même substance peuvent avoir des niveaux d'identification différents selon les échantillons.

Pour cela, le calcul de ce facteur est effectué pour une même entité détectée dans les échantillons de même extrait (extrait SPE ou extrait POCIS), par le même organisme (laboratoire 1 ou 2) et dans un même mode d'ionisation (ESI+ ou ESI-). La formule de calcul est la suivante :

$$\text{Facteur de fréquence d'identification} = (\text{nombre de détection} / \text{nombre de site}) * (1 / \text{niveau d'identification})$$

En prenant également en compte l'aspect coût et disponibilité des étalons analytiques, le classement par ce facteur de fréquence d'identification a permis de sélectionner 12 étalons à acquérir :

- 2-OH-isoproturon, métabolite de l'isoproturon
- Citalopram amide et citalopram-N-oxide, métabolites du citalopram
- Le métabolite acide carboxylique du losartan
- La N-desméthyl-venlafaxine, métabolite de la venlafaxine
- L'O-deméthyl azoxystrobine (R234886) et SYN 501657 (R401553), métabolites de l'azoxystrobine
- Le métabolite acide du valsartan
- L'acide 2-carbamoyl-3,5,6-trichloro-4-cyanobenzène-1-sulfonique (R417888), métabolite du chlorotalonil
- L'Irbesartan impurity A (irbesartan-446), métabolite de l'irbesartan
- La Sulisobenzone
- L'Acide parahydroxybenzoïque (PHBA)

Des étalons complémentaires ont également pu être obtenus et injectés pour les LAS C10, C11, C12, C13, daidzéine, génisteine, 2,5,6-trichloro-4-hydroxyphthalonitrile, 2-carbamoyl-

3,5,6-trichloro-4-cyanobenzene-1-sulfonic acid (R417888) par le laboratoire 2 et les DMSA et bisphénols AF, E, F, AP, C, Z par le laboratoire 1.

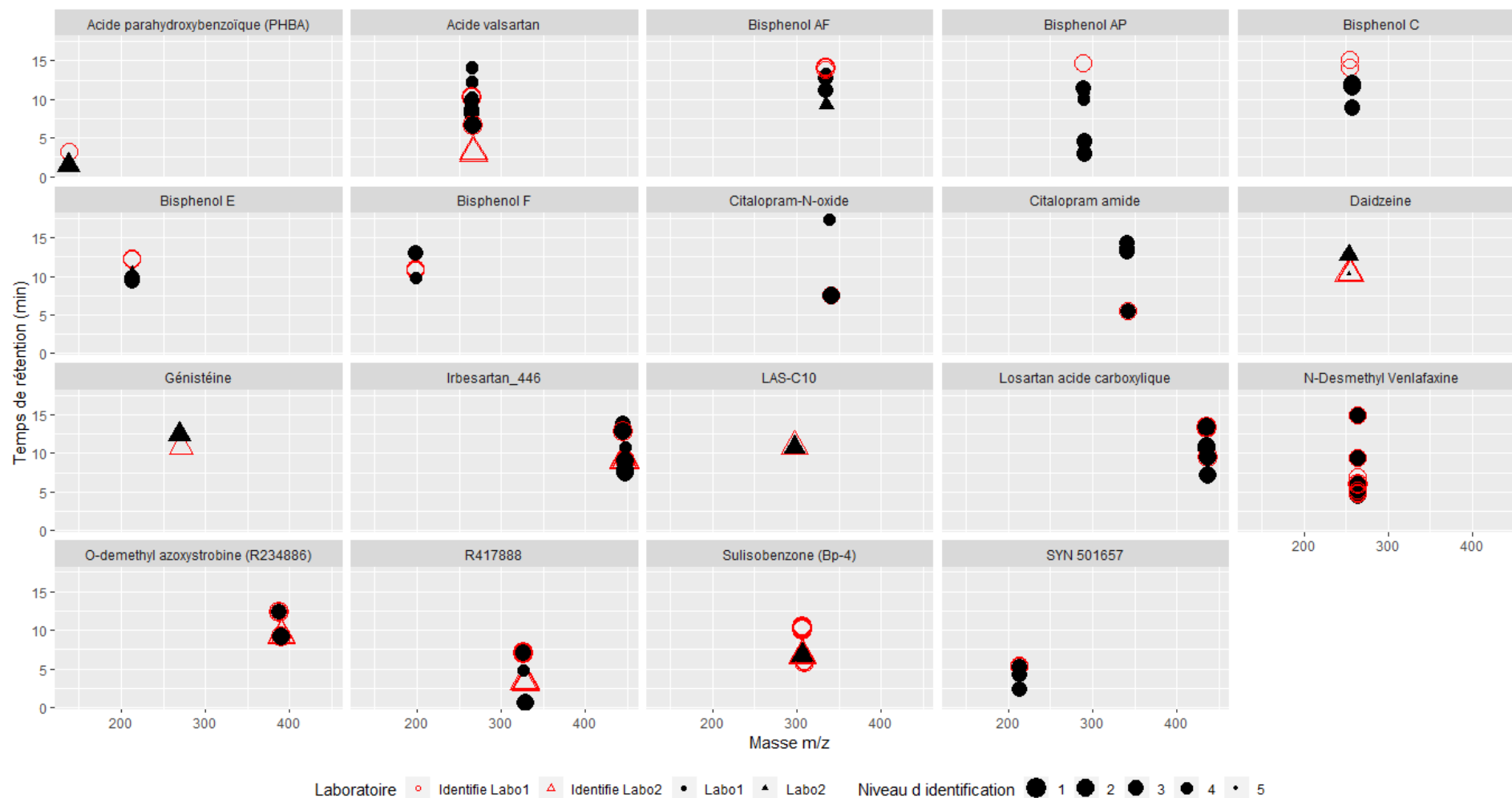
La Figure 46 représente les entités détectées et identifiées à partir de la base de données établie selon différents critères (cf paragraphe 2.5.4.2) et celles dont l'identification est confirmée par l'injection de l'étalon analytique. Sur cette figure sont représentés 19 graphiques, un pour chaque molécule dont l'identification a été confirmée aux niveaux 1 ou 2B. Les entités identifiées sans étalon analytique sont représentées en noir, cercle pour le laboratoire 1 et triangle pour le laboratoire 2 ; les entités dont l'identification a été confirmée par l'injection des étalons analytiques sont représentées en rouge, cercle pour le laboratoire 1 et triangle pour le laboratoire 2. Plus la taille des cercles et triangles est grande meilleure est la confiance accordée à l'identification.

Sans l'injection d'étalons analytiques, (cercles ou triangles noirs sur la Figure 46), plusieurs entités peuvent correspondre à un même nom de molécule ; la masse exacte est la même mais a été détectée à plusieurs temps de rétention et parfois dans les 2 modes d'ionisation. Ceci est représenté sur la Figure 46 par une variabilité verticale pour une même molécule. Lorsque l'étalon est injecté (cercles ou triangles rouges sur la Figure 46), l'identification est confirmée et correspond à une seule entité. Sur l'exemple de l'acide valsartan, plusieurs entités sont identifiées sans étalon par le laboratoire 1 (Figure 46 cercles noirs) ; lorsque l'étalon est injecté, 2 entités sont identifiées de façon certaine par le laboratoire 1 (cercles rouges), une en ionisation positive et une en ionisation négative pour lesquelles les méthodes chromatographiques sont différentes. Le laboratoire 2 a aussi identifié l'acide valsartan par l'injection d'étalon (triangle rouge).

Certaines substances candidates à l'issue du premier traitement (sans étalon injecté) comme le 1-OH isoproturon n'ont pas pu être confirmées suite à l'injection d'un étalon. A l'inverse, la majorité des substances potentiellement identifiées à la suite du premier traitement a pu ainsi être confirmée par l'injection d'un étalon.

Pour les LAS, ils ont tous été identifiés dans de nombreux échantillons mais également dans les blancs, avec des ratios oscillants souvent entre 8 et 9. Seul le LAS C10 par SPE est réellement confirmé, car présentant un rapport de réponse >10 entre échantillons et blanc pour 3 échantillons.

Figure 46 : Entités détectées, identifiées sans étalons et avec étalons. En noir, les entités identifiées sans étalons ; En rouge, les entités confirmées avec étalons analytiques. La taille des cercles et triangles est en lien avec le niveau de confiance accordé à l'identification.



Comme le montre la Figure 46, plusieurs candidats peuvent correspondre à une même molécule. Ces candidats ont la même masse mais des temps de rétention différents, ceux-ci ne pouvant pas être connus sans injection de l'étalon et ne sont donc pas présents dans la base de données externe établie *a posteriori*. Le Tableau 14 synthétise le nombre de candidats i) identifiés à partir de la BDD externe établie *a posteriori* sans injection d'étalon, ii) confirmés par l'injection d'étalon et iii) faux-positifs.

Tableau 14 : Nombre de candidats identifié dans les échantillons à partir de la BDD externe établie *a posteriori*, nombre de candidats confirmés par l'injection de l'étalon et nombre de faux-positifs. (nd : non détecté et ni : étalon non injecté).

A = Nombre de candidats B = Nombre de candidats confirmés C = Nombre de candidats "faux positifs"	Laboratoire 1						Laboratoire 2					
	ESI+			ESI-			ESI+			ESI-		
	A	B	C	A	B	C	A	C	B	A	B	C
2,5,6-trichloro-6-hydroxyphthalonitrile		ni			ni			nd			1	
2-OH-isoproturon	5	nd	5	4	nd	4		nd			nd	
Acide parahydroxybenzoïque (PHBA)		1			nd			nd		1	nd	
Acide valsartan	1	1		6	1	5		nd			nd	
Bisphenol AF		nd		4	1	4		ni		1	ni	
Bisphenol AP	2	nd	2	4	1	4		ni			ni	
Bisphenol C	2	nd	2		1			ni			ni	
Bisphenol E		nd		2	1	2		ni		2	ni	
Bisphenol F		nd		2	1	2		ni			ni	
Bisphenol Z		nd			1			ni			ni	
Citalopram amide	1	1		2	nd	2		nd			nd	
Citalopram-N-oxide	1	1		1	nd	1		nd			nd	
Daidzeine	2	ni			ni			1		3	1	2
DMSA		nd		1	1	1		ni			ni	
Génistéine		ni			ni			1		1	nd	1
Irbesartan_446	5	1	4	3	1	2	1	1		1	1	
LAS-C10		ni			ni			nd		1	1	
LAS-C11		ni			ni			nd		1	1	
LAS-C12		ni			ni			nd		1	1	
LAS-C13		ni			ni			nd		1	1	
Losartan acide carboxylique	2	1	1	2	1	1		nd			nd	
N-Desmethyl Venlafaxine	4	1	3		nd			nd			nd	
O-demethyl azoxystrobine (R234886)	1	1		1	1			1			nd	
R417888	1	nd		2	1	1		nd			nd	
Sulisobenzone (Bp-4)		1			1			nd		1	1	
SYN 501657	3	1	3					nd			nd	

Au total 79 candidats ont été identifiés comme étant les 28 molécules pour lesquelles les étalons ont été obtenus. Parmi eux, 37% ont été confirmés par l'injection d'étalons, ceci

représentant 25 molécules identifiées au niveau 1 ; et 57% des candidats s'avèrent être des faux-positifs et 6% n'ont pas pu être confirmés car les étalons n'ont pas été injectés (Tableau 14). Aucun lien n'a été observé entre le niveau accordé à la confiance d'identification des candidats et la confirmation avec étalons, c'est-à-dire que qu'il n'y a pas plus de confirmation avec étalons pour les candidats identifiés au niveau 2A ou 3, même des candidats niveau 4 ou 5 ont été confirmés.

