# Application de l'analyse métabolomique à la détection ciblée et globale de contaminants organiques dans des matrices agroalimentaires et environnementales par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution

Jérôme Cotton

▶ **To cite this version:**

Jérôme Cotton. Application de l'analyse métabolomique à la détection ciblée et globale de contaminants organiques dans des matrices agroalimentaires et environnementales par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066094 . tel-01166031

**HAL Id: tel-01166031**

**https://theses.hal.science/tel-01166031**

Submitted on 22 Jun 2015

**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.

**UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**
**PARIS 6**

***Ecole doctorale Complexité du Vivant***

**THÈSE DE DOCTORAT**

Spécialité
**CHIMIE ANALYTIQUE**

Présentée par
**Jérôme Cotton**

Pour obtenir le grade de
**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS 6**

# Application de l'analyse métabolomique à la détection ciblée et globale de contaminants organiques dans des matrices agroalimentaires et environnementales par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution

Soutenue le 08 janvier 2015

Devant un jury composé de :

| | |
|---|---|
| Dr. Christophe Junot | Directeur de thèse |
| Pr. Bruno Le Bizec | Rapporteur |
| Pr. Damià Barceló | Rapporteur |
| Pr. Philippe Schmitt-Kopplin | Examinateur |
| Pr. Germain Trugnan | Examinateur |
| Pr. Jean-Claude Tabet | Membre invité |
| Dr. Céline Ducruix | Membre invité |

*« La science a la chance et la modestie de savoir qu'elle est dans le provisoire, de déplacer les frontières de l'inconnu et d'avancer. »*

Marc Augé

# *REMERCIEMENTS*

Ce travail de thèse a été réalisé au CEA de Saclay, au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunologie, dans le laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments en collaboration avec la société Profilomic. Je souhaite donc remercier en premier lieu le Dr. Christophe CREMINON, chef du service, le Dr. Christophe JUNOT, chef du laboratoire et le Dr. Bruno CORMAN, PDG de Profilomic de m'avoir accueilli au sein de leurs équipes.

Je remercie la société Profilomic et l'Association Nationale de Recherche et Technologie d'avoir financé ce travail de thèse.

Je remercie sincèrement le Dr. Christophe JUNOT d'avoir dirigé mes travaux de thèse durant ces 3 années. Son aide, sa clairvoyance et ses bons conseils ont été des atouts précieux. J'adresse mes remerciements au Dr. Geoffrey MADALINSKI, au Dr. Victor SABARLY et au Dr. Céline DUCRUIX pour avoir encadré une partie des mes travaux de recherche. Je tiens également à remercier le Pr. Jean-Claude TABET pour son aide précieuse, sa disponibilité, sa gentillesse et pour avoir accepté de siéger au jury de thèse.

Ce travail a été réalisé grâce à la participation active d'une équipe formidable et soudée au sein de la société Profilomic. Je remercie donc très chaleureusement Fanny LEROUX, Simon BROUDIN Stéphanie OURSEL, et Marion POIREL pour leurs aides inestimables, leur disponiblité, leur gentillesse et leur (très) bonne humeur. Je remercie également Denis DESOUBZDANNE et Alexandre SEYER pour leurs précieux conseils.

Ce travail est aussi l'aboutissement de nombreuses collaborations, j'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui y ont participé et plus particulièrement au Dr. Eric LECLERC, au Dr. Natacha LENUZZA et au Dr. Michèle LEES.

Je tiens à exprimer mon profond respect au Pr. Bruno LE BIZEC et au Pr. Damià BARCELÓ pour avoir accepté de juger ce travail. J'associe mes remerciements au Pr. Germain TRUGNAN ainsi qu'au Pr. Philippe SCHMITT-KOPPLIN pour avoir accepté de siéger à ce jury de thèse.

J’exprime ma gratitude à Anna WARNET pour m’avoir aidé à trouver ma voie.

Je souhaite remercier chaleureusement l’ensemble du personnel du batiment 136 pour son accueil chaleureux et sa disponibilité.

Enfin, je remercie ma famille, ma compagne, mes amis et mes proches pour leur soutien indéfectible et je dédie ce travail à mon grand père disparu durant cette thèse.

# *PREAMBULE*

Les molécules organiques telles que les pesticides, les médicaments ou les produits industriels et domestiques polluent l'ensemble des écosystèmes de notre planète. Ces molécules créées et utilisées par l'homme sont disséminées par les industries, l'agriculture intensive ou lors des traitements médicamenteux des hommes et des animaux. Leurs effets sur l'environnement et l'homme sont désormais avérés bien qu'encore mal connus. Pour détecter les xénobiotiques, la spectrométrie de masse en tandem sur des appareils de type triple quadripôle en mode MRM est classiquement utilisée. Cette technologie facile d'utilisation est reconnue comme la référence en matière d'analyse de polluants en raison de sa spécificité et de sa sensibilité. Cependant, cette technique se restreint à une liste préétablie de substances à rechercher *a priori*. Ce manque d'exhaustivité est un problème car de nombreux métabolites sont générés à partir des molécules polluantes dans l'environnement au cours de transformations abiotiques ou biologiques.

L'analyse métabolomique est un savoir-faire développé au sein du Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments (LEMM). Elle permet l'analyse d'un grand nombre de molécules organiques de petites tailles et inférieures à 1500 u tels que les xénobiotiques, à partir d'une empreinte chimique globale acquise par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution et d'outils bioinformatiques de fouille de données. Ce type d'approche globale pourrait donc permettre d'apporter une réponse au manque d'exhaustivité des analyses conventionnelles.

Dans ce contexte, le principal objectif de mes travaux de thèse a été de développer des approches analytiques basées sur l'analyse métabolomique pour la caractérisation chimique de produits agro-alimentaires et environnementaux en matière de pollution et d'adultération. Le but est de démontrer la polyvalence de l'approche non seulement pour la recherche de polluants ciblés mais aussi de xénobiotiques inconnus ou non suspectés. Ces travaux de thèse ont été financés par la société Profilomic, une société issue du savoir faire du LEMM au CEA de Saclay et par l'Association Nationale de Recherche de Technologies (ANRT), dans le cadre d'un contrat doctorale CIFRE.

Notre manuscrit de thèse débutera par une introduction dans laquelle seront présentés les différents types de pollution, leurs origines, leurs conséquences sur l'environnement et l'homme, les moyens d'encadrement réglementaire et les techniques de détection utilisées. Nous présenterons ensuite notre démarche et les résultats que nous avons obtenus dans le

cadre d'expériences de preuve de concept visant à démontrer l'intérêt des analyses globales par spectrométrie de masse à haute résolution pour une caractérisation plus fine et plus complète des matrices agro-alimentaires et environnementales en matière de pollution et d'adultération. Nous détaillerons ensuite le développement et la validation d'une méthode multi-résidus permettant l'analyse 539 xénobiotiques en 36 minutes dans l'eau. Enfin, une application de cette méthode sur 26 eaux de la région parisienne sera présentée.

# *SOMMAIRE*

**REMERCIEMENTS** ..... **I**

**PREAMBULE** ..... **III**

**SOMMAIRE** ..... **V**

**LISTE DES FIGURES, TABLES ET EQUATIONS** ..... **IX**

**LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES** ..... **XXI**

**CHAPITRE I. PROBLEMATIQUE ET ETAT DE L'ART** ..... **1**

**I. LA POLLUTION : DEFINITION, CLASSIFICATION ET ORIGINE** ..... **3**

I.1. Définition et classification des polluants ..... 3

I.1.1. Définition d'un polluant ..... 3

I.1.2. Les différents types de polluants chimiques organiques ..... 3

I.2. Origine des polluants dans l'environnement et voies d'exposition ..... 8

I.2.1. La production (activité industrielle) ..... 9

I.2.2. L'utilisation ..... 9

**II. LA POLLUTION : CONSEQUENCES CONNUES ET MOYENS D'ENCADREMENT** ..... **19**

II.1. Conséquences connues sur la biodiversité environnementale ..... 19

II.1.1. Généralités ..... 19

II.1.2. Impact des pesticides ..... 19

II.1.3. Impact des médicaments ..... 25

II.2. Conséquences connues sur l'Homme ..... 26

II.2.1. Effets des pesticides sur l'Homme ..... 26

II.2.2. Effets des résidus médicamenteux sur l'homme ..... 37

II.3. Réglementation ..... 44

II.3.1. Au niveau mondial ..... 44

II.3.2. Au niveau européen et national ..... 45

**III. LA POLLUTION : COMMENT LA DETECTER ?** ..... **51**

III.1. Historique ..... 51

III.2. Les moyens de détection : classification et utilisation ..... 52

III.2.1. Techniques de détection sans couplage préalable ..... 53

III.2.2. Techniques de détection avec couplage chromatographique ..... 54

III.3. La spectrométrie de masse ..... 59

III.3.1. Principe général ..... 59

III.3.2. Les sources d'ionisation ..... 60

III.3.3. Les analyseurs ..... 62

III.4. Le système introductif ..... 66

III.4.1. Introduction directe en spectrométrie de masse ..... 66
III.4.2. Couplage de la chromatographie et de la spectrométrie de masse ..... 67
III.5. Préparation d'échantillon ..... 76
III.5.1. La préparation d'échantillon liquide ..... 77
III.5.2. La préparation d'échantillon solide ..... 79
III.5.3. La préparation d'échantillon de type QuEChERS ..... 80
**IV. APPORT DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A HAUTE RESOLUTION ET DE L'ANALYSE METABOLOMIQUE A L'ANALYSE DE POLLUANTS DANS LES MATRICES AGROALIMENTAIRES ET ENVIRONNEMENTALES ..... 84**
IV.1. Introduction ..... 84
IV.2. Le problème des métabolites ..... 84
IV.3. Apport de la spectrométrie de masse à haute résolution pour la recherche de composés innatendus ou inconnus ..... 87
IV.4. La métabolomique ..... 90
IV.4.1. Principe général ..... 90
IV.4.2. Le traitement des données ..... 91
IV.4.3. La normalisation ..... 93
IV.4.4. Les analyses statistiques ..... 96
IV.4.5. L'annotation ..... 99
**V. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE ..... 102**
**CHAPITRE II. UTILISATION DE L'ANALYSE METABOLOMIQUE POUR LA DETECTION DE POLLUANTS : EXPERIENCES DE PREUVE DE CONCEPT ..... 104**
**I. INTRODUCTION ..... 105**
**II. LE MIEL : PREMIERE PREUVE DE CONCEPT ..... 106**
II.1. Introduction ..... 106
II.2. Matériel et Méthodes ..... 110
II.2.1. Produits chimiques et réactifs ..... 110
II.2.2. Préparation des solutions de travail ..... 110
II.2.3. Echantillons de miels ..... 110
II.2.4. Préparation des échantillons ..... 111
II.2.5. Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ..... 111
II.3. Traitement des données ..... 113
II.3.1. Traitement de données pour l'analyse ciblée ..... 113
II.3.2. Traitement de données pour l'analyse non ciblée ..... 113
II.3.3. Identification des xénobiotiques chlorés dans les échantillons de miel ..... 114
II.3.4. Analyses statistiques ..... 114
II.4. Résultats et discussion ..... 115

II.4.1. Détection de polluants par approche ciblée dans le miel ..... 115
II.4.2. Analyses globales réalisées à partir des empreintes LC-HRMS ..... 138
II.5. Conclusion ..... 154
**III. L'ANALYSE DE L'EAU ISSUE DE PUITS DE CAPTAGE : DEUXIEME PREUVE DE CONCEPT 156**
III.1. Introduction ..... 156
III.2. Matériel et Méthodes ..... 158
III.2.1. Produits chimiques et réactifs ..... 158
III.2.2. Préparation des solutions de travail ..... 159
III.2.3. Sélection et prélèvement de l'eau issue des puits de captage ..... 159
III.2.4. Préparation des échantillons ..... 159
III.2.5. Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ..... 161
III.2.6. Traitement des données ..... 163
III.3. Résultats et discussion ..... 164
III.3.1. Détection des polluants dans les puits de captage ..... 164
III.3.2. Comparaison entre l'analyse métabolomique et les analyses conventionnelles ..... 174
III.3.3. Analyses statistiques univariées ..... 177
III.3.4. Analyse en composantes principales ..... 184
III.4. Conclusion ..... 185
**IV. BILAN DES ETUDES DE PREUVE DE CONCEPT ..... 187**
**CHAPITRE III. DEVELOPPEMENT D'UNE ANALYSE CIBLEE A LARGE SPECTRE DANS L'EAU ..... 189**
**I. INTRODUCTION ..... 191**
I.1. Contexte ..... 191
I.2. Objectifs du projet Agrifood GPS ..... 192
I.3. Organisation du projet ..... 193
I.4. Etat de l'art ..... 194
I.5. Objectifs du développement ..... 197
**II. MATERIEL ET METHODES ..... 197**
II.1.1. Produits chimiques et réactifs ..... 197
II.1.2. Préparation des solutions de travail ..... 198
II.1.3. Les échantillons d'eau ..... 199
II.1.4. Préparation des échantillons ..... 199
II.1.5. Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ..... 199
II.2. Traitement des données ..... 201
II.2.1. Traitement des fichiers FIA et recherche des temps de rétention ..... 201
II.2.2. Optimisation chromatographique ..... 202
II.2.3. Outils et critères d'identification pour l'analyse ciblée ..... 202
**III. RESULTATS ET DISCUSSION ..... 203**
III.1. Constitution de la base de données ..... 203

III.1.1. Choix des polluants ..... 203
III.1.2. Réalisation des solutions de travail ..... 205
III.1.3. Caractérisation MS ..... 205
III.1.4. Réalisation d'une banque de données MS/MS ..... 212
III.2. Optimisation des conditions d'analyse SPE en ligne et d'UHPLC ..... 215
III.2.1. Optimisation de la chromatographie liquide ..... 215
III.2.2. Optimisation de la préconcentration en ligne ..... 222
III.2.3. Validation des recherches effectuées avec l'outil MethodComparator et confirmation des temps de rétention sur le système analytique HSS T3 – pH 2,5 ..... 225
III.3. Validation ..... 229
III.3.1. Etude de la spécificité de la méthode analytique développée ..... 230
III.3.2. Fidélité inter- et intra-jour ..... 233
III.3.3. Linéarité et limites de détection (LOD) ..... 234
III.3.4. Etude du facteur de concentration de l'étape SPE ..... 236
III.3.5. Effet matrice sur 3 concentrations ..... 237
III.3.6. Effet mémoire et plan d'expérience ..... 240
III.3.7. Bilan de la validation ..... 242
III.4. Application de la méthode ..... 242
III.4.1. Méthodologie ..... 242
III.4.2. Résultats ..... 245
III.5. Conclusion ..... 248
**CHAPITRE IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... 251**
**ANNEXES ..... 259**
**I. ANNEXE 1 : CLASSIFICATION DES MEDICAMENTS ..... 260**
**II. ANNEXE 2 : SPECTROMETRIE DE MASSE RAPPEL THEORIQUES ..... 262**
**III. ANNEXE 3 : RAPPELS THEORIQUES SUR LA CHROMATOGRAPHIE ..... 295**
**IV. ANNEXE 4 : LES TECHNIQUES DE PREPARATION D'ECHANTILLON ..... 299**
**V. ANNEXE 5 : PRINCIPE GENERAL DU FONCTIONNEMENT DU LOGICIEL XCMS ..... 311**
**VI. ANNEXE 6 : TABLEAU DES 817 MOLECULES SELECTIONNEES DANS LE CADRE DE LA COLLECTE 1 DU PROJET AGRIFOOD ..... 321**
**PRODUCTION SCIENTIFIQUE ..... 341**
**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 343**
**PUBLICATIONS ..... 377**

# *LISTE DES FIGURES, TABLES ET EQUATIONS*

## ***Figures***

Figure 1 : Classification des produits phytosanitaires, pesticides et biocides (Adapté du travail de Lamiot [5]) ..... 4
Figure 2 : Pourcentage et type de pesticides utilisés en France en fonction du domaine d'application (Sur la base des statistiques réalisées pour un rapport d'office parlementaire en 2001 [19]) ..... 10
Figure 3 : Rampe de pulvérisation de pesticides montée sur un tracteur [20] ..... 11
Figure 4 : Pulvérisation de pesticides sur un champ de maïs par avion [21] ..... 11
Figure 5 : Phénomènes de pollution de l'environnement aux biocides pulvérisés (Adapté depuis CPP-Corpen [27]) ..... 13
Figure 6 : Caricature de l'origine des médicaments dans l'eau [31] ..... 14
Figure 7 : Cycle des médicaments dans l'eau et voie d'exposition (Adapté de la publication de Mompelat et coll., 2009 [35]) ..... 16
Figure 8 : Voies d'exposition de l'Homme aux substances polluantes (Adapté du rapport de l'OMS, 1990 [40]) ..... 18
Figure 9 : Groupes de population à risque liés à l'exposition des pesticides (Adapté du rapport de l'OMS, 1990 [40]) ..... 27
Figure 10 : relations entre les différents réservoirs de foyers d'antibiorésistances (Adapté de la publication de Moubarek et coll. [153]) ..... 41
Figure 11 : Nombre de publications en fonction des différentes techniques d'analyse des pesticides (chiffre recueillis sur PubMed en juillet 2014) ..... 59
Figure 12 : Schéma de présentation générale d'un système analytique basé sur la spectrométrie de masse (adapté de la publication de Boudah et coll. [207]) ..... 60
Figure 13 : Types de méthodes chromatographiques [286] ..... 67
Figure 14 : Exemples de molécules analysables par GC ..... 68
Figure 15 : Distribution pour chaque technique des limites de quantification (LOQ) pour tous les pesticides et métabolites (tiré de la publication de Alder et coll [312] ..... 73
Figure 16 : Comparaison des sensibilités pour la GC-MS et la LC-MS/MS de chaque pesticide en fonction des différentes classes (tiré de la publication de Alder et coll. [312]) ..... 74

Figure 17 : Illustration d'une séparation d'énantiomères et de diastéréoisomères par électrophorèse capillaire (Adapté de la publication de Garisson et coll. [316]) ..... 75
Figure 18 : Principe de l'électrophorèse capillaire de zone [317] ..... 76
Figure 19 : Distribution du nombre de publications en fonction du type de technique (SPME, SPE et LLE) utilisée pour la préparation d'échantillons liquides ..... 78
Figure 20 : Principe générale de la méthode QuEChERS (Adapté du site internet SeparationScience [324]) ..... 81
Figure 21 : Effet de l'emploi croissant de GCB sur un extrait QuEChERS d'épinard (Illustration tirée de la plaquette commerciale Waters) ..... 82
Figure 22 : Exemple de transformations des pesticides dans l'environnement (Adaptée de la publication de Fenner et coll. [341]) ..... 86
Figure 23 : Procédure proposée par Krauss et coll. pour la recherche successive de composés ciblés, non suspectés et inconnus dans une empreinte HRMS [352] ..... 88
Figure 24 : Processus d'une analyse métabolomique par spectrométrie de masse haute résolution (Tirée de la publication de Roux et coll. [366]) ..... 91
Figure 25 : Stratégie de traitement des données mise en œuvre par XCMS (Adapté de la publication de Smith et coll. [368]) ..... 93
Figure 26 : Evolution des intensités des molécules DDC et Olsalazine selon l'ordre de passage au cours d'une analyse de type métabolomique ..... 94
Figure 27 : Evolution des intensités lissées des molécules de DDC et Olsalazine selon l'ordre de passage au cours de l'analyse métabolomique après normalisation LOESS ..... 95
Figure 28 : Représentation graphique d'une ACP ou d'une PLS-DA (adaptée de Roux et coll. [366]) ..... 98
Figure 29 : Redondance du signal en ESI-MS [207] ..... 99
Figure 30 : Exemple de métabolite formellement identifié selon les recommandations du CAWG ..... 101
Figure 31 : Evolution de la production et de la consommation de miel en France en tonnes/an sur la période 1990-2013 (Adapté des données 2014 du Planetoscope [404]) ..... 108
Figure 32 : Spectre de masse Electrospray de la molécule carbaryl, enregistré en mode d'ionisation positive. ..... 117
Figure 33 : Spectre de masse Electrospray de la molécule amitraz, enregistré en mode d'ionisation positive. ..... 121
Figure 34 : Distribution des logP des molécules retenues pour l'analyse ciblée des échantillons de miel (obtenus sur Chemicalize [418]) ..... 122

Figure 35 : Chromatogramme illustrant la séparation de la sulfamethoxypyridazine et de la sulfamonomethoxine, deux molécules isomères ..... 123
Figure 36 : Chromatogramme illustrant la séparation chromatographique de 40 parmi les 83 composés de référence analysés en utilisant la Xterra C18 avec une détection en mode d'ionisation positive ..... 124
Figure 37 : Corrélation entre le logP des molécules d'intérêts et leurs temps de rétention obtenus sur la colonne Xterra C18 ..... 125
Figure 38 : Représentation schématique de la préparation des 24 extractions par solvant .... 126
Figure 39 : Rendement d'extraction (%) pour les trois solvants testés pour chaque molécule sur la base de 24 extractions par solvant ..... 127
Figure 40 : Coefficient de variation (%) pour les trois solvants testés pour chaque molécule sur la base de 24 extractions ..... 128
Figure 41 : Résultat de l'extraction liquide-liquide obtenue à partir d'un mélange d'eau, de miel et d'acétonitrile (sans ajout de sels) ..... 129
Figure 42 : Evaluation de l'effet matrice (%) sur les 83 molécules ciblées ..... 130
Figure 43 : Représentation schématique du protocole optimisé pour la préparation d'échantillon de miel ..... 130
Figure 44 : Identification du boscalid dans un échantillon de miel ..... 135
Figure 45 : Histogramme représentant le nombre de molécules retrouvés dans les miels ..... 136
Figure 46 : Représentation du nombre de miels dans lequel chaque molécule a été retrouvée ..... 137
Figure 47 : Illustration du Varroa Destructor, parasite des abeilles (sur les larves ou les abeilles) ..... 137
Figure 48 : Illustration du fonctionnement de l'algorithme pour la recherche automatique de xénobiotiques chlorés dans la table de pics XCMS ..... 140
Figure 49 : Identification du 2,6-dichlorobenzamide dans le miel de lavande n°63 (extraction réalisée : $[M+H]^+$ à *m/z* 189,9821 +/- 8 ppm) ..... 143
Figure 50 : ACP sur les échantillons de miels (hors eucalyptus) ..... 144
Figure 51 : PLS-DA sur les échantillons de miels (hors eucalyptus) ..... 145
Figure 52 : Modèle de validation du modèle PLS-DA par des tests de permutations ..... 145
Figure 53 : Boîtes à moustaches des six variables parmi les plus significatives de la PLS-DA ..... 147
Figure 54 : Spectres CID enregistrés en mode HCD à deux énergies de collision : (a) 20 % et (b) 40 % en énergie de collision normalisée de la variable X84952 protoné et annotée comme correspondant à la lunarine ..... 148

Figure 55 : Proposition d'un mécanisme complet de la fragmentation de la lunarine..... 149
Figure 56 : ACP sur les échantillons de miels (hors eucalyptus) avec la nouvelle table de pics filtrée ..... 150
Figure 57 : Exemple de la confirmation de la Naringine grâce à la MS/MS ..... 151
Figure 58 : Exemple de la confirmation de la Coumarine grâce à la MS/MS ..... 151
Figure 59 : Boîtes des moustaches des 8 variables les plus discriminantes pour la caractérisation des miels monofloraux ..... 152
Figure 60 : PLS-DA réalisée sur la base des 8 variables discriminant l'origine botanique des miels dont les miels monofloraux ..... 153
Figure 61 : Répartition géographique des captages d'eaux souterraines gérés par la société SAUR [435] ..... 157
Figure 62 : Protocole SPE de préparation des échantillons de la SAUR ..... 160
Figure 63 : Schéma récapitulatif de la méthodologie mise en œuvre pour sélectionner le groupe de captages [435] ..... 166
Figure 64 : Exemple d'une eau polluée à l'atrazine dans le puits de captage B ..... 170
Figure 65 : Fréquences d'apparition des 51 polluants parmi les 45 analyses effectuées. ..... 172
Figure 66 : Diagramme de Venn présentant l'occurrence des 51 polluants lors des 3 campagnes de prélèvement ..... 172
Figure 67 : Nombre de polluants détectés au moins une fois par puits de captage ..... 173
Figure 68 : Nombre de polluants détectés au moins une fois selon chaque méthode d'analyse parmi les 37 polluants recherchés en commun ..... 175
Figure 69 : Concentration totale en pesticides par captage et par campagne ..... 176
Figure 70 : Concentration totale en produits pharmaceutiques par captage et par campagne 177
Figure 71 : Exemple de molécules impactées par la densité de la population ..... 179
Figure 72 : Exemple de molécules influencées par le type géologique de nappe ..... 180
Figure 73 : Fréquence d'apparition des polluants en fonction du type d'activité corrélé aux familles chimiques observées ..... 181
Figure 74 : Fréquence d'apparition des polluants en fonction de la position géographique corrélée aux familles chimiques observées ..... 183
Figure 75 : ACP des 45 analyses et colorées en fonction de leur position géographique ..... 185
Figure 76 : Les enjeux du projet Agrifood GPS ..... 192
Figure 77 : Répartition du projet AgriFood GPS en 7 lots ..... 194
Figure 78 : Répartition des polluants chimiques organiques pour la collecte 1 ..... 204
Figure 79 : Réalisation des solutions de travail pour l'ensemble des molécules ..... 205

Figure 80 : Superposition des spectres MS obtenus en mode d'ionisation positive et négative par FIA du métabolite M01 du Spiromesifen et d'un blanc analytique ..... 207
Figure 81 : Extrait du tableau 1 pour le métabolite M01 du Spiromesifen ..... 207
Figure 82 : Extrait du tableau 2 pour le métabolite M01 du Spiromesifen ..... 208
Figure 83 : Superposition des spectres MS obtenus en mode d'ionisation positive et négative par FIA de la Céfalotine et d'un blanc analytique (les lettres correspondent à des ions qui ont été interprétés à partir des molécules, voir plu bas) ..... 209
Figure 84 : Extrait du tableau 1 pour la Céfalotine ..... 209
Figure 85 : Extrait du tableau 2 pour la molécule Céfalotine ainsi qu'une interprétation proposée entre la nature des fragments et la coupure de liaisons à partir de la structure de la molécule. Interprétation du mode d'ionisation positive en haut et négative en bas. ..... 210
Figure 86 : Diagramme de Venn présentant le mode d'ionisation des 795 molécules ionisables de la collecte 1 du projet AgriFood ..... 211
Figure 87 : Distribution des rapports *m/z* des molécules ionisables en mode positif ..... 211
Figure 88 : Rampe d'activation d'énergies normalisées entre 10 et 80 % sur l'Epiandrosterone (*m/z* 273.2) ..... 213
Figure 89 : Rampe d'activation d'énergies normalisées entre 23 et 35 % sur l'Epiandrosterone (*m/z* 273.2) ..... 214
Figure 90 : Spectre CID du Fenobucarb à 10 % d'énergie d'activation ..... 214
Figure 91 : Capture d'écran du site Chemicalize [418] pour la molécule atrazine ..... 216
Figure 92 : Distribution des logP des 817 molécules de la chimiothèque ..... 217
Figure 93 : Répartition des molécules neutres et ionisées en fonction du pH ..... 218
Figure 94 : Représentation radar des résultats obtenus à partir de MethodComparator pour les colonnes testées à la concentration de 100 ng/mL ..... 221
Figure 95 : Représentation radar des résultats obtenus à partir de MethodComparator pour les colonnes testées à la concentration de 10 ng/mL ..... 221
Figure 96 : Illustration du fonctionnement de la préconcentration en ligne ..... 223
Figure 97 : Représentation radar des résultats obtenus à partir de MethodComparator pour le système analytique Oasis HLB + HSS T3 à la concentration de 100 ng/L ..... 224
Figure 98 : Exemple de confirmation du temps de rétention de la molécule Atrazine ..... 226
Figure 99 : Diagramme de Venn imbriqué présentant le bilan du nombre de molécules à chaque étape de notre développement ..... 227
Figure 100 : Exemple de 3 molécules isomères de la chimiothèque ..... 230

Figure 101 : Séparation chromatographique de 3 isomères de position : la Simazine, la Sébuthylazine-desethyl et la Terbuthylazine-desethyl et confrontation de leur spectre CID obtenu à l'énergie de référence ..... 231
Figure 102 : Cas particuliers de 2 isomères de position de la chimiothèque ..... 232
Figure 103 : Différenciation de 2 isomères de position : le Prometon et le Secbumeton à l'aide des spectres CID des molécules ..... 232
Figure 104 : Répétabilité des 539 molécules de la méthode pour 5 échantillons sur 2 jours. (Jour 1 en noir et Jour 2 en gris) ..... 233
Figure 105 : Fidélité intermédiaire pour le facteur jour des 539 molécules de la méthode sur 10 échantillons ..... 234
Figure 106 : Exemple de linéarité sur 2 molécules : l'atrazine et la tétracycline ..... 235
Figure 107 : Distribution des limites de détection pour les 539 molécules de la méthode .... 236
Figure 108 : Distribution du facteur de concentration de l'étape de SPE sur Oasis HLB des 539 molécules détectées par la méthode développée ..... 237
Figure 109 : Effet matrice pour l'ensemble des couples molécule/matrice en fonction de la concentration ..... 238
Figure 110 : Effet matrice sur les aires obtenues sur chaque molécule pour les 10 eaux du robinet sélectionnées ..... 239
Figure 111 : Plan d'expérience pour l'analyse des échantillons d'eau ..... 241
Figure 112 : Carte de prélèvement des 26 eaux du robinet autour de Paris (GoogleMap) .... 243
Figure 113 : Capture d'écran du logiciel TraceFinder 3.1 ..... 244
Figure 114 : Proposition du logiciel TraceFinder pour l'identification de la molécule ..... 244
Figure 115 : Nombre de molécules détectées en fonction des villes collectées ..... 247
Figure 116 : Schéma d'une source à impact électronique couplée avec la chromatographie gazeuse (Adapté du travail de Gbdivers [482]) ..... 263
Figure 117 : Schéma d'une source d'ionisation chimique couplée à la chromatographie gazeuse (Adapté du travail de Gbdivers [483]) ..... 264
Figure 118 : Structure d'un jet supersonique [286] ..... 266
Figure 119 : Schéma d'une source APCI couplée à la chromatographie liquide (Adapté de la figure de Paul Gates, Université de Bristol, Royaume-Unis [485]) ..... 267
Figure 120 : Principe imagé de la réaction entre les constituants de l'air ionisé et le solvant conduisant à la protonation de l'analyte (Adapté de la figure de Paul Gates, Université de Bristol, Royaume-Unis [485]) ..... 268
Figure 121 : Schéma d'une source APPI couplée à la chromatographie liquide (Adapté de la plaquette commerciale PhotoMate™ Agilent [489]) ..... 269

Figure 122 : Schéma d'une source DART (Adapté de Cody et coll. [220]) ..... 270
Figure 123 : Plaque MALDI utilisé pour la réalisation des dépôts (analyte + matrice) (Adapté d'une plaquette commerciale Andromas [491]) ..... 272
Figure 124 : Schéma d'une source MALDI avec le principe d'ionisation (Adapté du travail de Mikayé [492]) ..... 272
Figure 125 : Schéma de principe d'une source ESI à pression atmosphérique (Adapté de Peptracker™, Université de Dundee, Royaume-Unis [493]) ..... 274
Figure 126 : Représentation schématique du modèle CRM ..... 274
Figure 127 : Représentation schématique du modèle IEM ..... 275
Figure 128 : Schéma d'une source DESI (Adapté d'une image de l'université de Perdue [496]) ..... 276
Figure 129 : Schéma de principe d'un analyseur quadripolaire [499] ..... 277
Figure 130 : Schéma d'un spectromètre de type triple quadripôles [500] ..... 278
Figure 131 : Schéma d'un piège tridimensionnel [501] ..... 279
Figure 132 : Schéma des deux types de pièges 2D à éjection axiale (à gauche) et à éjection radiale (à droite) [505] ..... 281
Figure 133 : Schéma d'un spectromètre de masse à temps de vol (Adapté de la figure de l'Université de Bristol, Royaume Unis [509]) ..... 282
Figure 134 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse de type FT-ICR (Adapté de l'image de Johnson Lab [511]) ..... 284
Figure 135 : Schéma de principe du spectromètre de masse Orbitrap™ (Adapté d'une image de Planète Orbitrap [515]) ..... 285
Figure 136 : Exemple d'affinement des pics *m/z* en fonction de la résolution (données G. Madalinski, LEMM, 2008) ..... 289
Figure 137 : Présentation des différents modes de balayage en MS/MS sur des spectromètres de masse spatiaux (adapté de Domon et coll. [520]) ..... 293
Figure 138 : Schéma d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse [521] ..... 295
Figure 139 : Phase stationnaire dérivée du diméthyl polysiloxane [522] ..... 296
Figure 140 : Phase stationnaire à base de polyéthylène glycol ..... 296
Figure 141 : Courbe de Van Deemter [523] ..... 297
Figure 142 : Schéma simplifié d'un système de chromatographie liquide [524] ..... 298
Figure 143 : Différentes étapes d'une extraction sur phase solide (Illustration tirée du site internet du lsabm [526]) ..... 300
Figure 144 : Représentation du copolymère HLB (Adaptée de la plaquette commerciale Waters HLB [535]) ..... 301

Figure 145 : Schéma présentant la différence des surfaces d'une silice greffée (a) et du PGC (b) [540] ..... 303
Figure 146 : Schéma de principe de l'adsorption sur une fibre SPME (Illustration tirée du site internet schambeck [547])..... 306
Figure 147 : Découpe des tranches de masse par l'algorithme MatchedFilter [570] ..... 312
Figure 148 : Découpe des tranches de masse par l'algorithme centWave [570] ..... 314
Figure 149 : Placement des pics en RT par l'approche MatchedFilter (Adapté de la publication de Smith et coll. [368]) ..... 315
Figure 150 : Placement des pics en RT par l'approche centWave [416] ..... 316
Figure 151 : Courbe de densité des pics d'une tranche de masse dans la dimension chromatographique (Adapté de la publication de Smith et coll. [368])..... 317
Figure 152 : Conversion des données brutes en une table de variables à 2 dimensions..... 319

## ***Tables***

Tableau 1 : Limite maximale de résidus dans les ressources en eau ..... 48
Tableau 2 : Exemples d'études réalisées sur des matrices environnementales et agroalimentaires avec des systèmes analytiques utilisant la spectrométrie de masse ..... 65
Tableau 3 : Table de contingence des pesticides non analysables par GC-MS ou LC-MS/MS en fonction des classes chimiques (tiré de la publication Alder et coll. [312]) ..... 73
Tableau 4 : Etude comparative de méthodologies de traitements d'échantillons pour la détermination de 57 polluants organiques par GC-MS/MS (tiré de la publication de Robles-Molina et coll. [319]) ..... 79
Tableau 5 : Liste des molécules retenues pour l'analyse ciblée incluant les informations collectées lors des expériences de FIA-MS et LC-MS avec un identifiant, le nom de la molécule, la formule brute, l'attribution à une classe de produits, la nature des ions détectés, la masse exacte des ions extraits, le temps de rétention en minute et le logP (coefficient de partage octanol/eau) ..... 120
Tableau 6 : Tableau référençant les informations sur le $R^2$ de la gamme de linéarité, la LOD de notre méthode comparaitivement à la littérature ainsi que la LMR des molécules. ..... 133
Tableau 7 : Liste des xénobiotiques chlorés détectés dans les échantillons de miel ..... 142
Tableau 8 : Liste des variables significatives pour la discrimination des miels multi-fleurs et monofloraux ..... 146
Tableau 9 : Répartition des 337 polluants en 9 catégories ..... 165
Tableau 10 : Captages retenus pour les campagnes et leurs principales caractéristiques ..... 169
Tableau 11 : Fréquences d'apparition en fonction de la campagne de prélèvement ..... 178
Tableau 12 : Fréquences d'apparition en fonction de la densité de population ..... 179
Tableau 13 : Fréquences d'apparition en fonction du type géologique de nappe ..... 180
Tableau 14 : Fréquences d'apparition en fonction du type d'activité ..... 181
Tableau 15 : Fréquences d'apparition en fonction de la présence de cours d'eau à proximité du puits de captage ..... 182
Tableau 16 : Fréquence d'apparition en fonction de la position géographique des puits de captage ..... 183
Tableau 17 : Etude bibliographique des articles de criblage sur toutes matrices ..... 195
Tableau 18 : Etude bibliographique des méthodes de criblage sur l'eau ..... 196
Tableau 19 : Critères pour les annotations valides et fiables dans MethodComparator ..... 220
Tableau 20 : Chiffres comparatifs des molécules détectées par l'outil puis réalisées de façon manuelle ..... 228

Tableau 21 : Tableau des 37 molécules détectées dans les 26 échantillons d'eau du robinet (triées par ordre alphabétique du nom des molécules)..... 246
Tableau 22 : Tableau récapitulatif des 817 molécules achetées dans le cadre de la collecte 1 du projet Agrifood contenant les informations suivantes : formule brute, rapport *m/z* des ions protonés et déprotonés, le mode d'ionisation dans lequel est détectée la molécule, le nombre d'ions interprétés en FIA-MS, la potentialité de détection de la molécule dans la méthode HLB-T3 ainsi que le temps de rétention, la LOD et le $R^2$ de la linéarité réalisée pour la validation..... 339

## ***Equations***

Équation 1 : Calcul du rendement d'extraction ..... 126
Équation 2 : Calcul du coefficient de variation sur le rendement d'extraction ..... 127
Équation 3 : Calcul de l'effet matrice ..... 127
Équation 4 : Calcul du facteur de concentration de la cartouche SPE ..... 237
Équation 5 : formation de l'ion moléculaire ..... 262
Équation 6 : dissociation de l'ion moléculaire ..... 262
Équation 7 : exemple de formation d'un ion par protonation à partir de la réaction avec l'ammoniac comme gaz réactif ..... 265
Équation 8 : formation de l'ion moléculaire directement à partir de la photoexcitation ..... 268
Équation 9 : formation de l'ion moléculaire suite à la réaction entre le dopant et le solvant 270
Équation 10 : formation des ions réactifs à partir de l'atome d'hélium métastable et de la vapeur d'eau aboutissant à l'ion protoné ..... 271
Équation 11 : relation entre la fréquence d'oscillation radiale et le rapport m/z sur un FT-ICR ..... 284
Équation 12 : relation entre la fréquence d'oscillation axiale et le rapport *m/z* sur un Orbitrap™ ..... 285
Équation 13 : calcul de la résolution ..... 289
Équation 14 : calcul d'une précision sur la mesure des rapports *m/z* ..... 290
Équation 15 : Equilibre du composé A en LC ..... 297
Équation 16 : Coefficient de partage ..... 297

# *LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES*

Liste triée par ordre alphabétique :

**ACN :** **AC**éto**N**itrile
**ACP :** **A**nalyse en **C**omposantes **P**rincipales
**AED :** Détecteur d'émission atomique (de l'anglais ***A****tomic* ***E****mission* ***D****etector*)
**AFNOR :** **A**ssociation **F**rançaise de **NOR**malisation
**AGC :** Contrôle automatique de gain (de l'anglais ***A****utomatic* ***G****ain* ***C****ontrol*)
**AGRICAN :** **AGRI**culture et **CAN**cers
**AHS :** ***A****gricultural* ***H****ealth* ***S****tudy*
**AINS :** **A**nti-**I**nflamatoires **N**on **S**téroïdiens
**AMM :** **A**utorisation de **M**ise sur le **M**arché
**AMPA :** Acide aminométhylphosphonique (de l'anglais ***A****mino****M****ethyl****P****hosphonic* ***A****cid*)
**ANOVA :** ***AN****alysis* ***Of*** ***VA****riance*
**Anses :** **A**gence **N**ationale de **SE**curité **S**anitaire
**ANSM :** **A**gence **N**ationale de **S**écurité du **M**édicament et des produits de santé
**AOEL :** Dose d'exposition acceptable pour l'applicateur (de l'anglais ***A****cceptable* ***O****perator* ***E****xposure* ***L****evels*)
**APCI :** Ionisation chimique à pression atmosphérique (de l'anglais ***A****tmospheric* ***P****ressure* ***C****hemical* ***I****onization*)
**API :** Ionisation à pression atmosphérique (de l'anglais ***A****tmospheric* ***P****ressure* ***I****onization*)
**APPI :** Photoionisation à pression atmosphérique (de l'anglais ***A****tmospheric* ***P****ressure* ***P****hoto****I****onization*)
**ASE :** Extraction accélérée par solvant (de l'anglais ***A****ccelerated* ***S****olvent* ***E****xtraction*)
**AZF :** **AZ**ote **F**ertilisants
**BRGM :** **B**ureau de **R**echerches **G**éologiques et **M**inières
**CAWG :** Groupe de travail sur la standardisation des analyses chimiques (de l'anglais ***C****hemical* ***A****nalysis* ***W****orking* ***G****roup*)
**CCM :** **C**hromatographie sur **C**ouche **M**ince (TLC, de l'anglais ***T****hin* ***L****ayer* ***C****hromatography*)
**CE :** Electrophorèse capillaire (de l'anglais ***C****apillary* ***E****lectrophoresis*)
**CEA :** **C**ommissariat à l'**E**nergie **A**tomique et aux énergies alternatives
**$CH_2Cl_2$ :** Dichlorométhane
**$CH_3COOH$ :** Acide acétique
**$CH_3COONa$ :** Acétate de sodium
**CHU :** **C**entre **H**ospitalier **U**niversitaire

**CI :** Ionisation chimique (de l'anglais ***C**hemical **I**onization*)

**CID :** Dissociation induite par collision (de l'anglais ***C**ollision **I**nduced **D**issociation*)

**CMR :** **C**ancérigène, **M**utagène et **R**eprotoxique

**COFRAC :** **CO**mité **FR**ançais d'**AC**créditation

**COV :** **C**omposé **O**rganique **V**olatil

**CPF :** Chlorpyriphos-éthyl (de l'anglais ***C**hlor**P**yri**F**os-éthyl*)

**CPG :** **C**hromatographie en **P**hase **G**azeuse

**CRM :** ***C**harged **R**esidue **M**odel*

**CV :** **C**oefficient de **V**ariation

**DA :** Analyse discriminante (de l'anglais ***D**iscriminante **A**nalysis*)

**DAD :** Détecteur à barrette de diode (de l'anglais ***D**iode **A**rray **D**etector*)

**DART :** Analyse directe en temps réel (de l'anglais ***D**irect **A**nalysis in **R**eal **T**ime*)

**DCE :** **D**irective **C**adre sur l'**E**au

**DDC :** Zalcitabine (2',3'-**D**i**D**éoxy**C**ytidine)

**DDS :** ***D**ata **D**ependant **S**can*

**DDT :** **D**ichloro**D**iphényl**T**richloroéthane

**DESI :** Désorption ionisation Electrospray (de l'anglais ***D**esorption **E**lectro**S**pray **I**onization*)

**DHB :** Acide gentistique (de l'anglais *acide 2,5-**D**i**H**ydroxy**B**enzoïque*)

**DJA :** **D**ose **J**ournalière **A**dmissible

**DMSO :** **D**i**M**éthyl**S**ulf**O**xyde

**d-SPE :** Extraction en phase solide et en mode dispersif (de l'anglais ***D**ispersive **S**olid **P**hase **E**xtraction*)

**DVB :** **D**i**V**inyl**B**enzene

**ECD :** Détecteur à capture d'électron (de l'anglais ***E**lectron **C**apture **D**etector*)

**ECD :** Détecteur électrochimique (de l'anglais ***E**lectro**C**hemical **D**etector*)

**ECD :** ***E**lectron **C**apture **D**issociation*

**EDD :** ***E**lectron **D**etachment **D**issociation*

**EEG :** **E**lectro-**E**ncéphalo**G**raphie

**EFSA :** Autorité européenne de sécurité des aliments (de l'anglais ***E**uropean **F**ood **S**afety **A**uthority*)

**EI :** Impact électronique (de l'anglais ***E**lectronic **I**mpact*)

**EIC :** ***E**xtracted **I**on **C**hromatogram*

**ELISA :** Dosage d'immunoadsorption par enzyme liée (de l'anglais ***E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay*)

**ESI :** Ionisation Electrospray (de l'anglais ***E**lectro**S**pray **I**onization*)

**ETD :** ***E**lectron **T**ransfert **D**issociation*

**EtOH :** Ethanol

**FAO :** Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (de l'anglais ***F**ood and **A**griculture **O**rganization of the United Nations*)

**FDS :** **F**iche de **D**onnées de **S**écurité

**FIA :** Injection automatique via le flux de phase mobile (de l'anglais ***F**low **I**njection **A**nalysis*)

**FID :** Détecteur à ionisation de flamme (de l'anglais ***F**lame **I**onization **D**etector*)

**FLD :** Détecteur à fluorescence (de l'anglais ***FL**uorescence **D**etector*)

**FPD :** Détecteur à photométrie de flamme (de l'anglais ***F**lame **P**hotometric **D**etector*)

**FT-ICR :** Spectrométrie de Masse à résonance d'ion cyclotronique et transformée de Fourier (de l'anglais ***F**ourier **T**ransform **I**on **C**yclotron **R**esonance mass spectrometry*)

**FWHM :** Largeur à mi-hauteur du maximum du pic (de l'anglais ***F**ull **W**idth at **H**alf **M**aximum*)

**GC :** Chromatographie en phase gazeuse (de l'anglais ***G**as **C**hromatography*)

**GCB :** Noir de carbone graphitisé (de l'anglais ***G**raphite **C**arbon **B**lack*)

**GPS :** ***G**lobal **P**rotection **S**ystem*

**GRECAN :** **G**roupe **R**égional d'**E**tudes sur le **CAN**cer

**$H_2O$ :** Eau

**HAP :** **H**ydrocarbure **A**romatique **P**olycyclique

**HCCA :** Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (de l'anglais *α-**C**yano-4-**H**ydroxy**C**innamic **A**cid*)

**HCD :** Dissociation induite par collision de haute énergie (de l'anglais ***H**igher-energy **C**ollision induced **D**issociation*)

**HCOOH :** Acide formique

**HESI :** ***H**eated **E**lectro**S**pray **I**onization*

**HILIC :** Chromatographie liquide d'interactions hydrophiles ou chromatographie liquide de paires d'ions (de l'anglais ***H**ydrophilic **I**nteraction **LI**quid **C**hromatography*)

**HLB :** Equilibre hydrophile/lipophile (de l'anglais ***H**ydrophilic-**L**ipophilic **B**alance*)

**HMDB :** *The **H**uman **M**etabolome **D**ata**B**ase*

**HPLC :** Chromatographie en phase liquide à haute performance (de l'anglais ***H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography*)

**HRMS :** Spectrométrie de masse à haute résolution (de l'anglais ***H**igh **R**esolution **M**ass* **S**pectrometry)

**IEM :** ***I**on **E**vaporation **M**odel*

**IGP :** **I**ndication **G**éographique **P**rotégé

**IMMM :** **I**nstitut des **M**olécules et **M**atériaux du **M**ans

**INC :** **I**nstitut **N**ational de la **C**onsommation

**INERIS :** **I**nstitut **N**ational de l'**E**nvi**R**onnement **I**ndustriel et des risque**S**

**INRA :** **I**nstitut **N**ational de la **R**echerche **A**gronomique

**INRS :** **I**nstitut **N**ational de **R**echerche et de **S**écurité

**INVS :** **I**nstitut **N**ational de **V**eille **S**anitaire

**IP :** ***I**sotopic **P**attern*

**ISI :** **I**nnovation **S**tratégique **I**ndustrielle

**IT :** Trappe d'ions (de l'anglais ***I**on **T**rap*)

**ITMS :** Spectromètre de masse à trappe d'ions (de l'anglais ***I**on **T**rap **M**ass **S**pectrometry*)

**KEGG:** ***K**yoto **E**ncyclopedia of **G**enes and **G**enomes*

**LC :** Chromatographie en phase liquide (de l'anglais ***L**iquid **C**hromatography*)

**LEMM :** **L**aboratoire d'**E**tude du **M**étabolisme des **M**édicaments

**LIST :** **L**aboratoire d'**I**ntégration des **S**ystèmes et des **T**echnologies

**LLE :** Extraction par solvant (de l'anglais ***L**iquid-**L**iquid **E**xtraction*)

**LMCO :** ***L**ow **M**ass **C**ut-**O**ff*

**LMR :** **L**imite **M**aximale de **R**ésidus

**LOD :** Limite de detection (de l'anglais ***L**imit **O**f **D**etection*)

**LOESS :** ***L**ow **O**rder non linear locally **ES**timated **S**moothing function*

**LS :** ***L**ibrary **S**pectra*

**LSE :** Extraction solide-liquide (de l'anglais ***L**iquid-**S**olid **E**xtraction*)

**LTQ :** ***L**inear **T**rap **Q**uadrupole*

***m/z* :** Rapport masse sur charge

**MAE :** Extraction assistée par micro-ondes (de l'anglais ***M**icrowave **A**ssisted **E**xtraction*)

**MALDI :** Désorption ionisation par laser assistée par matrice (de l'anglais ***M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption **I**onisation*)

**MeOH :** Méthanol

**METLIN :** The **MET**abolite and tandem mass spectrometry database

**$MgSO_4$ :** Sulfate de magnésium

**MIC :** IsoCyanate de Méthyl (de l'anglais ***M**ethyl **I**so**C**yanate*)

**MIT :** Temps d'injection maximal (de l'anglais ***M**aximum **I**nject **T**ime*)

**MNU :** **M**édicament **N**on **U**tilisé

**MRM :** ***M**ultiple **R**eaction **M**onitoring*

**MS :** Spectrométrie de masse (de l'anglais ***M**ass **S**pectrometry*)

**MS/MS :** Spectrométrie de masse en tandem (de l'anglais *Tandem Mass Spectrometry*)

**MSA :** **M**utualité **S**ociale **A**gricole

**MTBE :** Ether de méthyl-tert-buthyl (de l'anglais ***M**éthyl **T**ert-**B**utyle **E**ther*)

**NCE :** Energie de collision normalisée (de l'anglais ***N**ormalized **C**ollision **E**nergy*)

**$NH_3$ :** Ammoniac

**NIST :** Institut national des normes et de la technologie (de l'anglais ***N**ational **I**nstitute of **S**tandards and **T**echnology*)

**NMR :** **N**uclear **M**agnetic **R**esonance ou (RMN, du français *Résonance Magnétique Nucléaire)*

**NPD :** Détecteur azote-phosphore (de l'anglais ***N**itrogen-**P**hosphorus **D**etector*)

**OMS :** **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté

**ORL :** **O**to-**R**hino-**L**aryngologie

**PBB :** **P**oly**B**romo**B**iphényle

**PBDE :** **P**oly**B**romo**D**iphényl**E**thers

**PBT :** **P**ersistant, **B**ioaccumulable et **T**oxique pour l'environnement

**PCB :** **P**oly**C**hloro**B**iphényle

**PDMS :** **P**oly**D**i**M**ethyl**S**iloxane

**PGC :** ***P**orous **G**raphitic **C**arbon*

**PIC :** ***P**rior **I**nformed **C**onsent*

**PLOT :** ***P**orous **L**ayer **O**pen **T**ubular*

**PLS :** Régression aux moindres carrés partiels (de l'anglais ***P**artial **L**east **S**quares*)

**PNUE :** **P**rogramme des **N**ations-**U**nies pour l'**E**nvironnement

**POPs :** **P**olluants **O**rganiques **P**ersistant**s**

**ppb :** Partie par milliard (de l'anglais ***p**art **p**er **b**illion*)

**PSA :** Amine primaire et secondaire (de l'anglais ***P**rimary and **S**econdary **A**mine*)

**PVC :** PolyChlorure de Vinyle (de l'anglais ***P**oly**V**inyl **C**hloride*)

**QC :** Contrôle qualité (de l'anglais ***Q**uality **C**ontrol*)

**QuEChERS :** Rapide, facile, peu cher, efficace, robuste et sûre (de l'anglais ***Qu**ick, **E**asy, **Ch**eap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe*)

**REACH :** Enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques (de l'anglais ***R**egistration, **E**valuation and **A**uthorisation of **CH**emicals*)

**RFB :** **R**etardateur de **F**lamme poly**B**romé

**RMN :** **R**ésonance **M**agnétique **N**ucléaire (NMR, de l'anglais *Nuclear Magnetic Resonance*)

**ROI :** ***R**egion **O**f **I**nterest*

**RP :** Phase inversée (de l'anglais ***R**everse **P**hase*)

**RPLC :** Chromatographie liquide en phase inverse (de l'anglais ***R**everse **P**hase **L**iquid **C**hromatography*)

**RT :** ***R**etention **T**ime*

**SA :** Acide sinapinique

**SAUR :** **S**ociété d'**A**ménagement **U**rbain et **R**ural

**SAX :** ***S**trong **A**nion e**X**change*

**SBSE :** ***S**tir **B**ar **S**orptive **E**xtraction*

**SCOT:** ***S**upport **C**oated **O**pen **T**ubular column*

**SCX :** ***S**trong **C**ation e**X**change*

**SFE :** Extraction par fluide super critique (de l'anglais ***S**upercritical **F**luid **E**xtraction*)

**SIM :** Détection d'ions sélectionnés (de l'anglais ***S**elected **I**on **M**onitoring*)

**SNCF :** **S**ociété **N**ationale des **C**hemins de fer **F**rançais

**SORI :** ***S**ustained **O**ff-**R**esonance **I**rradiation*

**SPE :** Extraction sur phase solide (de l'anglais ***S**olid **P**hase **E**xtraction*)

**SPME :** Microextraction sur phase solide (de l'anglais ***S**olid **P**hase **M**icro**E**xtraction*)

**SRM :** ***S**elected **R**eaction **M**onitoring*

**STEP :** **ST**ation d'**EP**uration

**TCD :** Détecteur à conductivité thermique (de l'anglais ***T**hermal **C**onductivity **D**etector*)

**TIC :** Courant ionique total (de l'anglais ***T**otal **I**on **C**urrent*)

**TLC :** ***T**hin **L**ayer **C**hromatography* (CCM, du français **C**hromatographie sur **C**ouche **M**ince)

**TOF :** Temps de vol (de l'anglais ***T**ime **O**f **F**light*)

**TQ ou QqQ :** Triple quadripôle (de l'anglais ***T**riple **Q**uadrupole*)

**u :** Unité de masse atomique unifié (de l'anglais *unified atomic mass **u**nit*)

**U.A :** **U**nité **A**rbitraire

**UE :** **U**nion **E**uropéenne

**UHPLC :** Chromatographie liquide ultra haute performance (de l'anglais ***U**ltra-**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography*)

**UICN :** **U**nion **I**nternationale pour la **C**onservation de la **N**ature

**UPLC :** Chromatographie en phase liquide à haute performance (de l'anglais ***U**ltra **P**erformance **L**iquid **C**hromatography*)

**US EPA :** ***U**nited **S**tates **E**nvironmental **P**rotection **A**gency*

**UV :** **U**ltra**V**iolet

**VIH :** **V**irus de l'**I**mmunodéficience **H**umaine

**VIM :** ***V**alve **I**nterface **M**odule*

**VIP :** Importance de la variable pour la projection (de l'anglais ***V**ariable **I**mportance on the **P**rojection*)

**WAX :** ***W**eak **A**nion e**X**change*

**WCOT :** ***W**all **C**oated **O**pen **T**ubular*

**WCX :** ***W**eak **C**ation e**X**change*

**XCMS :** acronyme de diverses formes **(X)** de la chromatographie **(C)** couplée à la spectrométrie de masse **(MS)**

**XIC :** *e**X**tract **I**on **C**hromatogram*

# CHAPITRE I.

# *PROBLEMATIQUE ET ETAT DE L'ART*

# I. LA POLLUTION : DEFINITION, CLASSIFICATION ET ORIGINE

## I.1. **Définition et classification des polluants**

### I.1.1. Définition d'un polluant

Selon le dictionnaire du vocabulaire normalisé de l'Environnement de l'AFNOR [1], un polluant est un altéragène biologique, physique ou chimique qui provoque des impacts négatifs sur tout ou partie d'un écosystème (air, eau, sol), de l'environnement en général et/ou d'un organisme (qui peut être l'Homme). Au sens large, le terme désigne des agents qui sont à l'origine d'une altération des qualités du milieu, même s'ils y sont présents à des niveaux inférieurs au seuil de nocivité. Pour les polluants qui ont un effet nocif sur les organismes vivants, on réserve le terme de contaminants. On peut désigner sous le terme de polluant toute substance artificielle produite par l'homme et dispersée dans l'environnement, mais aussi toute modification d'origine anthropogène affectant le taux et/ou les critères de répartition dans la biosphère d'une substance naturelle propre à tel ou tel milieu. L'emploi du mot « xénobiotique » est également très courant. Il désigne toutes les substances présentes dans un organisme vivant mais qui lui sont étrangères (d'après le centre national de ressources textuelles et lexicales [2]).

### I.1.2. Les différents types de polluants chimiques organiques

Dans ce mémoire, nous nous intéresserons uniquement aux contaminants organiques, c'est-à-dire aux molécules composées d'une structure carbonée, par opposition aux contaminants inorganiques qui n'en contiennent pas. Ces molécules constituent en effet une part quasi-exclusive des composés produits par l'activité humaine. On distingue 3 grands types de contaminations organiques : les biocides, les médicaments et la pollution domestique et industrielle.

#### I.1.2.1. Les biocides

Le mot biocide (étymologiquement : *bio* + *cide* = « *qui tue la vie* ») désigne une large famille de substances destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre, par une action chimique ou biologique. Bien que ciblant les organismes nuisibles, les biocides sont par définition des produits actifs susceptibles d'avoir des effets sur l'homme, l'animal ou l'environnement [3]. Ces produits

sont classés en quatre grands groupes : (i) les désinfectants (ex : décontamination des mains et de l'eau), (ii) les produits de protection (ex : produits de protection du bois contre les insectes ou les champignons), (iii) les produits de lutte contre les nuisibles (ex : rodenticide, insecticide) et (iv) les autres produits (ex : peintures anti-salissures appliquées sur les bateaux). Dans la famille des biocides, une grande majorité est plus communément appelée pesticides (étymologiquement : *pest* + *cide* = « *qui tue les nuisibles* »). Elle regroupe non seulement les substances « phytosanitaires » (également appelées « phytopharmaceutiques », produits utilisés pour traiter les plantes), mais aussi les produits zoosanitaires (produits utilisés pour traiter les animaux), les produits de traitements conservateurs du bois, et de nombreux produits d'usage domestique : shampoing anti-poux, boules antimites, poudres anti-fourmis, bombes insecticides contre les mouches, mites ou moustiques, colliers antipuces, diffuseurs intérieurs de pesticides, etc. [4] (Figure 1).

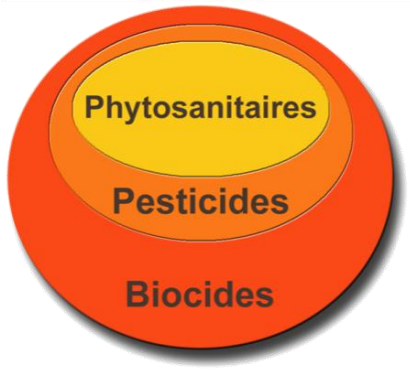



**Figure 1 : Classification des produits phytosanitaires, pesticides et biocides (Adapté du travail de Lamiot [5])**

Les pesticides regroupent plusieurs sous-catégories :

- Les acaricides, utilisés pour tuer les acariens ;
- Les algicides, utilisés pour tuer les algues ou lutter contre leur développement ;
- Les avicides, utilisés pour tuer les oiseaux ;
- Les bactéricides, utilisés pour tuer les bactéries ;
- Les fongicides, utilisés pour tuer les champignons ou inhiber leur croissance ;
- Les herbicides, (appelés désherbants, phytocides ou débroussaillants) utilisés pour détruire les adventices (« mauvaises herbes ») ;
- Les insecticides, utilisés pour détruire les insectes ou prévenir leur développement ;
- Les molluscicides, utilisés pour tuer les limaces et les escargots ;
- Les nématicides, utilisés pour tuer les nématodes ;
- Les parasiticides, utilisés pour tuer les parasites ;

- Les rodenticides, utilisés pour tuer les rongeurs ;
- Les taupicides, utilisés pour tuer les taupes ;
- Les régulateurs de croissance, utilisés pour la prévention de la croissance excessive d'une plante favorisant la résistance des plantes, le bouturage, la mise en fruit.

Chacune de ces sous catégories est généralement à nouveau subdivisée en sous classe en fonction des modes d'épandages, d'adsorption (par la plante ou l'animal) et/ou du mode d'action de la molécule (ce qui correspond généralement à une famille chimique). Pour exemple, les substances utilisées dans la seule famille des herbicides sont d'environ 700 molécules réparties en 42 familles chimiques [6]. Le nombre de pesticides susceptibles de se retrouver dans l'environnement est par conséquent très important. Par ailleurs, leur utilisation est intensive. Ainsi, 1000 euros de pesticides sont consommés chaque seconde dans le monde pour atteindre 30 milliards d'euros chaque année. La France est d'ailleurs le premier consommateur européen de pesticides devant l'Allemagne avec 35 % de ces terres soumises à des traitements, ce qui représente 2 milliards de dépenses en produits phytosanitaires par an [7].

#### I.1.2.2. Les médicaments

Les médicaments sont principalement d'origine organique. Il s'agit de toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique [8]. Au même titre que les pesticides, la classification générale des médicaments est très vaste et généralement organisée selon l'indication pharmacothérapeutique des molécules (Dorosz 2009 [9]). Dans cette classification présentée en annexe 1 sont consignées les 25 grandes classes pharmacothérapeutiques.

Ces différentes classes de médicaments regroupent en France environ 3000 substances actives soit environ 12 000 représentations pour un montant annuel de vente d'environ 27 milliards d'euros [10]. La France est le 5$^{ème}$ consommateur mondial de médicaments avec 4,4 % de parts de marché [11]. Ces larges quantités vendues et consommées sont autant de source de pollution de notre environnement.

#### I.1.2.3. Les pollutions industrielles et domestiques

Les pollutions industrielles et domestiques désignent les formes de pollution directement induites par l'industrie et la consommation domestique. La pollution industrielle est soit aiguë et accidentelle, soit « diffuse » et chronique. Elle concerne toute la filière industrielle : du processus en amont (mines, carrières, transport ou préparation de ressources), en passant par l'industrialisation et les déchets et/ou sous-produits de fabrication qu'elle génère jusqu'à la fin de vie des machines et des usines. Il existe plusieurs catégories de polluants chimiques industriels ou domestiques :

##### I.1.2.3.1. Les hydrocarbures liquides

Pétrole et dérivés, principalement des alcanes, sont rejetés notamment à la mer. Leur origine est liée à l'industrie et l'urbanisation continentale [12]. Pour exemple, les très médiatiques marées noires de l'Erika ou du Prestige ne représentent que 6 % de la contribution à la pollution aux hydrocarbures en mer.

##### I.1.2.3.2. Les produits de combustions industrielles et domestiques

Ils proviennent de la combustion incomplète de matières fossiles (charbon, fioul, essence) ou de l'utilisation de solvants (peintures, colles). Ils forment des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et des Composés Organiques Volatils (COV) qui sont rejetés dans l'atmosphère. Par ailleurs, l'activité de l'industrie métallurgique et sidérurgique forme des dioxines, substances extrêmement toxiques pour l'environnement et pour l'Homme.

##### I.1.2.3.3. Les tensioactifs

Ils sont très utilisés dans l'industrie (notamment du textile et de la métallurgie) et la consommation domestique (lessive, produits d'entretiens, shampooings, produits cosmétiques, etc.) comme détergents, agents de solubilisation, agents moussants, mouillants, dispersants ou émulsifiants [13]. On distingue 4 types de composés tensioactifs :

- Les tensioactifs anioniques : savons alcalins, savons métalliques, savons organiques, dérivés sulfatés (exemple : laurylsulfate de sodium), très utilisés comme agents émulsionnants ou moussants, et sulfonés (exemple : dioctylsufosuccinate de sodium) souvent caractérisés par un fort pouvoir mouillant.

- Les tensioactifs cationiques : sels d'ammonium quaternaire (exemple : chlorure de benzalkonium) ayant des propriétés bactériostatiques et émulsionnantes.
- Les tensioactifs zwitterioniques ou amphotères : les bétaïnes utilisés comme agents moussants et détergents, les dérivés imidazolines utilisés comme agents moussants et antiseptiques.
- Les tensioactifs non ioniques : sous forme d'ester (exemple : ester de glycol, esters de sorbitane), sous forme d'éther (exemple : éther de polyéthylèneglycol), sous forme de liaison amide (exemple : acide gras monoethanolamide de noix de coco) utilisés pour ses propriétés moussantes, émulsionnantes, détergentes et épaississantes.

#### I.1.2.3.4. Les plastifiants

Ce sont des substances qui, ajoutées à une matière, généralement du plastique, génèrent un produit flexible, résistant et plus facile à manipuler [14]. Les phtalates constituent la plus grande famille de plastifiants. La plupart des phtalates sont utilisés dans des applications industrielles comme additif au PVC (PolyChlorure de Vinyle), afin de le rendre plus souple, plus élastique, plus résistant et mieux adapté aux exigences de ses différentes utilisations. Les phtalates représentent plus de 80 % des 6 millions de tonnes de plastifiants utilisés chaque année dans le monde. Ils se divisent en trois sous-groupes aux propriétés et effets très différents :

- Les phtalates à chaîne moléculaire très courtes qui ne sont pas des plastifiants ;
- Les phtalates à chaîne moléculaire courtes qui sont des plastifiants considérés comme reprotoxiques et utilisés dans les encres et cartouches d'imprimante, adhésifs, dispositifs médicaux (notamment les poches de sang), mastics et joints d'étanchéité ou les peintures ;
- Les phtalates à chaîne moléculaire longues qui sont des plastifiants non considérés comme reprotoxiques et utilisés dans les fils et câbles, l'industrie automobile, le textile, l'habitat (revêtement de sol, toitures, piscine etc.) et les jouets.

Par ailleurs, des additifs aux plastifiants comme les bisphénols peuvent être utilisés. Cette famille de composés chimique d'une quinzaine de représentants est couramment utilisée pour donner aux matières plastiques certaines de la transparence ou de la brillance. Le bisphénol A est certainement le plus connu. Il est utilisé dans les résines époxydes (les polyépoxydes

tapissent l'intérieur de certaines boîtes de conserves) et les polycarbonates. Ces composés sont aussi connus pour être des perturbateurs endocriniens.

#### I.1.2.3.5. Les autres produits industriels

D'autres produits sont utilisés en grande quantité par l'industrie : ce sont des matières synthétiques n'appartenant à aucune classe citée auparavant. Deux exemples sont présentés ci-après :

- Les PolyChloroBiphényles (PCB), qui forment une famille de 209 composés aromatiques organochlorés, ont été utilisés comme isolants électriques dans les transformateurs électriques, les condensateurs, les moteurs de pompe, les fours à micro-ondes.
- Les Retardateurs de Flamme polyBromés (RFB) remplacent depuis les années 1970 les PCB jugés trop dangereux car toxiques et rémanent dans l'environnement. Cette famille de produits comprenant 75 représentants est utilisée comme ignifugeant dans les appareils électriques, électroménagers, mousse de rembourrage, peintures, vêtements, etc.

Cette classification des polluants a permis de mettre en évidence la multitude de substances susceptibles de se retrouver dans l'environnement, et ce, en se restreignant aux polluants chimiques organiques. De fait, la simple observation de notre environnement proche permet de nous rendre compte que l'ensemble des produits manufacturés qui nous entourent (tout objet à base de plastique ou de bois, la nourriture, les véhicules, les médicaments etc.) est générateur de pollution environnementale de sa fabrication jusqu'à son élimination. Quelles sont alors les mécanismes qui aboutissent à la dispersion de ces substances dans l'environnement ?

## I.2. **Origine des polluants dans l'environnement et voies d'exposition**

La contamination de l'environnement touche tous les compartiments de l'écosystème terrestre : l'eau, le sol et l'air. Ces écosystèmes n'étant pas hermétiques, les molécules polluantes peuvent migrer d'un compartiment à l'autre ce qui accentue leur dispersion. Le mode de contamination provient généralement de la production et de l'utilisation de ces substances.

### I.2.1. La production (activité industrielle)

Quel que soit le type de polluants (biocides, médicaments ou produits industriels et domestiques), sa fabrication est l'une des premières causes de pollution « diffuse et chronique » c'est-à-dire à petite dose, mais continue. Les industries chimiques productrices peuvent en effet répandre de plusieurs manières le produit fini, les sous-produits de synthèse et les substances chimiques nécessaires à sa conception : réactifs, catalyseurs, solvants. Ainsi, les modes de contamination possibles sont les fumées, les déchets solides et liquides et le stockage. Par ailleurs des accidents ponctuels de grande ampleur peuvent survenir et causer une pollution aiguë de l'environnement. Ainsi, depuis le début du 21$^{ème}$ siècle, pas moins de 35 catastrophes industrielles ont été recensées [15]. Ce fut par exemple le cas en 1976 avec l'explosion du réacteur chimique de Seveso en Italie durant lequel de fortes quantités (1 à 10kg) de dioxines furent rejetés. En 1999 avec le naufrage de l'Erika au large de la Bretagne, 12 000 tonnes de pétrole lourd furent déversées dans l'océan atlantique. En 2001, avec l'explosion du site AZF de Toulouse, du nitrate d'ammonium causa une explosion et fut rejeté dans l'environnement. En 2005, 100 tonnes de benzène furent déversés dans la rivière Songhua en Chine suite à l'explosion d'une usine de produits chimiques.

### I.2.2. L'utilisation

L'utilisation de produits chimiques est une autre source de pollution environnementale. Le mode de dispersion (ou d'administration) du produit, le stockage et la quantité sont, en effet, autant de facteurs, qui combinés à la dangerosité des substances utilisées, conduisent à une pollution durable des écosystèmes environnementaux. Dans cette partie, nous expliquerons quelles sont les sources de pollution par les pesticides, les médicaments et les produits industriels, ainsi que les voies d'exposition de l'Homme et des animaux.

#### I.2.2.1. Les pesticides

Les pesticides sont massivement employés dans l'agriculture moderne [16]. Leur utilisation remonte à l'antiquité, on retrouve des traces de l'utilisation du soufre en Grèce antique dès 1000 ans avant J.-C. Son usage comme agent de fumigation est d'ailleurs mentionné dans les oeuvres d'Homère. De la même manière, Pline l'Ancien, naturaliste romain du I$^{er}$ siècle, recommandait dans ses écrits l'usage de l'*arsenic* comme insecticide. Cependant, les pesticides ont été employés de façon plus intensive, dans les années 1930, avec le développement de la chimie organique, surtout après la seconde guerre mondiale. C'est à cette époque qu'apparaissent un grand nombre de composés organiques (notamment la grande

famille des organophosphorés). Les recherches militaires avaient déjà perfectionné des gaz de combat qui, à défaut d'être utilisés pendant les hostilités, le furent contre les insectes. La seconde moitié du XXème siècle a vu la généralisation de l'utilisation des pesticides au niveau mondial, avec des variations locales quant aux quantités et aux types de pesticides utilisés. Un pays comme la France utilise majoritairement des fongicides, tandis que des pays situés près des tropiques utilisent essentiellement des insecticides [17]. L'usage de ces produits est indispensable à la plupart des pratiques agricoles, quel que soit le niveau de développement économique des pays. Pour preuve, de 1945 à 1985, la consommation de pesticides a doublé tous les dix ans [17]. Ils jouent donc un rôle économique et social important notamment au travers de la politique agricole commune qui vise entre autre à accroître les rendements pour atteindre l'autosuffisance. Dans ce sens, les pesticides jouent un rôle important dans l'accessibilité à un approvisionnement alimentaire abondant pour l'ensemble de la planète, puisqu'ils contribuent à protéger les cultures vivrières et fourragères contre les organismes nuisibles (insectes, mauvaises herbes et maladies fongiques) [16]. Par ailleurs, l'augmentation des rendements des terres agricoles a permis de limiter la déforestation, ainsi les experts estiment que leur utilisation, en 50 ans, a permis de préserver 50 % de la surface de la forêt actuelle [18].

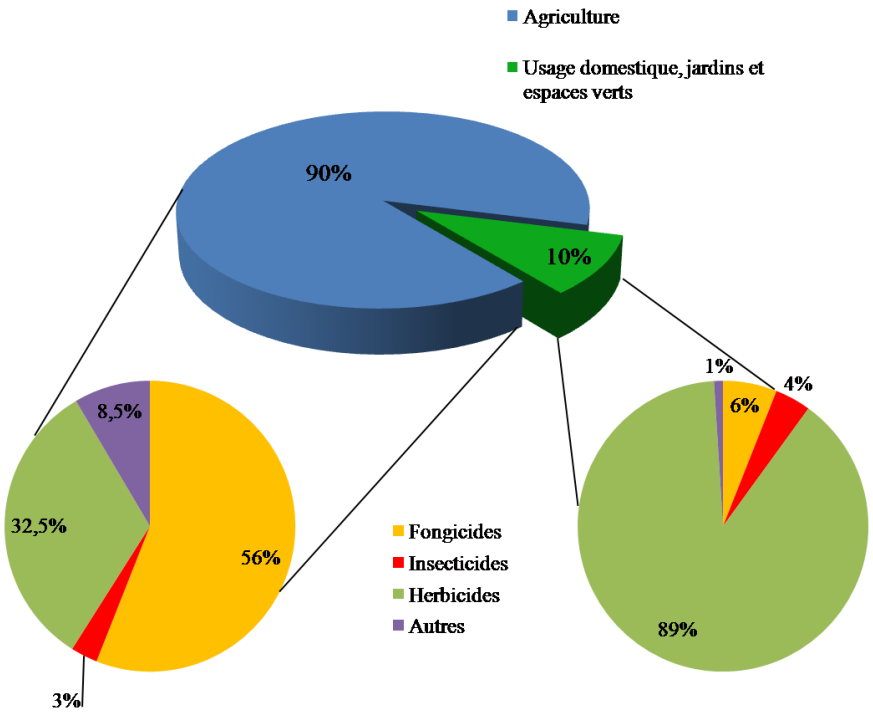



**Figure 2 : Pourcentage et type de pesticides utilisés en France en fonction du domaine d'application (Sur la base des statistiques réalisées pour un rapport d'office parlementaire en 2001 [19])**

Néanmoins, les contaminations de l'environnement aux pesticides concernent principalement les applications agricoles, puisqu'elles représentent 90 % des utilisations totales. Le reste étant réparti entre les utilisations privatives (anti-moustiques, antimites, antipuces par exemple) ou pour les jardins et les espaces verts (entretien des espaces verts des collectivités locales, voiries, réseau SNCF, etc.). Les produits utilisés diffèrent sensiblement selon les utilisateurs [19]. Les fongicides sont plutôt très utilisés en agriculture, tandis que les herbicides sont massivement utilisés pour l'entretien des jardins et des espaces verts (Figure 2). La plupart des pesticides utilisés dans l'agriculture sont appliqués à partir de rampes de pulvérisations montées sur des tracteurs (Figure 3), mais des applications aériennes (Figure 4) (par avion ou hélicoptère) peuvent également être mises en œuvre.

**Figure 3 : Rampe de pulvérisation de pesticides montée sur un tracteur [20]**

**Figure 4 : Pulvérisation de pesticides sur un champ de maïs par avion [21]**

Trois phénomènes distincts sont à l'origine de la présence des produits polluants dans l'air : (i) Les départs dans l'atmosphère se font dès l'application des pesticides par pulvérisation, on parle de dérive. Les gouttelettes les plus fines peuvent rester en suspension dans l'air et voyager sur de longues distances. (ii) Leur présence dans l'air est due à l'érosion éolienne des

sols traités (c'est-à-dire au transfert par le vent sous forme de particules de sols ou de poussières contaminées). Enfin, (iii) des phénomènes plus complexes de transfert existent, sous forme gazeuse à partir des plantes ou du sol traités appelés volatilisation. Plusieurs facteurs influencent ces différents mécanismes : la nature du sol et la plante traitée, les conditions climatiques lors de l'épandage, les propriétés physico-chimiques des composés. Une fois dans le compartiment aérien, les pesticides peuvent être dégradés, principalement sous l'effet des rayonnements lumineux, mais ils sont surtout transportés parfois sur de longues distances avant de retomber sous forme humide dans les pluies, les neiges ou les brouillards. L'atmosphère constituant une voie majeure pour le transport de ces composés dans l'environnement, les régions d'agriculture intensive ne sont pas les seules concernées par cette pollution. Ainsi, ces polluants, qui voyagent par l'intermédiaire des mouvements des grandes masses d'air, peuvent contaminer l'ensemble d'un territoire, y compris le milieu urbain [22].

La plupart des pesticides arrivent sur le sol où ils sont soumis à un ensemble de mécanismes conditionnant leur devenir et leur dispersion vers les autres compartiments de l'environnement. Les pesticides peuvent être métabolisés au grès de transformations abiotiques (photolyse, catalyse) ou biologiques (via des microorganismes), ou ils peuvent être retenus par la plante (absorption) ou par le sol via des processus physico-chimiques conduisant à des liaisons plus ou moins réversibles entre les éléments constitutifs du sol et les pesticides [22]. Enfin, ils peuvent être transportés par lessivage (transport par infiltration de particules solides potentiellement contaminées), ruissellement (transport de surface) ou lixiviation (transport par infiltration de matière dissoute dans l'eau) ce qui conduit à la contamination des eaux de drainage, des eaux de surface et des nappes phréatiques (Figure 5).

En proportion, le ruissellement emporte (suivant la saison) en moyenne 2 % d'un pesticide appliqué sur le sol, rarement plus de 5 à 10 % [23,24]; les pertes par lessivage et lixiviation sont généralement moins importantes [24,25]. En revanche, on a parfois constaté des pertes par volatilisation de 80 à 90 % du produit appliqué, quelques jours après le traitement [25,26]. En moyenne, de 25 à 80 % des pesticides pulvérisés sont, selon les conditions d'applications, perdus via ces différents phénomènes.

Une fois les pesticides dans l'eau et malgré la quantité disponible sur la planète (71 % de la surface totale), il existe un phénomène de concentration plus ou moins important lié au cycle hydrologique. En effet, de l'eau chargée en substances polluantes peut s'infiltrer dans la terre jusqu'à la nappe phréatique, puis être pompée par l'agriculteur pour irriguer son champs. La parcelle peut alors se charger de tous ces produits polluants.

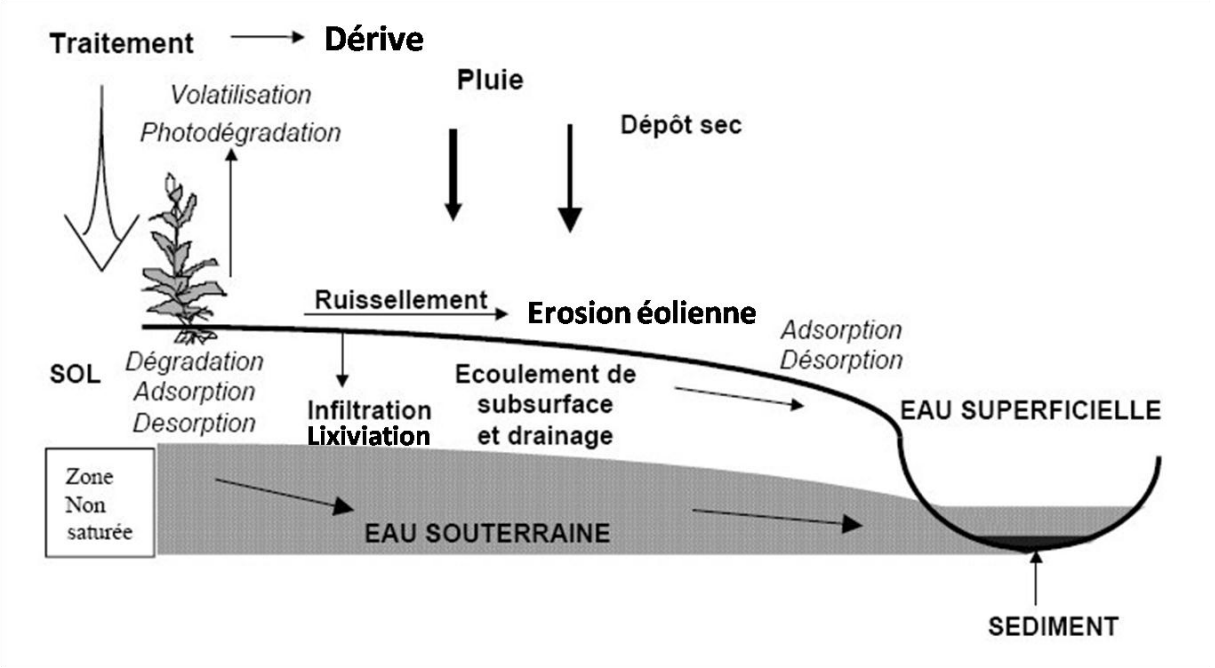



**Figure 5 : Phénomènes de pollution de l'environnement aux biocides pulvérisés (Adapté depuis CPP-Corpen [27])**

Les sources d'exposition professionnelle aux pesticides découlent directement de l'emploi qui en est fait (production, traitement des cultures ou des animaux), tandis que la population générale est essentiellement exposée au travers de son alimentation et de son environnement [28]. L'exposition par l'alimentation concerne les sources de nourritures traitées et l'eau de boisson. La contamination de l'environnement expose donc tout un chacun à des niveaux de pesticides variables et souvent difficiles à apprécier.

### I.2.2.2. Les médicaments

Outre la production de nombreux principes actifs dans les usines pouvant conduire à une diffusion de résidus médicamenteux dans l'environnement (voir I.2.1), la plupart de cette pollution provient surtout de l'utilisation qui en est faite.

Les médicaments sont, en effet, très utilisés chez l'Homme et l'animal pour prévenir ou guérir de maladies. On les retrouve donc dans les hôpitaux, la médecine de ville, les maisons de retraite et les fermes d'élevage aquacoles et terrestres. Ces produits pharmaceutiques peuvent atteindre l'environnement à la suite :

- De leur élimination par voie naturelle (Figure 6) : les médicaments sont administrés dans l'organisme puis sont éliminés par voie naturelle dans les urines ou les fèces sous leur forme initiale (de 50 à 80 % , Dorosz 2009 [9]), ou sous la forme d'un ou

plusieurs métabolites actifs ou non, puis disséminés dans les réseaux d'assainissement, les eaux usées et sur les sols, en ce qui concerne la plupart des médicaments vétérinaires. On peut ainsi prendre l'exemple de la metformine (un antidiabétique) pour lequel le VIDAL [29] indique qu'il n'y a aucune métabolisation de cette molécule. Il est ainsi considéré que 98 % de la quantité administrée est éliminée sous forme inchangée.

- Des mauvaises habitudes de certains patients (Figure 6) : une grande partie des médicaments non utilisés (MNU), soit 30 à 70 % des médicaments dispensés, sont le plus souvent jetés dans les ordures ménagères (66 %), dans les égouts et les toilettes (12 %), et seuls 22 % seraient retournés en pharmacie pour être incinérés par Cyclamed [30].
- De certaines pratiques agricoles : les médicaments vétérinaires (antibiotiques, hormones, antiparasitaires) sont en effet introduits dans les écosystèmes aquatiques par des procédés différents des deux précédents. Les rejets des fermes aquacoles, les déjections dans les pâturages des animaux de ferme d'élevage ou encore la remobilisation des résidus de médicaments présents dans les fumiers et lisiers épandus sur les sols agricoles sont autant de cause de pollution du milieu aquatique car ces molécules ruissellent jusqu'aux cours d'eaux et nappes phréatiques.

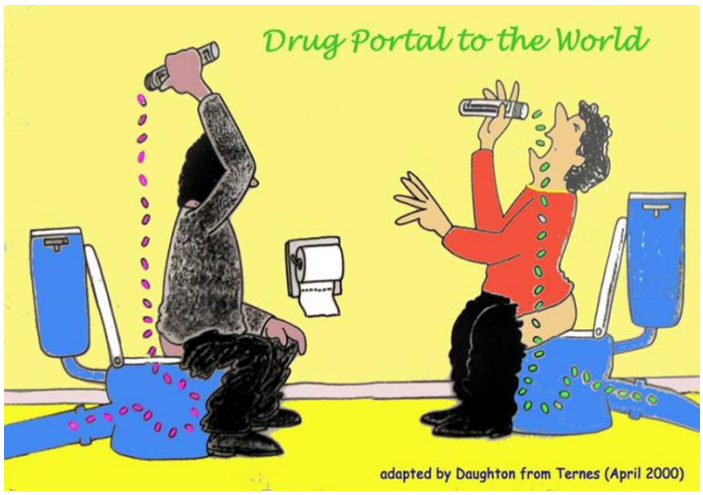



**Figure 6 : Caricature de l'origine des médicaments dans l'eau [31]**

Toutes ces substances sont ensuite acheminées vers les STations d'EPurations (STEP). Cependant, celles-ci ne sont pas prévues pour décontaminer l'eau de tous ces médicaments aux structures et variétés chimiques importantes. En 2009, le Dr. Joël Spiroux et son équipe ont évalué l'ensemble des rejets médicamenteux à la sortie du CHU de Rouen en France [32].

Pendant 30 jours, des échantillons ont été prélevés de la sortie du CHU jusqu'à la sortie des STEP traitant les eaux du CHU et d'un centre anticancéreux. A la sortie de la STEP, 36 résidus médicamenteux différents ont été retrouvés dans l'eau parmi celles détectées dans les eaux usées de sortie du CHU, ce qui montre que les STEP sont loin d'être efficaces dans l'élimination de toutes traces de médicaments.

De plus, les STEP font appel à des procédés chimiques (tels que la nitrification, la chloration ou l'ozonation) et biologiques (via des bactéries hétérotrophes) pour tenter de dégrader les xénobiotiques et pathogènes éventuels générant ainsi des produits de dégradation et de nouveaux métabolites. A titre d'exemple, une étude réalisée par Bourgin et coll. a révélé la présence de 21 composés chlorés ou bromés générés à la suite du traitement du bisphénol A par un traitement classique de STEP [33]. Cela montre que la pollution environnementale ne se restreint pas aux seules molécules connues et utilisées dans l'agriculture et l'industrie. Des processus de métabolisation des pesticides et médicaments peuvent aussi avoir lieu multipliant encore le nombre de molécules présents dans l'eau de sortie (

Figure 7).

Afin d'évaluer la présence de résidus médicamenteux dans les eaux destinées à la consommation humaine, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (Anses) a mené une campagne en 2011 et a mesuré 45 substances pharmaceutiques d'origine humaine ou vétérinaire [34]. Pour cette campagne, 285 échantillons d'eaux d'origine souterraine et superficielle ont été analysés, ce qui représente l'eau consommée par 24 % des Français. Les résultats montrent la présence simultanée d'une à quatre molécules pour 25 % des échantillons. Parmi les 45 substances recherchées, 19 ont été détectées au moins une fois. Celles qui ont été le plus souvent retrouvées étaient l'oxazépam, un anxiolytique ainsi que la carbamazépine, un antiépileptique. Les résultats ont montré que cette dernière pourrait constituer un « marqueur » attestant de la présence et de la persistance de médicaments dans l'eau.

L'exposition de l'homme et du bétail aux résidus de médicaments est donc lié à leur utilisation et la négligence de certaines personnes. Les médicaments ne sont pas tous traités par les stations d'épuration et se retrouvent dans nos rivières, lacs et océans avant de revenir dans nos robinets après une étape par une station de potabilisation (

Figure 7).

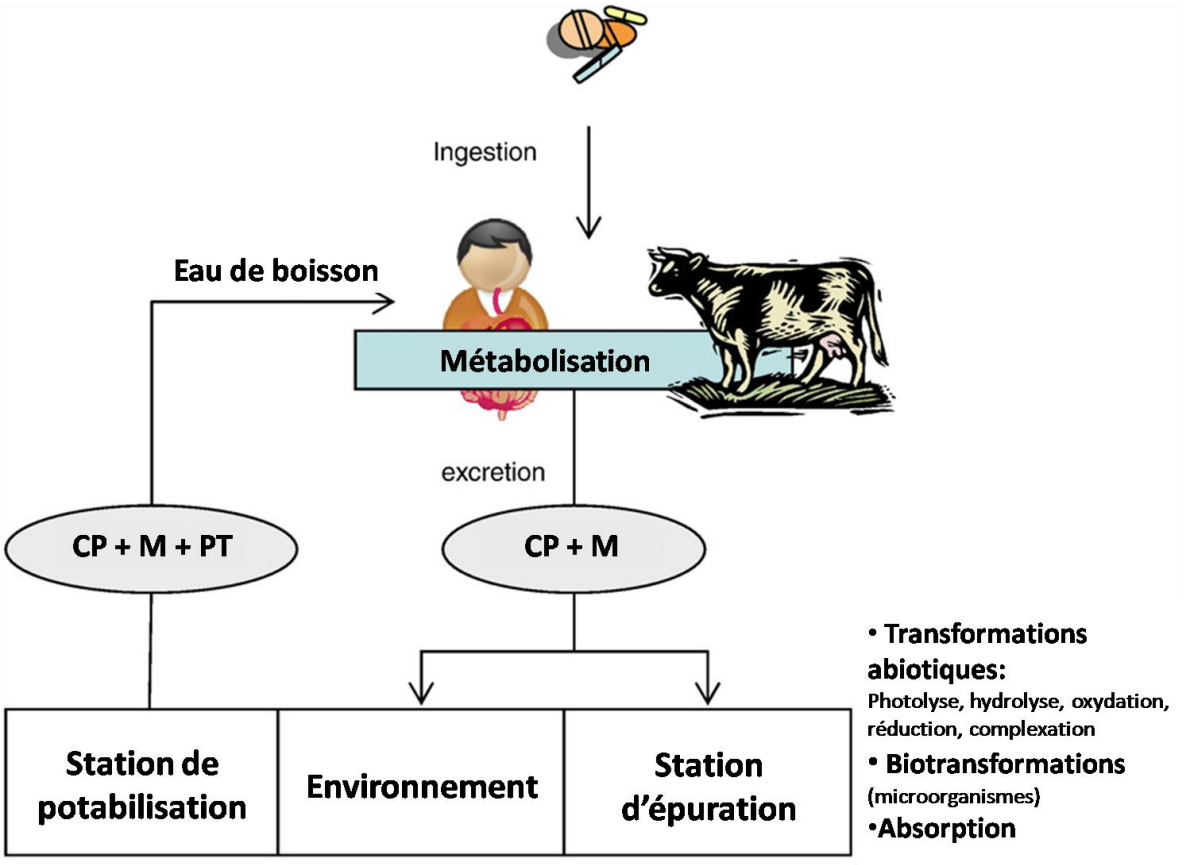



**Figure 7 : Cycle des médicaments dans l'eau et voie d'exposition (Adapté de la publication de Mompelat et coll., 2009 [35])**

CP : composés parents, M : Métabolites et PT : Produits de transformation

### I.2.2.3. Les produits industriels et domestiques

Les produits industriels et domestiques sont nombreux (voir I.1.2.3). Les substances à usage domestique susceptibles de se retrouver dans l'eau (lessive, produit lave-vaisselle, shampooing, cosmétique etc.) sont très bien dégradés par les bactéries des stations d'épuration. En effet, 5 à 12 heures seulement sont nécessaires pour éliminer 90 % des tensioactifs par dégradation et absorption dans les boues [36]. En revanche, les polychlorobiphényles (PCB), les retardateurs de flamme polybromés (RFB) et dioxines sont un véritable sujet de santé publique. Les PCB ont été utilisés dans les années 1930 dans les transformateurs électriques notamment, puis ont été interdits en France en 1987 du fait de leur toxicité avérée. Cependant, avec le temps et les rejets accidentels, ils se sont accumulés dans l'environnement, en particulier dans les sédiments marins ou d'eau douce. Dans l'organisme humain, ces molécules s'accumulent préférentiellement dans le tissu adipeux. Leur élimination est lente (plusieurs années) et se fait par les fèces. On en retrouve, par ailleurs, dans le lait maternel et le sang. La toxicité des PCB est essentiellement liée à leur

accumulation dans l'organisme au cours du temps [37]. Les dioxines présentent une grande stabilité à la chaleur, elles sont peu biodégradables et ont une forte affinité pour les graisses. Ces molécules vont ainsi s'accumuler dans les tissus graisseux, notamment d'origine animale tout au long de la chaîne alimentaire. On en retrouve particulièrement dans les aliments riches en graisses animales tels que les poissons, les crustacés, le lait, les produits laitiers et les œufs. L'alimentation constitue la principale voie d'exposition de la population générale aux dioxines avec plus de 90 % de l'exposition totale [38]. Les produits traités aux RFB, qu'ils soient en cours d'utilisation ou qu'il s'agisse de déchets, relâchent ces substances dans l'environnement et contaminent l'air, le sol et l'eau. Ces contaminants peuvent ensuite entrer dans la chaîne alimentaire, où ils sont présents principalement dans les aliments d'origine animale, tels que le poisson, la viande, le lait,et les produits dérivés (Autorité européenne de sécurité des aliments [39]).

Les voies de contaminations de l'environnement par les substances polluantes sont multiples et concernent toute la chaîne d'utilisation. Ainsi, les pesticides peuvent, après épandage, migrer via les vents vers d'autres lieux, ou ruisseler et s'infiltrer via la pluie dans le sol et les cours d'eau. Les médicaments sont, après assimilation par l'Homme ou l'animal, éliminés sous forme de métabolites ou de produits inchangés dans les eaux usés. La négligence de certains, qui jettent les comprimés à la poubelle ou aux toilettes, conduit à une pollution durable des rivières et des océans car ces substances sont difficilement traitées par les STEP. Enfin, les décharges à ciel ouvert, qui contiennent des produits manufacturés, peuvent libérer des produits industriels comme les RFB qui finissent par s'infiltrer.

L'exposition de l'Homme à ces substances est donc multiple. Elle peut être d'origine intentionnelle ou accidentelle ou concerner le milieu professionnel comme l'a inscrit l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans son rapport en 1990 (Figure 8). L'environnement est quant à lui exposé à l'ensemble de ces substances de façon continue. Existe-t-il alors des conséquences connues sur la faune et la flore lié à la présence de ces substances polluantes dans l'environnement ? L'Homme met-il sa santé en danger ? Quels sont les moyens de lutte mis en œuvre par les pouvoir publics pour remédier à ce problème ? Ce sont les questions auxquelles nous allons tenter de répondre dans la partie suivante.

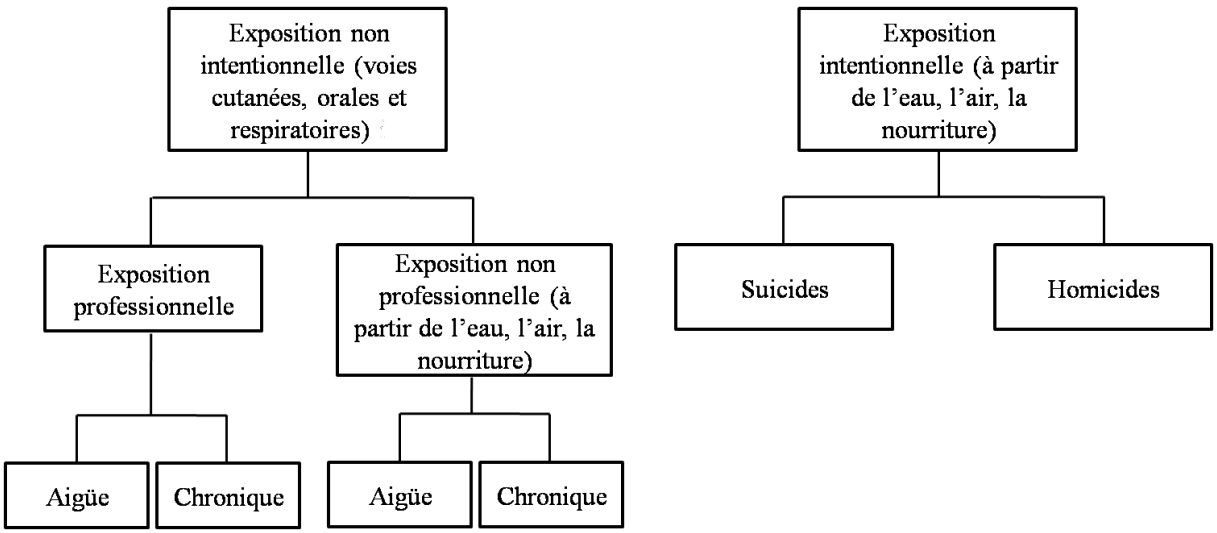



**Figure 8 : Voies d'exposition de l'Homme aux substances polluantes (Adapté du rapport de l'OMS, 1990 [40])**

# II. LA POLLUTION : CONSEQUENCES CONNUES ET MOYENS D'ENCADREMENT

Les biocides et les médicaments sont fabriqués et utilisés pour leurs effets sur les organismes vivants, respectivement pour les tuer et pour les guérir. De prime abord, il semble donc aisé de conclure que leur dissémination environnementale a un effet sur ces organismes. D'ailleurs, certains cas d'intoxications aiguës sont rapportés et seront présentés dans cette partie. Néanmoins, mesurer de manière chiffrée l'impact de quantités parfois infimes de produits polluants sur l'environnement n'est pas chose facile. En effet, quantifier les effets sur les populations, la disparition d'espèces, l'augmentation des maladies ou malformations et les modifications de comportement, nécessite un recul et des études approfondies sur le long terme. Au-delà des effets mesurés sur l'environnement, les pouvoir publics, tant au niveau mondial, européen que national, ont pris conscience de l'urgence et de la gravité de la situation.