Cette étape démontre ainsi que l'acquisition et l'injection d'un étalon est indispensable pour confirmer la nature d'une substance mais il met aussi en évidence, comme également observé dans la partie 1, que des substances peuvent être correctement (pré)-identifiées à l'aide de base de données externes, ce qui peut permettre une première étape de priorisation. Néanmoins, il subsiste un très fort taux d'entités identifiées à tort (Tableau 14); l'utilisation d'un critère complémentaire, les temps de rétention prédits, pourrait réduire ce nombre. En fonction des propriétés physicochimiques et de la connaissance des conditions chromatographiques, disposer d'un ordre de grandeur du temps de rétention de la molécule d'intérêt entraînerait une diminution du nombre d'entités candidates pour une même molécule.

7 Résultats des essais de quantification

7.1 TRAITEMENT QUANTITATIF DES DONNEES NTS

L'objectif principal du développement des analyses NTS est, à l'heure actuelle, qualitatif. Néanmoins, il a semblé nécessaire d'évaluer le potentiel de ces analyses dans un objectif quantitatif.

Pour l'estimation des concentrations, deux méthodes ont été comparées :

- Une méthode utilisant les traceurs ayant été ajoutés aux extraits (comme cela est recommandé pour les approches ciblées).
- Une méthode sans considérer les traceurs, ce qui limite tout contrôle qualité (mode dégradé) mais permettrait à terme de considérer différentes sources de données, n'ayant pas forcément le même type de contrôle qualité (dans un but d'analyses rétrospectives)

Pour cela, les analyses non ciblées sont comparées aux analyses ciblées effectuées dans le cadre de l'exercice RSP-EIP. En ce qui concerne les analyses d'eau, les comparaisons doivent être considérées avec prudence car les échantillons sont différents : un échantillon composite des deux temps de prélèvement a été utilisé pour le screening non ciblé, tandis que deux analyses indépendantes à T0 et T15 ont été moyennées pour les analyses ciblées. Ceci peut impliquer une évaluation faussée de la valeur moyenne, en cas de forte différence entre les deux valeurs (par exemple, une valeur <LQ avec une quantifiée). Pour les POCIS les deux échantillons sont identiques. Dans les deux cas cependant, les méthodes d'extraction ont été mises en œuvre par deux laboratoires, avec des protocoles un peu différents.

7.2 UTILISATION DES TRACEURS

Pour améliorer la quantification, en prenant en compte les spécificités (efficacité des extractions, effets matrices) des échantillons, on utilise les traceurs pour effectuer des corrections. Le traceur doit avoir des propriétés physico-chimiques et un comportement lors des différentes étapes analytiques proches de ceux des molécules qu'il permet d'évaluer. Les traceurs utilisés pour le traitement quantitatif des données NTS sont les traceurs

d'injection, qui permettent une correction de la procédure analytique (effets matrices, dilution des extraits etc...), mais qui ne prennent pas en compte l'effet de l'étape d'extraction.

Dans le cas de l'analyse non ciblée, les traceurs sont sélectionnés a priori, avant que les molécules d'intérêt à quantifier ne soient connues. Compte-tenu de l'expérience des laboratoires, une liste de traceurs utilisés en analyse ciblée a donc été utilisée.

L'attribution d'un étalon interne pour la quantification d'une substance d'intérêt donnée est fait, en prenant en compte les familles chimiques (traceur urée pour représenter les molécules de cette famille, exemple diuron d6), ou des temps de rétention chromatographique proches entre traceur et molécule considérée au moment du traitement de la donnée.

Tableau 15 : Association des traceurs aux molécules d'intérêt

Composés	El choisi
Acide fenofibrique	Sulfadiméthoxine D6
Alachlore	Simazine d10
Atrazine	Simazine d10
Atrazine Deisopropyl (DIA)	Simazine d10
Atrazine desethyl (DEA)	Simazine d10
Azoxystrobine	Simazine d10
Boscalide	Simazine d10
Carbamazépine	Sulfadiméthoxine D6
Carbamazépine 10,11 epoxide	Sulfadiméthoxine D6
Chlortoluron	Diuron D6
Clarithromycin	Sulfadiméthoxine D6
Cyclophosphamide	Sulfadiméthoxine D6
Diazepam	Sulfadiméthoxine D6
Diclofenac	Diclofenac 13C6
Dimethenamide	Sulfadiméthoxine D6
Diuron	Diuron D6
Epoxiconazole	Simazine d10
Erythromycin	Sulfadiméthoxine D6
flurtamone	Simazine d10
Imidacloprid	Simazine d10
Isoproturon	Diuron D6
Linuron	Diuron D6
Metazachlore	Simazine d10
Metformine	Sulfadiméthoxine D6
Metolachlore	Simazine d10
Ofloxacin	Sulfadiméthoxine D6
Oxazepam	Sulfadiméthoxine D6
Paracetamol (acetaminophen)	Sulfadiméthoxine D6
Simazine	Simazine d10
Sulfaméthoxazole	Sulfadiméthoxine D6
Tebuconazole	Simazine d10

7.3 COMPARAISON DES APPROCHES DE QUANTIFICATION

La Figure 47 montre l'intérêt de cette approche de quantification *a posteriori*.

Pour certains composés, l'approximation peut être considérée comme valable, les concentrations obtenues via les deux approches sont comparables. La plus-value d'utiliser une correction par les traceurs est évidente, liée aux forts effets matriciels rencontrés sur les extraits de POCIS.

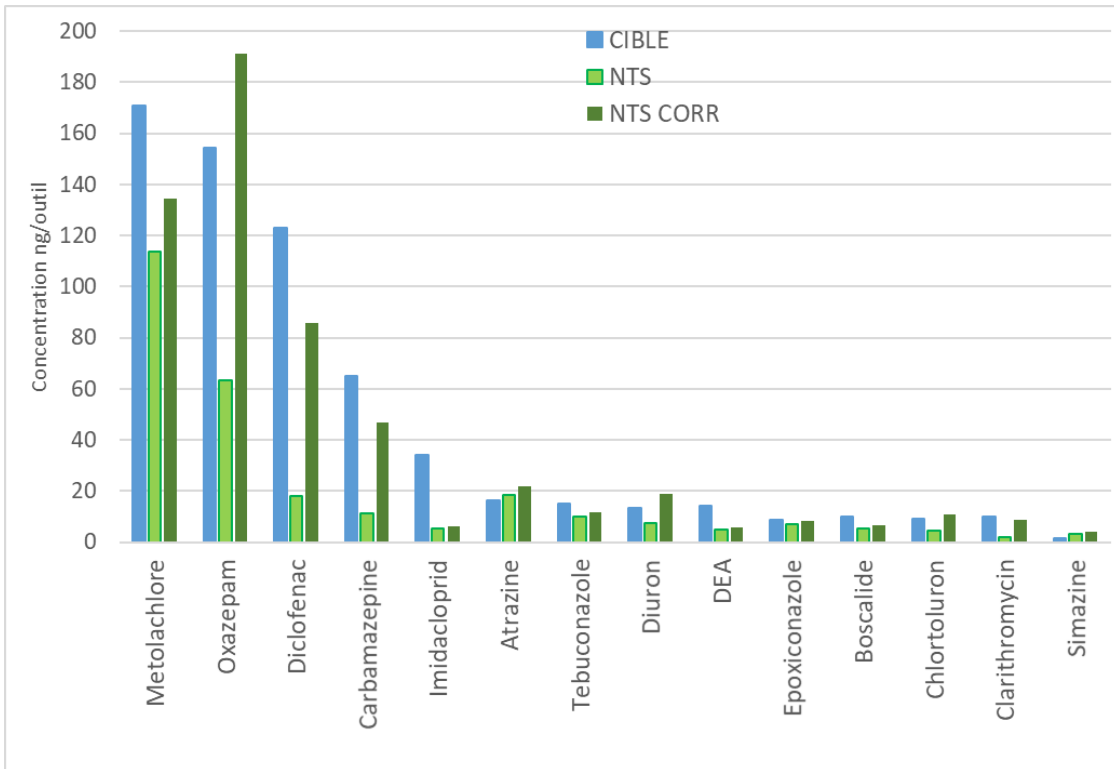


Figure 47 : Comparaison des résultats de quantification obtenus par analyse ciblée, NTS et NTS corrigée par les traceurs : extrait de POCIS, site de la Tréboul

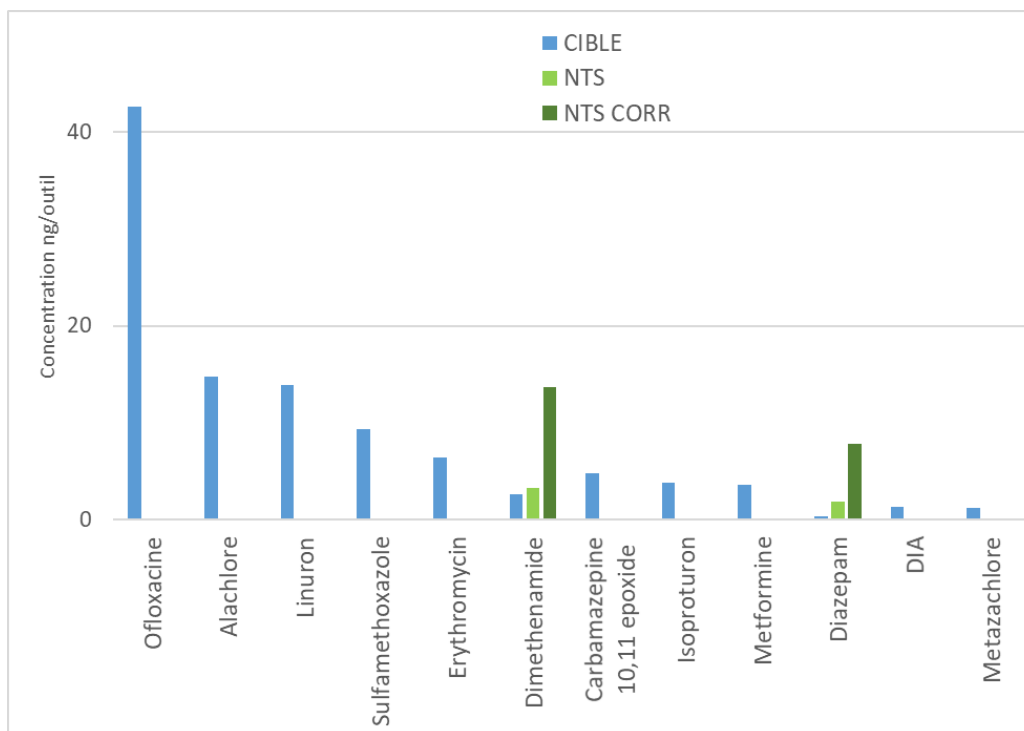


Figure 48 : Comparaison des résultats de quantification obtenus par analyse ciblée, NTS et NTS corrigé par les traceurs : extrait de POCIS, site de la Tréboul

Pour certains composés cependant, présenté en Figure 48, des écarts sont constatés, sans qu'il puisse être tranché fermement sur l'origine de ces écarts, les analyses n'ayant pas été réalisées sur les mêmes extraits ni les mêmes équipements analytiques.

Cependant les divergences semblent plus fortes sur les composés présents à faible concentration dans les échantillons. L'approche ciblée utilisant l'analyse par UPLC triple quadrupole reste plus sensible. A faible concentration, certaines molécules n'ont pas été identifiées par l'approche non ciblée. Pour certains composés, comme le diméthénamide ou le diazépam, le choix des traceurs associé pour correction semble mal adapté, ce qui soulève l'importance du choix des traceurs employés et donc de la mise en œuvre par des experts.

Cette étude très préliminaire montre à la fois la potentielle plus-value de cette utilisation des données NTS, mais aussi la nécessité de manipuler avec de grande précaution les résultats obtenus. Ils doivent rester indicatifs, pour aider potentiellement à prioriser des molécules par comparaison à des valeurs de toxicité par exemple, mais ne peuvent en aucun cas se substituer aux méthodes quantitatives actuelles. Ce travail devrait être poursuivi plus spécifiquement, en diminuant le nombre de facteurs pouvant influencer sur les différences observées (travail sur les mêmes extraits par exemple).

Dans l'objectif de la réutilisation de données potentiellement produites par différents laboratoires, sur des périodes de temps plus ou moins longues, la nécessité d'harmoniser les pratiques est impérative : choix des traceurs, description des méthodes (extraction et analyses) employées, ... Ces éléments devront être considérés dans les recommandations à venir sur le déploiement du screening non ciblé.

8 Conclusions de l'étude

Cette étude avait des objectifs de natures différentes : méthodologique (quelles méthodes pour quels types de résultats, quels critères méthodologiques pour fiabiliser les résultats), opérationnel (établissement de logigrammes de décision, formes et éléments de communications des résultats) et démonstration de l'intérêt en termes d'acquisition de nouvelles informations.

Aspect méthodologique

Il s'agit de la première expérience nationale à large échelle de comparaisons de résultats concernant l'analyse non ciblée. Afin d'envisager un déploiement dans le cadre de la surveillance des masses d'eau, cet exercice a permis de tester différents critères et d'identifier les points critiques à prendre en compte dans de futures recommandations. La difficulté de l'exercice est principalement liée à la multiplication des analyses pour une mise en œuvre par 3 laboratoires, dans l'objectif de renforcer les conclusions sur ce volet méthodologique

La complémentarité des approches par SPE (extrait d'eau issue d'un échantillonnage ponctuel) et POCIS (extrait eau issue d'un échantillonnage passif intégratif) est vérifiée, comme dans les analyses ciblées conventionnelles : si un grand nombre de molécules sont échantillonnées par les deux méthodes, leurs spécificités (sensibilité, gamme de composés...) permettent d'acquérir plus d'informations. Les effets matrices sont cependant plus importants sur les analyses POCIS

La complémentarité des analyses par les deux modes en chromatographie liquide (ESI + et ESI -) est elle aussi mise en évidence. Des efforts pour étoffer les BDD en ESI - restent à mener, afin d'élargir encore le panel de molécules identifiables. L'utilisation de la GC/HRMS appliquée dans des conditions non optimales pour cette technique (choix de l'extraction SPE plutôt que LLE) a néanmoins permis de mettre en évidence la plus-value apportée en termes de molécules identifiées. L'analyse d'échantillons spécifiques (extraits adaptés pour les molécules apolaires) permettra d'ouvrir le champ des molécules identifiées à un plus large panel. C'est ce choix méthodologique qui a été appliqué pour la campagne nationale EMNAT-NTS ^{13,14}.

Cette étude, au-delà des aspects instrumentaux, s'est intéressée aux bases de données qui sont un élément primordial de l'identification de composé d'intérêt. Dans le traitement suspect des données brutes, tout le processus d'identification repose sur la comparaison à une base de référence ; l'influence du mode de constitution de ces bases de données a donc un rôle déterminant sur les résultats obtenus.

En parallèle des BDD internes, construites par chacun des laboratoires, la validité de l'utilisation de BDD externes (constructeurs ou construites à partir de données bibliographiques) a fait l'objet d'une évaluation particulière. En effet, les BDD internes, bien que plus robustes (car établies à partir de l'injection de standard) sont peu étoffées et restreignent donc fortement le nombre de substances évaluées. Ce travail a pu montrer qu'en cadrant correctement les critères d'identification et en s'assurant d'une confirmation

¹³ Togola A., Lestremau F., Soulier C. et Coureau C.; Acquisition des données de screening environnemental dans le cadre du réseau de surveillance prospective. RSP-AQUAREF; Rapport BRGM/RP-69967-FR

¹⁴ Togola A., Lestremau F., Coureau C. et Soulier C. ; Propositions et mise en œuvre de traitement des données de screening environnemental : action EMNAT-NTS. RSP -AQUAREF; Rapport BRGM/RP-69968-FR.

des identifications (nécessaire par l'identification d'un grand nombre de faux-positifs), les résultats obtenus par les BDD externes sont pertinents et largement utilisables. La généralisation de l'emploi des temps de rétention « modélisés » devrait mener à réduire le nombre de faux positifs de manière très importante. Le travail de traitement de la donnée brute plus conséquent est largement compensé par le gain d'informations.

La majeure partie de ce travail a porté sur les aspects méthodologiques et les paramètres analytiques influant sur la qualité des résultats. Plusieurs points d'attention ont ainsi pu être soulevés, détaillés ci-dessous

Malgré des extraits identiques pour les différents laboratoires, des différences dans les résultats rendus sont mises en évidence. Les différences de performance des appareils, les modes et conditions de préparation des extraits pour analyse, les logiciels de retraitement des données analytiques sont autant d'éléments impactant le rendu des résultats. Si ces mêmes facteurs influencent les analyses conventionnelles, il est plus difficile d'en évaluer a priori l'impact dans le cas du screening non ciblé puisqu'il n'existe actuellement pas de critères d'acceptation associés à ces différents paramètres (comme la limite de quantification en analyse ciblée). Ces critères doivent donc être établis, en identifiant les facteurs les plus sensibles et les moyens de les évaluer.

Dans le cas des analyses conventionnelles, ces éléments de contrôle qualité restent au sein du laboratoire et lui servent à valider le résultat quantitatif. Ils ne sont pas fournis avec le résultat. Dans le cas de l'analyse non ciblée ces éléments de première importance comme souligné par cette étude devront d'une part permettre de valider que l'analyse s'est bien déroulée (et donc que la donnée brute est exploitable), mais aussi être transmis puisque nécessairement utilisé dans l'étape de traitement des données qui peut être dissociée de la production analytique (réutilisation des données brutes a posteriori).

La deuxième difficulté est de déterminer quels sont les moyens d'évaluer ces critères de contrôle qualité. En effet dans l'analyse quantitative, on valide une méthodologie par rapport aux substances à analyser ; hors ici, il est nécessaire d'identifier des points de contrôle pertinents **sans a priori sur les molécules à identifier**.

Différents contrôles qualité ont été discutés dans cette étude afin de garantir une harmonisation des résultats entre différents laboratoires ou expliquant des divergences de résultats entre laboratoire. Un travail complémentaire proposé en 2020, dans le cadre des actions AQUAREF, a pour objectif, pour chacun de ces facteurs, de proposer des valeurs de référence et des recommandations en termes de décision sur les résultats fournis (analyses, acceptables ou non, impact sur les identifications...).

L'importance **des traceurs (extraction et analyse)** a été mise en évidence à plusieurs niveaux.

De manière générale, les résultats obtenus sur les traceurs (notamment d'extraction) renseignent sur le bon déroulement du processus analytique. Dans le cas de cette étude, la non identification systématique de certains traceurs (pour aucun laboratoire) sous-entend que les méthodes appliquées (analyse ou extraction) ne sont pas adaptées à leur détection, mais ce point reste à vérifier.

Les différences des effets matriciels entre les types d'extraits (SPE et POCIS), mais aussi entre échantillons de même type ont été soulignées, ainsi que leur impact sur les résultats. Ces effets sont les mêmes que dans les analyses conventionnelles, où ils sont corrigés par l'utilisation de traceurs (extraction et injection).

Dans cette étude, la prise en compte d'un grand nombre de traceurs a permis d'évaluer de façon large leur sensibilité aux effets matriciels, aux méthodes et aux instruments utilisés. La comparaison des résultats obtenus sur les traceurs a permis de montrer leur pertinence pour évaluer la sensibilité intrinsèque de chaque instrument. En effet la non-identification de traceurs (notamment d'injection) et particulièrement dans les blancs (non sensible aux effets matriciels) permet de juger des différences de sensibilité des différents équipements, et donc de leur capacité de détection et donc d'identification des composés.

C'est ainsi que les plus fortes divergences de résultats entre les 3 laboratoires concernaient des molécules pour lesquelles le signal analytique était le plus faible.

L'utilisation de traceurs est également essentielle pour une analyse semi quantitative des résultats issus des spectres acquis en screening non ciblé complétés par les calibrations effectuées sur les molécules d'intérêt. Dans cette étude, les échantillons et les calibrations ont été analysés par le même laboratoire ce qui a simplifié l'approche, mais les différences seraient plus marquées si les données avaient été acquises par des laboratoires différents, montrant ainsi le besoin d'harmoniser les pratiques par exemple en proposant une liste systématique de traceurs pertinents à utiliser, ce qui faciliterait l'utilisation simultanée de données issues de différents laboratoires. Mais dans cet exercice, avec une calibration, des traceurs bien choisis les estimations semi quantitatives obtenues sont cohérentes avec des analyses ciblées

Il s'avère donc nécessaire de proposer une méthodologie permettant de pondérer les résultats obtenus par rapport à la sensibilité analytique, à l'efficacité de la méthode d'extraction et aux spécificités de chaque échantillon, en s'appuyant notamment sur l'utilisation de traceurs de référence qui restent à affiner.

Une autre problématique mise en lumière lors de cette étude est celle de la gestion des pollutions /contamination des échantillons, et de leur prise en compte dans le traitement et la restitution des résultats. Les contaminations au cours de l'échantillonnage ou au laboratoire sont inévitables et variables en fonction de l'opérateur, du matériel, du solvant, du lieu d'extraction, etc. ...; le cas du bisphénol A en est un très bon exemple. La problématique spécifique à l'analyse non ciblée est qu'il est difficile d'anticiper et d'éviter une pollution sur les composés organiques de manière générique, aucun contrôle a priori ne pouvant être fait sur les méthodes et matériau puisque par définition la liste des molécules n'est pas définie.

Il s'avère important de consolider les résultats issus de l'analyse non-ciblée à l'aide de contrôles de blancs réguliers, adaptés et associés aux résultats jusqu'à l'interprétation des données. Dans cette étude, de manière pragmatique, un critère d'acceptation pour l'identification d'une molécule dans un échantillon par rapport à un blanc de référence a été proposé.

Aspect opérationnel, restitution des résultats.

Le travail effectué dans cette étude par 3 laboratoires avait aussi pour but de discuter de la manière d'homogénéiser le traitement des résultats, et leur restitution.

Comme présenté précédemment, les aspects méthodologiques sont d'une très grande importance, à la fois pour permettre une bonne interprétation des résultats obtenus (identification/ non identification d'une molécule), mais aussi dans un objectif de traitement *a posteriori* de la donnée brute par d'autres acteurs que ceux ayant acquis cette donnée.

Le travail de construction d'un logigramme permettant d'associer à chaque substance identifiée un niveau de confiance répond en partie à cet objectif. Différents critères doivent

encore faire évoluer cette classification : le logigramme ne prend pas en compte la comparaison de plusieurs échantillons par exemple.

En parallèle, dans le cadre du traitement suspect, ne peuvent être identifiées que les molécules recherchées (quelle que soit la base de données), les autres signaux même détectés par l'analyse restant au stade d'entités. La forte influence de la constitution des BDD a été démontrée. La nécessité de communiquer, en même temps que les molécules identifiées, la liste des molécules effectivement recherchées paraît à recommander.

Mais la non-identification doit aussi être explicitée : le fait qu'une molécule soit recherchée mais non-identifiée ne permet pas de conclure à son absence : elle peut être présente à des niveaux indétectables, ou ne permettant pas de remplir les critères d'identification présentés dans le logigramme. Cette notion est difficile à transmettre, d'autant que la notion de limite d'identification (comparable à une limite de quantification) ne peut être systématiquement établie (puisque pour cela il faudrait une évaluation globale de tout le processus « extraction/analyse /traitement » pour toutes les molécules d'intérêt).