## II.1. **Conséquences connues sur la biodiversité environnementale**

### II.1.1. Généralités

Charles Darwin et Alfred Wallace furent parmi les premiers scientifiques à reconnaître l'importance de la biodiversité pour les écosystèmes. Ils suggérèrent qu'un mélange de plantes cultivées serait plus productif qu'une monoculture [41]. Bien qu'il y ait des exceptions, des études récentes confirment l'idée qu'une communauté diversifiée de plantes et d'insectes réussit généralement mieux qu'une communauté divisée ou altérée [42]. La diversité biologique se manifeste à plusieurs niveaux, dont ceux des écosystèmes, des espèces, des populations et des individus. Bien qu'il semble qu'une perte moyenne d'espèces peut affecter le fonctionnement d'une large variété d'organismes et d'écosystèmes, l'amplitude de ses effets dépend de l'importance de l'espèce disparue vis-à-vis de son écosystème, comme l'abeille qui permet la pollinisation d'un grand nombre d'autres espèces (voir II.1.2.2.3) [43].

### II.1.2. Impact des pesticides

Les pesticides ont une incidence majeure sur la diversité biologique, de même que la perte d'habitat et le changement climatique. Ils peuvent avoir des effets toxiques sur le court terme sur les organismes qui y sont directement exposés, ou des effets sur le long terme en provoquant des changements dans l'habitat et la chaîne alimentaire. C'est le manque de

sélectivité des pesticides vis-à-vis de leur cible qui provoque la plupart des effets nocifs pour l'environnement. Les animaux absorbent les pesticides via la nourriture ou l'eau d'alimentation, via l'air respiré ou au travers de leur peau ou de leur cuticule.
De nombreux pesticides sont toxiques pour les insectes, les oiseaux, les mammifères, les amphibiens ou les poissons. Certains pesticides utilisés dans l'agriculture peuvent réduire l'abondance des mauvaises herbes et insectes indispensables comme source de nourriture pour de nombreuses espèces.

#### II.1.2.1. Impact sur la flore

La quantité de plantes présentes dans les champs a diminué de plus de 20 %. Pour preuve, certaines plantes non cultivées (ou « mauvaises herbes ») sont menacées d'extinction en Grande-Bretagne [44]. Pourtant, l'aménagement d'une bordure de champ non pulvérisée d'au moins trois mètres de large accroît considérablement la diversité et le nombre de plantes des terres arables et d'insectes qu'elles abritent [45]. Par ailleurs, il a été montré que les champs pratiquant l'agriculture biologique comprenaient jusqu'à deux fois plus d'espèces de plantes et, en moyenne, une couverture des mauvaises herbes deux fois plus large [46].
Plusieurs études menées sur les herbicides en laboratoire ou sur le terrain ont montré de graves troubles au niveau des organismes testés :

- Les herbicides sont très étudiés sur les organismes aquatiques : algues, micro-algues et phytoplancton. Les résultats montrent que la croissance des algues et l'activité des micro-algues sont affectées à des concentrations très faibles [47] et que ces herbicides présentent un danger potentiel pour les systèmes aquatiques [48].
- Aux Etats-Unis, une étude a montré que les écosystèmes aquatiques à l'intérieur ou à proximité des zones traitées à l'hexazinone (un herbicide de la famille des triazines) étaient altérés par ses effets sur les plantes aquatiques [49]. Les autres triazines comme la terbuthylazine et l'atrazine affectent les plantes aquatiques de manière similaire.
- Dans les études de terrain, l'herbicide glyphosate (principe actif du RoundUp®) altère la composition des communautés microbiennes d'eau douce en diminuant l'abondance du phytoplancton microbien et en augmentant la quantité de cyanobactéries [50,51].

Les pesticides peuvent aussi avoir un effet indirect sur la santé de la flore en dégradant la fertilité des sols. En effet, un sol fertile fournit les nutriments nécessaires pour promouvoir la croissance des plantes. Il est constitué d'une communauté active de divers organismes et

présente une structure qui permet la décomposition continue des résidus organiques [52]. Les effets observés des pesticides sur la microflore sont tous unilatéraux [53]:

- Les herbicides de la famille des sulfonylurées sont à l'origine d'une réduction de la croissance des bactéries de sol de type *Pseudomonas* [54] et causent une réduction considérable de la biomasse microbienne de sol sur les 15 premiers jours [55].
- Dans une autre étude, le bromoxynile (un herbicide) a provoqué des changements majeurs dans la composition et la diversité des espèces. Le bromoxynile a inhibé la croissance des bactéries capables de dégrader les produits chimiques dans le sol [56].
- Le captane (un fongicide) et l'herbicide glyphosate ont également causé un changement de composition parmi les espèces bactériennes telluriques, et ce à des concentrations de pesticides du même ordre que celles mesurées dans l'environnement [57].

En somme, les pesticides et notamment les herbicides ont un impact démontré sur la flore de manière directe et indirecte. Ainsi, des plantes « non cultivées » sont aujourd'hui en voie d'extinction, ce qui pourrait avoir un impact sur les insectes dépendants de ces plantes, causant ainsi des perturbations de la chaîne alimentaire. Les herbicides de la famille des sulfonylurées, des triazines et le glyphosate présentent un risque pour les écosystèmes aquatiques (algues notamment). Enfin, les pesticides ont également un impact sur la microflore bactérienne présente dans les sols.

#### II.1.2.2. Impact sur la faune

L'utilisation des pesticides peut entraîner des impacts :

- Directs : disparition d'animaux par ingestion directe du produit ;
- Indirects : ressources vitales polluées telles que l'eau, la nourriture ou la disparition d'espèces entraînant une réduction des réserves en nourriture pour d'autres espèces, etc.

Outre le danger de mort du à l'ingestion directe ou indirecte des pesticides, les animaux peuvent développer des pathologies, une baisse de la fertilité, une modification des organes reproducteurs etc.

#### II.1.2.2.1. Les oiseaux

L'effet des pesticides sur les oiseaux est très étudié. Dès le début des années 50, on a rapporté des mortalités dans des champs traités au DDT (DichloroDiphénylTrichloroéthane) [58]. Il s'agissait d'empoisonnements secondaires, les oiseaux ayant gobé des insectes exposés à des insecticides. A cette époque, les graines étaient enrobées de composés organochlorés tuant de nombreux oiseaux granivores par ingestion de doses létales. Quand la dose ingérée est insuffisante pour causer la mort, il peut apparaître des effets sublétaux. Ainsi le DDT affecte les capacités de reproduction [59] et peut entraîner la ponte d'œufs à la coquille très mince : c'est là l'effet adverse des pesticides le plus important sur les oiseaux [60]. Un livre traite d'ailleurs de ce sujet : Silent Spring [61] (traduction française : Printemps silencieux) écrit par la biologiste Rachel Carson, publié en 1962 et dans lequel la scientifique raconte que cette année-là, aucun oiseau ne chantait, d'où un printemps silencieux, suite à l'emploi massif de DDT dans la région dans laquelle elle habitait.

La diminution du nombre d'oiseaux semble coïncider avec l'utilisation de pesticides dans les zones agricoles :

- En Europe de l'ouest, le nombre d'oiseaux de zones agricoles représente aujourd'hui la moitié de ce qu'il était en 1980. Tandis que les populations moyennes de tous les oiseaux communs et des forêts ont diminué d'environ 10 % en Europe entre 1980 et 2006, les populations des oiseaux des zones agricoles ont chuté de 48 %. Ce chiffre est issu d'une étude menée dans 21 pays européens [62].
- Cette année, une étude publiée dans le journal « Nature » fait le lien entre diminution du nombre d'oiseaux et pesticides. Au-delà des effets directs (dose létale) des pesticides sur ces populations, c'est un effet indirect qui est avancé. En effet, la rémanence de certains produits (comme l'imidacloprid) et la raréfaction des insectes mangés par les oiseaux sont considérées comme critique [63].

#### II.1.2.2.2. Les mammifères

Les morts de mammifères imputables aux pesticides sont généralement la conséquence de l'ingestion d'une nourriture contaminée. Les prédateurs accumulent des quantités de résidus plus élevées dans leur organisme que les herbivores. En France, des renards ont été empoisonnés par des résidus de bromadiolone (un anticoagulant utilisé comme rodenticide) présents dans le tissu corporel de leurs proies [64]. Au Royaume-Uni, suite au contrôle de la population de rats aux rodenticides, les populations locales de mulots sylvestres, campagnols roussâtres et campagnols agrestes ont décliné de manière significative [65]. On a, d'autre part,

montré que l'exposition péri- ou néonatale de mammifères à des pesticides comme l'aldrine, l'atrazine, le chlordane et la dieldrine pouvait perturber de diverses façons leur différenciation sexuelle [66].

#### II.1.2.2.3. Les insectes pollinisateurs : l'exemple des abeilles

La FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations ou l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture en français) estime que sur les 100 espèces culturales qui assurent 90 % des approvisionnements alimentaires de 146 pays, 71 sont pollinisés par les abeilles (essentiellement les abeilles sauvages). La valeur monétaire annuelle des services de pollinisation dans l'agriculture mondiale pourrait atteindre 200 milliards de dollars [67].

Plusieurs études ont montré l'effet de certains pesticides sur les abeilles :

- Au Royaume-Uni, sur 95 incidents d'empoisonnement d'abeilles (où la cause a pu être identifiée) entre 1995 et 2001, les organophosphorés ont causé 42 % de ces incidents, les carbamates 29 % et les pyréthroïdes 14 % [68].
- En France, une étude a montré la désorientation des abeilles à cause du thiamethoxam. Pour le démontrer, une équipe a marqué 653 abeilles avec des puces de radio-identification, ce qui a permis de suivre leurs déplacements. Ils ont ensuite donnée à certaines d'entre elles une dose de thiamethoxam communément retrouvée dans l'environnement et constaté qu'elles avaient du mal à retrouver la ruche (le pesticide interférant avec leur système cérébral de géolocalisation) provoquant la mort d'un grand nombre d'entre elles [69].
- Au Royaume-Uni, une équipe a exposé des jeunes bourdons à des doses d'imidacloprid comparables à celles rencontrées dans l'environnement. Les chercheurs britanniques ont comparé le poids des deux types de nids (animaux, cire, miel, larves, pollen) avant et après l'expérience, et constaté que les colonies exposées avaient trouvé moins de nourriture, étaient plus petites, et qu'elles produisaient 85 % de reines en moins [70].

#### II.1.2.2.4. Les amphibiens et espèces aquatiques

Les espèces aquatiques sont particulièrement exposées car une grande partie des substances polluantes passent dans l'eau (voir I.2). Pour preuve, deux études réalisées dans les années 2000 ont étudié les données recueillies sur près de 936 populations d'amphibien. Elles ont mis en évidence la réduction des populations voire la disparition de certaines espèces

depuis les années 1950 [71,72]. D'autres études ont montré l'impact des pesticides et notamment des organochlorées sur plusieurs espèces en déclins (notamment les rainettes) [73-75]. Par ailleurs, des effets de perturbations endocriniennes mettant en cause l'atrazine (un herbicide systémique) et pouvant provoquer le changement de sexe des amphibiens ont été constatés, et ce même à des concentrations très faibles [76,77]. Les pesticides peuvent également provoquer des dégâts importants dans la faune aquatique, les mortalités de poissons étant les plus spectaculaires. Les auteurs de cette étude américaine estiment qu'entre 1977 et 1987, aux États-Unis, 6 à 14 millions de poissons sont morts, chaque année, à cause des pesticides [78].

#### II.1.2.2.5. Les reptiles

D'après la société zoologique de Londres, 19 % des reptiles de la planète sont menacés d'extinction. L'une des causes avancées est la présence de pesticides dans l'environnement. Plusieurs études font état de situations critiques [79] :

- Une étude sur les œufs de tortues a été réalisée [80]. Si l'effet d'un mélange d'herbicides semble ne pas influer sur le taux de mortalité ou la taille des œufs, le metam sodium (un herbicide et fongicide) utilisé dans les plantations de pomme de terre provoque 100 % de mortalité.
- Une revue de la littérature se basant sur des études de laboratoire et des études de terrain conclut que les reptiles sont de bons modèles pour l'étude des composés modifiant le système endocrinien. En effet, les différentes espèces de reptiles ont des modes de différenciation sexuelle variés (détermination génotypique ou dépendant de la température). Il a ainsi été montré que l'exposition embryonnaire aux hormones naturelles et à de nombreux produits chimiques, comme les PCB ou les herbicides, peuvent modifier de façon permanente le fonctionnement du système reproducteur [81].

Ces nombreuses études de l'impact des pesticides sur la biodiversité environnementale montrent que les pesticides disséminés dans l'environnement peuvent de manière directe ou indirecte provoquer de graves conséquences sur la faune et la flore. Une étude résume ce constat [82] : au Canada, une équipe a montré que parmi 62 espèces en danger, les pertes ont été beaucoup plus étroitement liées aux quantités de pesticides utilisés (ou plus généralement de l'agriculture intensive) qu'à la perte d'habitat. Les auteurs ont conclu que les pesticides ont joué un rôle majeur dans le déclin des espèces menacées.

### II.1.3. Impact des médicaments

Les médicaments étant des substances conçues et prescrites au patient pour les guérir, on peut supposer qu'elles peuvent également induire des effets chez les autres êtres vivants.

A titre d'exemple, deux études font état de la diminution drastiques de vautours au Pakistan et en Inde liée à l'accumulation de résidus d'un anti-inflammatoire : le diclofénac, provoquant une insuffisance rénale entraînant la mort. L'exposition a probablement lieu lorsque les vautours se nourrissent de carcasses de bétails traités avec ce médicament [83,84]. Avec des effectifs de dizaines de millions d'individus il y a encore une vingtaine d'années, trois espèces autochtones de vautours ont ainsi été inscrites dès le début des années 2000 dans la catégorie « en danger critique d'extinction » par l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature).

Ceci dit, l'éventualité d'un risque aigu, c'est à dire à court terme, lié à la présence de résidus de médicaments dans les écosystèmes, notamment aquatiques, apparaît cependant faible (sauf en cas de pollution accidentelle) en raison des faibles concentrations dans les eaux. En revanche, le risque d'effets chroniques (effets à long terme) sur les écosystèmes ne peut être exclu. Certaines classes de substances pharmaceutiques ont ainsi été identifiées comme présentant un risque pour certaines familles d'organismes :

- Les médicaments anticonvulsivants tels que la carbamazepine ou le diazepam ont des effets sur le comportement de la perche [85].
- Les antibiotiques tels que l'amoxicilline, l'érythromycine et la tétracycline individuellement ou en mélange ont été testés sur différents organismes aquatiques (cyanobactérie, algue verte, daphnie (petit crustacée), poisson). Des effets toxiques sur le développement, la reproduction, la production d'oxygène ont été montrés à des concentrations très faibles [86,87].
- Les hormones tels que l'éthinylestradiol ou la progestérone (ou des molécules à structure mimétiques comme les alkylphénols tels que le nonylphénol) constituent l'un des exemples les plus connus car très médiatique de la féminisation des poissons. Selon plusieurs études, les poissons exposés à ces différentes substances présentent des changements de sexe, des malformations des gonades, une diminution de la spermatogénèse, des problèmes de la reproduction ou un hermaphrodisme [88-90].
- Les anticancéreux tels que le cisplatine, la doxorubicine ou l'imatinib ont montré une toxicité aiguë et chronique sur la chaîne alimentaire primaire de l'environnement aquatique (Daphnie, Brachionus et Thamnocephalus). Ainsi, le cisplatine et la doxorubicine présentent des effets écotoxicologiques aiguës à de très faibles

concentrations. Une toxicité chronique a également été mesurée provoquant une diminution de 50 % de la reproduction des crustacées du genre daphnie [91].

Ces nombreuses études sur les effets des pesticides et des médicaments montrent que leurs impacts sur les organismes de notre environnement sont loin d'être négligeables. Que ce soit des expositions aiguës ou chroniques, le risque demeure. Une interrogation reste néanmoins en suspens : y a-t-il un danger pour l'homme ?

## II.2. **Conséquences connues sur l'Homme**

Les conséquences connues des substances polluantes de l'environnement sur l'homme concernent le plus souvent les pesticides et les produits industriels. Ces substances sont plus facilement étudiées car elles sont susceptibles de par leur propriétés toxiques recherchées sur les plantes ou les animaux, d'occasionner des effets toxiques chez l'homme. De manière générale, tout un chacun connaît le danger des pesticides mais l'étude bibliographique présentée ci-après permet de chiffrer et de cerner l'ensemble des potentiels effets occasionnés par ces molécules sur l'homme. Certaines populations sont exposées à des doses plus élevés de polluant que la population générale. Cela permet de mettre en évidence plus aisément des effets néfastes sur l'homme. C'est le cas notamment des agriculteurs confrontés quasi quotidiennement aux pesticides. Depuis quelques temps, les effets des pesticides sur l'homme sont de plus en plus étudiés. Bien que l'étude des mécanismes d'actions des pesticides sur notre organisme soit complexe et encore mal connu, de nombreux effets macroscopiques ont été mis en évidence. Ainsi, le nombre d'articles publiés ces dix dernières années comportant les mots « pesticides » et « santé humaine » a considérablement augmenté. En 10 ans le nombre de publications est proche de 7000, c'est-à-dire 2000 de plus qu'entre 1946 et 2004. On distinguera dans la suite de cette partie les effets aiguës et les effets chroniques des substances chimiques polluantes. L'étude de résidus médicamenteux est quant à lui plus difficile à évaluer car ces molécules sont utilisées à la base pour soigner.

### II.2.1. Effets des pesticides sur l'Homme

En 1990, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié un rapport [40] sur l'utilisation des pesticides et ses conséquences sur la santé publique. Les données recueillies par l'OMS et le Programme des Nations-Unies pour l'Environnement (PNUE) ont estimé qu'il y a chaque année dans le monde 1 million de cas graves d'empoisonnement aux

pesticides conduisant à 220 000 décès (intoxications aiguës) et le recensement de plus de 14 000 cas de contaminations chroniques avérées. Selon l'organisme, l'exposition prolongée peut accroître le risque de troubles du développement, de la reproduction, de la fonction du système nerveux et du système respiratoire. Elle peut aussi perturber le système immunitaire et endocrinien et augmenter le développement de certains cancers. Les effets sont particulièrement délétères sur les enfants et lorsque les personnes ne sont pas protégés (combinaison, masques, gants). L'OMS présente également les populations à risques comparativement à leur degré d'exposition (Figure 9).

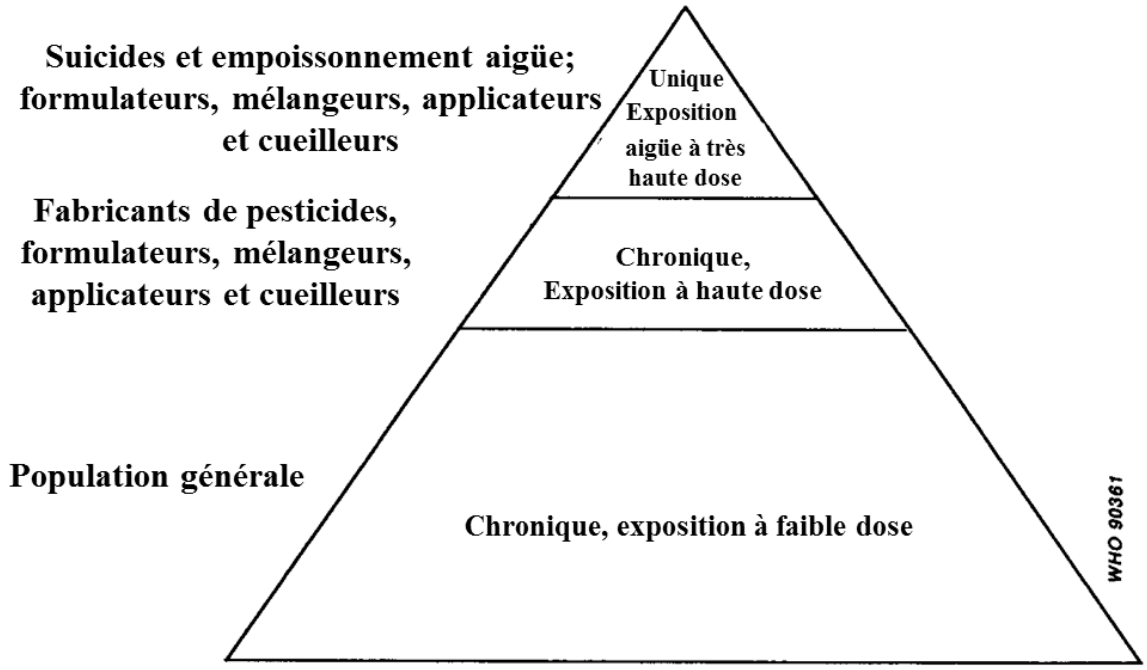



**Figure 9 : Groupes de population à risque liés à l'exposition des pesticides (Adapté du rapport de l'OMS, 1990 [40])**

La surface de chaque partie du triangle indique approximativement la taille du groupe exposée

En 2004, un autre rapport [92] commun publié par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime que les enfants sont exposés à des risques plus élevés d'intoxication par les pesticides que les adultes et ont besoin d'être mieux protégés contre ces substances chimiques, notamment dans les pays en développement. Selon le rapport, le nombre annuel des intoxications par les pesticides se situe entre 1 et 5 millions, dont plusieurs milliers de cas mortels. La plupart des intoxications touchent les zones rurales des pays en développement où les mesures de protection sont souvent inadéquates voire totalement inexistantes. Les pays en voie de développement qui

n'utilisent que 25 % des pesticides produits dans le monde, enregistrent 99 % des décès dus à ce type d'intoxication.

#### II.2.1.1. Cas d'intoxications aiguës

Les intoxications aiguës aux pesticides surviennent dans plusieurs cas : (i) les accidents industriels, (ii) les tentatives de suicide et (iii) une utilisation professionnelle sans protections adéquates.

##### II.2.1.1.1. Les accidents industriels

Plusieurs accidents au cours de ces dernières décennies sont recensés avec des conséquences directes pour les populations vivant aux alentours. Trois exemples sont présentés :

- L'incendie de Schweizerhalle en Suisse près de Bâle en bord de Rhin. C'est une ancienne usine transformée en centre de stockage et contenant lors des faits 1 250 tonnes de produits chimiques composés à 90 % de pesticides. Le 1er novembre 1986, un incendie se déclare dans l'un des entrepôts. Les pompiers et le personnel sur place vont mettre près de 5 heures à le maîtriser. Ils raconteront que les fumées sentaient l'œuf pourri en raison de la présence de mercaptan (un composé soufré). Le bilan de la catastrophe fait état de 30 tonnes de produits toxiques disséminés dans l'air et le Rhin. Outre les conséquences environnementales (l'ensemble de la faune aquatique du Rhin décimé sur 250 km), les fumées et émanations provoquèrent céphalées, irritations oculaires et respiratoires [93].
- L'accident industriel de Bhopal en Inde. Le réservoir 610 de l'usine de la firme américaine « Union Carbide » qui produit des pesticides a explosé la nuit du 2 au 3 décembre 1984 suite à une multitude de négligences. L'ensemble de son contenu, soit 42 000 litres de MIC (Methyl IsoCyanate, en français : isocyanate de méthyl, un intermédiaire de réaction utilisé dans la synthèse des carbamates), s'est volatilisé envahissant toute la ville de Bhopal. Le bilan de cette catastrophe fut très lourd, le dernier en date fait état de 7600 morts et plus de 300 000 blessés ou handicapés à plus ou moins long terme lié à des affections oculaires (jusqu'à la cécité), respiratoires et digestives [94].

- L’accident industriel de Seveso en Italie. La surchauffe d’un réacteur produisant du 2,4,5-trichlorophénol (intermédiaire de réaction pour la production d’herbicides et de bactéricides entre autre) a libéré un nuage toxique contenant notamment de grande quantité de dioxines (de 1 à 10 kg). Les habitants aux alentours développèrent un trouble de la peau : une chloracné (appelé également acné chlorique). Cette grave affection de la peau provoque des boursouflements, kystes et pustules qui résultent d’une modification dégénérative des processus de différenciation des cellules des glandes sébacées. [95,96].

#### II.2.1.1.2. Les intoxications suite à une tentative de suicide

L’OMS indique qu’en moyenne 3000 personnes se suicident chaque jour [97]. L'ingestion de pesticides est l'un des modes opératoires les plus courants [98]. En effet, ce mode d’autolyse représente 30 % du nombre estimé de suicides sur la planète. Un article [99] suggère que ce problème affecte tout particulièrement les zones rurales, surtout dans les pays asiatiques tels que la Chine, l’Inde et le Sri-Lanka. L’OMS estime même que l’ingestion de pesticides représente 60 à 90 % des suicides dans ces pays [98].

Plusieurs articles relayent des effets macroscopiques après l’ingestion de pesticides :

- Dans l’étude de Zouaoui et coll. [100], 13 cas d’intoxication aiguë au glyphosate ont été recensés dans un hôpital en 7 ans. Sur les 13 patients, 6 sont décédés (3 non pas pu être étudiés). Les manifestations les plus communes ont été l’acidose (7/10), l’ulcération oropharyngée (5/10) et l’arythmie cardiaque (4/10).
- Deux articles font référence à une intoxication aiguë à l’amitraz (un acaricide). Les premiers symptômes relevés sur 60 patients ont été la perte de conscience, les nausées et les vomissements. Les résultats cliniques montrent une bradycardie (rythme cardiaque trop lent), un myosis (diminution de la taille de la pupille), une hypothermie, une hyperglycémie, une hypotension et/ou une dépression respiratoire voire un coma [101,102].
- Un article présente 3 cas d’intoxication à l’endosulfan (un insecticide). Des troubles épileptiques ont systématiquement été relevés avec une activité anormale plusieurs années après l’intoxication observée par électro-encéphalographie (EEG) [103].

En tout état de cause, les effets d'une intoxication volontaire aux pesticides sont dramatiques et provoquent le décès de 250 000 personnes chaque année [98].

#### II.2.1.1.3. Les intoxications aiguës professionnelles et domestiques

Les pesticides peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion ou par inhalation. Les manifestations peuvent se limiter à des signes locaux : irritations cutanéomuqueuses, réactions allergiques cutanées ou oculaires, vomissements, toux, gêne respiratoire ou bien traduire l'atteinte d'un ou plusieurs organes ou systèmes : foie, rein, système nerveux central. On parle alors d'effets systémiques. L'intoxication massive peut avoir des conséquences graves, parfois mortelle.

En France, la Mutualité Sociale Agricole (MSA), qui a en charge la médecine du travail et la prévention des risques professionnels des salariés agricoles, a trouvé des effets indésirables chez 20 % des manipulateurs lors d'enquêtes portant sur une année d'utilisation professionnelle de pesticides [104]. Depuis 1991, la MSA a mis en place un dispositif à l'attention des utilisateurs de produits phytosanitaires (à l'aide d'un numéro de téléphone) qui leur permet de signaler leurs symptômes, gratuitement et de manière anonyme : « Phyt'attitude ». La synthèse des observations sur les années 2002-2003 met la lumière sur les substances les plus préoccupantes, les circonstances d'intoxications courantes ou non, et sur les différentes pathologies recensées. Les manifestations cutanées représentent 25 % des signalements, les troubles hépato-digestifs 23 % et les troubles neurologiques et neuromusculaires 12 %. Dans 58 % des signalements, une intervention médicale a été nécessaire et 22 % ont nécessité une hospitalisation. La majorité des signalements a concerné les insecticides (33 %), les fongicides (31 %) et les herbicides (23 %). La vigne et les céréales sont les cultures où les signalements d'accidents sont les plus nombreux (18 et 16 % respectivement). La MSA relève que la contamination a lieu dans 66 % des cas lors de l'application mécanisée ou manuelle ou lors de la préparation des pesticides [104].

D'autre part, les centres antipoison recueillent un grand nombre de cas d'intoxications par les pesticides. Ils représentent, selon les centres 3 à 8 % de leur activité soit 5 000 à 10 000 cas annuels en France. Les jeunes enfants sont aussi fréquemment victimes d'intoxications par les pesticides, à la suite d'ingestions accidentelles ou après contact cutané ou oculaire [105].

Les populations les plus exposées sont aussi celles chez qui on recense le plus d'effets liés à une exposition aiguë des pesticides. Plusieurs troubles sont récurrents : céphalées, vomissements, irritations cutanées, érythèmes, prurits. On remarque également que les

symptômes sont très proches voire identiques à ceux observés lors de tentative de suicide par ingestion ce qui montre bien le degré d'exposition des agriculteurs et applicateurs aux pesticides qu'ils utilisent.

#### II.2.1.2. Effets chroniques

Les effets retardés sont plus difficiles à repérer que les effets aigus. Les maladies potentiellement liées aux expositions à long terme aux pesticides sont essentiellement étudiées dans les populations professionnellement exposées. La détermination des impacts des pesticides sur la santé repose sur la mise en évidence d'effets chez les personnes exposées par rapport à des personnes non exposées (on parle alors d'approche épidémiologique). Cette approche permet d'étudier l'impact des différents facteurs (comportements, habitudes de vie...) sur la survenue d'une maladie.

##### II.2.1.2.1. Pesticides et cancer

Sans qu'il soit possible, en l'état actuel des connaissances, d'estimer avec précision la part de l'augmentation de l'incidence des cancers liée aux expositions environnementales, le lien entre l'apparition de certains cancers et les expositions environnementales est clairement établi [106,107]. Pour l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS), 5 à 10 % des cancers seraient liés à des facteurs environnementaux, 4 à 8,5 % des cancers seraient liés aux expositions professionnelles et 25 à 30 % des cancers seraient imputables aux comportements individuels (tabagisme, alcool, obésité) [107].

Les études sur le lien entre exposition professionnelle aux pesticides et cancer ne sont pas nouvelles. Dès 1993, une vaste cohorte prospective a été mise en place par le National Cancer Institute (Agricultural Health Study, AHS) aux États-Unis [108]. Elle comprenait 52 395 agriculteurs utilisateurs de pesticides de l'Iowa et de la Caroline du Nord, 32 437 conjoints et 4 916 applicateurs professionnels. Les résultats obtenus ont permis de réaliser de nombreuses publications : actuellement 200 sur cette seule cohorte. Les effectifs utilisés procurent une puissance statistique bien supérieure à la plupart des études cas-témoins menées sur le sujet. En France, l'étude AGRICAN (AGRIculture et CANcers) coordonnée par le GRECAN (Groupe Régional d'Etudes sur le CANcer) de Caen et la MSA a suivi une population d'agriculteurs en activité ou à la retraite de 12 départements [109]. En tout, le questionnaire a été envoyé à plus de 600 000 personnes.

De manière générale, les études épidémiologiques montrent que les agriculteurs sont en meilleure santé que la population générale et qu'ils ont moins de cancers : - 23 % selon

l'étude AGRICAN, - 12 % pour les agriculteurs et - 16 % pour les conjoints selon l'étude AHS. Ces résultats « inattendus » proviennent certainement des habitudes de vie de ces populations (plus d'activité physique, moins de fumeurs). Cette sous-incidence était retrouvée de façon très nette pour les cancers pulmonaires (- 50 %) et pour les cancers digestifs (- 16 %). En revanche, une tendance à un risque plus élevé a été observée pour le cancer du sein mais uniquement chez les agricultrices (+ 9 %) et pas chez les conjointes d'agriculteurs (+ 1 %). Le cancer de la prostate serait également plus fréquent dans cette cohorte (+ 24 %). Une tendance à un risque plus élevé était observée pour les myélomes multiples (+ 25 %) [110,111]. Par ailleurs, de nombreuses corrélations ont pu être mises en évidence entre pesticides et certains cancers sur ces mêmes cohortes :

- L'utilisation de pesticides chlorés parmi les agriculteurs de plus de 50 ans et le bromure de méthyle ont été significativement associées au risque de cancer de la prostate, le risque de cancer de la prostate augmentant de 14 % dans ce groupe [112].
- L'exposition des parents aux pesticides peut contribuer au risque de cancer chez les enfants. La corrélation entre cancer de l'enfant et application des pesticides par les parents a été réalisée sur 17 350 enfants. Le risque de cancer pédiatrique est augmenté de 36 %. Parmi les cancers recensés, les risques de lymphomes (tous confondus) sont augmentés de 118 % et le risque de lymphome de Hodgkin est augmenté de 156 %. Par ailleurs, un risque accru de cancer de 98 % a été détecté chez les enfants dont les pères n'utilisaient pas de gants résistants aux produits chimiques [113].
- L'utilisation de pesticides est également associée à un risque accru de dépression allant de 10 à 90 % selon le type de pesticides et les groupes d'agriculteurs étudiés [114].
- Des effets significatifs ont été mis en évidence entre le type de culture et asthme comme le montre cette étude [115]. Ainsi, l'asthme allergique est plus important de 43 % dans la viticulture, 58 % dans l'arboriculture, 66 % dans les cultures de serres, 35 % dans les cultures de prairies et 52 % pour les betteraves.
- Un risque élevé de bronchite chronique a été révélé chez les éleveurs de bétail (+ 24 %) et chez les producteurs de pomme de terre (+ 33 %) selon cette étude sur la cohorte AGRICAN [116].

#### II.2.1.2.2. Pesticides et trouble de la reproduction et du développement du fœtus

Les pesticides peuvent être la source de stérilité ou exercer une fonction de perturbateurs endocriniens, c'est-à-dire qu'ils interfèrent avec le fonctionnement du système

hormonal et engendrent ainsi des dommages sur la personne exposée ou sur ses descendants. C'est ce que tend à démontrer ces nombreuses études :

- Une étude épidémiologique sur 332 femmes a montré un risque de stérilité 27 fois plus important lors d'utilisation d'herbicides et 3,3 fois plus important lors d'utilisation de fongicides. Les facteurs de risques comportementaux ont également été évalués et se sont révélés d'impact bien inférieur à l'utilisation des pesticides : 1,8 fois plus pour la consommation d'alcool et 1,6 fois plus pour le tabagisme [117].
- Une autre étude s'est intéressée aux troubles du développement du système reproducteur masculin durant la grossesse. Ainsi, 113 couples mères-fils (91 mères exposées aux pesticides dans les serres et 22 mères non exposées professionnellement) ont été suivis. La position et le volume des testicules, la longueur du pénis, la position ainsi que l'ouverture de l'urètre ont été analysés après la naissance sur les nourrissons de 3 mois. Les résultats montrent une prévalence de la cryptorchidie (non descente de l'une ou des deux testicules) de 6,2 %. Les garçons de mères exposées ont montré une diminution du volume des testicules, de la concentration de testostérone et de la longueur du pénis [118].
- La qualité du sperme a également été étudiée. Pour cela, 86 échantillons ont été prélevés (50 échantillons provenant d'agriculteurs du Midwest des Etats-Unis *versus* 36 témoins provenant de grandes villes comme Los-Angles ou New-York). Les urines des patients étaient prélevées au même moment. Les résultats montrent une dégradation de la qualité du sperme (concentration des spermatozoïdes, morphologie, mobilité) en fonction de la présence de pesticides dans les urines tels que l'atrazine, l'alachlore ou le métolachlore [119,120].
- Les pesticides peuvent également impacter le développement du cerveau des enfants exposés in utero. Ce sont les conclusions d'une étude américaine publiée en 2012 [121]. Les auteurs se sont intéressés aux conséquences de l'exposition au CPF (ChlorPyriFos-éthyl) de femmes enceintes sur la morphologie du cerveau en utilisant l'imagerie par résonance magnétique sur 40 enfants. L'exposition des mères à ce pesticide a été établie à l'aide d'analyses du sang du cordon ombilical qui est un bon indicateur de l'exposition de la mère durant les dernières semaines de grossesse. En comparant 20 enfants de 6 à 11 ans qui avaient les niveaux d'exposition fœtale au CPF le plus élevé à 20 enfants du même âge moins exposés, les scientifiques ont observé un développement cérébral altéré chez le premier groupe. Les cerveaux de ces enfants présentaient plusieurs types d'anomalies : un élargissement de certaines régions, associé à de moins bonnes performances aux tests cognitifs à l'âge de 7 ans ainsi

qu'une diminution de l'épaisseur du cortex frontal et pariétal. Le CPF, présent dans de nombreuses préparations, inhibe l'acétylcholinestérase, une enzyme qui dégrade l'acétylcholine, un des principaux neurotransmetteurs excitateurs du cerveau. Ce pesticide augmenterait ainsi la quantité d'acétylcholine dans le cerveau. Ces anomalies cérébrales trouvées chez ces enfants pourraient être associées à des troubles neurocognitifs ou neuropsychologiques durables.

#### II.2.1.2.3. Pesticides et maladies neurologiques

Les troubles neurologiques sont des anomalies du système nerveux. Elles peuvent être structurelles, biochimiques ou électriques et, toucher le cerveau, la moelle épinière ou les nerfs. Or, de nombreux pesticides ciblent le système nerveux des insectes nuisibles pour les tuer. De telles substances peuvent donc également être neurotoxiques pour les hommes. Pour mesurer le pouvoir neurotoxique des pesticides (notamment des organophophates), une étude épidémiologique [122] a été menée sur des ouvriers viticoles girondins. Les auteurs ont suivi 929 personnes âgées de 42 à 57 ans dont 784 ayant subi une exposition directe ou indirecte aux pesticides pendant 12 ans. Les autres constituaient le groupe témoin non exposé. Les résultats ont montré que les personnes exposées présentaient des performances altérées aux tests neurocomportementaux par rapport aux sujets modèles. Les altérations retrouvées touchent particulièrement les fonctions les plus fines de la cognition qui permettent au cerveau de gérer les liens entre les informations entrantes et sortantes : attention, conceptualisation et attention contrôlée. Quatre ans plus tard, l'expérience a été répétée de la même manière sur 614 ouvriers encore disponibles [123]. Les résultats ont confirmé les conclusions précédentes : les personnes exposées aux pesticides présentaient des performances moindres à l'ensemble des tests. Cela dit, les résultats étaient encore plus inquiétants car les sujets disposant des scores les meilleurs au départ de l'étude présentaient une baisse des performances plus élevée. Les auteurs ont conclu que l'exposition prolongée aux pesticides est capable de réduire les capacités de réserve cognitive. L'ensemble de ces résultats a pu être relié à l'exposition à certains organophosphates.

##### II.2.1.2.3.1. La maladie d'Alzheimer

Si de nombreux facteurs de risques tels que l'âge ou la génétique sont impliqués dans le déclenchement de la maladie d'Alzheimer, il semblerait que l'exposition aux pesticides joue également un rôle. En effet, les pesticides organochlorés et organophosphoré inhibent l'acétylcholinestérase au niveau des synapses dans les systèmes somatiques, autonomes et

nerveux central. Une étude épidémiologique [124] a été réalisée sur plus de 3000 personnes âgés de 65 ans ou plus résidents de la communauté agricole du comté de Cache aux États-Unis. Les auteurs ont examiné le lien entre exposition professionnelle aux pesticides et maladie d'Alzheimer. Les résultats montrent que les personnes exposées aux pesticides ont respectivement 38 % et 42 % de risques en plus d'être atteint de démence et de la maladie d'Alzheimer que les personnes non-exposées. Une autre étude a été réalisée en Espagne sur 17 000 patients en étudiant les cas de maladie d'Alzheimer à partir des fichiers informatisés d'un hôpital. Les résultats montrent que la prévalence de la maladie d'Alzheimer est deux fois plus élevée chez les personnes vivant dans les zones à forte exposition aux pesticides comparativement aux zones de faible exposition [125]. En France, des résultats similaires ont été obtenus sur une cohorte de 1500 personnes âgées, entre 1992 et 1998. Des performances cognitives inférieures ont été observées chez les sujets qui avaient été exposés professionnellement aux pesticides par rapport à la population non exposée. Chez les hommes exposés aux pesticides, les risques relatifs de développer la maladie d'Alzheimer étaient de 139 % [126].

#### II.2.1.2.3.2. La maladie de Parkinson

Les effets nocifs des pesticides sur le système nerveux central peuvent également jouer un rôle dans l'apparition de la maladie de Parkinson. C'est ce qu'une étude de la *Danish Cancer Society* a étudié afin de trouver un lien éventuel entre l'exposition aux pesticides et la maladie de Parkinson [127]. Pour cela, 808 personnes ont été suivies dont 403 patients atteints de la maladie de Parkinson, et 405 témoins. Tous ont été interrogés via des questionnaires sur leurs habitudes de vie, leur emploi, leur consommation de médicaments et leur exposition aux pesticides. Les résultats montrent que sur les 403 patients atteints de la maladie de Parkinson, 18 % ont reporté une exposition aux pesticides contre 12 % chez le groupe témoin. La comparaison entre le groupe témoin et le groupe Parkinson montre que l'exposition aux pesticides augmente de 76 % le risque de développer la maladie de Parkinson. Parmi les sujets de l'étude, 53 étaient des agriculteurs dont 36 atteints de la maladie de Parkinson et 17 témoins. Ainsi, chez les agriculteurs, le facteur de risque est de 147 %.

Une autre étude a utilisé un système d'information géographique intégrant les informations sur les pratiques agricoles dans une zone résidentielle [128]. Entre 1998 et 2007, les auteurs ont recensé 368 cas de la maladie de Parkinson et 341 contrôles dans cette population. Les résultats montrent que les personnes vivant dans des maisons situées à moins de 500 mètres de zones exposées à deux pesticides (le manèbe et le paraquat) ont un risque accru de 75 % de

développer la maladie de Parkinson. L'étude montre également un effet « cocktail » des pesticides sur les populations âgées de moins de 60 ans. En effet, les sujets ont 2,27 fois plus de risques lorsqu'ils sont exposés au manèbe ou au paraquat seul et 4,17 fois plus de risques de développer la maladie de Parkinson lorsqu'ils sont exposés aux deux pesticides en même temps.

#### II.2.1.2.3.3. L'autisme

Cette proximité du lieu de résidence avec des zones d'applications agricoles de pesticides induisant une exposition chronique des personnes a également permis de faire le lien entre risque d'autisme et pesticides [129]. Une équipe de scientifiques américains a ainsi étudié 465 enfants autistes nés entre 1996 et 1998 et confronté les données d'exposition agricole durant la même période dans les quartiers proches des champs (moins de 500 mètres). Les résultats montrent que les femmes les plus exposées par leur environnement à des pesticides organochlorés comme le dicofol et l'endosulfan pendant le début de leur grossesse ont un risque de donner naissance à des enfants autistes 6 fois plus important que pour les femmes vivant éloignées des zones agricoles. L'étude montre que le risque augmente en fonction des quantités de pesticides utilisés et de la proximité entre la zone d'habitation et les zones d'utilisation des pesticides. Cette étude montre également que la période d'exposition du fœtus est déterminante, le risque étant maximal pendant les semaines 1 à 8 de la grossesse (période de développement du système nerveux du fœtus).

La planète terre comptera bientôt 7,5 milliards d'êtres humains [130]. Pour nourrir l'ensemble de ces individus, l'homme devra nécessairement compter sur des moyens chimiques pour limiter les pertes et augmenter les rendements tout en préservant les terres non cultivées. Par ailleurs, les expositions aux résidus de produits polluants concernent l'ensemble de la population, à travers son alimentation et son environnement. Une étude conduite aux Etats-Unis montre d'ailleurs que des résidus de pesticides sont retrouvés dans le sang, les urines, les tissus adipeux, certains organes et même le lait maternel [131]. Ainsi et comme nous venons de le voir, des troubles de la reproduction aux troubles neurologiques en passant par le cancer, les pesticides peuvent être liés à de nombreuses pathologies. Outre les expositions aiguës résultant d'accident ou de la volonté de se donner la mort, les populations les plus exposées sont les agriculteurs et les personnes habitant à proximité des zones cultivées. Malgré des

effets sur l'Homme de plus en plus décrits, il existe plusieurs raisons pour lesquelles il reste difficile de cerner les effets des pesticides sur la santé [132] :

- La première concerne le nombre de produits à considérer. En effet, il ne s'agit pas d'un produit unique mais d'un ensemble constitué de plus de 500 substances (jusqu'à 1000 si l'on considère les 30 dernières années). Le terme générique « pesticides » regroupe ainsi un grand nombre de composés aux usages variés et de familles chimiques très différentes qui conduisent à des effets toxicologiques différents. Il faut également noter que les formulants ou adjuvants, c'est à dire les produits que l'on ajoute à la substance active pour en améliorer l'efficacité ou l'absorption, peuvent également être à l'origine d'effets sur la santé. Ainsi, l'interaction de plusieurs composés entre eux est encore mal documentée, et l'on ne sait pas aujourd'hui quels peuvent être les effets de tels « cocktails ».
- La seconde difficulté est liée au caractère multifactoriel (plusieurs causes possibles) des pathologies évoquées comme les cancers.
- Enfin, une difficulté supplémentaire résulte de la multiplicité des voies d'exposition (alimentaire, dermique, aérienne…) et des faibles niveaux de contamination observés qui rendent difficile la quantification de l'exposition de la population. Toutes les analyses bibliographiques conduisent au constat que l'évaluation des expositions est aujourd'hui une source d'erreur ou de confusion dans la majorité des études portant sur les effets des pesticides sur la santé car il s'agit d'études épidémiologiques qui sont ajustées par des modèles statistiques complexes avec un pourcentage d'erreur important.

### II.2.2. Effets des résidus médicamenteux sur l'homme

Les résidus de médicaments peuvent paradoxalement être une source de pollution nocive pour l'homme. De prime abord, les médicaments humains ou vétérinaires ont été créés pour soigner ou, à défaut de le faire, tenter de diminuer les symptômes d'une pathologie. Serait-ce possible que les résidus médicaments puissent dans certaines circonstances être nocifs pour l'homme ?

#### II.2.2.1. Généralités

Les données issues des dossiers d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) permettent de mettre en évidence les doses efficaces et toxiques et évaluent les effets sur l'organisme à

court ou moyen terme aux doses thérapeutiques de chaque médicament. Les relations doses-effets concernent, quant à elles, surtout l'efficacité thérapeutique. Les données sont individuelles pour chaque principe actif. Néanmoins, les effets à long terme du médicament ainsi que l'effet d'une exposition chronique à faible dose sur l'organisme au cours d'une longue période (durée d'une vie) sont mal connus. De plus, on dispose de peu de données relatives aux mélanges éventuels (effet « cocktail ») [133].

Il y a cependant des mélanges de résidus de médicaments dans l'eau du robinet et notre alimentation, et ce à des concentrations extrêmement faibles. Il existe donc des voies directes d'absorption et des effets pouvant être synergiques et problématique pour les populations les plus sensibles comme les enfants ou les femmes enceintes. Ceci dit, en l'état actuel des connaissances, une étude a montré que même en buvant deux litres d'eau du robinet par jour pendant toute une vie (70 ans), la dose cumulée, suite à une contamination, ne dépasse pas la quantité d'une prise unique thérapeutique. Il existe une exception pour cinq principes actifs pour lesquels le rapport entre la dose cumulée sur 70 ans et la dose thérapeutique est supérieure à 1 : le clenbutérol (25,5), le cyclophosphamide, le salbutamol, le 17α-éthinylestradiol (2,5) et la terbutaline (2,1), alors que pour 57 autres médicaments testés, ce rapport est compris entre $10^{-4}$ et $10^{-9}$ [134,135]. Ce test a été réalisé en utilisant les concentrations retrouvées dans les eaux de consommation allemande par Ternes et coll, ou, à défaut de résultats positifs, la limite de quantification des systèmes analytiques de cette étude [136]. Néanmoins, aucune donnée chiffrée n'existe quant aux apports liés à l'alimentation générale qui ne sont donc pas considérés dans les conclusions de cet article. Par ailleurs, aucune conclusion hâtive ne doit être tirée de cette expérience. En effet, d'éventuels effets synergiques (ou effet cocktail) doivent être pris en compte avec (i) les médicaments pris par le patient durant sa vie à la dose thérapeutique, et (ii) la multitude de molécules polluantes (pesticides, produits industriels) que nous ingérons toute notre vie en plus de ces infimes quantités de médicaments. De plus, les effets doses-réponse ne sont pas bien connus et des données quantitatives ne permettent pas toujours de conclure quant à une toxicité éventuelle.

#### II.2.2.2. Les beta-agonistes : l'exemple du clenbutérol

Depuis le début des années 1990, des cas groupés d'intoxications suite à l'ingestion d'abats ou de viandes contaminés par du clenbutérol ont été décrits en Espagne (135 cas), en France (dizaine de cas), en Italie (62 cas) et au Portugal (50 cas) [137-140]. Cette utilisation frauduleuse et massive de béta-agonistes comme stimulants de croissance, chez le veau en particulier, est considérée comme un danger sérieux de santé publique. Normalement, les

béta-agonistes comme le clenbutérol sont utilisés en thérapeutique humaine et vétérinaire pour le traitement de problèmes bronchopulmonaires. Les symptômes provoqués chez l'Homme pour une absorption de ces viandes contaminées sont la tachycardie, les céphalées, les tremblements, les palpitations, la nervosité et les contractures musculaires durant plusieurs jours. Une guérison a été observée dans tous les cas.

#### II.2.2.3. Les anticancéreux

Une étude a analysé l'impact de 4 composés pharmaceutiques dont un anticancéreux (le cyclophosphamide) sur la santé par la méthode US EPA (de l'anglais *United States Environmental Protection Agency*) [141]. Cette méthodologie prend en compte des critères comme la qualité de l'eau et l'exposition humaine par l'eau contaminée y compris par l'intermédiaire de la bioaccumulation dans le poisson. Ils comparent les indices de risque pour les effets cancérogènes et non cancérogènes et aboutissent à la conclusion d'une absence de risque appréciable pour l'homme pour chacun de ces composés mais ils déplorent aussi le faible nombre de données dans la littérature et les limites de la méthode qui ne tient pas compte des interactions entre les produits.

#### II.2.2.4. Les antibiotiques

Les antibiotiques notamment à usage vétérinaire sont les médicaments parmi les plus utilisés. Un rapport de l'Anses indique un volume de vente de 782 tonnes en 2012 [142]. Cette utilisation occasionne des effets directs et indirects et même économique comme le montre les différentes études détaillées ci-dessous :

##### II.2.2.4.1. Danger immédiat

Plusieurs études ont établi un lien entre la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait et l'apparition de réactions allergiques immédiates ou chroniques [143-145]. En effet, certaines maladies du bétail exigent un traitement aux antibiotiques qui peut induire, lors d'utilisation inadéquate, la présence de résidus médicamenteux mesurables dans le lait et non détruits par la pasteurisation [145]. Par ailleurs, des effets « inattendus » comme la baisse de la production de yaourts, de beurre et de fromages ont été observée à cause de l'inhibition des bactéries lactiques liée à la trop grande concentration d'antibiotique [146].

Une autre préoccupation est liée à l'apparition d'antibiorésistances chez les éleveurs travaillant dans les fermes aux contacts des animaux comme le montrent plusieurs enquêtes

réalisées par Piddock et coll. sur la résistance aux fluoroquinolones [147,148] ou pas Van den Bogaards et coll. sur la résistance à la vancomycine (un glycopeptide) [149]. Ces effets ont été observés suite à l'utilisation massive d'antibiotiques dans les fermes d'élevage conduisant à un risque accru d'antibiorésistance chez les personnes travaillant dans l'élevage par rapport à la population en zone urbaine. L'antibiorésistance est un phénomène qui peut être très rapide comme le montre cette étude [150]. Une supplémentation en tétracycline a été introduite dans le régime alimentaire de poulets dans une ferme. Les auteurs ont ensuite analysés les fèces des poulets, éleveurs et voisins de la ferme afin de rechercher l'apparition d'antibiorésistance à la tétracycline. Une semaine seulement a suffi pour observer l'apparition d'antiorésistance à des bactéries de type *E.Coli* isolées dans les fèces des animaux. Cette étude a également montré que 31 % des fermiers présentaient eux aussi des souches *E.Coli* résistantes (environ 80 % des coliformes) à la tétracycline 4 à 6 mois après l'introduction de cette pratique.

La population générale est quant à elle exposée aux résidus d'antibiotiques via l'ingestion de poissons, coquillages et viandes commercialisés avec un risque d'altération de la flore intestinale ce qui pourrait augmenter la sensibilité aux infections bactériennes et la sélection de souches antibiorésistantes comme l'ont montré plusieurs études [151-153].

#### II.2.2.4.2. Danger à plus long terme

La question de l'antibiorésistance est aujourd'hui un problème de santé publique dans la population surtout en période de retour de certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne [154]. Le risque le plus important, voire le danger principal, ne provient pas nécessairement des résidus ingérés par le consommateur mais bien de la sélection de bactéries résistantes susceptibles de se transmettre à l'homme par l'alimentation (comme expliqué précédemment), mais aussi et surtout lors de transferts de matériel génétique (plasmides par exemple) chez l'animal jusqu'à l'être humain [155]. Pour preuve, deux patients ont succombé à une infection de genre *Salmonelle* provenant de viandes de porc contaminée [153]. Par ailleurs, l'utilisation importante de fluoroquinolones dans les élevages de poulets aux Etats-Unis a causé une sélection de *Campylobacter jejuni* résistante, ce qui s'est traduit par une augmentation des infections résistantes aux fluoroquinolones de la population du Minnesota de 9 % en 6 ans [156]. L'OMS reconnait d'ailleurs que la plupart des infections à *Salmonella* et à *Campylobacter* chez l'Homme proviennent de l'alimentation, et plus particulièrement des aliments d'origine animale [157]. L'antibiorésistance des pathogènes apparaît donc comme le

résultat direct de l'utilisation thérapeutique et nutritionnelle des antibiotiques chez les animaux destinés à la consommation (Figure 10) [158].

De manière générale, l'application nutritionnelle pour la stimulation de la croissance chez les animaux d'élevage est depuis longtemps controversée. L'utilisation thérapeutique de la tétracycline et de la pénicilline est interdite depuis longtemps au Japon, en Australie, en Nouvelle-Zélande et en Europe (2006), alors qu'elle est encore permise aux États-Unis et au Canada [155]. Sur le même constat, les quinolones sont aujourd'hui des antibiotiques réservés à l'usage humain. En effet, ces antibiotiques efficaces dans les affections humaines ont totalement été prohibés en aquaculture du fait de leur capacité à engendrer des résistances croisées (passage de l'environnement aquatique à l'environnement terrestre) [159-161] et de leur durée de vie prolongée dans les sédiments [162].

L'OMS indique que l'utilisation des antibiotiques dans les élevages terrestres et aquacoles doit être raisonnée et particulièrement surveillée sous peine de multiplications de foyers d'antibiorésistance pouvant causer de grave conséquence sur l'Homme et les animaux [157].

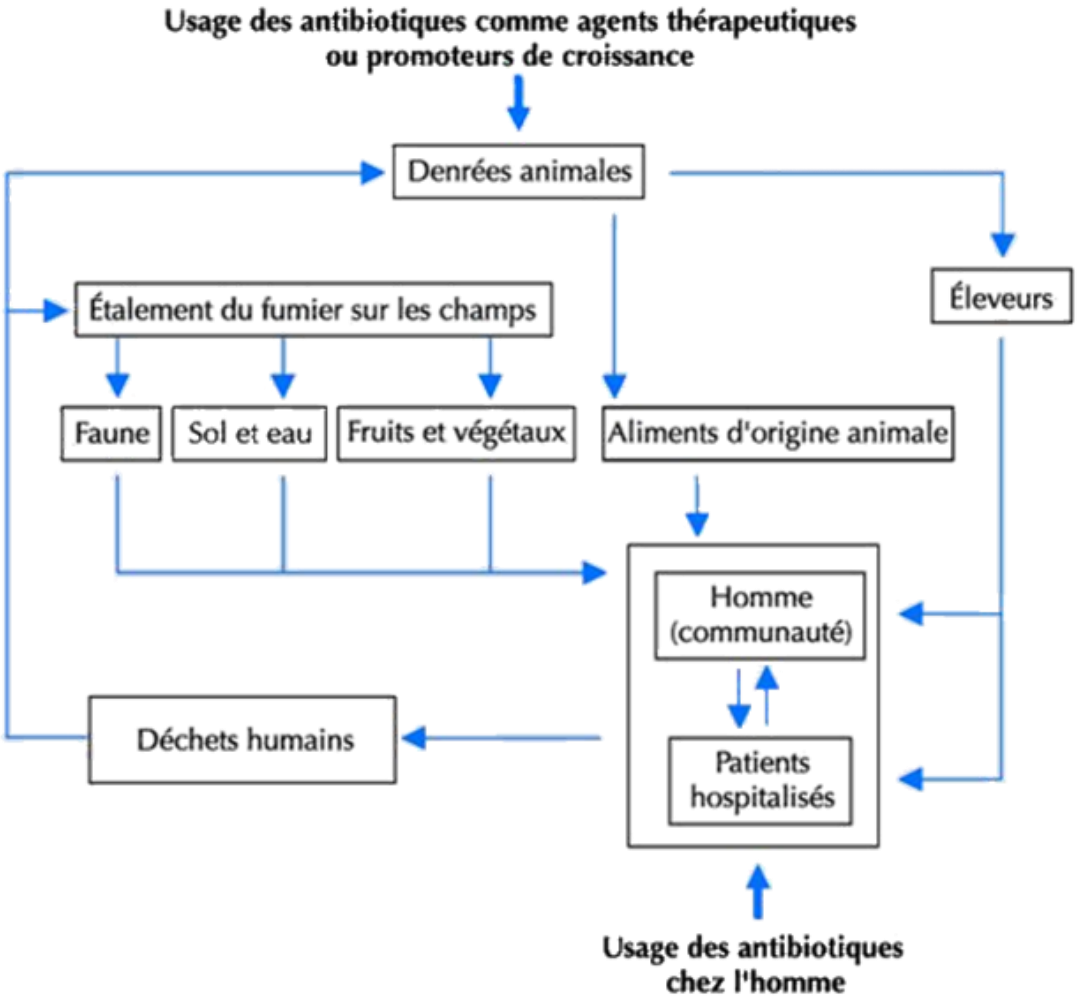



**Figure 10 : relations entre les différents réservoirs de foyers d'antibiorésistances (Adapté de la publication de Moubarek et coll. [153])**

### II.2.2.5. Les dérivés hormonaux

La présence de substances estrogéniques dans l'eau provoque des effets notables sur les organismes aquatiques (voir II.1.3). Ces substances sont très importantes pour le développement humain notamment chez les femmes, de la puberté à la ménopause. Ces produits chimiques peuvent affecter le développement des organes féminins, de la lactation, et joue également un rôle dans l'apparition de fibrome utérin (tumeur bénigne sur la paroi de l'utérus) et de l'endométriose (présence de muqueuse utérine en dehors de l'utérus) [163].
Une étude menée au Danemark [164] a calculé les quantités de l'hormone synthétique 17α-éthinylestradiol utilisée dans les contraceptifs oraux ainsi que les métabolites excrétés naturellement dans l'environnement par les femmes aux diverses périodes de leur vie. L'auteur a également pris en compte les diverses sources d'exposition : l'accumulation qui peut se produire dans du poisson représente une part de 93 % de l'exposition, tandis que l'eau ne représente que 5-6 % de l'apport, les légumes racines 12 % et les légumes feuilles 3 %. Sur ces bases, l'estimation de la dose journalière d'exposition humaine à ces substances s'est avérée être de 1,37 x $10^{-7}$ mg / kg de poids corporel / jour (ce qui fait 0,01 µg / jour pour une personne de 70 kg). Comparativement, la production de 17β-estradiol est d'environ 6 µg/jour chez un garçon pré-pubère et 45-48 µg / jour chez l'adulte. L'auteur conclut donc à l'improbabilité que cette hormone est un effet néfaste chez l'homme. Cependant, le fait que le système endocrinien soit indispensable au maintien des équilibres biologiques nécessaires à la vie explique que l'on s'interroge beaucoup aujourd'hui sur les conséquences d'une éventuelle rupture de cet équilibre par les contaminants de l'environnement. Par ailleurs, cet article n'envisage pas les effets « cocktails » c'est-à-dire l'interaction de cette hormone avec d'autres molécules comme les pesticides ou d'autres médicaments. Il existe d'ailleurs des cas avérés en médecine d'effet synergique entre médicaments. Ces interactions ont donc a priori lieu dans l'organisme et l'auteur ne conclut également pas quant à la présence d'autres perturbateurs endocriniens.

En conclusion quant aux effets des médicaments sur l'environnement et sur l'homme, il existe plusieurs difficultés à l'évaluation des risques pour la santé des Hommes et des animaux ainsi que pour la biodiversité environnementale résultant d'un écosystème complexe fonctionnant sur terre depuis plusieurs milliards d'années :

- La première est le manque de données. En effet, des données existent sur les dangers à des doses thérapeutiques pour l'Homme mais très peu en ce qui concerne les concentrations environnementales. Par ailleurs, les mécanismes d'action ne sont pas toujours connus or il est très difficile d'anticiper les effets potentiels sans les

connaître, qui plus est lorsque cela concerne les espèces non ciblées par la molécule active.

- La deuxième concerne la relation dose-effet. D'après le paradigme de Paracelse qui régit la toxicologie depuis des siècles « Rien n'est poison, tout est poison, c'est la dose qui fait le poison », plus la dose est importante, plus l'effet est grand. Là encore, les données manquent car les doses thérapeutiques ne correspondent généralement pas aux concentrations retrouvées dans l'environnement. Ceci-dit, plusieurs exemples montrent que la dose n'est pas toujours proportionnelle à l'effet. Ainsi, Couper et coll. ont montré que la fluoxétine (un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine) induit une métamorphose significativement plus importante chez le gastéropode à une concentration de $10^{-6}$ qu'à $10^{-4}$ mg, ce qui va à l'encontre du précepte énoncé [165]. Ce type de courbe dose-réponse a également été observé sur d'autres substances chimiques comme l'atrazine ou le bisphénol A [166].
- La troisième est l'exhaustivité des analyses. En effet, dans le prochain chapitre, nous verrons quelles sont les méthodes d'analyse des polluants. Dans l'état actuel, elles sont de plus en plus performantes mais ne prennent pas ou peu en compte les métabolites des médicaments, notamment ceux issus de l'environnement. Par ailleurs, certaines matrices comme les sédiments, les boues, les sols et les plantes sont difficiles à analyser. Il est donc très compliqué d'obtenir des données sur la présence de produits polluants issus de médicaments dans l'environnement et dans l'alimentation humaine et animale.

Dans cette partie, nous avons pu constater que les produits chimiques polluants sont partout dans notre environnement et qu'ils ont des effets, même à faible doses, sur l'homme. On peut également ajouter à notre raisonnement les effets cocktail qui, à ce jour, sont peu étudiés mais qui peuvent augmenter les risques pour l'Homme. Il est donc important d'utiliser ces produits à bon escient. Il existe d'ailleurs des moyens de prévention mis en place à plusieurs échelons afin de tenter de réglementer et rationnaliser l'utilisation des substances comme les pesticides et les médicaments.

## II.3. **Réglementation**

La lutte contre les pollutions (biocides, médicaments et produits industriels et domestiques) constitue un enjeu environnemental, sanitaire et économique. Ces substances dangereuses, même à très faible concentration, dégradent la qualité de l'eau potable, des produits de la pêche, de la conchyliculture (production de coquillages) et des denrées alimentaires terrestres (élevage, arboriculture et agriculture). Elles appauvrissent la biodiversité de nos rivières, lacs et eaux côtières et constituent un danger pour les consommateurs. Certains enjeux sanitaires sont aujourd'hui spécifiquement identifiés.

### II.3.1. Au niveau mondial

Il existe des textes internationaux qui traitent de la problématique des substances chimiques en général :

- La Convention de Bâle

La question de la gestion des déchets dangereux a été l'une des préoccupations internationales relatives à l'environnement dès le début des années 80. La Convention de Bâle sur le Contrôle des Mouvements Transfrontières de Déchets Dangereux et de leurs éliminations a été adoptée le 22 mars 1989 à la suite du tollé provoqué par la découverte au cours cette décennie, en Afrique et ailleurs dans les pays en voie de développement, de dépôts de déchets toxiques importés de l'étranger. La convention a pour principal objectif la protection de la santé humaine et de l'environnement contre les effets néfastes des déchets dangereux. Son champ d'application s'étend à une large gamme de déchets dangereux (catalyseurs métalliques, déchets des industries chimiques tels que les composés phénoliques, hydrocarbures, PCB, goudron soit en tout plus de 3000 indications). Les dispositions de la Convention portent sur les principaux objectifs suivants : i) réduire au minimum la production de déchets dangereux et favoriser leur gestion écologiquement rationnelle quel que soit le lieu de leur élimination ; ii) restreindre les mouvements transfrontières de déchets dangereux sauf lorsque l'on estime qu'ils interviennent conformément aux principes d'une gestion écologiquement rationnelle et iii) mettre en place un système réglementaire s'appliquant aux mouvements transfrontières autorisés [167].

- La Convention de Rotterdam

Cette convention, appelée également « Convention PIC » (de l'anglais, *Prior Informed Consent*) a été adopté le 10 septembre 1998. Elle encourage le partage des responsabilités et la coopération entre pays dans le domaine du commerce international de certains produits

chimiques dangereux, afin de protéger la santé des personnes et l'environnement contre des dommages éventuels. Par ailleurs, elle contribue à l'utilisation écologiquement rationnelle de ces produits chimiques dangereux en facilitant l'échange d'informations sur leurs caractéristiques, en instituant un processus national de prise de décisions applicable à leur importation et à leur exportation et en assurant la communication de ces décisions aux autres pays. La convention vise notamment les pesticides et les produits chimiques industriels qui ont été soit interdits soit strictement réglementés par certains pays, pour des raisons de santé ou de protection de l'environnement. Par ailleurs, cette convention oblige les exportateurs à envoyer une fiche de sécurité actualisée à l'importateur ainsi que l'étiquetage légal conformes aux pratiques du pays importateur [168].

- La Convention de Stockholm

Cette convention a été adopté le 22 mai 2001 avec pour objectif la protection de la santé humaine et de l'environnement via à vis des polluants organiques persistants (POPs). Lors de cette convention, une première liste de polluants a été établie et nommée les « douzes salopards » en référence au film de Robert Aldrich (The Dirty Dozen) : Aldrin, Chlordane, DDT, Dieldrin, Endrin, Heptachlor, Hexachlorobenzene, Mirex, Toxaphene, PCB, Dioxines polychlorées et Dibenzofuranes polychlorés. Ces substances sont prohibées ou fortement déconseillés. Des mesures d'élimination et de remplacement ont également été proposées [169].

### II.3.2. Au niveau européen et national

Le principal objectif de la législation de l'Union Européenne consiste à protéger les denrées alimentaires produites à partir des ressources terrestres et maritimes afin de garantir la santé et la qualité des cultures et des consommateurs de tous les États membres. Face à ces enjeux, plusieurs directives européennes visent à réduire l'impact des substances dangereuses sur l'environnement en fonction du milieu (eau, culture) et des substances utilisés [170].

D'une manière générale, on ne peut distinguer les textes de l'Union Européenne des textes nationaux. En effet, la procédure d'homologation d'un produit chimique, quel qu'il soit, comporte deux phases :

- La première partie porte sur une évaluation par des substances actives dans le cadre de directive européenne au niveau communautaire.
- La seconde partie est décidée par chacun des Etats membres en accordant une autorisation de mise sur le marché (AMM) sur la base de nouvelle évaluation nationale ou non.

### II.3.2.1. Réglementation sur les biocides

- Au niveau européen, c'est la directive 98/8/CE qui régit l'évaluation de ces produits biocides en vue d'une mise sur le marché. Cette réglementation vise à assurer un niveau de protection élevé de l'homme, des animaux et de l'environnement en limitant la mise sur le marché aux seuls produits biocides efficaces présentant des risques acceptables et en encourageant la mise sur le marché de substances actives présentant de moins en moins de risque pour l'homme et l'environnement. Les mesures visent notamment à prévenir les effets à long terme : effets cancérogènes ou toxiques pour la reproduction, effets des substances toxiques, persistantes et bioaccumulables [171].

- Au niveau national, c'est l'arrêté du 16 décembre 2004 qui a été mis en place. Ce texte stipule que c'est l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) qui réalisera l'enregistrement des déclarations de produits biocides et leur évaluation [172]. Les dispositions prises au niveau national sont (i) la lutte contre l'empoissonnement, (ii) l'obligation d'étiquetage et (iii) l'obligation de télé-déclaration. A ce jour, plus de 23 000 préparations biocides ont été acceptées dans le cadre de cette homologation [173].

### II.3.2.2. Cas particuliers des produits phytosanitaires

La commercialisation et la distribution des produits phytosanitaires sont soumises à la demande d'une autorisation de mise sur le marché. Le conseil de l'Union Européenne a harmonisé les conditions d'obtention pour les états membres dans la directive CE 1107/2009 [174]. Les anciens arrêtés de la loi française sont abrogés par ce texte. Pour obtenir l'autorisation, le produit devra subir une évaluation de sa substance active suivant différents critères :

- Les propriétés physico-chimiques : inflammabilité, explosivité, solubilité dans l'eau et les solvants, pression de vapeur saturante.
- L'évaluation de la toxicité sur l'homme : profils de pénétration et d'élimination de la substance dans l'organisme, mesure de la toxicité aiguë, du risque allergique, de la toxicité subaiguë sur des mammifères pour y tester la tératogénèse, du pouvoir mutagène et cancérogène. Ces différentes études permettront de définir une Dose Journalière Admissible (DJA, exprimée en µg / kg / jour) ainsi qu'une dose d'exposition acceptable pour l'applicateur (AOEL de l'anglais *AcceptableOperator Exposure Levels*).

- L’évaluation des résidus dans les végétaux, produits de transformations et les denrées alimentaires destinées aux animaux. Cela comprend l’étude du métabolisme des plantes destinées à être traitées ainsi que le suivi des potentiels résidus dans les végétaux traitées et les denrées alimentaires produits à partir de ces plantes. Ces études servent à définir les limites maximales de résidus (voir II.3.2.4).
- L’évaluation du devenir de la substance et de son comportement dans l’environnement. Ces études comprennent la dégradation dans l’eau, l’air, les sols, à la lumière, la migration de la substance ou de ses métabolites dans les eaux de surface et souterraines ainsi que sa rémanence.
- L’évaluation de la toxicité sur la faune et la flore. Les études comprennent la toxicité sur les oiseaux, les organismes aquatiques (poissons, crustacés, algues), les mammifères terrestres, les reptiles, les bactéries du sol, les insectes et en particulier les abeilles.
- L’évaluation de l’efficacité, incluant la prise en compte de la résistance des agresseurs visés, l’incidence sur le rendement des cultures, la qualité des végétaux produits, l’innocuité sur les cultures voisines ainsi que sur les animaux non visés (dommages collatéraux).

#### II.3.2.3. Réglementation sur les médicaments à usage humain

Au même titre que les produits phytosanitaires, une spécialité pharmaceutique doit disposer d’une AMM pour être commercialisée en France. Elle peut être délivrée soit (i) par la commission européenne après une évaluation par l’agence européenne du médicament (il s’agit dans ce cas d’AMM communautaires ou centralisées), soit (ii) par l’Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Il s’agit alors d’une AMM nationale.

Les AMM sont accordées si l’évaluation des effets thérapeutiques positifs du médicament ou produit au regard des risques pour la santé du patient ou la santé publique liés à sa qualité, à sa sécurité ou à son efficacité est considérée comme favorable. L’AMM est délivrée pour une durée de 5 ans, et peut être renouvelée de manière illimitée [175]. Il est à noter qu’à ce jour, aucune contrainte réglementaire n’existe pour le suivi et le devenir des médicaments dans l’environnement à l’exception de sa biodégradabilité.

### II.3.2.4. Limite réglementaire

Il existe pour les pesticides des études réalisées au moment de leurs mises sur le marché et qui évaluent leurs devenirs dans les cultures qu'ils protègent, dans les produits de transformation et dans l'eau.

- Limite Maximale de Résidus (LMR) dans les denrées alimentaires

Les LMR sont les niveaux supérieurs de concentration de résidus de pesticides autorisés légalement dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Elles sont fondées sur les bonnes pratiques en agriculture et l'exposition minimum du consommateur, nécessaires à la protection des personnes les plus vulnérables. Le règlement (CE) n° 396/2005 établit les LMR des pesticides autorisés dans les produits d'origine animale ou végétale destinés à la consommation humaine ou animale. Le règlement abroge la législation antérieure et remplace toutes les LMR nationales par des LMR européennes harmonisées pour toutes les denrées alimentaires. Auparavant, chaque État membre appliquait ses propres LMR pour les substances actives qui n'étaient pas encore couvertes par la réglementation de l'UE relative aux LMR. Un site internet regroupe toutes ces données : EU Pesticides database [176]. Aujourd'hui, ce sont les LMR de 500 pesticides dans plus de 300 denrées alimentaires qui sont consultables.

- Limite maximale dans l'eau

Pour les ressources en eau en France, c'est le code de la santé publique qui édite les valeurs maximales sur la base des directives européennes 98/83/CE et 75/440/CEE retranscrites en droit français le 11 janvier 2007 au journal officiel dans les articles R.1321-1 à R1321-66 [177]. Pour les pesticides, les limites de qualité sont fixées dans les eaux brutes et dans les eaux du robinet (Tableau 1).

| **Limite dans les ressources en eau** | **Eau brute** | **Eau du robinet (consommateur)** |
|---|---|---|
| Pour chaque pesticide | 2 µg/L | 0,1 µg/L (à l'exception de l'aldrine, dieldrine, heptabhlore et heptachloroépoxyde : 0,03 µg/L) |
| Pour le total des substances mesurées | 5 µg/L | 0,5 µg/L |

**Tableau 1 : Limite maximale de résidus dans les ressources en eau**

Le Code de la santé publique précise que, par « pesticide », on entend les insecticides, herbicides, fongicides, nématicides, acaricides, algicides, rodenticides et les produits antimoisissures organiques ainsi que les produits apparentés (notamment les régulateurs de croissance), leurs métabolites, produits de dégradation et de réaction pertinents. A noter également que ces limites de qualité réglementaires de l'eau au robinet des consommateurs sont plus strictes que les valeurs guides recommandées par l'OMS.

Au-delà de ces textes réglementaires, plusieurs autres directives nationales ou européennes ont été initiées afin d'améliorer la protection de l'environnement. Ces textes visent également à réaliser un état des lieux de la pollution environnementale notamment de nos ressources en eau douce :

- La directive REACH

Le système REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals) est un système intégré d'enregistrement, d'évaluation, d'autorisation et de restrictions des substances chimiques décidé par l'Union Européenne en 2006. Son objectif est d'améliorer la protection de la santé humaine et de l'environnement tout en maintenant la compétitivité et en renforçant l'esprit d'innovation de l'industrie chimique européenne [178]. Ce système oblige les entreprises qui fabriquent et importent des substances chimiques (à partir d'un volume annuel supérieur à 1 tonne) à évaluer les risques résultant de leur utilisation et à prendre les mesures nécessaires pour gérer tout risque identifié. Les substances identifiées comme préoccupantes ont quant à elles été enregistrées en premier dès décembre 2010. Il s'agissait des molécules classées CMR 1 et 2 (Cancérigène, Mutagène et Reprotoxique) dont la production est supérieure à 1 tonne par an ou les molécules très dangereuses pour l'environnement (phrase de risque R50/53), comme les PBT (Persistant, Bioaccumulable et Toxique pour l'environnement) dont la production est supérieure à 100 tonnes par an. Ce sont ainsi près de 30 000 molécules qui doivent être enregistrées avant juin 2018 et qui concernent environ 4000 entreprises françaises. La charge de la preuve de la sécurité des substances chimiques fabriquées ou commercialisées appartient à l'industrie. Ainsi, les connaissances (notamment sur la toxicologie) sur les produits chimiques concernés sont accrues. L'importateur ou l'industriel doit également fournir une Fiche de Données de Sécurité (FDS) indiquant les risques d'utilisation encourus par l'acheteur.

- La Directive Cadre sur l'Eau (DCE)

Cette directive européenne (2000/60/CE) a été mise en place le 23 octobre 2000 et a pour objectif la protection et la gestion de l'eau. Dans un premier temps, chaque état membre doit identifier et analyser les eaux de son territoire, recensées par bassin et par district

hydrographiques. Il adopte ensuite des plans de gestion et des programmes de mesures adaptés à chaque masse d'eau. Ce cadre s'applique aux eaux de surface, aux eaux souterraines, aux eaux dites de « transitions » (masses d'eaux de surface à proximité des embouchures des rivières et fleuves) et aux eaux côtières. Dans un premier temps, un état de lieux doit être réalisé afin de constater l'étendue et les niveaux de pollution. Plusieurs objectifs sont affichés, tels que la prévention et la réduction de la pollution, la promotion d'une utilisation durable de l'eau et la protection de l'environnement. A ce jour, une liste de 33 substances prioritaires dans le domaine de l'eau a été définie dans un rapport datant de décembre 2008 [179].

- Le Grenelle de l'environnement

Ce plan national décidé en 2007 vise à prendre des décisions sur le long terme en matière d'environnement et de développement durable, en particulier pour la biodiversité. Pour ce qui est de l'agriculture, ce Grenelle a promulgué le développement de l'agriculture biologique avec l'objectif d'aboutir à 20 % de produits issus de l'agriculture biologique dans la restauration collective ainsi que de passer à 20 % de la surface agricole utile française en agriculture biologique d'ici 2020. La deuxième décision a été nommée ECOPHYTO 2018 et a été décidé en 2008. Ce projet a pour objectif (i) la suppression progressive de 53 molécules les plus dangereuses (notamment pour les agriculteurs lors de l'application) et (ii) la réduction de moitié de l'usage des pesticides à l'horizon 2018. En effet, la réduction de l´usage des pesticides est l'une des composantes essentielles des objectifs de la durabilité des pratiques agricoles [180].

Note : Parmi la multitude de textes réglementaires existants au niveau européen, ce court paragraphe dans ce mémoire n'est pas exhaustif et fait état des directives et projets les plus importants pour notre raisonnement.

Il semble que les pouvoir publics aient compris la dangerosité et le risque encouru par les agriculteurs et les populations de l'usage et de la dissémination de produits polluants dans l'environnement. Ainsi, comme nous venons de le voir, il existe au niveau international, européen et national une volonté d'harmonisation. Le résultat est un ensemble de directives et plan de protection de l'environnement visant à améliorer les conditions de travail des agriculteurs, faire l'état des lieux de la pollution et tenter de trouver des solutions pour l'avenir. Toutes ces mesures ne seront efficaces et que s'il est possible de mesurer l'amélioration de l'état de pollution de notre environnement. Dans le prochain chapitre, nous allons présenter les moyens dont nous disposons pour détecter les polluants dans l'environnement.

# III. LA POLLUTION : COMMENT LA DETECTER ?

Afin de dresser un état des lieux le plus exhaustif possible de la pollution de notre environnement, il faut commencer par s'intéresser aux moyens de détection dont nous disposons. L'analyse de résidus dans les différents milieux (eau, nourriture, sol, fluide biologique) est une activité très complexe pour plusieurs raisons :

- Les produits polluants ont une diversité chimique extrêmement vaste, ils appartiennent à plusieurs familles chimiques très hétérogènes. Cela nécessite donc une utilisation de techniques variées car aucune n'est exhaustive.
- Les matrices (c'est-à-dire : l'eau, le sol, les denrées alimentaires, les produits transformés, l'air etc.) sont très nombreuses et les techniques de préparation d'échantillon doivent être spécifiquement mises au point pour chacune d'entre elles. Par ailleurs, les éléments constitutifs de la matrice peuvent dans certains cas interférer avec les molécules que l'on cherche à détecter, c'est ce que l'on appelle l'effet matrice. Ce point sera largement discuté dans la suite de ce manuscrit.
- Les quantités de polluants que l'on souhaite détecter sont souvent très faibles si bien que les limites technologiques sont parfois atteintes.

Ainsi pour chaque couple polluant/matrice étudiée, il convient d'optimiser les différentes étapes de l'analyse. Cette méthodologie s'apparente à de l'ingénierie analytique car il est nécessaire de réaliser la mise au point, la création et la validation de la méthode ainsi que les différentes étapes de l'analyse : extraction, purification, analyse, dosage. Les méthodes développées permettaient jusque dans les années 2000 l'identification de quelques molécules seulement. Toutefois, depuis une dizaine d'année, des méthodes « multi-résidues » permettent l'analyse d'une centaine de molécules avec une seule technique. Ce point est très largement discuté dans ce manuscrit.

## III.1. **Historique**

Dès les années 1940 et jusque dans les années 1960, des techniques d'analyse chimique font leur apparition telles que les tests colorimétriques pour la détection du DDT [181], la méthode de combustion du ballon d'oxygène (permettant de quantifier les molécules possédant de l'azote, du chlore ou du brome) [182], la titration par combustion [183] ou encore la méthode d'activation de neutron [184]. Dans les années 1960, l'apparition de la chromatographie de partage (prix Nobel attribué à Martin et Synge en 1952 [185]) pour la détection de pesticides

fait également son apparition. Ainsi, la chromatographie en phase gazeuse (GC, pour « Gas Chromatography » en anglais) et la chromatographie en phase liquide (LC, pour « Liquid Chromatography » en anglais) sont les premières techniques analytiques de mélange complexes. Les prémisses de cette technique ont été explorées par un biologiste russe Mikhail Tswett qui avait, en effet, séparé des pigments végétaux en 1901 avec une technique de chromatographie sur papier (phase cellulose), puis sur couche mince (phase alumine ou silice) [186]. Cette technique de chromatographie sur papier a été utilisée par Winteringham en 1952 pour la séparation d'insecticides (pyréthrine et ses dérivés) [187] tandis que l'une des premières applications de la chromatographie sur couche mince pour la détection de pesticides phosphorothioates a été réalisée par Braithwaite en 1963 [188]. D'autres techniques comme l'immunologie seront testées pour la détection de polluants, et plus particulièrement les pesticides en 1968 pour la détection du 2,4-dinitrophénol considéré par l'EPA comme un important contaminant de l'environnement [189]. La première utilisation de la chromatographie gazeuse pour l'analyse de pesticides a été rapportée par Adlard et coll. en 1958 [190]. Le détecteur utilisé était un conductimètre thermique. De nombreux autres détecteurs et techniques sont utilisés pour l'analyse de plusieurs molécules à la fois dans des mélanges plus complexes.

## III.2. **Les moyens de détection : classification et utilisation**

De nombreuses techniques existent pour la détection de pesticides. Dans cette partie, nous allons nous intéresser à leur utilisation. Pour cela, en plus de les recenser, une recherche associée sur la base de données PubMed [191] a été réalisée avec des mots clés afin d'y associer une utilisation. Les chiffres trouvés ne sont bien évidemment pas exhaustifs mais permettent de rendre compte de la « popularité » des différentes techniques.

Pour la recherche sur PubMed, seul le polluant « pesticide » sera utilisé car il reflète une grande partie des effets néfastes des polluants dans l'environnement. La recherche du mot « médicament » (*drug* en anglais) peut interférer avec les recherches dans le domaine médical. Deux recherches sont effectuées : (i) la première avec le nom complet de la technique et (ii) la deuxième en utilisant l'acronyme de la technique en veillant à ne pas inclure les articles préalablement recherchés (utilisation de NOT).

### III.2.1. Techniques de détection sans couplage préalable

Dans un premier temps, seules les techniques sans couplage sont étudiées :

#### III.2.1.1. Technique de colorimétrie

Cette technique de titrage colorimétrique est possible lorsqu'une réaction chimique donne un produit coloré et si l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'analyte à doser. C'est la loi de Beer-Lambert qui régit ce type de dosage. On peut également avoir recours à l'utilisation d'indicateurs colorés tels que l'hélianthine, le vert de bromocrésol qui vont se colorer à des pH différents [192].

- Mots recherchés : « colorimetric » AND « pesticide » = 267 articles

#### III.2.1.2. L'Absorption atomique

Cette technique se base sur l'absorption de photon par les atomes constitutifs du polluant recherché (notamment les métaux). Une simple mise en solution est nécessaire avant l'introduction de l'échantillon dans le spectromètre d'absorption atomique [193].

- Mots recherchés : « atomic absorption » AND « pesticide » = 225 articles

#### III.2.1.3. La chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC de l'anglais *Thin Layer Chromatography*)

Cette technique de chromatographie planaire est utilisée pour séparer selon une dimension les composés d'un mélange. Un standard pur est également nécessaire pour contrôler la migration du « spot » à étudier. Cette plaque est ensuite révélée soit à la lumière naturelle soit par l'utilisation de lumière UV (UltraViolet). Dans ce cas, la révélation n'a pas été considérée comme un couplage [194].

- Mots recherchés : « thin layer chromatography » AND « pesticide » = 1737 articles
- Mots recherchés : « TLC » AND « pesticide » NOT « thin layer chromatography » = 107 articles

#### III.2.1.4. L'analyse ELISA pour la détection de pesticides

Le principe de la technique ELISA (de l'anglais *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) repose sur une reconnaissance immuno-enzymatique du pesticide. Si jusqu'ici ces tests étaient

plus utilisés dans les domaines de la biologie et de la biochimie, les limites de quantification actuellement accessibles deviennent compatibles avec les ordres de grandeur de concentration recherchés en analyse environnementale. Le dosage se fait via une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composant coloré mesurable par spectroscopie. C'est un test simple, facile d'emploi et peu coûteux, mais limité par la disponibilité en anticorps spécifique [195]. Les tests immunologiques peuvent être utilisés aussi bien pour les échantillons biologiques (urine, plasma) que sur des échantillons environnementaux (eaux de surface, souterraines ou effluents de station d'épuration). Cependant, ces tests peuvent posés des problèmes de spécificité, dus à l'existence de réactions croisées lorsque d'autres molécules réagissent avec l'anticorps en raison de leurs structures chimiques proche.

- Mots recherchés : « ELISA » AND « pesticide detection » = 395 articles

### III.2.2. Techniques de détection avec couplage chromatographique

Dans cette deuxième partie, les modes de détection couplant deux instrumentations seront étudiés. Il s'agit le plus souvent de la chromatographie gazeuse ou liquide couplée avec un détecteur. Afin de faciliter les recherches, seuls le mot correspondant au détecteur a été utilisé. Ainsi quel que soit le couplage en amont, l'ensemble des articles sont représentés. Par exemple, le détecteur FID (de l'anglais *Flame Ionization Detector* ou détecteur à ionisation de flamme) est forcément couplé à la chromatographie gazeuse tandis que la spectrométrie de masse peut être couplée à la chromatographie liquide et gazeuse.

#### III.2.2.1. Le détecteur à conductivité thermique (TCD, de l'anglais *Thermal Conductivity Detector*)

Ce détecteur mesure les changements de conductivité thermique entre l'effluent de la colonne de chromatographie gazeuse avec laquelle il est couplé et un gaz de référence. En effet, la plupart des composés ont une conductibilité thermique inférieure à celle des gaz vecteurs communs en chromatographie gazeuse comme l'hydrogène, l'hélium ou l'azote. Lorsqu'un analyte est élué de la colonne, la conductibilité des effluents est réduite et un signal est détectable [196].

- Mots recherchés : « thermal conductivity detector » AND « pesticide » = 4 articles
- Mots recherchés : « TCD » AND « pesticide » NOT « thermal conductivity detector » = 17 articles

#### III.2.2.2. Le détecteur à ionisation de flamme (FID, de l'anglais *Flame Ionization Detector*)

Le fonctionnement de ce détecteur est basé sur la détection des ions formés lors de la combustion des composés organiques dans une flamme à hydrogène. La génération de ces ions est proportionnelle à la concentration des espèces organiques dans le flux gazeux. Ce détecteur est donc couplé avec la chromatographie gazeuse [197].

- Mots recherchés : « flame ionization detector » AND « pesticide » = 56 articles
- Mots recherchés : « FID » AND « pesticide » NOT « flame ionization detector » = 85 articles

#### III.2.2.3. Le détecteur à capture d'électron (ECD, de l'anglais *Electron Capture Detector*)

Ce détecteur est utilisé pour la détection de composés possédant des atomes électronégatifs (susceptible d'accueillir préférentiellement un électron) comme les halogènes. Il est utilisé en chromatographie gazeuse. Le principe réside dans l'utilisation d'une source radioactive ($^{63}$Ni par exemple) génératrice d'électron qui au contact d'un gaz (généralement de l'azote car il présente une faible énergie d'excitation) va créer un faisceau d'élections libres. En effet, les électrons émis par la source radioactive entrent en collision avec le gaz en arrachant au passage de nouveaux électrons. Les électrons ainsi produits génèrent un courant qui va fluctuer au passage des molécules devant le détecteur conformément à leur capacité à absorber une partie de ces électrons ce qui fait de ce détecteur un appareillage spécifique [198].

- Mots recherchés : « electron capture detector » AND « pesticide » = 421 articles
- Mots recherchés : « ECD » AND « pesticide » NOT « electron capture detector » = 456 articles

#### III.2.2.4. Le détecteur à photométrie de flamme (FPD, de l'anglais *Flame Photometric Detector*)

Ce détecteur est similaire au détecteur FID (vu précédemment) car les molécules qui sortent de la colonne de chromatographie en phase gazeuse sont détectés par combustion dans une flamme à dihydrogène. Alors que la FID analyse le courant d'ion produit par les molécules organiques, le FPD analyse le spectre de lumière émis par le composé dans la flamme. Ainsi, des composés inorganiques peuvent être détectés. De plus, ce détecteur est spécifique à

certains composés possédant du phosphore ou du soufre qui émettent à des longueurs d'onde spécifiques [199].

- Mots recherchés : « flame photometric detector » AND « pesticide » = 108 articles
- Mots recherchés : « FPD » AND « pesticide » NOT « flame photometric detector » = 78 articles

#### III.2.2.5. Le détecteur d'émission atomique (AED, de l'anglais *Atomic Emission Detector*)

La force de ce détecteur réside dans la capacité à déterminer simultanément les émissions atomiques d'un grand nombre d'éléments contenu dans les analytes élués à partir de la colonne de chromatographie en phase gazeuse. A la sortie de la colonne capillaire, les molécules sont introduites dans un four micro-onde créant ainsi un plasma. Ce plasma provoque la décomposition des composés et l'excitation des atomes constitutifs de la molécule. La relaxation de ces atomes émet des photons qui sont ensuite séparés en lignes individuelles par diffraction puis qui sont détectés par des photomultiplicateurs [200].

- Mots recherchés : « atomic emission detector » AND « pesticide » = 7 articles
- Mots recherchés : « AED » AND « pesticide » NOT « atomic emission detector » = 20 articles

#### III.2.2.6. Le détecteur azote-phosphore (NPD, de l'anglais *Nitrogen-Phosphorus Detector*)

Le principe de fonctionnement de ce détecteur est proche du détecteur FID mais il est spécifique à l'analyse des composés azotés et phosphorés. Pour cela, la buse de sortie de la flamme est recouverte d'un matériau alcalin. La combustion de l'hydrogène va ainsi crée un plasma froid, qui va exciter les ions alcalins environnants conduisant à la réception d'un courant électrique continu. Enfin, lorsque des molécules (possédant des atomes d'azote ou de phosphore) sortent de la colonne capillaire, ils augmentent la réaction catalytique au niveau du matériau alcalin induisant une fluctuation de la quantité d'électron et ainsi un signal spécifique [201].

- Mots recherchés : « nitrogen phosphorus detecteur » AND « pesticide » = 95 articles
- Mots recherchés : « NPD » AND « pesticide » NOT « nitrogen phosphorus detector » = 118 articles

#### III.2.2.7. Le détecteur à fluorescence (FLD, de l'anglais *FLuorescence Detector*)

La fluorescence est un type de spectroscopie. Elle implique l'utilisation de photons incidents afin d'exciter les molécules à analyser de leur état fondamental vers un état excité. Les molécules se relaxent ensuite en émettant un photon de plus basse énergie que celui qui leur a été envoyé. Ce photon est émis à une fréquence qui est fonction de l'état excité atteint par les molécules et donc par conséquent de leur structure. On obtient alors un spectre d'émission des molécules. Ce détecteur est généralement couplé à la chromatographie en phase liquide [202].

- Mots recherchés : « fluorescence detector » AND « pesticide » = 65 articles
- Mots recherché : « FLD » AND « pesticide » NOT « fluoresence detector » = 8 articles

#### III.2.2.8. Le détecteur UV/Visible (pour UltraViolet)

Le principe de ce détecteur met en jeu des photons (émis dans l'ultraviolet ou le visible soit entre 200 et 600 nm généralement) pour exciter la molécule d'une ou plusieurs transitions électroniques (c'est-à-dire vers un état excité). C'est le principe inverse de la technique de fluorescence qui vise à mesurer les spectres d'émission tandis que cette technique enregistre les longueurs d'onde absorbés pour passer de l'état fondamental à l'état excité. Ce détecteur se base sur la loi de l'absorbance de Beer-Lambert qui stipule que l'absorbance est proportionnelle à la concentration en analyte dans la solution et la longueur de la cellule de mesure [203].

- Mots recherchés : « ultraviolet visible » AND « pesticide » = 82 articles
- Mots recherchés : « UV » AND « pesticide » NOT « ultraviolet » = 992 articles

#### III.2.2.9. Le détecteur à barrette de diode (DAD, de l'anglais *Diode Array Detector*)

Ce détecteur est une amélioration des détecteurs UV/Visible à longueur d'onde variable qui nécessitent un balayage et une lecture de chaque longueur d'onde étudiée. Dans un détecteur à barrette de diode, un réseau diffracte la lumière blanche en une multitude de rayons monochromatiques qui vont ensuite être ou non absorbés par l'échantillon. Puis, une lecture de chaque canal est réalisée simultanément. C'est particulièrement avantageux lorsque deux molécules qui absorbent à deux longueurs d'onde différentes sortent de la colonne chromatographique en même temps [204].

- Mots recherchés : « diode array detector » AND « pesticide » = 103 articles
- Mots recherchés : « DAD » AND « pesticide » NOT « diode array detector » = 143 articles

#### III.2.2.10. Le détecteur électrochimique (ECD, de l'anglais *ElectroChemical Detector*)

Le détecteur électrochimique utilise les propriétés oxydo-réductrice des analytes. De fait, la phase mobile de la colonne chromatographique doit être suffisamment conductrice pour permettre le passage du courant. La mesure effectuée correspond à la perte ou au gain d'un ou plusieurs électrons par la molécule ce qui induit un courant électrique qui est ensuite amplifié [205].

- Mots recherchés : « electrochemical detector » AND « pesticide » = 31 articles
- Mots recherchés : « ECD » AND « pesticide » NOT « electrochemical detector » NOT « electron capture detector » = 452 articles

#### III.2.2.11. La spectrométrie de masse (MS, de l'anglais *Mass Spectrometry*)

Cette technique physique d'analyse permet de détecter et identifier les analytes par mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules préalablement chargées (ions) en fonction de leur rapport masse sur charge (*m/z*). Pour cela, les analytes sont tout d'abord ionisés grâce à une source d'ionisation puis sont détectés dans un ou plusieurs analyseurs pour séparer les espèces ioniques les unes des autres. Enfin, un détecteur compte et amplifie le signal afin d'obtenir un spectre de masse. Cette technique peut être aussi bien couplée avec de la chromatographie gazeuse qu'avec de la chromatographie liquide [206].

- Mots recherchés : « mass spectrometry » AND « pesticide » = 7056 articles
- Mots recherchés : « MS » AND « pesticide » NOT « mass spectrometry » = 1581 articles

#### III.2.2.12. Bilan

La Figure 11 montre que la technique la plus employée est la spectrométrie de masse avec près de 9000 publications concernant les pesticides en 35 ans. En effet, le principal intérêt de cette technique réside dans sa grande polyvalente. De nombreux polluants peuvent être analysés avec une bonne spécificité et une bonne sensibilité grâce à cette technique. La prochaine partie de ce chapitre va largement traiter de cette technologie.