Apports pour l'acquisition de nouvelles connaissances

Dans cette étude, selon les stations sélectionnées, on peut voir plus de 80% de molécules supplémentaires par rapport aux suivis réglementaires. Le gain en termes d'information est donc très important. De nouvelles molécules potentiellement à considérer ont pu être identifiées, même si le jeu de données reste assez faible pour une extrapolation nationale.

Des profils différents selon les stations ont été mis en évidence, alors même que les campagnes (unique pour chaque site) n'ont pas forcément permis d'échantillonner sur les périodes les plus propices. Une étude plus poussée des résultats permettrait par typologie de pression, par bassin... d'identifier des molécules communes ; un travail par station permettrait d'identifier des spécificités et potentiellement des molécules d'intérêt plus local.

Des essais de quantification à partir des données d'analyses non ciblés ont été menés, montrant que, sans chercher à remplacer l'analyse conventionnelle, il est possible d'obtenir une information approximative sur les teneurs présentes dans les échantillons, par l'établissement *a posteriori* d'une calibration instrumentale sur les molécules d'intérêt et par l'utilisation de traceurs d'extraction. Ainsi les molécules identifiées avec de fortes occurrences pourraient être priorisées selon un critère quantitatif, même approximatif pour comparaison avec des seuils de toxicité, afin d'intégrer des campagnes de suivis régulières par approche conventionnelle.

Ce travail a permis de préciser le périmètre d'applicabilité du screening non ciblé associé au traitement suspect des données. Pour la première fois au niveau national, il a également permis de tester cette méthodologie novatrice sur une campagne à large échelle.

Une utilisation opérationnelle, en tant qu'outil de la surveillance prospective nationale des masses d'eaux est largement envisageable. Il reste cependant nécessaire de développer des outils de contrôle qualité afin d'assurer la comparabilité des résultats à la fois entre laboratoires, entre échantillons/stations différents et dans le temps. Un travail sur les formats de restitutions des résultats est enfin nécessaire, ainsi que sur la communication vers les utilisateurs de ces données.

ANNEXES

Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution

Conditions Laboratoire 1

Les aliquots du Laboratoire 1 (300µL) dans le méthanol n'ont pas été modifiés, seuls des étalons d'injection ont été ajoutés ; la liste et les concentrations dans l'extrait sont données dans les Tableaux 3 et 4.

L'acquisition est effectuée par le logiciel MassLynx (Waters).

La séparation chromatographique a été réalisée avec un système UPLC I-Class (Waters), les paramètres sont donnés dans le tableau suivant:

Paramètres chromatographiques LC utilisés par le Laboratoire 1

Paramètres	ESI+	ESI-
Tampon aqueux (A)	Eau ULC (Biosolve) 0,05% d'acide formique (v/v)	Eau ULC (Biosolve) 0,007% d'acide formique (v/v)
Solvant organique (B)	Acétonitrile (Biosolve) 0,05% d'acide formique (v/v)	Méthanol (Biosolve) 0,007% d'acide formique (v/v)
Débit (mL/min)	0,45	0,3
Gradient A/B	T _{0min} : 98/2, T _{0,5min} : 98/2, T _{18,5min} : 1/99, T _{22,5min} : 1/99, T _{25min} : 98/2	
Colonne	Acquity BEH C18 (150 x 2,1 x 1,7µm, Waters)	
Température four colonne (°C)	35	45
Volume d'injection (µL)	2	

La détection par spectrométrie de masse haute résolution a été réalisée avec un spectromètre de masse hybride quadrupôle-temps de vol (XEVO G2S QTOF, Waters) possédant une interface électrospray opérant en modes d'ionisation positif et négatif. Pour chaque mode d'ionisation, les données spectrales ont été acquises sur une gamme de masse de 50 à 1 200 uma¹⁵ selon 2 méthodes :

- En mode résolution, continuum sans correction de lockmass et MS^E, permettant d'utiliser le logiciel de traitement UNIFI de Waters.
- En mode résolution, centroid avec correction de lockmass et MS^E, permettant de convertir les données en format universel « mzXML » ou « mzML » pour des traitements sur d'autres logiciels.

Le mode MS^E crée deux fonctions parallèles sur lesquelles sont enregistrées des scans alternatifs avec des énergies de collision différentes. La fonction 1 est obtenue à faible énergie de collision, 6eV, et la fonction 2 à haute énergie de collision, avec une rampe d'énergie allant de 6 à 45eV. Dans le cas de la fonction 2, tous les spectres de masse acquis à chaque énergie de collision, de 6 à 45 eV, sont superposés sur un seul spectre de

¹⁵ Unité de masse atomique

masse ; toutes les informations des ions précurseurs et fragments sont présents sur celui-ci. Les deux fonctions ont un temps de scan de 0,25s avec 0,015s d'interscan. Ce mode d'acquisition permet d'obtenir les ions précurseurs et fragments en une seule injection sans avoir à sélectionner au préalable l'ion précurseur.

L'analyse a été réalisée dans les 2 modes d'ionisation positif et négatif. Les paramètres du spectromètre de masse ont été optimisés pour un maximum d'intensité d'un mélange d'étalons et sont détaillés dans le tableau suivant.

Le gaz de collision est de l'argon avec une pureté de 99,9999% à $1,3 \cdot 10^{-4}$ mBar.

La correction d'une potentielle déviation en masse au cours de l'analyse s'effectue sur deux masses de référence de la leucine enképhaline, en ESI+ la masse de l'ion moléculaire à 556,2771 ainsi qu'un ion fragment à 278,1141 et en ESI- la masse de l'ion moléculaire (554,2620) ainsi qu'un ion fragment (236,1035).

Tableau: Paramètres spectrométriques utilisés par le Laboratoire 1

Paramètres	ESI+	ESI-
Mode d'acquisition HRMS	Data independant (MSe), profile (Continuum), mode Resolution	
Gamme de masse (uma)	50-1200	
Energie de collision (eV)	Rampe de 6 à 45	
Vitesse d'analyse (scan rate, Hz)	4	
Débit Cône gaz (L/h)	50	
Débit gaz de désolvatation (L/h)	900	
Température Cône gaz (°C)	120	
Température gaz de désolvatation (°C)	600	
Tension de cône (V)	30	15
Tension de capillaire (kV)	0,5	1
Tension de lockspray (kV)	3	2,5
Résolution (masse)	25 000-30 000 (556,2771)	30 000-32 000 (554,2620)

Différents contrôles qualité de l'instrument ont été réalisés :

- L'exactitude en masse est vérifiée au minimum toutes les semaines sur la gamme de masse (m/z) 50-1 200. Pour cela une solution de formate de sodium (0,5mM) constituée d'un mélange d'acide formique à 10% / 0,5mM d'hydroxyde de sodium (1/300 ; v/v) dans un mélange 2-propanol/eau (90/10 ; v/v), est injectée directement dans la source d'ionisation du spectromètre de masse avec un débit de 20µL/min.
- Pour corriger une potentielle déviation en masse lors de l'injection des échantillons, une solution de lockmass, leucine enképhaline à 1ng/µL est introduite directement dans la source d'ionisation du spectromètre de masse par le capillaire de lock spray à un débit de 20µL/min toutes les 15 s pendant l'analyse.

Les données ont été traitées via le logiciel Unifi (Waters).

Conditions LC Laboratoire 2

Les aliquots du Laboratoire 2 ont été filtrés sur des filtres seringues UptiDisc™ en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de porosité de 0,2 µm (25mm de diamètre interne, avec pré-

filtre en fibre de verre) puis un ajout des étalons d'injections a été effectué ; la liste et les concentrations dans l'extrait sont données dans le Tableau 3 et le Tableau 4.

Les analyses ont été effectuées avec un LC/QTOF 6550 (Agilent).

La séparation chromatographique a été effectuée par chromatographie de partage en phase inverse avec une colonne C18 de type ZORBAX SB-Aq (2,1*150mm, 1,8µm), les paramètres chromatographiques sont donnés dans le tableau suivant:

Paramètres chromatographiques LC utilisés par le Laboratoire 2

<i>Paramètres</i>	<i>ESI+/ESI-</i>
<i>Tampon aqueux (A)</i>	Eau 1mM Acétate d'Ammonium
<i>Solvant organique (B)</i>	Méthanol
<i>Débit (mL/min)</i>	0,4
<i>Gradient A/B</i>	T _{0min} : 100/0, T _{2min} : 100/0, T _{14min} : 2/98, T _{20min} : 2/98, T _{21min} : 100/0, T _{24min} : 100/0
<i>Colonne</i>	C18 de type ZORBAX SB-Aq (2,1*150mm, 1,8µm)
<i>Température four colonne (°C)</i>	40
<i>Volume d'injection (µL)</i>	5

La gamme de masse d'acquisition a été fixée de 100 à 1000 uma en mode scan et de 50 à 1000 uma en mode fragmentation. La détection des molécules a été réalisée dans les 2 modes d'acquisition positif et négatif en mode data indépendant (scan + fragmentation). La fragmentation des ions précurseurs est effectuée à deux énergies de collision de : 20 et 40 eV.

Les principaux paramètres spectrométriques utilisés sont répertoriés dans le tableau suivant

Paramètres spectrométriques utilisés par le Laboratoire 2

<i>Paramètres</i>	<i>ESI+</i>	<i>ESI-</i>
<i>Mode d'acquisition HRMS</i>	All ion (MS + MS/MS en data indépendant)	
<i>Gamme de masse (uma)</i>	100 à 1000 (MS/MS de 50 à 1000)	
<i>Energie de collision (eV)</i>	All ion : 20 et 40	
<i>Vitesse d'analyse (scan rate, Hz)</i>	4	
<i>Débit du gaz de gaine (L/min)</i>	12	
<i>Débit du gaz séchant (L/min)</i>	17	15
<i>Température du gaz de gaine (°C)</i>	390	350
<i>Température du gaz séchant (°C)</i>	200	
<i>Tension au capillaire (V)</i>	3500	
<i>Tension au « nozzle » (V)</i>	0	
<i>Pression de nébulisation (psig)</i>	30	
<i>Fragmentation (V)</i>	365	

Les données ont été traitées via le logiciel Masshunter (Agilent).

Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution

Conditions LC Laboratoire 3

Les aliquotes du Laboratoire 3 reçus en méthanol ont été évaporés à sec puis repris avec 500 µL d'une solution de traceur d'injection de Diuron D6 à 10 µg/L dans un mélange eau / acétonitrile (95/5, v/v).

L'analyse est réalisée avec une UHPLC H-Class Waters. Les paramètres chromatographiques sont donnés dans le tableau suivant

Paramètres chromatographiques LC utilisés par le Laboratoire 3

<i>Paramètres</i>	<i>ESI+</i>
<i>Tampon aqueux (A)</i>	Eau 0,1% d'acide formique (v/v)
<i>Solvant organique (B)</i>	Acétonitrile 0,1% d'acide formique (v/v)
<i>Débit (mL/min)</i>	0,5
<i>Gradient A/B</i>	T _{0min} : 98/2, T _{2min} : 98/2, T _{15min} : 1/99, T _{17min} : 1/99, T _{18min} : 98/2 ; T _{20min} : 98/2
<i>Colonne</i>	HSS™ T3 (C18) 2,1 mm x 10 cm ; 1,8 µm (Waters)
<i>Température four colonne (°C)</i>	30
<i>Volume d'injection (µL)</i>	5

Le spectromètre de masse utilisé est un Xevo-G2s-QToF Waters. La gamme de masse d'acquisition est de 50 à 1200 uma. L'acquisition a été réalisée en ionisation positive uniquement (ESI +), en mode MS^E (fragmentation MSMS en faisant varier l'énergie de collision) et au format continuum grâce au logiciel MassLynx de Waters. Les paramètres spectrométriques sont donnés dans le tableau suivant :

Paramètres spectrométriques utilisés par le Laboratoire 3

<i>Paramètres</i>	<i>ESI+</i>
<i>Mode d'acquisition HRMS</i>	Data independant (MSe), profile (Continuum), mode Resolution
<i>Gamme de masse (uma)</i>	50-1200
<i>Energie de collision (eV)</i>	Rampe de 10 à 45
<i>Vitesse d'analyse (scan rate, Hz)</i>	2
<i>Débit Cône gaz (L/h)</i>	50
<i>Débit gaz de désolvatation (L/h)</i>	700
<i>Température Cône gaz (°C)</i>	150
<i>Température gaz de désolvatation (°C)</i>	450
<i>Tension de cône (V)</i>	30
<i>Tension de capillaire (kV)</i>	0,35
<i>Tension de lockspray (kV)</i>	3
<i>Résolution (masse)</i>	25 000-30 000 (556,2771)

Les données acquises ont été retraitées et interprétées dans le logiciel Unifi de Waters.