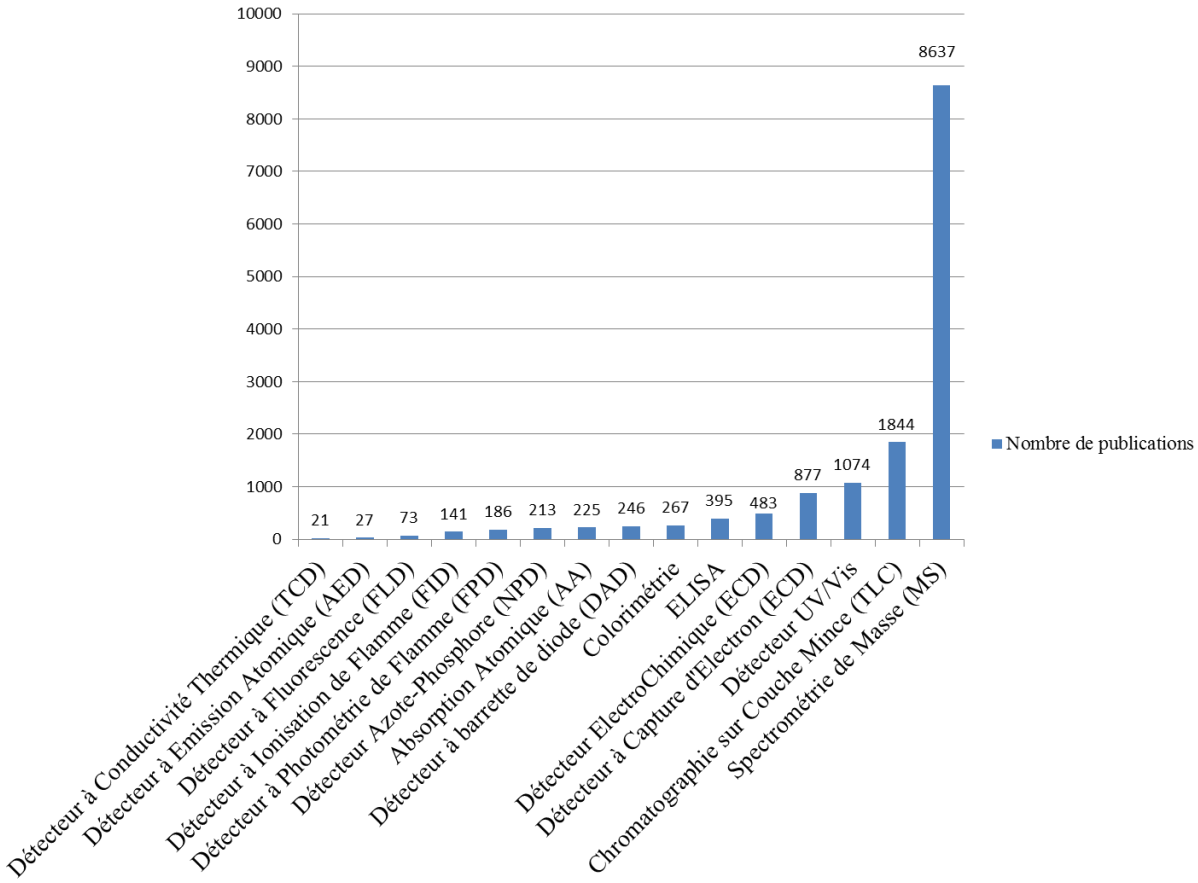



**Figure 11 : Nombre de publications en fonction des différentes techniques d'analyse des pesticides (chiffre recueillis sur PubMed en juillet 2014)**

## III.3. **La spectrométrie de masse**

### III.3.1. Principe général

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la mesure de molécules après leur ionisation. L'échantillon est tout d'abord introduit dans le spectromètre. Il peut l'être soit directement soit après une séparation chromatographique. Ensuite, les molécules sont ionisées puis les ions résultants sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (*m/z*). Un spectromètre de masse est généralement composé de 5 modules (Figure 12) : (i) un système d'introduction de la substance à analyser ; (ii) une source d'ionisation des analytes ; (iii) un ou plusieurs analyseurs soumis à un vide poussé pour séparer les ions générés dans la source en fonction de leur rapport *m/z* ; (iv) un détecteur pour dénombrer le nombre d'ions et enfin (v) une console de commande et un système de traitement des données permettant le contrôle des paramètres d'acquisition, la visualisation et l'enregistrement des spectres de masse.

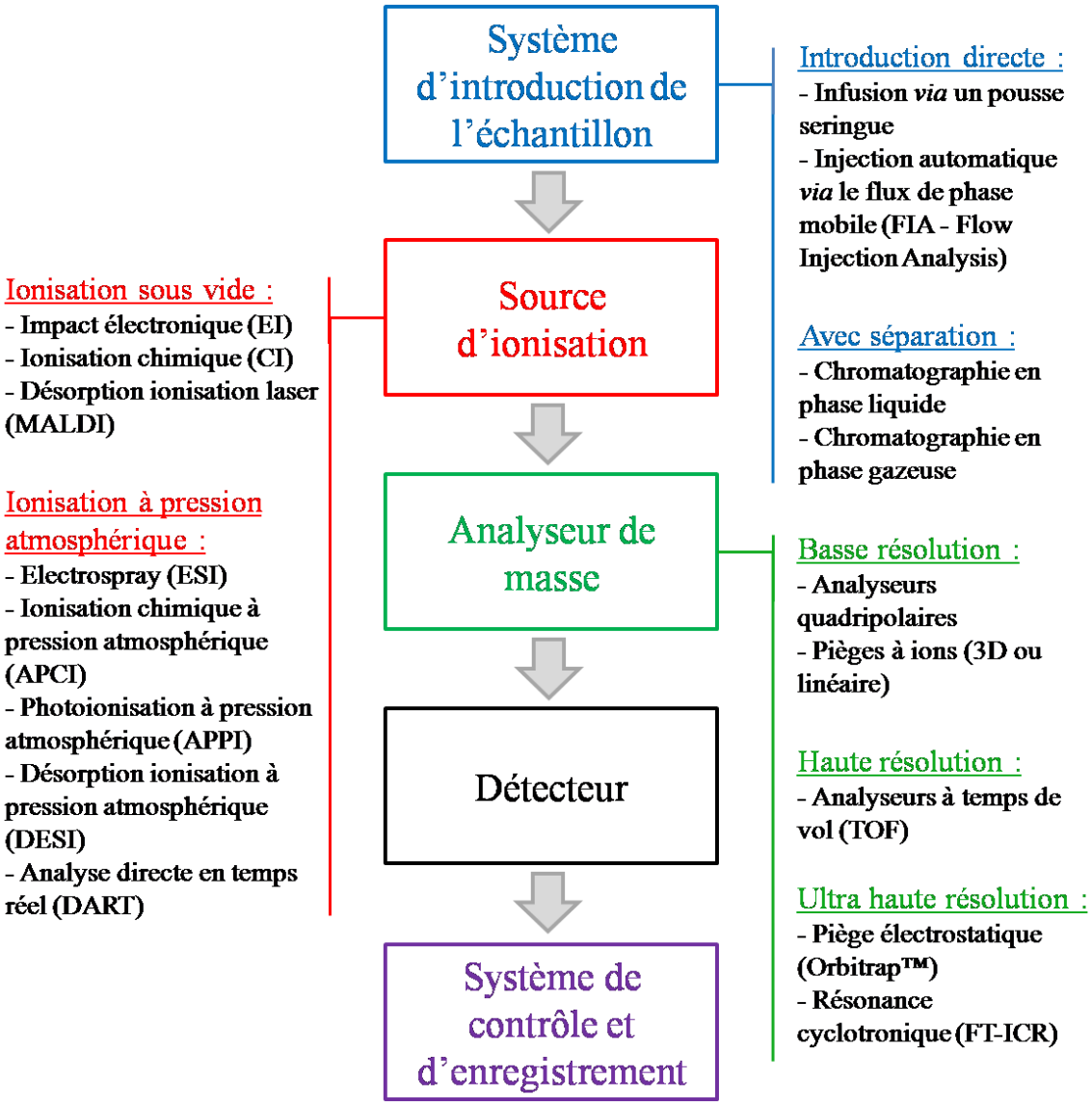



**Figure 12 : Schéma de présentation générale d'un système analytique basé sur la spectrométrie de masse (adapté de la publication de Boudah et coll. [207])**

L'annexe 2 reprend le principe de fonctionnement de chaque source et de chaque analyseur cité dans la figure ci-dessus. Les modes d'acquisition et notamment la fragmentation CID (de l'anglais *Collision Induced Dissociation*) avec les différents modes de balayage des appareils en tandem sont également présentés plus en détails.

### III.3.2. Les sources d'ionisation

De manière générale, les sources utilisées en spectrométrie de masse sont basées sur l'ionisation en phase gazeuse ou sur la désorption-ionisation d'analytes. L'ionisation peut être réalisée sous vide à l'aide de sources comme l'impact électronique [208] (EI) ou l'ionisation chimique [209] (CI). Ces sources sont utilisées par couplage avec la chromatographie gazeuse et s'adressent donc à des composés non thermolabiles. A titre d'exemple, des polluants

comme les PCB, les dioxines, les PBB (PolyBromoBiphényle) ou les organochlorés (chlordecone, endosulfan, DDT, lindane, dieldrin etc.) sont analysés par d'EI [210-212] et CI [210,213-215] et permettent d'obtenir des sensibilités inférieure à 5 µg/kg en deçà des limites maximales de résidus de l'Union Européenne.

L'ionisation en phase gazeuse peut également être réalisée à pression atmosphérique (API de l'anglais *Atmospheric Pressure Ionization*), comme c'est de le cas pour la source d'ionisation chimique à pression atmosphérique [216] (APCI), la photoionisation à pression atmosphérique [217-219] (APPI) ou encore l'analyse directe en temps réel [220] (DART). Les deux premières techniques ne sont pas les plus utilisées pour la détection de pesticides et de résidus médicamenteux mais présentent l'avantage de pouvoir être couplées aux deux techniques de chromatographie LC et GC [221-226]. De plus, ces sources d'ionisation sont complémentaires de l'EI comme le montre une étude de Hurtado-Fernandez et coll. qui ont réalisé la comparaison entre une source EI et APCI sur le type d'ions et de molécules détectées dans l'avocat. Les auteurs concluent que l'APCI permet de détecter plus de molécules en nombre et de natures chimiques différentes de celles observées en EI [225]. Enfin l'avantage du DART réside, comme son nom l'indique, dans la facilité de mise en œuvre (pas de préparation d'échantillon) et la rapidité d'analyse (en temps réel). De plus, cette source peut être appliquée à des composés déposés, adsorbés sur l'échantillon ou encore désorbés par ce dernier. Ainsi, il devient possible d'analyser des pesticides sur la surface des légumes [227], de détecter la présence d'explosifs ou de drogues illicites dans les cheveux [228,229], les vêtements, les bagages, les billets de banque [230], etc. L'inconvénient majeur de cette technique réside dans le fait qu'il n'est pas aisé d'obtenir des données quantitatives, les auteurs des études citées précédemment annoncent des sensibilités atteintes de l'ordre de la dizaine de ppb (partie par milliard, de l'anglais *part per billion*) ce qui correspond à 10 µg/kg par exemple. Cette valeur est obtenue par comparaison des intensités détectées lors de l'analyse de l'échantillon et d'une gamme de concentration de standard appliquée sur le même support.

La désorption-ionisation peut, quant à elle, s'opérer sous vide sur des supports solides à l'aide de matrices comme la désorption-ionisation par laser assistée par matrice [231,232] (MALDI). Cette technique d'ionisation n'est pas très utilisée pour la détection de xénobiotiques bien qu'elle présente une facilité de mise en œuvre et un débit d'analyse conséquent avec de relativement bonnes sensibilités. Pour exemple, dans l'étude de Madla et coll., les LOD (de l'anglais *Limit Of Detection*) obtenues pour 12 des 15 pesticides testés sont inférieures aux limites maximales de résidus de l'ordre de 10 µg/kg [233]. Cependant, cette source ne peut être couplée avec les techniques de chromatographie, ce qui réduit ses champs

d'application. Elle est néanmoins très intéressante pour la localisation des pesticides dans les tissus ou les plantes lorsque cette source est utilisée pour l'imagerie [234-236]. A titre d'exemple, Lagarrigue et coll., ont déterminé la localisation et les concentration en chlordecone dans le foie de souris exposée [234].

La désorption-ionisation peut également s'opérer à pression atmosphérique sur des nébulisats comme les sources d'ionisation électrospray [237-239] (ESI) et désorption-ionisation électropsray [240] (DESI). L'électrospray est assurément la source la plus employée car elle permet un couplage avec la chromatographie liquide, qui est la principale méthode de séparation des polluants et qui permet aussi un couplage avec un grand nombre d'analyseurs comme nous pourrons le voir ci-après. Ainsi, des méthodes basées sur l'ESI sont utilisées sur les médicaments [241,242], les pesticides [243-245] ou les produits industriels et domestiques [246,247]. La source DESI est, quant à elle, utilisée pour l'analyse de surface au même titre que le DART mais elle présente cependant un principe d'ionisation quelque peu différent puisque cette source délivre un nébulisat qui va solubiliser les molécules à la surface de l'échantillon. Ainsi, les domaines d'analyse sont la détection des drogues illicites, d'explosifs [248] ou de pesticides sur la peau des légumes [249].

### III.3.3. Les analyseurs

Il existe de nombreux analyseurs répondant à des usages divers. Leur utilisation pour la détection de polluants dans l'environnement ou les matrices agroalimentaires dépend de leur polyvalence et de leur performance. En effet, en fonction des matrices étudiées ou des besoins de l'analyste, le choix s'orientera vers un spectromètre quadripolaire réalisant une simple détection en masse ou vers un appareil de haute résolution hybride permettant la réalisation de caractérisations structurales complexes. Les performances des spectromètres de masse sont évaluées au travers de leur vitesse d'acquisition, de leur gamme de rapports *m/z*, de leur gamme dynamique de réponse, de leur sensibilité, de leur résolution et de leur précision sur la mesure des rapports *m/z* (voir annexe 2 pour plus de détails). Ainsi, les premiers analyseurs utilisés pour l'analyse de pollution environnementale sont les analyseurs quadripolaires couplés avec la chromatographie en phase gazeuse [250,251]. Elle a également été utilisée en couplage avec un piège à ions pour la détection de pesticides [252,253]. Les quadripôles sont des analyseurs à faisceaux d'ions qui peuvent être montés en série (séparés par une cellule de collisions) comme c'est le cas pour le triple quadripôle (TQ). Les TQ permettent différents modes d'acquisition en MS/MS (spectrométrie de masse en tandem), parmi lesquels les modes SRM et MRM (de l'anglais, *Selected Reaction*

*Monitoring* et *Multiple Reaction Monitoring*, voir annexe 2 pour plus de détails). Ces analyseurs sont extrêmement utilisés pour la détection et la quantification de polluants car ils sont particulièrement bien adaptés au dosage spécifique de molécules ou de familles chimique dans le cadre d'approches ciblées. Ces spectromètres de masse constituent aujourd'hui la référence dans le domaine car ils permettent d'atteindre de bonnes sensibilités avec une spécificité assurée par une ou plusieurs transitions de masse entre les ions précurseurs et fragments [254-256]. De plus, les données générées sont simples à interpréter. Cependant, le nombre de molécules suivies est fonction du nombre de transitions paramétrables qui tend à augmenter. Le développement de méthode peut être long car l'ensemble des fragments doit être connu et les temps d'acquisition (« *dwell time* ») ainsi que les énergies d'activation doivent être optimisés pour toutes les transitions suivies, et ce pour chaque molécule. Les analyseurs à piégeage d'ions (piège 3D et 2D linéaire) peuvent quant à eux stocker les ions, ce qui permet la réalisation d'expériences de fragmentations consécutives ou séquentielles ($MS^n$). Ces analyseurs sont donc particulièrement adaptés à l'analyse structurale pour la confirmation d'éventuels polluants dans des matrices environnementales complexes dans lesquels des interférents peuvent empêcher une conclusion aisée [257,258]. Le principal inconvénient de ces analyseurs est leur faible résolution, ce qui limite la séparation des ions de masse proche (isobares) et leur faible précision en masse, ce qui limite la détermination de formules brutes pour l'identification d'inconnus.

Un autre type d'analyseur a donc fait son apparition pour la détection de polluants dans l'environnement [259,260] : l'analyseur à temps de vol (TOF) avec sa version dérivée le Q-TOF permettant la réalisation d'expériences de MS/MS en haute résolution (30 000, Δm/m FWHM (de l'anglais, *Full Width at Half Maximum*) sur l'ensemble de la gamme des rapports *m/z*). Ce spectromètre permet en outre de résoudre un problème éventuel d'ions isobares mais donne également l'accès au massif isotopique des molécules ce qui ajoute un critère d'identification. Cet analyseur permet également de faire de la recherche d'inconnus ce qui n'est pas possible avec les TQ classiques avec lesquels on ne détecte que ce que l'on cherche. Plusieurs études ont d'ailleurs comparé les technologies TOF et Q-TOF avec la technique traditionnelle (TQ) et ont montré que la sensibilité des instruments à haute résolution étaient suffisantes pour atteindre les limites maximales de résidus européennes tout en ayant un gain significatif dans la confiance des résultats avec un grand nombre d'indice de confirmation en plus de la MS/MS [261,262]. Enfin, l'avènement d'un spectromètre à ultra-haute résolution à transformée de Fourier (> 50 000, Δm/m FWHM à *m/z* 400) de technologie Orbitrap au milieu des années 2000 a révolutionné le paysage de la

spectrométrie de masse notamment pour l'analyse des petites molécules. En effet, même si ces appareils représentent un investissement financier important, la différence de prix entre cette technologie et les dernières générations de TQ n'est pas si grande. Compte tenu de la grande polyvalence des appareils à ultra-haute résolution permettant la réalisation d'expériences MS/MS ou $MS^n$, ils sont de plus en plus courant dans les laboratoires et des applications pour la détection de polluants environnementaux ont été publiées [263-265]. Ces spectromètres permettent de séparer aisément les composés isobares et d'accéder aux rapports *m/z* précis des ions pour la détermination des formules brutes (la liste n'est plus que de quelques candidats), ce qui facilite également l'interrogation des banques de données.

Le choix de l'analyseur est donc conditionné par la problématique et les molécules étudiées. L'analyste s'orientera vers l'un ou l'autre en fonction de la stratégie analytique mise en place : préparation d'échantillons adéquate, choix d'un système introductif (chromatographique ou non), choix de la source d'ionisation. A titre d'exemple, une recherche sur la banque de données PubMed a permis de mettre en évidence l'utilisation actuelle des analyseurs pour la détection des pesticides. Avec plus de 6000 articles, la technologie de type quadripolaire (simple et triple) est aujourd'hui sans nul doute la plus utilisée pour la détection de ce type de molécules, et ce quelle que soit la problématique ou la matrice étudiée. La technologie TOF arrive en seconde position de ce classement avec 246 articles recensés juste devant les pièges à ions avec 212 articles. La technologie Orbitrap™ est très récente et ne compte que 42 articles à son actif pour la détection des pesticides. Ce constat a également été réalisé dans une revue de Petrovic et coll. sur l'analyse de contaminants organiques dans les échantillons environnementaux liquides (eaux de surface, eaux souterraines, eaux de boisson, eaux de station d'épuration, eaux de mer, de lac…) et solides (boue, sédiments, sol…). Parmi les 56 articles analysés, 40 ont été réalisés à l'aide de simple ou de triple quadripôle ce qui montre que cette technologie constitue la référence dans le domaine de l'analyse de polluants [266]. Par ailleurs, une autre revue a été réalisée par Botitsi et coll. sur les stratégies utilisées pour la détection de pesticides dans les matrices alimentaires et eau dans laquelle les auteurs ont analysé 108 articles en LC et GC couplé essentiellement en TQ et ITMS (de l'anglais, *Ion Trap Mass Spectrometry*). Ils concluent que les appareils de LC et GC couplé à un QqQ utilisant le mode MRM sont considérés comme les interfaces les plus sensibles et robustes [267].

En réalisant le même type d'analyses en 2014 en incluant les technologies TOF et Orbitrap, le Tableau 2 répertorie une dizaine d'articles récents (publiés après 2008) réalisées sur différents systèmes analytiques (TQ, ITMS, TOF et Orbitrap) en termes de matrices, de type de molécules analysées et de sensibilité. On constate que le groupe de matrices analysées, et ce

quelle que soit la technologie utilisée, est vaste comprenant des échantillons liquides et solides de type environnementaux ou agroalimentaires. Pour ce qui est de la sensibilité, on remarque une bonne homogénéité quelle que soit la technologie utilisée, bien que les appareils de type TQ aient une sensibilité légèrement meilleure. On note également que le couplage entre la technologie Orbitrap et la GC est très récente (Oct 2014) [268] et qu'aucun article n'a encore été publié sur l'analyse de polluant dans des matrices environnementales et agroalimentaires.

| Système analytique utilisé | Matrice analysée | Type de molécules | Sensibilité | Référence |
|---|---|---|---|---|
| GC-MS/MS (QqQ) | Fruits et légumes (tomate, pomme de terre, oignon orange) | 210 pesticides | 20-50 µg/kg | [256] |
| GC-MS/MS (QqQ) | Céréales (riz, farine et maïs) | 200 pesticides | 5-20 µg/kg | [269] |
| HPLC-MS/MS (QqQ) | Eaux brutes et traitées | 53 composés pharmaceutiques | 0,2-40 ng/L | [270] |
| GC-MS/MS (QqQ) | Tabac | 159 pesticides | 5-10 µg/kg | [271] |
| HPLC-MS/MS (IT) | Huile essentielle de lavendin | 256 pesticides | 1-10 µg/L | [272] |
| UPLC-MS/MS (QqQ) | Eau de surface et de STEP | 50 composés pharmaceutiques et produits d'hygiène personnelle | 1-100 ng/L | [273] |
| HPLC-MS/MS (IT) | Alimentation pour bébé | 10 fongicides | 0,8-3 µg/kg | [274] |
| GC-MS/MS (IT) et HPLC-MS/MS (QqQ) | Urine d'agriculteurs | Pesticides polaires et non polaire | 10-3000 ng/L | [275] |
| GC-MS/MS (IT) | Fruits (raisin, mangue et grenade) | 50 pesticides | 5-20 µg/kg | [276] |
| UHPLC-MS (TOF) | 13 fruits et légumes | 60 pesticides | 8-10 µg/kg | [277] |
| UHPLC-MS (TOF) | Eau de STEP | 84 pesticides et produits pharmaceutiques | 10-100 ng/L | [278] |
| GC-MS (TOF) | Vins rouge et blanc | 83 pesticides et 12 biphénils polychlorés | 1-10 µg/L | [279] |
| UHPLC-MS (Orbitrap) | Fruits et légumes (tomate, poivre, orange et thé vert) | 170 pesticides | 10-50 µg/kg | [280] |
| UHPLC-MS (Orbitrap) | Viandes (bœuf, porc et poulet) | 350 pesticides et médicaments vétérinaires | 2-20 µg/kg | [281] |
| UHPLC-MS (Orbitrap) | Eaux brutes et traitées | 72 pesticides et médicaments | 30-300 ng/L | [282] |
| HPLC-MS/MS (Orbitrap) | Sédiments de lac | 180 pesticides, produits pharmaceutiques et chimiques | 0,03-15 ng/g | [223] |

**Tableau 2 : Exemples d'études réalisées sur des matrices environnementales et agroalimentaires avec des systèmes analytiques utilisant la spectrométrie de masse**

## III.4. **Le système introductif**

Les analyses de polluants environnementaux par spectrométrie de masse peuvent être réalisées selon 2 approches : (i) en introduction directe et (ii) après un couplage à des méthodes séparatives.

### III.4.1. Introduction directe en spectrométrie de masse

Les systèmes DART et DESI sont des sources d'ionisation qui désorbent des molécules au passage sur l'échantillon et dont les applications ont été évoquées dans le paragraphe III.3.2 mais l'échantillon analysé n'est pas, à proprement parlé, introduit dans le spectromètre de masse ce qui limite considérablement l'effet matrice. L'introduction directe permet, quant à elle, des analyses d'extraits bruts, rapide et à haut débit. L'échantillon est introduit dans le spectromètre par un pousse seringue (infusion MS) ou à l'aide de la pompe du système chromatographique (FIA pour *Flow Injection Analysis*). Quelques études quantitatives ont été réalisées sur l'eau, les noix de pecan, le maïs ou le citron [283-285]. Les auteurs montrent des résultats tout à fait satisfaisant avec une bonne linéarité ($r^2 > 0,99$), une bonne reproductibilité (CV < 20%) et une bonne sensibilité (par exemple, 0,03µg/L pour l'eau du robinet avec une norme en France à 0,1µg/L). L'argument mis en avant par les auteurs est l'extrême rapidité de l'analyse, de 4,3 analyses par minute et jusqu'à 15 minutes pour une analyse complète comprenant la préparation d'échantillon, l'analyse et l'interprétation des résultats soit autant que la durée d'un gradient classique en LC-MS. Néanmoins, compte tenu de la complexité des matrices étudiées ainsi que du grand nombre et de la diversité des molécules analysées, ces approches sont peu employées et nécessitent parfois une préparation d'échantillon efficace et longue afin d'éliminer le maximum de constituants de la matrice. De fait, certaines limitations de l'injection directe sont gênantes comme (i) la présence « d'effet matrice » provoquant une suppression du rendement d'ionisation et dont l'importance est molécule-dépendante, (ii) la difficulté d'annoter des ions (moléculaires *vs* fragments en source *vs* adduits) sur les appareils haute résolution et (iii) et l'absence de distinction des isomères.

En conclusion, les analyses directes sont une excellente solution pour une analyse à très haut débit qu'elles soient réalisées par DART, DESI ou par injection directe d'échantillons bruts ou prétraités. Cependant, ces analyses s'adressent assurément à un nombre limité de molécules et de matrice pour des applications bien précises. Pour la réalisation de méthodes multi-résidu de polluants dans des matrices complexes, il est nécessaire de disposer d'une dimension séparative supplémentaire amenée par la

chromatographie en phase liquide, en phase gazeuse ou l'électrophorèse capillaire (LC, GC et CE respectivement pour *Liquid Chromatography*, *Gas Chromatography* et *Capillary Electrophoresis* en anglais).

### III.4.2. Couplage de la chromatographie et de la spectrométrie de masse

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique permettant la séparation des constituants d'un mélange, en utilisant les différences d'affinités des substances à analyser vis à vis de deux phases, l'une mobile, et l'autre fixe ou stationnaire. Cette technique se décline sous de nombreuses formes selon la nature des phases et des phénomènes mis en jeu, ainsi que le schématise la Figure 13. Dans ce paragraphe, seules les techniques les plus employées en chromatographie en phase gazeuse (GC) et en chromatographie en phase liquide (LC) seront discutées.

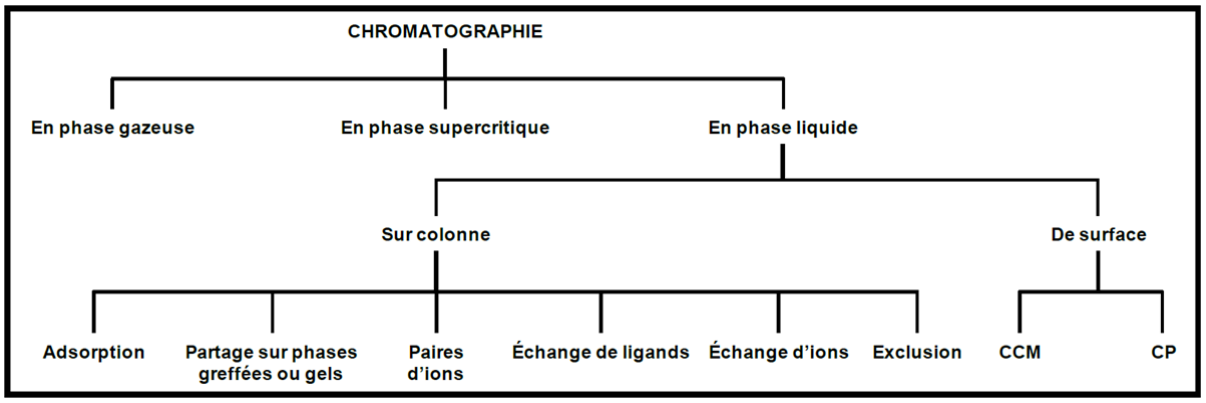



**Figure 13 : Types de méthodes chromatographiques [286]**

#### III.4.2.1. La chromatographie en phase gazeuse

Développée dans les années 1960, la chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation de composés susceptibles d'être vaporisés par chauffage (sans décomposition). Quelques rappels théoriques à propos de cette technique chromatographique tels que le mode de fonctionnement général, les types d'injecteur les plus utilisés et les différents type de colonnes et de gaz vecteur sont présentés dans l'annexe 3.

La chromatographie en phase gazeuse est une technique extrêmement utilisée pour la détection et le dosage de polluants dans l'environnement (plus de 4000 résultats sur la base de données PubMed en utilisant la recherche : « pesticide » AND « gas chromatography » AND « mass spectrometry »). Outre la spectrométrie de masse, la GC a été couplée avec de

nombreux détecteurs (voir CHAPITRE I.III.2) permettant une séparation et une détection toutes deux réalisées en phase gazeuse. Par ailleurs, la GC est une technique d'analyse extrêmement résolutive, rapide et sensible. Lorsqu'elle est couplée avec la spectrométrie de masse, les sources d'ionisation utilisées sont généralement l'impact électronique et l'ionisation chimique ce qui permet l'obtention de spectres reproductibles et comparables d'un instrument à l'autre, et l'interrogation de base de données comme celle du NIST (de l'anglais *National Institute of Standards and Technologie*). Les détecteurs sont généralement des analyseurs simples [287] ou triple quadripôlaires [271,288-290], même si quelques études ont été réalisées avec des appareils à haute résolution [291-293]. Par ailleurs, l'excellente reproductibilité des résultats et l'existence de banques de données (obtenues en EI) permettent la recherche de composés non ciblés au départ [294,295]. Certains types de molécules sont généralement analysés par GC comme les composés formés d'un squelette carboné avec peu d'hétéroatomes et des halogènes comme le chlore ou le brome (Figure 14). On peut citer les PCB, les RFB, les dioxines, les organochlorés (DDT, endosulfan, aldrine, heptachlore etc.) et les pyréthrionoïdes (non exhaustif). Par exemple, Camino-Sanchez et coll. ont analysé 86 polluants organiques persistants dans des sédiments marins au large de l'Espagne. Parmi eux, 20 organochlorés, 10 HAP, 10 PCB et 6 PBDE (PolyBromoDiphénylEthers) ont été sélectionnés. Les coefficients de détermination ($R^2$) obtenus ont été supérieurs à 0,99 et les sensibilités atteintes de l'ordre de 6 à 100 ng/kg, ce qui montre que la GC-MS est bien adaptée à la détection de ces composés.

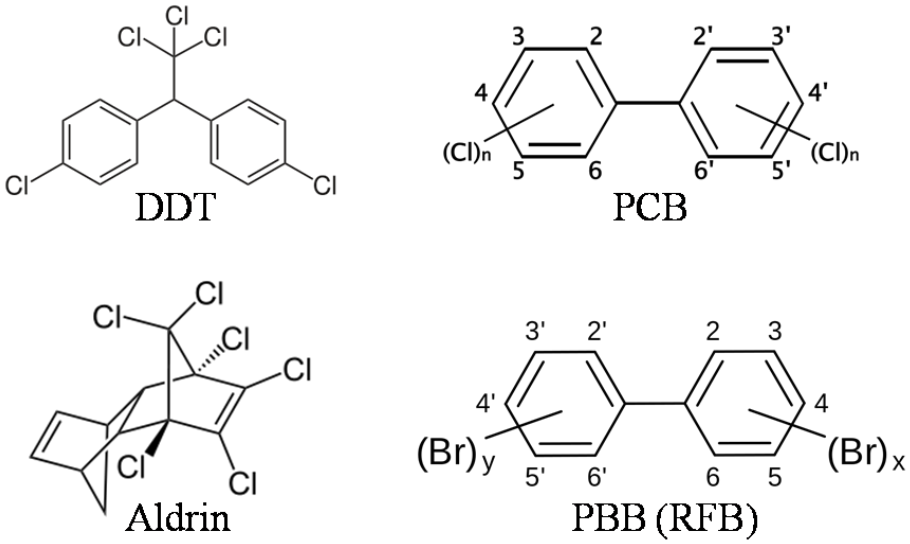



**Figure 14 : Exemples de molécules analysables par GC**

Néanmoins, la chromatographie en phase gazeuse ne convient pas pour les produits thermolabiles ou qui ne sont peu ou pas volatils. Il est toujours possible d'utiliser des procédures de traitement de l'échantillon afin de dériver les molécules pour les rendre plus stables et/ou volatiles, mais ces techniques sont longues et fastidieuses et les réactions ne sont pas toujours totales. La quantification absolue peut donc être délicate. Dans ce cas, l'utilisation de la chromatographie liquide est conseillée. Cela étant, le potentiel de cette dernière est bien plus important puisque environ 85 % des composés connus ne sont pas suffisamment volatils ou stables thermiquement pour être analysés en GC [296].

### III.4.2.2. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

La chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse est apparue plus tardivement que la chromatographie en phase gazeuse en raison de contraintes technologiques. La principale limitation était la nécessité d'évaporer la phase mobile chromatographique afin de faire passer les analytes en phase gazeuse avant leur introduction dans le spectromètre de masse. Ces problèmes ont été résolus avec le développement de méthodes d'ionisation à pression atmosphérique telles que l'electrospray (ESI). La LC présente l'avantage d'être plus polyvalente que la GC du fait de l'interaction de trois composantes (soluté, phase mobile, phase stationnaire) contre seulement deux pour la GC (soluté, phase stationnaire). Ainsi, la LC complète le pouvoir résolutif amené par la spectrométrie de masse. Son principal intérêt est de limiter le phénomène de suppression d'ionisation observé avec les sources ESI et lié à la complexité des matrices analysées. Enfin, elle permet généralement de séparer les molécules isobares et surtout les isomères de positions qui sont par définition indissociables avec la spectrométrie de masse, même en haute résolution car ces molécules ont la même formule brute. Quelques rappels généraux sur la chromatographie liquide sont disponibles en annexe 3.

En chromatographie liquide, on distingue les systèmes à haute (HPLC, de l'anglais *High Performance Liquid Chromatography*) et ultra-haute performance (UHPLC, de l'anglais *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*). D'apparition plus récente (depuis 2005), les systèmes de type UHPLC reposent sur l'utilisation de particules de phase stationnaire de diamètre réduit (sub 2µm) supportant de plus hautes pressions, et donc des débits plus élevés, permettant ainsi des séparations plus rapides. Les pics chromatographiques élués sont donc plus fins et plus intenses, ce qui augmente le rapport signal/bruit, la capacité de pics et l'efficacité de la colonne [297]. En revanche, ces colonnes nécessitent des pompes très haute pression qui permettent de faire migrer la phase mobile jusqu'à des pressions pouvant

atteindre 1000 bars (comparativement, la pression exercée dans un autocuiseur est de 2-3 bars). Ainsi, le système analytique est très sollicité ce qui tend à augmenter les pannes et les fuites. De plus, la finesse des pics observée doit être compatible avec la vitesse d'acquisition des analyseurs. Les spectromètres de masse de type TQ ou TOF n'ont aucun mal à réaliser correctement les acquisitions avec des vitesses de plusieurs dizaines de spectres par seconde. Les appareils bénéficiant de la technologie Orbitrap™ se sont beaucoup améliorés ces dernières années passant du LTQ-Orbitrap Discovery en 2008 avec une vitesse de scan de 1 Hz à la résolution de 30 000 (Δm/m, FWHM à m/z 400) à 6 Hz aujourd'hui sur le Q-Exactive™ à la même résolution. Aujourd'hui, seul le couplage avec le FT-ICR peut être problématique lorsque les spectres sont enregistrés à très haute résolution en raison d'un temps d'acquisition des spectres de l'ordre de plusieurs secondes.

Par ailleurs, différents mécanismes de rétention chromatographiques sont disponibles et vont conditionner le choix de la nature de la phase stationnaire ainsi que les solvants constituants la phase mobile.

Dans le domaine de l'analyse de résidus de polluants environnementaux, la chromatographie à polarité de phase inversée (RP de l'anglais *Reverse Phase*) est extrêmement utilisée [298,299]. La silice contenue dans la colonne est fonctionnalisée avec des chaînes aliphatiques de type $C_8$ ou $C_{18}$ (plus utilisée) ce qui rend la phase stationnaire hydrophobe et compatible avec de solvants aqueux et organiques [généralement de l'acétonitrile (ACN) ou du méthanol (MeOH)]. Il est alors possible d'appliquer un gradient croissant de phase organique afin de jouer sur la solubilité des composés apolaires dans la phase mobile et d'éluer les composés en fonction de leur polarité. Les méthodes RP sont également adaptées à la détection MS ce qui en fait une méthode de choix pour un couplage avec la spectrométrie de masse. Elles sont également hautement reproductibles et leurs mécanismes de séparation sont bien connus [300]. Une variante des traditionnelles colonnes C18 est l'ajout d'un « endcapping » polaire sur la silice. Généralement la nature de ce groupement n'est pas communiquée par les constructeurs car il bénéficie d'un brevet, mais il pourrait s'agir d'un groupement « diol », « amino » ou « cyano ». Ce groupement permet une utilisation de la colonne dans des conditions 100% aqueuses ce qui n'est pas conseillée avec des colonnes $C_{18}$ classiques sans « endcapping » car un repliement des chaînes aliphatiques peut avoir lieu et endommager la colonne. Ce groupement permet en outre une légère rétention mixte pour les polluants de polarité intermédiaire comme les médicaments. Ce type de colonne est donc également très utilisé dans la détection des pesticides [272,301,302] et des médicaments [303,304].

En revanche, les polluants très polaires sont mal retenus sur ces colonnes (élués dans le volume mort) et sont donc particulièrement sujets à l'effet matrice, ce qui limite leur détection. On peut citer par exemple les bipyridiliums (diquat, paraquat et cyperquat) utilisés comme herbicides et qui sont des ammoniums quaternaires, ou encore les molécules de faibles masses moléculaires (< 200 *m/z*) composées de groupements imidazole et ses dérivés (imidazoline et imidazolidine) ou de groupements pyrrole et pyrrolidine. En effet, le faible nombre d'atomes de carbone conjugué à la présence de nombreux atomes d'azote et d'oxygène rend ces pesticides polaires particulièrement difficiles à analyser en RP. Le même type de problème est observé pour les antibiotiques de la famille des aminoglycosides. De fait, des mécanismes de rétention alternatifs tels que la chromatographie liquide de paires d'ions ou la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC de l'anglais, *Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography*) ont été développés pour répondre à ce problème. En ce qui concerne la chromatographie d'appariements d'ions, un contre-ion volatil est additionné à la phase mobile pour former une paire d'ions avec les analytes. Les paires d'ions résultantes présentent une charge nulle, elles sont donc hydrophobes et retenues sur des colonnes RP. Cette technique a logiquement été utilisée pour les composés chargés en solution au pH de travail comme la mélamine [305] ou les molécules chargées telles que comme les ammoniums quaternaires [306].

La chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) est une autre approche utilisée pour séparer efficacement les analytes polaires en utilisant des solvants d'élution compatibles avec la spectrométrie de masse. Dans la pratique, la rétention des molécules est réalisée grâce à une couche d'eau semi immobilisée sur la phase stationnaire, ce qui rend possible les liaisons hydrogène et les interactions dipôle-dipôle. Cette technique a été utilisée pour la détection de plusieurs classes de médicaments vétérinaires [307,308] tels que les aminoglycosides, les tétracyclines, les coccidiostats ou les macrolides. Elle a également été utilisé pour la détection des pesticides [309-311] particulièrement difficile à analyser en RP du fait de leur trop grande polarité comme le glyphosate et son métabolite l'AMPA (*AminoMethylPhosphonic Acid*), ainsi que pour celles des organophosphorés polaires tels que l'acephate, l'omethoate et le methamidophos, tous ayant un coefficient de partage octanol/eau inférieur à 0.

Au même titre que la chromatographie en phase gazeuse, la LC est une méthode incontournable pour l'analyse de polluants dans l'environnement. Elle s'est démocratisée lors de l'avènement des sources ESI permettant un couplage aisé entre ce type de chromatographie et la spectrométrie de masse offrant un large choix d'analyse ainsi qu'une sensibilité inégalée pour un détecteur couplée à la LC.

De façon générale, il est difficile de conclure quant à une plus grande utilité de l'une ou l'autre des techniques de chromatographie tant elles paraissent complémentaires. Les auteurs d'une publication en 2005 ont tout de même tenté de répondre à cette question en se demandant qui de la GC-MS ou de la LC-MS/MS est la meilleure technique pour l'analyse de 500 pesticides hautement prioritaires [312]. Parmi les 500 pesticides retenus pour l'analyse, on retrouve 172 herbicides, 171 insecticides, 105 fongicides et 52 pesticides d'autres types parmi lesquels 81 organophosphorés, 43 carbamates, 40 organochlorés, 22 dérivés d'urées et 19 pyrethrinoïdes, ce qui représente une diversité chimique importante.

Lors du choix des systèmes analytiques et compte tenu de la diversité chimiques des pesticides retenus, les auteurs n'ont pu choisir de système qui leur permettait d'analyser l'ensemble des molécules. Ils se sont focalisés sur des systèmes permettant de réaliser une analyse simultanée de résidus avec une sensibilité en deçà des limites maximales recommandées par l'Union Européenne plutôt que l'identification et la quantification de pesticides non ciblés ou non réglementés. Ils ont donc comparé un système de chromatographie en phase gazeuse couplée à une source d'ionisation à impact (EI) avec un système de chromatographie liquide couplée à un TQ et une source ESI. Ainsi, ce sont près de 200 articles qui ont été utilisés pour compiler les résultats sur les 500 molécules ciblées en GC-MS et LC-MS/MS.

Les résultats montrent que d'avantage de pesticides et leurs métabolites peuvent être analysés par LC-ESI-MS/MS plutôt qu'en GC-MS. Le Tableau 3 répertorie les 500 pesticides analysés en fonction de leur classe chimique et indique le nombre de molécules qui n'est pas détectable par l'une ou l'autre des techniques utilisées. On constate que sur les 500 pesticides choisis, 135 ne sont pas analysables par GC-MS contre 47 pour la technique de LC-MS/MS. On remarque également que la classe chimique est un facteur déterminant dans la détection. Les pesticides organochlorés sont principalement analysables par GC-MS car ce sont généralement des molécules sans site ionisable par ESI. En revanche, les molécules relativement polaires donc peu volatiles comme les sulfonylurées, les triazines et les urées sont non détectables en plus grand nombre par GC-MS. Les auteurs ont mis en évidence une différence significative de sensibilité entre les deux approches. Sur la Figure 15, on remarque que la technique de LC-MS/MS a une sensibilité de 0,1 ng/mL pour une grande majorité des pesticides étudiés contre 100 ng/mL pour la GC-MS. La même conclusion peut être faite en regardant la Figure 16 dans laquelle on constate que seule la famille des pesticides des organochlorées est mieux détectée par GC-MS que par LC-MS/MS.

| Chemical class | Number of pesticides in that class | Not detected by GC-MS | Not detected by LC-MS/MS | Individual pesticides, not detected by LC-ESI/MS/MS |
|---|---|---|---|---|
| Organophosphorus | 81 | 0 | 1 | Fenchlorphos |
| Carbamate | 43 | 17 | 1 | Chlorpropham |
| Organochlorine | 40 | 0 | 33 | All organochlorines, except binapacryl, chlorobenzilate, chlorthiamid, endosulfansulfate, flurochloridone, iprodione, procymidone |
| Sulfonylurea | 26 | 26 | 0 | no |
| Triazole | 24 | 1 | 0 | no |
| Triazine | 23 | 6 | 0 | no |
| Urea | 22 | 16 | 0 | no |
| Pyrethroide | 19 | 0 | 2 | Tefluthrin, transfluthrin |
| Aryloxyphenoxy-propionate | 12 | 4 | 0 | no |
| Aryloxyalkanoic acid | 10 | 9 | 0 | no |
| Other | 200 | 56 | 12* | Benfluralin, biphenyl, captafol, captan, chlorbensid, chlorfenapyr, chlorothalonil, chlorthal-dimethyl, etridiazole, nitrothal-isopropyl, quintozene, tecnazene* |
| Total number | 500 | 135 | 47 | |

*This calculation/list does not contain four organotin compounds, four quaternary ammonium salts, glyphosate, and picloram, which require special LC conditions for ESI–MS/MS detection.

**Tableau 3 : Table de contingence des pesticides non analysables par GC-MS ou LC-MS/MS en fonction des classes chimiques (tiré de la publication Alder et coll. [312])**

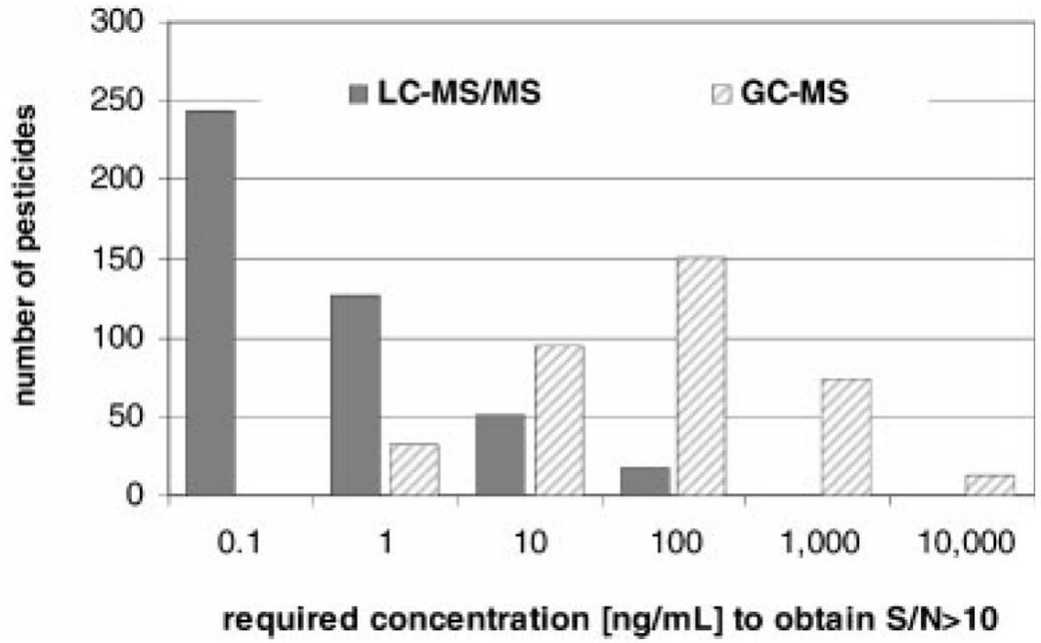



**Figure 15 : Distribution pour chaque technique des limites de quantification (LOQ) pour tous les pesticides et métabolites (tiré de la publication de Alder et coll [312]**

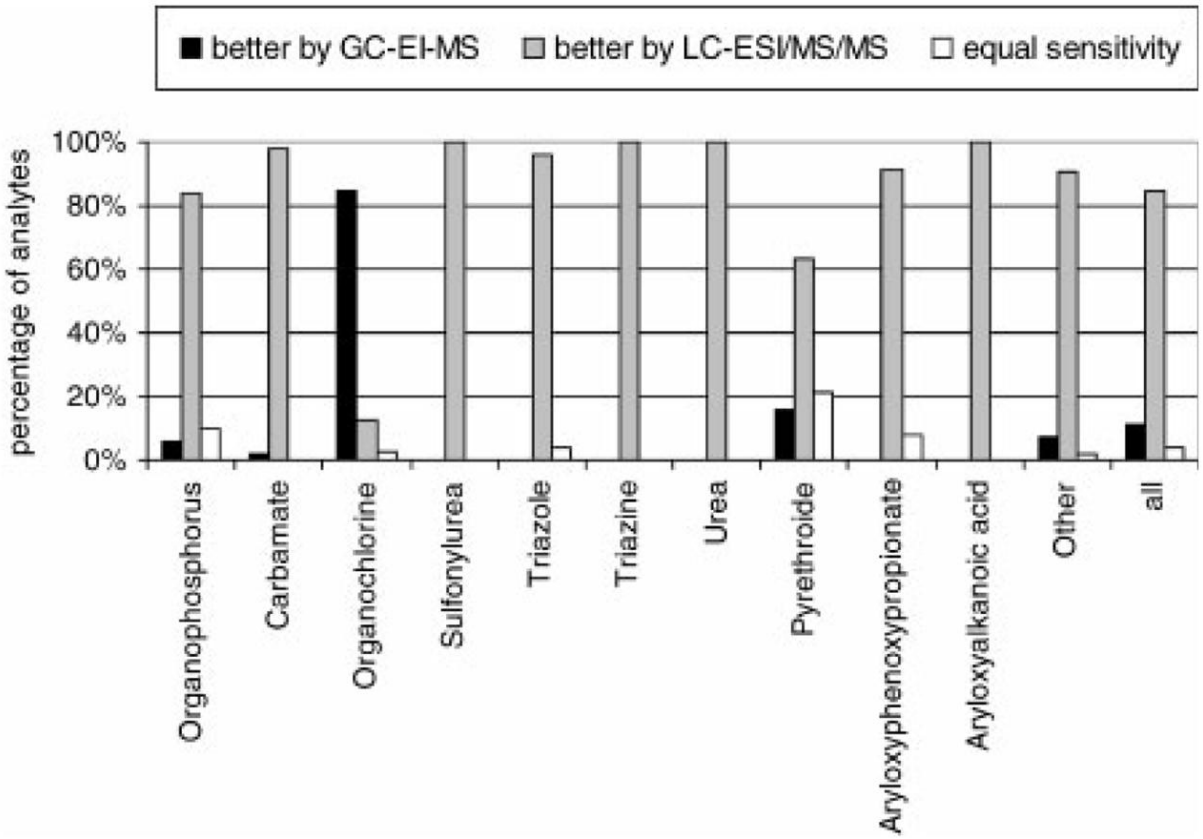



**Figure 16 : Comparaison des sensibilités pour la GC-MS et la LC-MS/MS de chaque pesticide en fonction des différentes classes (tiré de la publication de Alder et coll. [312])**

Les auteurs concluent que les meilleures performances de la LC-MS/MS sont probablement dues à plusieurs raisons. Tout d'abord, le volume d'injection utilisé en LC-MS/MS est plus important que pour la GC-MS (20 µL *vs* 1 µL). Ensuite, la quantité de fragmentation durant l'ionisation (ESI *vs* EI) peut également expliquer ces différences. De manière générale, on estime que la GC est plus sensible que la LC car les pics sont plus fins en raison du grand nombre de plateaux théoriques dans les colonnes GC. Il s'avère sur la base des articles analysés par les auteurs de cette publication que c'est un préjugé. Néanmoins, cette publication date de 2006, de nombreux développement en GC rapide (de l'anglais, *fast GC*) et GC bidimensionnelle (GC × GC) ont permis depuis de diminuer sensiblement les limites de quantification atteintes par ces appareils. On notera que de nombreux polluants comme les PCB ou les organochlorés sont très dangereux pour l'homme et l'environnement et qu'ils ne sont pas analysables par LC-ESI-MS. Ces deux techniques sont donc bien complémentaires pour la détection de micropolluants dans l'environnement et les matrices agroalimentaires. Il serait intéressant de réaliser une nouvelle étude comparative, à l'heure actuelle, afin de se rendre compte des progrès réalisés avec ces 2 types de technologies.

III.4.2.3. L'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse

L'électrophorèse a été conçue pour séparer des espèces chimiques soumises à un champ électrique selon leur rapport taille sur charge, et ce en fonction de leur vitesse de migration électrophorétique ($\mu_{ep}$). L'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse (CE-MS) représente une alternative intéressante aux techniques chromatographiques pour l'analyse des polluants polaires comme les antibiotiques [313-315]. Elle permet également de séparer des stéréoisomères à l'aide de sélecteurs chiraux comme la cyclodextrine [316]. Certains pesticides comme le propiconazole possèdent 2 sites chiraux qui peuvent être affectés au cours de biotransformation (Figure 17). Il est donc nécessaire de suivre les éventuels produits transformés pour connaître leur rémanence dans l'environnement.

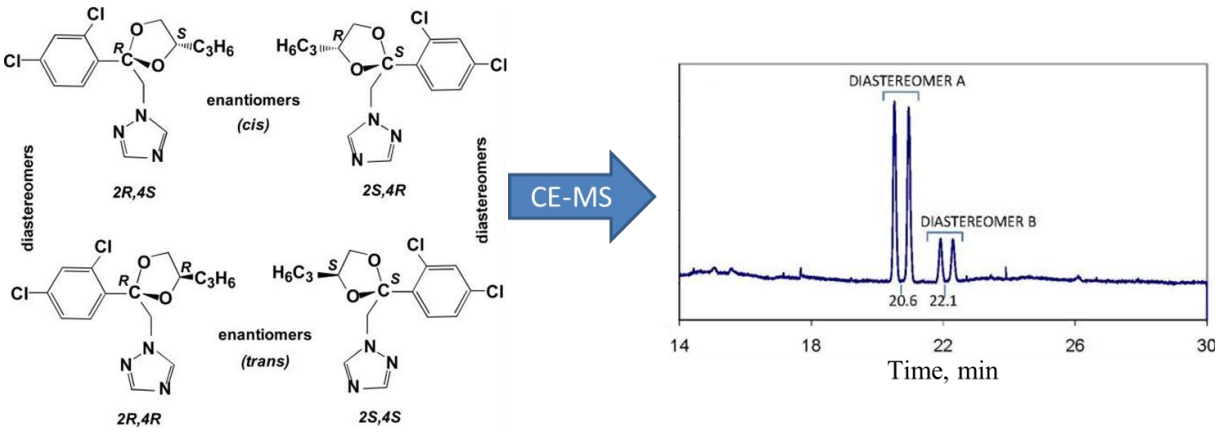



**Figure 17 : Illustration d'une séparation d'énantiomères et de diastéréoisomères par électrophorèse capillaire (Adapté de la publication de Garisson et coll. [316])**

L'électrophorèse capillaire est une méthode très résolutive, rapide et nécessitant une faible quantité d'échantillon. Contrairement à l'HPLC, l'électrophorèse capillaire n'implique pas de transfert de masse entre les phases et le profil d'écoulement est plat, alors qu'il est plutôt parabolique pour un flux hydrodynamique. Il n'y a donc pas d'élargissement du pic comme en LC. Généralement, c'est l'électrophorèse capillaire de zone qui est utilisée. Les molécules sont placées dans un tampon et migrent à différentes vitesses sous l'effet d'un champ électrique constant. La vitesse des analytes est fonction de leur migration électrophorétique qui dépend de leur charge et de leur masse et du flux électroosmotique qui est généré par la migration des constituants du tampon (Figure 18).

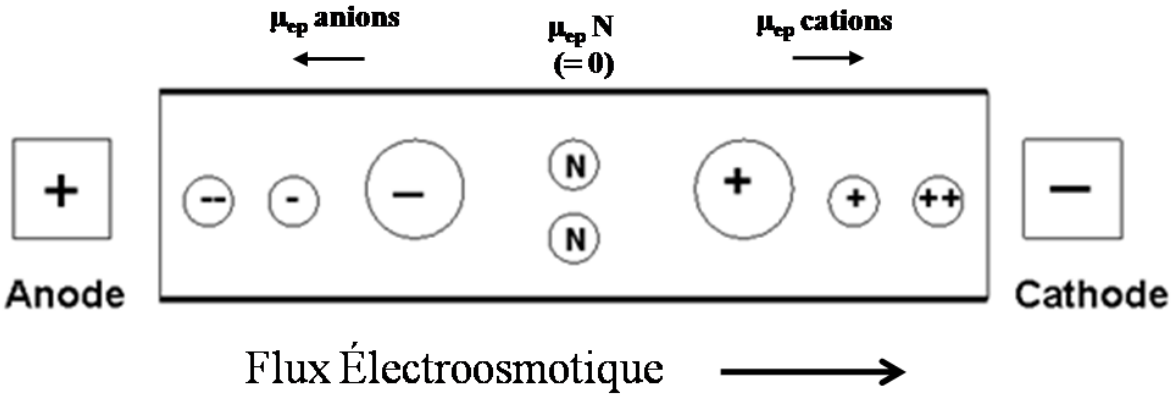



**Figure 18 : Principe de l'électrophorèse capillaire de zone [317]**

Le système introductif dans le spectromètre de masse est essentiel. Généralement, la chromatographie en phase liquide ou gazeuse est utilisée pour apporter une complémentarité nécessaire à l'analyse MS. Elles permettent, en outre, de réaliser l'analyse de matrices complexes et de gagner en sensibilité tout en fournissant une information quant à l'identification du composé par injection d'un standard pour comparaison, par exemple. Dans le cas de matrice incompatible avec la technique analytique souhaitée ou de manque de sensibilité, une étape de préparation d'échantillon est le plus souvent réalisée.

## III.5. **Préparation d'échantillon**

La préparation d'échantillon est une étape clé de l'ingénierie analytique [318]. Notons en préambule que la préparation d'échantillon intervient après l'échantillonnage dont seul le principe général sera abordé ici. En chimie analytique, la question de l'homogénéité de l'échantillon se pose d'autant plus que l'échantillon est important (pot de miel, cuve de vin, eau d'une rivière, muscle, foie, etc.). Or, la composition chimique peut varier d'un endroit à un autre (hétérogénéité de l'échantillon, stratification, décantation, migration etc.). Deux possibilités s'offrent à l'analyste : (i) homogénéiser l'échantillon si cela est possible ou (ii) prélever à plusieurs endroits selon un protocole précis pour l'obtention d'échantillons représentatifs. Le risque est le biais des résultats et des conclusions altérées ou faussées. De nombreuses étapes telles que la conservation des échantillons, la filtration, l'ajustement de pH des solutions aqueuses peuvent être nécessaires après l'échantillonnage et avant l'extraction et l'analyse. Si ces différentes étapes ne sont pas réalisées de manière appropriée, la composition originelle de l'échantillon avant l'extraction peut être altérée.

Le traitement de l'échantillon peut avoir plusieurs objectifs comme le changement d'état physique pour permettre l'injection dans les systèmes présentés précédemment (passage d'un

état solide à un état liquide, par exemple), l'élimination d'une partie de la matrice afin de rendre l'échantillon compatible avec la technique analytique ou de supprimer d'éventuels interférents. Pour les polluants peu concentrés et parce que la réglementation en terme de concentration évolue sans cesse à la baisse pour protéger le consommateur d'éventuels effets toxiques à long terme, la préparation d'échantillon permet de concentrer les analytes d'intérêts afin d'augmenter la sensibilité de l'analyse.

L'extraction dépend fortement de deux paramètres : (i) le type de matrice étudié [liquide (eaux, vin, jus de fruit, …), solide (sol, viande, céréales, fruits, …) ou gazeux (air, fraction volatil d'un parfum, fumée, …)] et (ii) le type de composés que l'on cherche préférentiellement à étudier, une famille chimique de polluants en particuliers (carbamates, pyréthrinoïdes, anti cancéreux, AINS, …) ou une classe chimique complète avec des méthodes multi-résidus (pesticides, médicaments vétérinaires ou produits d'hygiène personnel, …).

Dans le cas de méthodes analytiques quantitatives, cette préparation d'échantillon doit être contrôlée afin de connaître la fraction de molécules d'intérêts réellement extraites de la matrice. Pour cela, le recours à des étalons internes est indispensable. Il s'agit généralement d'une ou de plusieurs molécule(s), identiques ou proches en structures de celles qui sont recherchées, marquées avec des isotopes stables ($^{15}N$, $^{13}C$ par exemple) afin de pouvoir les distinguer des molécules d'intérêts grâce à la spectrométrie de masse. A l'aide de ces étalons, il est ainsi possible de normaliser l'extraction échantillon par échantillon pour s'affranchir du rendement et des conditions de l'extraction lors de la quantification. Néanmoins, compte tenu du prix et de la disponibilité, il est parfois difficile de contrôler chaque molécule par son analogue doublement marqué. Le plus souvent, un représentant par famille chimique de structure et de propriétés physico-chimiques proches est alors choisi pour normaliser toutes les molécules semblables avec une bonne approximation.

Dans ce paragraphe, seule la préparation des échantillons liquides et solides sera discutée avec une présentation succincte des techniques les plus employées.

### III.5.1. La préparation d'échantillon liquide

Les échantillons liquides peuvent être directement injectés dans les systèmes analytiques de type LC ou GC couplés à la spectrométrie de masse. Toutefois, ils ne sont pas toujours compatibles avec ces instruments et peuvent même les endommager. De plus, la complexité de la matrice peut empêcher la détection des analytes. Pour les matrices liquides, on distingue 3 méthodes de préparation très utilisées pour la détection de polluants dans l'environnement :

- L'extraction par solvant (LLE de l'anglais *Liquid-Liquid Extraction*)
- L'extraction sur phase solide (SPE de l'anglais *Solid Phase Extraction*)
- La microextraction sur phase solide (SPME de l'anglais *Solid Phase MicroExtraction*)

Ces 3 techniques sont détaillées en annexe 4. Pour mesurer le degré d'utilisation de ces 3 techniques de préparation d'échantillons liquides, une recherche à partir de la base de données PubMed a été réalisée pour l'extraction des pesticides. Pour la technique de SPE, les mots clés recherchés ont été : « (SPE OR (solid phase extraction)) AND pesticide » et le même mode opératoire a été utilisé pour les deux autres techniques. La Figure 19 montre les résultats associés à cette recherche en nombre de publications trouvées. On constate que la SPE et la LLE sont autant utilisés.

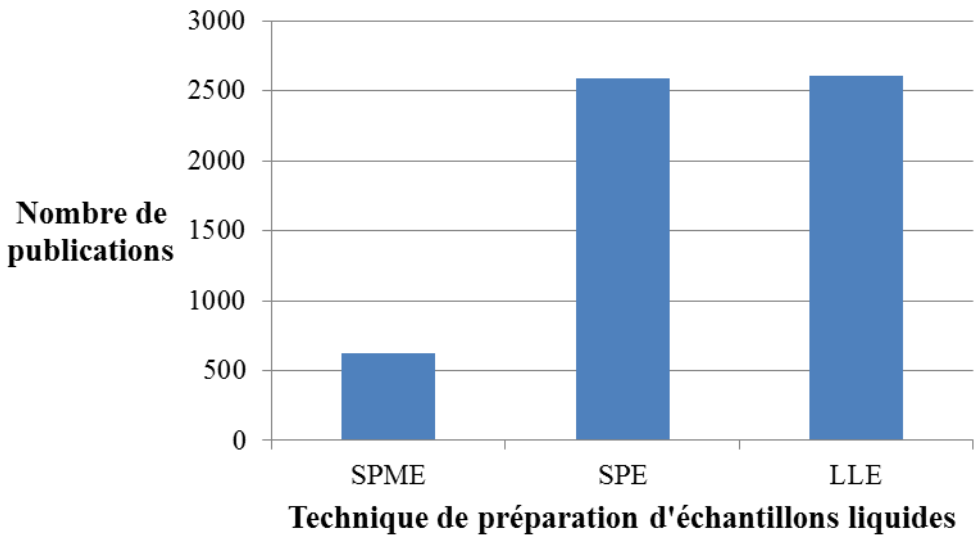



**Figure 19 : Distribution du nombre de publications en fonction du type de technique (SPME, SPE et LLE) utilisée pour la préparation d'échantillons liquides**

Au cours du temps, ces 3 techniques se sont modernisées pour consommer toujours moins de solvant ou d'échantillon et pour être plus sélective. Ces modes de préparation servent le plus souvent à concentrer les composés d'intérêts en éliminant autant que possible les interférents éventuels. La préparation d'échantillon reste une science à part entière. Il existe en effet un grand nombre de techniques disponibles ainsi qu'un grand nombre de phases adsorbantes pour toutes ces techniques et de multiples paramètres influençant la préparation. L'analyste doit alors envisager chaque solution qui lui est proposée afin de sélectionner la préparation la plus adaptée selon plusieurs paramètres tels que la sensibilité, la variabilité des molécules

analysées et la robustesse des résultats. A titre d'exemple, Robles Molina et coll. ont comparé ces 3 techniques de préparation d'échantillons pour la détermination par GC-MS/MS de 57 contaminants organiques majeurs tels que des pesticides, des HAP ou des PCB dans des eaux usées [319]. L'eau issue d'une station d'épuration a été extraite selon les procédures suivantes : (i) la LLE à l'aide de n-hexane, (ii) la SPE avec une phase $C_{18}$ et une élution avec de l'acétate d'éthyle et du dichlorométhane (1/1, v/v) et (iii) une SPME avec deux fibres différentes (polyacrylate et PDMS/carboxen/DVB). Les résultats sont présentés sur le Tableau 4 et montrent que la LLE et la SPE donnent des résultats très proches. Ces deux techniques permettent d'extraire l'ensemble des molécules sélectionnées contrairement à la SPME. La LLE et la SPE présentent les mêmes sensibilités, rendements d'extraction, répétabilités et linéarités. Cependant, la SPE sort vainqueur de cette comparaison car le temps de traitement et d'analyse par échantillon est plus faible et la quantité de solvant consommé est 3 fois inférieure. La SPE permet aussi une rétention sélective, ou relativement exhaustive comme l'a montré cette publication. Elle permet en outre de concentrer de grand volume d'échantillons afin de gagner en sensibilité. C'est donc une technique de choix pour l'analyse d'échantillons liquides agroalimentaires ou environnementaux.

| | LLE | SPE | HS-SPME (PA fiber results) |
|---|---|---|---|
| **Number of measurable compounds** | 57 | 57 | 43 |
| **Treatment+analysis time per sample (min)** | ≃75 | ≃55 | ≃60[a] |
| **Suspended particulate matter subject to analysis?** | Yes | Not (unless processing unfiltered wastewater samples) | Yes (although only for relatively volatile species) |
| **Solvents, consumed per sample** | 76 mL n-hexane | 12 mL MeOH; 14 mL EtAc+DCM (1:1) | 1 mL MeOH |
| **LOQs (ng $L^{-1}$)** | 0.03–5.10 | 0.03–5.00 | 0.10–150.00 |
| **Accuracy (recovery rates) (%)** | 70–110 | 70–120 | 73–119 |
| **Precision (RSD %)** | 3–15 | 1–10 in most cases | 7–20 |
| **Linearity ($R^2$)** | 1–500 ng $L^{-1}$ (at least 0.999 for most compounds) | 1–500 ng $L^{-1}$ (at least 0.999 for most compounds) | 5–50 ng $L^{-1}$ (at least 0.991 for most compounds) |

EtAc: ethyl acetate and DCM: dichloromethane.

[a] Overlapped mode: injection of sample "$n$"+time incubation of sample "$n+1$".

**Tableau 4 : Etude comparative de méthodologies de traitements d'échantillons pour la détermination de 57 polluants organiques par GC-MS/MS (tiré de la publication de Robles-Molina et coll. [319])**

### III.5.2. La préparation d'échantillon solide

L'extraction de composés organiques à partir d'échantillons solides tels que les sols ou les sédiments est relativement complexe. Il est assez aisé de comprendre que l'emploi d'un liquide est systématiquement employé dans la mesure où un changement d'état s'impose pour pouvoir analyser par chromatographie les composés d'intérêts présents au sein d'un solide. Pour les extraire, il existe 4 méthodes usuelles présentées succinctement en annexe 4 :

- L’extraction solide-liquide (LSE de l’anglais *Liquid-Solid Extraction*)
- L’extraction assistée par micro-ondes (MAE de l’anglais *Microwave Assisted Extraction*)
- L’extraction accélérée par solvant (ASE de l’anglais *Accelerated Solvent Extraction*)
- L’extraction par fluide super critique (SFE de l’anglais *Supercritical Fluid Extraction*)

Ces techniques de préparation d’échantillons solides sont toutes basées sur le même principe. L’extraction est réalisée à l’aide d’un solvant (par agitation ou micro-onde, chauffé, sous pression ou en phase supercritique) afin de pénétrer dans l’échantillon et d’y extraire les composés d’intérêts. L’objectif principal est de faire passer les composés piégés dans un solide vers un état liquide pour pouvoir les analyser en chromatographie. Ces extractions permettent également de concentrer les analytes d’intérêts. Sur la base de données PubMed, ces 4 techniques pour l’extraction de pesticides sont autant utilisés les unes par rapport aux autres. Les auteurs de deux publications, comparant les différentes techniques pour la détection de HAP, PCB et de pesticides organochlorés dans le sol ou la nourriture destinée à l’alimentation animale rapportent des performances similaires [320,321]. Ils concluent que l’extraction ASE est plus performante en raison de son rendement d’extraction, de sa faible consommation de solvant (5 mL seulement), de son faible temps d’extraction (9 minutes), de sa sensibilité (de l’ordre du ng/g) et de sa possibilité d’automatisation.

### III.5.3. La préparation d’échantillon de type QuEChERS

La méthode QuEChERS est une technique d’extraction à part entière que j’ai préférée traiter séparément des autres techniques tant elle a pris une place importante dans l’analyse de polluants dans l’environnement. Pour preuve, une recherche dans la base de données PubMed du mot « QuEChERS » donne plus de 500 résultats. Cette technique récente a été proposée par Anastassiades et coll. en 2003 [322]. QuEChERS et l’acronyme en anglais de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, qui se traduit en français par rapide, facile, peu cher, efficace, robuste et sûre. Cette approche a considérablement simplifié la mise au point de méthodes multi-résidus de pesticides dans les fruits, les légumes, les produits céréales ou les échantillons liquides complexes comme le vin, le thé, le café etc. La première méthode multi-résidus de grande échelle utilisant cette approche a conduit à la détermination de 229 pesticides dans les fruits et les légumes par Lehotay et coll. en 2005 [323]. Initialement, l’extraction QuEChERS a été conçue pour l’analyse de résidus de pesticides dans les fruits et

légumes qui présentent une teneur élevée en eau. Elle est basée sur une extraction de 10 ou 15 g d'échantillon à forte teneur en eau et un solvant organique (typiquement de l'acétonitrile), à raison de 1 mL de solvant pour 1 g d'échantillon (Figure 20). Des sels (comme de l'acétate de sodium) ou des tampons sont ensuite ajoutés en excès, ce qui va permettre : (i) de diminuer la solubilité des analytes dans la phase aqueuse pour permettre un transfert plus efficace vers la phase organique et (ii) de favoriser la séparation liquide-liquide. Après centrifugation, la phase organique contenant les analytes est récupérée. Elle peut être ensuite purifiée si nécessaire, et l'eau en excès éliminée, lors d'une étape unique d'extraction en phase solide et en mode dispersif (d-SPE) qui consiste à mélanger l'extrait organique avec du sulfate de magnésium anhydre ($MgSO_4$) et des supports de type amines primaires et secondaires (PSA, de l'anglais *Primary and Secondary Amine*). Le principal avantage de cette technique, en plus de sa rapidité et de sa simplicité de mise en œuvre, est la possibilité d'analyser directement l'extrait final par GC/MS ou par LC/MS/MS après dilution si nécessaire.

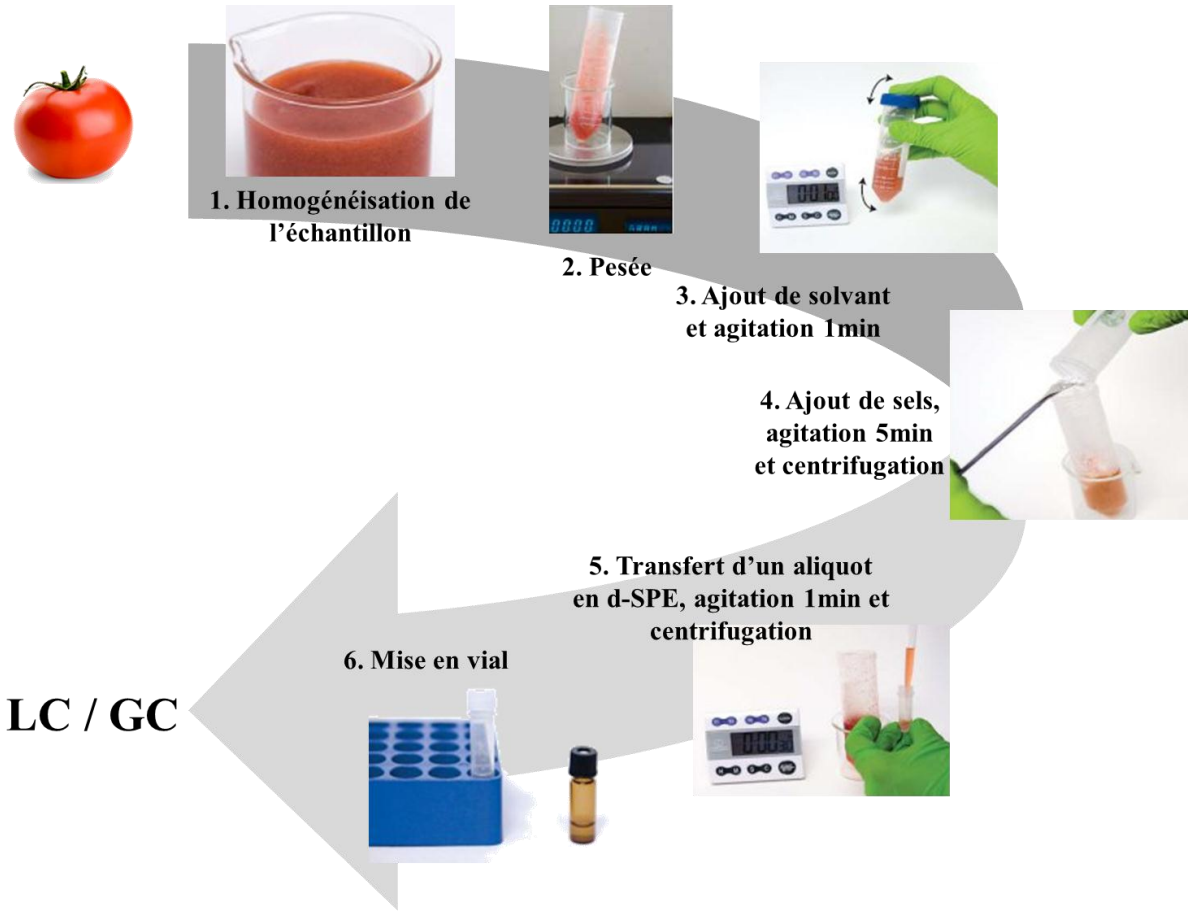



**Figure 20 : Principe générale de la méthode QuEChERS (Adapté du site internet SeparationScience [324])**

Dans le cas d'échantillons à faible teneur en eau comme les céréales, les fruits secs, le miel ou les épices, l'extraction peut être optimisée par ajout d'eau supplémentaire (généralement 2 fois plus que de matrice : 1g matrice et 2g d'eau) afin de faciliter la distinction des deux phases liquide-liquide et la récupération de la phase organique après centrifugation. La sélection des produits d'extraction de d-SPE est très importante lors de la purification de l'échantillon. Si le but de la purification est l'élimination des acides organiques polaires, des sucres et lipides dans les fruits et légumes courants (melon, courgette, tomate etc.), on ajoutera à la phase organique du $MgSO_4$ et du PSA. En revanche, s'il s'agit de denrées alimentaires contenant des cires ou une quantité de matières grasses importantes (céréales, noix, produits laitiers, avocat etc.), de la phase silice greffée $C_{18}$ en poudre sera ajoutée en plus du $MgSO_4$ et du PSA. Enfin, certains fruits et légumes, comme l'épinard, le poivron rouge et la carotte, présentent des teneurs importantes en pigments non polaires comme les caroténoïdes ou la chlorophylle qui peuvent poser problème notamment en GC car ils ont tendance à s'accumuler au niveau du port d'injection et contamine l'injecteur. Le PSA seul ne permet pas d'éliminer ce type de composés. L'emploi de noir de carbone graphitisé (GCB, de l'anglais *Graphite Carbon Black*) permet une élimination efficace et il est ajouté en même temps que le PSA (Figure 21).

**Figure 21 : Effet de l'emploi croissant de GCB sur un extrait QuEChERS d'épinard (Illustration tirée de la plaquette commerciale Waters)**

La méthode QuEChERS a été utilisée dans de nombreuses applications pour la détection de polluants environnementaux et plus généralement des pesticides tant sur des matrices solides comme les fruits [274,325,326], les légumes [327-329], les céréales [330], les épices [330,331], les olives [332], le miel [333] que sur des matrices liquides comme le vin [334,335], le thé [336] ou les jus de fruits [337]. Ce procédé a également été accrédité par les

instances européennes et américaines et fait partie des techniques standards des laboratoires agroalimentaires pour l'analyse de résidus.

En conclusion, nous avons pu constater dans ce paragraphe consacré à la préparation d'échantillon l'existence d'un grand nombre de techniques complémentaires. La préparation d'échantillons nécessite une bonne connaissance des molécules d'intérêts ainsi que de la matrice étudiée afin de mettre en œuvre un procédé efficace pour isoler et/ou concentrer les analytes. Quelle que soit la matrice (solide ou liquide), la tendance est à l'utilisation de quantité toujours plus faible de solvant et à l'utilisation des techniques adsorbantes (pour les liquides) ou par chauffage et sous pression (pour les solides). Enfin, la méthode QuEChERS a révolutionné la préparation des échantillons solides à haute teneur en eau ou des liquides complexes grâce à un procédé innovant d'extraction liquide-liquide couplée à une purification en une étape à l'aide d'une extraction sur phase solide dispersive.

Dans cette troisième partie, nous avons passé en revue les moyens de détection de la pollution environnementale. Ils ont beaucoup évolué au cours du siècle dernier permettant une analyse toujours plus sensible, spécifique, rapide et polyvalente. De nos jours, la spectrométrie de masse apparaît comme la technique incontournable. Le grand nombre de sources d'ionisation combiné aux différents analyseurs font de cet outil un système de détection très polyvalent et sensible. Ce détecteur peut être couplé avec un système chromatographique en phase gazeuse ou liquide permettant de séparer les molécules dans le temps en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Cette nouvelle dimension apporte non seulement de la spécificité mais aussi de la sensibilité car les molécules subissent moins les phénomènes de suppression à l'ionisation. La préparation d'échantillon est un autre aspect crucial de cette ingénierie analytique. Elle a pour but la concentration et la séparation des analytes de la matrice dans laquelle ils sont contenus. L'ensemble de ces procédés n'a qu'un seul but : être capable de détecter des quantités toujours plus faibles de polluants dans des matrices toujours plus complexes. La détection de la pollution a été entreprise dans un grand nombre de matrices telles que les sols, l'eau des rivières en passant par l'agroalimentaire et jusque dans les urines et le sang. Dans cette course vers une analyse toujours plus exhaustive et sensible, les spectromètres de masse à haute résolution sont-ils les appareils les plus pertinents ? C'est l'une des questions que nous nous sommes posées lors de ce travail.

# IV. APPORT DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A HAUTE RESOLUTION ET DE L'ANALYSE METABOLOMIQUE A L'ANALYSE DE POLLUANTS DANS LES MATRICES AGROALIMENTAIRES ET ENVIRONNEMENTALES

## IV.1. **Introduction**

Le couplage entre la chromatographie liquide (HPLC ou UHPLC) et la spectrométrie de masse à analyseurs triple quadripolaires est la technique en phase liquide la plus utilisée dans le domaine de la pollution environnementale en raison de ses nombreux avantages. Cette technique est le plus souvent utilisée en mode MRM (de l'anglais *Multiple Reaction Monitoring*, voir CHAPITRE IV.II.3) qui procure une grande vitesse d'acquisition et une excellente spécificité. La technologie de type triple quadripolaire assure une bonne transmission des ions, ce qui permet d'obtenir une excellente sensibilité. Les laboratoires experts ont un bon recul sur cette technologie et réalisent depuis de nombreuses années des méthodes de détection multi-résidus sur les polluants environnementaux. De nombreuses méthodes ont d'ailleurs été accréditées sur cet appareillage.

Toutefois, la mise au point de la validation des méthodes sur ce type d'appareillage est relativement longue et la détection ne concerne que les molécules préalablement sélectionnées. Ainsi, les molécules non ciblées ou inconnues ne peuvent, de prime abord, pas être détectées, ce qui pose un problème de sécurité alimentaire. Le premier cas concerne les molécules connues mais non référencées comme potentiellement présentes dans une matrice. Cela a été le cas par exemple lors du scandale du lait frelaté à la mélamine. En mai 2008, Sanlu, un producteur chinois de lait pour nourrissons, est informé que des enfants sont tombés gravement malade après avoir consommé son lait. Pour augmenter artificiellement la teneur en protéines, la poudre de lait a été coupée à la mélamine, un produit chimique utilisé notamment dans la fabrication des colles et des plastiques, tuant au moins 6 enfants et en rendant malade près de 300 000 autres. La mélamine ne faisant pas partie de la liste des molécules potentiellement présentes dans le lait, elle n'avait pas été recherchée.

## IV.2. **Le problème des métabolites**

En principe, les pesticides ne sont homologués et utilisés que s'il y a démonstration de leur non rémanence dans l'environnement au-delà de leur durée de vie (temps de demi-vie dans le

sol de l'ordre de quelques jours à quelques semaines). Tout au long de l'introduction, il a été démontré que des pesticides étaient quant même retrouvés dans l'environnement et qu'ils pouvaient contaminer des zones très étendues loin de leurs lieux d'épandage. Il existe trois grands générateurs de diversité chimique : (i) l'environnement, (ii) les stations d'épuration et (iii) l'homme. Dans l'environnement, il peut se produire des phénomènes de dégradation des pesticides lors de processus biologiques par des micro-organismes, des plantes, ou lors de processus abiotiques tels que des réactions chimiques et photochimiques. Les processus de transformation que subissent les pesticides sont déterminés par leurs structures, les conditions environnementales et le type de transport [338] (Figure 22).

En fonction de leurs propriétés physico-chimiques, les molécules sont préférentiellement transportées dans un compartiment plutôt qu'un autre. Elles peuvent être soumises à des gradients oxydo-réducteurs dans les sols et sédiments, tandis que le type d'aquifères (structure rocheuse suffisamment poreuse ou fissurée pour y stocker de l'eau) détermine les transformations biologiques ou abiotiques pouvant s'y produire (selon la présence ou non d'oxygène par exemple). De même, les transformations photochimiques sont limitées aux compartiments exposés à la lumière.

Les stations d'épuration (STEP) et de potabilisation sont aussi une source non négligeable de transformations chimiques. Dans les STEP sont utilisées des bactéries pour dégrader les substrats organiques ou des procédés très oxydants comme l'ozonation ou la chloration. Plusieurs publications font d'ailleurs état de nombreux produits de transformation à l'issue de ces traitements comme la chloration du bisphénol A en 21 autres produits dont 17 bromés [33], l'ozonation de l'estrone-sulfate en 11 autres produits [339] ou la dégradation de biocides tels que l'irgarol ou la terbutryne par les traitements biologiques d'une STEP [340]. Le même raisonnement peut être tenu pour toutes les molécules polluantes.

Les hommes sont également générateurs de diversité chimique car la grande majorité des médicaments que nous consommons sont, eux aussi, métabolisés selon des procédés différents de l'environnement dans le foie notamment et donne lieu à des métabolites de phase I (principalement des réactions d'oxydation) et de phase II (principalement des réactions de conjugaisons avec des sulfates ou des glucuronides, par exemple).

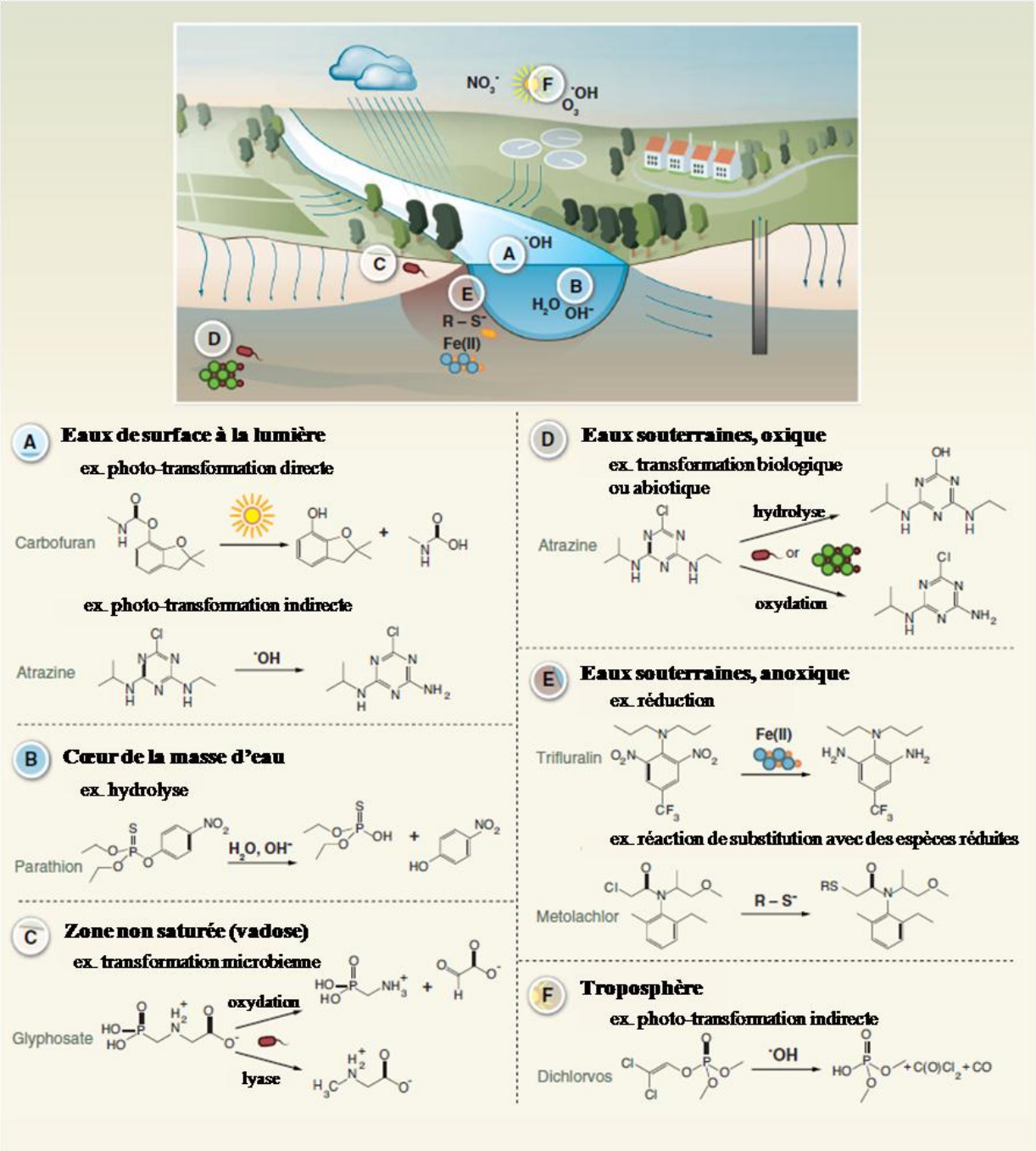



**Figure 22 : Exemple de transformations des pesticides dans l'environnement (Adaptée de la publication de Fenner et coll. [341])**

Dans le cadre en haut sont représentés les principaux compartiments et les types de réactifs pour la dégradation des pesticides tandis qu'en bas sont indiqués des exemples de réactions pertinentes pour chaque compartiment.

D'une manière générale, les produits de transformation, quels qu'ils soient, contribuent significativement au risque posé par les molécules mères [342] si : (i) ils sont formés avec un haut rendement, (ii) s'ils sont plus persistants ou plus disponibles que les molécules parents ou (iii) s'ils sont plus toxiques (effet cumulé d'un couple parent-métabolite [343,344]). Dans les faits, les trois principaux générateurs de produits de transformation génèrent plus ou moins

de produits toxiques. En ce qui concerne les dégradations observées dans l'environnement, les processus d'oxydation conduisent typiquement à des composés plus polaires et donc plus mobiles et moins toxiques que la molécule mère [345]. En revanche, certains articles montrent qu'une partie des produits de transformations sont clairement plus toxiques que la molécule mère comme la condensation photochimique du triclosan et de ses dérivés chlorés conduisant à la formation de dioxines [346] ou la formation de méthyl-triclosan par des bactéries beaucoup plus bio-accumulable que le triclosan [347]. Pour ce qui est des métabolites générés par l'homme, certains métabolites de phase I se sont avérés présenter des effets écotoxicologiques similaires à ceux des molécules mères, comme par le propanolol [348], la fluoxetine [343] et l'oseltamivir [349]. Les métabolites de phase II et en particuliers les conjugués glucuronide et sulfate peuvent être facilement déconjugués pendant les traitements biologique des stations d'épuration et reformer la substance active de départ conduisant potentiellement à de nouveaux métabolites de phase I via des réactions d'oxydation *in situ* [350,351]. Par conséquent, ce sont bien des milliers voire des dizaines de milliers de métabolites potentiels, provenant de la dégradation des molécules parents, qui pourraient être créés dans l'environnement et qui ne sont peu ou pas suivies à ce jour par les méthodes de références.

## IV.3. **Apport de la spectrométrie de masse à haute résolution pour la recherche de composés innatendus ou inconnus**

Face à ce problème, la spectrométrie de masse à haute résolution offre des perspectives nouvelles. Cette technologie assure la détection des ions produits par la source et contenus dans la gamme des rapports *m/z* fixée par l'analyste avec une précision en masse et une résolution permettant non seulement de distinguer les ions de rapport *m/z* proche mais également de proposer des formules brutes associées aux rapports *m/z*. Une empreinte chimique globale de l'échantillon est acquise, ce qui permet la réalisation de fouilles de données successives et illimitées en nombre et dans le temps. Elle permet la recherche ciblée de plusieurs centaines de molécules à la fois, comme le montrent les travaux réalisées avec l'UHPLC-Orbitrap-MS, et qui rapportent la détection de 170 pesticides dans la tomate, le poivre, l'orange et le thé vert [280] ou de 180 produits pharmaceutiques, produits d'hygiène personnelle, pesticides et autres produits industriels dans des sédiments du lac Greifensee en Suisse [223]. Cette empreinte chimique permet aussi la détection de composés non ciblés. Dans la bibliographie, il existe différentes définitions d'approches non ciblées. Il peut s'agir de composés inattendus c'est-à-dire non présents dans la procédure de routine. Pour d'autres,

il s'agit de composés inconnus au sens strict du terme c'est-à-dire sur lesquels les auteurs n'ont aucune information. Notons tout de même qu'il ne s'agit pas nécessairement d'un composé *de novo* jamais décrit mais qu'il peut s'agir d'un métabolite non observé dans l'environnement. Krauss et coll. [352] ont récemment réalisé une revue de la littérature et des futures tendances de la LC-HRMS (de l'anglais *High Resolution Mass Spectrometry*) et ont proposé une procédure pour l'analyse quantitative ciblée avec référence, de composés non suspectés ou des composés inconnus (Figure 23).

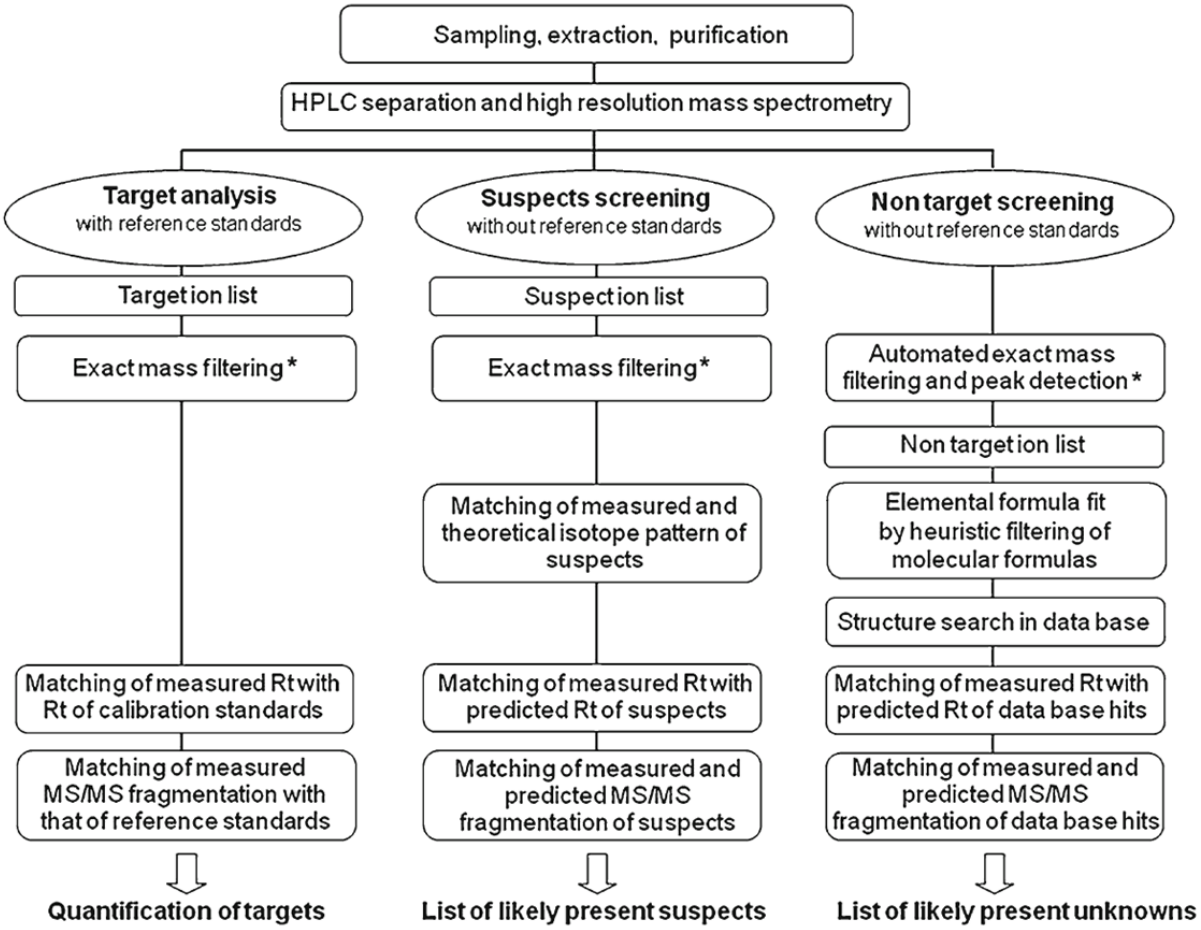



**Figure 23 : Procédure proposée par Krauss et coll. pour la recherche successive de composés ciblés, non suspectés et inconnus dans une empreinte HRMS [352]**

* La fenêtre d'extraction du rapport m/z filtré dépend de la précision de mesure des rapports *m/z* et du pouvoir résolutif du spectromètre de masse utilisé.

Pour une véritable analyse sans *a priori*, il faudrait, en principe, une identification de tous les éléments détectés dans un échantillon. L'inspection visuelle de l'ensemble du chromatogramme correspondant au TIC (de l'anglais, *Total Ion Current*) pourrait permettre une première vérification des composés présents. Cependant, les composés de faible abondance pourraient difficilement être mis en évidence lors de cette inspection visuelle, et

des pics intenses pourraient ne pas nécessairement être associés à un seul composant ou à des contaminants organiques pertinents. Le recours à des solutions de déconvolution est donc nécessaire pour détecter les multiples ions pertinents dans le chromatogramme.

La procédure d'analyse non-ciblée commence par la détection automatisée de tous les signaux et se poursuit par filtrage des rapports *m/z* exacts en fonction de critères tels que leur absence dans les blancs analytiques. Une recherche de structures plausibles sur la base de la masse exacte dans les bases de données chimiques est ensuite envisagée en plus de l'attribution d'une formule brute élémentaire. Il s'agit de tâches longues, fastidieuses et difficiles lorsque les inconnus sont présents à l'état de traces dans des échantillons de matrice complexe. L'utilisation de banque de données peut faciliter grandement la découverte et l'identification d'inconnus. Lorsque des produits de dégradation sont déjà connus ou signalés, ils peuvent être pris en compte au même titre que les molécules parents dans les analyses ciblées « conventionnelles ». En outre, une analyse rétrospective pour la recherche de produits de transformation soupçonnés d'être présents dans les échantillons analysés précédemment peut être entreprise à l'aide de l'empreinte globale acquise. Ainsi, des métabolites issus de produits pharmaceutiques ont pu être détectés dans des chromatogrammes d''eaux usées, initialement destinés la détection de produits pharmaceutiques. Plusieurs métabolites de ces produits ont été putativement annotés, illustrant le potentiel de la haute résolution dans ce domaine [353]. Après l'annotation, l'analyse ultérieure des standards de référence lorsqu'ils sont disponibles, permet une confirmation ultime du produit de transformations dans les échantillons.