Annexe 2 : Détails de sélection de la liste des molécules d'intérêt pour traitement suspect des empreintes NTS par les laboratoires 1 et 2.

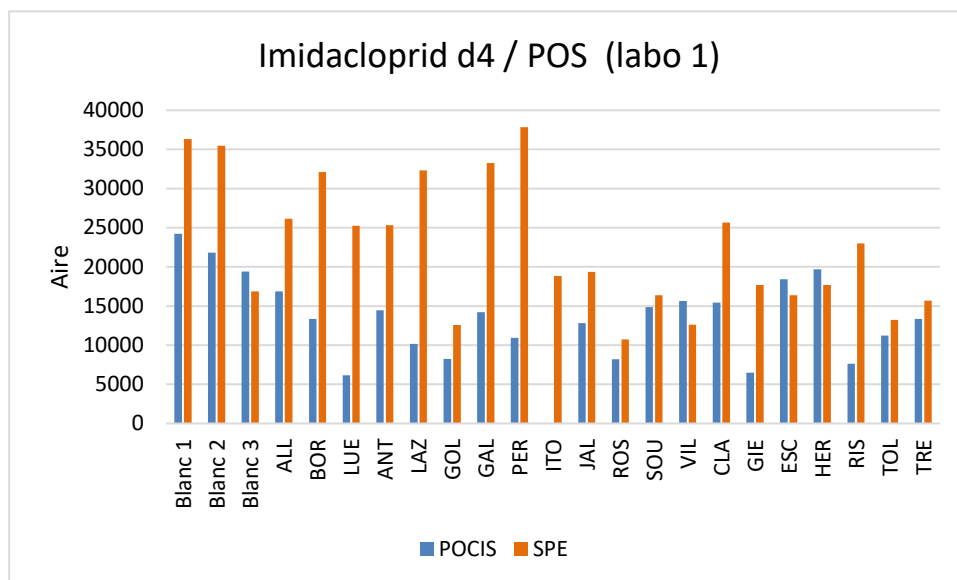
Nom composé	n°CAS	Formule brute	Famille	Molécule parent (si produit de transformation)	NORMANEWS	EMNAT	BIOESSAIS	METABOLITES PESTICIDES	Source BNVD	STABILITE
2,2-bisphenol F	246702-09	C13H12O2	Industriels		X					
Bisphenol AF	1478-61-1	C15H10F6O2	Industriels		X					
Bisphenol E	2081-08-5	C14H14O2	Industriels		X					
Bisphenol G	127-54-8	C21H28O2	Industriels		X					
Bisphenol TMC	129188-99-4	C21H26O2	Industriels		X					
Daidzéine	486-66-8	C15H10O4	Phytoestrogènes				X			
Fluconazole(II) (Diflucan)	86386-73-4	C13H12F2N6O	Pharmaceutiques				X			
Genistein	446-72-0	C15H10O5	Phytoestrogènes				X			
Irbesartan_446	748812-53-5	C25H30N6O2	Pharmaceutiques, produits de transformation	Irbesartan	X					
LAS-C10	/	C16H26O3S	Surfactants			x				
LAS-C11	/	C17H28O3S	Surfactants			x				
LAS-C12	/	C18H30O3S	Surfactants			x				
LAS-C13	/	C19H32O3S	Surfactants			x				
Sulisobenzone (Bp-4)	6628-37-1 / 4065-45-6	C14H12O6S	Filtres UV				X			
Acide parahydroxybenzoïque (PHBA)	99-96-7	C7H6O3	Parabènes, Produit transformation	Parabènes						x
1,2,4-triazole	288-88-0	C2H3N3	Pesticides, produits de transformation	R-conazoles				X		
1-OH-isoproturon	189500-72-9	C12H18N2O2	Pesticides, produits de transformation	isoproturon				X		

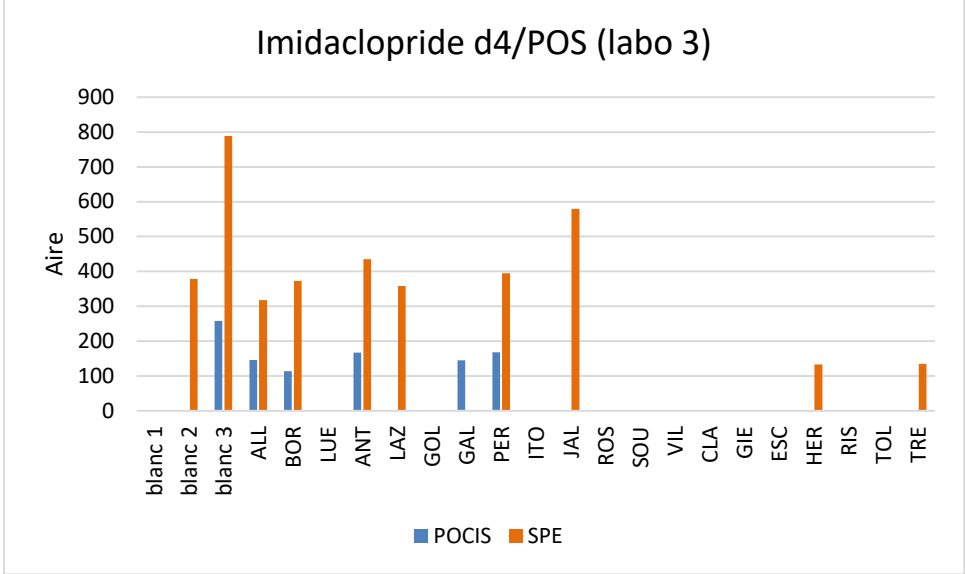
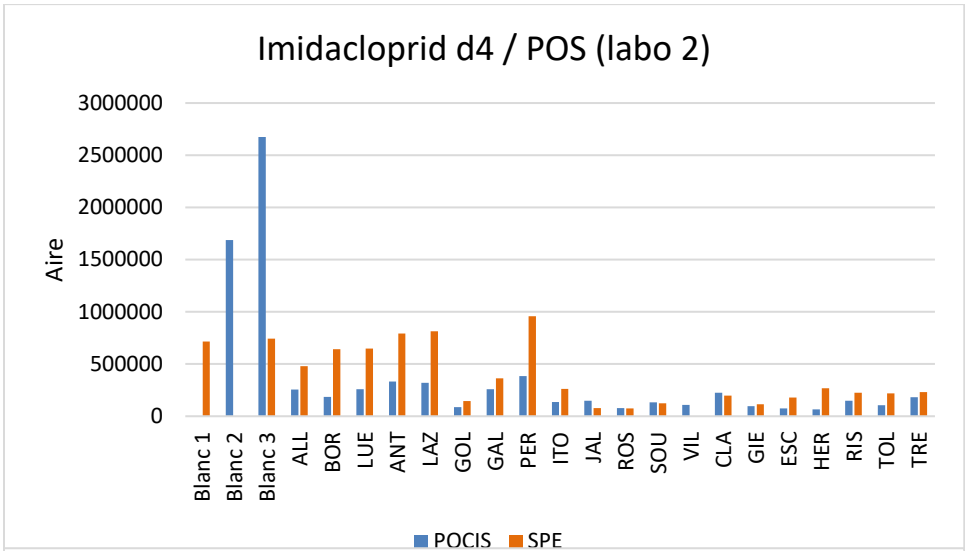
2,4,4- Trihydroxybenzophénone	1470-79-7	C13H10O4	Filtres UV				X			
2,5,6-trichloro-4-hydroxyphthalonitrile (DSD-3701 ou R182281)		C8HCl3N2O	Pesticides, produits de transformation	chlorothalonil						X
2-OH-isoproturon		C12H18N2O2	Pesticides, produits de transformation	Isoproturon				X		
3-carboxy-2,5,6-trichlorobenzamide (SDS-46851 ou R611965)		C8H4Cl3NO3	Pesticides, produits de transformation	chlorothalonil						X
bisphenol F	620-92-8	C13H12O2	Industriels		X		X			
4-n-butoxyphenol	122-94-1	C10H14O2	Industriels				X			
4-nonylphenol	84852-15-3	C15H24O	Industriels		X		X			
4-Nonyl phenol diethoxylate	20427-84-3	C19H32O3	Industriels				X			
4-t-octylphenol	140-66-9	C14H22O	Industriels		X					
bisphenol AP	1571-75-1	C20H18O2	Industriels		X					
bisphenol B	77-40-7	C16H18O2	Industriels		X					
bisphenol BP	1844-01-5	C25H20O2	Industriels		X					
bisphenol C	79-97-0	C17H20O2	Industriels		X					
bisphenol FL	3236-71-3	C25H18O2	Industriels		X					
bisphenol M	13595-25-0	C24H26O2	Industriels		X					
bisphenol P	2167-51-3	C24H26O2	Industriels		X					
bisphenol Z	843-55-0	C18H20O2	Industriels		X					
Citalopram amide	64372-56-1	C20H23FN2O2	Pharmaceutiques, produits de transformation	Citalopram	X					
Citalopram carboxylic acid	440121-09-5	C20H22FNO3	Pharmaceutiques, produits de transformation	Citalopram	X					
citalopram-N-oxide	63284-72-0	C20H21FN2O2	Pharmaceutiques, produits de transformation	Citalopram	X					
Clobetasone butyrate	25122-47-8	C26H32ClFO5	Pharmaceutiques				X			
Coumestrol	479-13-0	C15H8O5	Phytoestrogènes				X			
Difluprednate	23674-86-4	C27H34F2O7	Pharmaceutiques				X			
Fluticasone	90566-53-3	C22H27F3O4S	Pharmaceutiques				X			

Fluticasone furoate	397864-44-7	C27H29F3O6S	Pharmaceutiques				X			
Hydroxyflutamide	52806-53-8	C11H11F3N2O4	Pharmaceutiques, produits de transformation	Flutamide			X			
Losartan carboxylic acid	124750-92-1	C22H21ClN6O2	Pharmaceutiques, produits de transformation	Losartan	X					
Metolachlor mercapturate	159956-64-6	C20H30N2O5S	Pesticides, produits de transformation	metolachlore				X		
n-butylparabène	94-26-8	C11H14O3	Parabènes				X			
N-Desmethyl Venlafaxine	149289-30-5	C16H25NO2	Pharmaceutiques, produits de transformation	Venlafaxine	X					
R234886 compound 2 o-demethyl azoxystrobin	1185255-09-7	C21H15N3O5	Pesticides, produits de transformation	Azoxystrobine				X		
R401553 Compound 28 SYN 501657	240802-59-9	C11H7N3O2	Pesticides, produits de transformation	Azoxystrobine				X		
R402173	951009-69-1	C18H11N3O4	Pesticides, produits de transformation	Azoxystrobine				X		
RH-24580	29918-41-0	C12H13Cl2NO2	Pesticides, produits de transformation	Propyzamide				X		
RH-24644	29918-40-9	C12H11Cl2NO	Pesticides, produits de transformation	Propyzamide				X		
TCEP / Tris(2-chloroethyl)phosphate	5961-85-3	C6H12Cl3O4P	Industriels				X			
Valsartan acid	164265-78-5	C14H10N4O2	Pharmaceutiques		X					
Venlafaxine	93413-46-8	C17H27NO2	Pharmaceutiques		X					
Vinclozoline	50471-44-8	C12H9Cl2NO3	Pesticides				X			
Prosulfocarb sulfoxide		C14H21NO2S	Pesticides, produits de transformation	Prosulfocarb					X	
DMSA	304-55-2	C4H6O4	Pesticides, produits de transformation	dichlorofluanid + tolylfluanid				X		