Dans le cas d'une recherche de molécules inconnues, deux stratégies peuvent être considérés :

- La première est basée sur l'utilisation d'une relation « fragmentation-dégradation » entre le composé parent et le produit de transformation. En effet, si des liens de similarité structurale existent entre le composé parent et le produit de transformation, il est possible d'observer un comportement proche dans leur voie de fragmentation en spectrométrie de masse et les produits de transformation sont alors identifiés grâce à des fragments communs avec le composé parent [354,355].
- La deuxième stratégie est basée sur la réalisation d'expériences de laboratoire ou de terrain dans des conditions contrôlées afin de modéliser le métabolisme et/ou la dégradation des composés d'intérêts. Plusieurs études ont été réalisées pour étudier la photodégradation des triazines [356], de la bentazone [357] ou du fenhexamide [358] dans l'eau. D'autres études se sont axées sur la caractérisation de produits de transformation à partir de composés pharmaceutiques comme les diclofénac dans les eaux usées [359], la photodégradation de l'énalapril [360] et la méthadone [361] dans

l'eau ou la dégradation de l'aténolol et du glibenclamide dans les boues d'épuration [362].

## IV.4. **La métabolomique**

### IV.4.1. Principe général

L'acquisition d'une empreinte globale par spectrométrie de masse haute résolution pour la réalisation de fouilles de données n'est pas sans rappeler l'analyse métabolomique [363]. Le concept de métabolome fait référence à l'ensemble des métabolites contenus dans un système biologique donné : organisme, type cellulaire ou fluide biologique tel que l'urine ou le plasma. Le terme métabolite inclut toutes les molécules de petites tailles et inférieures à 1500 Da. Il inclut donc les xénobiotiques tels que la plupart des biocides, médicaments et perturbateurs endocriniens. L'analyse métabolomique environnementale peut ainsi permettre de rechercher des xénométabolites (métabolites qui résultent de substances étrangères telles que les médicaments ou les pesticides).

L'analyse métabolomique est par ailleurs un savoir-faire développé au sein du Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments (LEMM), dirigé par le docteur Christophe Junot et dans lequel j'ai effectué ce travail de thèse. La métabolomique effectuée dans ce laboratoire est quasi exclusivement destinée à la compréhension des systèmes biologiques et à la recherche de biomarqueurs de diagnostic ou de traitements de pathologies [364]. Les biomarqueurs sont des indicateurs internes mesurables à la suite de modifications, d'altérations cellulaires ou moléculaires qui peuvent apparaître dans un organisme pendant, après une maladie ou suite à l'exposition à un toxique [365]. L'analyse du métabolome est une approche multidisciplinaire mettant en jeu la chimie analytique, le traitement du signal et l'analyse statistique. L'analyse commence par le traitement de l'échantillon. Il doit être le moins sélectif et le plus simple possible afin de conserver le maximum de molécules possibles. Les empreintes chimiques (données brutes) sont ensuite obtenues par spectrométrie de masse à haute résolution ou RMN (*Résonance Magnétique Nucléaire*).

Ces données brutes sont ensuite traitées par différents logiciels en fonction du type de fouille de données souhaité. De manière générale, des logiciels spécialisés dans la détection automatique des signaux sont utilisés pour l'obtention de table de pics qui sont ensuite analysées avec des outils statistiques. Enfin, l'identification des signaux discriminants est

réalisée en combinant l'analyse des spectres et la consultation des bases de données (Figure 24).

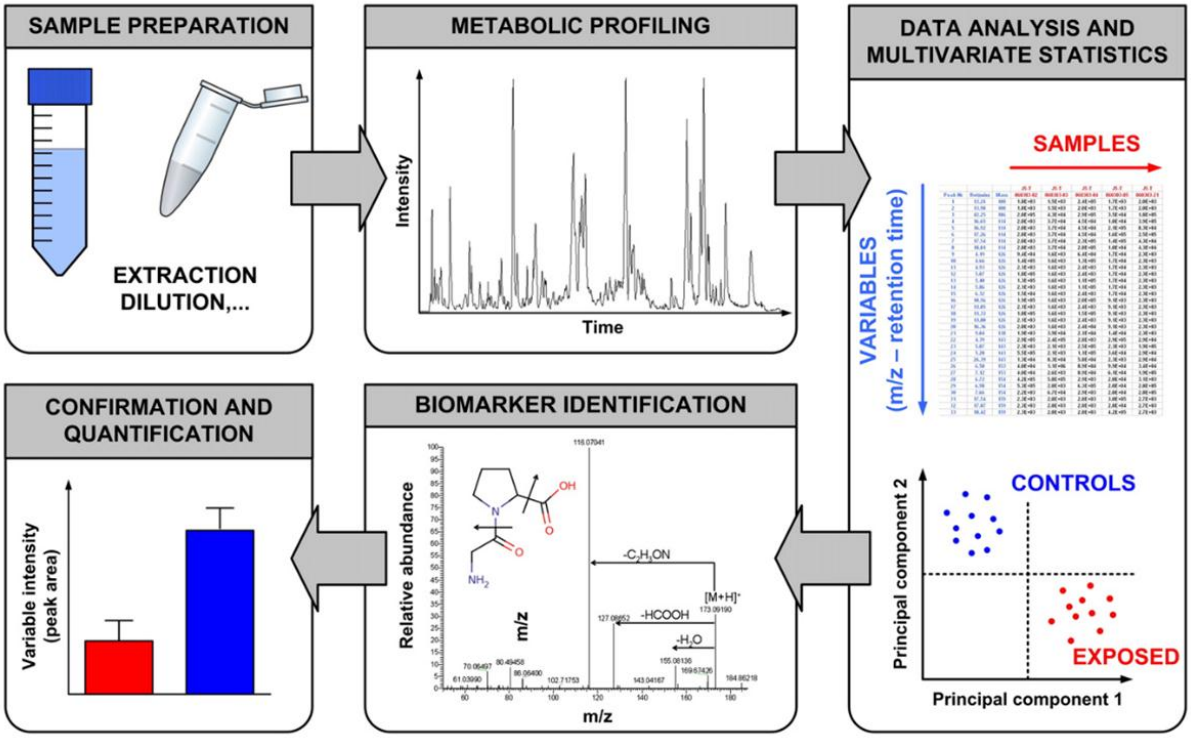



**Figure 24 : Processus d'une analyse métabolomique par spectrométrie de masse haute résolution (Tirée de la publication de Roux et coll. [366])**

### IV.4.2. Le traitement des données

Le traitement des données brutes consiste en la détection automatique des informations spectrales et chromatographiques de l'ensemble des composés détectés dans l'intégralité des échantillons analysés en LC-MS. Son objectif est de convertir les signaux bruts en un format numérique contenant uniquement les informations analytiques pertinentes.

Des logiciels dédiés permettent la détection automatique des signaux analytiquement pertinents de chaque échantillon, et leur réalignement (dans les domaines spectral et chromatographique, dans le cas des analyses LC-MS). L'ensemble des signaux détectés est ensuite restitué sous une forme matricielle compatible avec les logiciels d'analyse statistique tel que présenté en Figure 24 : à chaque ligne, correspond une variable, c'est-à-dire un signal caractérisé par un temps de rétention et un rapport *m/z* et à chaque colonne, l'intensité ou l'aire des pics chromatographiques de chaque variable dans un échantillon donné.

Différents logiciels libres ou commerciaux assurant la détection automatique des signaux sont actuellement disponibles. Parmi ces logiciels, MZmine [367] et XCMS [368] [acronyme de

diverses formes (X) de la chromatographie (C) couplée à la spectrométrie de masse (MS)] sont les plus largement utilisés. Ces logiciels proposent différents algorithmes assurant les différentes étapes de détection automatique des signaux tels qu'illustré en Figure 25 pour le logiciel XCMS. L'analyse XCMS se décompose généralement en quatre étapes distinctes :

- La détection des pics et les filtres de bruit. Chaque échantillon est traité par un algorithme dont l'objectif est de détecter les ions et de placer les sommets des pics chromatographiques. Au cours de cette étape, des filtres de bruit tels que le ratio signal sur bruit ou la comparaison au niveau de la ligne de base du chromatogramme permettent la suppression d'artefacts électroniques.
- L'alignement inter-échantillons. Cette étape a pour objectif le regroupement de signaux (variables) identiques entre différents échantillons, malgré de faibles décalages en rapport *m/z* ou en temps de rétention qui peuvent exister.
- La correction des temps de rétention. Après l'alignement des signaux identiques, cette étape permet de recaler les temps de rétention. Il est à noter qu'une nouvelle étape d'alignement est possible après la correction des temps de rétention pour mettre en évidence de nouveaux groupes de signaux qui n'étaient pas alignés lors de la première itération.
- La complétion des données manquantes lorsqu'une variable est présente dans un grand nombre d'échantillons mais absente dans quelques-uns. Cette dernière étape permet de (i) rattraper des pics non détectés en raison de bruit de fond trop important ou de forme de pic chromatographique atypique (non gaussien généralement) et (ii) de remplacer la donnée manquante par l'intégration du bruit de fond local. Cette complétion des données manquantes est primordiale pour l'utilisation de statistiques notamment pour l'établissement de significativité. En effet, trop de valeurs manquantes ou à « 0 » peuvent fausser le caractère discriminant des variables.

Ces étapes de fonctionnement du logiciel XCMS, qui sera utilisé dans le cadre de mon travail de thèse, sont décrites plus précisément en annexe 5. Différents paramètres peuvent être définis par l'utilisateur. Certains d'entre eux tels que la largeur à mi-hauteur de chromatogramme ou la précision en mesure des rapports *m/z* sont dépendantes d'un système analytique donné, tandis que d'autres sont plus abstraits et doivent être optimisés par des tests (tel que le choix de la méthode de calcul de la masse moyenne d'une variable). Une fois le choix des algorithmes et l'optimisation des paramètres effectués au sein d'une plate-forme, l'analyse peut être automatisée pour les futures utilisations. La sortie XCMS est une matrice de données contenant les informations sur les variables détectées. Chaque variable est

caractérisée par un couple rapport *m/z* et temps de rétention et contient l'information de l'aire sous pic chromatographique dans chaque échantillon. Cette matrice de données à deux dimensions peut être à son tour traitée par des algorithmes ou des programmes d'exploration de données.

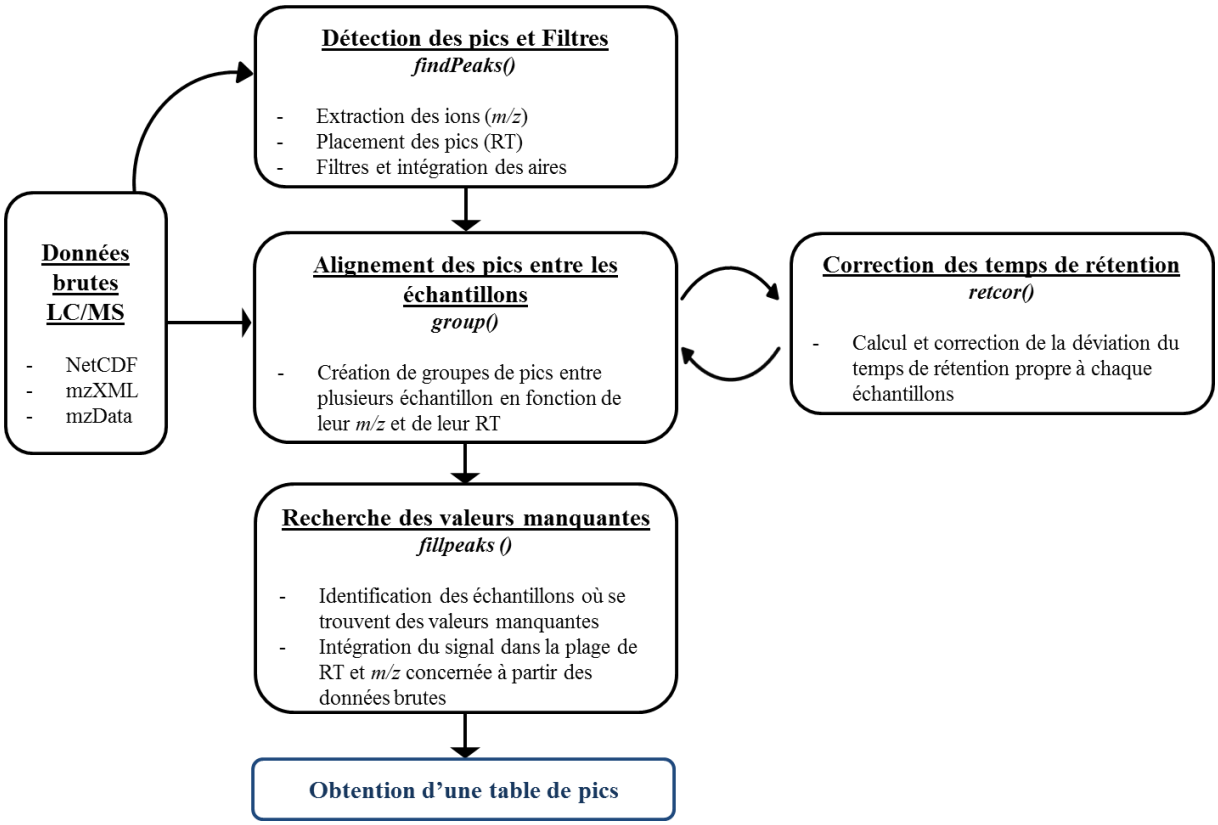



**Figure 25 : Stratégie de traitement des données mise en œuvre par XCMS (Adapté de la publication de Smith et coll. [368])**

### IV.4.3. La normalisation

Le processus d'ionisation à pression atmosphérique est sujet à de nombreuses dérives analytiques, notamment des effets de suppression d'ionisation dus à l'encrassement de la source et qui modifient le rendement d'ionisation au sein d'une même analyse ou d'expériences différentes. Il faut donc maîtriser et corriger ces fluctuations de rendement d'ionisation afin qu'elles n'entravent pas l'interprétation des données. Les fluctuations des signaux observés en API/MS peuvent être évaluées par des étalons internes ajoutés dans tous les échantillons. Ceux-ci doivent présenter une similitude structurale avec les composés d'intérêt (idéalement, métabolites marqués) [369]. Ces étalons internes peuvent être obtenus par synthèse chimique des métabolites marqués aux isotopes stables, mais cette procédure est coûteuse et longue. Une autre solution est le recours à des échantillons de contrôle qualité

(QC, de l'anglais *Quality Control*). Pour une expérience, les QC sont un mélange de l'ensemble des échantillons analysés, ce qui leur permet de satisfaire au critère de représentativité. Ils sont injectés de façon régulière au cours de la séquence d'acquisition, afin de modéliser le biais analytique et corriger le signal de chaque métabolite par régression. Cette méthode offre également la possibilité d'intégrer des données provenant de différentes séries analytiques [370].

L'injection de QC à intervalles réguliers tout au long de l'expérience est une solution intéressante mais qui reste néanmoins limitée aux seuls métabolites détectés dans le QC. Il faut donc que les QC soient représentatifs des échantillons à analyser, ce qui est susceptible de poser problème pour la recherche de xénobiotiques. En effet, la présence de xénobiotiques dans les échantillons agroalimentaires ou environnementaux est très hétérogène en termes de diversité et de concentration. De plus, cette approche impose également d'utiliser un aliquot d'un seul et même échantillon de QC, ce qui pose le problème de la disponibilité mais aussi de la stabilité à long terme des métabolites dans ces matrices.

Bien que la randomisation des échantillons au sein d'une séquence permette de répartir aléatoirement le biais analytique dû à l'encrassement de la source, si ce dernier est trop important, il peut potentiellement masquer ou augmenter de manière fictive la variabilité que l'on cherche à étudier. Cette variabilité analytique est mise en évidence en visualisant l'évolution des intensités des différents métabolites notamment dans les échantillons de QC selon l'ordre de passage.

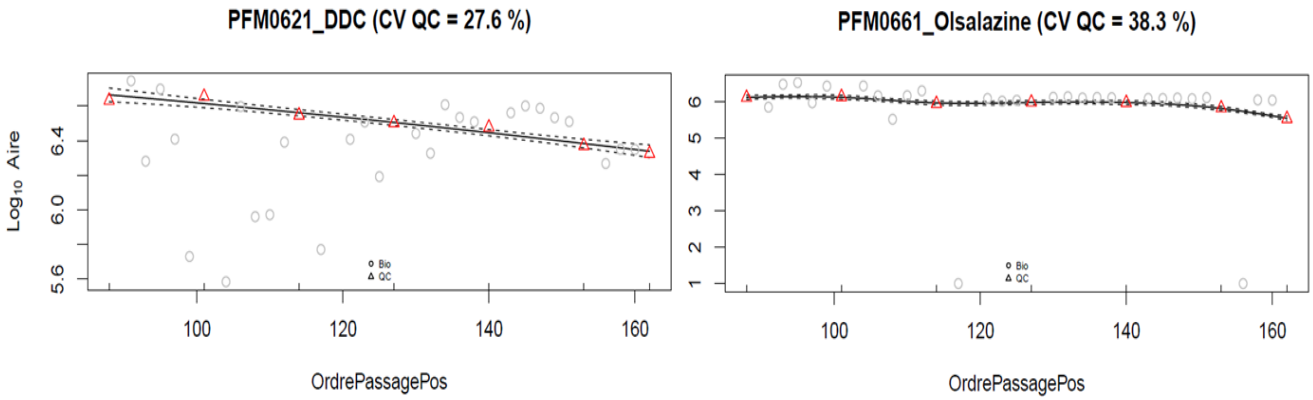



**Figure 26 : Evolution des intensités des molécules DDC et Olsalazine selon l'ordre de passage au cours d'une analyse de type métabolomique**

Chaque symbole représente l'aire sous la courbe du chromatogramme de l'ion extrait (XIC) par XCMS. Les cercles en gris clair correspondent aux échantillons tandis que les triangles rouges représentent les QC. La courbe représente l'approximation polynomiale modélisant les intensités détectées pour les QC.

Comme illustré en Figure 26, la dérive analytique des signaux analytiques suivis (assimilable à la pente de la droite) est nettement observable : elle n'est pas nécessairement monotone mais présente une tendance générale à la baisse qui n'est pas strictement linéaire. Cette évolution est similaire dans toutes les autres molécules des échantillons analysés. Le biais analytique dépend aussi de la molécule étudiée. Par exemple, la baisse du signal de l'olsalazine au cours de la séquence d'analyse (CV des QC : 38,3 %, baisse de 75 % du signal) est 1,5 fois plus importante que celle observée pour le DDC (CV des QC : 27,6 %, baisse maximale de 53 % du signal). Il convient donc d'effectuer une correction des données individuellement pour chaque métabolite. Pour ce faire, différentes méthodes de normalisation peuvent être utilisées. Dans de le cas d'analyse de jeux de données métabolomiques, la régression locale de type LOESS (de l'anglais *Low Order non linear locally EStimated Smoothing function)* est généralement utilisée. Celle-ci s'appuie sur une modélisation polynomiale locale, traçant la courbe qui ajuste au mieux les différentes intensités des QC. Pour chaque métabolite, une régression polynomiale locale est réalisée à partir des intensités des QC. Les abondances réelles détectées pour les échantillons sont alors divisées par la valeur correspondante sur la courbe de régression puis multiplié par la moyenne des QC afin d'obtenir les abondances normalisées. La droite de régression du nuage de points obtenue après normalisation est alors quasi parallèle à l'axe des abscisses, signifiant que la dérive analytique (assimilable à la pente de la droite) n'impacte plus les abondances des métabolites (Figure 27). La correction du signal pour chaque série d'analyse peut être évaluée par le calcul du coefficient de variation des QC ou encore de la baisse du signal au cours de l'analyse.

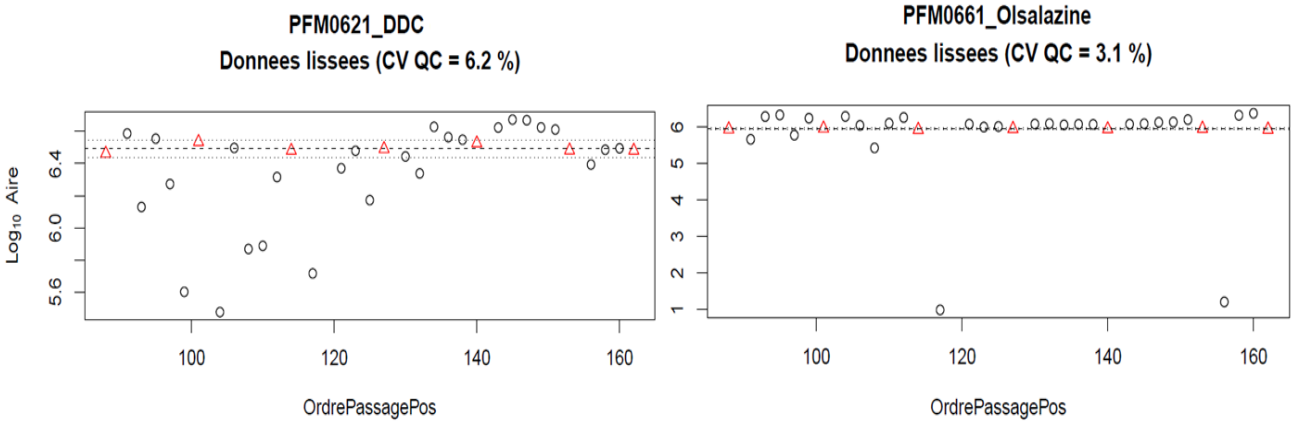



**Figure 27 : Evolution des intensités lissées des molécules de DDC et Olsalazine selon l'ordre de passage au cours de l'analyse métabolomique après normalisation LOESS**

La correction LOESS améliore l'évolution du signal du DDC et de l'olsalazine ce qui se traduit sur les variations des QC passant respectivement à 6,2 % et 3,1 % (contre 27,6 % et

38,3 % avant normalisation) avec une baisse maximale du signal de 15 % et 8 % (contre 53 % et 75 % avant normalisation).
Un autre type de normalisation peut être utilisé : la normalisation des quantiles. Il s'agit d'une technique de normalisation des distributions des aires des échantillons. Les échantillons injectés en fin de séquence et dont les aires seraient moins intenses se verraient mis à niveau grâce à cette normalisation [371].

### IV.4.4. Les analyses statistiques

Une fois les données normalisées, s'en suit une analyse statistique des résultats pour faire ressortir des profils métaboliques pertinents.
Deux types d'analyses statistiques sont utilisables, les analyses univariées et multivariées :

- Analyses univariées

  Les analyses statistiques univariées sont des techniques classiquement utilisées en biologie. Elles permettent d'analyser une à une les variables explicatives en fonction d'une métadonnée (concentration, ordre de passe, origine géographique…) sans tenir compte des interactions existant entre les variables. Le type de test utilisé dépend de la nature de la variable et de la nature de la métadonnée à étudier : des calculs de corrélation sont réalisés si les deux sont quantitatives alors que des analyses de variance sont utilisées si l'une des deux est qualitative. La distribution de probabilité de la variable conditionne aussi le choix du test. Une distribution selon la loi normale autorise l'utilisation de tests paramétriques (test de Student ou corrélation de Spearman), alors que les variables dont la distribution au sein de la population étudiée ne suit pas une loi statistique sont étudiées à l'aide de tests non-paramétriques tels que le test de Wilcoxon ou la corrélation de Pearson.

- Analyses multivariées [372]

  Les analyses multivariées permettent l'étude simultanée de plusieurs variables. Une partie de l'analyse multivariée regroupe les techniques pour réduire la dimensionnalité des données afin de résumer et visualiser dans un espace réduit l'information biologiquement pertinente contenue dans le jeu de données (Figure 28). Un procédé de prétraitement doit être appliqué préalablement aux analyses statistiques multivariées. En raison de la disparité en intensités, des variations inter-échantillons entre les variables étudiées et des fluctuations incontrôlées lors des analyses chimiques, les données exportées à partir des outils de détection automatique de pics ne peuvent être directement utilisées pour ce type

d’analyses. Il convient de « centrer » les données (pour déplacer la distribution des valeurs autour de la valeur de 0 et non autour de la moyenne) et, si besoin, d’effectuer une mise à l'échelle (appelée *scaling* en anglais). Ceci se fait selon une mesure de distribution (par exemple en utilisant l'écart-type, on parle alors de réduction) ou une mesure de taille (comme l'utilisation de la moyenne ou du rang ou encore une « transformation » comme la transformation logarithmique). Il existe deux types d’analyses multivariées :

- Les analyses statistiques descriptives

L’objectif est d’obtenir une vision globale des données, sans aucun a priori, afin de révéler la structure latente. Les sorties de ces analyses sont souvent représentées sous forme graphique : dendrogramme ou plans factoriels dans le cas d’une réduction de dimension. La plus connue est l’analyse en composantes principales (ACP). L’ACP est souvent la première étape dans l’analyse des données. Elle permet de visualiser comment le jeu de données se structure spontanément dans un espace réduit. Pour cela, un changement de coordonnées est effectué afin de définir de nouveaux axes, appelés composantes principales. Ces composantes sont des combinaisons linéaires des variables d’origine calculées pour extraire le maximum de variance. Le calcul est itératif : la première composante extrait la plus grande source de variance, la seconde composante, orthogonale à la première, extrait la plus grande variance restante, et ainsi de suite, si bien que les dernières composantes contiennent surtout le bruit aléatoire. En pratique, les deux ou trois premières composantes permettent souvent d’expliquer plus de 40 % de la variance totale. Les échantillons sont présentés sous forme de cartes factorielles des individus ou *score plot* selon leurs coordonnées dans l’espace réduit. Les individus appartenant à un même groupe sont proches les uns des autres. Il est ainsi possible de visualiser la structuration du jeu de données selon un facteur confondant analytique tel que l’ordre d’analyse des échantillons ou un facteur biologique étudié. Parallèlement, une carte factorielle du poids des variables ou *loading plot* est établie. Elle représente la projection des variables explicatives sur les composantes latentes. Les variables responsables de la séparation des deux groupes se répartissent de part et d’autre du graphique par analogie aux échantillons qui les sur-expriment ou sous-expriment, permettant ainsi de mettre en exergue des variables discriminantes (Figure 28). Ces analyses sont ensuite suivies d’analyses dites explicatives ou prédictives qui facilitent la mise en évidence des signaux d’intérêts.

- Les analyses statistiques explicatives et prédictives

Elles visent à expliquer une ou plusieurs réponses (Y) à partir des variables explicatives (X) contenues dans les matrices de données. Dans ce cas, les caractéristiques ou métadonnées des échantillons sont renseignées et elles participent à la construction du modèle statistique. Parmi les méthodes explicatives, on trouve la régression PLS (de l'anglais *Partial Least Squares* ou régression aux moindres carrés partiels) et également l'analyse discriminante PLS (PLS-DA, de l'anglais *Discriminante Analysis*). Ces méthodes peuvent également être utilisées dans un but prédictif. Dans ce cas, un jeu de données initial permet de construire un modèle qui sera ensuite appliqué à d'autres jeux de données afin de prédire la classe d'appartenance des individus. Lors de la phase d'élaboration du modèle, il faut veiller à contrôler le risque de sur-apprentissage en utilisant des techniques de validation croisées.

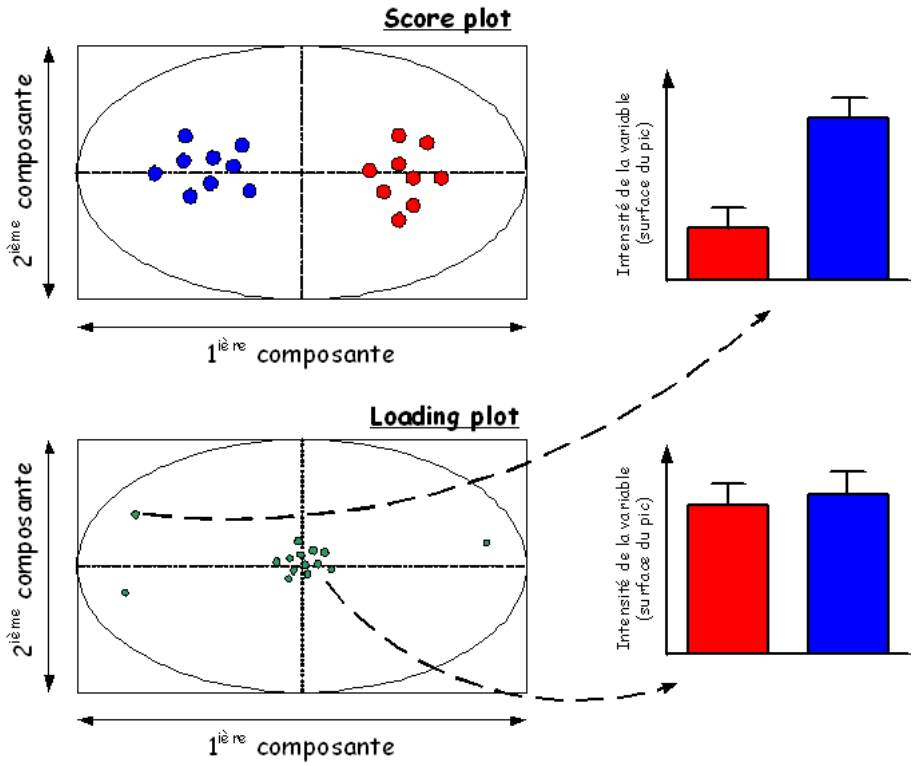



**Figure 28 : Représentation graphique d'une ACP ou d'une PLS-DA (adaptée de Roux et coll. [366])**

Score plot : carte factorielle du poids des individus
Loading plot : carte factorielle du poids des variables

### IV.4.5. L'annotation

Une fois les variables discriminantes mises en évidence, leur identification débute par une étape d'annotation. En approche LC/API-MS, cette étape repose sur l'homologie du rapport *m/z* précis détecté d'une variable à celui calculé pour un métabolite décrit dans des banques de données publiques chimiques, métabolomiques ou biochimiques. Il existe plusieurs bases de données disponibles telles que KEGG [373], HMDB [374], METLIN [375], Scifinder [376] ou Pubchem [377]. Il faut toutefois garder à l'esprit que l'ionisation ESI produit souvent plus d'un ion pour un métabolite donné. Ces ions peuvent correspondre à des fragments produits en source, des adduits et leurs isotopes (Figure 29). Leur présence peut être utile dans la mesure où elle confirme la pertinence des compositions élémentaires car elle permet plusieurs mesures de masses précises liées à la même molécule [378,379]. Toutefois, si elle n'est pas prise en compte, cette redondance du signal complique le traitement des données, un ion fragment pouvant être par exemple considéré à tort comme un ion mono-isotopique.

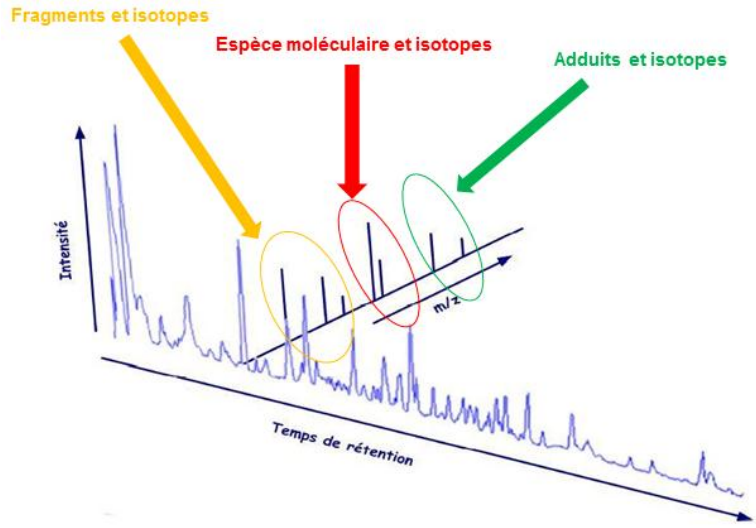



**Figure 29 : Redondance du signal en ESI-MS [207]**

Pour faire face à ce problème, l'annotation peut aussi se faire à l'aide d'une base de données spectrale. Ces dernières sont le plus souvent des banques de données internes, développées dans les laboratoires qui répertorient les spectres de masse, et/ou MS/MS et/ou $MS^n$ et/ou temps de rétention de métabolites d'intérêt. Une fois annotées, les variables doivent être identifiées à l'aide d'expériences de MS/MS. Les spectres obtenus peuvent être en accord ou au contraire permettent de réfuter certaines structures. Enfin, l'ultime étape de l'identification reste l'analyse comparative avec un composé de référence si disponible.

Cette étape critique d'identification a fait l'objet d'un travail de concertation en vue d'harmoniser les démarches et de pouvoir échanger les résultats à travers leur publication. A cet effet, le groupe de travail sur la standardisation des analyses chimiques (CAWG de l'anglais *Chemical Analysis Working Group*) de la société de métabolomique a défini les niveaux suivants d'identification des métabolites [380] :

**1. «Composés identifiés» :** il s'agit du niveau d'exigence le plus élevé. Celui-ci requiert un minimum de 2 critères d'identification orthogonaux comparés à ceux obtenus à partir du produit chimique de référence analysé dans les mêmes conditions expérimentales (Figure 30). Il peut s'agir des temps de rétention et spectre de masse, ou temps de rétention et spectre 1H NMR, ou masse précise et spectre MS/MS, ou masse précise et massif isotopique correspondant, ou 1H- et/ou 13C-NMR avec le spectre NMR 2D.

**2. «Composés putativement annotés» :** ce niveau d'identification concerne les composés qui ne sont pas commercialement disponibles ou difficilement synthétisables. L'identification du métabolite repose sur la similitude spectrale et/ou physico-chimique du composé avec les informations des banques de données spectrales.

**3. «Composés putativement caractérisés» :** ce niveau correspond aux composés pour lesquels il n'existe pas de proposition de structure dans les bases de données chimiques et spectrales mais qui présentent des similitudes spectrale et/ou physico-chimique avec des composés connus ou des motifs structuraux d'une classe chimique donnée.

**4. « Composés inconnus»** : pour lesquels, aucune hypothèse structurale n'est émise.

Afin de respecter cette hiérarchisation dans la caractérisation des métabolites, l'identification des variables d'intérêt se fait dans un premier temps par interrogation des banques de données biochimiques telles que KEGG et HMDB. Il s'agit de comparer une masse précise expérimentale à une masse précise théorique répertoriée dans des bases de données. S'en suit la confirmation de l'hypothèse structurale alors émise par la concordance du temps de rétention expérimental et/ou de spectres MS/MS avec les propriétés physico-chimiques du composé proposé par les bases de données. Mais, encore une fois, seule la comparaison des propriétés physico-chimiques du composé à identifier avec celles d'un composé de référence permettent une identification formelle.

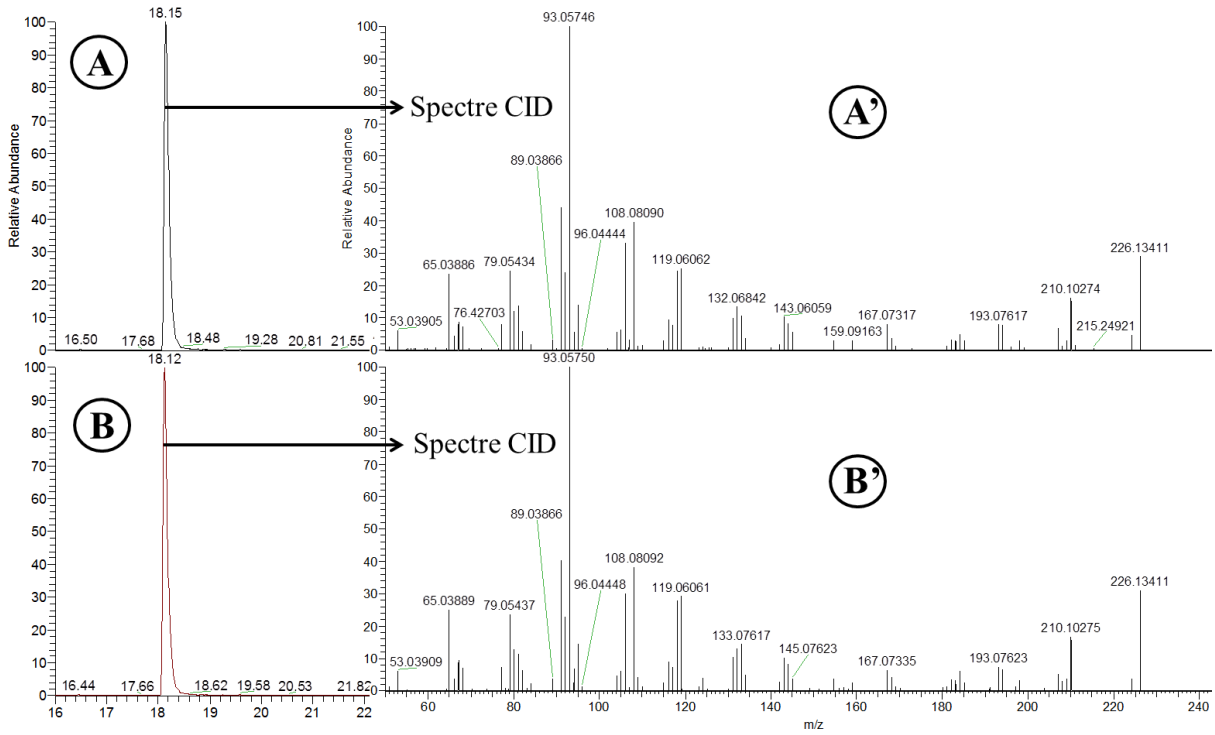



**Figure 30 : Exemple de métabolite formellement identifié selon les recommandations du CAWG**

Identification du fongicide cyprodinil dans des échantillons d'eaux du robinet. (A) : Chromatogramme du courant ionique de l'ion *m/z* 226.13388 (+/- 5 ppm) à identifier depuis l'empreinte d'eau obtenue en LC-ESI(+)-Q-Exactive. (A') : Spectre CID de l'ion précurseur d'intérêt *m/z* 226.13 à l'énergie de collision normalisée 80 %. (B) : Chromatogramme du courant ionique de l'ion m/z 226.13388 (+/- 5 ppm) représentant la masse théorique du cyprodinil protoné. (B') : Spectre CID du composé de référence « cyprodinil » à l'énergie de collision normalisée à 80 %.

# V. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'utilisation de l'analyse métabolomique par spectrométrie de masse est le point de départ de notre réflexion scientifique. La richesse de l'information contenue dans une empreinte chimique couplée avec le savoir-faire et les outils de traitement de données du laboratoire sont susceptibles d'apporter un regard nouveau sur l'analyse de polluants chimiques organiques pour la recherche de produits de dégradation ou de composés non suspectés ou inconnus dans des matrices agroalimentaires et environnementales. C'est cette démarche que nous avons souhaitée développer. Dans un premier temps, plusieurs preuves de concept ont été réalisées sur des matrices agroalimentaires liquides et solides afin de (i) vérifier le bien fondé de notre démarche et (ii) d'adapter la procédure analytique d'une analyse métabolomique à partir de fluides biologiques pour la préparation d'échantillon et jusqu'aux traitements de données de matrices agroalimentaires et environnementales.
Ce travail de thèse s'articule en 2 parties :

## Utilisation de l'analyse métabolomique pour la détection de polluants : expériences preuve de concept

Dans la première partie des résultats, deux études de preuves de concept sont présentés et concernent : (i) l'analyse d'échantillons de miel et (ii) l'eau de puits de captage. Dans ces deux matrices, une analyse ciblée de polluants prioritaires a été réalisée, puis des analyses statistiques ont été effectuées afin de relier les métadonnées des échantillons à la signature chimique réalisée par spectrométrie de masse. Les résultats de ces premières études ont été très concluants et ont permis non seulement la détection de polluants ciblés mais également la découverte de polluants inconnus et non suspectés. Les analyses statistiques réalisées ont permis aussi de mettre en évidence une signature chimique caractéristique et ainsi découvrir des biomarqueurs d'adultération ou de pollution.

## Développement d'une analyse multi-résidus de polluants de familles chimiques variées par spectrométrie de masse à haute résolution

Fort de ces expériences, la société Profilomic a été à l'origine d'un vaste programme collaboratif de recherche sur la sécurité alimentaire nommé Agrifood GPS. La part réalisée pour la société consistait à créer une analyse ciblée la plus exhaustive possible de polluants susceptibles d'être retrouvés l'eau, tels que les biocides, les médicaments et les produits industriels et domestiques. Un choix de plusieurs centaines de polluants a été effectué, puis un développement complet comprenant les paramètres de spectrométrie de masse, la

chromatographie ultra-haute performance et la préparation d'échantillons ont été réalisés, aboutissant à un produit commercial permettant la détection de 539 xénobiotiques en seulement 36 minutes à partir de 5 millilitres d'eau. De nombreux outils bioinformatiques ont été nécessaires à ce développement, contribuant ainsi à accélérer les prises de décision lors du choix des paramètres optimums.

# CHAPITRE II.

# *UTILISATION DE L'ANALYSE METABOLOMIQUE POUR LA DETECTION DE POLLUANTS : EXPERIENCES DE PREUVE DE CONCEPT*

# I. INTRODUCTION

Fin 2011, Botitsi et coll. [267] ont constaté que l'analyse des pesticides et de leurs métabolites dans l'eau et les matrices agroalimentaires continuaient d'être un sujet majeur et central de la recherche afin d'améliorer la sécurité alimentaire et de faire l'état des lieux de la pollution environnementale. Les auteurs ont observé que la technique de préparation de type QuEChERS était la plus employée et que les approches basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse à analyseurs de type triple quadripôle, à piégeage d'ions, TOF et Qq-TOF montraient l'étendue de leurs possibilités et jouaient un rôle primordial dans la détection, la quantification et/ou l'identification et la confirmation des polluants et de leurs métabolites. L'avènement d'instruments à ultra-haute résolution (notamment l'Orbitrap) offre aujourd'hui des possibilités nouvelles pour l'analyse de polluants environnementaux dans des échantillons complexes. Compte tenu du savoir-faire du laboratoire et de l'analyse de la littérature, il a été décidé de tenter d'appliquer la métabolomique à des matrices environnementales et agroalimentaires. Le but de cette nouvelle approche que nous pourrions qualifier de métabolomique environnementale est l'utilisation de l'empreinte générée par spectrométrie de masse à haute résolution pour la réalisation de fouilles de données successives.

Cette approche a tout d'abord été testée sur des échantillons de miel lors d'un contrat passé avec l'Institut National de la Consommation (INC). L'objectif premier était la détection de pesticides et d'antibiotiques pour contrôler la qualité « chimique » du miel. Nous avons ensuite profité de cette étude pour mettre en place d'autres types de fouilles de données permettant de réaliser des approches globales, telles que la recherche de contaminants non suspectés ou inconnus à l'aide de la contribution isotopique du chlore. Nous avons montré que notre approche permet de classer les échantillons de miel en fonction de leur origine botanique et annoté les molécules chimiques responsables de cette discrimination. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Agricultural Food Chemistry*.

Par ailleurs, une étude de la composition de l'eau de 15 puits de captage gérés par la SAUR (*Société d'Aménagement Urbain et Rural*) a été réalisée sur 3 saisons en 14 mois. L'objectif était de réaliser un plan de surveillance des eaux en matière de pollution par les pesticides et les médicaments. Nous avons comparé nos résultats avec les analyses réglementaires obtenues par des laboratoires experts afin de valider notre approche métabolomique. Ensuite, nous avons corrélé ces données de pollution aux métadonnées des points de captage afin de déceler un type d'environnement propice à la pollution chimique organique et d'orienter préférentiellement les analyses sur ces captages. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Technique, Sciences et Méthodes*.

# II. LE MIEL : PREMIERE PREUVE DE CONCEPT

## II.1. **Introduction**

Cette étude a été en partie financée par l'Institut National de la Consommation (INC). Cet établissement public à caractère industriel et commercial a été créé en 1967. L'INC est un centre de ressource et d'expertise au service des consommateurs et des associations qui les représentent et les défendent. Sa mission principale est d'informer le consommateur d'éventuelles dérives ou malfaçons. Pour cela, cet organisme réalise ou fait réaliser des essais comparatifs de produits comme dans le cas de cette étude qui concernait la qualité du miel et notamment ses teneurs en pesticides et antibiotiques.

Il existe en Europe et en France depuis 1998 un affaiblissement et une mortalité inhabituelle des colonies d'abeilles rapportés par de nombreux articles de presse et témoignages de professionnels [381-383]. Ces affaiblissements et pertes de colonies sont signalés, principalement mais non exclusivement, dans les zones de grandes cultures agricoles [384]. Dans son environnement, l'abeille est soumise à différents facteurs de risque comme les agents biologiques (prédateurs, parasites, champignons, bactéries et virus) et les agents non biologiques (toxiques divers, conditions climatiques par exemple). Parmi les agents biologiques, la varroose, une parasitose très contagieuse due au parasite *Varroa Destructor*, est l'une des plus inquiétantes. Cet acarien importé d'Asie provoque un affaiblissement du système immunitaire de l'abeille en s'accrochant à elle et en prélevant son hémolymphe [385]. Cela entraîne une réduction de la durée de vie des abeilles, proportionnellement au taux d'infection par le parasite. Les abeilles affaiblies ne survivent pas à l'hiver et ne peuvent donc pas contribuer à la croissance de la colonie au printemps ce qui conduit le plus souvent à la mort de la colonie. Ce parasite est aussi porteur de virus, ce qui rend l'abeille encore plus vulnérable [386]. Outre la varroose, une autre maladie parasitaire, la nosémose est mise en avant comme un facteur explicatif de la surmortalité des abeilles. Elle est provoquée par l'agent *Nosema*, un parasite unicellulaire qui se développe dans l'intestin des abeilles et provoque différents symptômes comme la perturbation du butinage et des problèmes d'orientation provoquant un taux de retour à la ruche réduit [387]. Par ailleurs, certains traitements agricoles et notamment les pesticides sont régulièrement mis en cause dans la décimation des colonies d'abeilles. Il s'agit d'insecticides comme l'imidaclopride (Gaucho®) ou d'autres néonicotinoïdes comme la clothianidine (Poncho Pro®), le fipronil (Régent TS®) ou le thiamethoxame (Cruiser OSR®). Leurs effets, discutés dans le CHAPITRE I.II.1.2.2.3, suggèrent que les pesticides sont l'une des causes probables de la surmortalité des colonies d'abeilles. D'ailleurs, le Gaucho® a été interdit en France sur le tournesol dès 1999 et sur le

maïs en 2004 jusqu'à la réévaluation de la commission européenne en 2006 qui a autorisé l'utilisation de la substance dans les préparations bénéficiant d'une AMM. Néanmoins, en 2013, un moratoire de deux ans pour toute l'union européenne a été obtenu par les associations de défense des abeilles afin d'interdire l'utilisation de 3 néonicotinoïdes : la clothianidine, l'imidaclopride et le thiaméthoxam sur les cultures qu'affectionnent les abeilles comme le colza, le maïs, le tournesol et le coton.

La pollinisation est également un enjeu économique majeur car selon l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), la production de 84 % des espèces cultivées en Europe dépendrait directement des pollinisateurs, qui sont à plus de 90 % des abeilles domestiques et sauvages [388]. Pour protéger leurs ruches, les apiculteurs utilisent parfois des pesticides comme l'amitraz, le coumaphos ou le tau-fluvalinate afin d'éradiquer le varroa, ou des antibiotiques comme la fumagilline, la tétracycline et ses dérivés (oxytétracycline et chlortétracycline), la tylosine, les sulfamides, quinolones et les phénicolés comme le chloramphénicol. Ces traitements couplés à la pollution que peuvent rencontrer les abeilles à l'extérieur conduisent à la pollution des produits de la ruche. De nombreuses études par spectrométrie de masse ont déjà montré la présence de molécules polluantes sur l'abeille [389,390], sur la cire [391,392], sur le miel [393-396], sur la gelée royale [397,398] et sur la propolis (une résine végétale utilisée par les abeilles comme mortier et anti-infectieux pour assainir la ruche) [399,400]. La présence de pesticides et d'antibiotiques dans les produits susceptibles d'être consommés pose la question de la dangerosité pour le consommateur et notamment de l'antibiorésistance (voir CHAPITRE I.II.2.2.4). En ce qui concerne les normes européennes en termes de résidus, les limites pour les pesticides sont bien établies et sont spécifiques à chaque molécule. Elles se situent généralement entre 10 et 50 µg/kg. En revanche, il n'existe aucune réglementation concernant les antibiotiques car ces derniers ne disposent pas d'AMM pour le traitement des abeilles [401].

La diminution des populations d'abeilles induit une diminution des quantités de miel produit. Ainsi, la profession apicole a estimé à 22 % la baisse de production nationale de miel entre les années 1995 et 2001 [402]. La France a même enregistré un record en 2013 quand la production est tombée à 15 000 tonnes, loin derrière les 35 000 tonnes de l'année 1995 [403]. De manière générale, la production s'est effondrée depuis les années 90 pour s'établir à 15 000 tonnes par an environ depuis les 4 dernières années tandis que la consommation est restée stable autour de 40 000 tonnes par an (Figure 31).

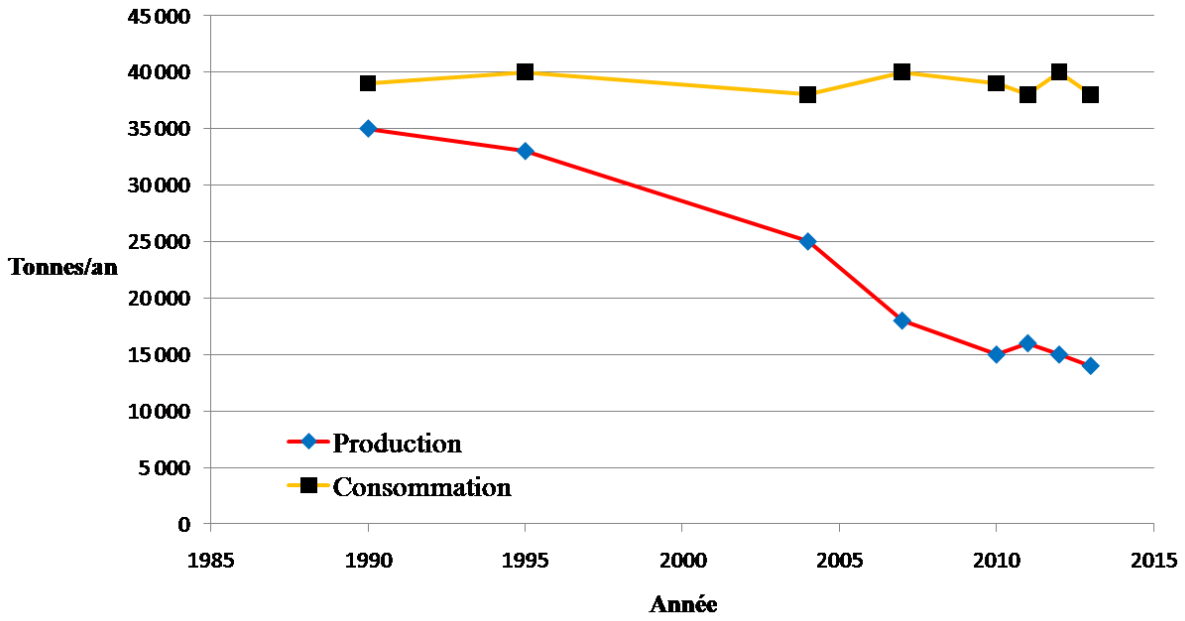



**Figure 31 : Evolution de la production et de la consommation de miel en France en tonnes/an sur la période 1990-2013 (Adapté des données 2014 du Planetoscope [404])**

La conséquence directe est l'importation en France de miels issus du monde entier pour compenser la trop faible production et satisfaire les consommateurs de miels. Avec la globalisation des marchés mondiaux, les pratiques agricoles de par le monde ne sont pas toujours calquées sur les standards européens et le risque de fraude est accru. Il existe plusieurs types de fraudes tels que l'ajout de sucre (ou sirop de sucre) pour « couper » le miel, la fraude par dénomination incorrecte de l'origine botanique (dans le cas de miels mono-floraux) et par falsification de l'origine géographique. La fraude à l'ajout de sucre est aujourd'hui bien détectée par les techniques actuelles notamment par analyse des ratios de carbone [405,406]. En revanche, les fraudes à l'origine florale ou géographique sont bien plus complexes et la méthode classiquement utilisée est l'analyse mélissopalynologique. Il s'agit de l'étude des pollens présents dans le miel par microscopie électronique après centrifugation d'une solution aqueuse de miel. Cependant, cette méthode est insuffisamment précise et pose de nombreux problèmes d'utilisation (haut degré de spécialisation technique nécessaire, faible degré de reproductibilité, interprétation complexe et non automatique des résultats). D'un point de vue chimique, quelques études montrent une discrimination des miels selon leurs teneurs en acides aminés [407] ou par analyse chimiométrique à l'aide de donnée obtenue en LC-UV-MS/MS. Cependant, aucun marqueur utilisable n'a pu être proposé [408].

Pour l'ensemble de ces raisons, l'INC a choisi d'étudier le miel afin de renseigner les consommateurs français sur la qualité des miels qu'ils consomment. Cette étude a été pour

nous l'occasion de réaliser une preuve de concept de la réalisation d'une analyse ciblée et globale d'une matrice complexe par LC-HRMS en utilisant une approche métabolomique.

Le miel est une substance obtenue par les abeilles en butinant le nectar des fleurs ou en récoltant du miellat, une excrétion produite par des insectes suceurs comme le puceron et la cochenille à partie de la sève des arbres (à l'origine du miel de sapin par exemple). Le nectar ou le miellat est ensuite transformé par les abeilles en miel par hydrolyse du saccharose en fructose et en glucose. Il est ensuite stocké dans les alvéoles de la ruche où il est deshydraté. Une fois arrivé à maturation, le miel obtenu peut être conservé durant plusieurs mois et sert aux abeilles comme source de nourriture durant les périodes froides. Le miel est composé de 80 % de sucres (principalement sous forme de fructose et de glucose), de 18 % d'eau maximum (teneur légale maximale), de 1 % d'acides aminés libres et de 1 % d'autres produits tels que des sels minéraux, des acides organiques, des vitamines, des enzymes (dont les amylases), des flavonoïdes, des substances aromatiques, des matières pigmentaires, et des grains de pollen.

De fait, le miel ne peut être injecté directement dans un système analytique faisant intervenir un processus thermique en raison de la grande proportion de sucre. Une analyse par les systèmes tels que la GC-MS ou la LC-MS nécessite donc une préparation d'échantillon appropriée afin d'éliminer le sucre et de concentrer les analytes si nécessaire. Dans la littérature, l'extraction réalisée est généralement de type QuEChERS [333,394], par extraction liquide-liquide avec purification par SPE [409,410] ou par microextraction liquide-liquide dispersive [396]. Le miel est alors analysé par des techniques de spectrométrie de masse en tandem [409,411,412]. Il existe également quelques applications sur des spectromètres de masse à haute résolution de type TOF [413] ou Orbitrap™ [265,395]. Aucune étude de classification et de recherche de composés non ciblés ou inconnus n'a été réalisée sur le miel par spectrométrie de masse à haute résolution.

L'objectif de cette étude était de développer et de valider une méthode en LC-HRMS pour la détection de 83 polluants connus pour être présents dans le miel et permettant d'indiquer si leur concentration est au-dessus ou en deçà des limites réglementaires. La valeur ajoutée de ce travail réside aussi dans l'application à ces mêmes données brutes de méthodes d'analyses de données développées initialement pour l'analyse métabolomique. Grâce à ce type d'approches, nous avons pu caractériser et identifier de nouveaux xénobiotiques et également discriminer les miels selon leur origine florale.

## II.2. **Matériel et Méthodes**

### II.2.1. Produits chimiques et réactifs

Les 83 composés de référence ainsi que le sulfate de magnésium (MgSO4, > 99 %) et l'acétate de sodium ($CH_3COONa$, > 97 %) proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Les mélanges de substances utilisés pour l'étalonnage des spectromètres de masse (Calmix-positif, pour le mode d'ionisation positive, comportant la caféine, l'acétate de L-méthionyl-arginyl-phénylalanyl-alanine et de l'Ultramark 1624 ; et Calmix-négatif, pour le mode d'ionisation négative, contenant, en plus du mélange Calmix-positif, du dodécylsulfate de sodium et du taurocholate de sodium) ont été achetés chez Thermo Fisher Scientific (Les Ulis, France). L'acétonitrile (ACN) de pureté analytique, l'acide formique (HCOOH), le dichlorométhane ($CH_2Cl_2$) et l'éther de méthyl-tert-buthyl (MTBE) proviennent de VWR (Fontenay-sous-Bois, France) et le méthanol (MeOH) de pureté analytique de chez Carlo Erba (Val de Reuil, France). L'eau ultra pure déionisée a été filtrée à travers un système Milli-Q (Millipore, Molsheim, France).

### II.2.2. Préparation des solutions de travail

Les solutions mères des composés de références ont été préparées à 1 mg/mL, lorsque cela était possible, en dissolvant 1 mg de chaque substance dans 1 mL d'un solvant approprié. Le choix des solvants étaient restreint à l'eau ($H_2O$), à l'acétonitrile (ACN), au méthanol (MeOH) et à des mélanges de ces solvants avec addition d'acide formique (HCOOH) jusqu'à un maximum de 10 %. Des solutions de travails à 5 µg/mL ont été réalisées pour chaque composé de référence par dilution de la solution mère dans un mélange $H_2O$/ACN (95/5, v/v). Un mélange de solutions de travail à 1 µg/mL contenant les 83 composés de référence a également été réalisé à partir de solutions mères par une dilution au millième. Pour minimiser la dégradation de toutes ces solutions, elles ont été conservés à -20°C immédiatement après leurs préparations.

### II.2.3. Echantillons de miels

Un groupe de 76 miels a été acheté par l'INC dans différents magasins de Paris. Ces miels ont été choisis en fonction de leurs origines géographiques, leurs origines florales, leurs prix et leurs « modes de fabrication » (labellisés ou non). Sont représentés des miels du monde entier (mélangé ou non) et des miels d'origines botaniques différentes (mille fleurs, lavande,

acacia, montagne, oranger et eucalyptus). Ces miels sont de prix et de qualité divers (« discount », de la grande distribution, artisanaux et luxueux) et de différents labels [aucun, label rouge, agriculture biologique et Indication Géographique Protégé (IGP)].

### II.2.4. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons de miels a été réalisée selon une méthode QuEChERS inspirée des protocoles de Pizzutti et coll. [414] et Gomez-Perez et coll. [395]. Chaque miel a été préparé six fois selon le protocole suivant : une prise d'essai de 5 g de miel a été introduite dans un tube de 50 mL de type Falcon en polypropylène à bouchon à vis, et 4 mL d'eau ont été ajoutés. Ce mélange miel-eau a été agité par vortex pendant 2 minutes pour homogénéiser les échantillons quels que soient leurs consistances (liquides, crémeux ou solides). A ce stade, trois des six réplicas ont été dopés avec un volume approprié (dépendant de la masse pesée) de la solution de mélange de travail (1 µg/mL) pour obtenir une concentration de 10 µg/kg (concentration réglementaire la plus basse) pour chaque polluant ciblé. Les échantillons ont ensuite été extraits avec 10 mL d'ACN, 2 g de sulfate de magnésium et 2,5 g d'acétate de sodium. Les tubes Falcon ont été mélangés de haut en bas pendant 1 heure. Après centrifugation à 3500 rpm pendant 5 minutes, un aliquot de 4 mL de la phase supérieure (ACN) a été transféré dans un tube de 5 mL en polypropylène. Cet aliquot de phase organique a été évaporé dans un bain marie à 25 °C sous flux d'azote. Les échantillons ont ensuite été reconstitués avec 200 µL d'un mélange $H_2O$/ACN (95/5, v/v) avant injection dans le système de chromatographie liquide couplée avec la spectrométrie de masse.

### II.2.5. Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses LC-HRMS ont été réalisées avec un système de chromatographie liquide de type NEXERA LC-30AD de la société Shimadzu (Champs-sur-Marne, France) couplé à un spectromètre de masse de type Exactive (technologie Orbitrap™) de la société Thermo Fisher Scientific (Les Ulis, France). Les expériences LC-HESI-MS/MS ont été réalisées avec un système chromatographique de type ACCELA 1250 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) couplé à un spectromètre de masse de type Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France). L'Exactive et le Q-Exactive étaient équipés d'une source Electropsray et Heated-Electrospray 2 (HESI-II), respectivement, et opérant dans le mode d'ionisation positive. Les échantillons ont été placés dans un passeur automatique et thermostaté à 4 °C.

Les données ont été acquises et visualisées avec le logiciel Xcalibur (version 2.1, Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France).

#### II.2.5.1. Conditions chromatographiques

La chromatographie haute performance en phase liquide (HPLC) a été réalisée avec une colonne Xterra C18 de dimension 2,1 mm × 150 mm, 5 µm (Waters, Guyancourt, France) placée dans un four thermostaté à 30 °C. Le système chromatographique a été équipé d'un préfiltre en ligne de 0,5 µm (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France).

Les phases mobiles utilisées pour la séparation chromatographique étaient constituées de 100 % d'eau (phase A) et d'ACN (phase B), et contenaient toutes deux 0,1 % d'acide formique. L'élution chromatographique a été réalisée selon les conditions de gradient indiqué comme suit. Le débit de phase mobile a été fixé à 0,3 mL/min. L'élution débute avec une étape isocratique de 2 minutes à 5 % de phase B. S'en suit un accroissement linéaire de 5 à 100 % de proportion de phase B pendant les 20 minutes suivantes. La proportion de 100 % de phase B est maintenue constante pendant 4 minutes pour un rinçage de la colonne avant de revenir dans les conditions initiales, lesquelles sont maintenues pendant 4 minutes pour une rééquilibration du système chromatographique.

#### II.2.5.2. Conditions d'analyse par spectrométrie de masse

Afin de s'assurer de la bonne précision de mesure des rapports *m/z*, l'étalonnage de l'instrument a été effectué chaque semaine dans les deux modes d'ionisation en utilisant le mélange étalon « Calmix » fourni par la société Thermo Fisher Scientific. Le spectromètre de masse a été utilisé avec une tension du capillaire d'introduction fixée à 4,8 kV en mode d'ionisation positive à une température de capillaire de transfert de 280 °C. La pression du gaz de nébulisation et la pression du gaz axillaire ont été respectivement fixées à 28 et 9 unités arbitraires. Le pouvoir résolutif de l'analyseur a été fixé à 50 000 ($m/\Delta m$ où $\Delta m$ correspond à la largeur à mi-hauteur du pic produit par un ion monochargé à *m/z* 200). La détection des ions a été réalisée sur la gamme de masse entre *m/z* 70 et 1000 avec une précision en masse inférieure à 5 ppm. Le nombre d'ions à accumuler (paramètre AGC target de l'anglais *Automatic Gain Control*) et le temps d'injection maximum des ions (paramètre MIT de l'anglais *Maximum Inject Time*) ont été respectivement fixés à $10^6$ et 50 ms.

Pour les expériences MS/MS, deux types d'évènements successifs ont été utilisés sur le Q-Exactive : (i) un spectre MS avec un pouvoir résolutif, un paramètre d'AGC target et un

paramètre MIT fixé à 70 000 (*m/Δm*, FWHM à *m/z* 200), $10^6$ et 50 ms et (ii) un spectre MS/MS en mode d'activation non résonnante de type HCD (de l'anglais *Higher-energy Collisional induced Dissociation*) avec des valeurs d'énergies de collision normalisées de 20 et 40 %, un pouvoir résolutif, des valeurs d'AGC target, de MIT, et une fenêtre d'isolation fixée à 17 500 (*m/Δm*, FWHM à *m/z* 200), $10^6$, 250 ms et 0,4 *m/z*, respectivement.

#### II.2.5.3. Structure de la séquence

Les échantillons ont été injectés aléatoirement et analysés en trois séquences de 152 échantillons (76 échantillons dopés et non dopés.) Dans chaque séquence, les échantillons non dopés ont été injectés en premier. Un échantillon de blanc analytique et un mélange des 83 composés de référence à la concentration de 100 ng/mL en tampon (95/5 $H_2O$/ACN, v/v) ont été injectés tous les 5 et 10 injections d'échantillons de miels respectivement.

## II.3. **Traitement des données**

### II.3.1. Traitement de données pour l'analyse ciblée

Toutes les données brutes ont été traitées avec deux applications de la suite logiciel Xcalibur 2.1 : (i) Qualbrowser pour la visualisation des chromatogrammes et pics de masse et (ii) Quanbrowser pour l'intégration des pics chromatographiques. L'identification des polluants d'intérêt à partir des données brutes a été réalisée selon 4 critères : (i) le temps de rétention attendu est comparé avec celui du composé de référence dans une fenêtre de temps de +/- 0,15 minutes, (ii) la masse précise mesurée pour l'analyte doit être à +/- 5 ppm de la masse précise du composé de référence, (iii) la fiabilité du massif isotopique comparé avec celle du composé de référence (nombre de pics isotopiques et intensité relative) et (iv) l'augmentation de l'aire chromatographique dans l'échantillon dopé comparativement à l'échantillon non dopé.

### II.3.2. Traitement de données pour l'analyse non ciblée

La détection automatique des pics, l'intégration des aires et l'alignement inter-échantillons ont été réalisées avec le logiciel XCMS. Pour cela, les données brutes ont tout d'abord été converties dans le format mzXML, qui est un format libre, à l'aide du logiciel ProteoWizard [415]. Les données ainsi converties ont été traitées en utilisant la version 1.30.3 d'XCMS fonctionnant sur la version de l'environement logiciel R 3.0.0. Celui-ci a été installé sur un

serveur de calcul Lenovo ThinkStation C20X 24 core Intel Xeon de 2,4 GHz avec 24 Go de RAM et fonctionnant sous Linux version Centos release 6.4 Final x86_64. La détection des pics a été réalisée grâce à l'algorithme CentWave [416]. La table de pics ainsi générée a été traitée selon la procédure décrite ci-après. Dans un premier temps, les variables ont été quantile-normalisées pour harmoniser leurs distributions [371]. Ensuite, les variables ont été filtrées selon 3 critères : (i) leur répétabilité, leur coefficient de variation et leur intensité par rapport aux blancs analytiques. Les variables n'ont été conservées que si elles étaient détectées avec le même statut (présent ou absent) dans les trois réplicas de 90 % des miels avec un coefficient de variation inférieur à 50 % et un ratio par rapport au blanc supérieur à 10. Enfin, les variables ont été annotées par comparaison à +/- 10 ppm de leur masse précise avec les masses théoriques des molécules contenues dans les bases de données publiques KEGG [373], HMDB [374] et METLIN [375] en utilisant un outil informatique du laboratoire développé en langage R.

### II.3.3. Identification des xénobiotiques chlorés dans les échantillons de miel

Un algorithme a été écrit en langage R afin de mettre en évidence les molécules chlorées à l'aide du massif isotopique spécifique obtenu à partir des atomes de chlores. Il existe, en effet, dans la nature deux isotopes majoritaires du chlore : le $^{35}Cl$ et le $^{37}Cl$. Ces deux isotopes sont distants de 1,9970 u. L'algorithme créé utilise la table de pics générée par XCMS et permet de regrouper deux variables potentiellement chlorées et ayant un même temps de rétention (écart de +/- 5 secondes autorisé) en les associant grâce à une différence recherchée de 1,9970 +/- 0,0010 *m/z*.

### II.3.4. Analyses statistiques

#### II.3.4.1. Analyses statistiques multivariées

Les variables résultant du traitement XCMS ont été centrées sur la moyenne, transformées en logarithmes, puis analysées en utilisant le logiciel SIMCA-P11 (Umetrics, Umea, Suède). Des analyses en composantes principales (ACP) et des analyses discriminantes (PLS-DA) ont été réalisées. Ce logiciel permet également l'export d'une liste de variables importantes dont les contributions au modèle PLS-DA créé sont matérialisées par leur score VIP (de l'anglais *Variable Importance on the Projection*). Une variable a ensuite été considérée comme discriminante pour le modèle si son score VIP est supérieur à 2. Les modèles de PLS-DA ont

aussi été validés en utilisant la fonction de validation croisée du logiciel SIMCA-P11 qui réalise des tests de permutations (k = 500).

#### II.3.4.2. Analyses statistiques univariées

Pour chaque variable, l'hypothèse de normalité a été testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk avec une erreur α de 5 %. Des tests de Wilcoxon ont été utilisés avec une erreur α de 5 % pour déterminer la significativité (p-value) des variables entre deux groupes (multi-floraux *vs* monofloraux). Dans un second temps, des tests Fisher-Snedecor de type ANOVA (de l'anglais *ANalysis Of VAriance*) ont été réalisés pour déterminer la significativité d'une variable par rapport à une origine botanique avec un risque α de 5 % en utilisant un contraste de type somme. Dans ce cas, la moyenne de tous les individus est utilisée comme référence au regard de la moyenne du groupe testé.

## II.4. **Résultats et discussion**

Le but de cette étude est de montrer, à partir de l'analyse d'échantillons de miels, que la spectrométrie de masse à ultra haute résolution couplée à des outils informatiques de fouille de données permet d'améliorer la caractérisation physico-chimique de produits agroalimentaires. Dans un premier temps, une analyse ciblée de pesticides et d'antibiotiques a été effectuée à partir d'une liste pré-établie. Pour cela, une banque de données spectrales permettant d'annoter et d'identifier avec précision les polluants dans le miel a été réalisée. Les données brutes ont aussi été analysées à l'aide d'un algorithme de recherche d'ions chlorés, afin de mettre en évidence des composés inattendus ou inconnus. Enfin, une classification des miels a été réalisée en fonction de leur origine florale à l'aide d'analyses statistiques uni et multivariées.

### II.4.1. Détection de polluants par approche ciblée dans le miel

#### II.4.1.1. Développement et validation de la méthode

Une analyse par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse haute résolution a été développée pour étudier 83 polluants (55 pesticides et 28 antibiotiques) d'intérêt. La première étape a été la création d'une banque de données spectrales contenant toutes les informations obtenues à partir des spectres MS des molécules. Une méthode chromatographique ainsi qu'une méthode d'extraction QuEChERS

basée sur une extraction liquide-liquide ont été développées afin de (i) détecter ces 83 polluants, (ii) indiquer si la concentration des polluants retrouvés dans le miel est supérieure ou inférieure à la limite réglementaire et (iii) détecter la plus grande variété de produits chimiques présents dans le miel. Enfin, la méthode a été validée en calculant les limites de détection, les effets de la matrice ainsi que la fidélité sur plusieurs extractions.

#### II.4.1.1.1. Choix des polluants

En premier lieu, une liste de polluants susceptibles de se retrouver dans le miel a été établie par un expert du miel mandaté par l'INC. Il a choisi 55 pesticides et 28 antibiotiques parmi lesquelles des molécules classiquement utilisées par les apiculteurs pour protéger leurs ruches contre les maladies et les parasites tels que le *varroa* et l'agent *nosema*. La liste de ces molécules est présentée dans le Tableau 5.

#### II.4.1.1.2. Implémentation de la banque de données spectrale

Dans un second temps, une banque de données spectrales a été constituée en injectant chacun de ces composés individuellement à une concentration de 5 µg/mL pour la réalisation d'analyses par introduction directe dans le spectromètre de masse (FIA-MS de l'anglais *Flow Injection Analysis*). Il s'agit d'un couplage de la chaîne chromatographique et du spectromètre de masse sans utiliser de colonne chromatographique afin de permettre l'injection automatisée des composés de référence en solution envoyés vers le spectromètre à l'aide du flux de phase mobile. L'acquisition d'une banque de données spectrales en spectrométrie de masse haute résolution est indispensable, car contrairement à l'analyse de transition de masse en mode MRM sur les appareils de type TQ, l'HRMS génère un grand nombre de signaux utiles pour la détection et l'identification des molécules. En effet, il a été montré qu'en moyenne 6 à 10 ions peuvent être générés au cours du processus d'ionisation Electrospray pour chaque molécule [378,417]. On distingue quatre types d'ions observés : (i) les ions protonés ou déprotonés (en fonction du mode d'ionisation), qui fournissent des informations sur la masse moléculaire du composé analysé et qui sont utilisées pour la quantification, (ii) les ions du massif isotopique, qui sont pertinents pour l'identification des métabolites, notamment lorsque plusieurs formules brutes sont possibles à partir de la masse exacte de la molécule analysée, (iii) les ions adduits dont la présence dépend de l'affinité acido-basique des ions dans la phase gazeuse et (iv) les ions issus de la fragmentation en source d'ionisation, dont la fréquence et l'abondance dépendent principalement des conditions expérimentales et notamment des paramètres de source et de désolvatation tels que la tension du capillaire

d'introduction, la température d'évaporation dans le capillaire de transfert ou les potentiels appliqués aux lentilles de désolvatation et de refocalisation. Ces ions permettent une plus grande confiance dans l'attribution et l'annotation des molécules détectées. Le Tableau 5 regroupe les ions principaux détectés pour chaque molécule accompagnés de leur masse exacte.

A titre d'exemple, la Figure 32 montre le spectre de masse obtenu en Electrospray en mode d'ionisation positive de la molécule carbaryl. On observe la présence de la molécule protonée à la masse *m/z* 202,0857 avec une précision de l'ordre de 2 ppm et un ion fragment détecté à m/z 145,0645 correspondant à la perte d'un groupement $CH_3$-N=C=O. Ces deux ions peuvent ainsi être utilisés pour la détection et l'identification du carbaryl dans les spectres de masse des échantillons de miel. Dans le Tableau 5 sont indiqués pour chaque molécule la nature des ions détectés ainsi que la masse exacte de ces ions.

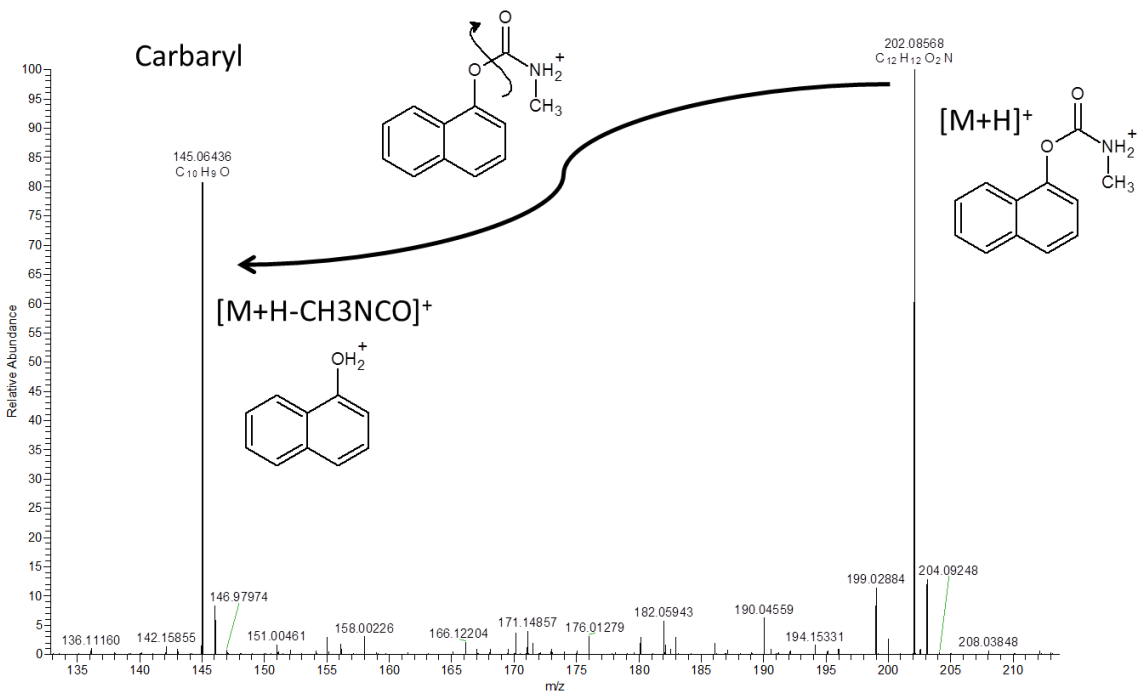



**Figure 32 : Spectre de masse Electrospray de la molécule carbaryl, enregistré en mode d'ionisation positive.**

| ID | Nom de la molécule | Formule brute | Attribution | Ions détectés | Masse exacte extraite | RT (min) | logP* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5-hydroxythiabendazole | $C_{10}H_7N_3OS$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 218,03826 | 6,45 | 2,03 |
| 2 | Acetamiprid | $C_{10}H_{11}ClN_4$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 223,0745 | 10,09 | 1,11 |
| 3 | Albendazole | $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 266,09578 | 11,5 | 3,2 |
| 4 | Aldicarb | $C_7H_{14}N_2O_2S$ | Pesticide | $[M+H-C_2H_4NO_2]^+$ | 116,0536 | 11,21 | 1,28 |
| 5 | Amitraz | $C_{19}H_{23}N_3$ | Pesticide | $[M+H-C_9H_8N]^+$ | 163,12298 | 7,64 | 2,34 |
| 6 | Atrazine | $C_8H_{14}ClN_5$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 216,10105 | 13,4 | 2,2 |
| 7 | Azoxystrobin | $C_{22}H_{17}N_3O_5$ | Pesticide | $[M+H]^+$ et $[M+H-CH_3O]^+$ | 404,1241 et 372,09788 | 15,86 | 4,22 |
| 8 | Boscalid | $C_{18}H_{12}Cl_2N_2O$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 343,03995 | 16,07 | 4,92 |
| 9 | Carbaryl | $C_{12}H_{11}NO_2$ | Pesticide | $[M+H]^+$ et $[M+H-C_2H_3NO]^+$ | 202,08626 et 145,06479 | 13,32 | 2,46 |
| 10 | Carbendazim | $C_9H_9N_3O_2$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 192,07676 | 6,22 | 1,8 |
| 11 | Carbofuran | $C_{12}H_{15}NO_3$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 222,11247 | 12,81 | 2,05 |
| 12 | Carfentrazone-ethyl | $C_{15}H_{14}Cl_2F_3N_3O_3$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 412,04371 | 17,58 | 4,29 |
| 13 | Chlorfenvinphos | $C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 358,97681 | 17,41 | 4,3 |
| 14 | Clothianidin | $C_6H_8ClN_5O_2S$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 250,016 | 9,2 | 1,11 |
| 15 | Coumaphos | $C_{14}H_{16}ClO_5PS$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 363,02174 | 18,34 | 4,15 |
| 16 | Cyproconazol | $C_{15}H_{18}ClN_3O$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 292,12112 | 15,26 | 2,85 |
| 17 | Cyprodinil | $C_{14}H_{15}N_3$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 226,13388 | 14,14 | 3,21 |
| 18 | Diazinon | $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 305,10833 | 18,17 | 3,81 |
| 19 | Dichlorvos | $C_4H_7Cl_2O_4P$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 220,95318 | 12,16 | 1,37 |
| 20 | Difenoconazol | $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 406,07198 | 17,77 | 4,86 |
| 21 | Diflubenzuron | $C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 311,03934 | 16,62 | 3,61 |
| 22 | Dimethoate | $C_5H_{12}NO_3PS_2$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 230,0069 | 9,79 | 0,34 |
| 23 | Dimethomorph | $C_{21}H_{22}ClNO_4$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 388,13101 | 15 | 3,28 |
| 24 | Dimetridazole | $C_5H_7N_3O_2$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 142,06111 | 5,08 | 0,23 |
| 25 | Diphenylamine | $C_{12}H_{11}N$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 170,09643 | 16,93 | 3,41 |
| 26 | Febantel | $C_{20}H_{22}N_4O_6S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 447,13328 | 16,6 | 2,91 |
| 27 | Fenbendazole | $C_{15}H_{13}N_3O_2S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 300,08013 | 13,22 | 3,99 |
| 28 | Fenoxycarb | $C_{17}H_{19}NO_4$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 302,13869 | 16,92 | 3,31 |
| 29 | Flubendazole | $C_{16}H_{12}FN_3O_3$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 314,09355 | 12,2 | 3,4 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 30 | Flusilazole | $C_{16}H_{15}F_2N_3Si$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 316,10761 | 16,48 | 4,68 |
| 31 | Fluvalinate | $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 503,13438 | 22,3 | 6,98 |
| 32 | Furazolidone | $C_8H_7N_3O_5$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 226,04585 | 8,94 | 0,87 |
| 33 | Hexaconazol | $C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 314,08215 | 16,64 | 3,71 |
| 34 | Imidacloprid | $C_9H_{10}ClN_5O_2$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 256,05958 | 9,56 | 1,1 |
| 35 | Indoxacarb | $C_{22}H_{17}ClF_3N_3O_7$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 528,07799 | 18,99 | 5,39 |
| 36 | Iprodione | $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 330,04068 | 16,75 | 2,29 |
| 37 | Malathion | $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ | Pesticide | $[M+H]^+$ et $[M+H-C_2H_5O]^+$ | 331,04335 et 285,00148 | 16,79 | 1,86 |
| 38 | Mebendazole | $C_{16}H_{13}N_3O_3$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 296,10297 | 11,67 | 3,26 |
| 39 | Metalaxyl | $C_{15}H_{21}NO_4$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 280,15434 | 13,65 | 2,12 |
| 40 | Methoxyfenozide | $C_{22}H_{28}N_2O_3$ | Pesticide | $[M+H]^+$ et $[M+H-C_4H_7]^+$ | 369,21727 et 313,15467 | 16,52 | 4,75 |
| 41 | Metolachlor | $C_{15}H_{22}ClNO_2$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 284,14119 | 16,83 | 3,45 |
| 42 | Metronidazole | $C_6H_9N_3O_3$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 172,07167 | 4,25 | -0,46 |
| 43 | Myclobutanil | $C_{15}H_{17}ClN_4$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 289,12145 | 15,86 | 3,66 |
| 44 | Nifuroxazide | $C_{12}H_9N_3O_5$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 276,0615 | 10,54 | 1,75 |
| 45 | Oxfendazole | $C_{15}H_{13}N_3O_3S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 316,07504 | 9,99 | 2,62 |
| 46 | Oxibendazole | $C_{12}H_{15}N_3O_3$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 250,11862 | 9,96 | 2,52 |
| 47 | Penconazol | $C_{13}H_{15}Cl_2N_3$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 284,07158 | 16,69 | 4,19 |
| 48 | Pendimethalin | $C_{13}H_{19}N_3O_4$ | Pesticide | $[M+H]^+$ et $[M+H-C_5H_9]^+$ | 282,14484 et 212,06658 | 20,34 | 4,82 |
| 49 | Piperonyl-butoxide | $C_{19}H_{30}O_5$ | Pesticide | $[M+Na]^+$ et $[M+H-C_8H_{17}O_3]^+$ | 361,19855 et 177,09101 | 19,59 | 4,1 |
| 50 | Pirimiphos-ethyl | $C_{13}H_{24}N_3O_3PS$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 334,13488 | 19,65 | 3,68 |
| 51 | Pirimiphos-methyl | $C_{11}H_{20}N_3O_3PS$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 306,10357 | 17,85 | 2,96 |
| 52 | Prochloraz | $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$ | Pesticide | $[M+H]^+$ et $[M+H-C_3H_3N_2]^+$ | 376,03809 et 308,00063 | 14,88 | 3,62 |
| 53 | Propiconazole | $C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 342,07706 | 17,05 | 4,33 |
| 54 | Pyraclostrobin | $C_{19}H_{18}ClN_3O_4$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 388,10586 | 18,29 | 4,7 |
| 55 | Pyrimethanil | $C_{12}H_{13}N_3$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 200,11823 | 12,08 | 2,43 |
| 56 | Pyriproxifen | $C_{20}H_{19}NO_3$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 322,14377 | 19,97 | 4,75 |
| 57 | Ronidazole | $C_6H_8N_4O_4$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 201,06183 | 5,81 | -0,48 |
| 58 | Simazine | $C_7H_{12}ClN_5$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 202,0854 | 11,75 | 1,78 |
| 59 | Spinosad | $C_{41}H_{65}NO_{10}$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 732,46813 | 14,57 | 5,6 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 60 | Spirodiclofen | $C_{21}H_{24}Cl_2O_4$ | Pesticide | $[M+H]^+$ et $[M+H-C_6H_9O]^+$ | 411,11244 et 313,03928 | 21,64 | 6,62 |
| 61 | Sulfachloropyridazine | $C_{10}H_9ClN_4O_2S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 285,02075 | 9,5 | 0,85 |
| 62 | Sulfadiazine | $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 251,05973 | 5,98 | 0,39 |
| 63 | Sulfadimethoxine | $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 311,08086 | 11,29 | 1,26 |
| 64 | Sulfamerazine | $C_{11}H_{12}N_4O_2S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 265,07538 | 7,45 | 0,52 |
| 65 | Sulfamethazine | $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 279,09103 | 8,27 | 0,65 |
| 66 | Sulfamethizole | $C_9H_{10}N_4O_2S_2$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 271,0318 | 8,53 | 0,21 |
| 67 | Sulfamethoxazole | $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 254,05939 | 10,03 | 0,79 |
| 68 | Sulfamethoxypyridazine | $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 281,07029 | 8,59 | 0,47 |
| 69 | Sulfamonomethoxine | $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 281,07029 | 9,28 | 0,74 |
| 70 | Sulfaphenazole | $C_{15}H_{14}N_4O_2S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 315,09103 | 11,46 | 1,81 |
| 71 | Sulfapyridine | $C_{11}H_{11}N_3O_2S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 250,06448 | 7,09 | 1,01 |
| 72 | Sulfaquinoxaline | $C_{14}H_{12}N_4O_2S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 301,07538 | 11,32 | 1,55 |
| 73 | Sulfathiazole | $C_9H_9N_3O_2S_2$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 256,0209 | 7,02 | 0,98 |
| 74 | Sulfisoxazole | $C_{11}H_{13}N_3O_3S$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 268,07504 | 10,45 | 0,73 |
| 75 | Tebuconazole | $C_{16}H_{22}ClN_3O$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 308,15242 | 16,29 | 3,69 |
| 76 | Tebufenozide | $C_{22}H_{28}N_2O_2$ | Pesticide | $[M+H]^+$ et $[M+H-C_4H_7]^+$ | 353,22236 et 297,15975 | 17,34 | 5,35 |
| 77 | Tebuthiuron | $C_9H_{16}N_4OS$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 229,11176 | 11,15 | 1,35 |
| 78 | Tetramethrin | $C_{19}H_{25}NO_4$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 332,18564 | 19,77 | 3,09 |
| 79 | Thiabendazole | $C_{10}H_7N_3S$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 202,04335 | 7,02 | 2,33 |
| 80 | Thiacloprid | $C_{10}H_9ClN_4S$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 253,03092 | 11,11 | 2,06 |
| 81 | Thiamethoxam | $C_8H_{10}ClN_5O_3S$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 292,02657 | 8,41 | 1,29 |
| 82 | Trifloxystrobin | $C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$ | Pesticide | $[M+H]^+$ | 409,13697 | 19,12 | 4,8 |
| 83 | Trimethoprim | $C_{14}H_{18}N_4O_3$ | Antibiotique | $[M+H]^+$ | 291,14517 | 7,59 | 1,28 |

* les logP ont été obtenus à partir du site Chemicalize créé par ChemAxon (http://www.chemicalize.org/)

**Tableau 5 : Liste des molécules retenues pour l'analyse ciblée incluant les informations collectées lors des expériences de FIA-MS et LC-MS avec un identifiant, le nom de la molécule, la formule brute, l'attribution à une classe de produits, la nature des ions détectés, la masse exacte des ions extraits, le temps de rétention en minute et le logP (coefficient de partage octanol/eau)**

La Figure 33 montre un autre exemple de spectre de masse obtenu en Electropsray pour la molécule Amitraz. Dans ce cas, ni l'ion protoné, ni l'ion déprotoné n'ont été observés mais un fragment intense à la masse *m/z* 163,12239 correspondant à la perte du groupement $C_9H_9N$.

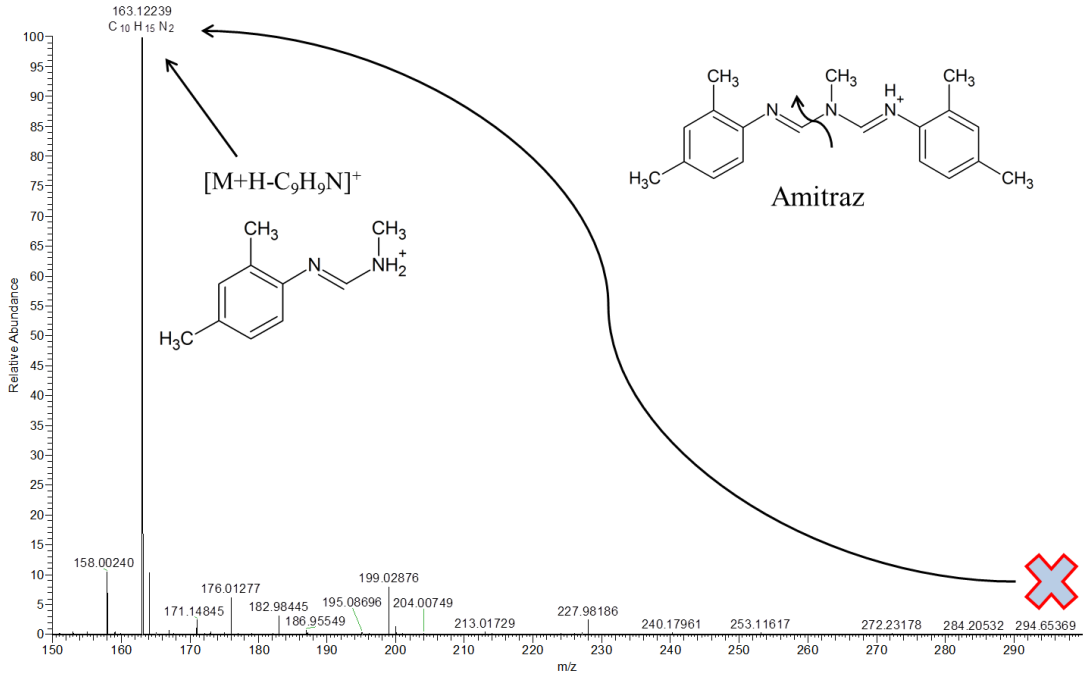



**Figure 33 : Spectre de masse Electrospray de la molécule amitraz, enregistré en mode d'ionisation positive.**

A l'issue de ces interprétations de spectres de masse sur chacune des molécules de la chimiothèque, une question demeure à propos de l'origine des fragments observés. L'analyse réalisée était une FIA-MS, il n'y a donc pas de séparation chromatographique et les fragments observés peuvent être de deux types : (i) une fragmentation en source liée à une certaine fragilité de la molécule dans les conditions d'ionisation utilisées et (ii) une dégradation de la molécule dans la solution liée aux conditions de solubilisation et l'emploi d'acide par exemple. A ce stade, des tests plus avancés sur les conditions d'ionisation auraient pu être entrepris en changeant les potentiels appliqués aux différentes lentilles, afin de constater ou non un changement des rapports d'intensité entre les hypothétiques fragments en source et l'ion protoné ou déprotoné. La solution retenue a été l'utilisation de la chromatographie car les fragments issus de la dégradation en solution sont alors potentiellement séparés dans le temps. A l'issue de la chromatographie, tous les fragments mis en évidence ont pu être considérés comme issus de fragmentations en source car ils étaient élués au sein du pic chromatographiques de l'ion parent correspondant. Dans le cas de l'amitraz, ou de molécules dont l'ion protoné ou déprotoné n'est pas visible sur le spectre de masse (Figure 33),

l'hypothèse d'une dégradation totale en solution reste néanmoins possible. Pour conclure, la solution a été préparée de nouveau en changeant les conditions de solubilisation mais les résultats obtenus sont restés les mêmes.

#### II.4.1.1.3. Optimisation des conditions de chromatographie liquide

La chromatographie liquide est une étape importante de l'analyse car elle permet de séparer dans le temps les molécules constitutives du miel et les polluants en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Elle sert aussi à limiter le phénomène de suppression d'ionisation lié généralement à la multitude de composés arrivant simultanément dans la source d'ionisation. Deux colonnes chromatographiques ont été évaluées : la Xterra C18 (150 mm × 2,1mm, 5 µm de granulométrie, Waters, Guyancourt, France) et la Supelco HSF5 (150 mm × 2,1 mm, 5 µm de granulométrie, Interchim, Montluçon, France). Ces deux colonnes ont été sélectionnées car les composés d'intérêts présentent une polarité faible à intermédiaire (voir valeur de logP dans le Tableau 5), la chromatographie de polarité de phase inversée est donc tout à fait indiquée. La Figure 34 montre que les logP des molécules retenues pour l'analyse ciblée des miels sont supérieurs à 0. Par ailleurs, bon nombre de molécules présentent des cycles aromatiques, raison pour laquelle la colonne HSF5 a été choisie. Cette colonne présente un groupement fonctionnel de type pentafluorophenyl dans lequel les 5 atomes de fluor très électronégatif répartis sur le cycle benzénique interagissent efficacement avec les électrons π des cycles aromatiques.

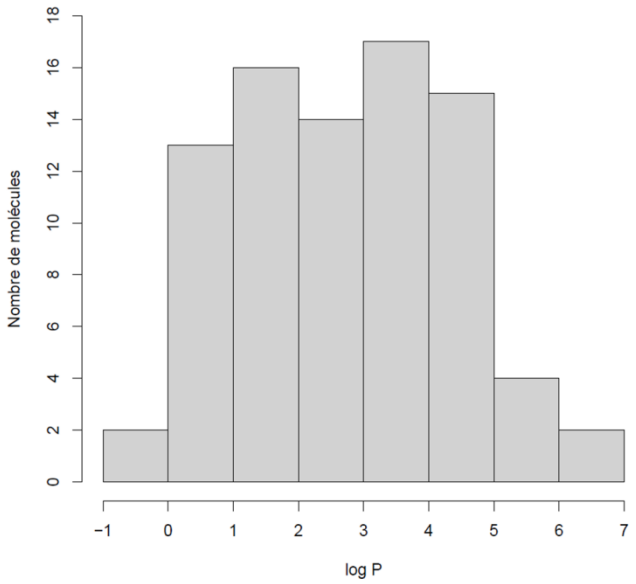



**Figure 34 : Distribution des logP des molécules retenues pour l'analyse ciblée des échantillons de miel (obtenus sur Chemicalize [418])**

Les deux colonnes ont été testées en injectant un mélange des 83 composés de référence à une concentration de 1 µg/mL. Les résultats obtenus sur les deux systèmes montrent de bien meilleurs résultats sur la colonne Xterra C18 (Figure 36). Les temps de rétention sur cette colonne sont présentés dans le Tableau 5 et sont compris entre 5 et 22 minutes avec une bonne séparation pour la moitié des composés (retour à la ligne de base). Cette colonne permet la discrimination avec retour à la ligne de base de composés isomères tels que la sulfaméthoxypyridazine (8,64 minutes) et la sulfamonométhoxine (9,34 minutes), non distinguables même avec la spectrométrie de masse haute résolution. Dans cet exemple, il est primordial de pouvoir séparer ces deux molécules avec le système chromatographique (Figure 35) d'autant plus que la différence structurale est mineure.