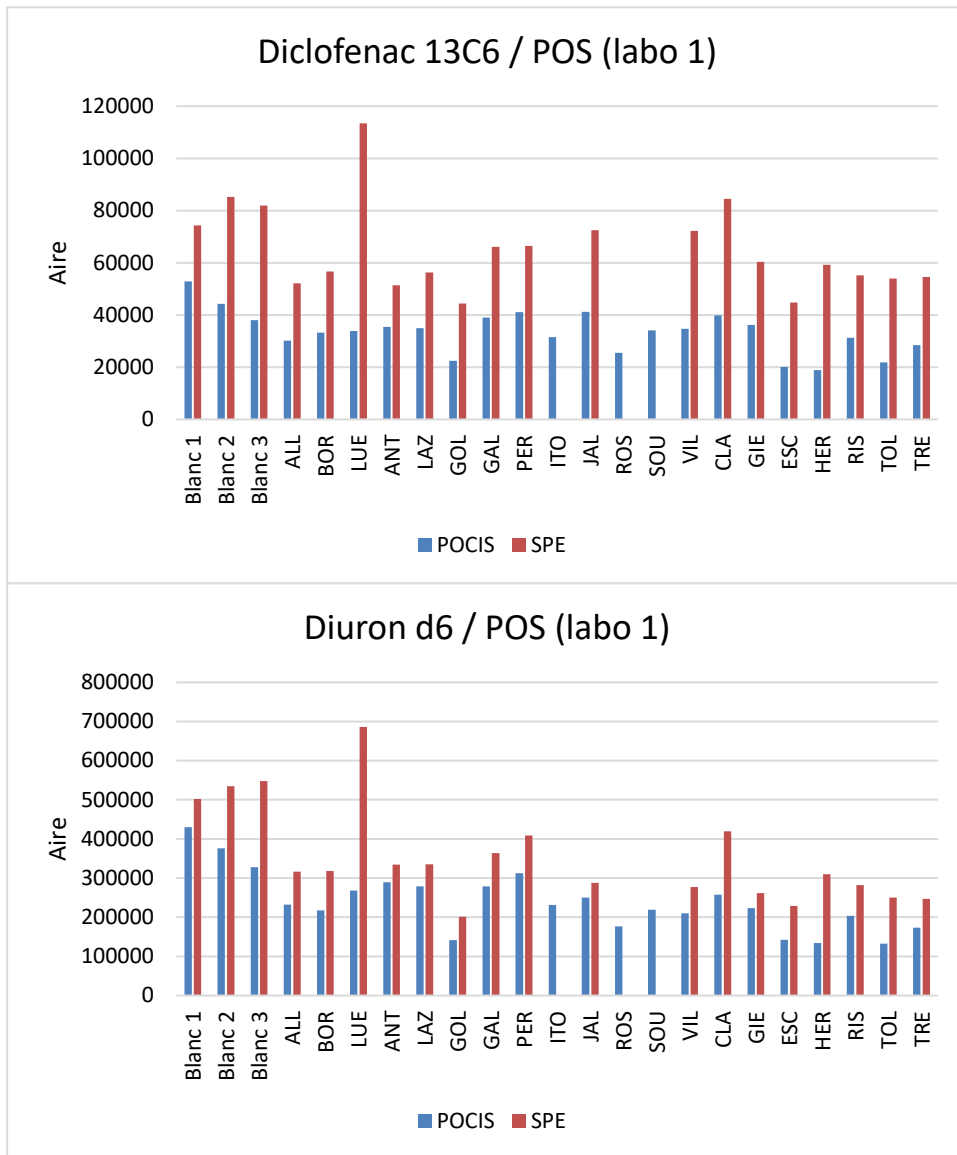
2-carbamoyl-3,5,6-trichloro-4-cyanobenzene-1-sulfonic acid (R417888)		C8H3Cl3N2O4S	Pesticides, produits de transformation	chlorothalonil (Kiefer 2019)								X
4-carbamoyl-2,5-dichloro-6-cyanobenzene-1,3-disulfonic acid (R419492)		C8H4Cl2N2O7S2	Pesticides, produits de transformation	chlorothalonil (Kiefer 2019)								X
2,3,6-trichloro-5-cyano-4-hydroxybenzamide (SYN507900)		C8H3Cl3N2O2	Pesticides, produits de transformation	chlorothalonil (Kiefer 2019)								X
2,4-dicarbamoyl-3,5,6-trichlorobenzene-1-sulfonate (R471811)		C8H5Cl3N2O5S	Pesticides, produits de transformation	chlorothalonil (Kiefer 2019)								X
2,4,5-trichloro-6-hydroxy-benzene-1,3-dicarboxamide (SYN548580)		C8H5Cl3N2O3	Pesticides, produits de transformation	chlorothalonil (Kiefer 2019)								X
Chlortoluron TP (CGA15140)		C10H11ClN2O3	Pesticides, produits de transformation	Chlortoluron (Kiefer 2019)								X

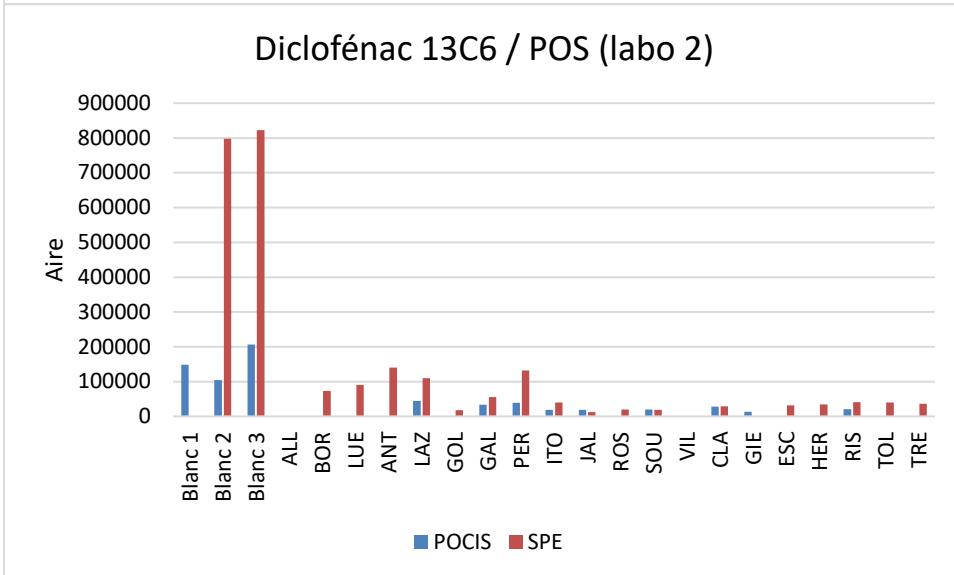
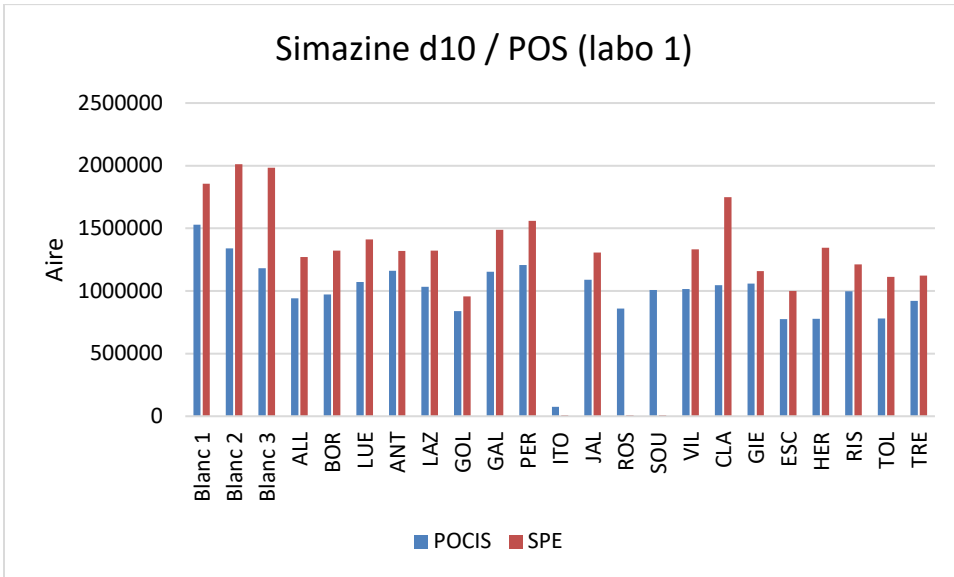
Annexe 3 Suivi du traceur d'extraction imidaclopride d4 dans les échantillons eau, POCIS et blanc par laboratoire