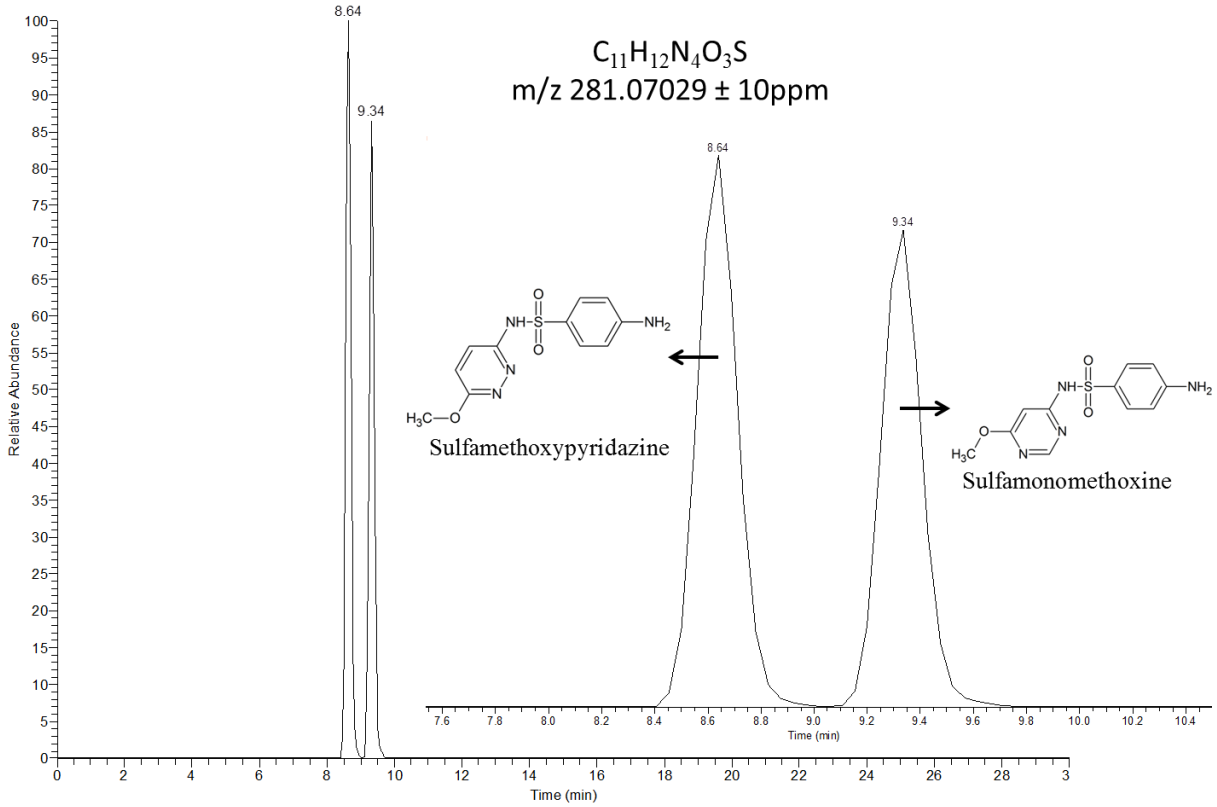



**Figure 35 : Chromatogramme illustrant la séparation de la sulfamethoxypyridazine et de la sulfamonomethoxine, deux molécules isomères**

En revanche, la séparation chromatographique obtenue avec la colonne HSF5 a été moins satisfaisante en raison d'un nombre important de coélutions observées sur plus de 25 composés parmi les 83 composés de référence, et notamment avec les molécules isobares.

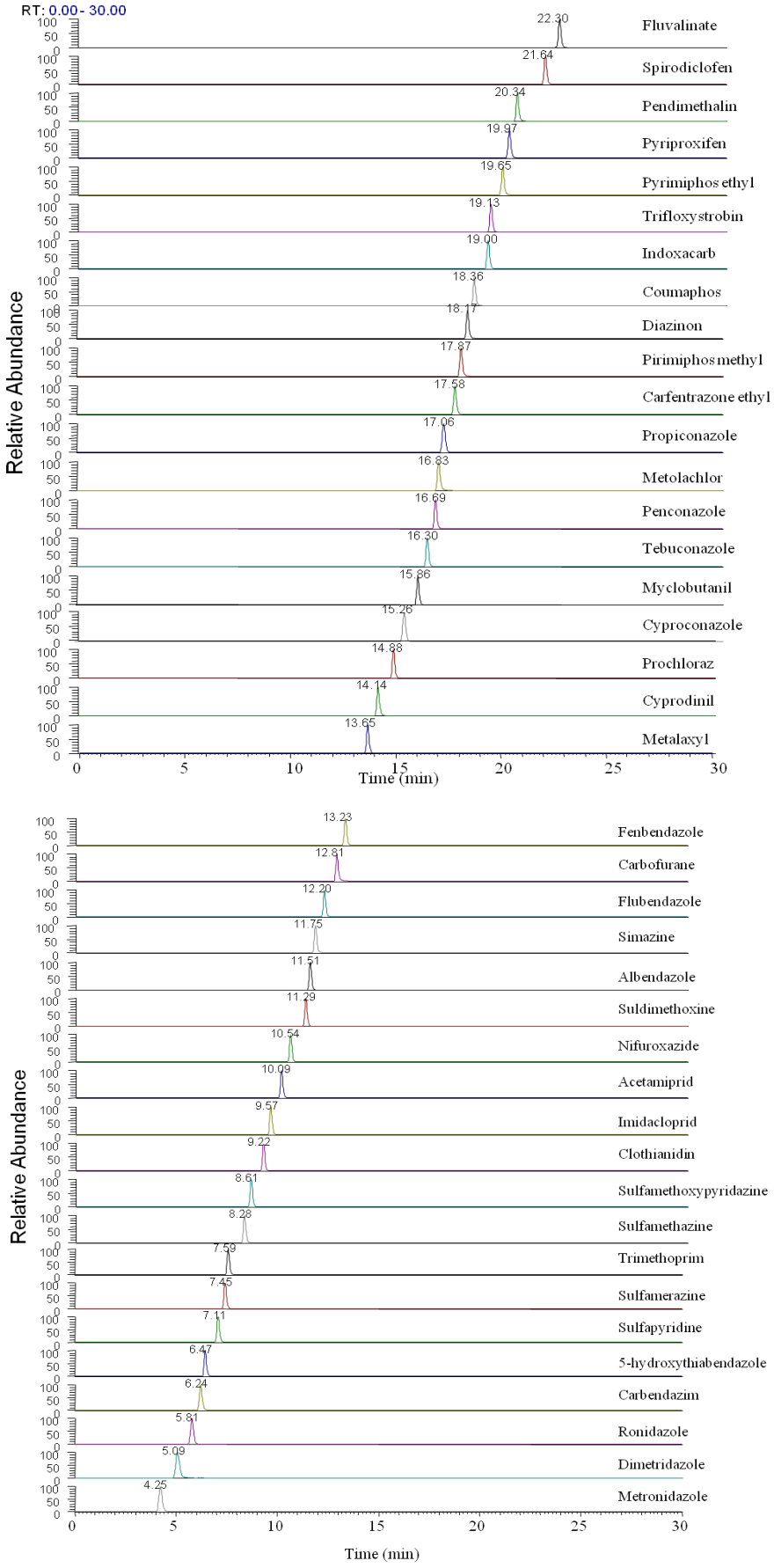



**Figure 36 : Chromatogramme illustrant la séparation chromatographique de 40 parmi les 83 composés de référence analysés en utilisant la Xterra C18 avec une détection en mode d'ionisation positive**

Afin de comprendre les mécanismes de rétention mis en jeu sur la colonne Xterra C18, une corrélation entre les logP et les temps de rétention obtenus sur la colonne a été réalisée (Figure 37). On note que les logP sont reliés de façon quasi proportionnelle aux temps de rétention. Les mécanismes de rétention de la colonne Xterra C18 sont donc principalement basés selon l'hydrophobie des molécules d'intérêts. La droite de régression réalisée sur ce modèle est tout à fait correcte compte tenu de la valeur de $R^2$ d'environ 0,74 ce qui pourrait nous permettre de prédire avec une bonne justesse les temps de rétention d'autres molécules à l'aide de leur logP si celui-ci est contenu entre 0 et 6.

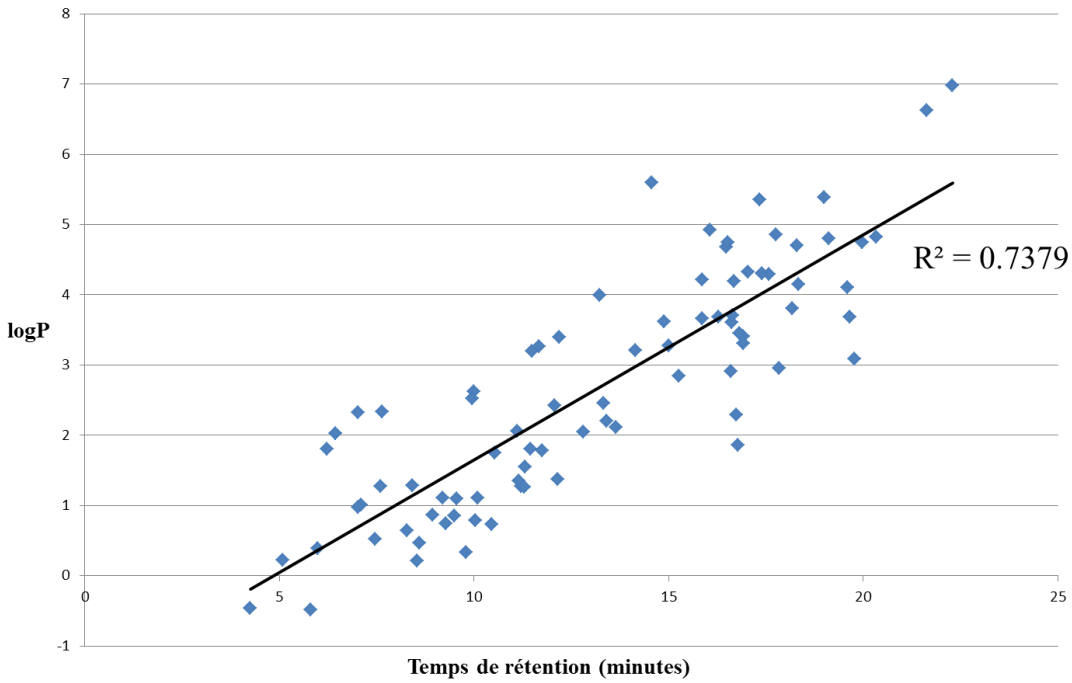



**Figure 37 : Corrélation entre le logP des molécules d'intérêts et leurs temps de rétention obtenus sur la colonne Xterra C18**

II.4.1.1.4. Optimisation de l'étape d'extraction des molécules d'intérêts à partir du miel

Le miel est une matrice complexe qui contient de grandes quantités de sucres et notamment du fructose qui entravent la désolvatation des ions. Il est indispensable de réaliser une extraction efficace afin (i) de piéger un nombre maximum de composés d'intérêts, (ii) d'éviter l'extraction d'une trop grande quantité de sucres et (iii) de réaliser l'extraction la moins destructrice et permettant tant que possible de réaliser des analyses globales. Pour résoudre ces problème, un protocole de type QuEChERS sur la base d'une extraction liquide-liquide adaptée des publications de Pizzutti et coll. [414] et Gomez-Perez et coll. [395] a été optimisée par l'évaluation de trois solvants et de deux prises d'essai. Les solvants choisis ont

été l'acétonitrile (ACN), le méthyl tert-butyle éther (MTBE) et le dichlorométhane ($CH_2Cl_2$) pour leurs caractères très apolaires compte tenu des logP des molécules d'intérêts et parce que les sucres ne sont pas ou peu solubles dans ces solvants. Pour réaliser le choix du solvant extracteur, huit miels représentatifs ont été sélectionnés en fonction de leurs viscosités (liquide, crémeux et solide), leur origine florale et le pays de production. Afin de calculer l'efficacité d'extraction et l'effet matrice, deux expériences ont été réalisées. La première a été utilisée pour calculer le rendement et le coefficient de variation de l'extraction. Pour cela, les miels ont été surchargés avec les 83 composés de référence puis extraits. La deuxième expérience avait pour objectif de calculer l'effet matrice. Pour cela, les miels ont été extraits puis surchargée avec les 83 composés de référence pour s'affranchir du rendement d'extraction. Dans les deux cas, 3 réplicas par miel ont été réalisés, soit 24 extractions par solvant pour chaque procédé (Figure 38). Pour chaque polluant, les miels ont été surchargés à la limite réglementaire de 10 µg/kg. Par ailleurs, 6 réplicas en tampon (mélange $H_2O$/ACN, 95/5, v/v) ont été analysés pour connaître l'aire de référence pour chaque molécule.

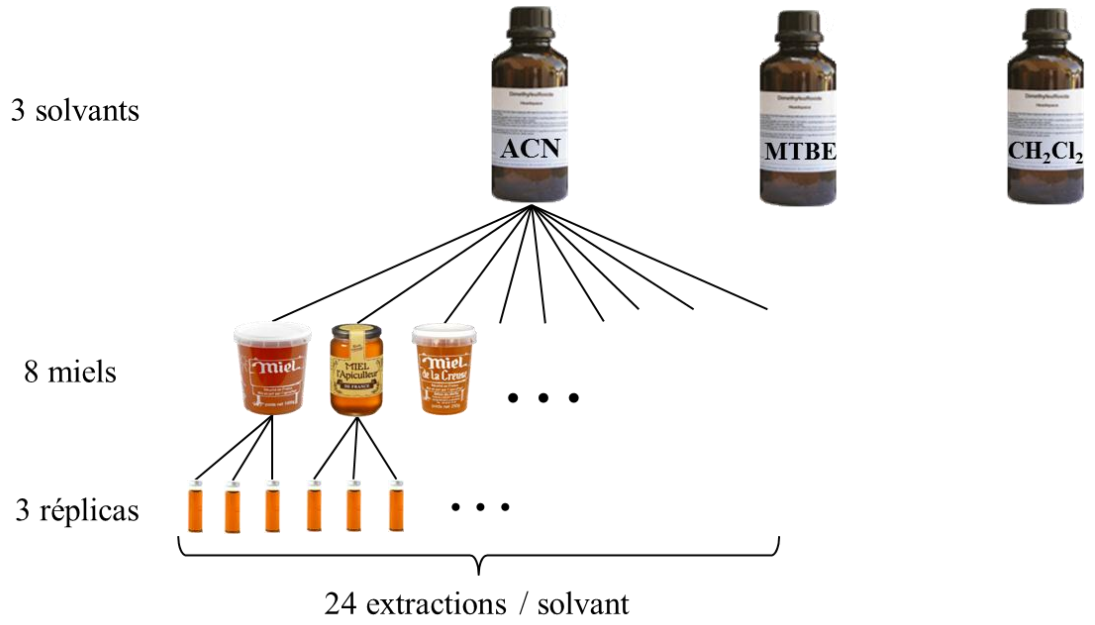



**Figure 38 : Représentation schématique de la préparation des 24 extractions par solvant**

Pour le calcul du rendement et du coefficient de variation de l'extraction, l'Équation 1 et l'Équation 2 ont été utilisées pour chaque couple molécule-solvant.

$$\boldsymbol{Rdt\ extraction} = \frac{\boldsymbol{Moy\ \ Aire\ (24\ extractions\ de\ l'expérience\ 1)}}{\boldsymbol{Moy\ Aire\ (24\ extractions\ de\ l'expérience\ 2)}} \times \mathbf{100}$$

**Équation 1 : Calcul du rendement d'extraction**

$$CV\ (\%) = \frac{Sd\ (24\ rendements\ d'extractions)}{Moy\ (24\ rendements\ d'extractions)} \times 100$$

**Équation 2 : Calcul du coefficient de variation sur le rendement d'extraction**

***Sd*** : Ecart-type et ***Moy*** : Moyenne

L'effet matrice pour chaque couple molécule-solvant a été calculé selon l'Équation 3.

$$Effet\ matrice\ (\%) = \frac{Moy\ Aire\ (24\ extractions\ de\ l'expérience2)}{Moy\ Aire\ (6\ réplicas\ dans\ tampon)} \times 100$$

**Équation 3 : Calcul de l'effet matrice**

Les moyennes des 24 rendements d'extraction et les moyennes des 24 coefficients de variation pour chaque composé et pour les trois solvants testés sont présentées dans la Figure 39 et la Figure 40 respectivement.

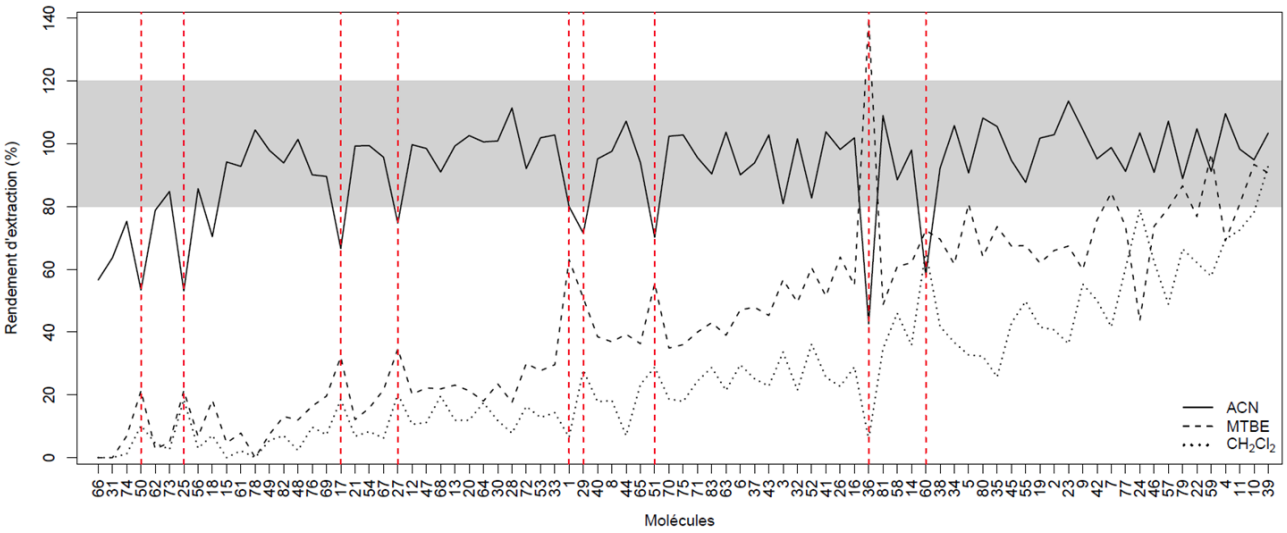



**Figure 39 : Rendement d'extraction (%) pour les trois solvants testés pour chaque molécule sur la base de 24 extractions par solvant**

La zone en grise correspond à la limite acceptable de +/- 20 % autour du rendement de 100 %. Les traits pointillés rouge mettent en évidence une diminution notable du rendement d'extraction en acétonitrile au profit de l'un ou des deux autres solvants.

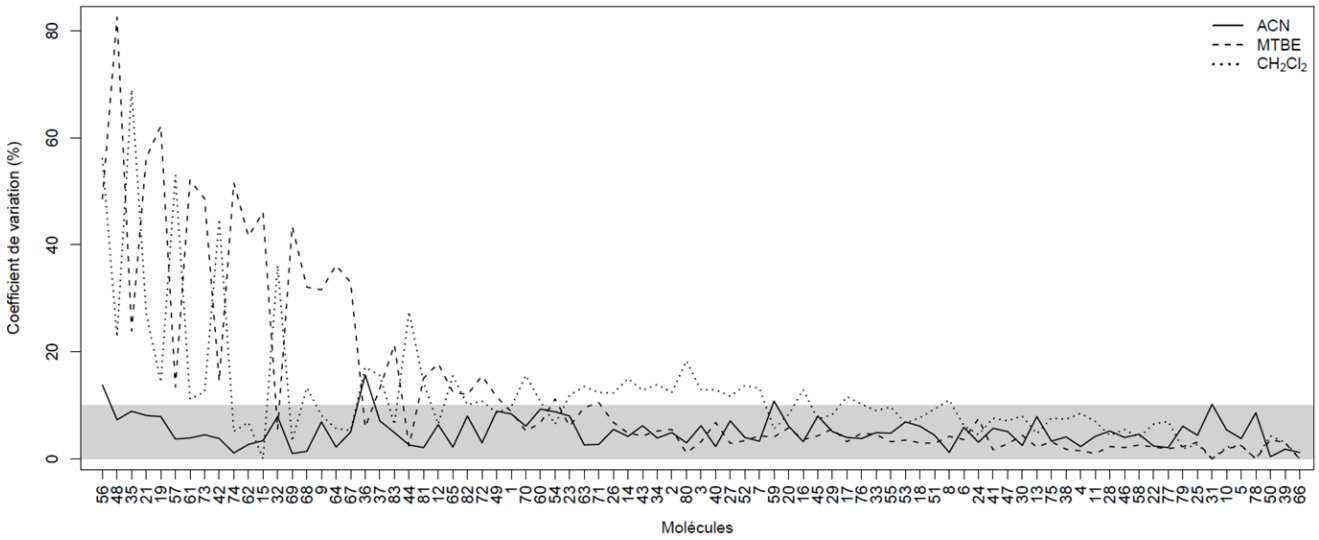



**Figure 40 : Coefficient de variation (%) pour les trois solvants testés pour chaque molécule sur la base de 24 extractions**

La zone en grise correspond à la limite acceptable de 0 à 10 % pour la répétabilité.

Compte tenu des résultats, l'acétonitrile apparaît comme le solvant le plus approprié avec un rendement d'extraction moyen de 92 % pour les 83 composés ciblés et des valeurs de coefficients de variation sur les 24 extractions analysées inférieurs à 10 % pour 96 % des molécules. De prime abord, l'acétonitrile n'apparaît pas comme un choix évident pour la réalisation d'une extraction liquide-liquide car, dans les conditions normales, il est miscible en toute proportion avec l'eau. Or, l'objectif final est de récupérer la phase organique à l'issue du mélange. Cette méthodologie est rendue possible grâce à la grande quantité de sucres présents dans le miel qui polarise la phase aqueuse qui devient non miscible avec la phase organique comme le montre la Figure 41.

Dans la Figure 39, on observe aussi une baisse brutale du rendement d'extraction pour le solvant acétonitrile pour quelques molécules marquées par des traits verticaux rouges (n° 1, 17, 25, 27, 29, 36, 50, 51 et 60). Cette baisse coïncide avec une meilleure extraction par l'un ou des autres solvants. En fait, ces molécules sont composées de structures telles que des groupements benzimidazole (n° 1, 27 et 29), amino-pyrimidine (n° 17, 25, 50 et 51) et dichlorophenyl-oxocyclopentene (n° 36 et 60) qui se solvatent mieux dans des solvants très apolaires tels que le MTBE et le $CH_2Cl_2$ comparativement à l'acétonitrile.

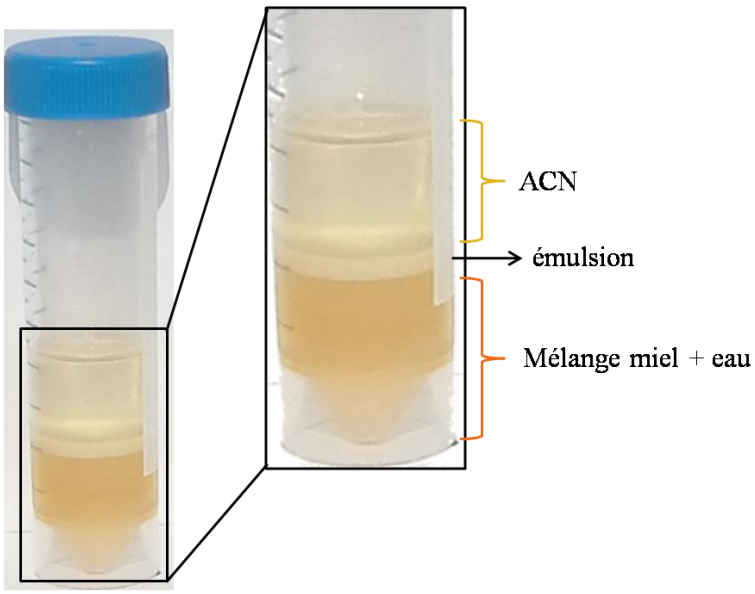



**Figure 41 : Résultat de l'extraction liquide-liquide obtenue à partir d'un mélange d'eau, de miel et d'acétonitrile (sans ajout de sels)**

L'effet matrice a été évaluée par le calcul des rapports, exprimées en % entre les aires correspondant aux molécules surchargées dans les miels extraits (expérience 2) et les aires mesurées dans les échantillons préparés en solvant. La Figure 42 montre l'effet matrice obtenu pour les 83 composés de référence. Dans notre cas, l'effet matrice a été jugé acceptable lorsque la valeur du rapport se situe entre 80 et 120 %. Les valeurs en dehors de cette gamme indique un effet matrice fort lié à une suppression à l'ionisation. Les deux tiers des composés d'intérêts ont un effet matrice entre 50 et 80 %. Ce fort effet matrice a également été décrit par Gomez-Perez et coll. [395], ce qui démontre la nécessité d'une surcharge individuelle de tous les miels en vue d'une semi-quantification.

Deux prises d'essai de 2 g et 5 g ont également été testées afin de comparer la répétabilité et la sensibilité des extractions. Une prise d'essai trop faible induit une réponse faible et des difficultés à détecter et/ou quantifier avec précision les molécules d'intérêts. A l'inverse, une quantité trop grande pourrait poser problème au niveau de l'extraction à cause d'un effet matrice trop important. Les huit miels précédents ont à nouveau été utilisés pour ces tests en utilisant les mêmes expériences 1 et 2 afin de calculer le rendement d'extraction, le coefficient de variation ainsi que l'effet matrice. Ces miels ont été extraits uniquement avec l'acétonitrile et testés à la concentration réglementaire de 10 µg/kg. Les résultats ont montré un net avantage de la prise d'essai de 5 g. Les rendements d'extraction obtenus ont été meilleurs de 10 % en moyenne sur chaque miel tout en conservant un effet matrice convenable comparativement à la prise d'essai de 2 g. Les coefficients de variation obtenus avec la prise

d'essai de 2 g ont été de l'ordre de 20-30 % sur l'ensemble des miels contre 5-10 % pour la prise d'essai de 5 g.

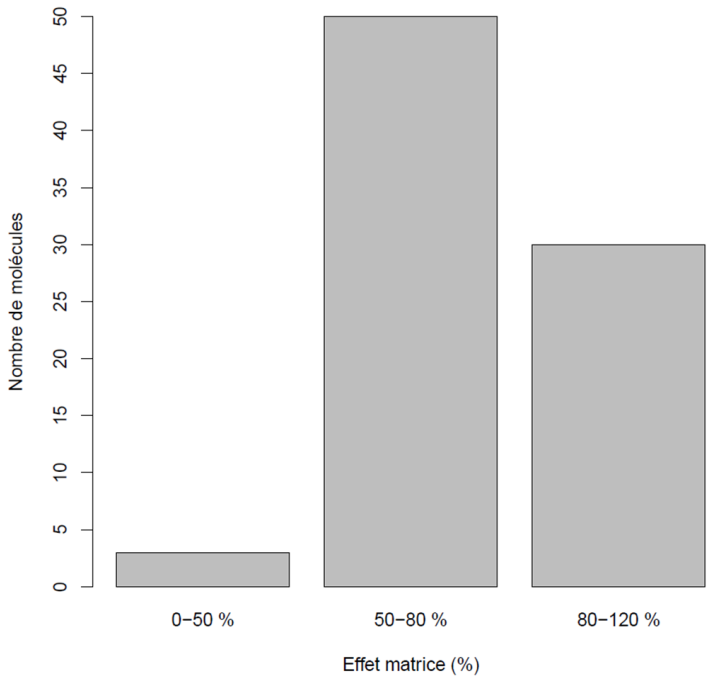



**Figure 42 : Evaluation de l'effet matrice (%) sur les 83 molécules ciblées**

Le protocole optimisé est ainsi une extraction de type QuEChERS basée sur une extraction liquide-liquide en utilisant une prise d'essai de 5 g et l'acétonitrile comme solvant extracteur. Pour une semi-quantification plus précise et compte tenu des effets matrices observés lors des expériences d'optimisation, il a été décidé de supplémenter chaque miel avec les 83 composés de référence afin d'obtenir un témoin positif le plus fidèle possible pour chaque miel analysé (Figure 43).

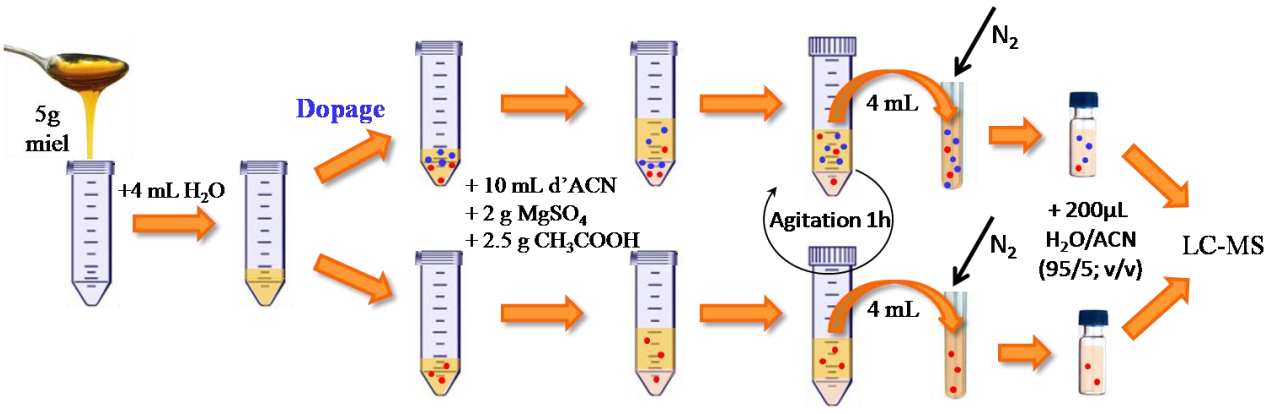



**Figure 43 : Représentation schématique du protocole optimisé pour la préparation d'échantillon de miel**

Le pouvoir de solvatation des sels (sulfate de magnésium et acétate de sodium) a été utilisé afin de diminuer la solubilité des polluants dans la phase aqueuse. Ces sels permettent aussi une séparation plus nette et plus rapide des différentes phases. Cette extraction permet de concentrer d'un facteur 10 les polluants présents dans l'échantillon.

#### II.4.1.1.5. Validation de la méthode

La méthode développée a ensuite été validée par des études de répétabilité intra-essai, par la détermination des limites de détection (LOD, de l'anglais *Limit Of Detection*) et en réalisant des gammes de linéarité en matrice. Pour cela, deux miels présentant un effet matrice fort (entre 50 et 80 %) ou faible (entre 80 et 120 %) ont été choisis afin de tester la sensibilité (LOD) et la linéarité de notre analyse sur plusieurs matrices. Une gamme de concentration en polluant entre 0,01 µg/kg et 1000 µg/kg (0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 ; 500 ; et 1000 µg/kg) a été répétée trois fois sur chaque matrice. La LOD pour chaque molécule a été déterminée pour la concentration la plus basse pour laquelle le coefficient de variation sur les aires des 3 réplicas réalisés était inférieur à 15 % pour les deux matrices. Les résultats sur le $R^2$ le plus faible des deux matrices testées, la LOD, et les limites réglementaires européennes sont consignés dans le Tableau 6.

| ID | Nom de la molécule | $R^2$ | LOD (µg/kg) | | LMR[a] (µg/kg) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | A | B | |
| 1 | 5-hydroxythiabendazole | 0,997 | 0,1 | | -[b] |
| 2 | Acetamipride | 0,992 | 1 | 1,5 | 50 |
| 3 | Albendazole | 0,991 | 1 | | -[b] |
| 4 | Aldicarb | 0,989 | 1 | | -[b] |
| 5 | Amitraze | 0,995 | 0,1 | 37,0 | -[b] |
| 6 | Atrazine | 0,996 | 0,1 | | -[b] |
| 7 | Azoxystrobine | 0,997 | 0,1 | | 10 |
| 8 | Boscalid | 0,988 | 1 | | 500 |
| 9 | Carbaryl | 0,991 | 1 | 3,8 | -[b] |
| 10 | Carbendazime | 0,999 | 0,1 | 4,0 | 1000 |
| 11 | Carbofuran | 0,998 | 0,1 | 3,8 | -[b] |
| 12 | Carfentrazone-ethyl | 0,996 | 10 | | -[b] |
| 13 | Chlorfenvinphos | 0,993 | 1 | | -[b] |
| 14 | Clothianidine | 0,992 | 10 | 2,5 | 10 |
| 15 | Coumaphos | 0,997 | 1 | 3,0 | -[b] |
| 16 | Cyproconazole | 0,993 | 0,1 | 3,5 | 50 |
| 17 | Cyprodinile | 0,992 | 0,1 | | 50 |
| 18 | Diazinon | 0,994 | 0,1 | 10,5 | -[b] |
| 19 | Dichlorvos | 0,989 | 1 | 14,6 | -[b] |

| ID | Nom de la molécule | $R^2$ | LOD (µg/kg) | | LMR[a] (µg/kg) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | A | B | |
| 20 | Difenoconazole | 0,995 | 1 | | 50 |
| 21 | Diflubenzuron | 0,995 | 10 | | -[b] |
| 22 | Dimethoate | 0,994 | 1 | 18,2 | -[b] |
| 23 | Dimethomorphe | 0,992 | 1 | | 50 |
| 24 | Dimetridazole | 0,993 | 0,1 | | -[b] |
| 25 | Diphenylamine | 0,99 | 0,1 | | -[b] |
| 26 | Febantel | 0,998 | 0,1 | | -[b] |
| 27 | Fenbendazole | 0,996 | 0,1 | | -[b] |
| 28 | Fenoxycarb | 0,997 | 1 | 4,1 | -[b] |
| 29 | Flubendazole | 0,994 | 0,1 | | -[b] |
| 30 | Flusilazole | 0,992 | 0,1 | 4,1 | -[b] |
| 31 | Fluvalinate | 0,993 | 10 | | -[b] |
| 32 | Furazolidone | 0,991 | 10 | | -[b] |
| 33 | Hexaconazole | 0,990 | 0,1 | | -[b] |
| 34 | Imidaclopride | 0,992 | 1 | 1,5 | 50 |
| 35 | Indoxacarb | 0,998 | 10 | | 20 |
| 36 | Iprodione | 0,987 | 10 | 19,5 | -[b] |
| 37 | Malathion | 0,989 | 10 | 11,7 | 20 |
| 38 | Mebendazole | 0,996 | 1 | | -[b] |
| 39 | Metalaxyl | 0,993 | 0,1 | | -[b] |
| 40 | Methoxyfenozide | 0,991 | 0,1 | | 10 |
| 41 | Metolachlore | 0,999 | 0,1 | | -[b] |
| 42 | Metronidazole | 0,996 | 1 | | -[b] |
| 43 | Myclobutanile | 0,995 | 0,1 | 32,2 | -[b] |
| 44 | Nifuroxazide | 0,994 | 10 | | -[b] |
| 45 | Oxfendazole | 0,998 | 1 | | -[b] |
| 46 | Oxibendazole | 0,997 | 0,1 | | -[b] |
| 47 | Penconazole | 0,993 | 0,1 | 13,5 | -[b] |
| 48 | Pendimethaline | 0,995 | 10 | | -[b] |
| 49 | Piperonyl-butoxide | 0,996 | 0,1 | 9,0 | -[b] |
| 50 | Pirimiphos-ethyl | 0,997 | 0,1 | | -[b] |
| 51 | Pirimiphos-methyl | 0,992 | 0,1 | | -[b] |
| 52 | Prochloraze | 0,990 | 1 | 11,4 | -[b] |
| 53 | Propiconazole | 0,999 | 0,1 | | 10 |
| 54 | Pyraclostrobine | 0,995 | 1 | | 50 |
| 55 | Pyrimethanile | 0,999 | 0,1 | | 50 |
| 56 | Pyriproxifen | 0,996 | 10 | 4,3 | 50 |
| 57 | Ronidazole | 0,994 | 10 | | -[b] |
| 58 | Simazine | 0,999 | 0,1 | | -[b] |
| 59 | Spinosade | 0,989 | 10 | | 10 |
| 60 | Spirodiclofene | 0,991 | 10 | | 20 |
| 61 | Sulfachloropyridazine | 0,996 | 1 | | -[b] |
| 62 | Sulfadiazine | 0,995 | 1 | 3,0 | -[b] |

| ID | Nom de la molécule | $R^2$ | LOD (µg/kg) | | LMR[a] (µg/kg) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | A | B | |
| 63 | Sulfadimethoxine | 0,994 | 1 | 3,1 | -[b] |
| 64 | Sulfamerazine | 0,993 | 1 | 5,1 | -[b] |
| 65 | Sulfamethazine | 0,991 | 1 | | -[b] |
| 66 | Sulfamethizole | 0,992 | 1 | 6,0 | -[b] |
| 67 | Sulfamethoxazole | 0,998 | 1 | 6,3 | -[b] |
| 68 | Sulfamethoxypyridazine | 0,996 | 1 | | -[b] |
| 69 | Sulfamonomethoxine | 0,993 | 1 | 6,0 | -[b] |
| 70 | Sulfaphenazole | 0,994 | 1 | | -[b] |
| 71 | Sulfapyridine | 0,992 | 1 | | -[b] |
| 72 | Sulfaquinoxaline | 0,990 | 10 | 3,0 | -[b] |
| 73 | Sulfathiazole | 0,992 | 1 | 2,2 | -[b] |
| 74 | Sulfisoxazole | 0,994 | 1 | | -[b] |
| 75 | Tebuconazole | 0,998 | 0,1 | 12,8 | 50 |
| 76 | Tebufenozide | 0,999 | 0,1 | | 50 |
| 77 | Tebuthiuron | 0,996 | 0,1 | | -[b] |
| 78 | Tetramethrine | 0,989 | 10 | | -[b] |
| 79 | Thiabendazole | 0,993 | 0,1 | | -[b] |
| 80 | Thiaclopride | 0,994 | 1 | 1,5 | 200 |
| 81 | Thiamethoxam | 0,996 | 0,1 | 1,5 | 10 |
| 82 | Trifloxystrobine | 0,998 | 1 | | 40 |
| 83 | Trimethoprime | 0,999 | 0,1 | | -[b] |

**Tableau 6 : Tableau référençant les informations sur le $R^2$ de la gamme de linéarité, la LOD de notre méthode comparaitivement à la littérature ainsi que la LMR des molécules.**

[a] : Limite Maximale de Résidus (consulté sur le site internet http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/), [b] : pas de données disponibles). LOD (µg/kg) A : de la méthode développée et B d'une revue de la littérature en LC ou GC-MS/MS sur le miel [394,396,419]

Grâce à cette validation, on voit que la linéarité obtenue en matrice est supérieure à 0,99 pour 99 % des molécules ciblées, ce qui montre que le protocole développé permet une extraction proportionnelle à la quantité présente dans la matrice. Les sensibilités atteintes grâce à notre analyse sont toutes en deçà des limites réglementaires fixées par les instances européennes. La sensibilité obtenue est globalement meilleure que celle obtenue sur des instruments de type triple quadripoles fonctionnant en mode MRM, comme le montre la comparaison avec les valeurs de LOD publiées sur le miel (colonne B du Tableau 6).

### II.4.1.2. Résultats de l'analyse ciblée des échantillons de miel

L'identification des molécules dans les échantillons de miels a été réalisée sur la base de plusieurs critères. Le temps de rétention du pic chromatographique a été comparé avec celui du composé de référence dans une fenêtre de temps de rétention de +/- 0,15 minutes. La masse précise mesurée pour l'analyte a été comparée à la masse précise du composé de référence et ne doit pas dévier de plus de +/- 5 ppm. Le massif isotopique a également été inspecté ainsi que l'augmentation de l'aire chromatographique dans l'échantillon surchargé avec les composés de références.

L'exemple décrit en Figure 44 traite de la détection du boscalid dans deux blancs analytiques, 3 réplicas d'un même miel non dopés et 3 réplicas du même miel surchargé. Nos résultats montrent que ce miel est pollué au boscalid. On constate un temps de rétention aligné entre les 3 réplicas dopés et les réplicas non dopés ainsi qu'une augmentation de l'aire dans les échantillons surchargés. Le massif isotopique du boscalid est très caractéristique car il possède deux chlores et permet de conclure quant à la présence de ce polluant dans le miel analysé. Dans cet exemple, l'identification du boscalid est basée sur l'utilisation de 3 paramètres orthogonaux : le temps de rétention, la masse précise et le massif isotopique caractéristique et superposable à celui du standard. Ces données nous ont permis également de donner un ordre de grandeur des quantités détectées dans le miel en réalisant un calcul de proportionnalité par rapport au contrôle positif. Ainsi dans cet exemple, la quantité estimée de boscalid était de 0,8 µg/kg. L'aire moyenne dans les échantillons est approximativement 10 fois inférieure à l'aire moyenne dans les échantillons dopés de miel à la concentration réglementaire de 10 µg/kg.

L'ensemble des 76 miels a été inspecté manuellement sur le même principe en vue de l'analyse ciblée des 83 polluants sélectionnés. La banque de données spectrales contenant les ions caractéristiques de chaque molécule a été très utile à ce stade pour rechercher et confirmer la présence des molécules dans le miel. Lorsque les éléments dosponibles n'étaient pas suffisants (comme par exemple, la présence d'un pic chromatographique aligné avec celui du standard à la masse exacte extraite mais pas de massif isotopique caractéristique), l'ion en question a systématiquement été fragmenté lors d'une nouvelle expérience afin de le comparer avec le spectre MS/MS du standard. Les résultats de l'analyse ciblée ont montré que 74 des 76 miels analysés sont contaminés avec au moins une molécule parmi les 83 xénobiotiques sélectionnés.

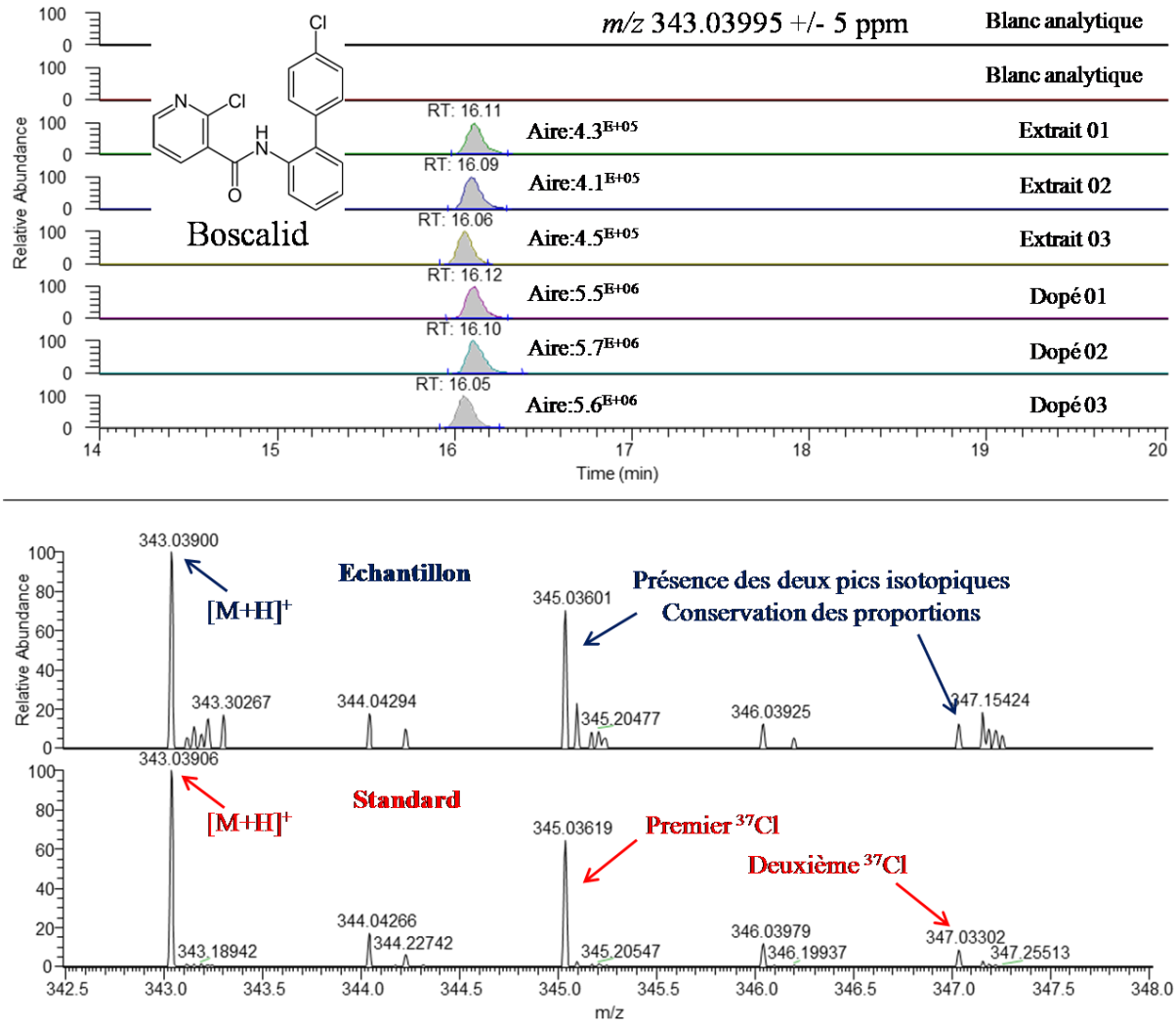



**Figure 44 : Identification du boscalid dans un échantillon de miel**

La Figure 45 montre le nombre de molécules détectées dans chaque miel. Une distribution bimodale semble se dessiner avec un maximum en deux points correspondant à 2 et 7 molécules par miel. Des classifications du nombre de molécules retrouvées dans chaque miel en fonction des métadonnées comme le pays, l'origine florale ou le label ont été effectuées mais n'ont pas montré de corrélations significatives. Nos analyses montrent qu'en nombre de molécules détectées, les miels issus de l'agriculture biologique n'ont pas moins de pollution que les miels non biologiques.

Les deux miels, dans lesquels aucune molécule n'a été retrouvée sont issus de l'agriculture biologique et viennent d'Australie et du Mexique. Ainsi, deux hypothèses s'opposent : (i) soit ces miels sont effectivement exempts de toute pollution organique liées par exemple à des lieux de production préservés de l'activité humaine soit (ii) les pesticides et médicaments utilisés dans les régions de production de ces miels sont absents de la liste de molécules ciblées.

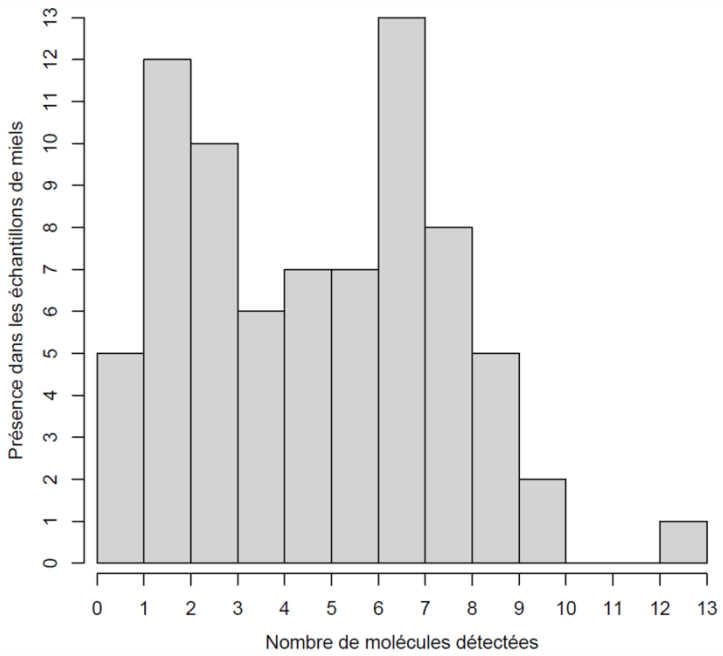



**Figure 45 : Histogramme représentant le nombre de molécules retrouvés dans les miels**

La Figure 46 donne le nom des xénobiotiques détectés ainsi que leur présence dans les échantillons de miel. On constate que 35 des 83 molécules ciblées ont été détectées,, dont 9 antibiotiques et 27 pesticides. Toutes ces molécules ne sont pas nécessairement rencontrées par l'abeille à l'extérieur de la ruche. Il peut s'agir de résidus provenant de traitement à de fortes doses appliqués par des apiculteurs qui uilisent des molécules détournées de leur utilisation prévue. Ainsi, les trois composés les plus fréquemment retrouvés ont été le carbendazime, l'amitraz et le chlorfenvinphos (avec 70, 59 et 35 fois sur 76). Le carbendazime est un fongicide appartenant à la famille des carbamates couramment utilisé dans les cultures de céréales et de fruits, ce qui pourrait expliquer leur fréquence. Il a toutefois été interdit dans l'Union européenne depuis 2009 [420] et pourrait être rémanent. L'amitraz est un acaricide appartenant à la famille de formamifines. Il est très souvent utilisé par les apiculteurs eux-mêmes pour protéger leurs ruches contre le *Varroa Destructor* qui infeste et décime les colonies (Figure 47). Le chlorfenvinphos est un insecticide et un acaricide de la famille des composés organophosphorés. Il a été principalement utilisé contre les larves de mouches dans les élevages de poulet et de bœuf [421]. En raison de sa toxicité, il a été interdit dans l'Union européenne en 2007. Cependant, certains apiculteurs continuent de l'utiliser malgré l'interdiction afin de lutter contre le *Varroa*, car il est plus efficace que l'amitraz [422]. Nos résultats fournissent un ordre de grandeur de la quantité présente dans les miels et montrent qu'aucun xénobiotique n'a été retrouvé à des concentrations supérieures aux seuils réglementaires de l'Union Européenne.

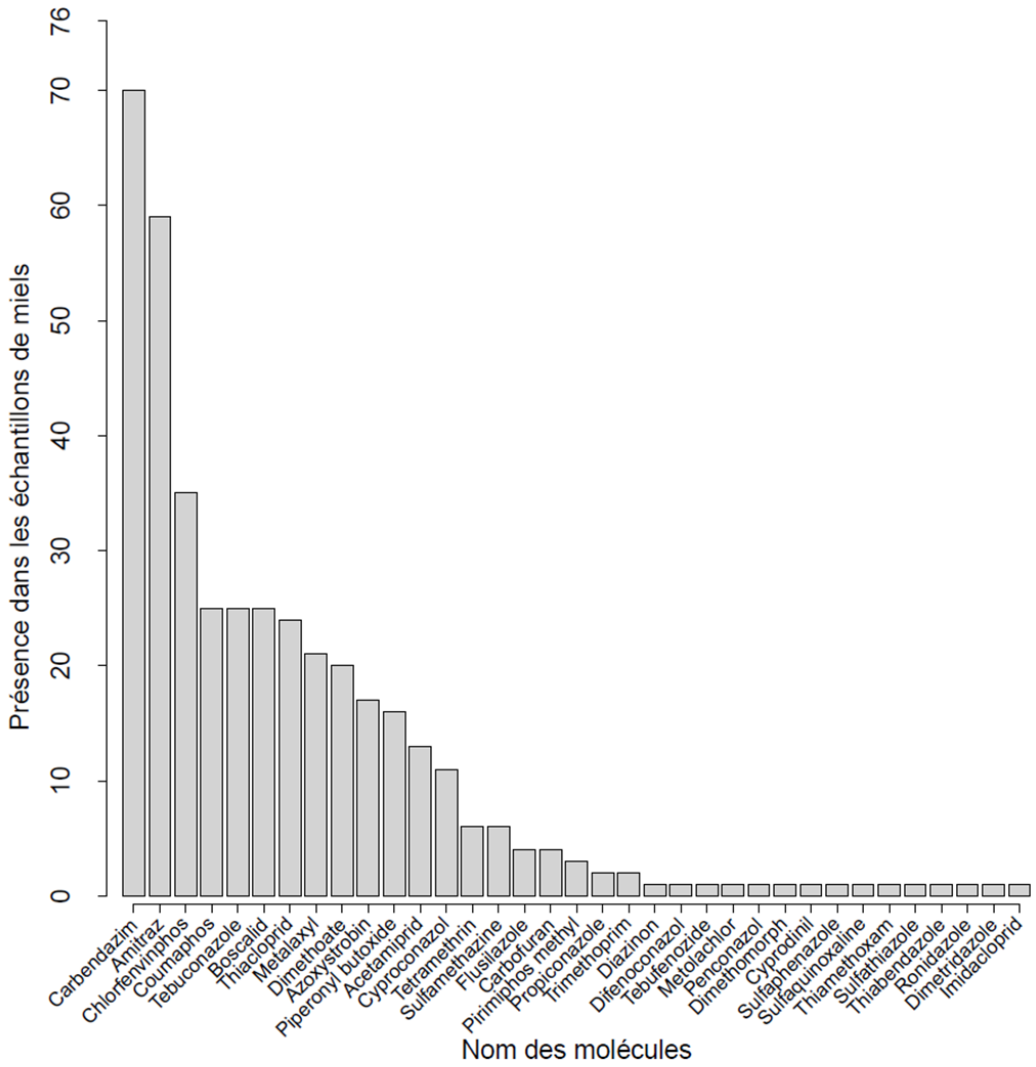



**Figure 46 : Représentation du nombre de miels dans lequel chaque molécule a été retrouvée**

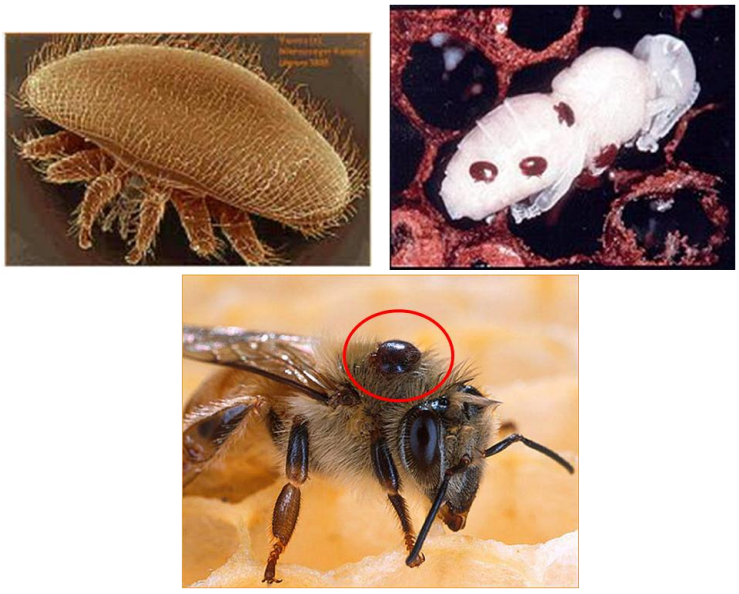


**Figure 47 : Illustration du Varroa Destructor, parasite des abeilles (sur les larves ou les abeilles)**

### II.4.2. Analyses globales réalisées à partir des empreintes LC-HRMS

Contrairement aux données acquises sur un spectromètre de masse de type triple quadripôle fonctionnant en mode MRM, les données acquises sur des systèmes HRMS peuvent être soumises à des procédures de fouille de données afin de mettre en évidence des informations non anticipées. Ce type de recherche est traditionnellement utilisé pour la compréhension des systèmes biologiques ou la recherche de biomarqueurs. Dans cette étude de preuve de concept, l'accent a été mis sur la pertinence d'une telle approche pour la détection de xénobiotiques inattendus et une caractérisation chimique plus fine des miels.
Les données brutes ont été traitées en utilisant le logiciel XCMS. A ce stade, une vérification du bon déroulement du processus de détection automatique des signaux XCMS a été réalisée. Pour cela, une comparaison des temps de rétention et des aires chromatographiques obtenus par XCMS et par une intégration manuelle sur le module QuanBrowser (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) a été réalisée sur les molécules détectées dans les 76 miels (400 cas positifs environ). La concordance des résultats ($R^2$ = 0,99) des deux approches montre que le processus XCMS permet un recouvrement et une intégration juste des signaux dans les données brutes. La matrice XCMS obtenue a ensuite été utilisée pour une recherche des composés inconnus ou non suspectés, ou pour la réalisation d'analyses statistiques multivariées.

#### II.4.2.1. Détection de xénobiotiques inattendus ou inconnus

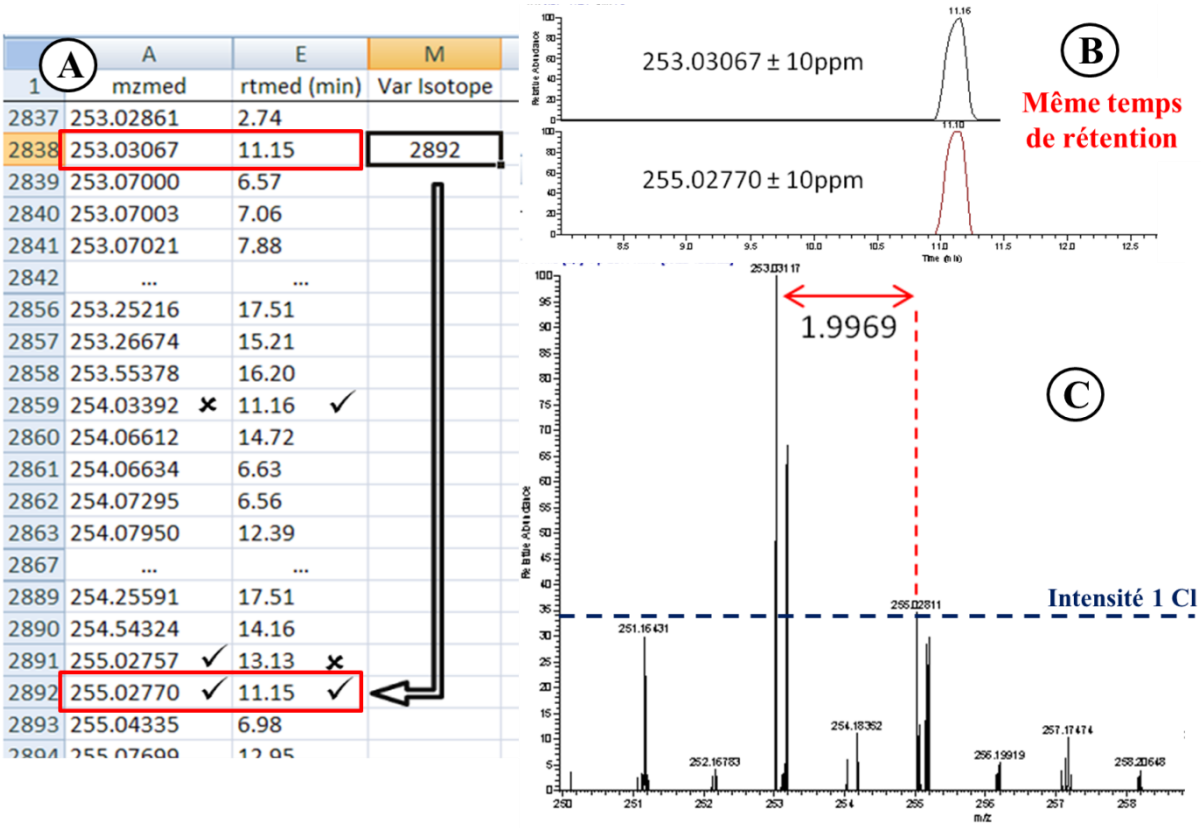
D'une manière générale, la distinction entre les signaux liés aux métabolites de la matrice étudiée comme les substances organiques d'origine naturelle provenant du métabolisme de l'organisme vivant producteur de la ressource et les xénobiotiques dans l'empreinte chimique acquise par LC-HRMS est une question clé. Cette question a été abordée au début des années 2000 dans le cadre d'une analyse chimio-informatique qui décrit les métabolites présents dans les bactéries *E. Coli* répertoriés dans les bases de données Ecocyc et KEGG à l'aide des fragments retrouvés dans l'empreinte chimique et des descripteurs basés sur les propriétés physico-chimiques [423]. D'autres études comme celles de Gupta et coll. [424], Dobson et coll. [425] et Peironcely et coll. [426] ont ensuite été publiées sur le sujet. L'exemple développé par Peironcely et coll. est particulièrement intéressant. Il a constaté certaines tendances à la discrimination entre les métabolites et les « non-métabolites » à l'aide d'ACP (*Analyse en Composantes Principales*). Cette discrimination s'est basée sur le fait que les métabolites ont tendance à avoir une meilleure solubilité dans l'eau, une masse moléculaire plus faible et un moins grand nombre d'atomes de carbone, d'azote et de soufre et une

diminution du nombre de cycle que les molécules considérés comme « non-métabolites » (hypothétiquement des produits de transformation ou des xénobiotiques).

Cependant, il apparaît difficile, sur la base de ces études, d'établir des règles pour distinguer les signaux issus de métabolites ou de xénobiotiques dans une empreinte LC-HRMS complexe. Le fait que les xénobiotiques puissent être métabolisés par les organismes vivants ou dégradés dans l'environnement, ajouté à la difficulté de générer automatiquement des compositions élémentaires pertinentes à partir des masses précises mesurées et ce, en dépit de la disponibilité des produits chimiques de référence et des règles chimiques et empiriques [427], complique encore la tâche.

Dans cette étude de preuve de concept, nous avons décidé de mettre l'accent sur des composés chlorés. Dans la nature et dans les milieux biologiques, l'atome de chlore se présente principalement sous forme de chlorure de sodium. Les composés organiques contenant du chlore proviennent surtout de l'activité industrielle humaine (médicaments, biocides ou produits industriels). On peut donc considérer une molécule organique chlorée présente dans le miel comme un probable marqueur de xénobiotique ou métabolite de xénobiotique (« xénométabolite »). A titre d'exemple, 35 % des 83 composés ciblés précédemment contiennent au moins un atome de chlore. Les composés chlorés peuvent être facilement et sélectivement détectés dans les milieux biologiques en utilisant des instruments de type haute résolution. En effet, le chlore présente une signature isotopique particulière liée à l'abondance naturelle de ses deux isotopes stables : $^{35}Cl$ et $^{37}Cl$, ce dernier ayant une abondance relative de 33 % par rapport au premier. Ces deux isotopes sont par ailleurs distants de 1,9970 u (pour les ions monochargés z = 1). Nous avons donc développé un algorithme écrit en langage R pour mettre en évidence des couples d'ions espacés de 1,9970 +/- 0,0010 u et ayant le même temps de rétention (à +/- 5 secondes) dans la table de pics générée par XCMS (Figure 48).

Sur ce principe et pour rechercher des molécules chlorées dans les échantillons de miels, une table de pics pour chaque miel a été générée avec XCMS. En effet, le rapport masse sur charge et le temps de rétention d'une variable sont des valeurs moyennes obtenues à partir de l'ensemble des miels contenus dans la table de pics. Ceux-ci seront donc plus précis dans une table de pics contenant les 3 réplicas d'un seul miel plutôt que dans une table de pics contenant les 3 réplicas de tous les miels. Ces tables de pics ont ensuite été annotées par les bases de données publiques (KEGG, HMDB et METLIN) et traitées par notre algorithme de recherche de chlore. Les variables ainsi mises en évidence dans les 76 tables de pics ont ensuite été fusionnées, ce qui a conduit à l'obtention d'une table de pics contenant 25 000 éléments.




| | A | E | M |
|---|---|---|---|
| 1 | mzmed | rtmed (min) | Var Isotope |
| 2837 | 253.02861 | 2.74 | |
| 2838 | 253.03067 | 11.15 | 2892 |
| 2839 | 253.07000 | 6.57 | |
| 2840 | 253.07003 | 7.06 | |
| 2841 | 253.07021 | 7.88 | |
| 2842 | ... | ... | |
| 2856 | 253.25216 | 17.51 | |
| 2857 | 253.26674 | 15.21 | |
| 2858 | 253.55378 | 16.20 | |
| 2859 | 254.03392 ✗ | 11.16 ✓ | |
| 2860 | 254.06612 | 14.72 | |
| 2861 | 254.06634 | 6.63 | |
| 2862 | 254.07295 | 6.56 | |
| 2863 | 254.07950 | 12.39 | |
| 2867 | ... | ... | |
| 2889 | 254.25591 | 17.51 | |
| 2890 | 254.54324 | 14.16 | |
| 2891 | 255.02757 ✓ | 13.13 ✗ | |
| 2892 | 255.02770 ✓ | 11.15 ✓ | |
| 2893 | 255.04335 | 6.98 | |

**Figure 48 : Illustration du fonctionnement de l'algorithme pour la recherche automatique de xénobiotiques chlorés dans la table de pics XCMS**

Etape A : l'algorithme créé associe deux variables (les lignes 2838 et 2892) encadrées en rouge sur la table de pics XCMS, leur différence de masse étant de 1,9970 u et leur temps de rétention identique. Etape B : Une confirmation est obtenue sur la donnée brute avec le tracé des chromatogrammes des deux rapports *m/z* avec des formes de pic identiques. Etape C : Sur le spectre de masse, on observe deux pics distants de 1,9969 avec un rapport d'intensité de 33 %, ce qui correspond à une molécule possédant 1 chlore.

Nous ne nous attendions pas à autant de variables positives et traduisant la présence potentielle de molécules chlorées. Nous avons vérifié le bien-fondé de cet algorithme en recherchant l'ensemble de molécules chlorées retrouvées lors de l'analyse ciblée. Il est à noter que 97 % des cas positifs de miel pollué par les 9 molécules chlorées de l'analyse ciblée ont été retrouvées dans cette table de pics. En raison du nombre élevé des variables, une inspection manuelle a été limitée aux 1300 les plus intenses car elles présentent moins de risque d'être artefactuelles. Ces 1300 variables ont été regroupées en 143 groupes sur la base des rapports *m/z* pour repérer les molécules communes retrouvées à tous les miels et sur les couples $^{35}Cl$ et $^{37}Cl$. Seuls 20 %, soit 28 groupes, ont été confirmés comme des ions correspondant à des molécules chlorées. Sur 28 groupes, 13 d'entre eux ont été annotés comme composés chlorés, les autres variables étant des artefacts générés par le processus automatique de détection des pics XCMS. L'inspection d'une partie de la table de pics a

montré que trop de faux positifs sont annotés par l'algorithme en utilisant seulement les critères du temps de rétention et la différence de masse exacte.

D'autres critères ont ensuite été appliqués : (i) l'abondance relative de l'ion $^{37}Cl$ doit être comprise entre 20 % et 120 % de l'ion $^{35}Cl$ assurant ainsi la détection de molécules portant 1 à 4 atomes de chlore, (ii) un temps de rétention supérieur à 90 secondes afin d'éviter les faux positifs en raison du nombre important de molécules présentes dans le volume mort, (iii) l'aire du pic chromatographique de l'ion monoisotopique doit être supérieur à $10^6$ U.A. (*Unité Arbitraire*) et (iv) un ratio de l'aire de l'échantillon (la moyenne des 3 réplicas par miel) sur la moyenne des blancs supérieur à un facteur 3. A l'aide de ces nouveaux critères, seules 4 molécules chlorées (thiacloprid, imidacloprid, cyproconazole et tébuconazole) sur les 9 détectées dans l'analyse ciblées ont été retrouvées. Cependant, le nombre de variables mises en évidence par l'algorithme a été beaucoup plus faible permettant ainsi un contrôle manuel. Cela a conduit à la détection de 18 nouveaux composés chlorés présents dans au moins un échantillon de miel en plus des 4 composés chlorés qui faisaient partie de la liste ciblée.

Nous avons ensuite recherché ces 18 molécules chlorées dans une table de pics plus exhaustive. Pour cela, une table de pic générée par XCMS sur la base des 228 échantillons (les 76 miels analysés en 3 réplicas) a été utilisée afin de confirmer la présence des 18 molécules dans un maximum de miels. Cela a conduit à la confirmation de 12 molécules chlorées parmi les 18 précédentes dont 10 sont présentes dans au moins 10 miels différents (Tableau 7).

| ID | m/z | RT (min) | Interpretation | Présence dans les échantillons de miels (origine) | Identification* |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 189,9817 | 7,9 | 2,6-dichlorobenzamide ($C_7H_5ONCl_2$) | 6 (lavande) | Identifiée (a, b, c) |
| 2 | 236,1407 | 12,5 | $C_{11}H_{22}NO_2Cl$ | 70 (divers) | a, e |
| 3 | 243,0971 | 2,9 | $C_5H_{15}N_6O_3Cl$ | 15 (divers) | a, e |
| 4 | 253,0308 | 11,2 | Thiacloprid ($C_{10}H_9N_4SCl$) | 20 (divers) | Identifiée (a, b, c) |
| 5 | 256,0598 | 9,6 | Imidacloprid ($C_9H_{10}N_5O_2Cl$) | 1 (mille fleurs) | Identifiée (a, b, c) |
| 6 | 277,1069 | 13,7 | $C_{10}H_{17}N_4O_3Cl$ | 1 (mille fleurs) | a, e |
| 7 | 277,2158 | 12,5 | $C_{13}H_{29}N_4Cl$ | 13 (divers) | a, e |
| 8 | 284,0834 | 6,0 | $C_{11}H_{19}NO_3Cl_2$ | 38 (divers) | a, e |
| 9 | 292,1204 | 15,3 | Cyproconazole ($C_{15}H_{18}N_3OCl$) | 9 (divers) | Identifiée (a, b, c) |
| 10 | 308,1520 | 16,3 | Tebuconazole ($C_{16}H_{22}N_3OCl$) | 30 (divers) | Identifiée (a, b, c) |

| ID | m/z | RT (min) | Interpretation | Présence dans les échantillons de miels (origine) | Identification* |
|---|---|---|---|---|---|
| 11 | 325,1255 | 9,4 | $C_{17}H_{22}N_2\ Cl_2$ | 39 (divers) | a, e |
| 12 | 341,0610 | 12,7 | $C_{11}H_{18}N_4O_2S\ Cl_2$ | 56 (divers) | a, e |
| 13 | 347,1973 | 16,5 | $C_{18}H_{31}O_4Cl$ | 48 (divers) | a, e |
| 14 | 357,1520 | 8,5 | $C_{12}H_{25}N_4O_6Cl$ | 38 (divers) | a, e |
| 15 | 369,1526 | 9,7 | U50488 ** ($C_{19}H_{26}N_2OCl_2$) | 15 (divers) | a, e |
| 16 | 387,1622 | 9,9 | $C_{17}H_{27}N_4O_2SCl$ | 47 (divers) | a, e |

**Tableau 7 : Liste des xénobiotiques chlorés détectés dans les échantillons de miel**

* a : composition élémentaire, b : temps de rétention en accord avec celui du composé de référence, c : spectre MS/MS en accord avec celui du composé de référence, d : spectre MS/MS en accord avec une hypothèse de structure, e : expérience MS/MS réalisée.
** Hypothèse structurale obtenue à partir de la base de données Scifinder (CAS, Colombus, USA) sur la base de la composition élémentaire.

La composition élémentaire extrapolée à partir du massif isotopique pour la détermination du nombre d'atomes de chlore ainsi que les spectres MS/MS ont été obtenus avec succès pour ces 12 composés. Au-delà des 4 molécules identifiées car préalablement ciblées, seuls deux structures ont pu être proposées sur la base de l'interprétation MS/MS. Le spectre CID du composé n°15 a été comparé avec la structure du U50488, un composé présent dans la base de données Scifinder (CAS, Colombus, USA) tandis que le composé n°1 a été identifié comme le 2,6-dichlorobenzamide en faisant correspondre son temps de rétention, la masse précise mesurée, le massif isotopique et le spectre CID avec ceux du composé de référence qui est commercialement disponible (Figure 49).

Fait intéressant, cette molécule est le métabolite du dichlobénil, un herbicide qui ne faisait pas partie de notre liste de xénobiotiques et qui a été largement utilisé dans les plantations de lavande et lavandin jusqu'à son interdiction en France en 2010. C'est peut-être la raison pour laquelle le dichlobénil n'est retrouvé que dans les miels de lavande. Les autres molécules caractéristiques n'ont, à ce jour, pas pu être identifiées avec les banques de données publiques comme HMDB, KEGG ou METLIN. Il peut s'agir de métabolites inconnus ou de produits de dégradation. Un algorithme comme MetFrag [428] pourrait être utilisé pour découvrir les structures de ces composés. Quoiqu'il en soit, la présence de nombreux composés chlorés dans le miel montre le succès de notre preuve de concept.

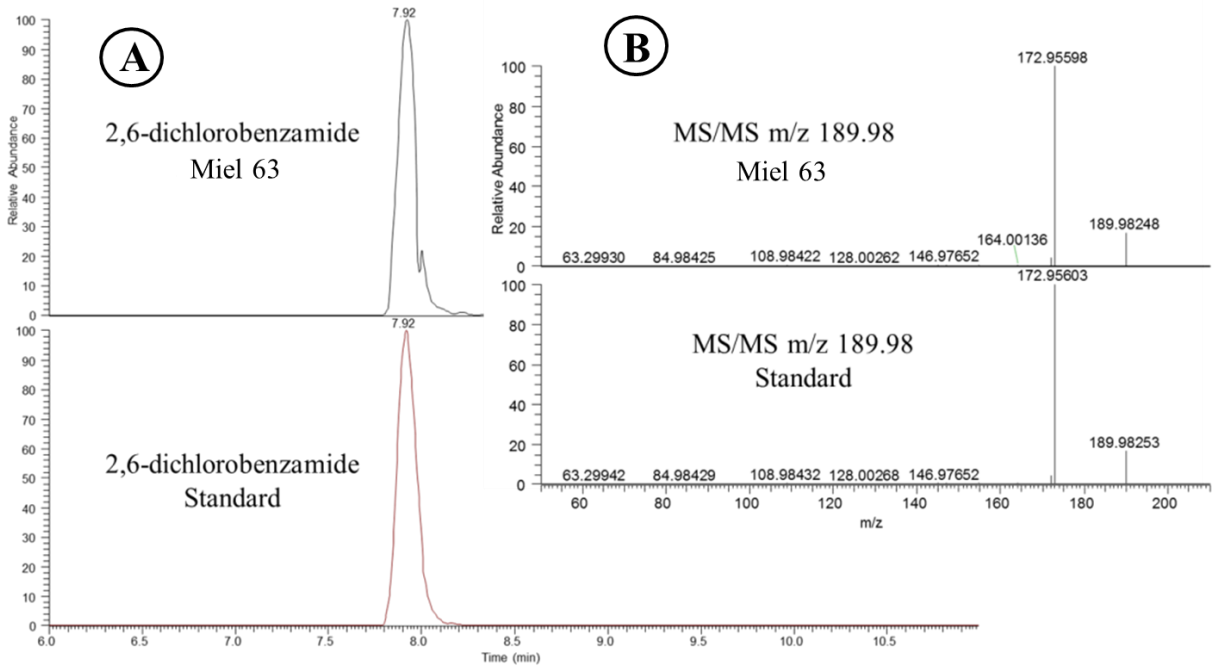



**Figure 49 : Identification du 2,6-dichlorobenzamide dans le miel de lavande n°63 (extraction réalisée : $[M+H]^+$ à *m/z* 189,9821 +/- 8 ppm)**

A : Chromatogrammes et B : Spectres MS/MS

### II.4.2.2. Caractérisation chimique du miel

En plus de la détection de contaminants chimiques et/ou de leurs métabolites, nous voulions aussi démontrer que la LC-HRMS associée à des techniques de fouille de données, est susceptible d'améliorer la caractérisation chimique des échantillons de miel. Nous nous sommes attachés dans cette étude à découvrir des biomarqueurs de l'origine florale qui pourraient aider à détecter des fraudes, sachant que l'origine botanique est actuellement réalisée à l'aide de méthodes traditionnelles, subjectives et requérant une haute qualification.

Pour cela, nous avons utilisé la table de pic générée par XCMS pour les 76 types de miels préalablement utilisée pour la recherche de composés inconnus ou inattendus. Cette table de pic contenait 121 000 variables et 300 échantillons (c'est-à-dire 76 miels analysés en 3 réplicas et 72 blancs analytiques). Cette table a été filtrée selon la procédure expliquée dans la section expérimentale afin de conserver 42 500 signaux analytiquement pertinents en termes de répétabilité, de robustesse et de seuil par rapport aux blancs analytiques.

Les données ont tout d'abord été log-transformées et centrées. La carte factorielle sur les individus présentés en Figure 50 montre une discrimination nette entre les miels monofloraux (acacia, lavande et oranger) et multi-fleurs (mille fleurs et montagne) à l'exception des échantillons de miel d'eucalyptus pour lequel l'échantillonnage était trop faible (n = 4).

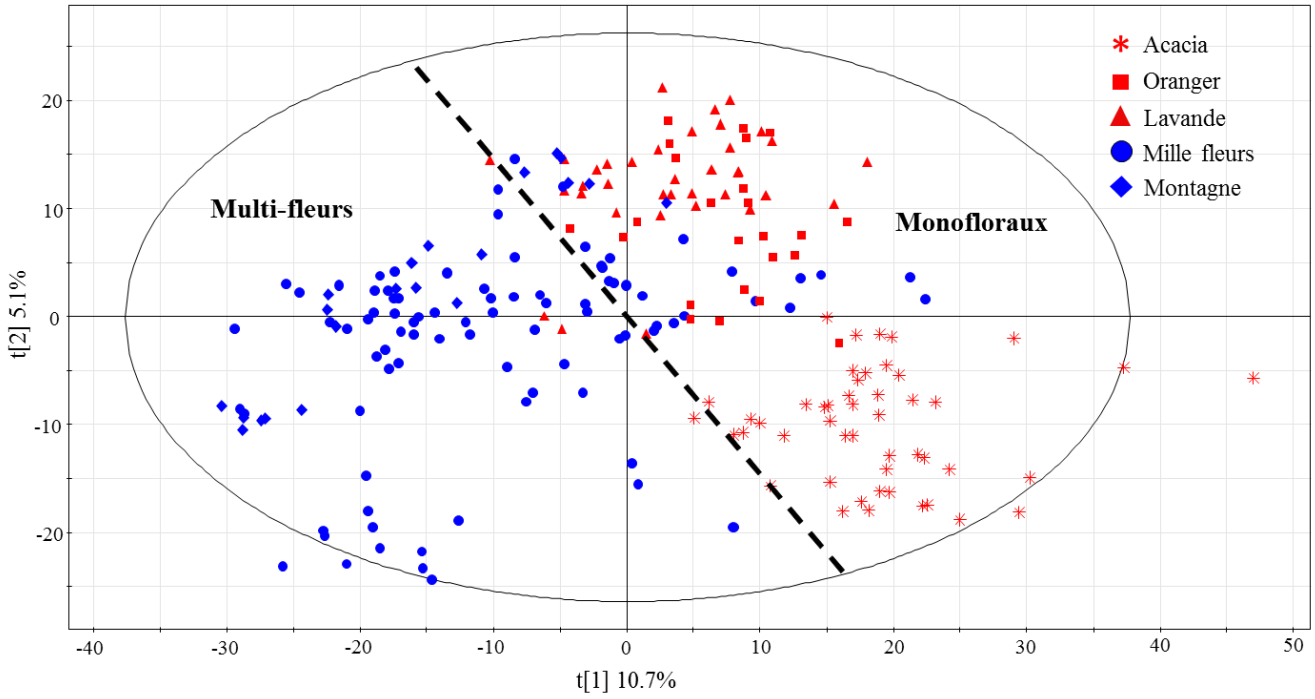



**Figure 50 : ACP sur les échantillons de miels (hors eucalyptus)**

Les échantillons de miel correspondant à mille-fleurs (●) et montagne (♦) sont de couleur bleue, tandis que les échantillons de miel correspondant à acacia (*), oranger (■) et lavande (▲) sont de couleur rouge.

Ce résultat a été confirmé par PLS-DA, dont la représentation selon les miels est présentée en Figure 51. Ce modèle PLS-DA a été validé en utilisant la fonction de validation croisée du logiciel SIMCA P11 qui réalise des tests de permutations des étiquettes de données (k = 500) selon la première composante, le but étant de vérifier la décroissance des performances du modèle. Le paramètre R2 (Y) correspond à la proportion de la variance expliquée par le modèle et traduit la qualité de l'ajustement tandis que Q2 (cumulé) exprime la proportion cumulée des prédictions correctes et représente la capacité de prédiction du modèle. On voit que la permutation des étiquettes de données, ou l'appartenance à un groupe, entre les miels multi-fleurs et monofloraux diminue de manière spectaculaire la performance du modèle, confirmant sa validité (Figure 52).

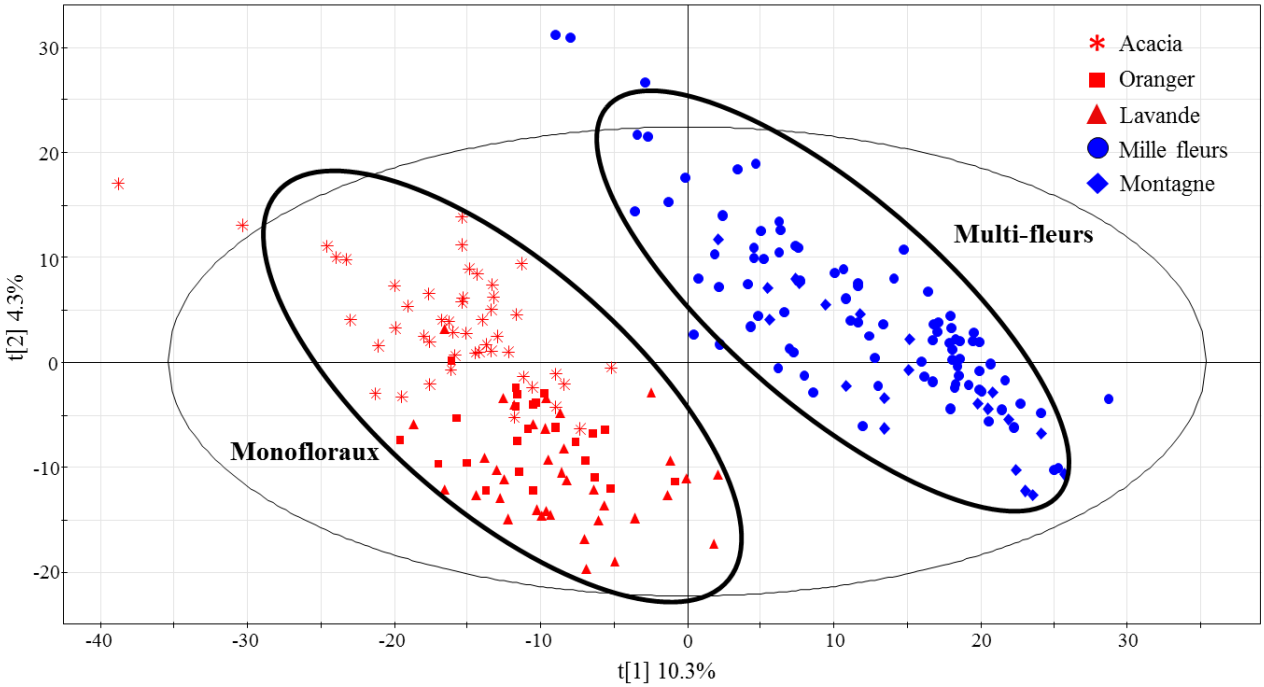



**Figure 51 : PLS-DA sur les échantillons de miels (hors eucalyptus)**

Les miels monofloraux (acacia, lavande et oranger) et multi-fleurs (mille fleurs, montagne) sont de couleur rouge et bleue respectivement.

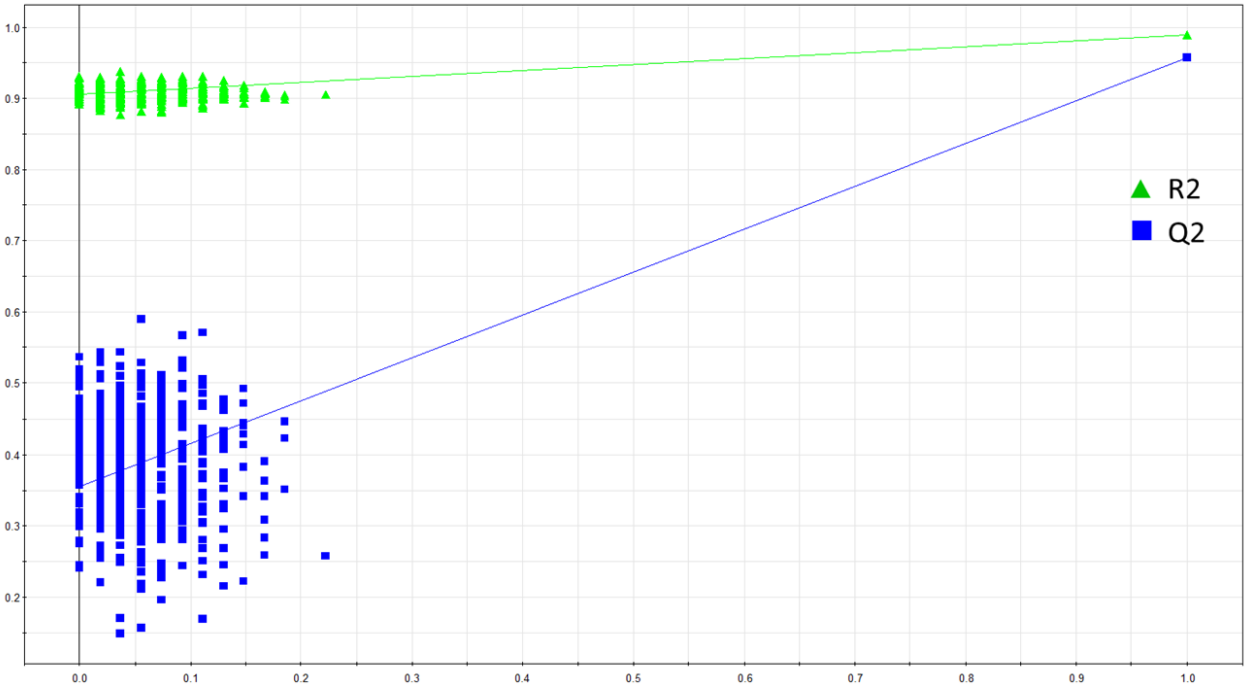



**Figure 52 : Modèle de validation du modèle PLS-DA par des tests de permutations**

Les variables présentant un score VIP (de l'anglais *Variable Importance on the Projection*) dans le logiciel SIMCA P11 supérieur à 2 ont été annotées en utilisant les bases de données publiques telles que KEGG, HMDB et METLIN. Six des variables les plus significatives

annotées (VIP > 2) ont été sélectionnés. Leur significativité a été confirmée par le test de Wilcoxon avec un risque α = 5 % après vérification de l'hypothèse de normalité avec le test de Shapiro-Wilk avec un risque α = 5 %. Les représentations de type boîtes à moustaches de ces six variables sont affichées avec les p-value calculée par le test de Wilcoxon (Figure 53). Cinq des six variables ont été putativement identifiées grâce à leurs masses exactes et une structure compatible avec leur spectre MS/MS (Tableau 8). Enfin, une molécule sur la base d'une flavone a été proposée sans pouvoir situer les ramifications.

| Variable | m/z | RT (min) | Interprétation | Identification* |
|---|---|---|---|---|
| X36800 | 232,15433 | 5,5 | Methyl 2-(2-ethoxyacetamido)-2-methylpentanoate ou Methyl 2-(2-ethoxyacetamido)-4-methylpentanoate | a,d |
| X36809 | 232,15433 | 5,7 | Methyl 2-(2-ethoxyacetamido)-2-methylpentanoate ou Methyl 2-(2-ethoxyacetamido)-4-methylpentanoate | a,d |
| X42700 | 256,11795 | 1,6 | N-D-Glucosylarylamine | a,d |
| X42932 | 257,0654 | 3,8 | Acide piscidic | a,d |
| X69282 | 361,09179 | 11 | Flavone avec ramification : $C_{18}H_{16}O_8$ | a,d |
| X84952 | 438,23873 | 7,9 | Lunarine | a,d |

**Tableau 8 : Liste des variables significatives pour la discrimination des miels multi-fleurs et monofloraux**

* a : masse précise permettant la proposition d'une composition élémentaire et d'une structure, b : temps de rétention en accord avec celui du composé de référence, c : spectre MS/MS en accord avec celui du composé de référence, d : spectre MS/MS en accord avec une hypothèse de structure.

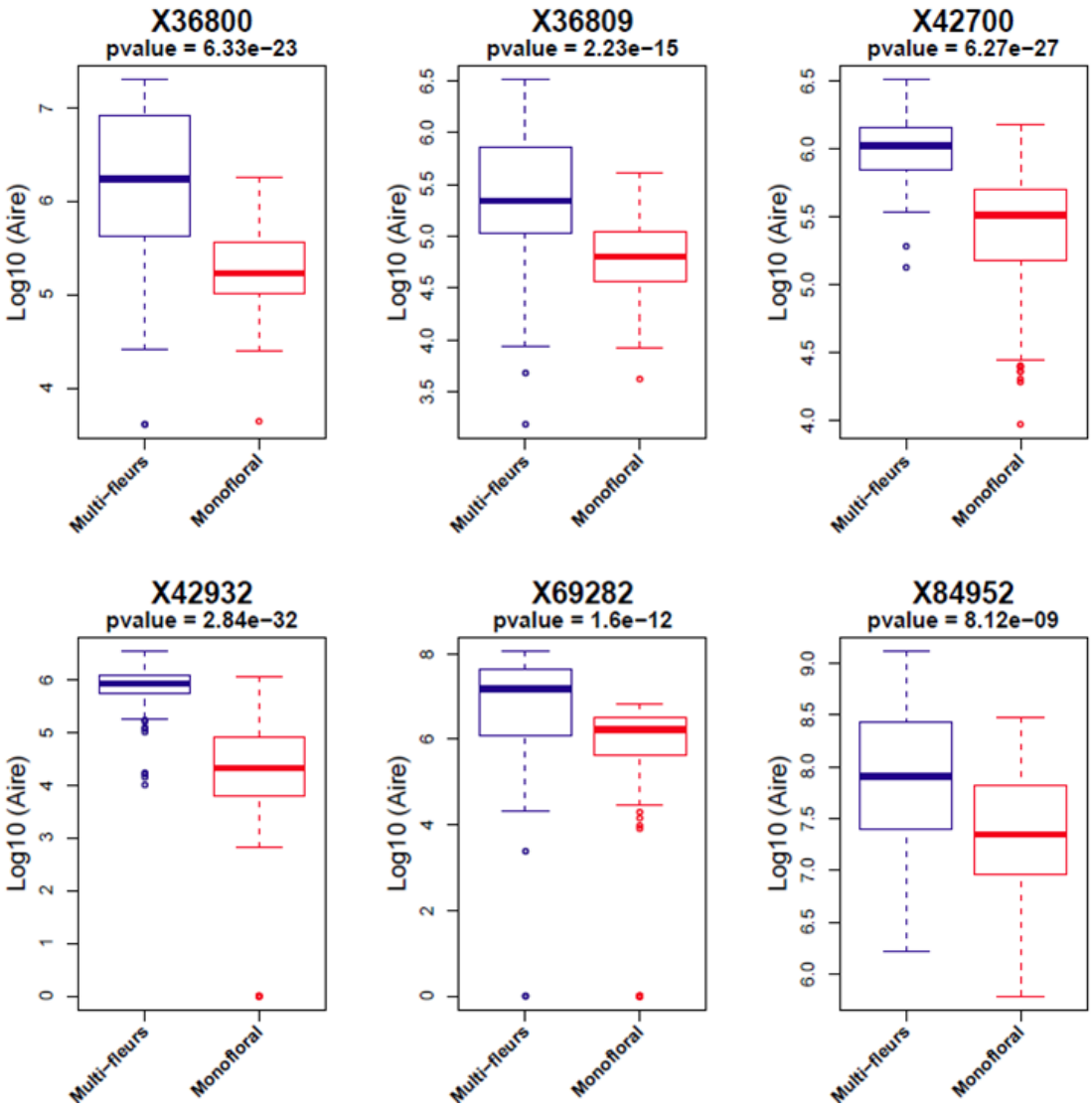



**Figure 53 : Boîtes à moustaches des six variables parmi les plus significatives de la PLS-DA**

La ligne épaisse correspond à la médiane. La boîte correspond au premier et au troisième quartile. Les moustaches représentent 1,5 fois l'écart interquartiles et les valeurs extrêmes sont marquées par des points.

Lorsqu'une variable est associée à une proposition de nom et de structure, l'ion correspondant est fragmenté pour la réalisation d'un spectre CID en mode HCD à plusieurs énergies de collision normalisées sur un instrument de type Q-Exactive (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France). Un travail de d'appariement entre la structure et le spectre de fragmentation est réalisé afin de savoir si les fragments observés sont en contradictions avec l'agencement des atomes dans la structure proposée. Un exemple de ce travail réalisé en partenariat avec le professeur Jean-Claude Tabet est présenté en Figure 54 et Figure 55.

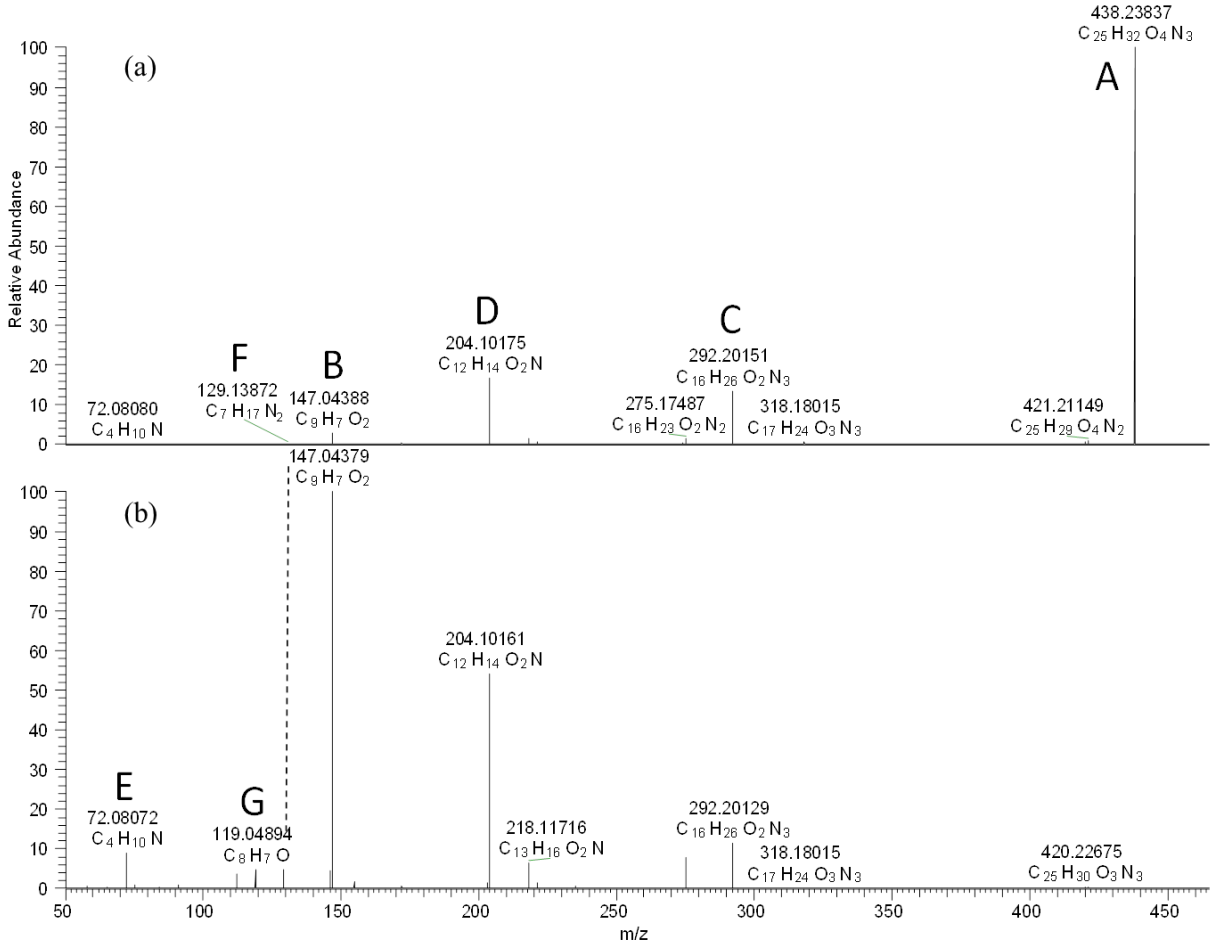



**Figure 54 : Spectres CID enregistrés en mode HCD à deux énergies de collision : (a) 20 % et (b) 40 % en énergie de collision normalisée de la variable X84952 protoné et annotée comme correspondant à la lunarine**

Dans cet exemple, la plupart des ions fragments détectés dans les spectres de masses MS/MS ont été interprétés à partir d'un complexe ion-dipôle permettant la formation de l'ion fragment B et de l'ion fragment C. L'ion fragment C peut ensuite se fragmenter à nouveau pour donner les ions fragments D, E et F tandis que l'ion fragment G provient de l'ion fragment B. On constate également que l'ion fragment B est majoritaire à l'énergie la plus élevée (40 %) car il est produit de deux manières différentes : (i) soit à partir de la dissociation directe du complexe ion-dipôle soit (ii) à partir de la cascade de fragmentation C forme D forme B. L'énergie interne de la molécule devra être suffisante pour engendrer cette cascade ce qui est le cas à 40 % et non à 20 %. Avec ce travail, nous confirmons avec une relativement bonne confiance que la variable X84952 peut correspondre à la lunarine. Il s'agit d'un alcaloïde retrouvé communément dans les plantes du genre *Lunaria* originaire d'Europe centrale et méridionale. De fait, ces 6 molécules permettent la discrimination des miels multi-fleurs et monofloraux et pourraient être utilisés pour la détection de fraude comme la vente de

miels multi-fleurs à la place de miels monofloraux. Cela nécessiterait une confirmation des résultats obtenus avec un plus large groupe.

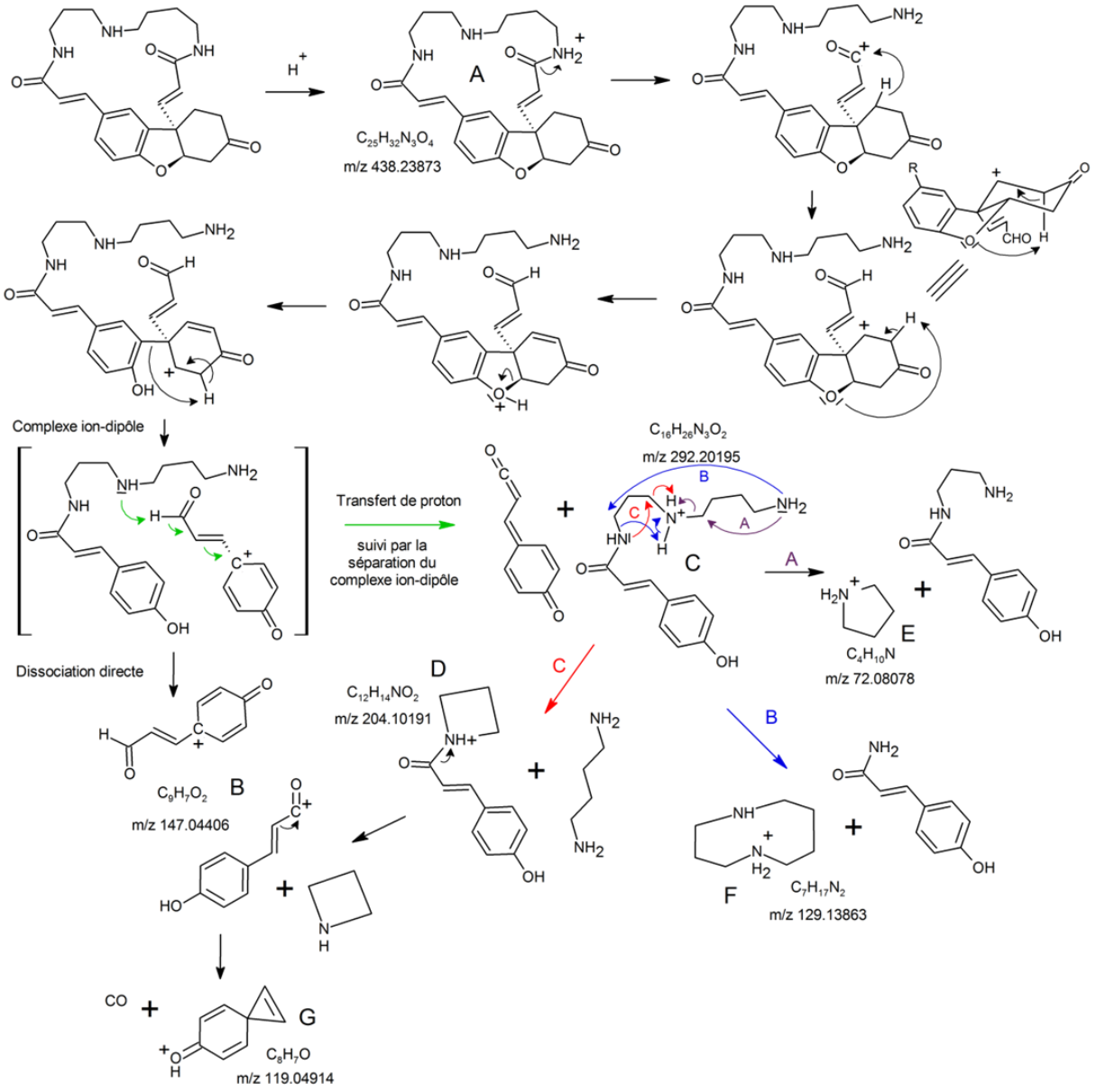



**Figure 55 : Proposition d'un mécanisme complet de la fragmentation de la lunarine**

Dans un second temps, un autre filtrage de la table de pics XCMS a été envisagé afin de tenter de mieux séparer les miels monofloraux. Pour cela, des filtres plus stricts ont été mis en place : le statut des variables dans tous les miels devait être identique (présent ou absent) pour 3 des 3 réplicas, le coefficient de variation inférieur à 25 % et un ratio par rapport aux blancs analytiques supérieur ou égal à 10. Avec ces nouveaux filtres, la table de pics était constituée de 32 000 variables. Les données ont été log-transformées et centrées en vue de réaliser une ACP sans utiliser les miels d'eucalyptus (Figure 56).

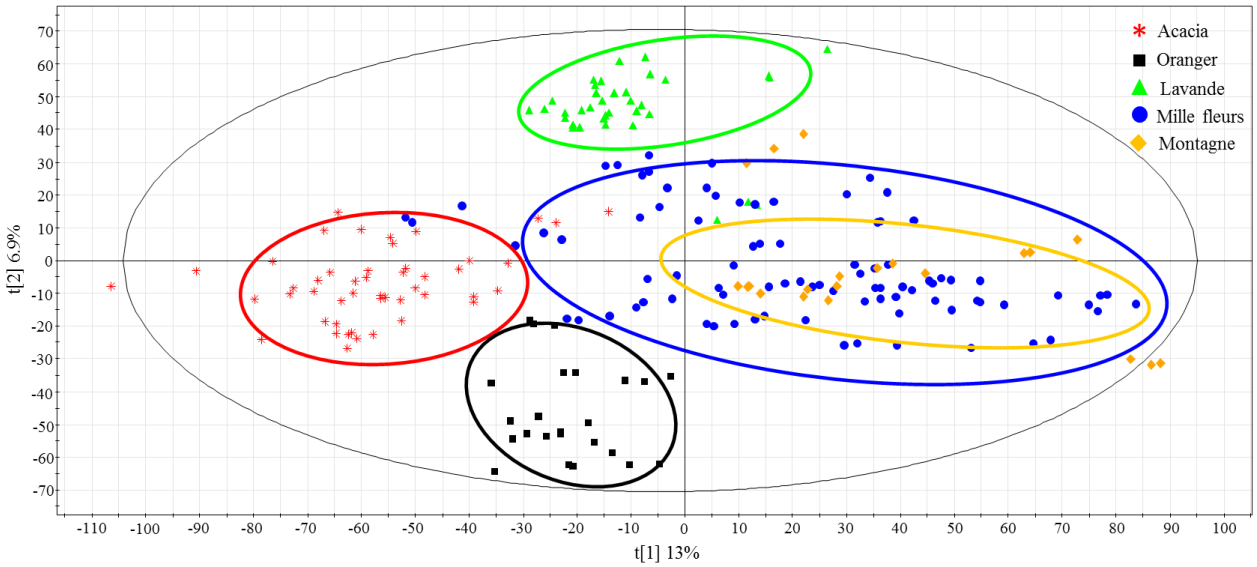



**Figure 56 : ACP sur les échantillons de miels (hors eucalyptus) avec la nouvelle table de pics filtrée**

Sur cette ACP, on constate une meilleure discrimination des miels monofloraux grâce à la nouvelle table de pics filtrée ce qui montre l'importance du filtrage et de la conservation des variables analytiquement pertinentes. Sur le même principe, une PLS-DA a été réalisée (résultats non présentés) permettant la génération d'une liste des variables les plus discriminantes (VIP > 2). A partir de celle-ci, 8 variables ont été annotées à partir des bases de données publiques puis validées sur la base de leur spectre MS/MS comparé avec celui du standard (exemples de la naringine et de la coumarine en Figure 57 et Figure 58). Des tests de type ANOVA (de l'anglais *ANalysis Of VAriance*) univariée réalisés sur ces 8 variables ont permi de discriminer les miels selon l'origine botanique. Les p-values obtenus pour chaque ANOVA par le test de Fisher-Snedecor sont inférieures à 0,05, ce qui valide leurs significativités vis-à-vis de l'origine botanique testée. L'hypoxanthine, l'hypaphorine et l'acide abscissique permettent de discriminer les miels d'acacia ; l'hesperidine, la naringine et la poncirine distinguent les miels d'oranger ; alors que la coumarine et la phenylalanine discriminent les miels de lavande (Figure 59). Biologiquement parlant, les variables annotées sont pertinentes. L'hesperidine, la naringine et la poncirine sont des flavanones hétérosidiques traditionnellement retrouvés dans les agrumes du genre *Citrus* [429]. Ces molécules discriminent dans notre étude les miels d'oranger. La coumarine est présente dans la lavande à hauteur de 0,15 % ce qui explique sa présence dans le miel de lavande. Les autres molécules sont des molécules naturelles présentes dans un grand nombre d'être vivant comme la phenylalanine (un acide aminé), l'hypoxanthine (une base azotée à base purique) ou l'acide abscissique (une phytohormone).

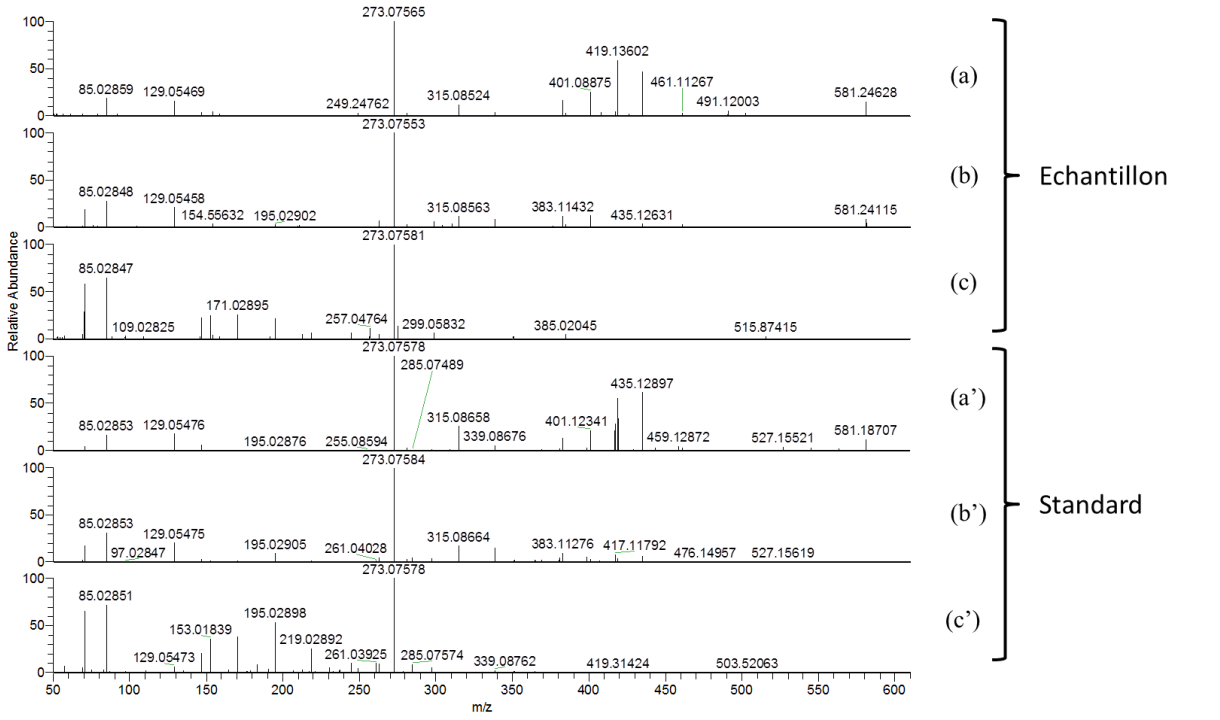



**Figure 57 : Exemple de la confirmation de la Naringine grâce à la MS/MS**

Spectres de fragmentation de la Naringine (*m/z* 581,2) à trois énergies de collision 10, 20 et 40 % (NCE) pour les spectres a, b et c respectivement.

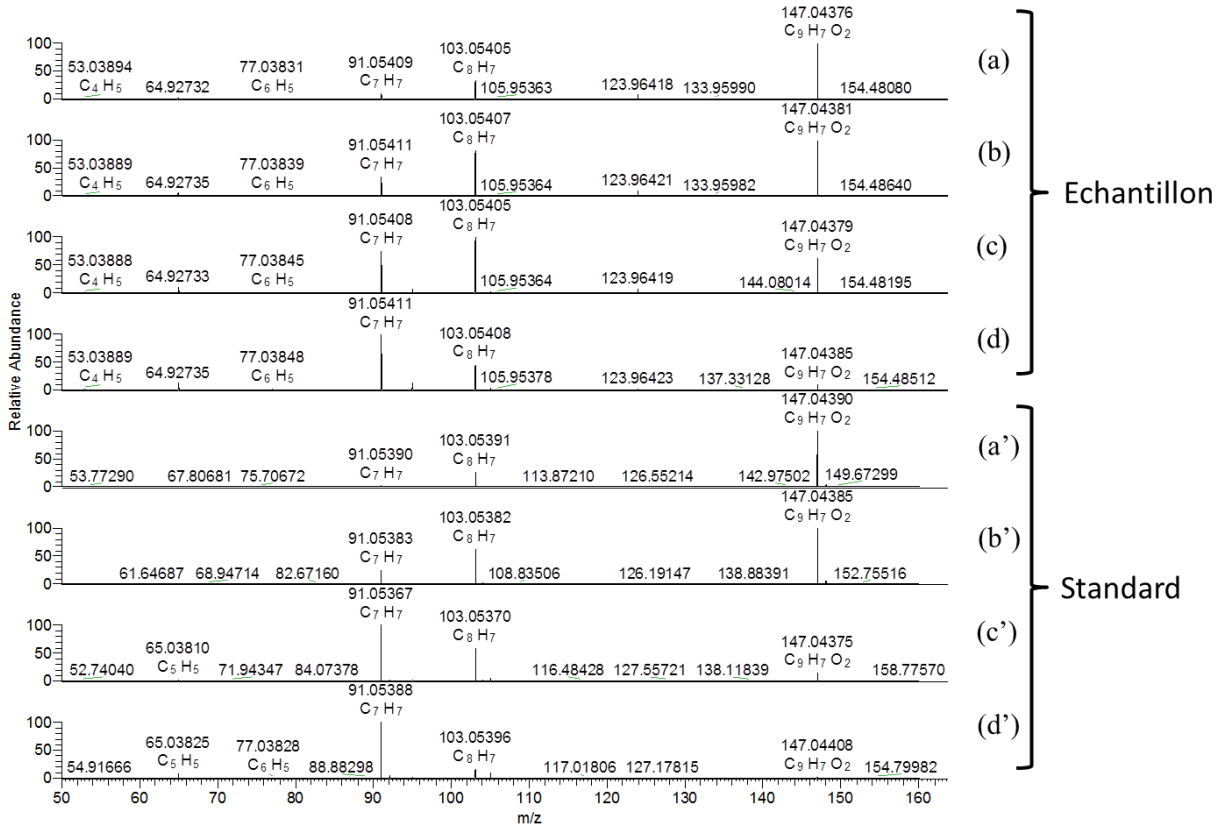



**Figure 58 : Exemple de la confirmation de la Coumarine grâce à la MS/MS**

Spectres de fragmentation de la Coumarine (*m/z* 147,04) à quatre énergies de collision 40, 50, 60 et 80 % (NCE) pour les spectres a, b, c et d respectivement.

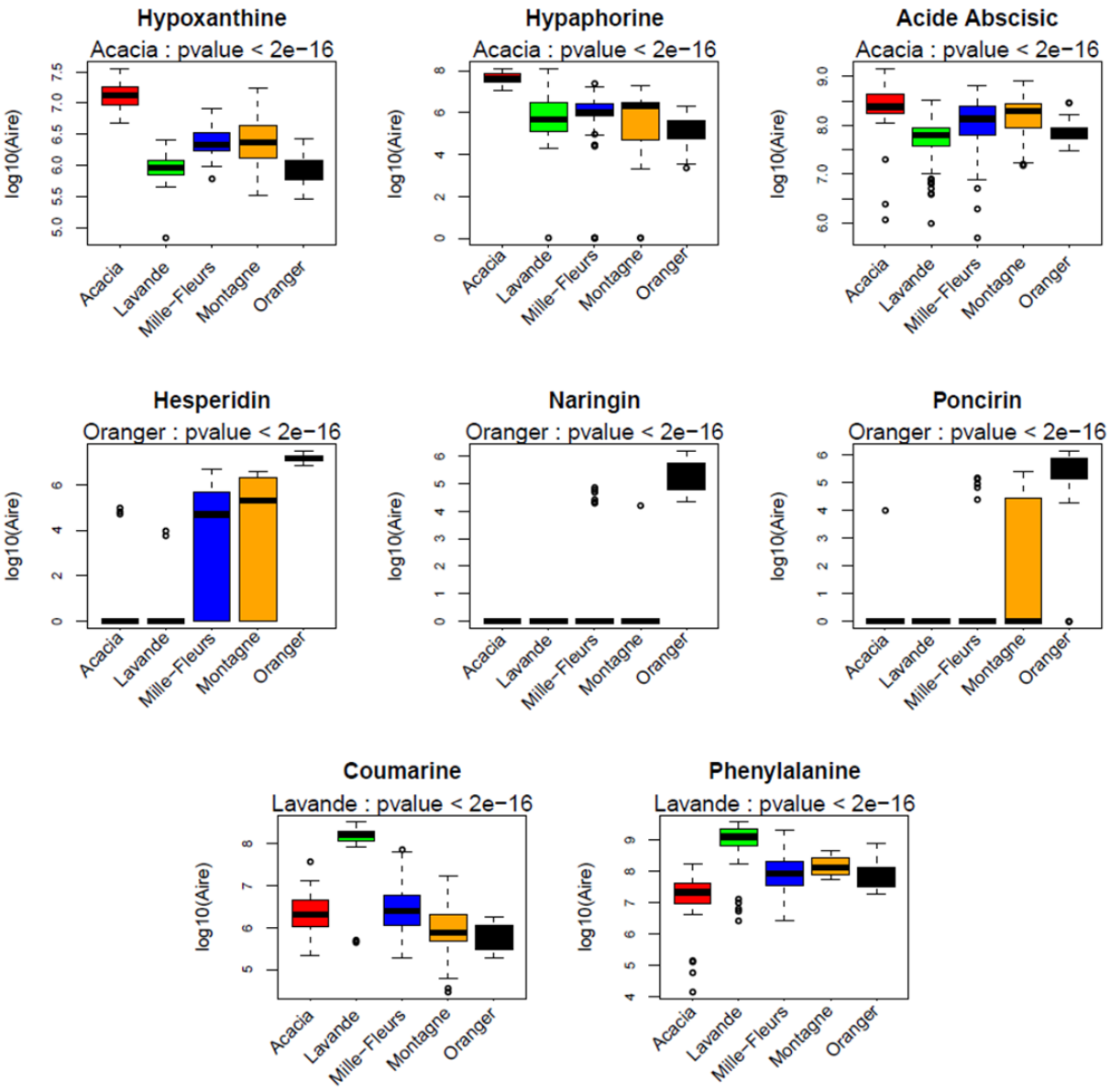



**Figure 59 : Boîtes des moustaches des 8 variables les plus discriminantes pour la caractérisation des miels monofloraux**

La ligne épaisse correspond à la médiane. La boîte correspond au premier et au troisième quartile. Les moustaches représentent 1,5 fois l'écart interquartiles et les valeurs aberrantes sont marquées par des points. Les variables sont organisées en ligne en fonction de l'origine florale qu'elles discriminent : Acacia (ligne 1), Oranger (ligne 2) et Lavande (ligne 3).

Une PLS-DA sur la base de ces 8 variables uniquement a été réalisée afin de voir si elles permettaient la création d'un modèle prédictif susceptible de caractériser l'origine botanique de ces miels. La Figure 60 montre que ces variables permettent une bonne séparation des miels monofloraux avec les proportions de variance expliquée supérieures à 18 % pour chacun des deux axes. On voit que les miels multi-fleurs (mille-fleurs et montagne) sont au centre de la carte factorielle du poids des individus car ils ne sont discriminés par aucune des 8 variables.

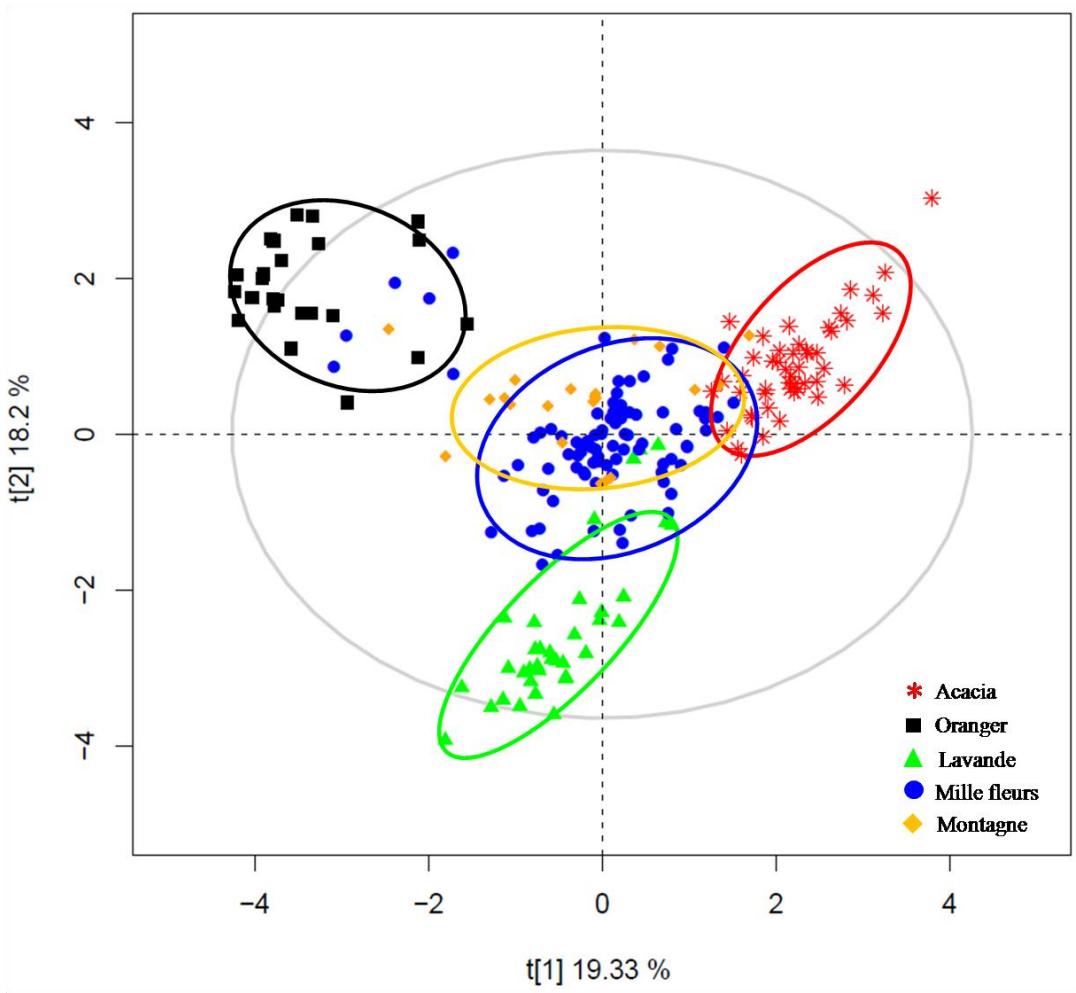



**Figure 60 : PLS-DA réalisée sur la base des 8 variables discriminant l'origine botanique des miels dont les miels monofloraux**

Ce modèle a été validé à l'aide de trois tests de mesure de la qualité de prédiction : validation croisée de type « leave-one-out », « k-fold » et « train & test ». Le résultat quel que soit le test est la qualité de prédiction d'un individu ou d'un groupe d'individus à partir d'un modèle appris sur le reste des individus. Seul le nombre de miels ou de groupes d'apprentissage diffèrent en fonction du type de test. Quel que soit le test, les résultats montrent un taux de 80 % de miels dont l'origine botanique a été correctement prédite. Les 20 % mal placés sont en grande partie liés aux miels de montagne qui sont confondus avec les miels mille fleurs. Sur la distinction de miels monofloraux, ce chiffre atteint 95 % de miels correctement placés. On remarque néanmoins sur la PLS-DA des miels mille fleurs (en bleu) au milieu des miels d'oranger (en noir). Il pourrait s'agir de miels mille fleurs contenant une forte teneur en miel d'oranger, malheuresement, aucune métadonnée sur le pot n'a pu confirmer notre hypothèse. On notera aussi quelques réplicas de miels de lavande (en vert clair) au milieu des miels mille-fleurs ce qui était déjà le cas sur l'ACP présentée préalablement. Il pourrait s'agir d'un miel fraudé ou mélangé avec du miel mille-fleurs. Cette observation pose le problème du

risque dans la création d'un modèle prédictif sur la base d'un groupe de miels non maîtrisé car nous n'avons pas de vérification de l'origine botanique par étude mélissopalynologique. La détection de fraudes devrait dans l'avenir être confirmée avec d'autres études complémentaires en spectrométrie de masse et en résonance magnétique nucléaire sur la base d'un groupe de miels plus large et caractérisé auparavant par étude mélissopalynologique.

## II.5. **Conclusion**

Cette étude démontre que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution est un outil polyvalent permettant à la fois des analyses ciblées et globales pour une meilleure caractérisation des matrices alimentaires. Sur la même empreinte chimique acquise en HRMS, plusieurs fouilles de données ont été réalisées : (i) une analyse multiplexée et ciblée classique de xénobiotiques, (ii) la détection de contaminants chimiques non ciblés et inconnus et (iii) la détection de métabolites utiles pour la caractérisation des matrices alimentaires. Ces résultats ont été obtenus lors d'une preuve de concept sur des échantillons de miel. Pour cela, une analyse comprenant la création d'une banque de données spectrales de 83 polluants (55 pesticides et 28 antibiotiques), une extraction de type QuEChERS, et une optimisation des paramètres HRMS et HRMS/MS ont été mis au point et validés. Ce protocole permet l'acquisition d'une empreinte chimique globale en plus de la détection des 83 molécules ciblées avec une bonne répétabilité et une sensibilité comparable voire meilleure que celle obtenue sur les appareils de type TQ. Nos résultats sur un groupe de 76 miels ont montré qu'au moins un des 83 polluants ciblés a été détecté dans 74 des 76 miels avec une moyenne de 5 xénobiotiques par miels. Toutes ces molécules ont été retrouvées à des concentrations inférieures aux limites réglementaires européennes. Le reste de l'empreinte chimique a ensuite été analysée à l'aide du logiciel XCMS, qui a permis de convertir les données brutes en une matrice de pics sur laquelle il est beaucoup plus facile d'effectuer des fouilles de données et des analyses statistiques. Afin de découvrir des molécules inattendues ou inconnues, un algorithme a été développé et appliqué à cette table de pics pour la recherche spécifique de molécules chlorées. Cet algorithme a été validé car nous avons retrouvé 4 des 9 des molécules chlorées préalablement recherchées lors de l'analyse ciblée. De plus, cette procédure a permis de mettre en évidence 12 produits chimiques chlorés inconnus dans des échantillons de miel dont l'un a été formellement identifié dans 4 miels de lavande comme étant le 2,6-dichlorobenzamide, un métabolite du dichlobénil qui a été largement utilisé comme herbicide dans les plantations de lavande avant 2010. Des analyses statistiques multivariées ont été aussi effectuées sur les variables analytiquement pertinentes issues de

deux filtres différents appliqués à la table de pics, ce qui a permis de mettre en évidence une séparation des échantillons de miel en fonction de leurs origines florales. Cette discrimination a d'abord été restreinte aux miels monofloraux et multi-fleurs, et 6 variables significativement discriminantes ont pu être identifiées, dont la lunarine. Des critères de filtre mieux maîtrisés et plus stricts ont permis de caractériser plus finement les échantillons de miel selon leur origine botanique, dont les miels monofloraux entre eux. Huit variables biologiquement pertinentes ont été formellement identifiées et introduites dans un modèle prédictif permettant de placer correctement 80 % des échantillons lors du test de validation. Cette approche pourrait à l'avenir être utilisée pour la caractérisation des miels selon leurs origines florales. Des travaux sont en cours en collaboration avec les laboratoires Eurofins pour la réalisation d'une fusion de données provenant de technologies différentes : la spectrométrie de masse à ultra haute résolution d'une part et la résonance magnétique nucléaire d'autre part. Les premiers résultats montrent une meilleure discrimination des miels lors de la fusion des données comparativement à la séparation réalisée par une seule des deux techniques.

L'approche par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution pourrait être appliquée à toute autre matrice alimentaire afin de réaliser une approche métabolomique complète. Le but serait de construire (i) des bases de données spectrales de métabolites et de polluants pour améliorer l'annotation et l'identification des composés et (ii) des bases de données d'empreinte métabolomique liées à une matrice alimentaire distincte qui pourraient être couplées avec des outils de fouilles de données pour mettre en évidence la présence de composés inattendus. Néanmoins, ce type d'approche nécessite le développement d'outils de normalisation afin de limiter l'impact des biais analytiques (encrassement de la source par exemple) et permettant de fusionner des expériences acquises sur différentes périodes de temps. Comme le soulignent nos résultats, la caractérisation des produits chimiques non ciblés et inconnus à l'aide de spectres MS et MS/MS reste toutefois difficile. Des outils informatiques tels que des prédicteurs de fragments *in silico* [428] ou des logiciels tels que Metfusion [430] pourraient être combinés avec d'autres propriétés physico-chimiques tels que l'indice de temps de rétention ou des coefficients de partage octanol-eau [431] pour aider à résoudre ce problème.

Une autre étude de preuve de concept a été réalisée afin de confirmer ces premiers résultats obtenus sur des échantillons de miels. Dans le cadre d'un partenariat avec la société SAUR (*Société d'Aménagement Urbain et Rural*), la société Profilomic a réalisé une étude de détection de polluants chimiques organiques dans de l'eau issue de puits de captage et destinée à la production d'eau potable.

# III. L'ANALYSE DE L'EAU ISSUE DE PUITS DE CAPTAGE : DEUXIEME PREUVE DE CONCEPT

## III.1. Introduction

Cette deuxième étude a été en partie financée par la société SAUR. Ce groupe créé en 1933 est constitué d'un ensemble d'entreprises qui accompagne les collectivités locales et les industriels dans leurs projets d'aménagement liés à la propreté, l'énergie, l'ingénierie ou encore la logisthique de l'eau. Il est notamment spécialisé dans les métiers de la production, la distribution de l'eau potable et le traitement des eaux usées en qualité d'opérateur de gestion délégué de services d'eau. La SAUR dessert en France 6 700 communes et sept millions de consommateurs pour les services d'eau et d'assainissement. Le groupe possède 40 000 stations d'épuration et usines de traitement d'eau potable exploitées, 200 000 km de réseaux gérés et 600 millions de $m^3$ d'eau potable produits par an. En France, la SAUR est le troisième opérateur pour la distribution d'eau, après Veolia et Suez. Le groupe SAUR est fortement impliqué dans le développement de procédés de traitement pour l'élimination des micropolluants. La problématique des substances émergentes et plus généralement des micropolluants organiques préoccupe et prend une place de plus en plus importante dans le domaine du contrôle chimique de l'eau en France. Leur recherche et leur détection a d'abord concerné les eaux de surface, considérées comme les plus vulnérables à ce genre de pollution (rejets des ruissellements, rejets de stations d'épuration, etc.). Les interrogations se sont multipliées ces derniers temps sur la présence de ces substances dans les eaux souterraines [432]. Au début 2011, la société SAUR exploitait en France 871 champs captant, constitués de forages actifs en permanence, ou bien de manière discontinue (captages d'appoint, etc.). La Figure 61 illustre leur répartition géographique.

Au niveau national, les tables rondes du Grenelle de l'Environnement de 2007 ont identifié comme objectif prioritaire la préservation à long terme des ressources utilisées pour l'alimentation en eau potable des 500 captages les plus menacés [433]. Ces derniers sont répartis sur l'ensemble du territoire français, dont 238 sur le bassin Seine-Normandie [434]. Parmi les polluants recherchés, les pesticides figurent en bonne place. Les niveaux de contamination sont souvent inférieurs à la limite de 0,1 µg/L, fixée par le Code de la Santé Publique dans l'eau potable, même si ponctuellement des dépassements sont mesurés. Les produits pharmaceutiques commencent également à être recherchés, notamment au travers de grandes campagnes nationales comme celle réalisée par l'Anses en 2011 dans laquelle les

niveaux de concentration rencontrés étaient généralement très faibles, de l'ordre de la dizaine de ng/L [34].

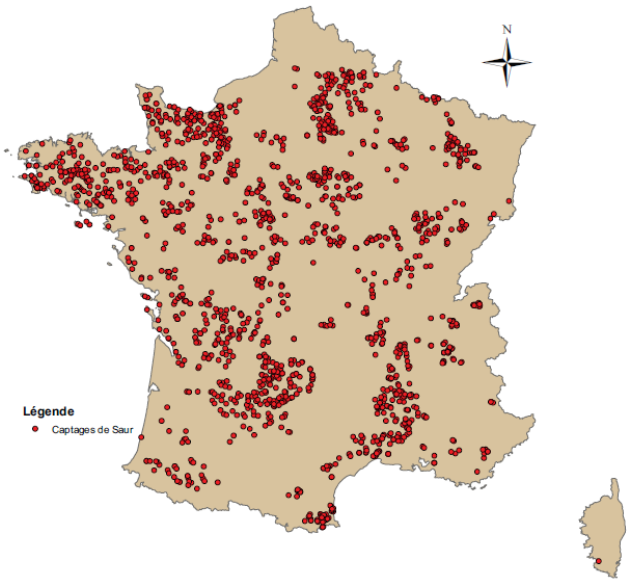



**Figure 61 : Répartition géographique des captages d'eaux souterraines gérés par la société SAUR [435]**

Les approches conventionnelles consistent à rechercher des listes de molécules *a priori* en multipliant les analyses dédiées ce qui est un problème pour la SAUR compte tenu du nombre de points de captage à surveiller. La SAUR a aussi souhaité réaliser un état des lieux d'un nombre restreint de points de captage à titre de preuve de concept, en s'appuyant sur une analyse du plus grand nombre de molécules recherchées en une seule fois. En plus de cet état des lieux de la pollution chimique organique de ces quelques points de captage, cette étude avait pour objectif d'estimer un état « de risque » de pollution des nappes en fonction d'un nombre importants de métadonnées telles que la position géographique, les caractéristiques des aquifères (type de sol, densité de population etc.), le type d'activités aux alentours (urbaine, agricole, naturelle) ou encore la présence de cours ou de plan d'eau. L'idée sous-jacente est la création d'une carte des points de captages « à risque » compte tenu de leurs caractéristiques pour une surveillance accrue et pour la mise en place de système de dépollution spécifique ou plus important. Dans ce contexte, l'analyse métabolomique est apparue comme une bonne alternative que nous avons réalisée en se basant sur l'acquisition d'empreintes chimiques globales. Cependant, et contrairement à l'analyse du miel réalisée précédemment, l'approche a été différente. Nous nous sommes appuyés sur la chimiothèque de xénobiotiques incrémentée au fur et à mesure des contrats de la société Profilomic et qui, au moment de cette étude, comprenait 337 polluants incluant les 83 de l'étude du miel. Nous

avons vérifié que les molécules constitutives de cette chimiothèque avaient, pour bon nombre d'entre elles, un intérêt dans le cadre de l'analyse de l'eau en se basant sur les études de l'Anses [34], le rapport de l'académie de pharmacie [133] ou la littérature scientifique. On peut prendre l'exemple des articles de Petrovic et coll. [436] et Lopez-Serna et coll. [437] qui ont analysé respectivement 81 et 74 produits pharmaceutiques en communs dans l'eau souterraine dont 51 sont dans notre liste de 337 polluants tels que la carbamazepine, l'atenolol, le kétoprofene ou la fluoxetine. Par ailleurs, Mezcua et coll. [438] a analysé 9 pesticides prioritaires, tous dans notre liste, dans l'eau souterraine tels que l'atrazine, la simazine, le diuron ou la trifluraline.

Une analyse la plus exhaustive possible a été réalisée avec la possibilité de confirmer la présence des molécules dans les échantillons à l'aide de cette chimiothèque. Cette preuve de concept dans le cadre d'une nouvelle matrice testée a été évaluée sur un groupe de 15 puits de captages exploités par la SAUR pour la production d'eau potable. Ainsi, 3 campagnes de prélèvements ont été menées par l'équipe Recherche & Développement de SAUR sur les 15 puits de captage sélectionnés. Les analyses ont été réalisées par Profilomic et 2 laboratoires de références afin de comparer les résultats de l'analyse type métabolomique avec des analyses conventionnelles de référence. Dans un premier temps, le groupe de captages retenus ainsi que la méthode d'empreintes chimiques globale proposée par Profilomic seront détaillés. Puis les résultats obtenus à partir des campagnes d'analyses seront présentés et discutés en matière de micropolluants organiques des puits de captage étudiés.

## III.2. **Matériel et Méthodes**

### III.2.1. Produits chimiques et réactifs

Tous les composés chimiques de référence (337 polluants > 95 % de pureté) répartis en 205 médicaments à usage humain, 107 pesticides, 17 produits industriels et 8 substances vétérinaires ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Les mélanges des substances utilisées pour l'étalonnage des spectromètres de masse (Calmix-positif, pour le mode d'ionisation positive, comportant la caféine, l'acétate de L-méthionyl-arginyl-phénylalanyl-alanine et de l'Ultramark 1624 ; et Calmix-négatif, pour le mode d'ionisation négative, contenant, en plus du mélange Calmix-positif, du dodécylsulfate de sodium et du taurocholate de sodium) ont été achetés chez Thermo Fisher Scientific (Les Ulis, France). L'acétonitrile (ACN) de pureté analytique, l'acide formique (HCOOH), l'ammoniac ($NH_3$, 23 %), l'éthanol absolu (EtOH) et le méthanol (MeOH) de pureté analytique

proviennent de VWR (Fontenay-sous-Bois, France). L'eau ultra pure déionisée a été filtrée à travers un système Milli-Q (Millipore, Molsheim, France).

### III.2.2. Préparation des solutions de travail

Les solutions mères des composés de références ont été préparées à 1 mg/mL lorsque cela était possible en dissolvant 1 mg de chaque substance dans 1 mL d'un solvant approprié. Le choix des solvants étaient restreint à l'eau ($H_2O$), l'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH), l'éthanol (EtOH) et des mélanges de ces solvants avec addition d'acide formique (HCOOH) ou d'ammoniac ($NH_3$) jusqu'à 10 % maximum. Des solutions de travail ont été réalisées à 5 µg/mL pour chaque composé de référence par dilution de la solution mère dans un mélange $H_2O$/ACN (95/5, v/v). Un mélange de travail à 1 µg/mL des 337 composés de référence a également été réalisé à partir de solutions mères par une dilution au millième. Pour minimiser la dégradation de toutes ces solutions, elles ont été conservées à -20°C immédiatement après leurs préparations.

### III.2.3. Sélection et prélèvement de l'eau issue des puits de captage

Les critères de sélection des 15 puits de captage sont spécifiés dans les résultats. Trois campagnes de prélèvements ont été réalisées entre mi-2011 et fin 2012. Les échantillons d'eau brute souterraine ont été prélevés dans des bidons de 3 L en Nalgène. Si possible, les échantillons étaient prélevés au niveau du refoulement de la pompe du captage considéré, sinon, au niveau de la bâche de mélange des eaux brutes, lorsque l'alimentation était assurée par plusieurs puits de captage. Les échantillons étaient ensuite envoyés par transporteurs réfrigérés à 4 °C pour une analyse débutant dans les 24 à 48 heures après le prélèvement.

### III.2.4. Préparation des échantillons

Dès leur arrivée, les échantillons ont été extraits extemporanément à l'aide d'un protocole manuel de SPE. Les cartouches d'extraction SPE Oasis HLB (1 g / 20 mL) utilisées ont été achetées chez Waters (Guyancourt, France). Chaque eau a été préparée une fois selon le protocole suivant (Figure 62) :

- Conditionnement de la cartouche en quatre étapes : 10 mL d'acétonitrile, 10 mL de méthanol, 10 mL d'eau, puis séchage sous vide pendant trois minutes. Cette étape

permet l'ouverture des pores du copolymère permettant une bonne adsorption des composés.

- Percolation : 500 mL d'échantillon d'eau passe à travers la cartouche à un rythme régulier d'environ une goutte par seconde. Le temps total de chargement à ce débit est réalisé en 4 heures.
- Lavage de la cartouche : 10 mL d'eau milliQ ont ensuite été percolés sur la cartouche permettant de retirer les sels et impuretés restantes.
- Elution : 2 × 5 mL d'un mélange ACN/MeOH (50/50, v/v) ont été employés pour éluer les composés préalablement retenus sur la cartouche. L'utilisation de deux solvants complémentaires permet une récupération à haut rendement des molécules d'intérêts.
- Evaporation et reconstitution : l'éluât de 10 mL a été évaporé dans un bain marie (25°C) sous flux d'azote (2 psi) à l'aide d'un TurboVap (Biotage, Upssala, Suède). Enfin, le culot a été reconstitué avec 500 µL d'un mélange $H_2O$/ACN (95/5, v/v).

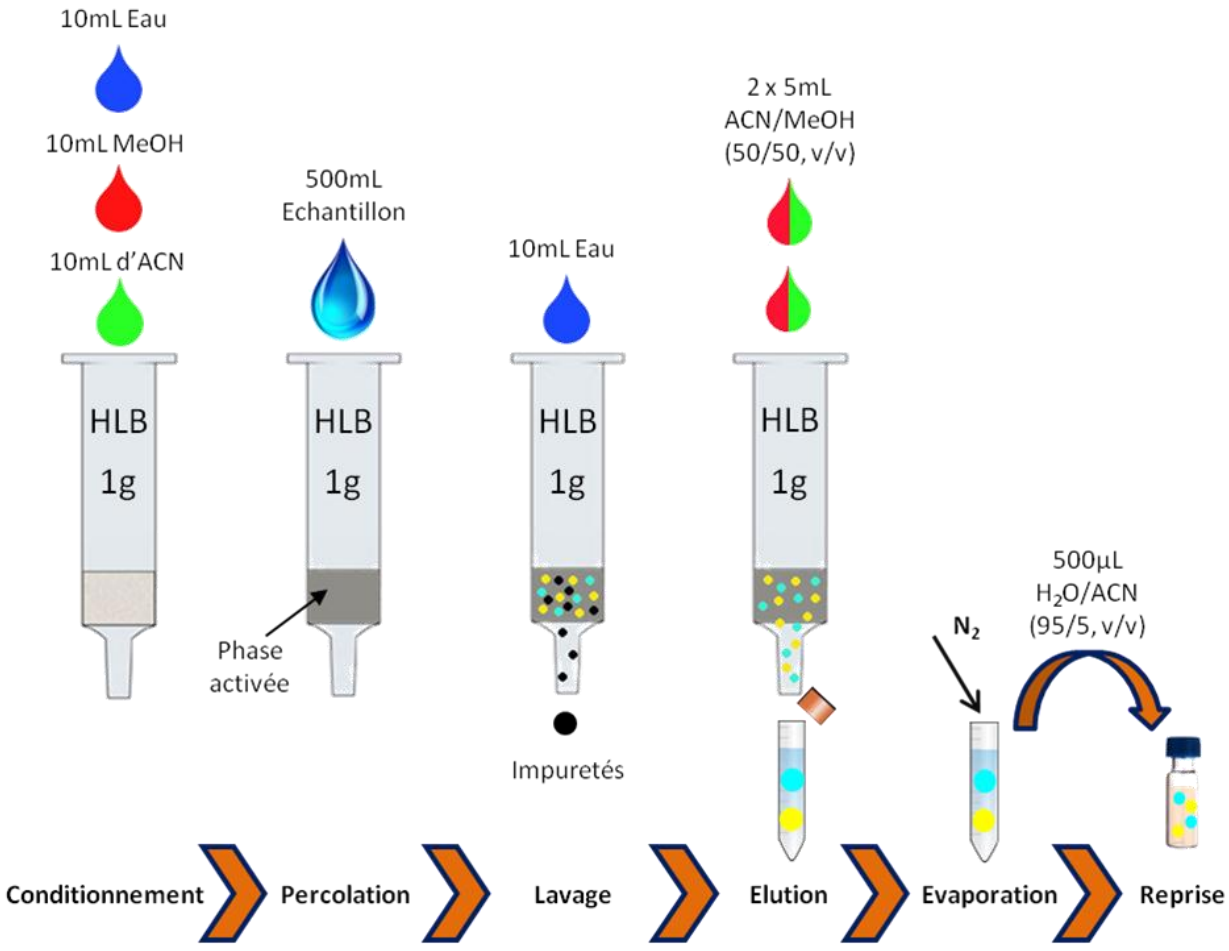



**Figure 62 : Protocole SPE de préparation des échantillons de la SAUR**

### III.2.5. Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses LC-HRMS ont été réalisées avec un système de chromatographie liquide de type NEXERA LC-30AD de la société Shimadzu (Champs-sur-Marne, France) couplé à un spectromètre de masse de type Exactive (technologie Orbitrap™) de la société Thermo Fisher Scientific (Les Ulis, France). Les expériences LC-HESI-MS/MS ont été réalisées avec un système chromatographique de type ACCELA 1250 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) couplé à un spectromètre de masse de type Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France). Les spectromètres de masse étaient équipés d'une source Electropsray (Exactive) et Heated-Electrospray 2 (Q-Exactive) opérant en mode d'ionisation positive et négative alterné. Les échantillons ont été placés dans un passeur automatique et thermostaté à 4 °C. Les données ont été acquises et visualisées avec le logiciel Xcalibur (version 2.1, Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France).

#### III.2.5.1. Conditions chromatographiques

La chromatographie haute performance en phase liquide (HPLC) a été réalisée avec une colonne Xterra C18 de dimension 2,1 mm × 150 mm, 5 µm (Waters, Guyancourt, France) placée dans un four thermostaté à 30 °C. Le système chromatographique a été équipé d'un préfiltre en ligne de 0,5 µm (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France).

Les phases mobiles utilisées pour la séparation chromatographique étaient constituées de 100 % d'eau (phase A) et d'ACN (phase B), et contenaient toute deux 0,1 % d'acide formique. L'élution chromatographique a été réalisée selon les conditions de gradient indiquées comme suit. Le débit de phase mobile a été fixé à 0,3 mL/min. L'élution débute avec une étape isocratique de 2 minutes à 5 % de phase B. S'en suit un accroissement linéaire de 5 à 100 % de proportion de phase B pendant les 20 minutes suivantes. La proportion de 100 % de phase B est maintenue constante pendant 4 minutes pour un rinçage de la colonne avant de revenir dans les conditions initiales, lesquelles sont maintenues pendant 4 minutes pour une ré-équilibration du système chromatographique.

#### III.2.5.2. Conditions d'analyse par spectrométrie de masse

Afin de s'assurer de la bonne précision de mesure des rapports *m/z*, l'étalonnage de l'instrument a été effectué chaque semaine dans les deux modes d'ionisation en utilisant le mélange étalon « Calmix » fourni par la société Thermo Fisher Scientific. Le spectromètre de masse a été utilisé avec une tension du capillaire d'introduction fixée à 4,8 kV en mode

d'ionisation positive à une température de capillaire de transfert de 280 °C. La pression du gaz de nébulisation et la pression du gaz axillaire ont été respectivement fixées à 28 et 9 unités arbitraires. Le pouvoir résolutif de l'analyseur a été fixé à 50 000 ($m/\Delta m$ où $\Delta m$ correspond à la largeur à mi-hauteur du pic produit par un ion monochargé à $m/z$ 200). La détection des ions a été réalisée sur la gamme de masse entre m/z 70 et 1000 avec une précision en masse inférieure à 5 ppm. Le nombre d'ions à accumuler (paramètre AGC target de l'anglais *Auto Gain Control*) et le temps d'injection maximum des ions (paramètre MIT de l'anglais *Maximum Inject Time*) ont été respectivement fixés à $10^6$ et 50 ms.

Pour les expériences MS/MS, deux types d'évènements successifs ont été utilisés sur le Q-Exactive : (i) un spectre MS avec un pouvoir résolutif, un paramètre d'AGC target et un paramètre MIT fixé à 70 000 ($m/\Delta m$, FWHM à $m/z$ 200), $10^6$ et 50 ms et (ii) un spectre MS/MS en mode d'activation non résonnante de type HCD (de l'anglais *Higher-energy Collisional induced Dissociation*) sans LMCO (de l'anglais *Low Mass Cut Off*) avec des valeurs d'énergies de collision normalisées de 20 et 40 %, avec un pouvoir résolutif, un paramètre d'AGC target, un paramètre MIT et une fenêtre d'isolation fixé à 17 500 ($m/\Delta m$, FWHM à $m/z$ 200), $10^6$, 250 ms et 0,4 m/z respectivement.

### III.2.5.3. Structure de la séquence

Les échantillons ont été injectés aléatoirement et analysés en trois séquences de 15 échantillons (une séquence par campagne de prélèvement). Dans chaque séquence, le système analytique a été conditionné avec 10 blancs. Un « blanc cartouche » a aussi été injecté, il s'agit d'un échantillon d'eau ultra-pure du laboratoire préparé le même jour que les échantillons d'eau afin de vérifier que le système de SPE n'apporte pas de pollution. Ensuite, une série de 3 QC (*Quality Control*) de chaque dilution au demi, au quart et au huitième ont été injecté en commençant par la plus petite concentration. Un blanc analytique a été injecté entre chaque échantillon et un QC non dilué tous les 5 échantillons (soit 1 QC tous les 10 injections). Le QC correspond à un mélange équivolumique de tous les échantillons de la campagne analysée. Ces 3 séquences ont été analysées sur plus d'un an, au fur et à mesure des prélèvements, pour la réalisation de bilan intermédiaire pour la SAUR.

Dans un second temps, les 45 échantillons ont tous été injectés lors de la même séquence afin de pouvoir comparer les résultats des différentes campagnes entre elles sur le modèle présenté ci-dessus.

### III.2.6. Traitement des données

#### III.2.6.1. Génération de la table de pics

La détection automatique des pics, l'intégration des aires et l'alignement inter-échantillons ont été réalisés avec le logiciel XCMS. Pour cela, les données brutes ont tout d'abord été converties dans le format mzXML, qui est un format libre, à l'aide du logiciel ProteoWizard [415]. Les données ainsi converties ont été traitées en utilisant la version 1.30.3 d'XCMS fonctionnant sur la version de l'environement logiciel R 3.0.0. Celui-ci a été installé sur un serveur de calcul Lenovo ThinkStation C20X 24 core Intel Xeon de 2,4 GHz avec 24 Go de RAM et fonctionnant sous Linux version Centos release 6.4 Final x86_64. La détection des pics a été réalisée grâce à l'algorithme CentWave [416].

#### III.2.6.2. Normalisation et filtre des variables pertinentes

Les variables ont été normalisées à cause de l'encrassement au cours du temps à l'aide de l'algorithme LOESS (de l'anglais *Low Order non linear locally EStimated Smoothing function*). Les variables ont ensuite été filtrées à l'aide du coefficient de corrélation sur les QC dilué pour chaque variable qui devait être au minimum de 0,98 et d'un ratio d'aire de 10 pour au moins un des échantillons par rapport à la moyenne des blancs analytiques. Les variables ont finalement été annotées par comparaison à +/- 10 ppm de leurs masses précises avec les masses théoriques des molécules contenues dans la banque de données des 337 polluants en utilisant un outil informatique du laboratoire développé en langage R.

#### III.2.6.3. Analyses statistiques

##### III.2.6.3.1. Calcul des fréquences d'apparition

Pour le calcul des fréquences d'apparition de chaque polluant, le nombre d'apparition du polluant a été divisé par 45 (3 campagnes × 15 puits) et multiplié par 100. L'erreur standard correspond à l'écart-type sur la base d'une loi binomiale car les tests effectués sont de type présence/absence 0 (le polluant n'a pas été détecté) ou 1 (le polluant a été détecté).

##### III.2.6.3.2. Analyses statistiques univariées

Pour calculer la significativité deux à deux des paramètres testés tels que le risque de pollution en fonction du type de nappe, de la densité de population ou de la présence de cours d'eau, le test du $\chi^2$ ($chi^2$) a été réalisé avec un risque $\alpha = 5$ %.

#### III.2.6.3.3. Analyses statistiques multivariées

Les données résultant du traitement XCMS ont été centrées sur la moyenne et transformées dans une échelle logarithmique puis analysées en utilisant le logiciel R pour la réalisation d'ACP.

## III.3. **Résultats et discussion**

Le but de cette étude était d'étudier 15 puits de captage sur 3 campagnes de prélèvement réalisées à des saisons différentes de l'année (périodes sèche et pluvieuse) afin de rechercher le plus de micropolluants possibles parmi la chimiothèque de 337 molécules dont nous disposions au moment de cette étude. La réalisation de cette expérience est de type métabolomique car les données brutes sont acquises en haute résolution et la structure de la séquence d'acquisition réalisée de manière à pouvoir normaliser les données en vue d'effectuer des analyses statistiques pour tenter de corréler les caractéristiques des puits de captage avec la fréquence d'apparition des polluants. Dans un premier temps, une banque de données spectrales permettant d'annoter et d'identifier avec précision les polluants dans l'eau a été réalisée sur la base des 337 polluants disponibles. La méthode employée a été la même que celle utilisée pour l'analyse du miel pour avoir une analyse la plus exhaustive possible. Ensuite, 15 puits de captage ont été choisis par la SAUR dans lequel les polluants retrouvés par analyse métabolomique ont été comparés avec les analyses conventionnelles réglementaires. Des analyses statistiques uni et multivariées ont permis de mettre en évidence un type de puits corrélé avec un risque de pollution accrue et une discrimination nette des eaux analysés en fonction de leur origine géographique.

### III.3.1. Détection des polluants dans les puits de captage

#### III.3.1.1. Caractéristique des polluants recherchés

La chimiothèque comprenait 337 polluants chimiques organiques répartis en 9 catégories (Tableau 9), acquis par Profilomic au cours des études que la société avait réalisées. Parmi ces xénobiotiques, on trouve des pesticides et leurs métabolites comme ceux de l'atrazine mais aussi 205 médicaments dont des anticancéreux, des best-sellers de l'industrie pharmaceutique (paracétamol, pravastatine ou bisoprolol), des antihypertenseurs, des antidépresseurs ou des hormones. Ces molécules ne sont, à ce jour, que peu recherchées dans le milieu naturel et notamment dans l'eau par les laboratoires conventionnels car il n'existe pas de normes ou de

législation encore en discussion au niveau du parlement européen avec la directive cadre sur l'eau.

| Catégories | Nombre de molécules |
|---|---|
| Acaricides | 8 |
| Antibiotiques | 57 |
| Autres médicaments | 148 |
| Fongicides | 31 |
| Herbicides | 41 |
| Insecticides | 26 |
| Toxines | 1 |
| Produits industriels et domestiques | 17 |
| Substances vétérinaires | 8 |

**Tableau 9 : Répartition des 337 polluants en 9 catégories**

### III.3.1.2. Incrémentation de la base de données spectrales

Au même titre que dans l'étude sur le miel, tous ces composés ont été analysés en FIA-MS et FIA-MS/MS dans les deux modes d'ionisation positive et négative. L'objectif était de créer une banque de données en masse exacte de tous les ions les plus intenses générés par ces molécules lors du processus ESI dans les deux modes d'ionisation : ion protoné ou déprotoné, adduits, fragments produits en source. Par ailleurs, des spectres CID de référence ont été acquis à plusieurs énergies de collisions normalisées pour la création d'une banque de données spectrales en vue d'une comparaison avec les spectres CID acquis dans les échantillons pour une validation ultime de la présence des polluants.

### III.3.1.3. Sélection du groupe de captages

Le groupe SAUR a choisi les 15 puits de captage selon plusieurs critères (Figure 63). Les diverses typologies de masses d'eau (caractéristiques hydrogéologiques, caractère karstique ou non de l'écoulement…) présentes dans le parc des 871 captages ont été pris en compte. Les captages avec les débits de pompage les plus élevés ou historiquement mieux renseignés ont été privilégiés. Une sélection de captages regroupés a été décidée afin de réduire les contraintes géographiques pour faciliter la logistique.

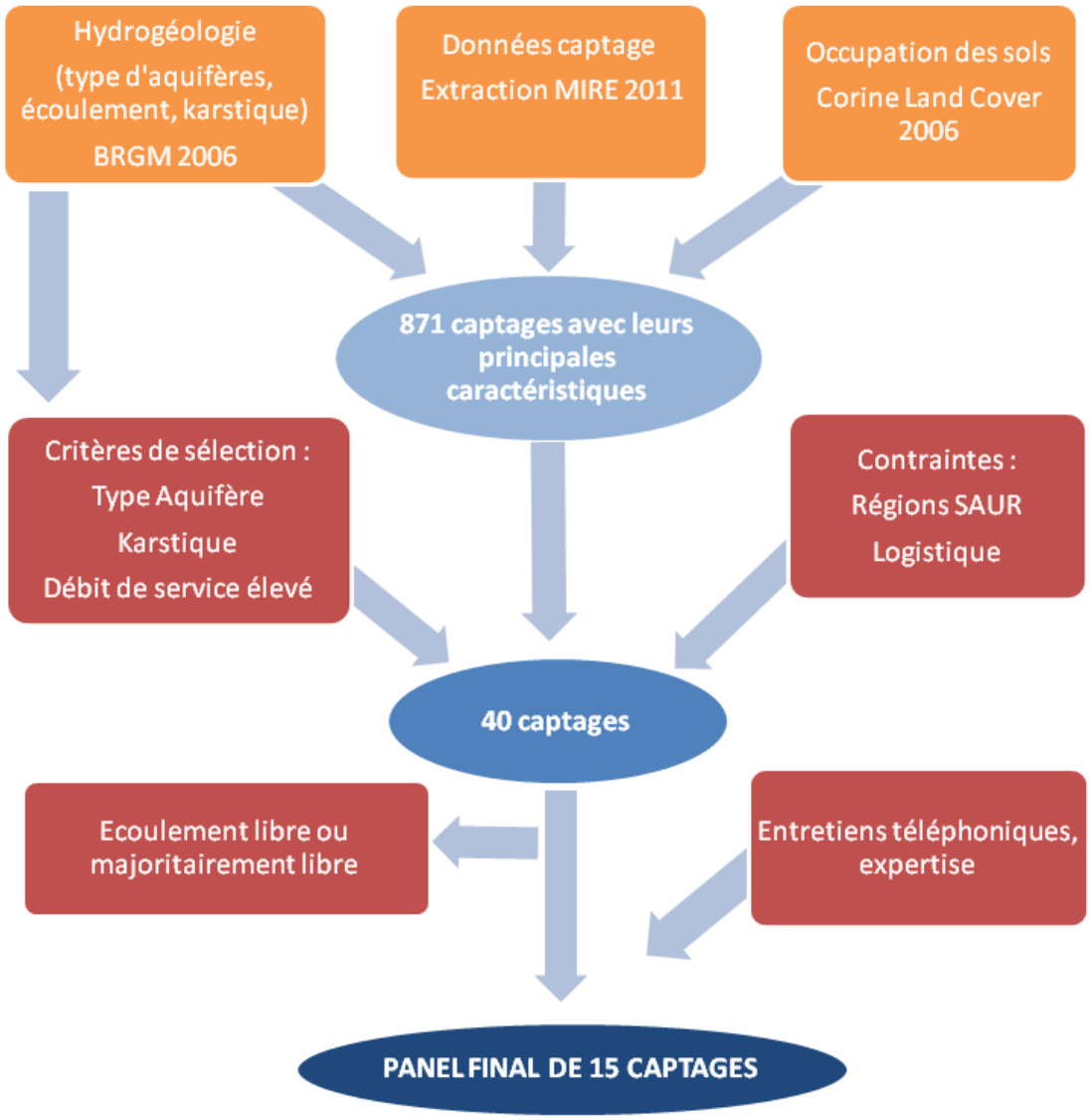



**Figure 63 : Schéma récapitulatif de la méthodologie mise en œuvre pour sélectionner le groupe de captages [435]**

Afin de caractériser au mieux ces captages, différentes sources d'informations ont été consultées :

- La base de données patrimoniale de Saur recensant les installations, leur position, etc. ;
- La typologie des aquifères réalisée par le BRGM (Bureau de Recherches Géologiques et Minières) en 2006, suite à la demande des Agences de l'Eau. Cette base de données a pour but d'installer un réseau de surveillance des masses d'eau dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau [179] et décrit les aquifères sur 2 niveaux :
  - 1$^{er}$ niveau, principal, avec les caractéristiques hydrogéologiques (type de réservoir, nature des écoulements) ;
  - 2$^{ème}$ niveau, avec le type d'écoulement rencontré (karstique, présence en frange littorale, regroupement d'aquifère) ;
- La base de données « Corine Land Cover 2006 », issue d'un projet réalisé par l'Agence Européenne de l'Environnement. Elle décrit l'occupation des sols dans 38

Etats européens. La base de données est obtenue par photo-interprétation humaine d'images satellites de précision 20 mètres.

Connaissant la position GPS des captages, un traitement sous le logiciel ARCMAP a permis de regrouper l'ensemble de ces informations.

Les caractéristiques des 15 captages retenus sont présentées dans le Tableau 10. Deux catégories de captages se détachent (i) ceux à faible densité de population, en zone naturelle, isolés, au sud-est ou à l'est, avec une faible présence de cours d'eau, composés de nappes sédimentaires et karstiques et (ii) ceux à forte densité de population, en zone urbaine ou agricole, à l'ouest, avec une forte présence de cours d'eau, composés de nappes alluviales et non karstiques.

| Dénomination des captages | Position géographique | Densité de population | Type géologique | Karst | Type d'activités | Présence de cours ou de plan d'eau | Date des campagnes de prélèvement |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | Ouest | Forte | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | NON | Zone urbaine ou assimilée | Faible ou nulle | 06/2011<br>05/2012<br>10/2012 |
| B | Ouest | Faible | Sédimentaire | OUI | Zone agricole | Faible ou nulle | 06/2011<br>05/2012<br>10/2012 |
| C | Ouest | Forte | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | NON | Zone urbaine ou assimilée | Forte | 07/2011<br>04/2012<br>10/2012 |
| D | Centre-ouest | Moyenne | Sédimentaire | OUI | Zone agricole | Faible ou nulle | 07/2011<br>04/2012<br>10/2012 |
| E | Centre-ouest | Forte | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | NON | Zone agricole | Forte | 06/2011<br>03/2012<br>11/2012 |
| F | Centre-est | Forte | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | NON | Mixte | Moyenne | 06/2011<br>03/2012<br>10/2012 |
| G | Centre-est | Moyenne | Sédimentaire | NON | Zone agricole | Moyenne | 06/2011<br>03/2012<br>10/2012 |
| H | Nord | Faible | Sédimentaire | OUI | Zone agricole | Faible ou nulle | 06/2011<br>03/2012<br>10/2012 |
| I | Sud-ouest | Faible | Autre | OUI | Zone agricole | Faible ou nulle | 07/2011<br>03/2012<br>12/2012 |
| J | Centre-est | Forte | Autre | NON | Zone naturelle ou assimilée | Faible ou nulle | 07/2011<br>02/2012<br>06/2012 |
| K | Centre-est | Moyenne | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | NON | Zone agricole | Forte | 07/2011<br>02/2012<br>11/2012 |
| L | Centre-est | Moyenne | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | NON | Zone agricole | Forte | 07/2011<br>02/2012<br>11/2012 |
| M | Sud-est | Moyenne | Autre | NON | Zone agricole | Forte | 07/2011<br>04/2012<br>10/2012 |
| N | Sud-est | Faible | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | OUI | Zone agricole | Faible ou nulle | 07/2011<br>04/2012<br>10/2012 |
| O | Sud-est | Faible | Sédimentaire | OUI | Zone naturelle ou assimilée | Faible ou nulle | 07/2011<br>04/2012<br>10/2012 |

**Tableau 10 : Captages retenus pour les campagnes et leurs principales caractéristiques**

Pour les paramètres densité de population, activité et cours d'eau, la valeur présentée est celle majoritaire dans un cercle de 5 km autour du captage

### III.3.1.4. Exemple de pollution détectée dans l'eau de puits de captage

Les polluants ont été recherchés à partir de la table de pics générée par XCMS et contenant l'ensemble des variables détectées dans les empreintes chimique acquises sur les 45 eaux issus des 15 puits de captage sur 3 campagnes. Une annotation de la masse mesurée des variables de la table de pic avec les masses exactes reportées dans la banque de données réalisées à partir de l'introduction directe des standards dans le spectromètre (FIA-MS) avec une tolérance de +/- 5 ppm a été réalisée. Pour tous les cas positifs, une première inspection manuelle a été faite sur la donnée brute afin de vérifier (i) la qualité du signal avec des critères comme l'intensité du pic par rapport au bruit de fond local, (ii) la présence d'un pic chromatographique avec allure gaussienne, (iii) un nombre de spectres consécutifs suffisants et (iv) un massif isotopique en adéquation avec la formule brute du polluant proposée, notamment lors de la présence de soufre, de chlore ou de brome produisant un massif isotopique caractéristique. Ensuite, une confirmation ultime a été réalisée selon 2 critères. Le premier utilise la comparaison du temps de rétention du polluant suspecté avec celui du standard obtenu par injection de ce dernier dans les mêmes conditions chromatographiques que l'analyse de l'eau. Dans le cas d'un temps de rétention identique, le deuxième critère consiste à réinjecter l'eau contenant le polluant suspecté pour qu'il soit fragmenté en HCD à la même énergie normalisée de référence déterminée sur le standard pour une comparaison des spectres CID (Figure 64).

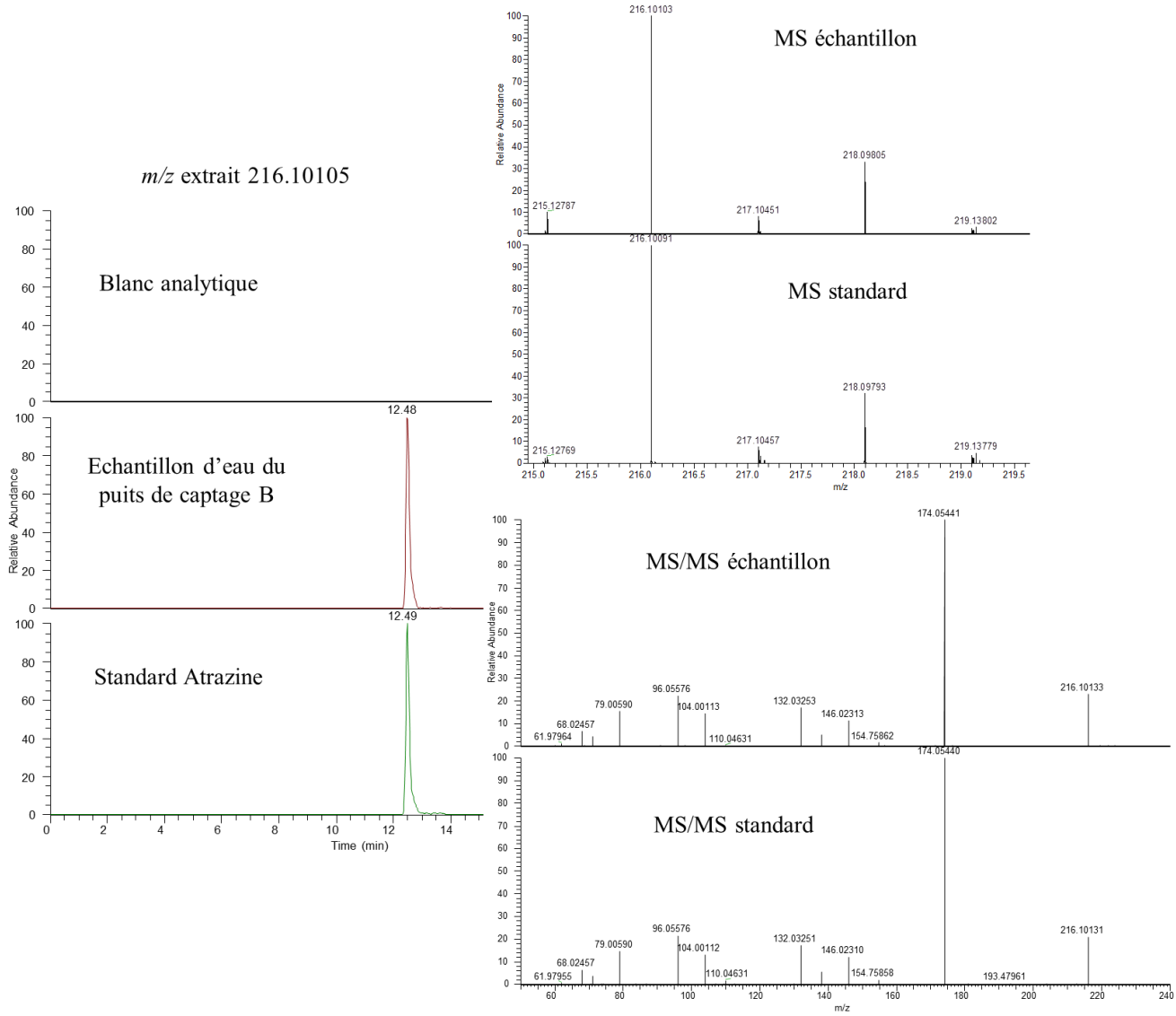



**Figure 64 : Exemple d'une eau polluée à l'atrazine dans le puits de captage B**

A gauche sont présentés les chromatogrammes de l'ion extrait *m/z* 216,10105 +/- 5 ppm d'un blanc analytique, de l'échantillon d'eau du puits de captage B et du standard correspondant à l'atrazine. En haut à droite sont présentés les spectres MS présentant le massif isotopique de l'atrazine dans l'échantillon B et le standard atrazine. En bas à droite sont présentés les spectres MS/MS à 48 % en énergie de collision normalisée de l'échantillon B et du standard atrazine.

### III.3.1.5. Résultats de l'analyse métabolomique pour la recherche de polluants

Parmi les 337 polluants recherchés par analyse métabolomique, 51 ont été détectés au moins une fois dans les 3 campagnes. La Figure 65 présente les fréquences auxquelles ont été détecté chacun des 51 polluants qui ont été repérés au moins une fois parmi les 45 analyses effectués par molécule (15 captages x 3 campagnes de prélèvement). Ces fréquences de détection vont de 2 % à 84 % pour les polluants les plus courants. Un quart de ces

51 molécules sont détectées dans plus de 46 % des cas. Par ailleurs, 6 catégories de polluants ont été retrouvées : 3 antibiotiques, 15 autres médicaments, 7 fongicides, 21 herbicides, 3 insecticides et 2 plastifiants.

Parmi les molécules retrouvées, on note la forte présence (70 % d'apparition) de l'atrazine et de ces métabolites (atrazine-desethyl, atrazine-deisopropyl, atrazine-2-hydroxy) alors qu'elle est interdite en France depuis 2003. Elle pollue aujourd'hui un grand nombre de cours d'eau et est retrouvée dans un grand nombre d'analyses du fait de sa rémanence dans le temps. On note également la présence de la carbamazépine et de la 10,11-époxycarbamazepine, un antiépileptique et son métabolite. Bien que ce médicament ait été jugé comme prioritaire par l'OMS en 2013, il est préoccupant de le retrouver dans l'eau de façon systématique. Il a été proposé comme « marqueur » de la présence de médicaments dans l'eau par de nombreuses études. Parmi les catégories absentes des molécules retrouvées, on retrouve les acaricides et les substances vétérinaires. D'après la SAUR, les polluants retrouvés correspondent à l'occupation du territoire et aux pratiques locales. Ainsi, les acaricides n'étant pas détectés, il semblerait qu'ils soient peu ou pas utilisés dans les régions concernées. Des insecticides à spectre large sont plus souvent utilisés, tel que l'imidaclopride, qui lui est bien retrouvé. Concernant les produits pharmaceutiques vétérinaires, ils sont excrétés de la même façon que les produits pharmaceutiques humains, dans les urines et fèces des animaux sous forme inchangée ou métabolisée. L'approche de la contamination est différente car leur utilisation est moins systématique (seulement en cas de maladie par ordonnance vétérinaire) et la pollution est diffuse. Ces substances sont introduites indirectement par lessivage des biosolides issus de déjections animales épandues sur les sols agricoles puis, par infiltration [35] ce qui peut expliquer leur faible occurrence dans les eaux souterraines.

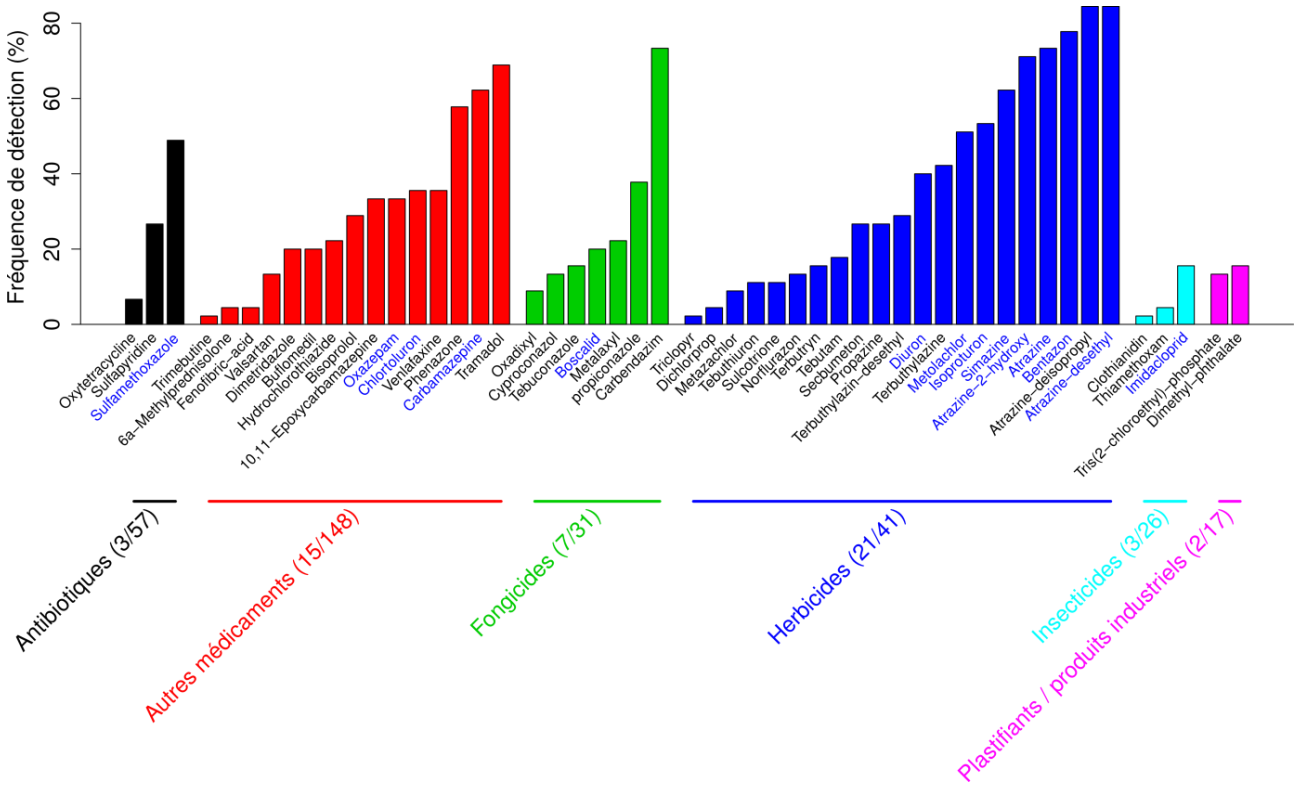



**Figure 65 : Fréquences d'apparition des 51 polluants parmi les 45 analyses effectuées.**

Les noms des composés détectés par les deux approches sont indiqués en bleu.

Sur la Figure 66, on voit que 40 des 51 polluants retrouvés sont les mêmes durant les 3 campagnes. Seuls 2 polluants sont spécifiques de la campagne 3 contre 1 polluant pour la campagne 2. En termes de surveillance et sauf en cas de pollution aiguë, la pollution de ces 15 puits de captages en France est résumée par 51 polluants parmi les 337 que nous avions au départ.

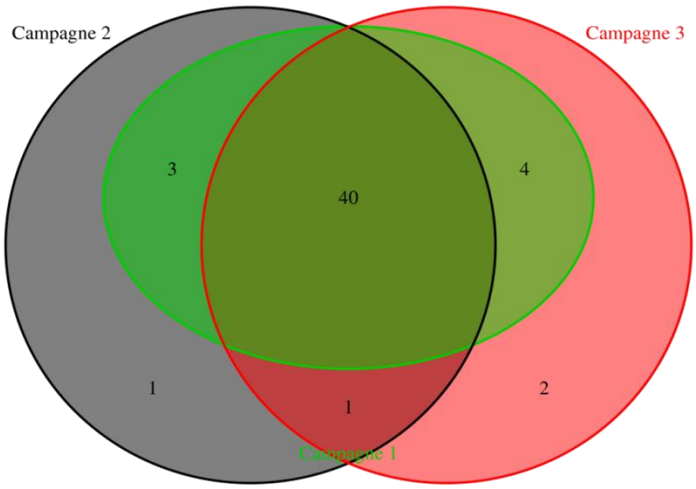



**Figure 66 : Diagramme de Venn présentant l'occurrence des 51 polluants lors des 3 campagnes de prélèvement**

La Figure 67 représente le nombre de polluants détectés au moins une fois par puits de captage. Seulement 2 polluants ont été retrouvés dans le captage le moins pollué contre 37 dans le plus pollué. En moyenne, pour chaque captage, les deux tiers des molécules ont été détectées à plusieurs reprises. Deux exceptions sont à noter : le captage I pour lequel 23 des 25 polluants détectés ont uniquement été repérés lors de la 3ème campagne de prélèvement et le captage L pour lequel seulement un seul des 24 polluants détectés a été repéré lors de la 3ème campagne de prélèvement. La répartition des molécules détectées diffère selon les puits de captage, conséquence probable d'une pollution de nature différente selon le territoire concerné. On notera tout de même que les deux puits de captage les moins pollués en nombre (J et O) sont les seuls captages en zone naturelle ou assimilée.

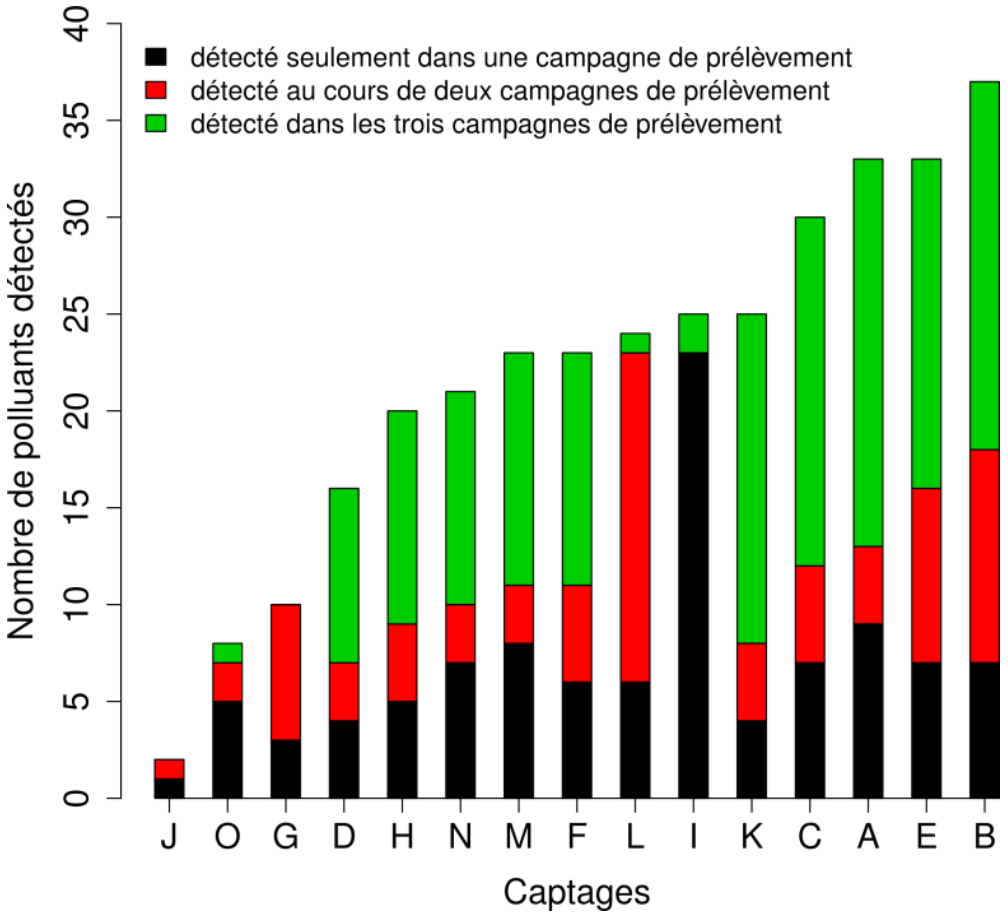



**Figure 67 : Nombre de polluants détectés au moins une fois par puits de captage**

En l'état, il est très difficile de conclure quant aux raisons pour lesquelles le puits de captage I s'est retrouvé très pollué lors de la deuxième campagne et pas du tout lors des deux autres. Il s'agit certainement d'un concours de circonstances multifactorielles comme la pluviométrie ou le traitement de cette zone agricole. De manière générale, ces constatations sont une première ébauche de l'intérêt de l'analyse métabolomique pour la réalisation d'une

cartographie du type d'environnement à risque pour les puits de captage qui sera développée par la suite avec le concours des analyses statistiques.

Certaines molécules étant attendues d'après l'expertise SAUR, il a été décidé de quantifier leur présence afin d'offrir un point de comparaison avec la méthode développée par la société Profilomic et ainsi mieux appréhender sa sensibilité. Pour cela, des analyses conventionnelles ont été réalisées par 2 laboratoires de référence accrédités COFRAC (Comité FRançais d'ACcrédication).

### III.3.2. Comparaison entre l'analyse métabolomique et les analyses conventionnelles

Les zones de recouvrement des deux approches ont été évaluées afin de mieux appréhender leurs intérêts respectifs. Seules les molécules recherchées de façon commune par les deux méthodes ont été comparées, soit 37 polluants. Parmi eux, 6 n'ont été détectés que par les analyses conventionnelles (Figure 68). Cette différence provient de la démarche même des techniques utilisées. Dans la méthodologie conventionnelle, les analyses sont spécifiques à chaque classe de molécule. Les étapes d'extraction et de détection des molécules sont optimisées et adaptées à chacune des classes de molécules que l'on cherche à quantifier. A l'inverse, l'analyse métabolomique se veut globale et la plus universelle possible. Une méthode d'extraction unique est employée et les composés extraits sont tous analysés avec les mêmes paramètres. Par conséquent certaines molécules ne sont pas détectées ou avec des sensibilités très faibles. La méthode utilisée résulte d'un compromis : si elle était optimisée en vue de détecter les 6 composés qui n'ont pas été décelés, cela réduirait le nombre total d'espèces chimiques détectées et limiterait donc la polyvalence de l'approche. En revanche, 17 molécules n'ont été détectées que par le criblage large spectre car les analyses conventionnelles sont réalisées dans un cadre réglementaire avec des exigences en termes de sensibilité souvent supérieures aux limites de détection des appareillages récents employés pour les analyses de criblage.

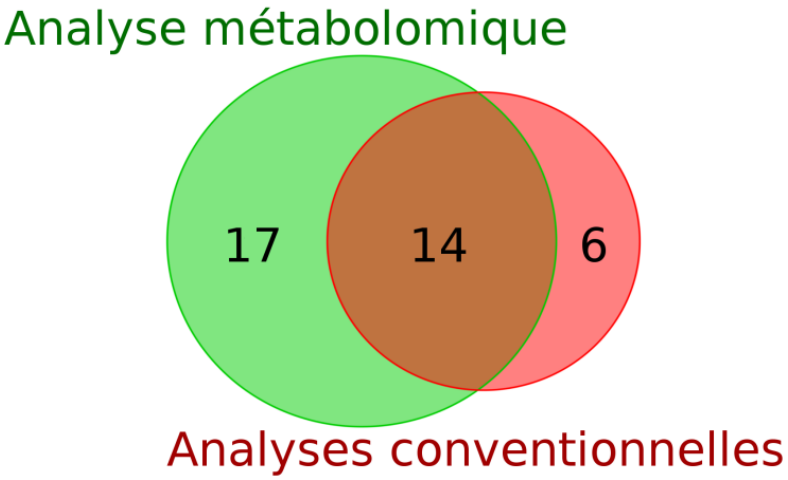



**Figure 68 : Nombre de polluants détectés au moins une fois selon chaque méthode d'analyse parmi les 37 polluants recherchés en commun**

Enfin, 14 polluants marqués en bleu dans la Figure 65 parmi les 37 molécules recherchées ont été retrouvés au moins une fois par chacune des 2 méthodes. Pour chacune de ces molécules et chacune des campagnes, des tests statuant sur sa présence dans un puits de captage ont été réalisés : 14 molécules × 15 captages × 3 campagnes de prélèvements, soit un total de 630 tests. Dans 47% des cas (296 tests), les 2 méthodes sont négatives (la molécule n'est détectée ni par analyse métabolomique, ni par les analyses conventionnelles) et dans 10 % (63 tests), les 2 méthodes sont positives. Dans 1 % des cas (9 tests), les analyses conventionnelles sont positives tandis que l'analyse métabolomique est négative. Dans 41 % des cas (262 tests), les analyses conventionnelles sont négatives tandis que l'analyse métabolomique est positive. Ces résultats montrent que les 2 méthodes aboutissent à des résultats cohérents et que le criblage large spectre est plus informatif. Cette différence de sensibilité pourrait en partie être liée à la technologie de l'appareil utilisé.

L'approche métabolomique utilisée dans cette étude n'étant pas une méthode quantitative, les analyses conventionnelles ont permis de déterminer les concentrations de polluants détectés pour les 37 polluants recherchés en commun.

### III.3.2.1. Quantification réalisée par les analyses conventionnelles

Des méthodes reposant sur l'utilisation de chromatographie liquide ou gazeuse couplées à de la spectrométrie de masse ont été utilisées, quatre pour l'analyse des pesticides et deux pour l'analyses des produits pharmaceutiques. Sur les 63 tests positifs (cf. III.3.2) les concentrations de polluants quantifiées par analyse conventionnelle varient de 0,005 µg/L (sulfaméthoxazole) à 0,55 µg/L (2-hydroxyatrazine). On peut donc penser que pour les

262 tests positifs uniquement par analyse métabolomique, les quantités détectées sont inférieures aux concentrations des molécules détectées par les 2 méthodes et quantifiées par les analyses conventionnelles. Ces observations montrent la pertinence et la sensibilité de l'approche globale par spectrométrie de masse haute résolution mais surtout que les quantités de polluants retrouvées dans les puits de captage sont globalement inférieures aux limites réglementaires. Les niveaux de concentrations en pesticides et en produits pharmaceutiques sont présentés en Figure 69 et Figure 70.

Les captages sélectionnés présentent différents types de réponses en termes de pollution en pesticides. Le nombre de molécules quantifiées par captage varie de 0 (captages J et O) à 9 (captage H) et reste de manière générale inférieur ou égal à 4. La valeur extrême retrouvée pour le captage H peut s'expliquer par un taux de précipitation important la veille de la campagne de prélèvement, aux alentours de 25 mm, pouvant entraîner une pénétration directe de la pollution dans la nappe de cet aquifère karstique. Parmi les 15 captages suivis, 3 (A, B et H) présentent une concentration totale en pesticides supérieure ou égale à 0,5 µg/L. Pour les autres, la concentration totale est inférieure ou égale à 0,2 µg/L. La famille des triazines est majoritairement représentée. La 2-hydroxyatrazine (métabolite de l'atrazine) dépasse 0,1 µg/L dans 7 cas et seuls les captages J et O n'en ont pas présenté. Même si l'atrazine a été interdite en 2003, sa persistance dans l'environnement entraîne une présence importante de ses métabolites dans les eaux souterraines.

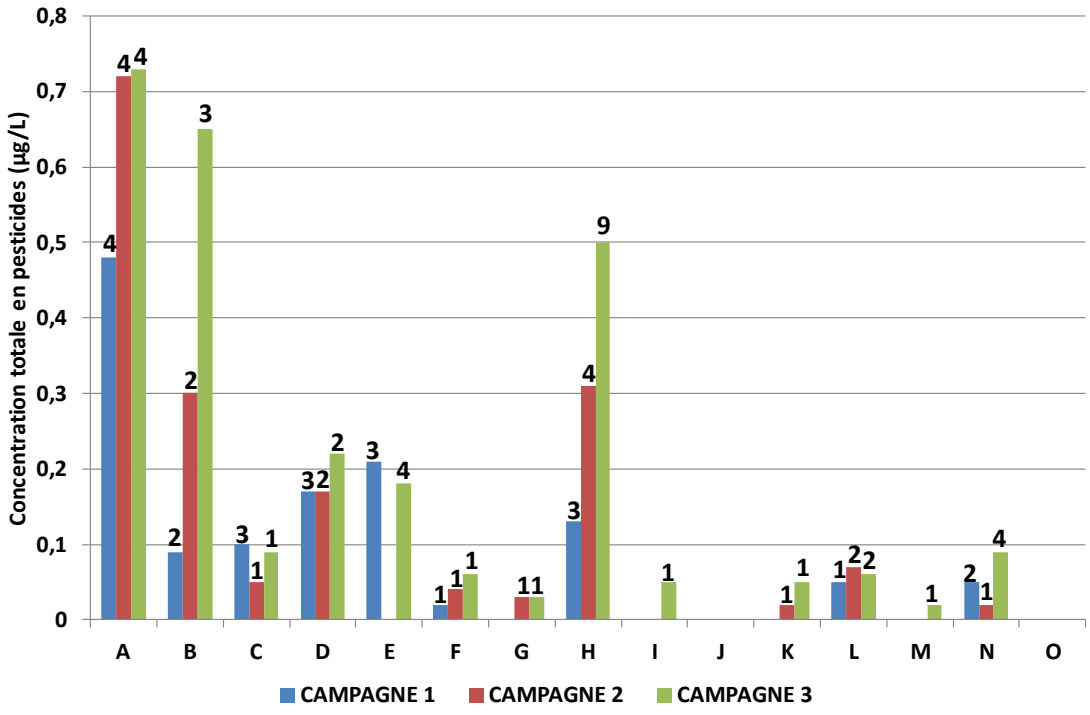



**Figure 69 : Concentration totale en pesticides par captage et par campagne**

Le nombre de substances retrouvées est mentionné au-dessus des séries de données.

Pour les produits pharmaceutiques, 4 captages (D, F, G et H) n'ont pas montré de contamination. Près de la moitié des échantillons contaminés ne le sont qu'avec une substance. En termes de concentration, près d'un tiers des échantillons positifs ont une concentration totale inférieure ou égale à 20 ng/L. La concentration totale maximale est de 157 ng/L dont 151 ng/L de caféine (captage K). Notons que seuls les captages K et L présentent une contamination à un ou plusieurs produits pharmaceutiques lors des 3 campagnes. Les molécules les plus retrouvées sont la carbamazépine (antiépileptique), la caféine (stimulant psychotrope) et le sulfaméthoxazole (antibiotique humain et vétérinaire).

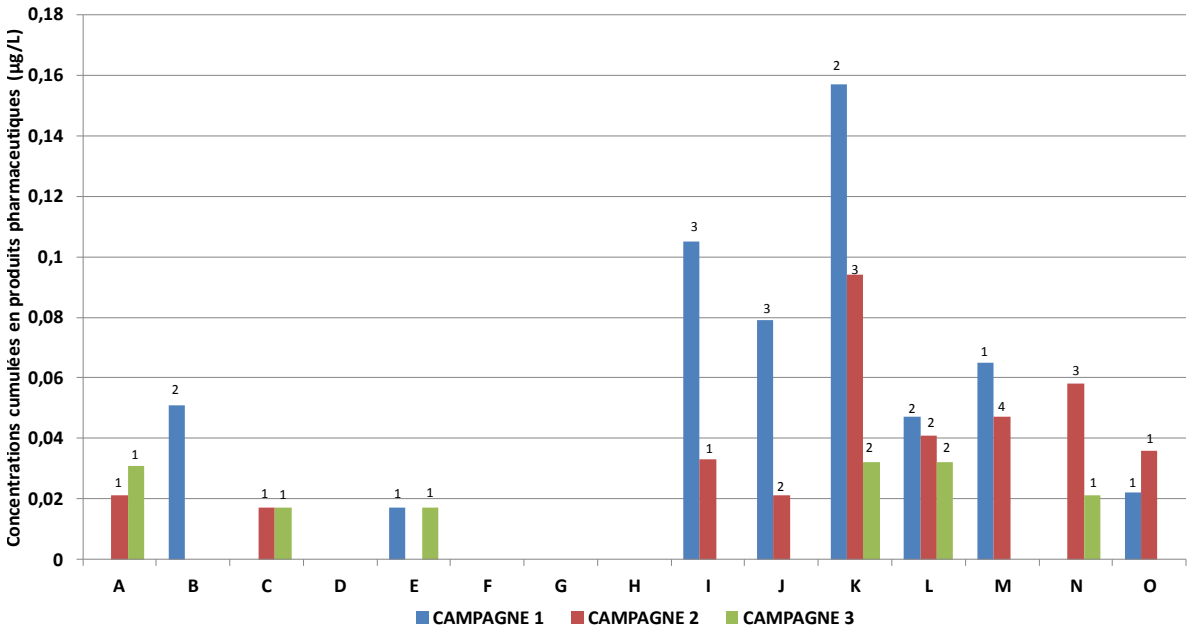



**Figure 70 : Concentration totale en produits pharmaceutiques par captage et par campagne**

Le nombre de substances retrouvées est mentionné au-dessus des séries de données.

### III.3.3. Analyses statistiques univariées

Après cette première étape concernant la détection de polluants chimiques organiques dans les eaux issues des puits de captage, nous avons tenté de relier ce risque de pollution aux caractéristiques des aquifères et de leur environnement. Chaque paramètre a été testé à l'aide d'un test du $\chi^2$. Dans un second temps, des ACP ont été réalisées afin de structurer les échantillons analysés en fonction de leurs métadonnées et ainsi découvrir la métadonnée explicative la plus pertinente.