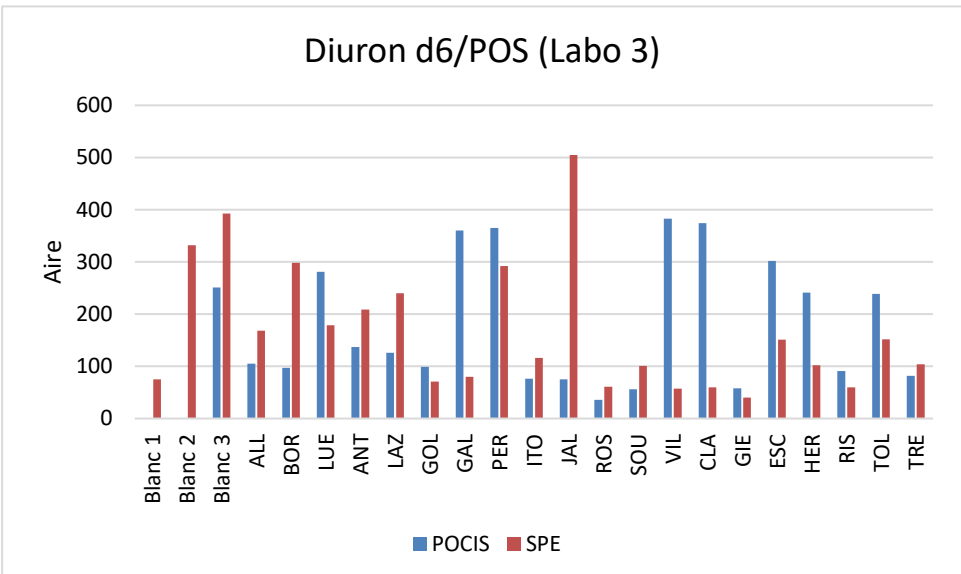
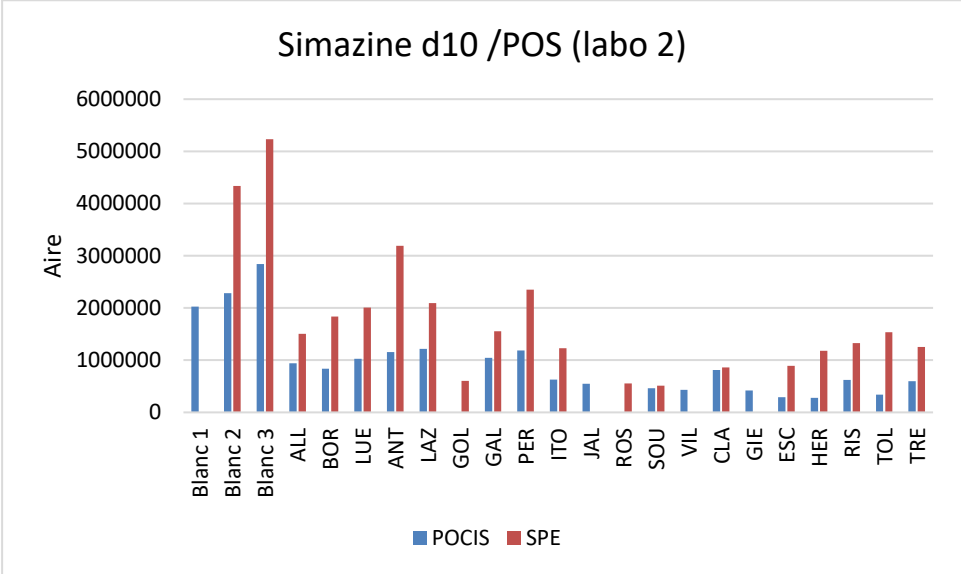
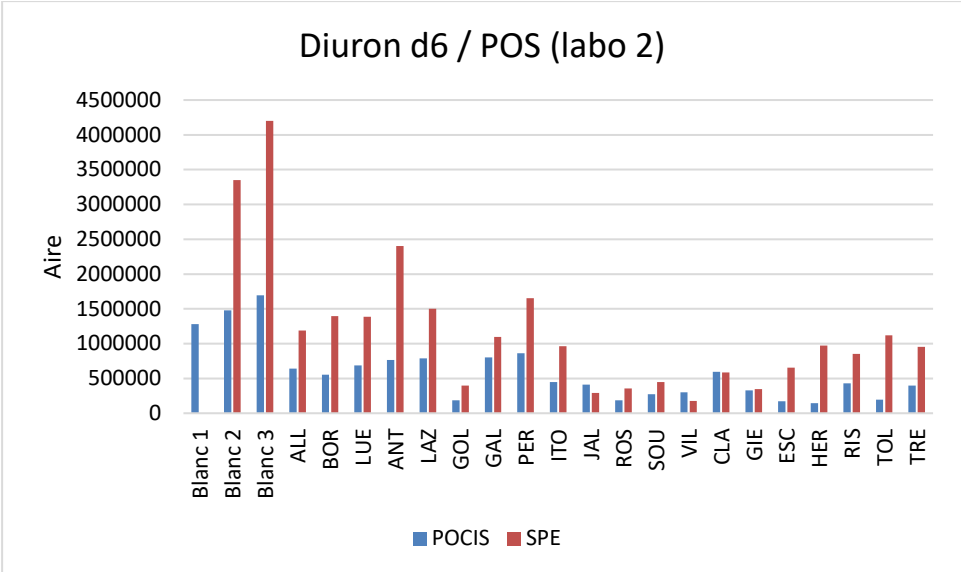


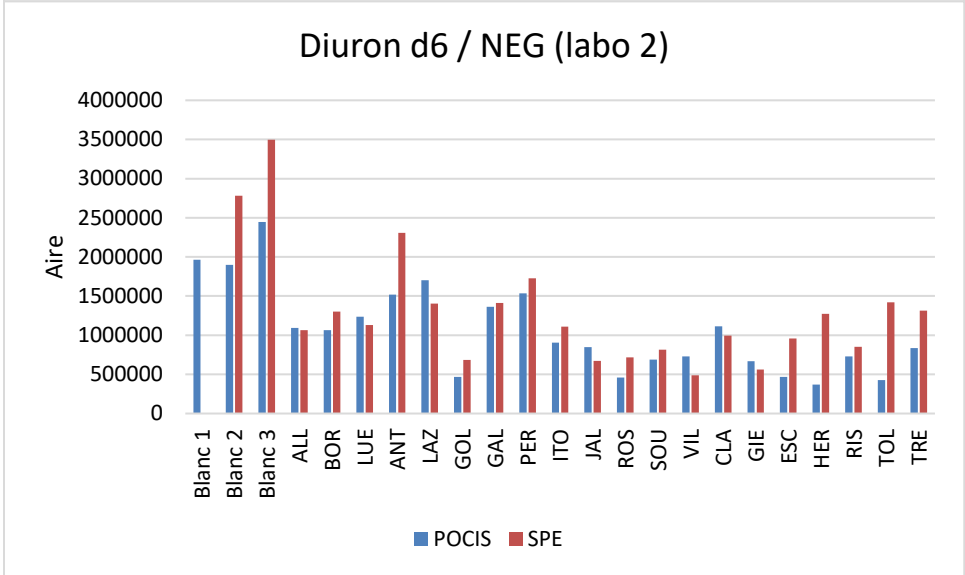
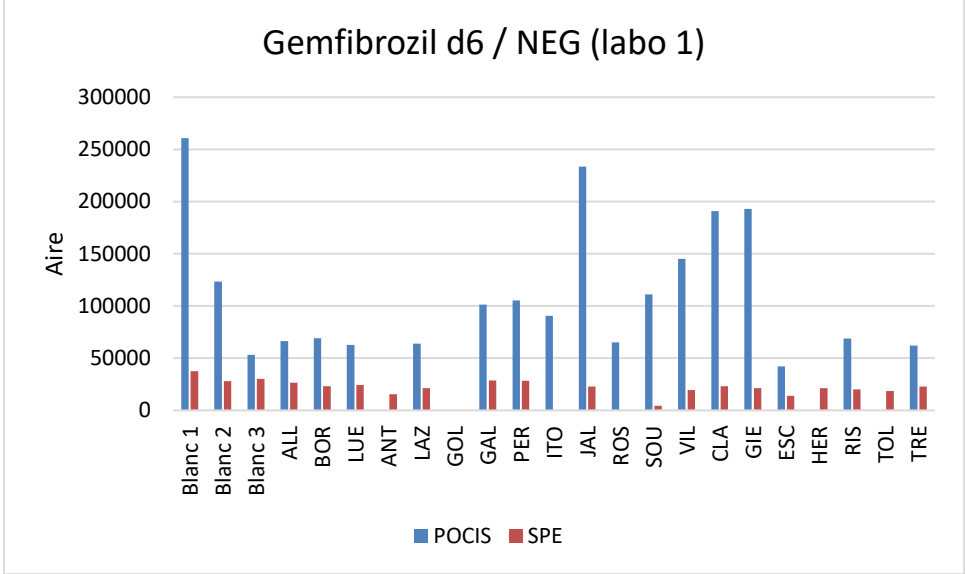
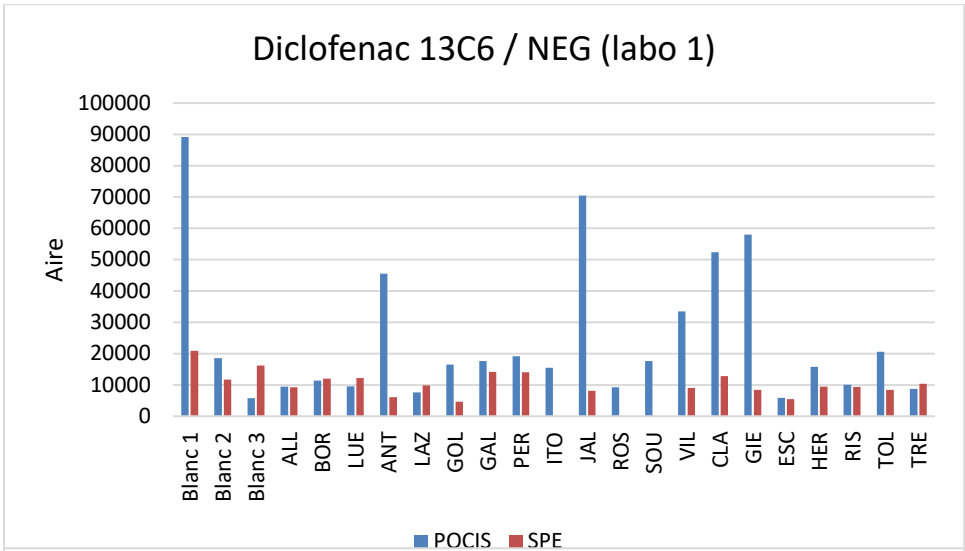


Annexe 4: Suivi de traceurs d'injection dans les blancs laboratoires et les échantillons d'eau et de POCIS









Annexe 5 : Variation des temps de rétention pour 5 traceurs d'extraction

Mode positif

Atenolol D7	Laboratoire 1	Laboratoire 2	Laboratoire 3
Moyenne	2,779	8,305	4,415
Ecart type	0,009	0,034	0,008
RSD	0,34%	0,41%	0,19%
Min	2,76	8,22	4,40
Max	2,80	8,38	4,43

Imidaclopride D4	Laboratoire 1	Laboratoire 2	Laboratoire 3
Moyenne	5,353	8,564	6,535
Ecart type	0,004	0,010	0,005
RSD	0,08%	0,12%	0,08%
Min	5,35	8,55	6,53
Max	5,36	8,58	6,54

Oxazepam d5	Laboratoire 1	Laboratoire 2	Laboratoire 3
Moyenne	8,181	10,604	8,474
Ecart type	0,005	0,008	0,005
RSD	0,07%	0,08%	0,06%
Min	8,17	10,59	8,47
Max	8,19	10,62	8,48

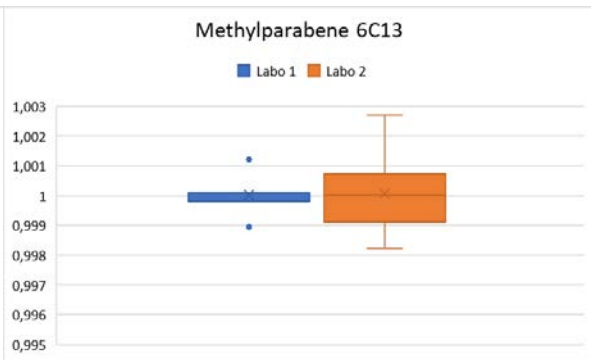
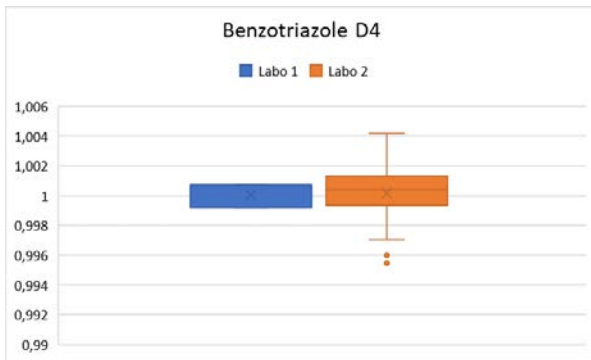
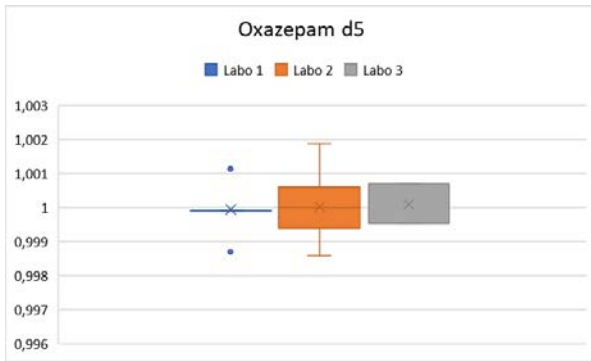
Mode négatif

Benzotriazole D4	Laboratoire 1	Laboratoire 2
Moyenne	8,869	7,458
Ecart type	0,007	0,014
RSD	0,07%	0,19%
Min	8,86	7,42
Max	8,88	7,49

Methylparabene 6C13	Laboratoire 1	Laboratoire 2
Moyenne	6,505	9,146
Ecart type	0,005	0,010
RSD	0,08%	0,11%
Min	6,50	9,13
Max	6,51	9,17

Boîte à moustache des temps de rétention normalisés par rapport à la moyenne des temps de rétention respectifs (l'influence des temps de rétention pouvant être considérée comme uniforme par rapport à la durée de l'analyse (et non proportionnelle au temps), cette représentation a cependant tendance, de manière relative, à maximiser les écarts pour les temps de rétention les plus faibles et à les minimiser pour les plus importants).





Annexe 6 : Variation des m/z pour l'ion moléculaire monoisotopique de 5 traceurs d'extraction

Mode positif

Atenolol D7	Laboratoire 1	Laboratoire 2	Laboratoire 3	Valeur théorique
Moyenne	274,2122	274,2135	274,2146	274,2143
Ecart type	0,0020	0,0009	0,0004	
Min	274,2096	274,2118	274,2132	
Max	274,2148	274,2152	274,2152	

Imidaclopride D4	Laboratoire 1	Laboratoire 2	Laboratoire 3	Valeur théorique
Moyenne	260,0828	260,0849	260,0851	260,0847
Ecart type	0,0023	0,0012	0,0007	
Min	260,0799	260,0823	260,0836	
Max	260,0862	260,0869	260,0861	

Oxazepam d5	Laboratoire 1	Laboratoire 2	Laboratoire 3	Valeur théorique
Moyenne	292,0877	292,0891	292,0902	292,0896
Ecart type	0,0021	0,0008	0,0011	
Min	292,0852	292,0871	292,0870	
Max	292,0905	292,0903	292,0918	

Mode négatif

Benzotriazole D4	Laboratoire 1	Laboratoire 2	Valeur théorique
Moyenne	122,0657	122,0663	122,0662

Ecart type	0,0002	0,0001
Min	122,0652	122,0661
Max	122,0661	122,0665

Methylparabene 6C13	Laboratoire 1	Laboratoire 2	Valeur théorique
Moyenne	157,0598	157,0604	157,0602
Ecart type	0,0002	0,0003	
Min	157,0593	157,0600	
Max	157,0604	157,0608	

Mêmes valeurs mais exprimées en ppm par rapport à la valeur théorique

Mode positif

Atenolol D7	Laboratoire 1	Laboratoire 2	Laboratoire 3
Moyenne	-7,74	-2,79	0,97
Min	-17,14	-9,12	-4,01
Max	1,82	3,28	3,28

Imidaclopride D4	Laboratoire 1	Laboratoire 2	Laboratoire 3
Moyenne	-7,36	0,70	1,47
Min	-18,46	-9,23	-4,23
Max	5,77	8,46	5,38

Oxazepam d5	Laboratoire 1	Laboratoire 2	Laboratoire 3
--------------------	---------------	---------------	---------------

Moyenne	-6,58	-1,70	1,98
Min	-15,06	-8,56	-8,90
Max	3,08	2,40	7,53

Mode négatif

Benzotriazole D4	Laboratoire 1	Laboratoire 2
Moyenne	-4,08	1,09
Min	-8,19	-0,82
Max	-0,82	2,46

Methylparabene 6C13	Laboratoire 1	Laboratoire 2
Moyenne	-2,40	1,16
Min	-5,73	-1,27
Max	1,27	3,82

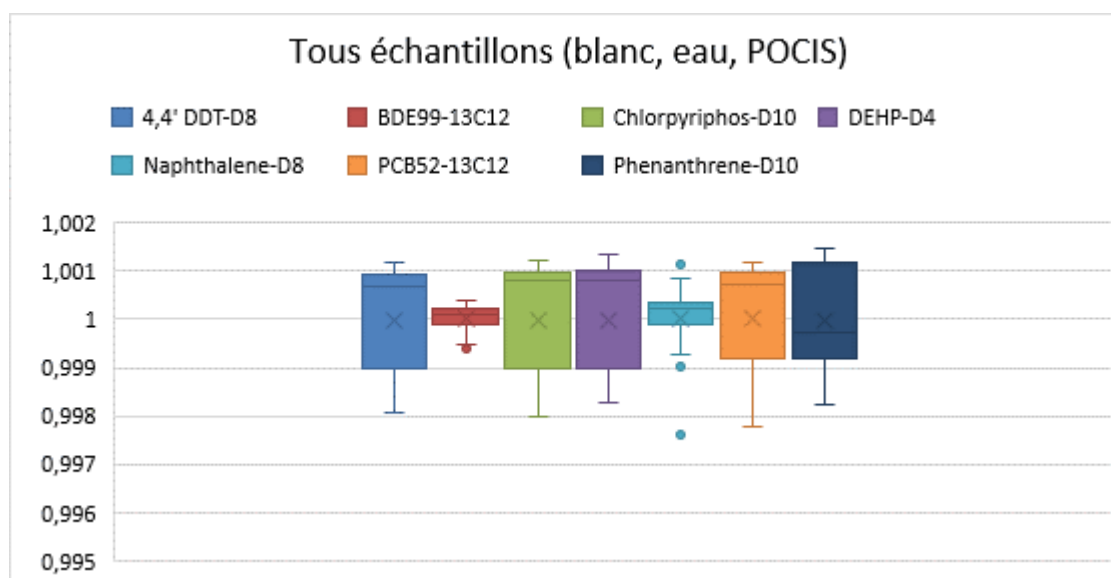
Annexe 7 : Variation des temps de rétention pour les étalons internes en GC-HRMS

Performances en termes de temps de rétention en considérant la totalité des échantillons

	4,4' DDT-D8	BDE99-13C12	Chlorpyriphos-D10	DEHP-D4	Naphthalene-D8	PCB52-13C12	Phenanthrene-D10
Moyenne	24,10	27,47	20,77	25,54	11,12	20,41	18,73
Ecart type	0,025	0,008	0,024	0,028	0,008	0,022	0,020
RSD	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Min	24,05	27,46	20,73	25,50	11,10	20,37	18,70
Max	24,13	27,48	20,79	25,58	11,14	20,44	18,76

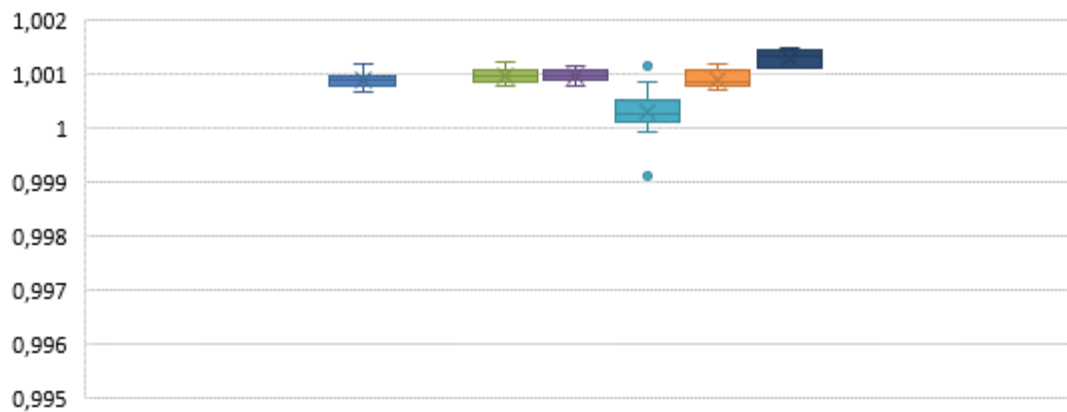
Boîte à moustache des temps de rétention normalisés par rapport à la moyenne des temps de rétention respectifs des substances suivies

sous forme de boîte à moustache normalisée par rapport à la moyenne de tous les échantillons avec l'un la totalité des échantillons et l'autre uniquement les échantillons de POCIS (2eme séquence uniquement)



Echantillons de POCIS

- 4,4' DDT-D8
- BDE99-13C12
- Chlorpyriphos-D10
- DEHP-D4
- Naphthalene-D8
- PCB52-13C12
- Phenanthrene-D10

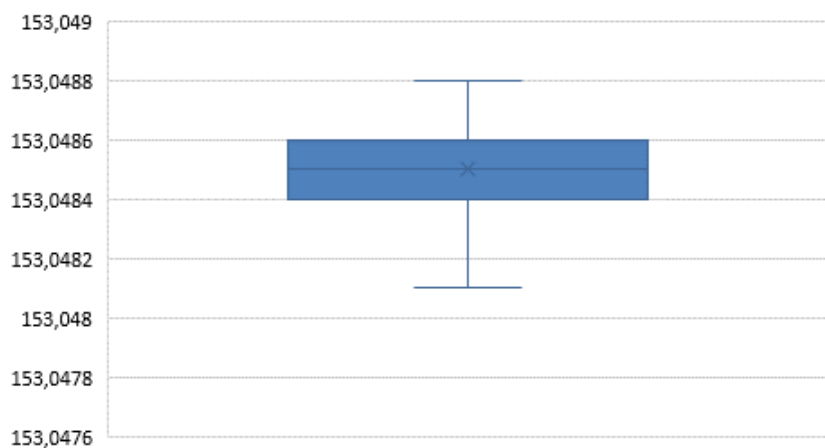


Annexe 8 : Variation des m/z pour l'ion de base des étalons internes par GC-HRMS pour la totalité des échantillons (blanc laboratoire, eau, POCIS)

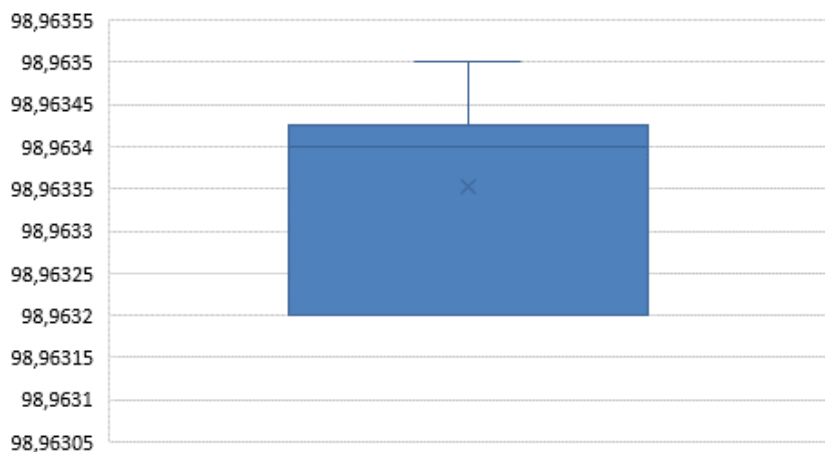
	4,4' DDT-D8	BDE99-13C12	Chlorpyriphos-D10	DEHP-D4	Naphthalene-D8	PCB52-13C12	Phenanthrene-D10
Moyenne	243,0577	415,8264	98,9633	153,0485	136,1122	303,9592	188,1404
Ecart type	0,0002	0,0002	0,0001	0,0002	0,0001	0,0002	0,0001
RSD	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Min	243,0573	415,8259	98,9632	153,0481	136,1120	303,9584	188,1402
Max	243,0583	415,8268	98,9635	153,0488	136,1123	303,9596	188,1407

Boîte à moustache pour la totalité des échantillons sur l'ion de base

DEHP d4 / GCHRMS



Chlorpyrifos d10 / GCHRMS





Centre scientifique et technique
Direction Eau, Environnement, Procédés et Analyses (DEPA)
3, avenue Claude-Guillemin
BP 36009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34
www.brgm.fr