### III.3.3.1. Liens entre les caractéristiques du territoire et des aquifères, et le risque de pollution par les micropolluants

#### III.3.3.1.1. Effet de la campagne de prélèvement (effet saison)

Le premier effet testé concerne la campagne et permet de voir s'il existe un lien entre saison (printemps, été et automne) et le risque de pollution. On peut, en effet, s'interroger sur les effets d'une période particulièrement pluvieuse (automne) qui va lessiver les sols et entraîner les polluants de la surface vers les nappes phréatiques ou au contraire sur une période (printemps) durant laquelle de nombreux agriculteurs vont pulvériser des pesticides sur leur champ pour protéger les récoltes d'été. Le Tableau 11 présente la fréquence d'apparition des polluants en fonction de la campagne. On constate que les fréquences d'apparition des polluants sont indépendantes de la campagne sur la base de notre échantillonnage, bien que les conditions climatiques aient différées entre les 3 prélèvements, notamment la pluviométrie.

| Campagne | Fréquence d'apparition* | Erreur standard |
|---|---|---|
| C1 | 31% | 2% |
| C2 | 28% | 2% |
| C3 | 33% | 2% |

**Tableau 11 : Fréquences d'apparition en fonction de la campagne de prélèvement**

*fréquences non significativement différentes : $\chi^2$ *p-value* = 0,12

#### III.3.3.1.2. Effet de la densité de population

Une forte densité de population pourrait être corréler avec un plus fort risque de pollution par les médicaments plutôt que par les pesticides en raison de la consommation des hôpitaux et de la médecine de ville. Le Tableau 12 indique que la fréquence d'apparition des polluants est statistiquement plus importante dans les zones à forte densité de population comparativement aux densités moyenne et faible. En revanche, on ne constate pas de différences marquées entre le nombre de médicaments et de pesticides retrouvées. Sur la Figure 71 sont présentés quatre exemples de molécules dont la fréquence d'apparition est impactée par la densité de population. On retrouve aussi bien des médicaments comme le tramadol (un antidouleur) et la carbamazepine que des pesticides comme l'atrazine et le diuron.

| Densité de population | Fréquence d'apparition* | Erreur standard |
|---|---|---|
| Faible | 29% | 2% |
| Moyenne | 27% | 2% |
| Forte | 36% | 2% |

**Tableau 12 : Fréquences d'apparition en fonction de la densité de population**

*fréquences significativement différentes : $\chi^2$ *p-value* = 2,01 x $10^{-4}$

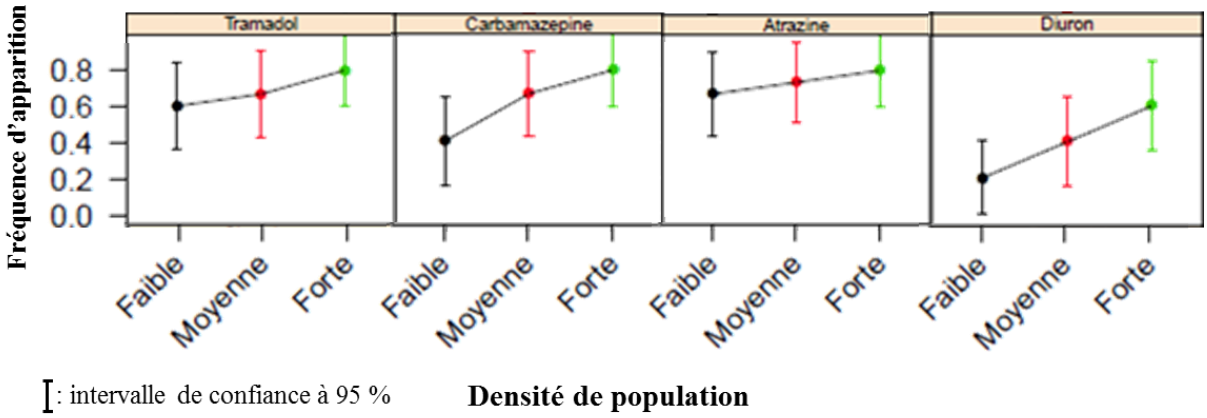



**Figure 71 : Exemple de molécules impactées par la densité de la population**

III.3.3.1.3. Effet du type géologique des nappes

Le type géologique des nappes est un caractère spécifique d'une masse d'eau dépendant du terrain dans laquelle elle est contenue. Une nappe alluviale est une nappe peu profonde située dans un sol perméable généralement sous un cours d'eau avec lequel elle communique. Une nappe en domaine sédimentaire est composée de roches poreuses ou fracturées composés de sables, grès, calcaire ou craie déposées en vastes couches. Sur le Tableau 13 on voit que le type géologique de nappe influe de manière très significative sur la fréquence d'apparition des polluants, notamment pour les nappes alluviales. On peut faire l'hypothèse que ces dernières sont particulièrement exposées aux polluants car ce type de nappe communique directement avec les cours d'eau de surface soumis à l'ensemble de l'activité humaine. De plus, ces nappes sont composés d'un sol perméable qui ne filtre pas toujours de manière efficace les matières organiques ce qui pourrait expliquer ce risque de contamination accrue. Cet effet est particulièrement marqué pour la molécule atrazine et ses métabolites (Figure 72) qui ont tous un risque plus important de pollution sur des nappes de type géologique alluviale. Ce pourrait

être lié au fait que l'atrazine est un pesticide relativement mobile avec un logP de 2,75. Cette molécule est particulièrement sensible à la photo-dégradation et aux transformations biologiques en milieu oxique comme ce peut être le cas dans les nappes alluviales ce qui pourrait expliquer la forte fréquence d'apparition des métabolites dans ce type de nappe.

| Type géologique de nappe | Fréquence d'apparition* | Erreur standard |
|---|---|---|
| Alluviale | 40% | 1% |
| Sédimentaire | 26% | 2% |
| Autre | 18% | 2% |

**Tableau 13 : Fréquences d'apparition en fonction du type géologique de nappe**

*fréquences significativement différentes : $\chi^2$ *p-value* < 2,2 x $10^{-16}$

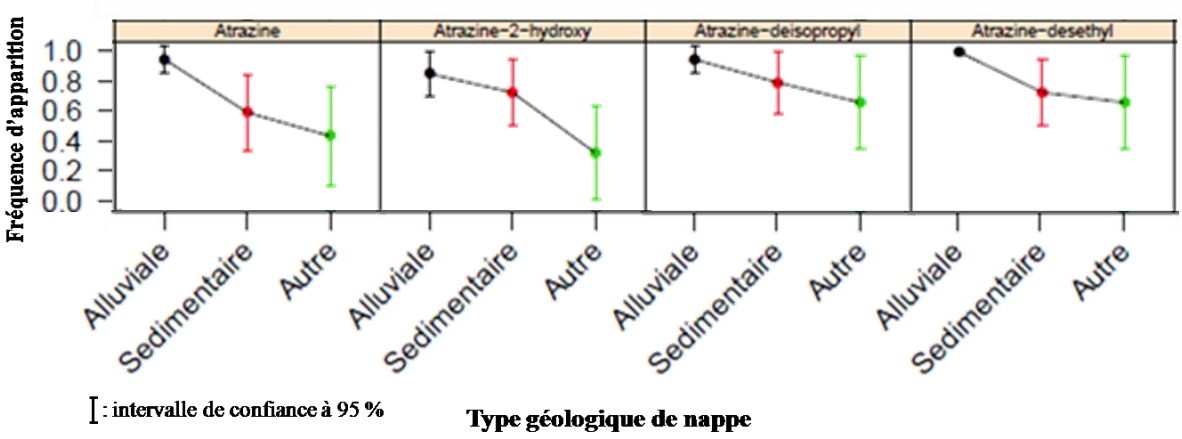



**Figure 72 : Exemple de molécules influencées par le type géologique de nappe**

III.3.3.1.4. Effet du type d'activités

De prime abord, il semble normal de penser que la présence d'activité humaine ainsi que leur nature peut influer sur le type de pollution retrouvée ainsi que sur le risque de pollution. Parmi les captages sélectionnés, 4 types d'activités ont été répertoriés : (i) zone naturelle, (ii) zone agricole, (iii) zone urbaine et (iv) mixte. Le Tableau 14 indique de manière significative et marquée que le risque de pollution dépend du type d'activité. On constate sans surprise que les zones urbaines, mixtes et agricoles ont un risque de pollution important comparativement à la zone naturelle.

| Type d'activités | Fréquence d'apparition* | Erreur standard |
|---|---|---|
| Mixte | 34% | 4% |
| Zone naturelle | 5% | 1% |
| Zone agricole | 32% | 1% |
| Zone urbaine | 48% | 3% |

**Tableau 14 : Fréquences d'apparition en fonction du type d'activité**

*fréquences significativement différentes : $\chi^2$ *p-value* < 2,2 x $10^{-16}$

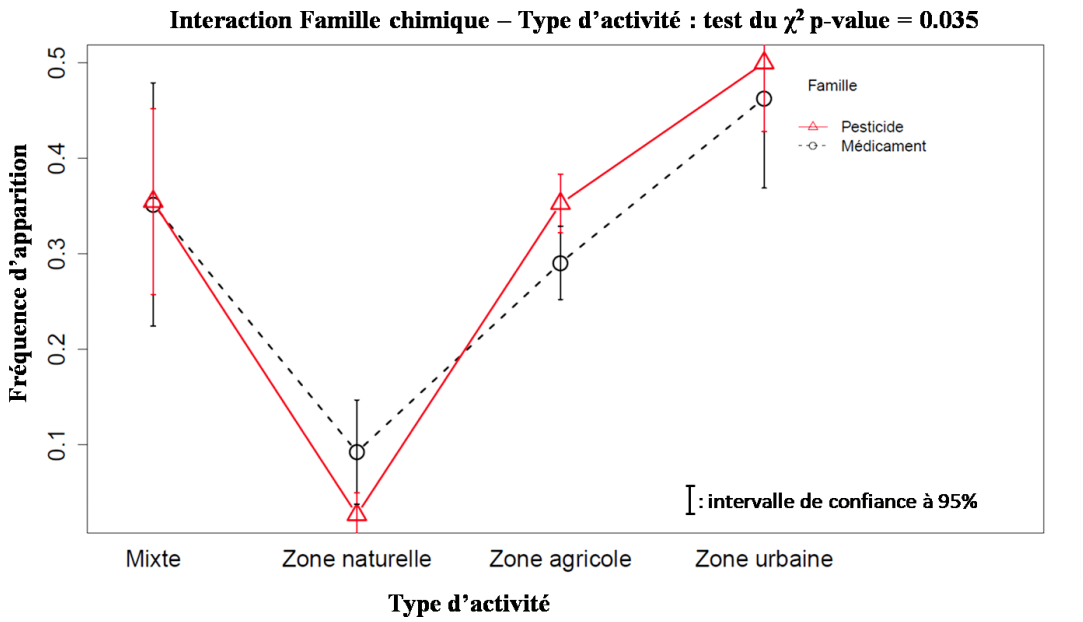



**Figure 73 : Fréquence d'apparition des polluants en fonction du type d'activité corrélé aux familles chimiques observées**

Le type de pollution (médicament *versus* pesticides) est également significativement différent en fonction du type d'activité (p-value = 0,035). Alors que nous aurions pu nous attendre à un risque plus élevé de détection des médicaments en zone urbaine et de pesticides en zone agricole, la Figure 73 indique que ces hypothèses ne se vérifient pas par notre échantillonnage. On voit, en effet, que le risque de pollution aux pesticides est plus fort partout sauf en zone naturelle.

III.3.3.1.5. Effet de la présence de cours d'eau

La présence d'un ou de plusieurs cours d'eau à proximité d'un puits de captage implique la possibilité d'échanges avec les masses d'eau souterraine ainsi qu'un charriage des matières potentiellement polluantes rencontrées au fil de l'eau. Il n'est donc pas surprenant de constater sur le Tableau 15 un risque de pollution accru lorsque le puits de captage est à proximité d'une forte densité de cours d'eau avec un effet significatif.

| Présence cours ou plan d'eau | Fréquence d'apparition* | Erreur standard |
|---|---|---|
| Faible ou nulle | 27% | 1% |
| Moyenne | 23% | 2% |
| Forte | 40% | 2% |

**Tableau 15 : Fréquences d'apparition en fonction de la présence de cours d'eau à proximité du puits de captage**

*fréquences significativement différentes : $\chi^2$ *p-value* = 3,47 x $10^{-10}$

III.3.3.1.6. Effet de la position géographique des puits de captage

La pollution des nappes phréatiques est probablement le reflet de la pollution au niveau locale. Pour le vérifier, nous avons regardé par ce test si le risque de pollution est fonction de la position géographique des points de captage. Il apparaît nettement au vu du Tableau 16 que le risque de pollution est fonction de la position géographique du captage. Le risque de pollution est deux fois plus important sur les puits de captage situé à l'ouest comparativement à tous les autres. Sur le papier, cette constatation ne semblait pas évidente car les puits de captage situés dans le sud-est sont situés le long du Rhône non loin de la vallée de la chimie. Pour ce qui est des puits de captage situés à l'ouest, cette terre rurale abrite de nombreux élevages et cultures soumises à de multiples produits de traitement ce qui explique peut-être en partie les résultats.

Une différence significative de la famille chimique retrouvée en fonction de la position géographique est observée. C'est ce que montre la Figure 74 où l'on observe que les captages situés à l'ouest sont pollués par des médicaments et des pesticides à parts égales tandis que les captages à l'est et les captages isolés sont d'avantage pollués par des pesticides que par des médicaments. Sur la base de ce constat, il est très difficile de donner une explication rationnelle car les mécanismes de pollution sont plurifactoriels et complexifiés par les mouvements d'eau et les cycles hydrologiques.

| Position | Fréquence d'apparition* | Erreur standard |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| isole | 25% | 2% |
| est | 23% | 2% |
| sud-est | 24% | 1% |
| ouest | 45% | 2% |

**Tableau 16 : Fréquence d'apparition en fonction de la position géographique des puits de captage**

*fréquences significativement différentes : $\chi^2$ *p-value* < 2,2 x $10^{-16}$

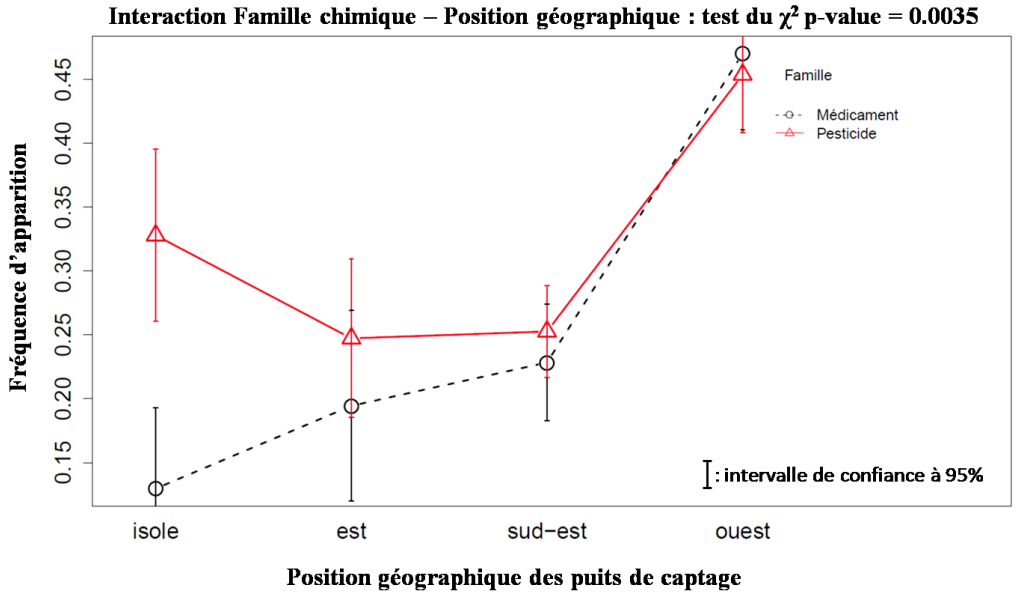



**Figure 74 : Fréquence d'apparition des polluants en fonction de la position géographique corrélée aux familles chimiques observées**

En conclusion, les tendances dégagées par cette étude statistiques du risque de pollution en fonction des caractéristiques du territoire et des aquifères sur la base de notre échantillonnage de 15 puits de captage sont les suivantes :

- Le risque de pollution n'est pas impacté par la saison.
- Une forte densité de population est associée à un plus grand risque de pollution qu'une densité faible ou moyenne.
- Les nappes alluviales ont été identifiées comme un facteur aggravant le risque de pollution comparativement aux autres types de nappe.
- Un captage en zone urbaine est plus sensible qu'en zone agricole ou naturelle et un captage en zone agricole est plus sensible qu'en zone naturelle.
- Les captages en zone agricole présentent une pollution en pesticides plus importante qu'en produits pharmaceutiques.

- Une présence importante de cours d'eau est plus associée à un risque accru de pollution qu'une présence nulle, faible ou moyenne.
- Les captages situés à l'ouest sont associés à un risque plus fort de pollution que les captages isolés, à l'est ou au sud-est. Les captages isolés sont plus pollués en pesticides qu'en produits pharmaceutiques.

Ces tendances ne traduisent pas nécessairement des liens de cause à effet et certaines peuvent être la conséquence de facteurs partiellement confondants du fait du plan d'expérience assujetti à des contraintes, notamment logistiques et de représentativité du parc exploité par Saur. Cependant, ces résultats qui devront être confirmés vont permettre au groupe SAUR de renforcer la surveillance des captages présentant le plus grand risque de pollution.

### III.3.4. Analyse en composantes principales

Une analyse en composantes principales a également été réalisée afin de mettre en évidence une hiérarchisation des données. L'ensemble de la table de pics générée par XCMS, sur laquelle ont été appliquées une normalisation LOESS à l'aide des QC et une transformation logarithmique, a été utilisée. La Figure 75 présente l'ACP des 45 analyses (15 puits de captage × 3 campagnes) colorées en fonction de la position géographique. On voit l'empreinte chimique acquise est fortement corrélée avec la position géographique du captage avec plus de 49 % de variabilités du jeu de données expliqué sur la première composante. Ces résultats viennent corréler la tendance observée à propos du risque de pollution en fonction de la position géographique et indique donc que les molécules polluantes ou non présentes dans l'eau sont très différente d'une région à l'autre.

Nous avons ensuite essayé de mettre en évidence quelques molécules responsables de cette discrimination mais sans succès. Il ne s'agissait pas de polluants préalablement annotées. De manière générale, cette ACP indique des compositions chimiques très différentes de l'eau. On note une forte variabilité à l'échelle d'un pays suggérant un effet matrice différent selon l'eau analysé et donc des performances analytiques variables en fonction de l'origine géographique. A ce titre, il faut être prudent lors de rendu de résultats d'eaux provenant de sites différents avec une forte variabilité. Un autre enseignement de cette analyse est la vérification des performances analytiques dans l'échantillon analysé afin de s'assurer de la capacité du système à détecter la molécule polluante. La meilleure solution est de réaliser un contrôle supplémenté à la concentration réglementaire de tous les échantillons analysés afin de vérifier la détection du polluant et l'effet matrice. Ce résultat bouscule quelque peu les habitudes en matière d'analyse réglementaire dans l'eau car ce contrôle positif de tous les échantillons

n’est habituellement pas fait. A la place, une validation de la méthode est réalisée selon les textes en vigueur sur 3 eaux de référence considérant que la variabilité des eaux rencontrées est suffisante.

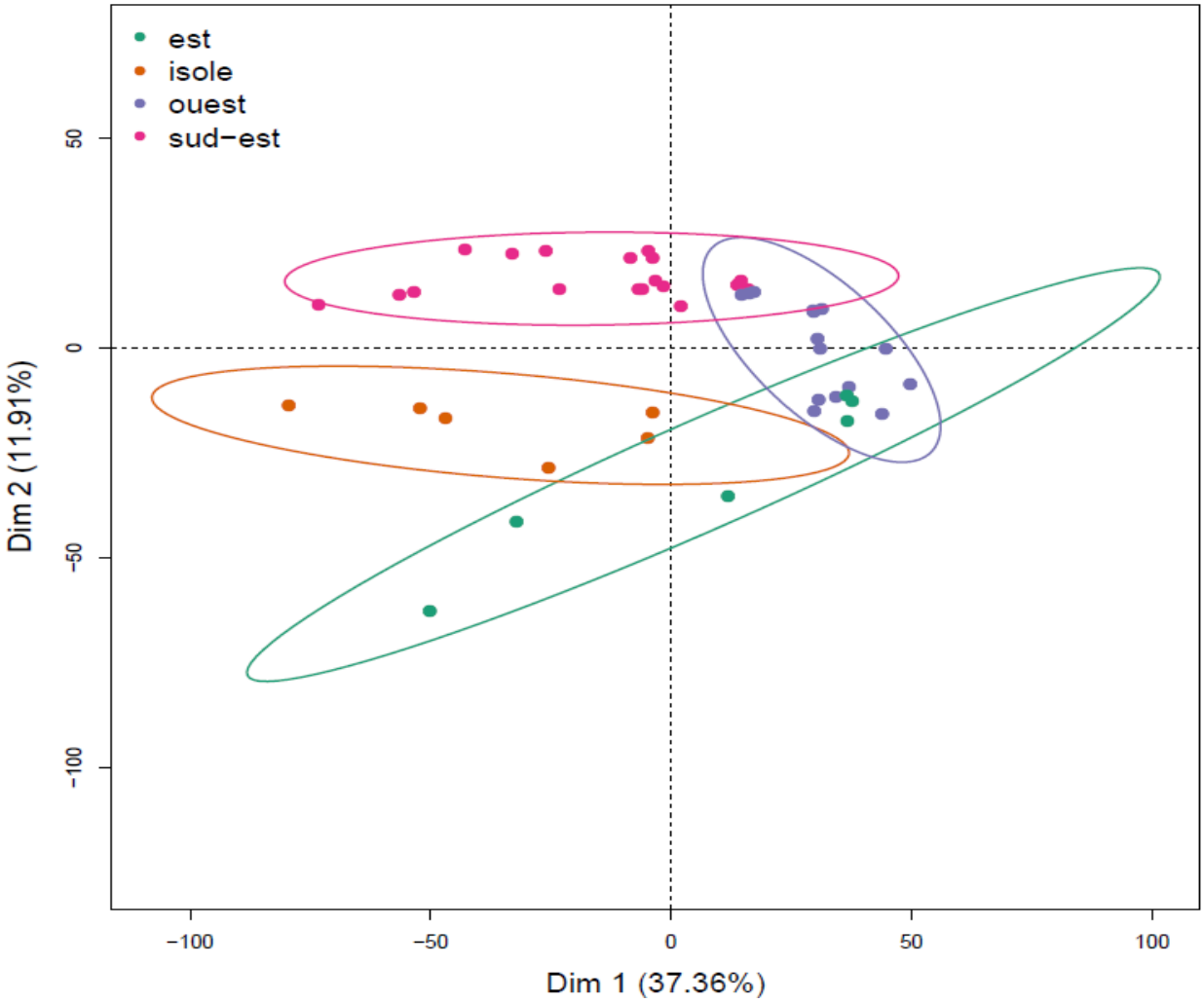



**Figure 75 : ACP des 45 analyses et colorées en fonction de leur position géographique**

## III.4. **Conclusion**

Cette étude avait pour objectif la caractérisation physico-chimique de 15 puits de captage en France. Une approche innovante et sensible a donc été appliquée lors de ce travail collaboratif entre Saur et Profilomic avec pour objectif l’estimation du niveau de contamination de ces 15 puits de captage par les micropolluants organiques à l’aide d’un criblage ciblé d’une large liste de 337 polluants connus. Dans un second temps, un lien entre risque de pollution et caractéristiques des territoires et des aquifères a été établi afin de mettre en évidence un profil de captage sur lequel une surveillance et des traitements supplémentaires pourraient être réalisées.

Les résultats de cette étude montrent que l'acquisition d'une empreinte chimique permet de détecter des molécules polluantes en plus grand nombre et vraisemblablement à de plus faibles concentrations que les analyses conventionnelles. En outre, les analyses conventionnelles ont permis la quantification des principaux polluants retrouvés et ont ainsi montré des niveaux de concentrations généralement faibles pour l'ensemble des molécules, exceptés pour certains pesticides, lesquels peuvent dépasser ponctuellement les 0,1 µg/L. Le criblage large spectre conforte cette idée de pollution relativement faible considérant que les polluants supplémentaires détectés le sont à des concentrations faibles. Différents polluants peuvent être retrouvés selon l'occupation majeure du territoire (zone à dominante urbaine, agricole ou naturelle). Cette approche nouvelle est complémentaire des analyses conventionnelles. Des analyses ciblées sur des listes prédéfinies de polluants de plus en plus vastes seront alors possibles grâce à l'incrémentation en continu des bases de données.

Il existe une micro pollution environnementale peu ou pas prise en compte à l'heure actuelle impliquant principalement des composés inconnus ou non suivis. Les listes de polluants recherchés ne contiennent qu'une faible partie de la multitude des molécules potentiellement présentes dans l'environnement pouvant être générées par des transformations abiotiques ou biologiques formant des sous-produits de dégradation et de métabolisation. Une approche plus globale et permettant la mise en évidence de certaines de ces molécules, consisterait à comparer, par une étude statistique, les empreintes chimiques de plusieurs échantillons pour en faire ressortir sans a priori les molécules qui les discriminent.

Les analyses statistiques réalisées sur les données obtenues par le criblage et les données recensées par Saur pour la caractérisation de ses captages ont permis de mettre en évidence certains paramètres liés à un risque de pollution accru. Parmi ceux-ci, on peut citer une forte densité de population, une géologie de type alluviale, et une présence forte de cours d'eau. Grâce à cette étude, Saur possède une meilleure connaissance de ses ressources pour la surveillance de ses captages ainsi que pour l'adaptation des filières de traitement pour la production d'eau potable. En réponse à cette étude, une solution de traitement, à base de charbon actif micro grain fluidisé (procédé CarboPlus®G) va être proposée.

# IV. BILAN DES ETUDES DE PREUVE DE CONCEPT

Notre objectif était de réaliser des études pilotes permettant d'illustrer l'apport de l'analyse métabolomique par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution pour la caractérisation chimique des matrices agro-alimentaires et environnementales. Pour cela, nous avons réalisé des empreintes chimiques globales de chaque échantillon des deux matrices analysées. Les données brutes ont été traitées à l'aide d'outils de fouille de données utilisés classiquement en métabolomique tels que les analyses statistiques ou des algorithmes d'annotation écrits dans le langage R. Dans le cas de l'analyse du miel, une analyse ciblée de polluants connus a révélé la présence de nombreux contaminants. Une analyse de xénobiotiques chlorées et des analyses statistiques uni et multivariées ont permis de mettre en évidence des polluants inconnus ou non suspectés ainsi que des marqueurs spécifiques de l'origine florale des miels permettant la création d'un modèle prédictif. Lors de la collaboration avec la SAUR, 15 puits de captage sur 3 campagnes ont été analysés afin de détecter de nombreux polluants à de faibles concentrations, certainement en deçà des limites de détection des appareils de type TQ utilisés en comparaison de l'analyse métabolomique. Une analyse statistique sur la base des polluants détectés et sur les caractéristiques du territoire et des aquifères a également permis de mettre en évidence le type de captage le plus sensible à la pollution.

Ces deux preuves de concept réalisées sur la matrice miel et sur l'eau issue de puits de captage ont fourni des résultats au-delà de la « simple » détection ciblée de polluants connus et montrent l'étendue des possibilités de l'analyse métabolomique par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution.

Fort de ces expériences, la société Profilomic a mis à profit les compétences acquises au service d'un projet de grande envergure sur la sécurité alimentaire coordonné par la société Eurofins. L'objectif de ce projet, nommé AgriFood GPS, est la création de méthodes analytiques innovantes pour la détection précoce de fraudes et de pollution dans des matrices agroalimentaires et environnementales pour améliorer la sécurité alimentaire. Le travail de cette thèse s'inscrit dans le cadre de ce projet dont la première partie concernant le développement d'une analyse ciblée sur une chimiothèque de 800 composés qui est décrit dans le troisième chapitre.

# CHAPITRE III.

# *DEVELOPPEMENT D'UNE ANALYSE CIBLEE A LARGE SPECTRE DANS L'EAU*

# I. INTRODUCTION

## I.1. **Contexte**

L'industrie agroalimentaire importe des matières premières et des ingrédients provenant de pays de plus en plus lointains. Les échanges commerciaux de produits alimentaires mondiaux ont ainsi été multipliés par trois en 20 ans [439]. Ce marché international accroît les risques de contamination des produits agroalimentaires. Pour exemple, le cas de la mélamine en 2008 dans la poudre de lait frelatée a secoué l'industrie agro-alimentaire, certains industriels évoquant même une comparaison avec le « 11 septembre » pour cette industrie. Dans ce contexte de mondialisation des produits alimentaires, les industriels doivent également faire face à une défiance de plus en plus importante de la part des consommateurs qui s'intéressent à l'origine et à la qualité de ce qu'ils mangent notamment en matière de polluants chimiques. Ce climat est largement alimenté par les médias grands publics qui relayent les études scientifiques chocs et autres scandales concernant l'eau ou l'industrie agro-alimentaire, ce qui pousse bien souvent les instances gouvernementales et politiques à réagir en faveur de règlementations toujours plus strictes pour la sécurité du consommateur. Pour traduire cette défiance, on peut prendre l'exemple de la progression du chiffre d'affaire des ventes de produits issus de l'agriculture biologique censés être dénués ou moins concentrés en produits polluants. Les ventes ont progressé de 191 % en 8 ans passant de 1,5 milliards en 2005 à 4,5 milliards d'euros en 2013 [440]. Cette préoccupation croissante des consommateurs à l'égard de la sécurité alimentaire pousse certains industriels à la plus grande prudence. Ceux-ci n'hésitent plus à jouer le jeu de la transparence dans leur campagne de communication à propos des teneurs en pesticides dans leurs produits. Pour exemple, le groupe Blédina annonce un taux de pesticides dans les petits pots de purée de carotte pour bébé « proche de zéro » dans une publicité destinée à la télévision début 2014. De manière générale, le coût des crises pour une entreprise est extrêmement important et va même au-delà de l'incidence financière en cas de rappel de produits. Les conséquences de ces crises sur l'image de marque est particulièrement délétère et nuit à la confiance des consommateurs qui se détournent irrémédiablement ou sur une longue période des produits de la marque incriminée. C'est dans ce contexte où l'actualité sur la pollution des eaux et des denrées alimentaires est omniprésente qu'a été initié le projet AgriFood GPS (de l'anglais *Global Protection System*). Il a pour but l'amélioration de la sécurité alimentaire et tend à répondre aux demandes croissantes des industriels en matière de détection de polluants ou de fraudes.

## I.2. **Objectifs du projet Agrifood GPS**

Le projet AgriFood GPS s'intéresse au développement de nouvelles approches analytiques pour mieux appréhender les risques alimentaires, en détectant les dangers émergeants ou fraudes, de la manière la plus exhaustive possible dans les produits alimentaires. L'enjeu est de développer un service intégré permettant d'anticiper les risques alimentaires. C'est la logique même de l'analyse qui est revisitée : alors que les méthodes d'analyse et de contrôle utilisées aujourd'hui se limitent à une approche ciblée de cribale multi-résidus (prédéfinition des contaminants recherchés), le projet AgriFood GPS a pour objectif de prendre en compte les contaminations potentielles non évaluées ou même inconnues. Il existe ainsi des méthodes spécifiques pour des contaminants tels que l'acrylamide ou la mélamine. Dans le cadre de ce projet, l'objectif est de réaliser une analyse par type de produits pour la détection simultanée de contaminants de familles chimiques variées susceptibles de polluer la matrice étudiée. En intégrant des outils métabolomiques, il s'agira est de détecter aussi les contaminations chimiques, microbiologiques et les fraudes de manière non ciblée, sans *a priori*.

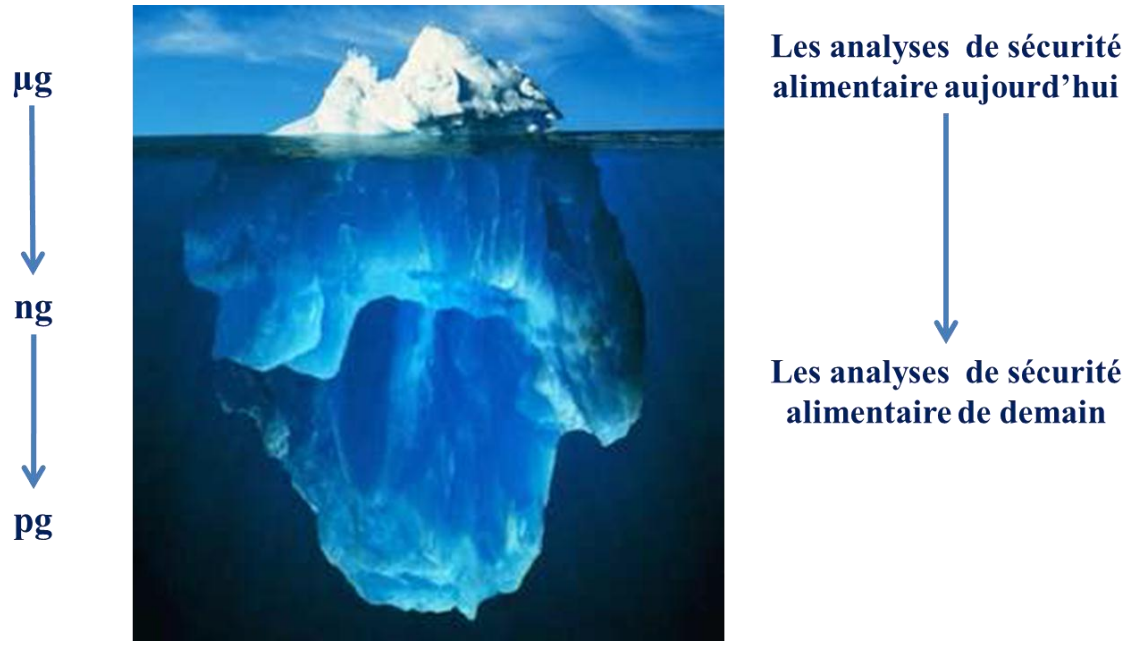



**Figure 76 : Les enjeux du projet Agrifood GPS**

On peut imager l'approche AgriFood GPS telle que le montre la Figure 76. Les analyses de sécurité alimentaire d'aujourd'hui ne représentent qu'une petite partie de l'iceberg compte tenu des sensibilités atteintes par les appareils utilisés et de l'ensemble des métabolites et produits de transformations non pris en compte. Or, il est utile à la fois pour les industriels et les consommateurs d'être informés de la pollution sous-jacente potentiellement présente afin

de prévenir les risques de crise pour les industriels et les dangers à long terme pour les consommateurs. Le criblage d'une matrice devrait permettre d'obtenir un profil rapide et une détection exhaustive des dangers potentiels présents dans le produit. Des techniques de pointe comme la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) et la spectroscopie Raman seront couplées à la mise en place de bases de données de matrices alimentaires variées (produits laitiers, carnés, céréales, produits de la mer, eaux…).

Pour résumé, les avantages apportés par l'approche AgriFood GPS en cas de succès sont :

- Le criblage rapide et le plus exhaustif possible de l'échantillon avec une orientation rapide vers des analyses poussées.
- La détection simultanée de contaminants de familles chimique différentes à l'aide d'une seule analyse.
- Une probabilité accrue de mettre en évidence un danger non évalué.
- Un gain de temps et des économies pour les industriels.
- La contribution à l'amélioration de la sécurité alimentaire et de la santé des consommateurs.

## I.3. **Organisation du projet**

Ce projet est issu d'une collaboration entre 7 partenaires comprenant l'entreprise Eurofins (porteur du projet) spécialisé dans les analyses agro-alimentaires et environnementales, l'équipementier Bruker leader mondial en Résonance Magnétique Nucléaire, la société Profilomic spécialisée en spectrométrie de masse haute résolution et des instituts publics tels que AgroParisTech spécialisé en chimiométrie, l'Université de Nantes et l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM) spécialistes de la technique RAMAN ainsi que le Laboratoire d'Intégration des Systèmes et des Technologies du CEA de Saclay (CEA LIST) spécialisé en bioinformatique. Ce consortium d'acteurs publics et privés regroupe des structures à la pointe de la technologie dans leurs spécialités afin de favoriser des approches différentes et une recherche pluridisciplinaire de grande qualité.

Le projet AgriFood GPS a démarré en 2012, pour une durée de 5 ans. Les financements dont dispose le projet sont supérieurs à 15 millions d'euros, provenant en partie du programme d'Innovation Stratégique Industrielle (ISI) de Bpi France, et des fonds propres des laboratoires et entreprises. Pour une meilleure organisation de travail, le programme a été divisé en 7 lots (Figure 77) afin d'allouer les tâches à réaliser par un ou plusieurs partenaires.

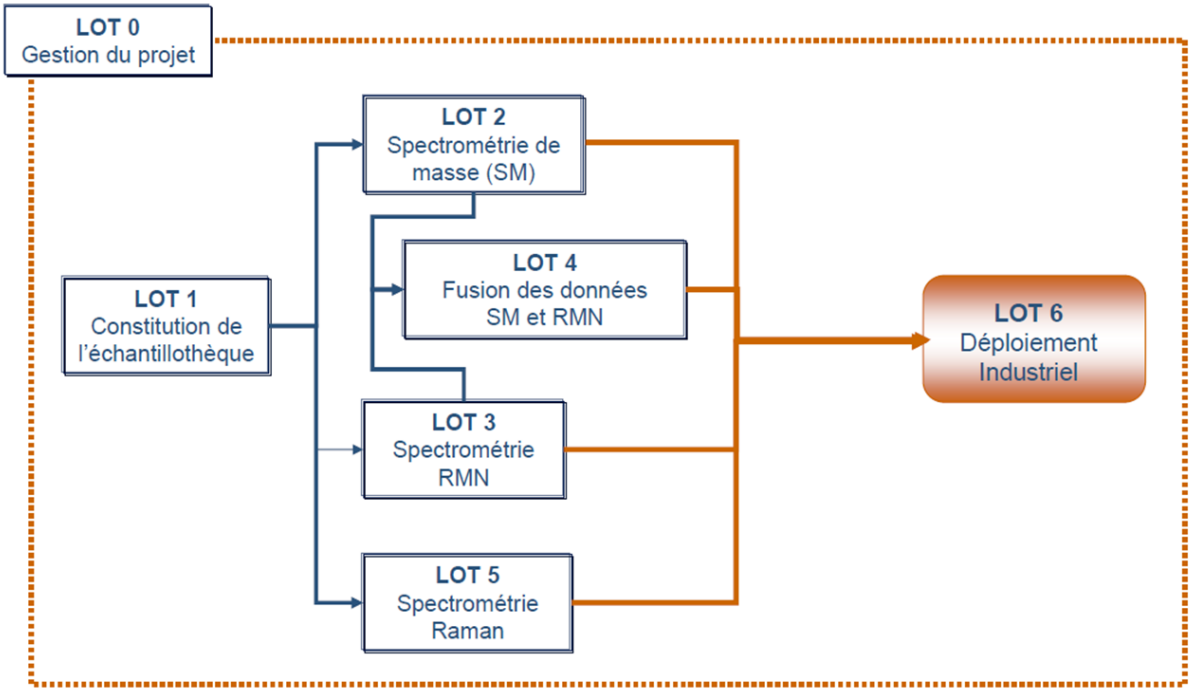



**Figure 77 : Répartition du projet AgriFood GPS en 7 lots**

Dans le cadre de ce programme, la société Profilomic a été chargée pour grande partie du lot 2 concernant la spectrométrie de masse même si elle est impliquée également dans les lots 0, 1, 4 et 6. Par ailleurs, la société doit principalement travailler sur la matrice « eau ».

Deux axes de recherche principaux se dégagent du projet :

- Le premier axe de recherche concerne le développement d'une méthode de criblage à « large spectre » permettant de détecter un maximum de polluants à l'état de trace ou d'ultra-trace dans l'eau. Le projet est ambitieux car ce sont près de 2000 molécules qui devront pouvoir être analysées à l'aide d'une ou plusieurs méthodes ciblées.
- Le second axe de recherche concerne l'utilisation de l'empreinte chimique globale acquise sur l'eau lors de l'analyse ciblée pour la réalisation d'une analyse globale permettant la détection sans *a priori* de polluants dans les échantillons d'eau à partir d'outils bioinformatiques développés par le LIST.

## I.4. Etat de l'art

Il existe dans la littérature de nombreuses méthodes de criblage sur différentes matrices. Toutefois, la grande majorité de ces criblages dépasse rarement la détection et/ou le dosage d'une centaine de molécules. La bibliographie fait état de nombreux articles dans lesquels la technologie employée est la LC-MS/MS [267,441,442]. Les auteurs de ces méthodes de

criblage se cantonnent généralement à un type de molécules, analysant soit des pesticides soit des résidus de médicaments, et rarement les deux en même temps.

| Nombre et type de molécules | Matrice | Type colonne (granulométrie) | Technologie | Sensibilité | Réf |
|---|---|---|---|---|---|
| 136 pesticides | Avocat | Aqueous $C_{18}$ (3µm) HP-5ms | HPLC-TQ GC-TQ | 10-50 ng/g | [443] |
| 256 pesticides | Huile essentielle de lavandin | Synergy Hydro $C_{18}$ (4µm) | HPLC-TQ | 1-10 ng/mL | [272] |
| 96 médicaments | Cheveux | Acquity HSS $C_{18}$ (1,8µm) | UPLC-TQ | 2-50 ng/g | [444] |
| 127 médicaments | Viande de bœuf | Acquity HSS T3 (1,8µm) | UPLC-TQ | 0,01-1 ng/g | [445] |
| 170 pesticides | Fruits et légumes | Accucore aQ $C_{18}$ (2,6µm) | HPLC-Q-Orbitrap | Détection qualitative | [280] |
| 556 pesticides | Fruits et légumes | Atlantis T3 (3µm) | HPLC-Orbitrap | 50-200 ng/g | [446] |
| 100 médicaments vétérinaires | Œuf, poisson et viande | Acquity BEH $C_{18}$ (1,7µm) | UPLC-TOF | 5-200 ng/g | [447] |
| 100 médicaments vétérinaires | Différentes viandes | Acquity HSS T3 (1,8µm) | UPLC-TOF | 1-100 g/g | [448] |
| 116 médicaments vétérinaires | Nourriture animale | Acquity BEH $C_{18}$ (1,7µm) | UPLC-TOF | 20-200 ng/g | [449] |
| 150 médicaments vétérinaires | Lait | Acquity BEH $C_{18}$ (1,7µm) | UPLC-TOF | 0,4-100 ng/mL | [450] |
| 350 pesticides et médicaments | Miel | Hypersil Gold aQ $C_{18}$ (1,7µm) | UPLC-Q-Orbitrap | 20-50 ng/g | [395] |
| 333 pesticides et médicaments | Nourriture pour bébé | Accucore aQ $C_{18}$ (2,6µm) | HPLC-Q-Orbitrap | 0,01-10 ng/g | [451] |

**Tableau 17 : Etude bibliographique des articles de criblage sur toutes matrices**

Le Tableau 17 est le résultat d'une étude bibliographique sur les méthodes de criblage LC les plus importantes en nombre de molécules, toutes matrices confondues. Cette étude confirme les tendances dégagées par les revues citées précédemment. On voit que les colonnes utilisées sont souvent de type UHPLC $C_{18}$ ou $C_{18}$ avec un « endcapping » polaire (dénomination « hydro », « aQ » ou « T3 »). Les sensibilités atteintes par les appareils de type TQ semblent légèrement meilleures que celles obtenues par les technologies TOF et Orbitrap.

En ce qui concerne plus spécifiquement l'analyse de l'eau dont est en charge la société Profilomic, une autre étude bibliographique a été réalisée. Le Tableau 18 résume le contenu des articles étudiés.

| Nombre et type de molécules | Matrice | Méthode d'extraction | Type colonne (granulométrie) | Technologie | Sensibilité (LOQ) | Réf |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 30 médicaments | Eau de STEP | SPE off-line (Oasis MCX) | Luna $C_8$ (3µm) | HPLC-TQ | 0,7-2 ng/L | [452] |
| 76 médicaments | Eau usée abattoir | SPE off-line (Oasis HLB) | Acquity BEH $C_{18}$ (1,7µm) | UHPLC-TQ | 10-20 ng/L | [453] |
| 74 médicaments | Eau de STEP | SPE off-line (Oasis HLB) | Acquity BEH $C_{18}$ (1,7µm) | UHPLC-TQ | 1-10 ng/L | [454] |
| 90 médicaments | Eau de surface et eau de STEP | SPE off-line (Oasis HLB | Hypersil Gold $C_{18}$ (5µm) | HPLC-TQ | 0,1-50 ng/L | [455] |
| 54 médicaments | Eau de STEP | SPE off-line (Oasis MCX) | Acquity BEH $C_{18}$ (1,7µm) | UHPLC-TQ | 0,2-10 ng/L | [273] |
| 300 pesticides | Eau minérale | Injection directe | Aqua $C_{18}$ (5µm) | HPLC-TQ | 50-5000 ng/L | [456] |
| 53 pesticides et médicaments | Eau de surface et eau de STEP | SPE off-line (Oasis HLB) | Symmetry Shield RP18 (3,5µm) | HPLC-TQ | 1-15 ng/L | [457] |
| 58 médicaments et 18 métabolites | Eau de surface, souterraine, et de STEP | SPE on-line (Cyclone P, C18-P XL et MAX) | Betasil Phenyl-Hexyl (3µm) | HPLC-TQ | 0,1-30 ng/L | [458] |
| 84 pesticides et médicaments | Eau de STEP | SPE off-line (Oasis MCX et Strata X) | Acquity BEH $C_{18}$ (1,7µm) | UHPLC-TOF | 10-200 ng/L | [278] |
| 300 pesticides et médicaments | Eau de surface, souterraine et de STEP | SPE off-line (Oasis HLB) | Acquity BEH $C_{18}$ (1,7µm) | UHPLC-QTOF | 20-500 ng/L | [459] |
| 400 pesticides et médicaments | Eau de surface et de STEP | SPE off-line (Oasis HLB) | Zorbax Eclipse plus $C_{18}$ (1,8µm) | UHPLC-QTOF | 1-250 ng/L | [245] |

**Tableau 18 : Etude bibliographique des méthodes de criblage sur l'eau**

Dans cette étude bibliographique, la plupart des criblages sont réalisés sur des TQ qui permettent l'analyse de dizaines ou centaines de molécules simultanément avec une bonne sensibilité, très en deçà des limites réglementaires dans l'eau potable (100 ng/L). Pour cela, une étape de préparation de l'échantillon est très souvent réalisée par SPE « off-line ». Le copolymère HLB (divinylbenzène et N-vinylpyrrolidone) est le plus utilisé car il permet une rétention mixte de composés apolaires et modérément polaires. Tous les types d'eaux environnementales ont été analysés lors de différentes études ce qui montre la polyvalence des méthodes développées. Ces articles nous ont servis de base de travail pour le développement de notre méthode.

## I.5. **Objectifs du développement**

Durant ce travail de thèse, l'accent a été mis sur le développement de l'analyse ciblée dans le cadre du projet AgriFood GPS tandis que la recherche globale sera abordée en perspective de ce manuscrit. Pour des raisons organisationnelles et financières, nous avons fait le choix de fragmenter la collecte des 2000 molécules du projet en 3 étapes, afin d'affiner la sélection des molécules au fur et à mesure de chaque collecte en s'adaptant à l'actualité et aux orientations du consortium.

Dans ce chapitre, le développement d'une analyse simultanée de la première collecte du projet sur la base d'une chimiothèque de 800 polluants (pesticides, médicaments et produits industriels et domestiques) est expliqué. Le choix des 800 polluants a été réalisé dans un premier temps puis une banque de données spectrales dans les modes d'ionisation positive et négative ainsi qu'une banque de données de spectres MS/MS en mode d'ionisation positive ont été acquises et interprétées. Ensuite, 4 colonnes analytiques ont été choisies et testées dans différentes configurations de pH pour l'obtention de la meilleure séparation possible des molécules sélectionnées. Afin d'automatiser autant que possible l'analyse de l'eau, le choix d'un système de préconcentration en ligne a été fait et développé en testant notamment la prise d'essai et le pH de l'échantillon. La méthode développée, qui permet l'analyse de 539 polluants en 36 minutes avec 5 mL d'eau, a ensuite été validée selon plusieurs critères : linéarité, effet matrice, LOD et spécificité en vue de sa commercialisation. Cette méthode a été appliquée sur une vingtaine d'eaux du robinet de la région parisienne et a permis de mettre en évidence de nombreuses pollutions par les médicaments et les pesticides.

# II. MATERIEL ET METHODES

### II.1.1. Produits chimiques et réactifs

Tous les standards (composés de 459 médicaments, 341 pesticides et 17 autres molécules, tous d'une pureté > 95 %), l'acétonitrile (ACN) de qualité HPLC, l'acétone (pureté > 99 %), le DiMéthylSulfOxyde (DMSO, > 99,9 % de pureté) et l'acétate de sodium ($CH_3COONa$, > 97 %) proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le méthanol (MeOH) de qualité HPLC, l'acide formique (HCOOH, teneur > 99 %), l'ammoniac ($NH_4OH$, 28 %), l'éthanol absolu (EtOH), l'acide acétique ($CH_3COOH$, 100 %), les tubes Falcon stériles de 10 et 50 mL et les flacons d'injection de 2 mL en verre ambré ont été obtenus chez VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). L'eau ultra pure déionisée a été filtrée à travers un système Milli-Q (Millipore, Molsheim, France). Les flacons d'injection de 10 mL

en verre ambré et les frittés en métal de 0,2 µm ont été achetés auprès de ThermoFisher Scientific (Les Ulis, France). Les flacons de 60 mL en aluminium (99,5 % de pureté) avec des bouchons avec revêtement intérieur en aluminium ont été achetés chez Cloup (Champigny-sur-Marne, France). Le mélange des substances utilisées pour l'étalonnage du spectromètre de masse (Calmix-positif, pour le mode d'ionisation positive, comportant la caféine, l'acétate de L-méthionyl-arginyl-phénylalanyl-alanine et de l'Ultramark 1624 ; et Calmix-négatif, pour le mode d'ionisation négative, contenant, en plus du mélange Calmix-positif, du dodécylsulfate de sodium et du taurocholate de sodium) viennent de chez Thermo Fisher Scientific (Les Ulis, France).

### II.1.2. Préparation des solutions de travail

Les solutions mères des composés de références ont été préparées à 1 mg/mL lorsque cela était possible en dissolvant 1 mg de chaque substance dans 1 mL d'un solvant approprié. Le choix des solvants était restreint à l'eau ($H_2O$), l'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH), l'éthanol (EtOH), l'acétone, et des mélanges de ces solvants avec addition d'acide formique (HCOOH) ou d'ammoniac ($NH_4OH$) jusqu'à 10 % maximum ou du DMSO jusqu'à 5 % maximum. Deux solutions ont été préparées à partir de la solution mère : (i) une solution de chaque composé à 100 µg/mL a été préparée dans un tube eppendorf de 2 mL en diluant la solution mère par 10 pour obtenir la solution de travail qui permet de préparer le mélange et (ii) une solution de chaque composé à 5 µg/mL a ensuite été préparéeée en flacon d'injection ambré de 2 mL pour l'injection directe dans le spectromètre de masse par dilution de la solution de travail par 20. Un mélange des 763 composés à une concentration de 0,1 µg/mL a été préparé en transférant 10 µL de chaque solution à 100 µg/mL dans un tube Falcon de 10 mL puis en complétant avec de l'eau jusqu'au volume nécessaire. Enfin, 10 mélanges de 80 molécules environ à une concentration de 1 µg/mL ont été préparés à l'aide du même protocole. Pour minimiser la dégradation de toutes ces solutions, elles ont été conservées aliquotées à -20 °C immédiatement après leurs préparations. Pour la préparation de solution à 0,1 µg/L, une solution intermédiaire à 0,1 µg/mL est préparée en mélangeant 100 µL de chaque solution de 80 molécules à 1 µg/mL puis 6 µL de cette solution ont été ajoutés à 6 mL d'eau dans les flacons d'injection extemporanément à l'analyse.

### II.1.3. Les échantillons d'eau

Un groupe de 25 échantillons d'eau du robinet de la région parisienne a été recueilli dans des tubes de 60 mL en aluminium au domicile de salariés du bâtiment 136 du CEA de Saclay. Un protocole de collecte a été défini comme suit pour harmoniser les conditions de prélèvement :

- Positionner le levier du mitigeur vers l'eau la plus froide possible.
- Si possible, nettoyer le robinet à l'alcool.
- Laisser couler l'eau durant 30 secondes.
- Dévisser le bouchon du tube de prélèvement.
- Déposer le bouchon sur l'envers, attention à ne pas toucher le goulot du flacon.
- Rincer le tube de prélèvement avec l'eau à prélever (le remplir et le vider 3 fois de suite)
- Collecter l'eau du robinet jusqu'à remplir le tube au 2/3.
- Reboucher le tube de prélèvement en veillant à ne pas toucher l'intérieur du bouchon.
- Inscrire le nom de la ville de collecte et la date de prélèvement sur le tube.
- Conserver et envoyer l'échantillon à 4 °C.

### II.1.4. Préparation des échantillons

Les échantillons d'eau ont été filtrés à l'aide d'un filtre en métal de 0,5 µm pour éliminer les particules solides. Ensuite, 6 mL d'eau filtrée ont été introduits dans un flacon d'injection en verre ambré, 5 µL d'un mélange d'étalons internes et 5 µL d'acide formique (HCOOH) ont été ajoutés. Le flacon d'injection a finalement été stocké dans le portoir de l'échantillonneur automatique jusqu'à l'injection.

### II.1.5. Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses ont été effectuées en utilisant un système PAL HTC (CTC Analytics AG, Zwingen, Suisse) couplé à un système de chromatographie liquide de type Transcend 1250 (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) équipé de deux pompes (chargement et élution) et un VIM (de l'anglais, *Valve Interface Module*) qui permet la rétro-élution (de l'anglais, *backflush*) de la cartouche de préconcentration en ligne. Le spectromètre de masse utilisé est un Q-Exactive (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) équipé d'une source Heated-Electrospray 2 opérant dans le mode d'ionisation positive. Les échantillons ont été placés

dans un passeur automatique et thermostaté à 4 °C. Le volume d'injection a été fixé à 5 mL. Les données ont été acquises et visualisées avec le logiciel Xcalibur (version 2.2, Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France).

### II.1.5.1. Conditions chromatographiques de chargement et d'élution

L'étape de préconcentration a été réalisée sur une cartouche de préconcentration en ligne Oasis HLB Direct Connect (12 µm, 20 mm × 2,1 mm) de la marque Waters (Guyancourt, France) montée sur un dispositif de SPE automatisé. Durant la première partie, la phase mobile de la pompe de chargement était composée (A) d'eau contenant 0,08 % d'acide formique et (B) d'acétonitrile. Le chargement a été effectué lors d'une phase isocratique à 100 % de A pendant 6 minutes à un débit de 1 mL/min. Ensuite la pompe de chargement a été arrêtée et la vanne 6 voies du VIM a commuté permettant la rétro-élution de la cartouche de préconcentration en ligne. La séparation a été réalisée à l'aide d'un système de chromatographie à ultra-haute performance (UHPLC) sur une colonne HSS T3 (1,8 µm, 150 mm × 2,1 mm) de la marque Waters (Guyancourt, France) équipée d'un fritté en métal de 0,5 µm (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France). Les phases mobiles utilisées pour la séparation chromatographique étaient constituées (A') d'eau et (B') d'acétonitrile toutes deux contenant 0,08 % d'acide formique. L'élution chromatographique a été réalisée selon les conditions de gradient indiqué comme suit. Le débit de phase mobile a été fixé à 0,5 mL/min. L'élution débute avec une étape isocratique de 2 minutes à 5 % de phase B'. S'en suit un accroissement linéaire de 5 à 100 % de proportion de phase B' pendant les 20 minutes suivantes. La proportion de 100 % de phase B' est maintenue constante pendant 4 minutes pour un rinçage de la colonne avant de revenir dans les conditions initiales, lesquelles sont maintenues pendant 4 minutes pour une rééquilibration du système chromatographique. Durant la phase de rinçage et de rééquilibrage de la colonne analytique, la cartouche de préconcentration est isolée du système et rincer à 100 % de B puis rééquilibrer à 100 % de A à un débit de 1 mL/min. Trois autres colonnes ont été testées lors de ce développement. Il s'agit des colonnes Hypersil Gold $C_{18}$ (1,9 µm, 150 mm × 2,1 mm, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France), BEH $C_{18}$ (1,7 µm, 150 mm × 2,1 mm, Waters, Guyancourt, France) et HSS PFP (1,8 µm, 150 mm × 2,1 mm, Waters, Guyancourt, France).

#### II.1.5.2. Conditions d'analyse par spectrométrie de masse

Afin de s'assurer de la bonne précision de la mesure des rapports *m/z*, l'étalonnage de l'instrument a été effectué chaque semaine dans les deux modes d'ionisation en utilisant le mélange de substances étalon « Calmix » fourni par la société ThermoFisher Scientific. Le spectromètre de masse a été utilisé avec une tension du capillaire d'introduction fixée à 3,6 kV en mode d'ionisation positive à une température de capillaire de transfert de 320 °C. La pression du gaz de nébulisation et la pression du gaz axillaire ont été respectivement fixées à 60 et 20 unités arbitraires. Le pouvoir résolutif de l'analyseur a été fixé à 70 000 ($m/\Delta m$ où $\Delta m$ correspond à la largeur à mi-hauteur du pic produit par un ion monochargé à *m/z* 200). La détection des ions a été réalisée sur une gamme de masse entre m/z 72 et 1080 avec une précision en masse inférieure à 2 ppm. Le nombre d'ions à accumuler (paramètre AGC target) et le temps d'injection maximum des ions (paramètre MIT) ont été respectivement fixés à $10^6$ et 50 ms.

Pour les expériences MS/MS, deux types d'évènements successifs ont été utilisés sur le Q-Exactive : (i) un spectre MS avec l'ensemble des paramètres renseignés ci-avant et (ii) un spectre MS/MS en mode d'activation non résonnante de type HCD sans LMCO avec des valeurs d'énergies de collision normalisées fonction de la molécule avec un pouvoir résolutif, un paramètre d'AGC target, un paramètre MIT et une fenêtre d'isolation fixé à 17 500 ($m/\Delta m$, FWHM à *m/z* 200), $10^5$, 250 ms et 0,4 m/z respectivement.

#### II.1.5.3. Structure de la séquence

Les échantillons ont été injectés aléatoirement. Dans chaque séquence, les échantillons non dopés ont été injectés en premier. Un échantillon de blanc analytique a été intercalé entre chaque échantillon tandis qu'un mélange des 539 composés de référence analysables par la méthode développée à la concentration de 0,1 µg/L en tampon (95/5 $H_2O$/ACN, v/v) a été injecté tous les 5 échantillons.

## II.2. **Traitement des données**

### II.2.1. Traitement des fichiers FIA et recherche des temps de rétention

Le logiciel Qualbrowser (Xcalibur 2.2) a été utilisé pour le traitement des données nécessitant un affichage graphique des chromatogrammes, des spectres de masses ou

l'utilisation d'outils de recherche de chromatogrammes d'ions extraits (XIC, de l'anglais *eXtract Ion Chromatogram*).

### II.2.2. Optimisation chromatographique

Pour la sélection de la colonne et des paramètres de séparation associés (nature de phase stationnaire, pH), un processus en deux étapes a été utilisé : (i) la détection des pics a été effectuée en utilisant le logiciel XCMS et (ii) un algorithme créé par le bioinformaticien de l'équipe et appelé « MethodComparator » a été utilisé (décrit plus précisément dans les résultats). La détection automatique des pics et l'intégration des aires ont été réalisées avec le logiciel XCMS. Pour cela, les données brutes ont tout d'abord été converties dans le format mzXML non propriétaire, à l'aide de ProteoWizard [415]. Les données ainsi converties ont été traitées en utilisant la version 1.30.3 d'XCMS fonctionnant sur la version R 3.0.0. Le logiciel R a été installé sur un serveur de calcul Lenovo ThinkStation C20X 24 core Intel Xeon de 2.4 GHz avec 24 Go de RAM et fonctionnant sous Linux version Centos release 6,4 Final x86_64. Pour XCMS, l'algorithme CentWave a été utilisé [416].

### II.2.3. Outils et critères d'identification pour l'analyse ciblée

L'identification des xénobiotiques a été effectuée en utilisant le logiciel TraceFinder 3.1 (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France). Ce logiciel permet l'identification des molécules en fonction de plusieurs critères tels que (i) le rapport *m/z* et (ii) le temps de rétention. Il permet également de confirmer l'identification de la molécule suspectée grâce à (iii) un score basé sur la correspondance des massifs isotopiques théoriques et expérimentaux et (iv) une comparaison des spectres MS/MS expérimentaux et enregistrés dans la banque de données spectrales associée au logiciel, commerciale ou réalisée au laboratoire.

# III. RESULTATS ET DISCUSSION

La première partie des résultats est consacrée à la mise au point d'une méthode de criblage multi-résidus dans l'eau. Une chimiothèque de plus de 800 xénobiotiques a été constituée, ce qui a permis la création d'une banque de données spectrales MS et MS/MS de plusieurs milliers de signaux. Dans un second temps, une optimisation des conditions chromatographiques a été réalisée avec l'aide d'un outil d'annotations automatique. La méthode développée a ensuite été validée selon de nombreux critères tels que la fidélité, la linéarité, la spécificité ou l'effet matrice. Enfin, une analyse de 26 eaux de la région parisienne a été effectuée. Les résultats montrent de nombreuses pollutions par des médicaments et des pesticides.

## III.1. **Constitution de la base de données**

Dans un premier temps, environ 800 molécules ont été choisies dans le cadre de la collecte 1 à partir de l'analyse de la littérature et de nombreux rapports d'expertise. Une banque de données spectrales MS et MS/MS a ensuite été créée afin de répertorier l'ensemble des informations qui caractérisent les molécules pour une identification facilitée dans les données brutes.

### III.1.1. Choix des polluants

L'objectif de cette première sélection des polluants est de réaliser une liste de composés chimiques pertinents pour l'analyse de l'eau qui soient analysables par LC-ESI-HRMS. Pour cela, deux stratégies ont été utilisées. La première consiste à rechercher les polluants « incontournables » car déjà détectés dans l'environnement, les meilleures ventes de l'industrie pharmaceutique, les polluants « médiatiques » ou des liocides produits en grande quantité pour l'agriculture en prenant en compte le tonnage par exemple. La deuxième approche a été de recenser tous les polluants chimiques organiques connus par catégorie (pesticides, médicaments ou produits industriels et domestiques) afin de choisir quelques représentants par famille chimique. Les polluants en cours de sélection ont tous fait l'objet d'une recherche sur la base de données PubMed afin de vérifier s'ils avaient déjà été analysés en spectrométrie de masse et notamment en ESI. Lorsque qu'aucun résultat n'était trouvé, les molécules composées de sites acides ou basiques, présentant ainsi un site ionisable, ont été retenues sur la base d'une interprétation personnelle.

Pour la sélection des molécules jugées préoccupantes (pesticides ou médicaments) car déjà détectées dans l'environnement, de nombreux rapports tels que ceux de l'Anses [34,460,461], l'ANSM [462,463], l'EFSA (de l'anglais, *European Food Safety Authority*) [464], l'INERIS (Institut National de l'EnviRonnement Industriel et des risqueS) [465] ou l'académie de pharmacie [133] ont été consultés.

Nous nous sommes également appuyés sur les meilleures ventes des industries pharmaceutiques telles que les AINS (ibuprofène, kétoprofène), les antihypertenseurs (valsartan, losartan), les hypolipémiants (pravastatine, simvastatine), les antibiotiques (amoxicilline), les antalgiques (paracétamol, tramadol) ou les antidépresseurs (paroxétine, fluoxétine). Les médicaments les plus toxiques pour l'environnement ont été sélectionnés, parmi lesquels les anticancéreux ou les agents de contrastes iodés. Les molécules connues sur le plan médiatique telles que le bisphénol A et le bisphénol S ainsi que les œstrogènes tels que l'estradiol et l'éthynilestradiol ont également été retenues. Pour les pesticides, au-delà des molécules citées dans les rapports, une liste la plus exhaustive possible des nombreuses familles chimiques a été réalisée. Ainsi, rien que dans la classe des insecticides, 33 familles chimiques qui peuvent se subdiviser en sous-familles ont été dénombrées. Parmi les insecticides, on peut prendre l'exemple des carbamates ou des organophosphorés divisés respectivement en 4 et 26 sous-familles, ce qui représente 50 et 150 composés différents répertoriés pour l'une et l'autre famille. En fonction de la taille de la sous-famille, 2 à 8 représentants ont été sélectionnés dans notre groupe de molécules. Enfin, les métabolites les plus importants et disponibles commercialement tels ceux de l'atrazine ont été ajoutés à notre sélection. L'ensemble des molécules non sélectionnées dans la première sélection a été répertorié dans un fichier pour les autres campagnes.

Finalement, 817 molécules ont été achetées (Tableau 22 en annexe 6) et les informations sur leurs propriétés physico-chimiques telles que leur masse exacte, leur famille chimique, leur logP, leur pKa ont été collectées. La Figure 78 montre la répartition de notre sélection vis-à-vis des 3 grandes classes de polluants chimiques organiques : pesticides, médicaments et autres (produits industriels, domestiques et stupéfiants).

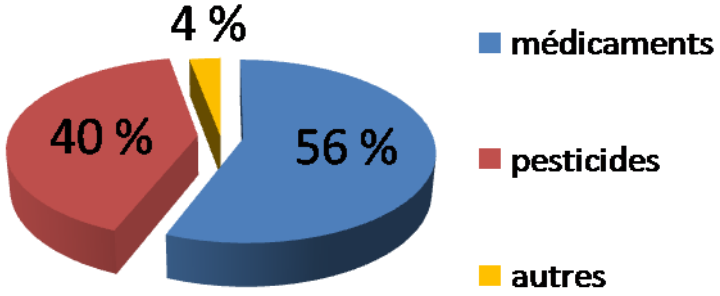



**Figure 78 : Répartition des polluants chimiques organiques pour la collecte 1**

### III.1.2. Réalisation des solutions de travail

Les molécules ont ensuite été pesées et solubilisées dans un solvant approprié afin d'obtenir une solution mère à 1 mg/mL. Toutefois, nous avons fait le choix de nous restreindre dans le choix des solvants de solubilisation (voir Matériel et Méthode) afin de permettre la constitution d'un mélange de toutes les molécules pour un développement analytique facilité par l'injection d'une seule solution. Des solutions filles et des solutions d'injection ont été réalisées pour l'ensemble des molécules. Quelques problèmes de reprécipitation ont été constatés lorsque nous avons réalisé les solutions filles, notamment pour les molécules solubilisées dans un solvant organique puis diluées avec de l'eau milliQ. Dans ce cas, une dilution avec un mélange $H_2O$/ACN (v/v) a été préférée. Les solutions d'injection ont permis la réalisation des FIA-MS et des FIA-MS/MS à une concentration de 5 µg/mL (Figure 79).

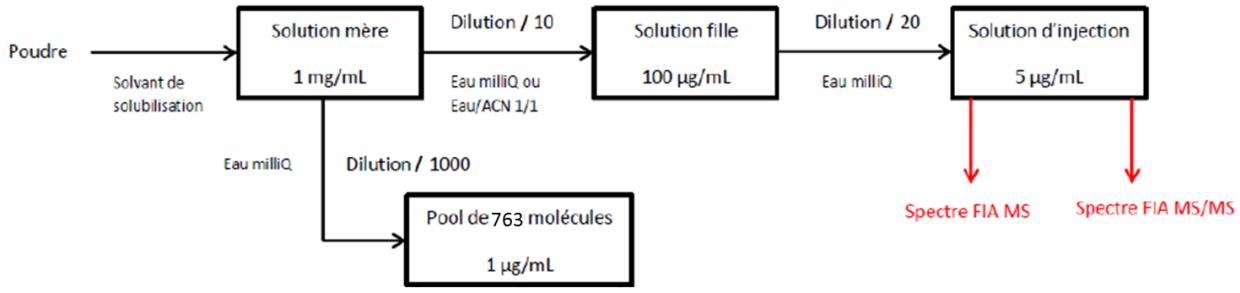



**Figure 79 : Réalisation des solutions de travail pour l'ensemble des molécules**

### III.1.3. Caractérisation MS

Au cours de ce travail de thèse nous avons, à de nombreuses reprises, insisté sur la redondance du signal observée sur les spectres de masse en utilisant la source ESI. Cette richesse d'information est un avantage considérable au même titre que le temps de rétention ou les spectres de fragmentation MS/MS pour une caractérisation précise et sans ambiguïté des molécules dans les données brutes. De plus, l'annotation d'un grand nombre de pics associés à une molécule permet de diminuer la complexité des données et les erreurs d'interprétation. Ce travail d'annotation peut toutefois être long et fastidieux.

Notre objectif a été de créer une banque de données en masse exacte de l'ensemble des ions détectés. Pour cela, toutes les molécules ont été analysées individuellement par FIA-MS afin d'obtenir les informations sur leur mode d'ionisation ainsi que leurs potentiels adduits et

fragments formés en source. A ce stade, 2 tableaux Excel ont été incrémentés à l'aide des informations récupérées sur les spectres MS de toutes les molécules. Le tableau 1 répertorie les informations sur les molécules telles que le nom, la formule brute, la masse exacte ainsi que les rapports *m/z* de la molécule protonée et déprotonée, la date d'acquisition des spectres MS, le statut de détection en mode d'ionisation positive ou négative, l'intensité de l'ion moléculaire à la concentration de la solution d'injection (5 µg/mL) ainsi que des remarques sur la présence d'ions adduits et fragments. Le tableau 2 regroupe les informations sur les ions détectés pour chaque molécule telles qu'un identifiant unique pour chaque ion, la nature de l'ion détecté, la masse exacte, l'état de charge, l'intensité et l'intérêt ou non de fragmenter l'ion en MS/MS. En ce qui concerne la sélection des ions d'intérêts pour la création d'une banque de données MS/MS, les critères de nature de l'ion et d'intensité ont été pris en compte. Le but était de choisir les ions les plus susceptibles de se retrouver dans les échantillons de matrice d'eau (les plus intenses et les plus usuels).

Le traitement des spectres de masse a été réalisé manuellement selon une procédure normée afin que l'ensemble des collaborateurs ayant pris part à l'interprétation des spectres de masse aboutissent à des résultats similaires. Seuls les principaux ions ont été annotés soit parce qu'ils étaient très intenses soit parce qu'ils étaient informatifs comme la fragmentation spécifique d'une famille ou d'une structure en particuliers. Ci-après sont présentés deux exemples d'interprétations de spectre FIA : (i) le métabolite M01 du Spiromesifen et (ii) la Céfalotine. Les spectres MS de la molécule ont été analysés en mode d'ionisation positive et négative, accompagnés d'un blanc analytique afin de distinguer les pics provenant de la molécule des pics de bruits issus du solvant ou des artéfacts électroniques (les pics correspondants à la molécule sont encadrés en rouge sur la Figure 80). On constate que le métabolite M01 du Spiromesifen est ionisable à la fois en mode d'ionisation positive et négative. La molécule est détectée sous sa forme protonée et déprotonée et on observe également deux adduits en mode positif. Les autres ions ne sont pas pris en compte car ils sont détectés dans le blanc analytique. Les informations recueillies ont ensuite été ajoutées au tableau 1 (Figure 81) et au tableau 2 (Figure 82). Les ions correspondant à la molécule protonée et déprotonée ainsi que l'adduit sodium ont été jugés d'intérêt pour la constitution de la banque de données MS/MS et notés comme « à fragmenter ».

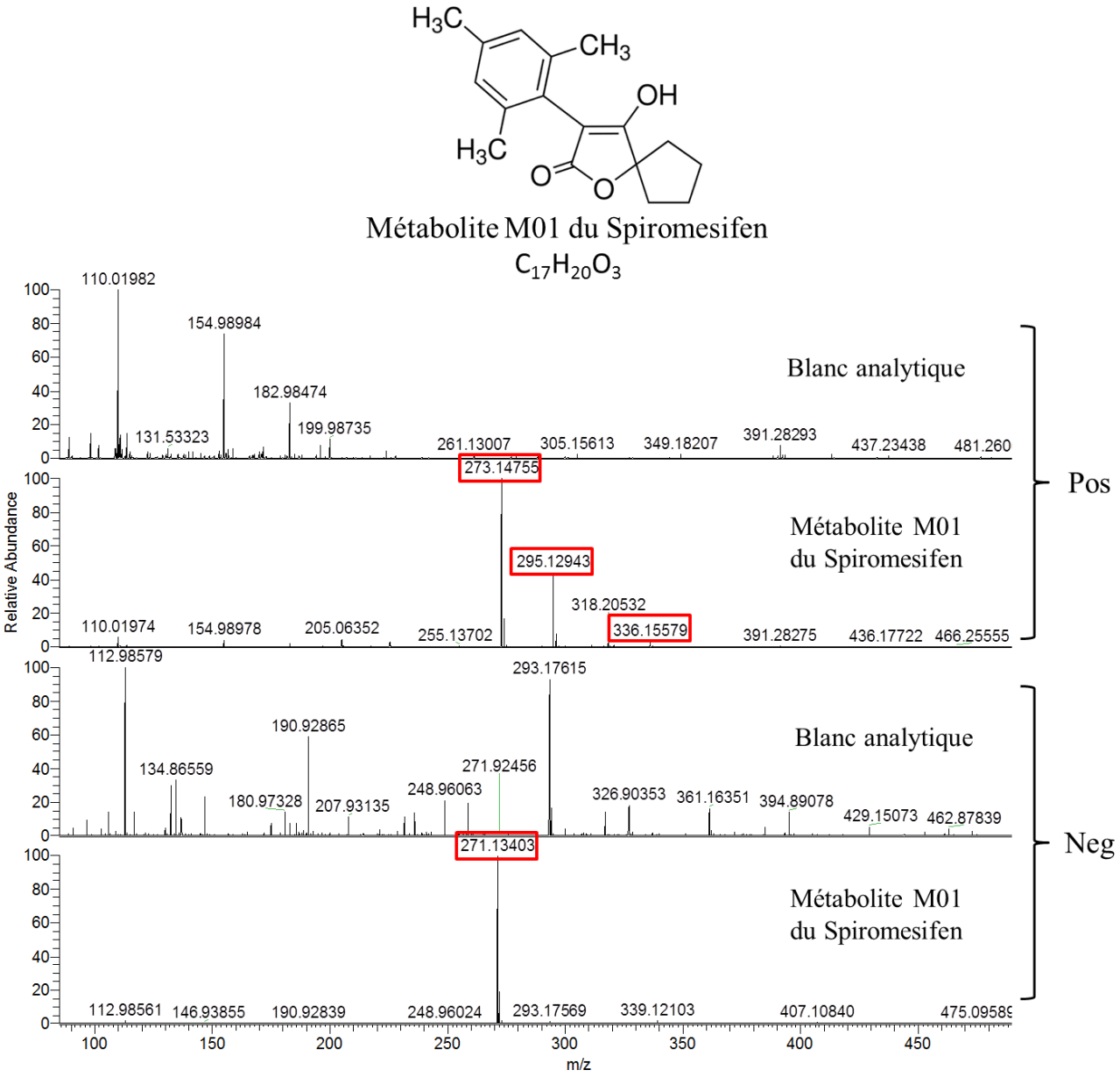



**Figure 80 : Superposition des spectres MS obtenus en mode d'ionisation positive et négative par FIA du métabolite M01 du Spiromesifen et d'un blanc analytique**

Les ions provenant de la molécule sont encadrés en rouge

| Numero PFM | Nom | Formule Brute | Masse Exacte | Date Acquisition | Detection POS | Masse Exacte Protonee | Intensite Moleculaire | Detection NEG | Masse Exacte Deprotonee | Intensite Moleculaire | Remarques FIA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PFM0281 | Isoproturon | C12H18N2O | 206.14191 | 20130419 | Y | 207.14919 | 3.30E+09 | N | 205.13463 | 0.00E+00 | Moleculaire seul pic en Pos. |
| PFM0282 | Atrazine-desisopropyl-2-hydroxy | C5H9N5O | 155.08071 | 20130419 | Y | 156.08799 | 2.40E+09 | Y | 154.07343 | 1.00E+08 | |
| PFM0283 | Spiromesifen-Metabolite-M01 | C17H20O3 | 272.14124 | 20130419 | Y | 273.14852 | 1.30E+09 | Y | 271.13396 | 1.10E+09 | Seul pic du moleculaire en Pos et en Neg. |
| PFM0284 | Atraton | C9H17N5O | 211.14331 | 20130419 | Y | 212.15059 | 5.60E+09 | N | 210.13603 | 0.00E+00 | Moleculaire tres intense en Pos. |
| PFM0285 | Atrazine-desethyl-desisopropyl | C3H4ClN5 | 145.01552 | 20130419 | Y | 146.02280 | 3.10E+08 | Y | 144.00824 | 0.00E+00 | Moleculaire et perte intenses en Pos. Perte moins intense en Neg. |

**Figure 81 : Extrait du tableau 1 pour le métabolite M01 du Spiromesifen**

| Numero PFM PicMS | Mode ionisation | Nature ion | Masse exacte | Etat de charge | Intensité 5µg/mL | A fragmenter |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PFM0282-P1 | POS | +H | 156.08799 | +1 | 2.40E+09 | 1 |
| PFM0282-P2 | POS | +H+C5H9N5O | 311.16870 | +1 | 9.10E+07 | |
| PFM0282-N1 | NEG | -H | 154.07343 | -1 | 1.00E+08 | 1 |
| PFM0282-N2 | NEG | -H+C5H9N5O | 309.15414 | -1 | 1.20E+07 | |
| PFM0283-P1 | POS | +H | 273.14852 | +1 | 1.30E+09 | 1 |
| PFM0283-P2 | POS | +Na | 295.13047 | +1 | 5.80E+08 | 1 |
| PFM0283-P3 | POS | +Na+CH3CN | 336.15701 | +1 | 5.10E+07 | |
| PFM0283-N1 | NEG | -H | 271.13397 | -1 | 1.10E+09 | 1 |
| PFM0284-P1 | POS | +H | 212.15059 | +1 | 5.60E+09 | 1 |
| PFM0284-P2 | POS | +H-CH2 | 198.13494 | +1 | 2.90E+08 | 1 |

**Figure 82 : Extrait du tableau 2 pour le métabolite M01 du Spiromesifen**

Dans le cas du métabolite M01 du Spiromesifen, l'interprétation n'a pas été très complexe. En revanche, il existe des molécules pour lesquelles les spectres MS contiennent une quantité d'informations très importante. C'est le cas de la Céfalotine, un antibiotique de la famille des céphalosporines. Sur la Figure 83, de nombreux ions et notamment des fragments sont mis en évidence, ce qui traduit une certaine fragilité de la molécule lors du processus d'ionisation. A l'aide des informations recueillies sur les spectres de masse en mode d'ionisation positive et négative de la Céfalotine, le tableau 1 a été rempli (Figure 84). L'ion protoné et l'ion déprotoné de la molécule étant détectés à de faible intensité ($7 \times 10^{+05}$ et $2 \times 10^{+06}$ U.A. respectivement), leur détection dans des matrices chargées restera difficile. De nombreux autres ions ont été observés et notés dans le tableau 2 (Figure 85). En mode d'ionisation positive, la présence d'un adduit sodium et d'un fragment 100 fois plus intense que le moléculaire, interprété comme la perte du groupement $CH_3$-CO-OH, permettront la détection de la Céfalotine dans ce mode d'ionisation (Figure 85). Ces deux ions ont d'ailleurs été sélectionnés pour la création de la banque de donnée MS/MS à venir. D'autres fragments ont été observés et systématiquement confrontés à la structure de la molécule pour tenter de trouver une explication « logique » à leur formation, notamment par la rupture d'une ou plusieurs liaisons σ (Figure 85). En mode d'ionisation négative, le même travail a été réalisé ce qui a permis de mettre en évidence 6 fragments et 3 adduits en plus de l'ion moléculaire déprotoné. Dans le cas d'un réarrangement, l'expertise du professeur Jean-Claude TABET a été d'une grande aide afin de confirmer l'appartenance de l'ion fragment à la molécule. En effet, des ions parasites ont parfois été observés provenant d'injections précédentes ou de sous-produits de réaction de la molécule bien que les substances achetées présentent une pureté supérieure à 99 %.

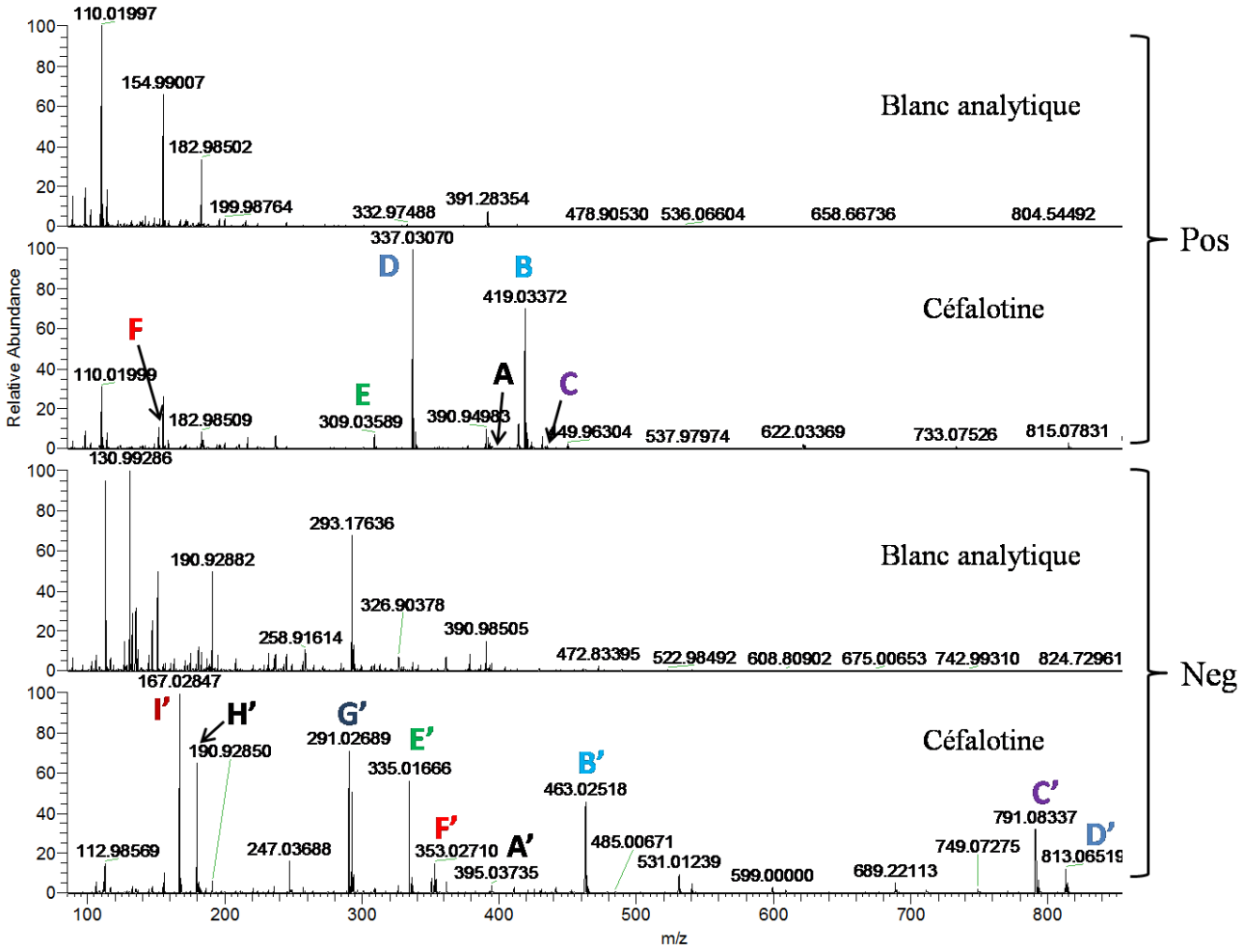
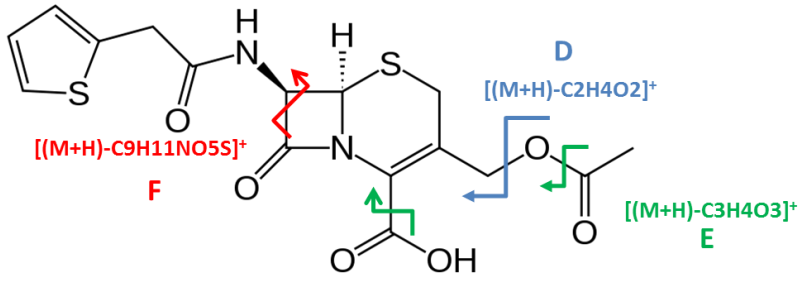



**Figure 83 : Superposition des spectres MS obtenus en mode d'ionisation positive et négative par FIA de la Céfalotine et d'un blanc analytique (les lettres correspondent à des ions qui ont été interprétés à partir des molécules, voir plu bas)**

| Numero PFM | Nom | Formule Brute | Masse Exacte | Date Acquisition | Detection POS | Masse Exacte Protonee | Intensite Moleculaire | Detection NEG | Masse Exacte Deprotonee | Intensite Moleculaire | Remarques FIA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PFM0407 | Aminotriazole | C2H4N4 | 84.04359 | 20131120 | Y | 85.05087 | 8.10E+08 | Y | 83.03632 | 1.20E+06 | En POS, l'ion moléculaire est intense. Pas d'adduits ou de dimères observés. En NEG, l'ion moléculaire est en dessous de la gamme de masse. Pas d'adduits ou de dimères observées. Pas de MSMS en NEG. masse [M-H]- en dehors de la gamme de masse : à |
| PFM0408 | Cefalotin | C16H16N2O6S2 | 396.04498 | 20130506 | Y | 397.05225 | 7.10E+05 | Y | 395.03770 | 2.50E+06 | En POS, ion dichargé à m/z 225 non expliqué. MSMS sur [M+Na]+ car beaucoup plus intense que [M+H]+. L'ion-fragment à m/z 337 (perte de C2H4O2) est abondant, le plus intense du spectre MS. En NEG, MSMS sur [M-H+HCOONa]- ou [M-H+M]- car [M-H]- moyennement intense. Le spectre NEG est plus caractéristique |
| PFM0409 | Vinorelbine | C45H54N4O8 | 778.39416 | 20130506 | Y | 779.40144 | 5.10E+07 | N | 777.38689 | 1.10E+04 | En POS, l'ion moléculaire dichargé est très intense (1.1e9)>ion moléculaire monochargé (5.1e7). Un seul ion-fragment monochargé caractéristique à m/z 658. En cas de nécessité, faire la recherche des ions-fragments dichargés. L'ion moléculaire |

**Figure 84 : Extrait du tableau 1 pour la Céfalotine**

| Numero PFM PicMS | Mode ionisation | Nature ion | Masse exacte | Etat de charge | Intensité 5µg/mL | A fragmenter |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PFM0407-N1 | NEG | -H+C2N2 | 135.04247 | -1 | 1.90E+07 | |
| PFM0407-N2 | NEG | -H | 83.03632 | -1 | 1.20E+06 | |
| PFM0407-N3 | NEG | -H+HCOOH | 129.0418 | -1 | 4.10E+05 | |
| PFM0408-P1 | POS | D +H-C2H4O2 | 337.03112 | +1 | 1.70E+08 | 1 |
| PFM0408-P2 | POS | F +H-C9H11NO5S | 152.01646 | +1 | 1.90E+07 | |
| PFM0408-P3 | POS | E +H-C3H4O3 | 309.03621 | +1 | 1.30E+07 | |
| PFM0408-P4 | POS | A +H | 397.05225 | +1 | 7.10E+05 | |
| PFM0408-P5 | POS | B +Na | 419.0342 | +1 | 1.20E+08 | 1 |
| PFM0408-P6 | POS | C +K | 435.00814 | +1 | 3.30E+06 | |
| PFM0408-N1 | NEG | -H-C2H2O | 353.02714 | -1 | 7.90E+06 | |
| PFM0408-N2 | NEG | -H-C9H8O5S | 167.02846 | -1 | 5.30E+07 | |




| Numero PFM PicMS | Mode ionisation | Nature ion | Masse exacte | Etat de charge | Intensité 5µg/mL | A fragmenter |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PFM0408-P5 | POS | +Na | 419.0342 | +1 | 1.20E+08 | 1 |
| PFM0408-P6 | POS | +K | 435.00814 | +1 | 3.30E+06 | |
| PFM0408-N1 | NEG | F' -H-C2H2O | 353.02714 | -1 | 7.90E+06 | |
| PFM0408-N2 | NEG | I' -H-C9H8O5S | 167.02846 | -1 | 5.30E+07 | |
| PFM0408-N3 | NEG | H' -H-C8H9NO4S | 180.01247 | -1 | 3.40E+07 | |
| PFM0408-N4 | NEG | G' -H-C3H4O4 | 291.02674 | -1 | 3.80E+07 | |
| PFM0408-N5 | NEG | E' -H-C2H4O2 | 335.01657 | -1 | 3.00E+07 | 1 |
| PFM0408-N6 | NEG | A' -H | 395.0377 | -1 | 2.10E+06 | |
| PFM0408-N7 | NEG | B' -H+HCOONa | 463.02512 | -1 | 2.40E+07 | 1 |
| PFM0408-N8 | NEG | C' -H+C16H16N2O6S2 | 791.08268 | -1 | 1.70E+07 | |
| PFM0408-N9 | NEG | D' -2H+C16H16N2O6S2Na | 813.06462 | -1 | 6.40E+06 | |
| PFM0409-P1 | POS | +H | 779.40144 | +1 | 5.10E+07 | 1 |
| PFM0409-P2 | POS | +2H | 390.20436 | +2 | 1.10E+09 | 1 |

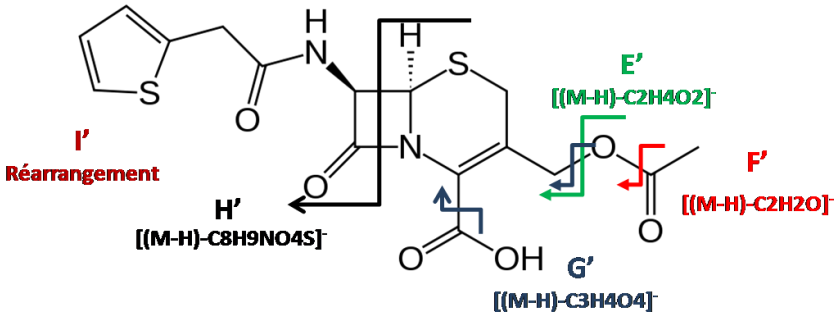



**Figure 85 : Extrait du tableau 2 pour la molécule Céfalotine ainsi qu'une interprétation proposée entre la nature des fragments et la coupure de liaisons à partir de la structure de la molécule. Interprétation du mode d'ionisation positive en haut et négative en bas.**

Au final, ce sont 1634 spectres de masse (817 molécules × 2 modes d'ionisation) obtenus en FIA-MS qui ont été interprétés. Les tableaux 1 et 2 ont été complétés. Ils sont composés de 817 (1 ligne par molécule) et 6132 lignes respectivement, ce qui représente 7,5 ions par molécule en moyenne, et ce sans compter les ions isotopes. Ce résultat qui peut paraître

important, illustre bien la complexité des données obtenues avec la source ESI et la nécessité d'une annotation aussi fiable et complète que possible. Les informations sur le mode d'ionisation dans lequel est détecté la molécule ainsi que le nombre d'ions interprétés pour chaque molécule pour les deux modes d'ionisation cumulés ont été inscrits dans le Tableau 22 (annexe 6). Parmi les 817 molécules analysées, 22 ont été considérées comme non ionisables malgré les vérifications réalisées avant l'achat. Le diagramme de Venn (Figure 86) montre le mode d'ionisation dans lequel les 795 molécules restantes sont détectées. On voit que 96 % d'entre elles, soit 763, sont ionisables dans le mode d'ionisation positive et que seule 32 molécules sont ionisables uniquement dans le mode d'ionisation négative. Il a donc été choisi logiquement de continuer le développement de la méthode ciblée large spectre dans le mode d'ionisation positive. Sur la Figure 87 a été tracée la distribution des rapports *m/z* des 763 molécules ionisables en mode positif. La plupart des rapports *m/z* des molécules se situe autour de 300 u tandis qu'une petite distribution autour de 800 u correspond aux molécules antibiotiques et anticancéreuses.

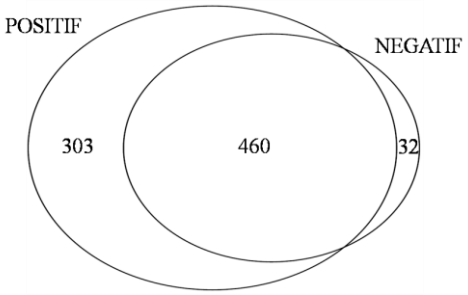



**Figure 86 : Diagramme de Venn présentant le mode d'ionisation des 795 molécules ionisables de la collecte 1 du projet AgriFood**

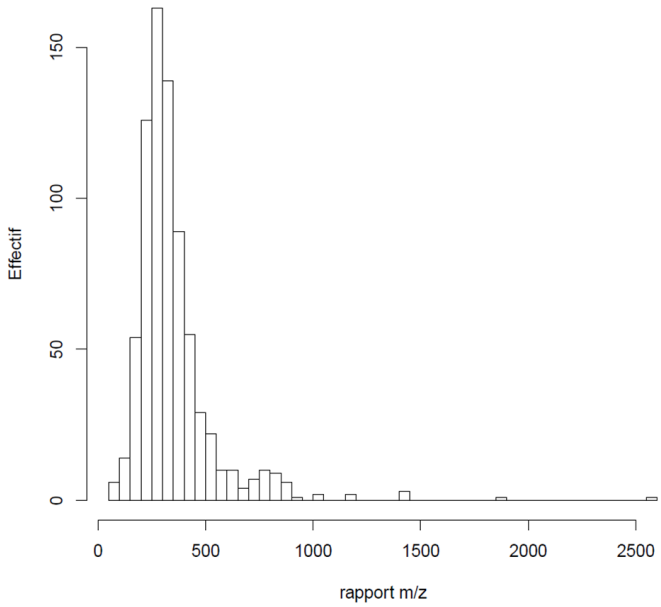



**Figure 87 : Distribution des rapports *m/z* des molécules ionisables en mode positif**

### III.1.4. Réalisation d'une banque de données MS/MS

A l'issue de cette caractérisation en MS des molécules et de l'ensemble des informations recueillies sur la nature des ions produits par chacune d'entre elles en ESI, la caractérisation ultime ne peut être obtenue que par la comparaison du spectre MS/MS de référence avec celui du candidat dans l'échantillon obtenu à la même énergie de fragmentation. Ainsi, il est indispensable de réaliser une banque de données MS/MS contenant l'énergie optimale de fragmentation de chaque ion ainsi qu'un spectre de référence. Il faut rappeler que cette démarche est réalisée car le recours à des banques de données extérieures publiques ou privées ne fournit pas la même qualité de résultats. La nature et surtout les intensités relatives des ions fragments peuvent être très différents selon le mode d'activation, la technologie du spectromètre de masse utilisé ou encore la nature et la pression du gaz dans la cellule de collision. Dans ce cas, la comparaison des spectres de fragmentation peut être difficile voire impossible. Malgré les initiatives d'harmonisation à l'œuvre dans certains laboratoires, il est, à ce jour, primordial de constituer ses propres bases de données de spectres de référence pour pouvoir confirmer sans ambiguïté la présence des molécules suspectées dans les échantillons [466].

Pour la constitution de notre banque de données de spectres MS/MS de référence en mode d'ionisation positive, nous nous sommes appuyés sur les travaux précédents obtenus en FIA-MS et notamment sur les renseignements contenus dans la case « A fragmenter » du Tableau n°2. Cette information a été ajoutée lorsque l'ion était jugé d'intérêt sur la base de sa nature (ion moléculaire ou fragment de haut rapport *m/z*) et/ou de son intensité. Nous avons ensuite défini la notion de spectre de référence avec l'aide du professeur Jean-Claude TABET. Il s'agit d'un spectre CID obtenu à une énergie pour laquelle le rapport d'intensité entre l'ion précurseur et le fragment le plus intense est compris entre 20 % et 40 %. Chaque molécule en solution (5 µg/mL) a été injectée individuellement afin que les ions choisis lors de l'étape de FIA-MS (généralement l'ion moléculaire) soient fragmentés en HCD à l'aide d'une rampe d'activation d'énergies de collision normalisées (NCE, de l'anglais *Normalized Collision Energy*) de 10 % à 80 %. Un traitement automatique des spectres CID mis en place par le bioinformaticien de l'équipe, a été réalisé pour déterminer l'énergie optimale selon les conditions énoncées précédemment.

La Figure 88 montre la rampe d'activation d'énergie normalisée entre 10 % et 80 % réalisée sur l'ion moléculaire *m/z* 273,2 de l'Epiandrosterone. Sur la base de cette première expérience, aucun spectre ne respecte le critère d'un spectre de référence. On remarque que l'énergie d'activation à 20 % n'est pas suffisante mais que l'énergie à 40 % est trop importante. Dans ce cas, une seconde injection a été nécessaire en affinant la rampe

d'activation entre 20 % et 40 %. Les résultats, présentés sur la Figure 89, montrent que les énergies d'activation à 29 %, 32 % et 35 % respectent les conditions d'un spectre de référence. Dans ces cas-ci, nous avons choisi l'énergie 35 %, ce qui permet l'obtention de l'ion moléculaire à 25 % du fragment le plus intense.

Parfois aucun spectre de référence respectant la règle fixée n'a pu être obtenu (270 ions concernés). C'est le cas du Fenobucarb, dont le spectre CID est présenté Figure 90, pour laquelle l'énergie d'activation minimale autorisée par le logiciel du spectromètre de masse (10 %) est trop importante et suffit à fragmenter l'ion précurseur au-delà de 20 % par rapport au fragment le plus intense. Pour ces cas-là, une des solutions envisagées consisterait à isoler l'ion précurseur sans appliquer d'énergie d'activation. L'énergie apportée par l'isolation de l'ion aurait alors pu suffire à la fragmentation. Malheureusement, cette option n'est pas disponible car le logiciel de configuration du spectromètre de masse impose une énergie d'activation minimale de 10 %.

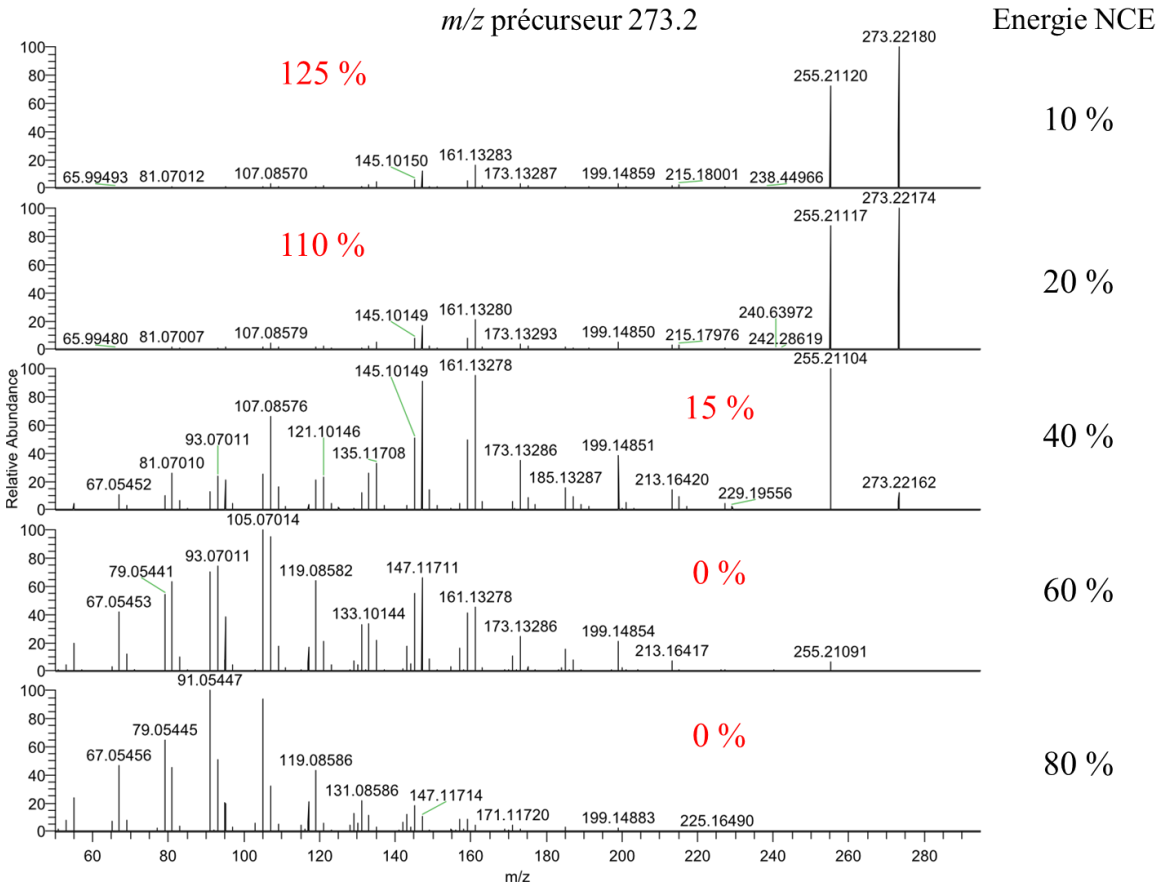



**Figure 88 : Rampe d'activation d'énergies normalisées entre 10 et 80 % sur l'Epiandrosterone (*m/z* 273.2)**

L'énergie d'activation est notée à droite en noir tandis que le rapport entre l'ion précurseur et le fragment le plus intense est noté en rouge.

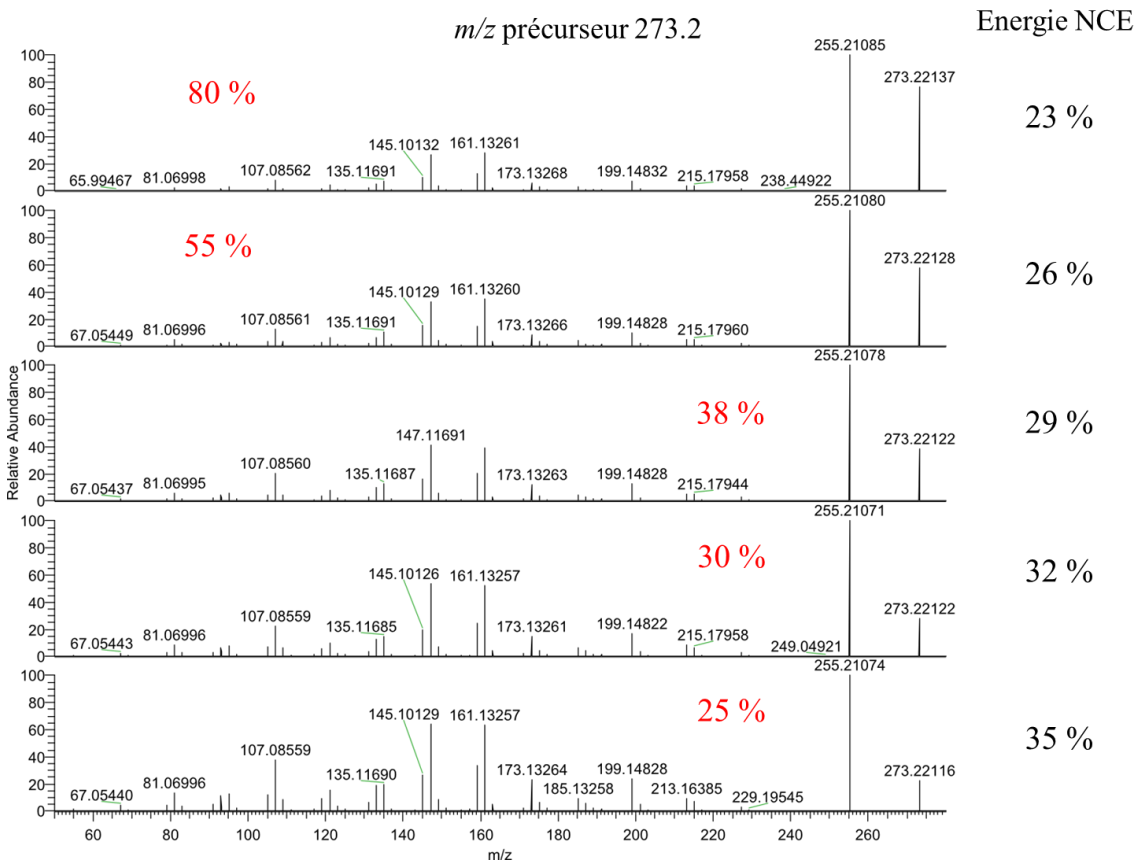



**Figure 89 : Rampe d'activation d'énergies normalisées entre 23 et 35 % sur l'Epiandrosterone (*m/z* 273.2)**

L'énergie d'activation est notée à droite en noir tandis que le rapport entre l'ion précurseur et le fragment le plus intense est noté en rouge.

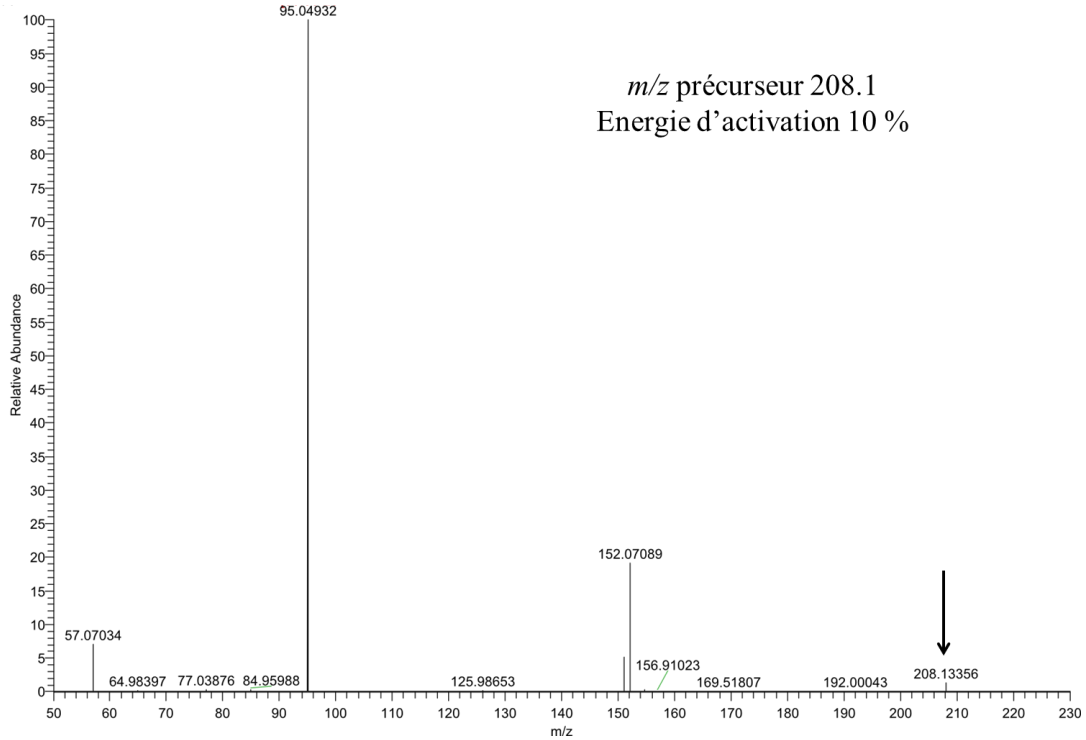



**Figure 90 : Spectre CID du Fenobucarb à 10 % d'énergie d'activation**

Au total, 3000 spectres CID (mode HCD) en mode d'ionisation positive ont été acquis afin de rechercher l'énergie optimale de chacun des ions jugés d'intérêt, et 1150 spectres de référence à l'énergie optimale ont ainsi été stockés pour la création d'une banque de données.

En définitive, cette première étape a permis de créer une chimiothèque de 817 molécules prioritaires pour l'environnement dans le projet AgriFood. Une banque de données MS et MS/MS a également été créée afin de caractériser chacune des molécules. Ces informations seront très utiles dans l'étape suivante qui consiste à développer un système analytique permettant de séparer et retenir ces molécules.

## III.2. **Optimisation des conditions d'analyse SPE en ligne et d'UHPLC**

Dans cette deuxième étape, l'objectif était de mettre au point la préconcentration en ligne et la chromatographie en phase liquide afin de gagner en sensibilité et de séparer les constituants de la matrice à étudier pour accroître la spécificité et la qualité de notre analyse. Parmi les molécules à étudier, plusieurs sont des isomères de position qu'il est important de différencier à l'aide d'une séparation chromatographique de qualité car la spectrométrie de masse ne le permet pas. Pour cela, 4 colonnes chromatographiques ont été sélectionnées puis testées avec des phases mobiles à différents pH. Ensuite, la seule cartouche de préconcentration du marché résistante à une pression suffisante à notre connaissance, l'Oasis HLB Direct Connect a pu être testée et les conditions de prise d'essai (volume et acidification) ont été optimisées.

### III.2.1. Optimisation de la chromatographie liquide

Compte tenu de la grande diversité des molécules de la chimiothèque, l'enjeu de l'étape de chromatographie est de séparer les analytes avec la meilleure résolution. Les phénomènes de suppression d'ionisation sont alors limités et les molécules qui possèdent le même rapport *m/z* sont confirmées et quantifiées sans ambiguïté. L'objectif de cette première étape était de déterminer la colonne analytique la mieux adaptée à la séparation et à la détection du plus grand nombre de molécules de la chimiothèque.

Avant la sélection des colonnes chromatographiques, une analyse des caractéristiques physico-chimiques de chacune des molécules a été réalisée à l'aide du site internet chemicalize.org (ChemAxon, Budapest, Hongrie). Ce service gratuit en ligne permet d'obtenir des grandeurs physico-chimiques sur la base de modélisation. Ainsi, le logP (log $K_{o/w}$) qui traduit la polarité de la molécule et les pH extrêmes pour lesquels la molécule est

sous forme neutre ont été récupérés. Sur la Figure 91 est présenté un exemple d'une capture d'écran du site chemicalize.org pour la molécule d'atrazine. Outre la structure développée de la molécule ainsi que son analyse élémentaire, le site internet donne le logP et l'état d'ionisation en phase liquide de la molécule en fonction du pH. Dans le cas d'une molécule toujours ionisée, les pH extrêmes ont été déterminés pour la forme de la molécule permettant l'obtention du logD le plus grand. Ces informations ont été relevées pour chacune des molécules de la chimiothèque.

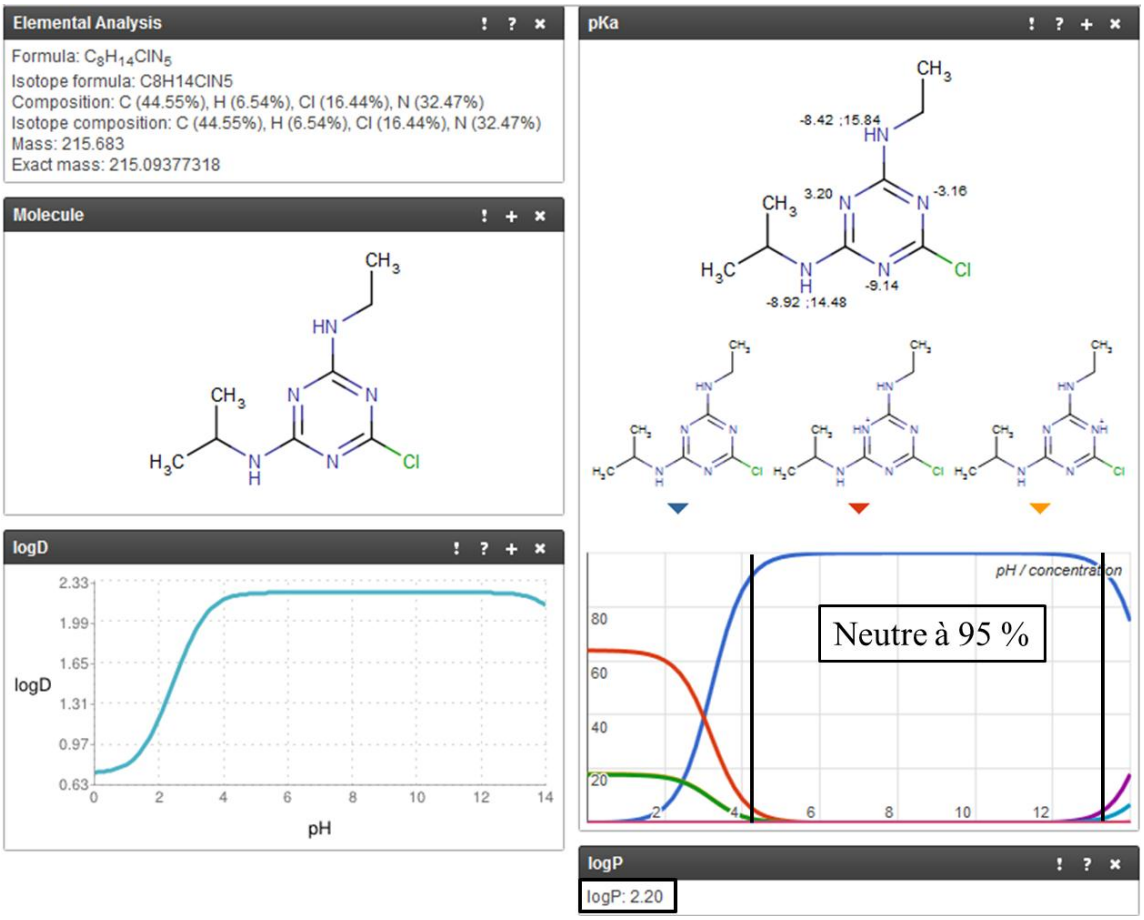



**Figure 91 : Capture d'écran du site Chemicalize [418] pour la molécule atrazine**

Dans cette exemple, le logP de la molécule (encadré en noir) et de 2,20 tandis que les pH extrêmes pour lesquels la molécule est sous forme neutre à plus de 95 % sont 4,4 et 13,2 (entre les deux barres verticales noires).

La distribution des logP de l'ensemble des molécules de la chimiothèque est représentée sur la Figure 92. La barre verticale noire placée sur le 0 symbolise la distinction entre le caractère polaire ou apolaire de la molécule, bien que dans la pratique cette séparation ne soit pas aussi nette. Cette illustration permet néanmoins de dégager une tendance où l'on peut voir que la grande majorité des 817 molécules de la chimiothèque sont apolaires avec un logP supérieur à 0 et un maximum observé entre 2 et 4. Cela confirme les conclusions réalisées à partir de

l'étude bibliographique menée lors de l'introduction de ce travail dans laquelle les colonnes utilisées étaient majoritairement des silices greffées $C_{18}$. Sur la base de ces observations, 4 colonnes ont été sélectionnées : deux colonnes $C_{18}$ pour leurs caractères très apolaires et leur taux de carbone greffé important :(i) la Waters BEH $C_{18}$ et (ii) la Thermo Hypersil Gold $C_{18}$ et deux colonnes à rétention mixte : (iii) la Waters HSS T3 et (iv) la Waters HSS PFP. La colonne HSS T3 est composée de silice greffée de chaînes $C_{18}$ et un endcapping polaire (dont la nature est confidentielle) permettant une meilleure rétention de composés modérément polaires. La colonne HSS PFP est composée de silice greffée avec des groupements pentafluorophényl dont les atomes de fluor, particulièrement électronégatif, vont interagir avec les liaisons π des molécules. Elle est donc bien adaptée à la rétention de composés qui possèdent des cycles aromatiques, ce qui est le cas de nombreux médicaments.

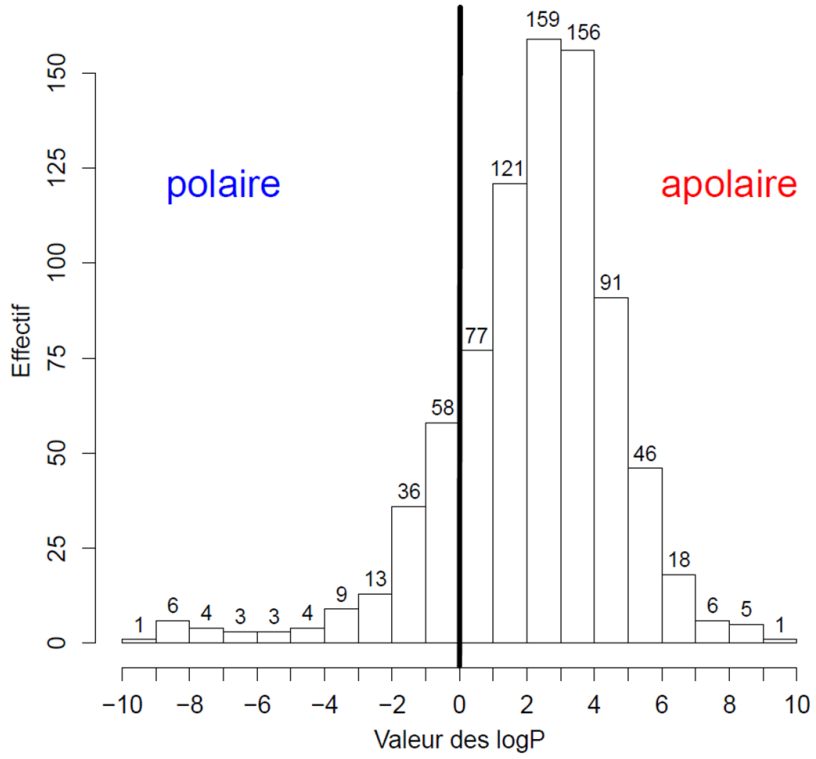



**Figure 92 : Distribution des logP des 817 molécules de la chimiothèque**

Nous voulions aussi connaître le pH pour lequel la plus grande proportion de molécules de la chimiothèque est sous forme neutre. En effet, nous sommes partis de l'idée qu'une molécule neutre est mieux retenue par les colonnes chromatographiques de type $C_{18}$ qu'une molécule ionisée qui subira davantage de forces d'élution notamment en présence de phase aqueuse. Pour cela, nous avons utilisé les données recueillies sur le site internet chemicalize.org pour tracer la Figure 93 qui représente le nombre de molécules neutres ionisées positivement et ionisées négativement en fonction du pH. Le maximum de molécules neutres est obtenu au

pH 5 avec 466 molécules sur 817. Pour offrir un point de comparaison avec le pH optimum théorique de 5, nous avons décidé de choisir deux autres pH à 2,5 et 10 pour tester les colonnes. Chacune d'entre elles a été testée à 2 ou 3 pH conformément aux spécifications des constructeurs. La colonne Hypersil Gold $C_{18}$ a été testée aux 3 pH tandis que les autres colonnes n'ont pu être évaluées qu'au pH acide et neutre. Les 2 phases mobiles ($H_2O$ et ACN) ont été préparées comme suit : pH acide 2,5 avec 0,08 % de HCOOH, pH 5 avec 5 mM de $CH_3COONa$ + 100 µL de $CH_3COOH$ et pH basique 10 avec 0,08 % de $NH_3$. Le pH des solutions aqueuses a été vérifié avant et après l'expérience pour contrôler la stabilité de la solution. Durant ces tests, 9 conditions ont été évaluées sur les paramètres colonnes et pH.

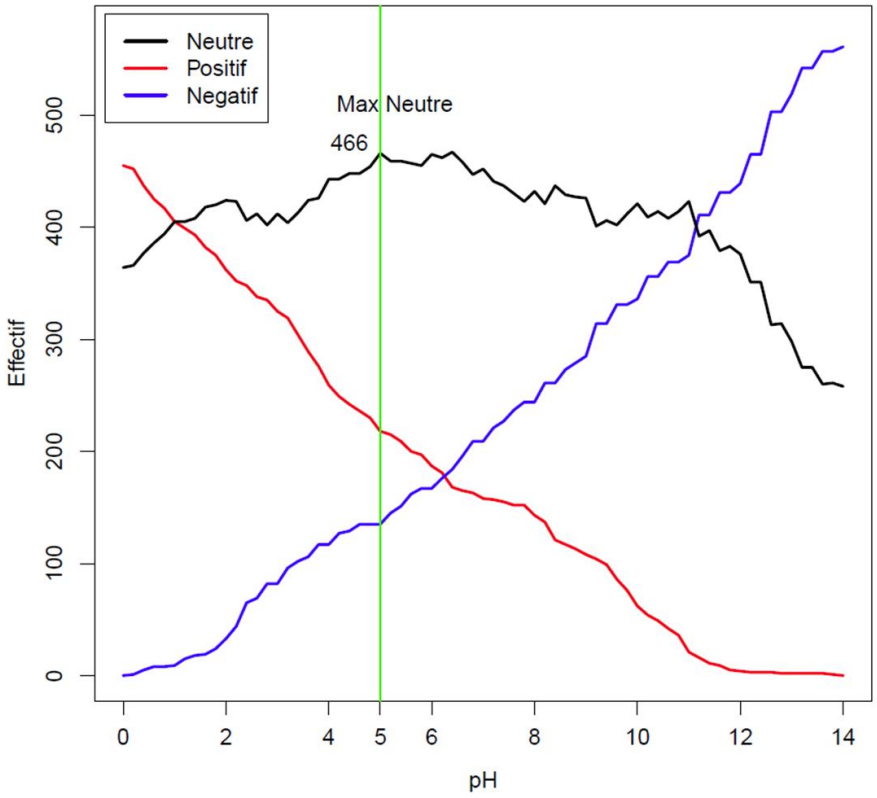



**Figure 93 : Répartition des molécules neutres et ionisées en fonction du pH**

Afin de définir un protocole expérimental des différentes conditions, plusieurs critères de sélection ont été définis : (i) le nombre maximal de molécules détectées avec la méthode et (ii) la répétabilité de la méthode. Le protocole expérimental suivant a été réalisé : la colonne a été conditionnée par 6 blancs analytiques, puis 10 injections à 10 ng/mL et 10 injections à 100 ng/mL d'un mélange de 763 molécules (uniquement celles ionisables en mode d'ionisation positive) ont été réalisées. Un blanc analytique a été injecté entre chaque échantillon (mélange des 763 molécules), notamment pour mesurer l'éventuel effet mémoire du système analytique pour chaque molécule.

Une fois les expériences réalisées, il semblait difficile et particulièrement fastidieux de réaliser une inspection manuelle des données au vu du nombre d'analytes ciblés et du nombre de conditions testées. Par conséquent, une solution automatisée pour détecter les analytes d'intérêt à partir de données brutes a été développée. Pour cela, le logiciel XCMS a été utilisé pour détecter les pics chromatographiques dans chaque échantillon puis un algorithme appelé « MethodComparator » a été créé par le bioinformaticien de l'équipe. Les variables de chaque réplica ont été annotées par comparaison de leurs rapports m/z avec une base de données contenant l'ion principal formé par chaque molécule. Cette annotation dans chaque échantillon séparément permet d'améliorer la précision des temps de rétention et des rapports *m/z* mesurés par rapport à l'annotation d'une seule table de pics contenant tous les échantillons avec des temps de rétention et des rapports *m/z* moyens. Pour chaque annotation, les fragments en source ainsi que les adduits et isotopes ont été associés avec une tolérance maximum de 4 secondes par rapport aux temps de rétention de l'ion principale. Le ratio entre l'aire expérimentale des pics du massif isotopique $^{13}C$, $^{37}Cl$, $^{34}S$ et $^{81}Br$ et leur aire théorique a été calculé. Les annotations identiques dans les réplicas d'une même concentration ont été alignées sur la base de leur temps de rétention. Enfin, des filtres ont été appliqués sur la table de pics des réplicas alignés pour déterminer plusieurs niveaux de confiance pour chaque annotation (Tableau 19).

Seules les annotations pour lesquelles le temps de rétention et l'aire sont supérieurs à 90 secondes et $1 \times 10^6$ U.A. ont été prises en compte. Elles ont été considérées comme « valides » lorsqu'elles étaient présentes dans au moins 8 sur 10 réplicas. Les annotations « valides » ont été considérées comme « fiables » si : (i) elles étaient détectées dans tous les réplicas, (ii) si le rapport entre l'aire détectée et l'aire théorique de l'isotope $^{13}C$ était compris entre 0,7 et 1,3 dans tous les réplicas **et** si elles avaient (iii) **soit** un ratio correct (compris entre 0,5 et 1,5) entre l'aire détectée et l'aire théorique pour les isotopes $^{37}Cl$, $^{81}Br$ et $^{34}S$ dans respectivement 60 %, 60 % et 50 % (en raison de l'intensité relative théorique du $^{34}S$ de seulement 4,5 %) des échantillons, **soit** au moins 3 autres adduits ou fragments en source formés par la même molécule détectés dans 60 % des échantillons. Pour ce dernier critère, si moins de 3 adduits ou fragments en source étaient recensés dans la banque de données pour une molécule, la détection d'un d'entre eux suffisait. Il est à noter que certaines annotations ne pouvaient pas être considérées comme « fiables » car elles ne possédaient pas d'adduits ou fragments en source répertoriés ni d'atomes Cl, Br ou S dans leur formules brute.

| Critères | Annotation valide | Annotation fiable |
|---|---|---|
| Présence (en nombre de réplicas) | ≥ 8/10 | 10/10 |
| Ratio isotopique $^{13}C$ | - | 0,7 < ratio < 1,3 |
| Confirmation 1 | - | Ratio d'aire compris entre 0,5 et 1,5 pour les isotopes $^{37}Cl$, $^{81}Br$ et $^{34}S$ pour 60 %, 60 % et 50 % des réplicas |
| Confirmation 2 | - | Au moins 3 adduits ou fragments en source formés par la même molécule dans 60 % des réplicas |

**Tableau 19 : Critères pour les annotations valides et fiables dans MethodComparator**

L'objectif de l'annotation valide est l'utilisation d'un critère assez peu strict pour l'obtention d'une liste de molécules proche de la réalité mais avec une confiance relative tandis que l'annotation fiable permet de générer une liste de molécules restreintes mais avec une grande confiance grâce à des critères très stricts.

Sur la base des données générées par l'outil MethodComparator, les conditions d'essai ont été évaluées. Pour chacune d'entre elles (couple colonne/pH), le nombre de molécules « valides » et « fiables » pour les deux concentrations testées (10 et 100 ng/mL) ainsi que le coefficient de variation (CV) sur les aires et les temps de rétention des 10 réplicas ont été comparés. Enfin, l'effet mémoire a été évalué par la détermination du signal correspondant à chaque molécule dans 4 blancs analytiques suivant les injections du mélange de 763 molécules. Les résultats de MethodComparator ont été compilés dans la Figure 94 pour la concentration 100 ng/mL et dans la Figure 95 pour la concentration 10 ng/mL.

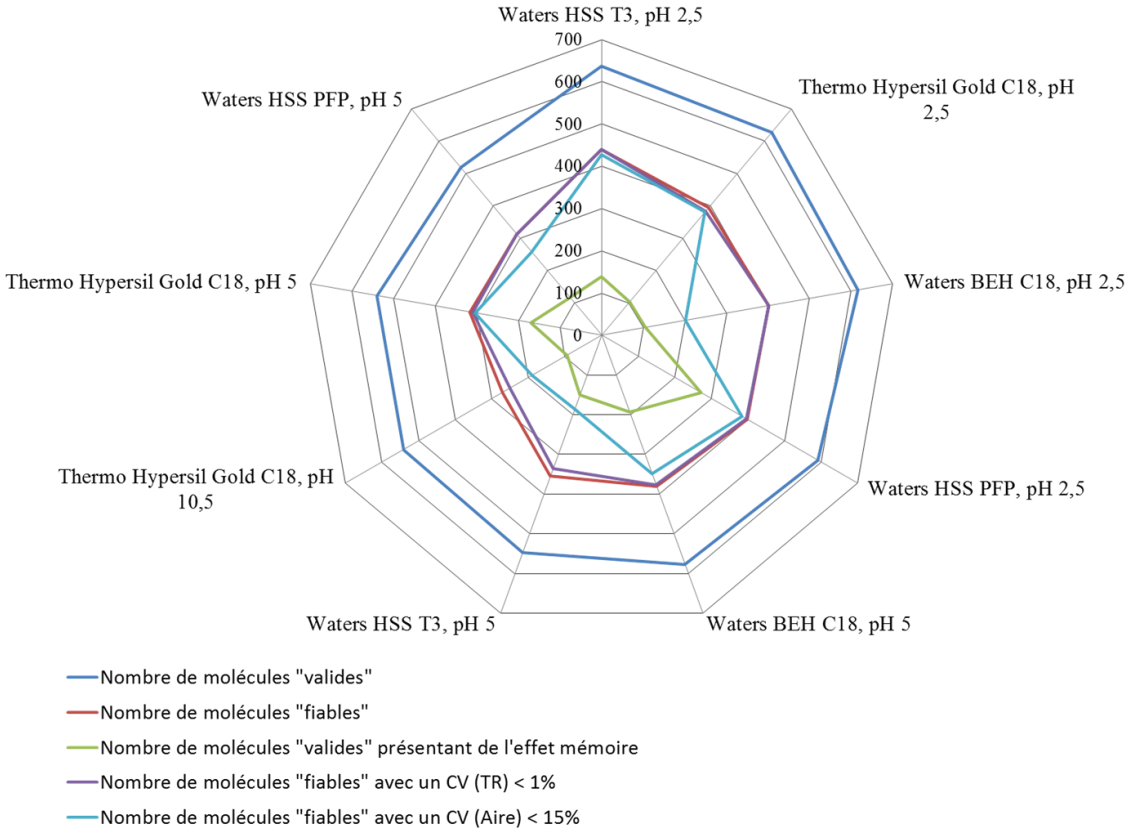



**Figure 94 : Représentation radar des résultats obtenus à partir de MethodComparator pour les colonnes testées à la concentration de 100 ng/mL**

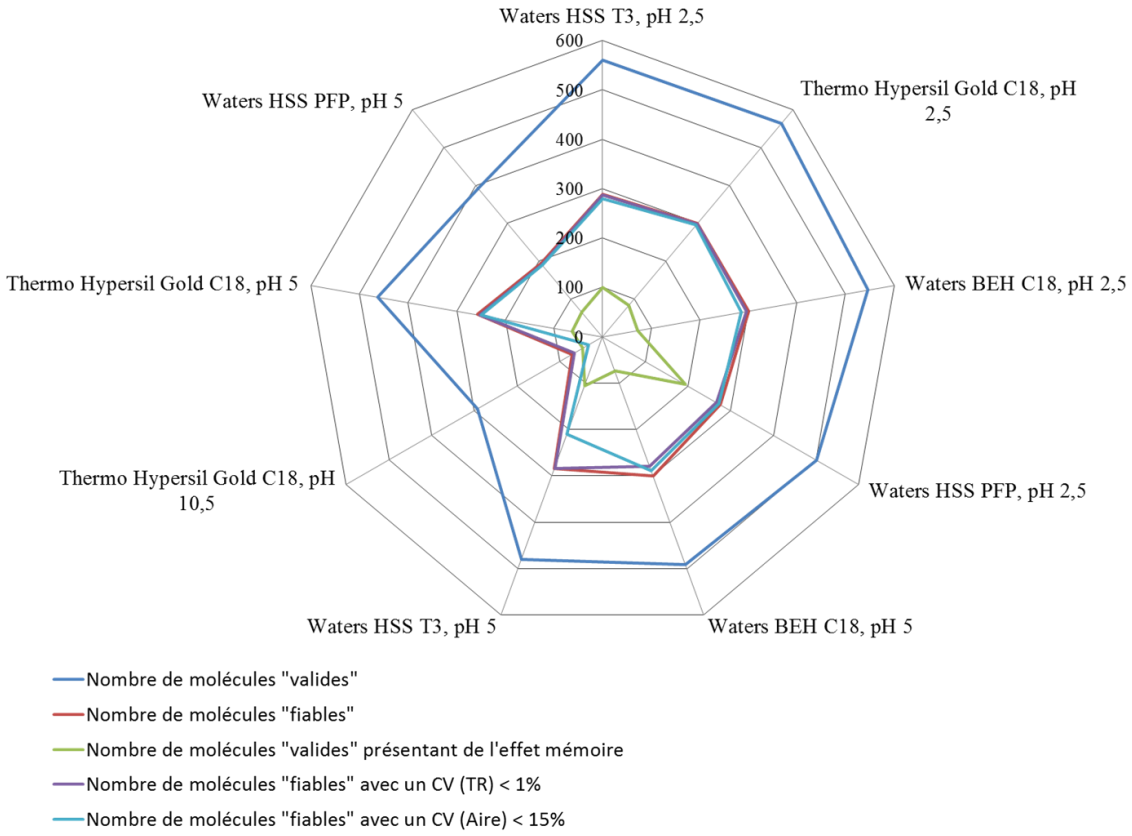



**Figure 95 : Représentation radar des résultats obtenus à partir de MethodComparator pour les colonnes testées à la concentration de 10 ng/mL**

Les résultats montrent que la colonne HSS T3 à pH acide (2,5) produit les meilleurs résultats pour les deux concentrations avec plus de 630 molécules détectées dans le mélange de 763 molécules ionisables en mode positif pour la concentration à 100 µg/mL. On constate également que toutes les molécules jugées comme fiables par l'outil MethodComparator pour les deux concentrations testées, ont un coefficient de variation sur les temps de rétention et sur l'aire inférieur à 1 % et 15 % respectivement, ce qui signifie une bonne répétabilité sur 10 réplicas. Par ailleurs, le nombre de molécules présentant un effet mémoire est important (plus de 100 molécules selon l'outil). Une optimisation des rinçages de la seringue de prélèvement premettra de régler ce problème. La colonne Hypersil Gold $C_{18}$ produit sensiblement les mêmes résultats, mais est légèrement moins performante que la colonne HSS T3. Ces résultats montrent que de nombreuses molécules sont sujettes à l'effet mémoire avec la colonne HSS PFP à pH acide pour les deux concentrations bien qu'aucune explication n'ait pu être proposée.

Contrairement au calcul de pH optimum réalisé précédemment, l'ensemble des conditions acides produisent de meilleurs résultats que les conditions à pH 5. Cette différence entre la théorie et la pratique peut s'expliquer par le fait que : (i) le site internet chemicalize.org est basé sur des calculs de modélisation et/ou (ii) la nécessité de prendre en compte d'autres paramètres que l'hydrophobicité pour évaluer la rétention chromatographique et/ou (iii) la base de données MS ayant été réalisée en milieu acide, les résultats peuvent être orientés dans ce sens. A l'issue de ces tests et après l'étude des résultats de MethodComparator, il a été choisi de conserver la condition à pH acide et la colonne HSS T3 pour continuer le développement de la méthode ciblée large spectre.

### III.2.2. Optimisation de la préconcentration en ligne

L'analyse de la matrice eau est complexe car les polluants présents en très petites quantités doivent généralement être concentrés avant la détection. Pour preuve, lors de l'étude bibliographique en introduction de ce travail, les seuls auteurs ayant travaillés en MS par injection directe sont 100 à 1000 fois moins sensibles que les autres analyses réalisées. La quasi-totalité des auteurs réalisent une préconcentration hors ligne, c'est-à-dire une analyse en deux temps. L'échantillon est tout d'abord concentré sur des cartouches puis les molécules d'intérêts sont éluées dans un solvant organique. Cet éluat est ensuite séché puis reconstitué dans un solvant aqueux avant analyse. Les cartouches utilisées sont efficaces mais coûteuses, jetables et nécessitent un grand volume initial de matrice, ce qui implique aussi un coût logistique en transport et en stockage plus important. De plus, le grand nombre de

manipulations réalisées est important en temps humain et des erreurs de manipulation peuvent survenir. Pour pallier à ces limitations, les fabricants ont mis au point une cartouche de préconcentration en ligne réutilisable et nécessitant un volume d'échantillon 10 à 100 fois plus faible pour des résultats comparables comme le montre différents articles [282,467,468]. Les volumes injectés sur la cartouche de préconcentration en ligne sont compris entre 1 mL et 20 mL de matrices chargées de type eau de station d'épuration. Cette procédure permet d'atteindre des limites de quantification entre 0,1 et 80 ng/L, ce qui est comparable aux sensibilités atteintes par le protocole hors ligne observées lors de la revue bibliographique dans l'introduction de ce travail.

La préconcentration en ligne est automatisée et comprend deux étapes :

- Tout d'abord, un volume de 1 à 10 mL d'eau est chargé sur la cartouche dans le sens usuel d'utilisation de la cartouche (*flush*) à fort débit (1 mL/min classiquement) pour se placer à régime turbulent (Figure 96, étape 1).
- Une fois l'échantillon percolé, le gradient analytique à 0,5 mL/min commence et est introduit dans la cartouche de préconcentration dans le sens contraire à la première étape (*backflush*) afin d'éluer les molécules d'intérêt piégées précédemment (Figure 96, étape 2). L'extrait est alors envoyé vers la colonne analytique pour la chromatographie des molécules. Le gradient de phase mobile organique permet d'éluer les molécules au fur et à mesure en fonction de leur apolarité.

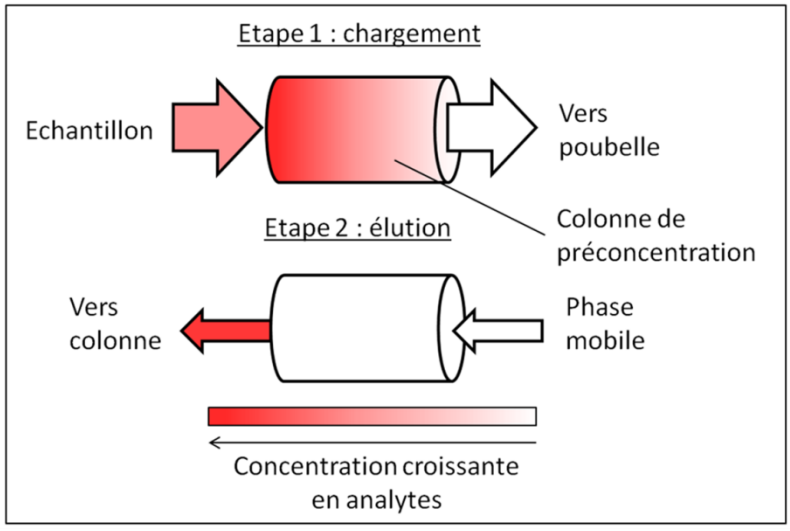



**Figure 96 : Illustration du fonctionnement de la préconcentration en ligne**

Lors de l'étape 2, la cartouche de préconcentration est reliée en série et placée entre la pompe analytique et la colonne. Elle subit donc la contre pression exercée par la colonne analytique et doit être dotée des spécifications mécaniques adéquates. Or, les systèmes de SPE en ligne

sont généralement incompatibles avec les pressions élevées (1000 bars) générées à un débit de 500 µL/min par les systèmes UHPLC utilisant des particules *sub* 2 µm comme la colonne HSS T3. Par conséquent, la seule cartouche SPE en ligne disponible sur le marché, au moment de ce développement, susceptible de résister à de telles contre-pressions est l'OASIS HLB Direct Connect (Waters, Guyancourt, France) composée d'un copolymère de divinylbenzène et N-vinyl-pyrrolidone. Par chance c'est aussi la phase la plus utilisée pour l'adsorption de xénobiotiques dans de nombreuses matrices y compris dans l'eau comme nous l'avons vu lors de l'introduction. Pour nos tests, nous avons couplé cette cartouche de préconcentration de 2 cm avec la colonne analytique HSS T3 préalablement choisie. Afin de sélectionner les meilleures conditions pour l'étape de SPE en ligne, nous avons décidé de tester l'acidification de la prise d'essai chargé sur la cartouche car le pH acide a été déterminé comme le pH optimum lors de nos tests de colonnes. Par ailleurs, deux volumes d'échantillons ont été évalués : 1 mL et 5 mL pour le chargement sur la cartouche. Durant ces tests, le protocole analytique a été identique à celui effectué pour le test des colonnes si ce n'est que le mélange de 763 molécules a été injecté en 10 réplicas à une concentration 1000 fois plus petite que pour le test des colonnes soit 100 ng/L et 10 ng/L.

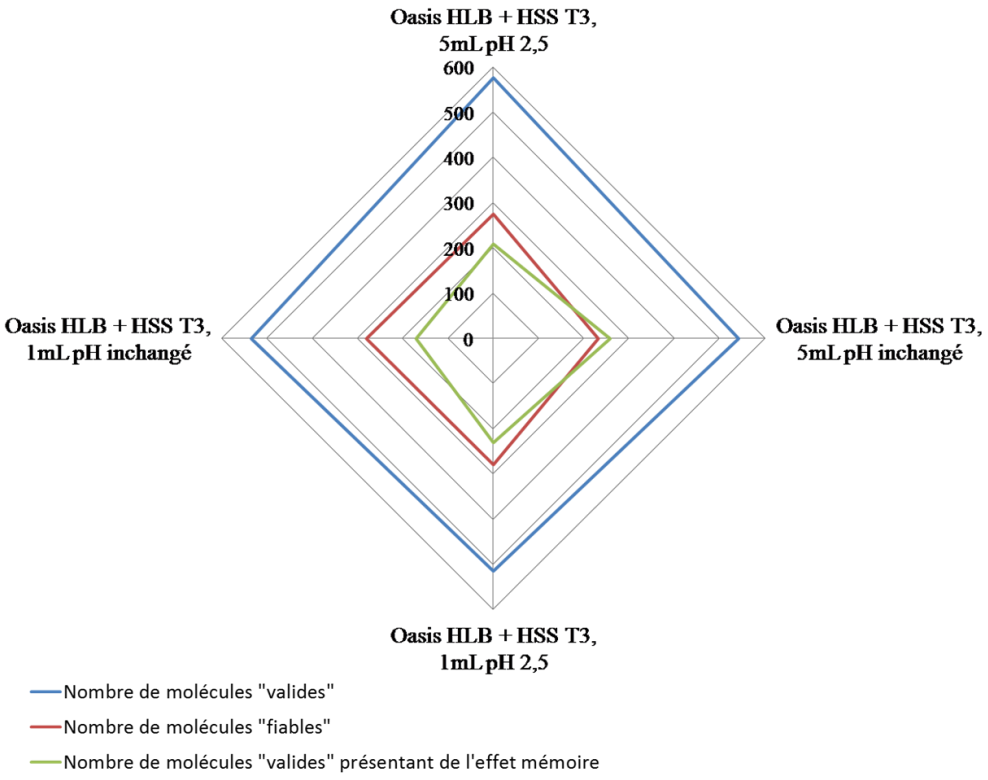



**Figure 97 : Représentation radar des résultats obtenus à partir de MethodComparator pour le système analytique Oasis HLB + HSS T3 à la concentration de 100 ng/L**

Les résultats de MethodComparator pour les tests effectués sur le système analytique couplant la cartouche de préconcentration Oasis HLB et la colonne analytique HSS T3 sont présentés en Figure 97. Les données sur le coefficient de variation ont été supprimées par rapport aux résultats précédents car l'ensemble des molécules fiables sur ce graphique ont un coefficient de variation sur les aires et sur les temps de rétention inférieurs à 15 % et 1 % respectivement. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque 5 mL d'eau acidifié à un pH de 2,5 sont chargés sur la cartouche de préconcentration, avec près de 575 molécules détectées selon l'outil MethodComparator. Les résultats pour la concentration 10 ng/L ne sont pas présentés car ils aboutissent aux mêmes conclusions.

A l'issue de ce développement analytique, le système retenu prévoit l'utilisation d'une prise d'essai de 5 mL préalablement acidifié avec de l'acide formique pour obtenir un pH de 2,5. Ce volume d'échantillon est envoyé sur une cartouche de type Oasis HLB à régime turbulent de 1 mL/min durant 7 minutes (5 minutes de chargement de l'échantillon et 2 minutes de lavage de la cartouche avec la phase mobile de chargement acidifié). Le gradient analytique est ensuite envoyé à contre sens de la phase chargement dans la cartouche de préconcentation pour réaliser l'élution des composés adsorbés. Ce gradient est composé de phases mobiles acidifiées à un pH de 2,5 de composition croissante et linéaire en acétonitrile à un débit de 0,5 mL/min. L'éluat provenant de la cartouche de préconcentration est envoyé vers une colonne analytique de type Waters HSS T3 qui assure la séparation des molécules qui sont ensuite transférées vers la source ESI et le spectromètre de masse Q-Exactive.

### III.2.3. Validation des recherches effectuées avec l'outil MethodComparator et confirmation des temps de rétention sur le système analytique HSS T3 – pH 2,5

Afin de confirmer le travail réalisé avec l'outil MethodComparator, nous avons réalisé une recherche manuelle dans les données brutes de l'ensemble des molécules détectées avec le système analytique Oasis HLB + HSS T3. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler sur le mélange des 763 molécules ionisables en mode positif mais aussi de constituer 10 mélanges contenant un plus petit nombre de molécules (environ 80 molécules par mélange). Nous redoutions en effet que le mélange complexe des 763 molécules limite le nombre de molécules détectables en raison de phénomènes de compétition lors de l'étape de préconcentration et de phénomènes de suppression d'ionisation important.
Ces mélanges ont été injectés à une concentration de 100 ng/L (limite réglementaire dans l'eau potable en France) dans le système Oasis HLB + HSS T3 et la détection a été réalisée

avec une méthode incluant deux évènements MS et MS/MS ciblé sur les ions contenus dans la banque de données MS/MS préalablement constituée. Les 763 molécules ionisables ont ensuite été recherchées manuellement et confirmées par comparaison de leurs spectres CID à ceux des standards afin d'obtenir un temps de rétention validé pour chacune d'elles.

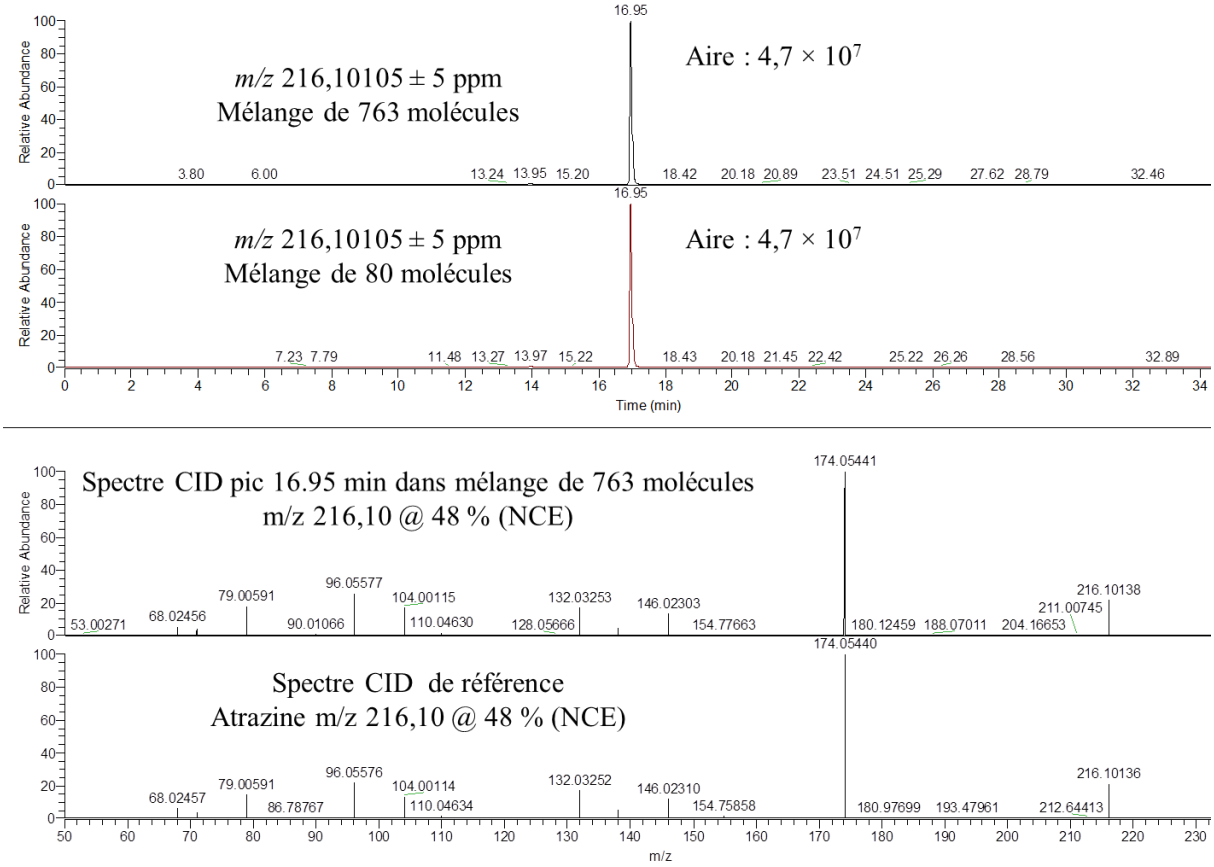



**Figure 98 : Exemple de confirmation du temps de rétention de la molécule Atrazine**

En haut sont présentés les chromatogrammes obtenus dans le mélange de 763 molécules et de 80 molécules en extrayant le courant ionique pour le rapport *m/z* 216.10105 avec 5 ppm de tolérance. En bas sont présentés les spectres CID sous le pic à 16,95 minutes pour le mélange de 763 molécules et le spectre CID de référence de l'Atrazine.

Sur la Figure 98, un exemple de la confirmation du temps de rétention de l'atrazine est présenté. Le rapport *m/z* correspondant a été extrait dans les chromatogrammes correspondant aux mélanges des 763 et de 80 molécules, puis le spectre CID obtenu dans le mélange de 763 molécules a été comparé avec le spectre de référence de l'atrazine. Dans cet exemple, les spectres CID sont parfaitement superposables, ce qui confirme sans ambiguïté le temps de rétention de l'atrazine. Cette opération a été réalisée pour l'ensemble pour les 763 molécules. Au final, 512 molécules sont détectées dans le mélange de 763 molécules contre 539 dans les mélanges de 80 molécules. La méthode que nous avons développée permet au final la détection de 539 molécules en 36 minutes avec 5 mL de prise d'essai. Dans le Tableau 22

(annexe 6) contenant les 817 molécules sélectionnées au départ de cette étude, une colonne indique si chaque molécule est détectable avec cette méthode ainsi que son temps de rétention. Compte tenu des résultats, il a été choisi de travailler avec des mélanges de 80 molécules plutôt qu'avec un mélange de 763 molécules pour la suite de ce travail.

### III.2.3.1. Bilan des molécules perdues durant le développement de la méthode

Afin de connaître le nombre de molécules perdues à chaque étape du développement, les 763 molécules ionisables en mode positif sous forme de mélange de 80 molécules ont été injectées à la concentration de 100 ng/mL sur la colonne analytique HSS T3 seule. Les molécules ont ensuite été recherchées manuellement et confirmées de la même manière que précédemment. A l'issue de cette étape, 640 molécules ont été détectées avec un temps de rétention supérieur à 90 secondes. La Figure 99 présente le nombre de molécules à chaque étape du développement de notre méthode ciblée large spectre. On remarque que 123 molécules ne sont pas détectées avec la colonne chromatographique seule à partir des 763 molécules ionisables en mode positif. Parmi elles, 53 ont un temps de rétention inférieur à 90 secondes et passent dans le volume mort. Les autres sont trop peu intenses pour être détectées à la concentration injectée de 100 ng/mL sur la colonne contre 5 µg/mL lors des FIA-MS. Lors du passage de la LC seule vers le couple SPE + LC, 99 molécules sont à nouveau perdues. Il s'agit principalement de molécules modérément polaires ayant un temps de rétention dans l'expérience de LC seule autour de 2 à 5 minutes. Ces molécules sont donc vraisemblablement trop peu retenues sur la cartouche de préconcentration pour être détectées.

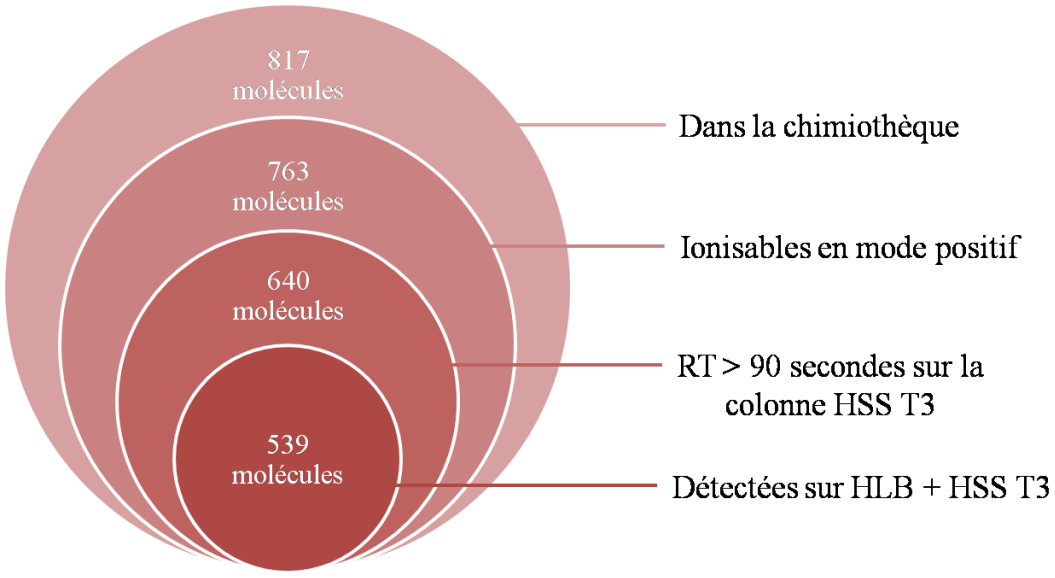



**Figure 99 : Diagramme de Venn imbriqué présentant le bilan du nombre de molécules à chaque étape de notre développement**

### III.2.3.2. Etude rétrospective de l'outil MethodComparator

Le nombre exact de 539 molécules détectables par notre méthode étant désormais connu, les performances de l'outil MethodComparator ont été rétrospectivement évaluées en comparant ce chiffre avec le nombre de molécules estimées par l'outil.

| Critères | Nombre d'annotations par l'outil | Nombre de molécules réellement détectées sur 539 | Nombre de faux positif |
|---|---|---|---|
| m/z seulement | 684 | 534 (99 %) | 150 (22 %) |
| Valide | 575 | 495 (92 %) | 80 (14 %) |
| Fiable | 274 | 262 (49 %) | 12 (4 %) |

**Tableau 20 : Chiffres comparatifs des molécules détectées par l'outil puis réalisées de façon manuelle**

Le Tableau 20 présente la comparaison des molécules identifiées par l'outil selon plusieurs critères avec celles validées de façon manuelle lors de l'étude des données brutes de l'expérience SPE + LC. La deuxième colonne de ce tableau indique le nombre d'annotations réalisées par l'outil selon 3 critères de plus en plus restrictifs. La troisième colonne indique le nombre de molécules effectivement identifiées dans les données brutes parmi les 539. La quatrième colonne indique le nombre de faux positif, c'est-à-dire le nombre d'annotations réalisées par l'outil MethodComparator alors que la molécule n'a pas été identifiée manuellement.

Sur la base de ces résultats, on constate que le critère d'annotation sur le rapport *m/z* permet d'annoter 99 % des molécules réellement détectées. Cependant, le nombre d'annotation est très supérieur à 539 conduisant à 22 % de faux positifs. Ces chiffres montrent que l'annotation réalisée sur la base d'une détection avec le logiciel XCMS est relativement exhautive. Néanmoins, les signaux présents dans le bruit de fond chimique et électronique peuvent être interprétés comme de vrais pics, ce qui explique le nombre important de faux positifs. Le niveau d'annotation fiable est très robuste puisque seulement 4 % des molécules annotées sont des faux positifs. Ce critère a donc bien joué son rôle car ce niveau d'annotation très strict définissait le nombre de molécules détectées avec une certitude quasi-totale dans les différentes conditions testées. Cette exigence se traduit par un pourcentage d'annotations de molécules correctement détectées de 49 % seulement. Finalement, le meilleur compromis est le niveau d'annotation valide qui permet l'obtention de 92 % de molécules correctement détectées avec un faible pourcentage de faux positif autour de 14 %. Ces résultats montrent surtout que l'outil de traitement des données automatisé MethodComparator est fiable et que

les niveaux de critères d'annotation ont été correctement choisis. Cet outil présente donc un intérêt certain lorsque le nombre de molécules suivies et/ou le nombre de conditions testées sont importants car une inspection manuelle d'un grand nombre de signaux est très chronophage et fastidieux. Ce nouvel outil peut être considéré comme un bon indicateur pour choisir la condition testée la plus pertinente.

A ce stade, 4 colonnes chromatographiques et une cartouche de préconcentration ont été testées pour l'obtention d'une méthode la plus exhaustive possible. L'emploi d'outils bioinformatiques et notamment de MethodComparator nous a permis de comparer automatiquement avec une grande rapidité et une bonne fiabilité les différentes conditions testées. La meilleure condition obtenue est un couplage de la colonne analytique HSS T3 avec la cartouche de préconcentration Oasis HLB, une prise d'essai et des phases mobiles acidifiés à 0,08 %. Les temps de rétention ont ensuite été recherchés manuellement sur des mélanges de 80 molécules environ plutôt que sur un mélange de 763 molécules et confirmés par comparaison des spectres CID de la banque de données de référence et des échantillons tests. La méthode ainsi développée permet la détection simultanée de 539 polluants (297 médicaments, 238 pesticides et 4 autres) en 36 minutes avec seulement 5 millilitres d'eau. Elle a ensuite été validée selon plusieurs critères.

## III.3. **Validation**

De manière générale, la validation au sens strict du terme de méthodes de criblage multi-résidus est très difficile en raison du grand nombre de paramètres à prendre en compte. S'agissant d'une méthode de criblage à large spectre hors d'un cadre réglementaire, il n'existe pas de normes établies pour ce type d'analyse bien que des initiatives commencent à apparaître notamment pour les spectromètres de masse haute résolution [469]. Plusieurs auteurs de publication ont réalisé une validation qualitative afin d'évaluer les limites potentielles de la procédure appliquée et d'améliorer les connaissances sur les limites de concentration de la méthode [470,471]. Le but de cette validation était d'assurer la présence d'un analyte à une certaine concentration et de rendre un résultat binaire (oui/non) lorsque la molécule est retrouvée dans un échantillon. Frenich et coll. précisent que l'intérêt est de réaliser une analyse qualitative dans laquelle la réponse serait de dire si la molécule est au-dessus ou en dessous des limites maximales de résidus de la matrice étudiée. Dans le cas d'une molécule au-dessus du seuil, l'échantillon serait analysé par une méthode quantitative

afin de déterminer précisément sa concentration. Finalement, et en l'absence de règles définies, l'étendue de la validation dépend de l'objectif de la méthode analytique [472].

Dans ce travail, le but était de réaliser une analyse qualitative par rapport à la norme dans l'eau potable, soit une LMR de 100 ng/L. Dans notre perspective d'amélioration continue vers une méthode la plus exhaustive possible, nous souhaitions aussi mieux connaître les performances de notre méthode. Ainsi, plusieurs paramètres tels que la spécificité, la fidélité intra-jour (répétabilité) et inter-jour (fidélité intermédiaire), la linéarité, les limites de détection (LOD), le facteur de concentration, l'effet matrice, l'effet mémoire, le plan d'expérience ont été étudiés.

### III.3.1. Etude de la spécificité de la méthode analytique développée

La chimiothèque compte 112 molécules isobares (54 paires ou trios) dont de nombreux isomères de position. La Figure 100 présente un exemple de 3 molécules isomères contenues dans la chimiothèque. Une séparation optimale par chromatographie de ces composés est essentielle car la spectrométrie de masse à haute résolution ne permet pas de les distinguer sur la base de leur rapport *m/z* identique. Il est donc très important tant pour la confirmation que pour la quantification de les séparer au mieux.

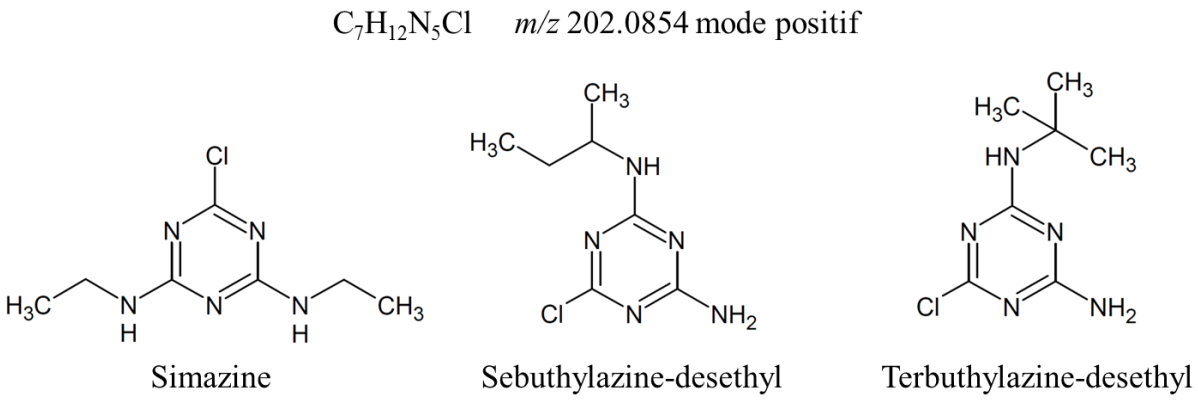



**Figure 100 : Exemple de 3 molécules isomères de la chimiothèque**

Pour caractériser sans ambiguïté ces molécules, deux mélanges de 54 substances ont été réalisés en veillant à séparer les molécules isobares. Ils ont ensuite été injectés sur le système analytique SPE + LC tout en réalisant des spectres MS/MS à l'énergie de référence préalablement déterminée. Les données générées ont permis d'attribuer un temps de rétention confirmé pour ces 108 molécules. Au cours de cette interprétation, deux cas de figures particulièrement intéressants ont été rencontrés :

- Le premier cas concerne les 3 molécules présentées en exemple ci-avant. Sur la Figure 101, on observe dans le chromatogramme du mélange des 539 molécules détectées par la méthode que les 3 substances semblent être séparées chromatographiquement, le pic à 17,43 minutes correspondant à un fragment d'une autre molécule. L'injection des 2 mélanges de 54 molécules isobares et du standard individuel de Terbuthylazine-desethyl ont permis d'identifier et de déterminer avec précision les temps de rétention de chacun des 3 pics chromatographiques. La qualité de la séparation chromatographique est d'autant plus importante lorsque l'on regarde les spectres CID à l'énergie de référence de chacune des molécules. On s'apperçoit que les spectres CID de la Sébuthylazine-desethyl et la Terbuthylazine-desethyl sont très proches voire indifférenciables. Dans ce cas, aucun problème d'identification n'est à craindre car ces deux molécules sont séparées d'une minute par la chromatographie liquide.

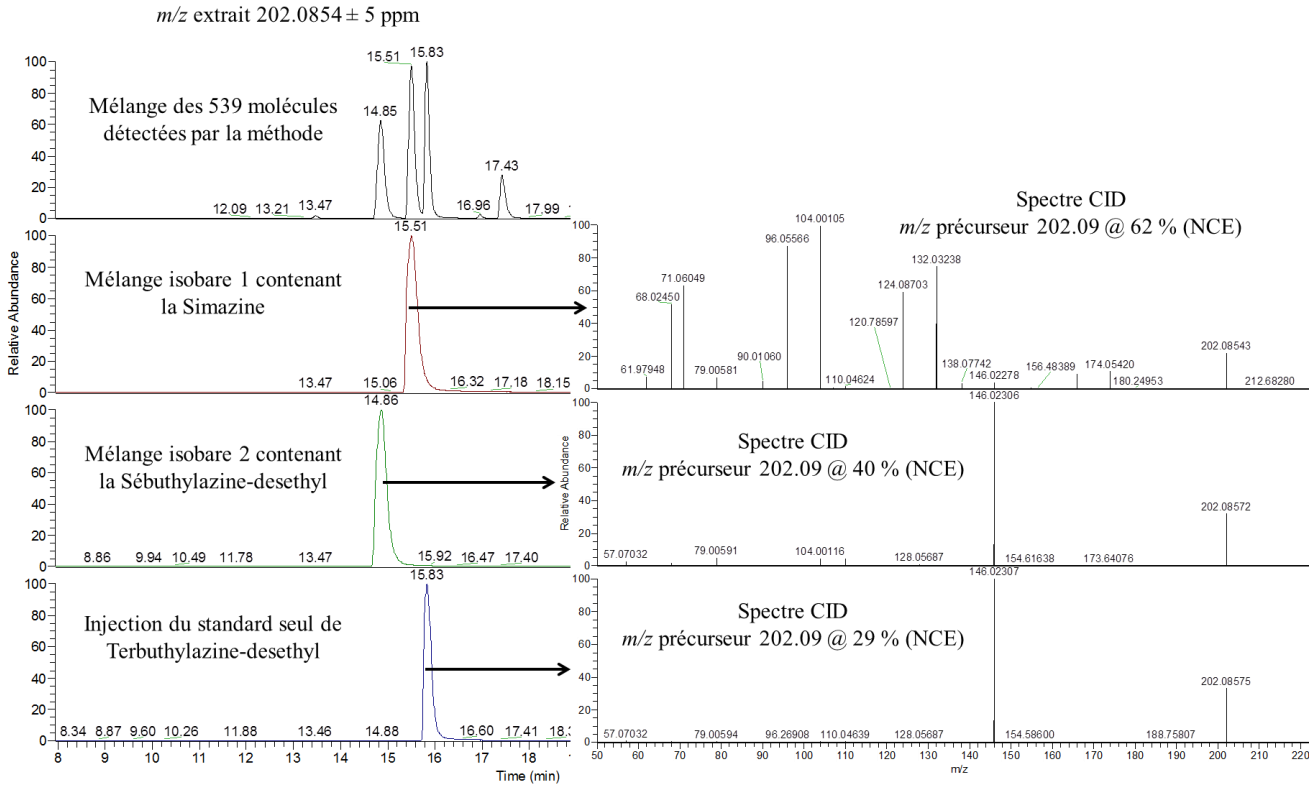



**Figure 101 : Séparation chromatographique de 3 isomères de position : la Simazine, la Sébuthylazine-desethyl et la Terbuthylazine-desethyl et confrontation de leur spectre CID obtenu à l'énergie de référence**

- Le deuxième cas concerne les molécules Prometon et Secbumeton présentées en Figure 102. Il s'agit de 2 isomères de position qu'il est impossible de différencier avec leur rapport *m/z*.

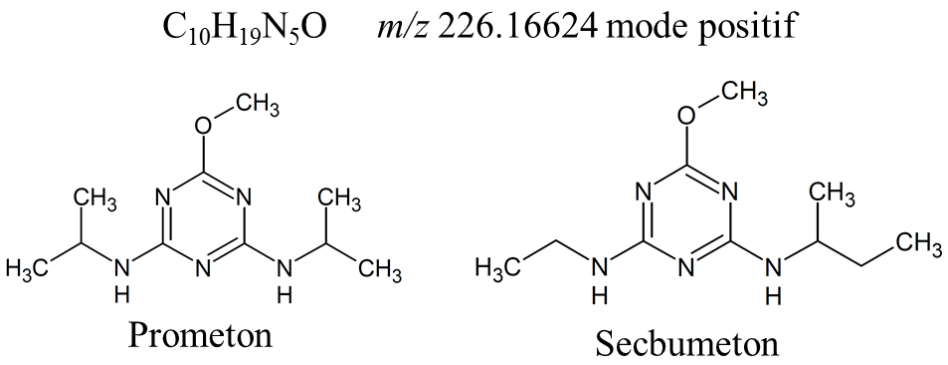



**Figure 102 : Cas particuliers de 2 isomères de position de la chimiothèque**

Sur le chromatogramme en Figure 103 du mélange des 539 molécules détectées par la méthode que nous avons développée, ces 2 molécules ne semblent pas être séparées chromatographiquement. Cette hypothèse est confirmée par l'injection des 2 mélanges de molécules isobares contenant l'une et l'autre des substances. Toutefois, les spectres CID de ces molécules sont très différents, ce qui permet de les identifier facilement. Il est ainsi possible, en fonction de la nature du spectre CID obtenu, de savoir si l'une ou les deux molécules sont détectées dans l'échantillon.

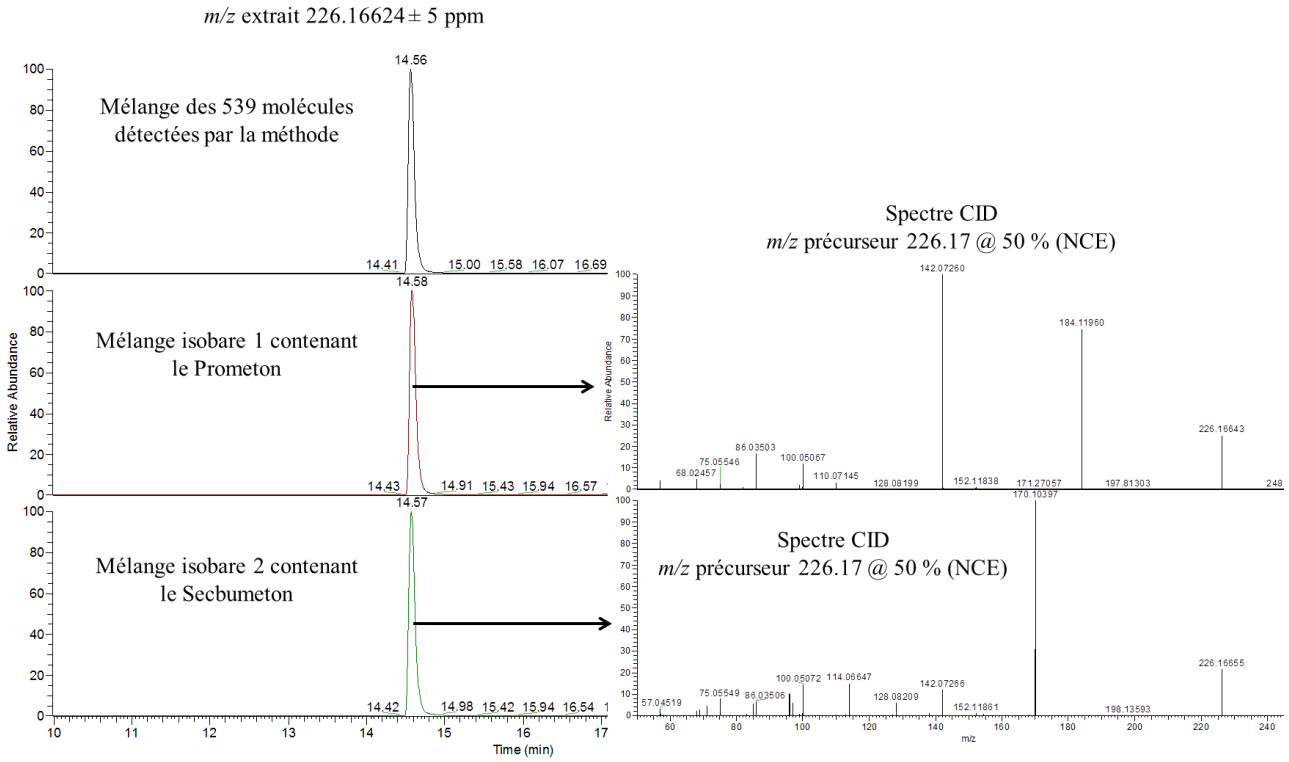



**Figure 103 : Différenciation de 2 isomères de position : le Prometon et le Secbumeton à l'aide des spectres CID des molécules**

D’autres isomères de la chimiothèque ne peuvent pas être identifiés sur la base de leur temps ou de leur spectre CID. C’est le cas du Métalaxyl et de son métabolite, le Métalaxyl-M qui est un stéréoisomère pour lesquels de la chromatographie stéréosélective devrait être utilisée. Dans notre cas, nous avons considéré que l’un ou l’autre des stéréoisomères pouvait être présents sans pouvoir les distinguer.

Ces résultats montrent que la méthode développée est spécifique pour un grand nombre de molécules isobares. L’identification des molécules est réalisée sans ambiguïté à l’aide de la chromatographie et/ou des spectres MS/MS.

### III.3.2. Fidélité inter- et intra-jour

La fidélité a été évaluée par des études de répétabilité et de fidélité intermédiaire (paramètre jour). La fidélité intra-jour a été testée par l’analyse de 5 échantillons supplémentés à 0,1 µg/L pendant 2 jours différents et la fidélité inter-jour a été réalisée sur les 10 échantillons de ces 2 mêmes jours. Le coefficient de variation (en %) a été obtenu en divisant l’écart-type par la moyenne, puis en multipliant par 100.

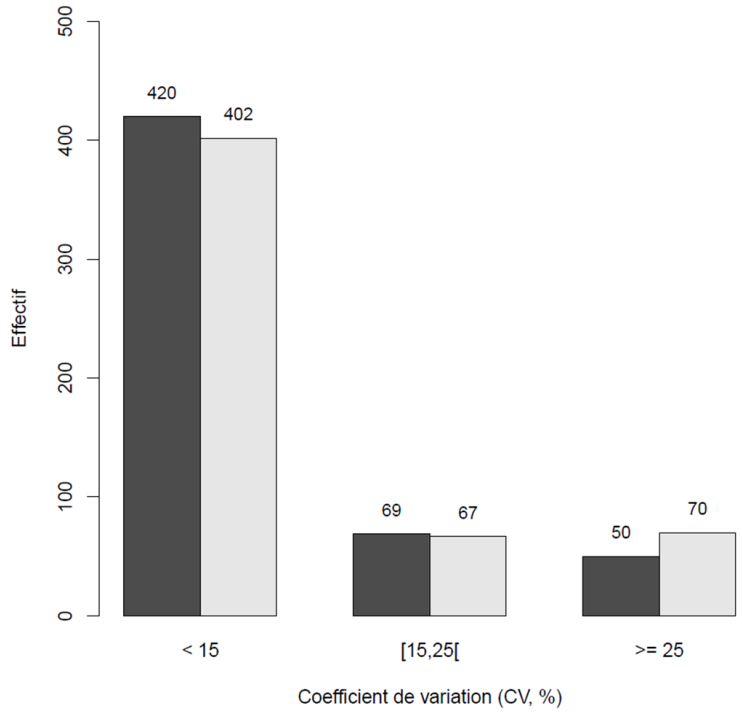



**Figure 104 : Répétabilité des 539 molécules de la méthode pour 5 échantillons sur 2 jours. (Jour 1 en noir et Jour 2 en gris)**

Les résultats de la fidélité intra et inter-jour sont présentés en Figure 104 et en Figure 105 respectivement. Les coefficients de variation pour 75 % des molécules sont inférieurs à 15 % pour les 2 jours en répétabilité et en reproductibilité. Ces chiffres montrent la capacité de la méthode à produire des résultats constants au cours du temps. On remarque néanmoins que certaines molécules présentent une variabilité importante dès ce stade de la validation.

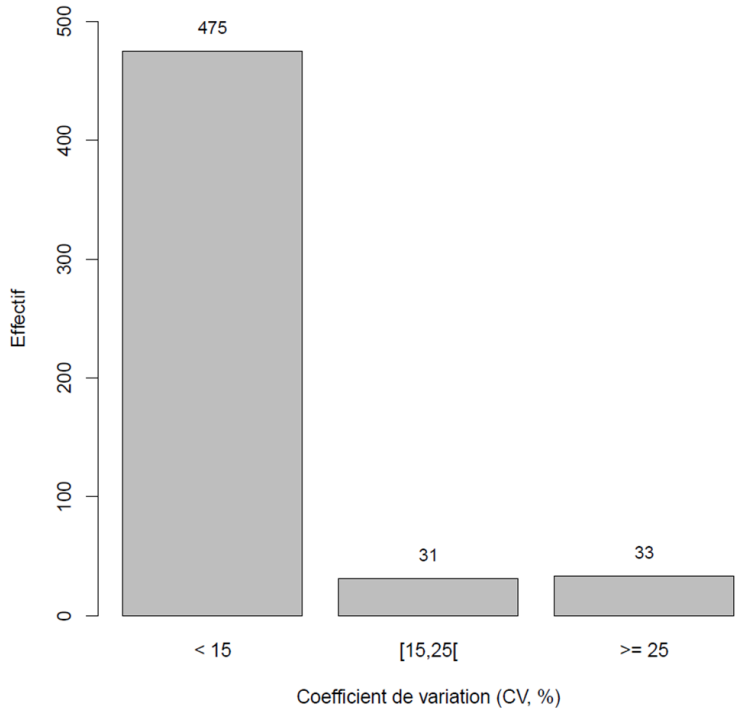



**Figure 105 : Fidélité intermédiaire pour le facteur jour des 539 molécules de la méthode sur 10 échantillons**

### III.3.3. Linéarité et limites de détection (LOD)

La linéarité a été évaluée dans l'eau ultra-pure sur 9 points de concentrations répartis entre 0,1 ng/L et 1000 ng/L (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 ; 500 ; 1000 ng/L). Elle a été répétée deux fois afin de déterminer un coefficient de corrélation ($R^2$) et une limite de détection pour chacune des molécules. La LOD d'une molécule a été fixée à la concentration la plus basse pour laquelle celle-ci est détectée dans les 2 linéarités. Deux exemples de linéarité sont présentées en Figure 106 pour les molécules atrazine et tétracycline. Les axes du graphique ont été transformés selon l'échelle logarithmique pour permettre de voir l'ensemble des points de gamme en raison de l'étendue de l'échelle des concentrations (4 logarithmes). Pour l'atrazine, le $R^2$ de 0,995 indique une bonne corrélation et une limite de détection de 0,1 ng/L a pu être déterminée (soit 100 ppq). Pour la tétracycline, on remarque visuellement

une tendance non linéaire et asymptotique, ce qui se traduit par un $R^2$ de 0,981. Ce phénomène peut être dû à une certaine saturation du système et notamment de la cartouche de préconcentration en fonction d'une concentration croissante en tétracycline comme si la cartouche ne parvenait plus à adsorber la tétracycline proportionnellement à la quantité injectée. Le domaine de linéarité pour cette molécule est donc réduit et se situe plutôt entre 5 ng/L et 50 ng/L ou entre 50 ng/L et 1000 ng/L. Le coefficient de corrélation de chaque molécule a été ajouté au Tableau 22 (annexe 6).

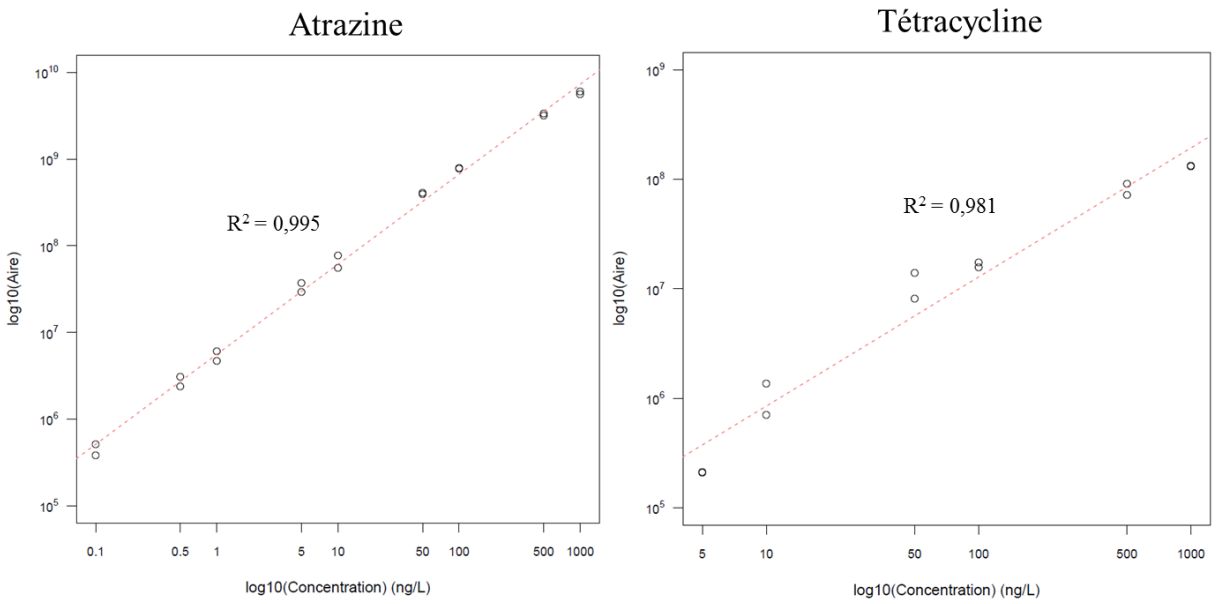



**Figure 106 : Exemple de linéarité sur 2 molécules : l'atrazine et la tétracycline**

L'échelle des axes est en logarithme pour les aires et les concentrations. Chaque cercle correspond à une aire mesurée (2 points par concentration). La ligne pointillée rouge représente la régression linéaire.

La Figure 107 présente les limites de détection (LOD). Sur les 539 molécules détectables avec la méthode développée, 531 ont une LOD inférieure ou égale à la concentration de 100 ng/L (LMR pour l'eau potable en France). Comparativement aux méthodes analytiques présentées dans l'étude bibliographique, la sensibilité atteinte par notre technique analytique développée par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution est meilleure que celles obtenues sur TOF et équivalente aux méthodes développées sur TQ [245,278,353].

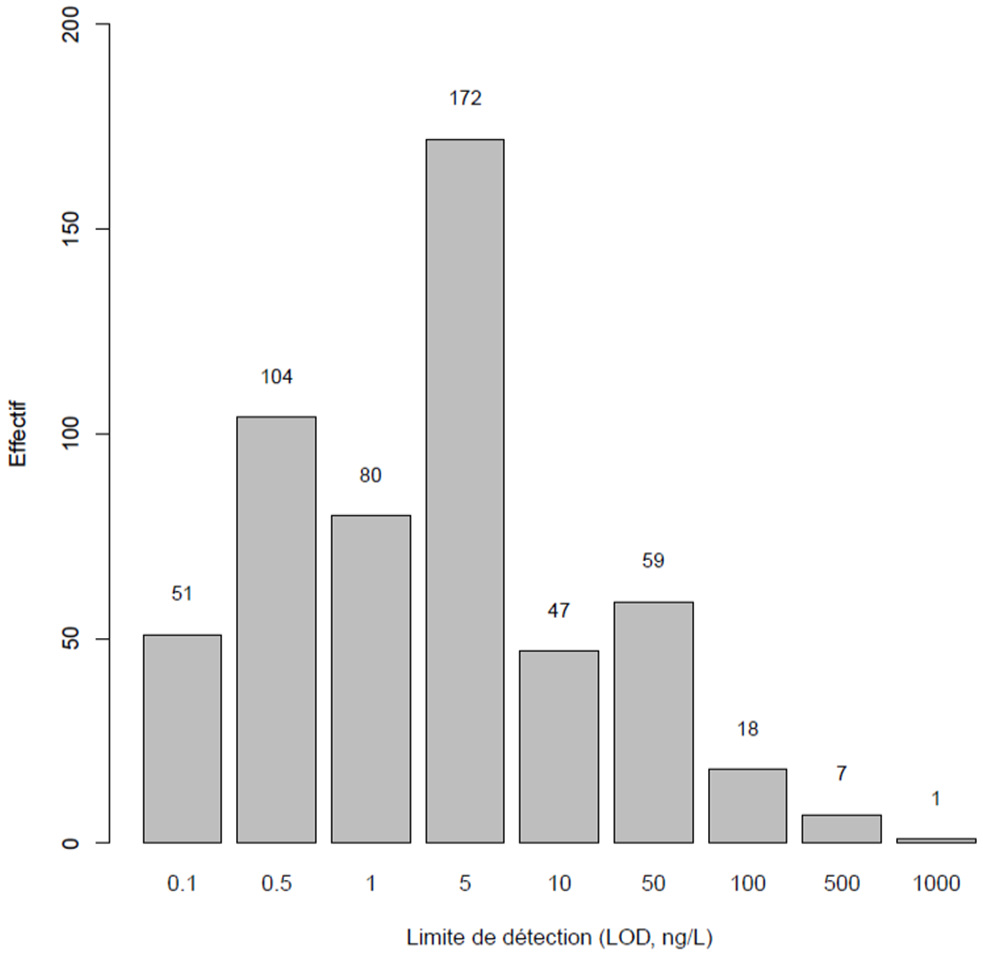



**Figure 107 : Distribution des limites de détection pour les 539 molécules de la méthode**

### III.3.4. Etude du facteur de concentration de l'étape SPE

Le facteur de préconcentration de la cartouche Oasis HLB a été évalué. Ce paramètre est molécule-dépendant car il est fonction de l'affinité de la molécule avec la phase stationnaire de la cartouche. Pour calculer le facteur de concentration, nous nous sommes servis des expériences sur la colonne LC HSS T3 seule et sur le système couplant la colonne LC et la cartouche de préconcentration Oasis HLB. Pour rappel, les mélanges de 80 molécules ont été injectés à une concentration de 100 ng/mL sur la LC seule et à une concentration de 100 ng/L (soit 1000 fois moins) sur le système SPE + LC. Pour les 539 molécules détectées, les aires sous les pics chromatographiques ont été relevées dans les deux expériences. En faisant l'hypothèse que l'aire est proportionnelle à la quantité injectée, ce qui a été vérifiée lors de l'étape précédente, le facteur de concentration se calcule de la manière suivante : Équation 4.

$$\textbf{\textit{Facteur de concentration}}\ (\textbf{\textit{SPE}}) = \frac{\textbf{\textit{Aire}}\ (\textbf{\textit{SPE}} + \textbf{\textit{LC}}) \times \mathbf{1000}}{\textbf{\textit{Aire}}\ (\textbf{\textit{LC seule}})}$$

**Équation 4 : Calcul du facteur de concentration de la cartouche SPE**

Les résultats obtenus pour les 539 molécules sont présentés en Figure 108 sous la forme d'une distribution des facteurs de concentration. On constate que la plupart des molécules sont concentrées entre 300 et 500 fois par la cartouche Oasis HLB, ce qui est tout à fait satisfaisant compte tenu du faible volume de départ (5 mL).

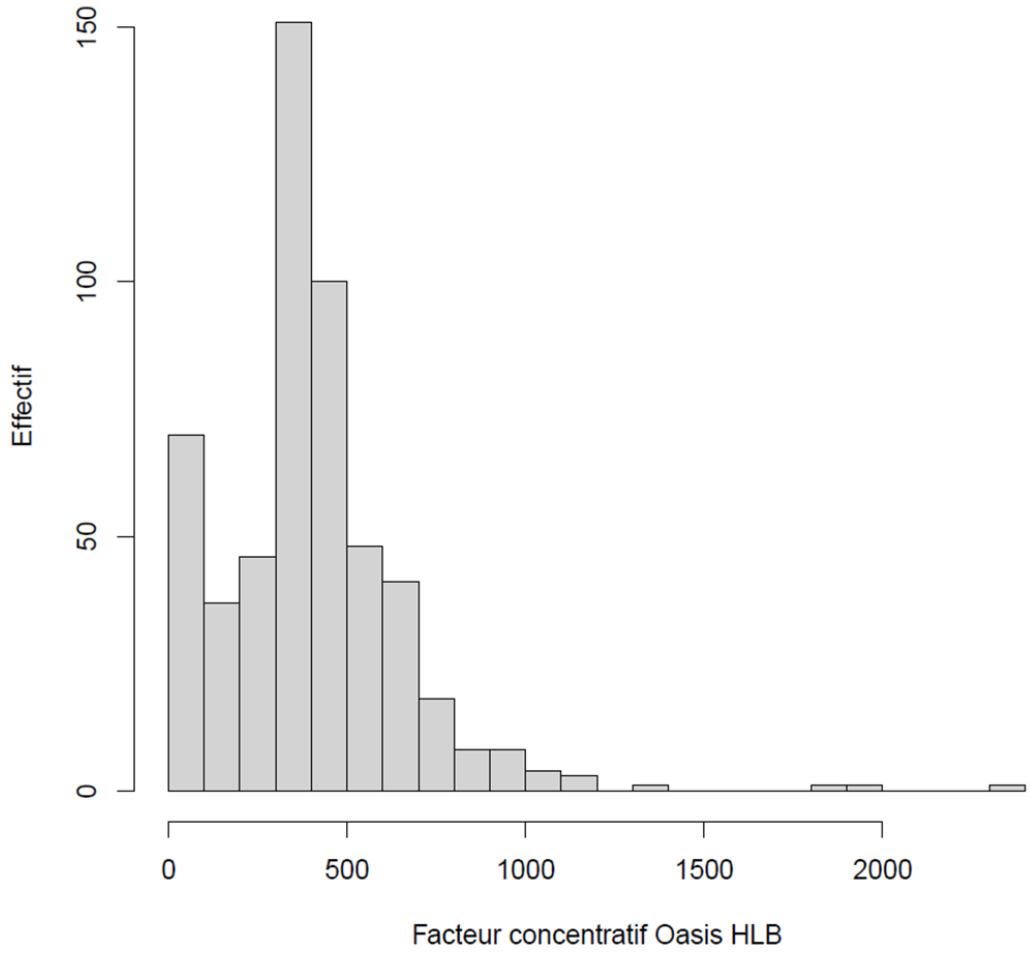



**Figure 108 : Distribution du facteur de concentration de l'étape de SPE sur Oasis HLB des 539 molécules détectées par la méthode développée**

### III.3.5. Effet matrice sur 3 concentrations

D'une façon générale, on entend par « effet matrice », l'influence du milieu analysé sur l'élément dosé. En spectrométrie de masse, cet effet peut avoir une influence sur l'intensité des analytes détectés et peut même, dans un cas extrême, éteindre complètement le signal. Pour rendre compte de l'effet matrice sur les molécules dans notre analyse, nous avons réalisé

3 expériences sur 10 eaux du robinet dans lesquelles les 539 molécules ont été ajoutées à 3 concentrations différentes (1, 10 et 100ng /L). Ces eaux du robinet ont été collectées en région parisienne dans le cadre d'une application présentée dans le paragraphe suivant. Pour ajouter un point de comparaison, trois échantillons d'eau ultra-pure ont été ajoutés dans chaque expérience et supplémentés à la même concentration. A l'aide des données générées, deux interprétations ont été réalisées. En premier lieu, l'aire pour chaque couple molécule/matrice a été comparée avec la moyenne des aires des échantillons supplémentés dans l'eau ultra-pure. Le résultat ainsi obtenu pour chaque couple molécule/matrice est un pourcentage qui indique l'effet matrice par rapport à une matrice de référence (dans notre cas l'eau ultra-pure de laboratoire). Les résultats sont présentés sur la Figure 109.

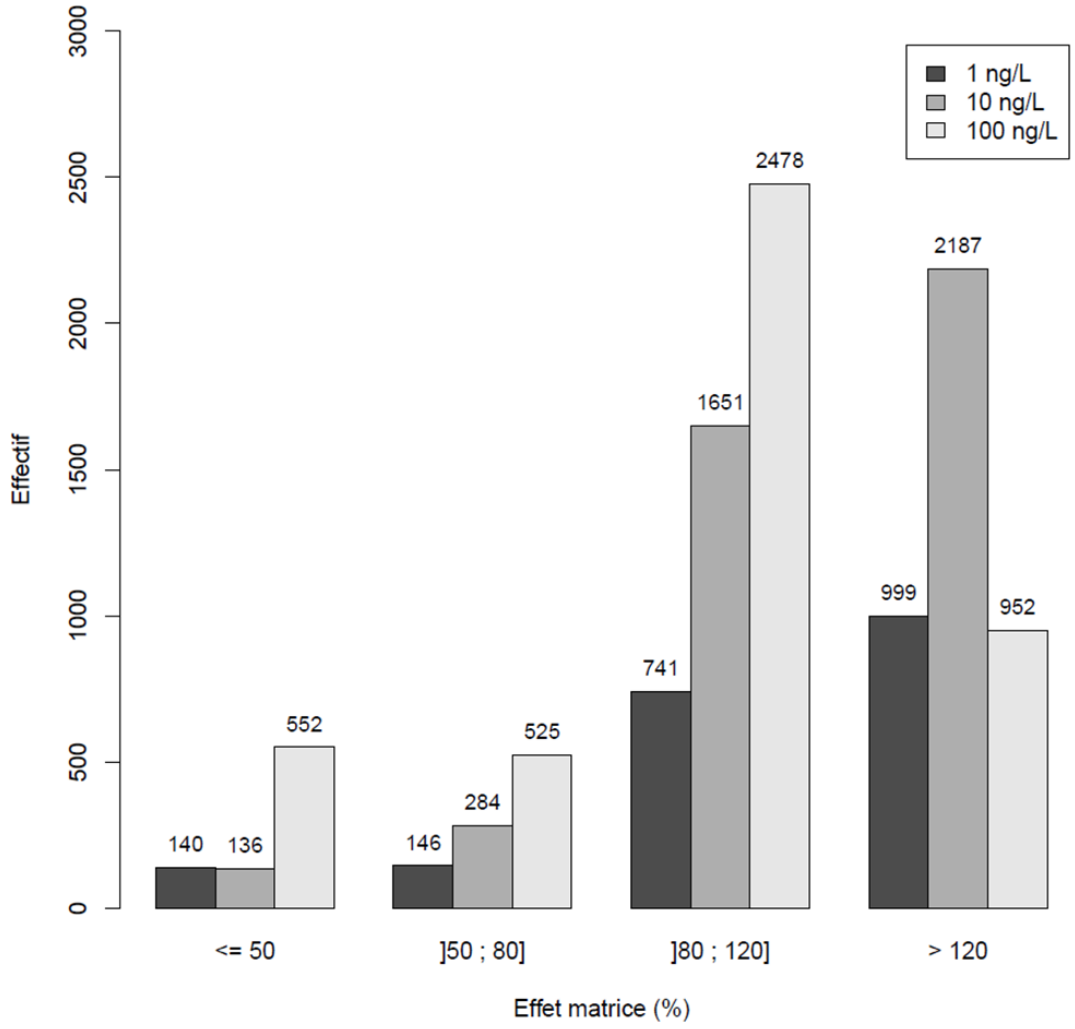



**Figure 109 : Effet matrice pour l'ensemble des couples molécule/matrice en fonction de la concentration**

Dans ce travail, nous avons considéré que l'effet matrice était faible lorsqu'il était compris entre 80 % et 120 %, tolérable entre 50 % et 80 % et important lorsqu'il était inférieur à 50 %

ou supérieur à 120 %. Sur la Figure 109, pour la concentration 100 ng/L, 65 % des tests effectués présentent un effet matrice faible ou tolérable. En revanche, pour les concentrations 1 ng/L et 10 ng/L, 50 % des tests présentent un effet matrice supérieurs à 120 %, ce qui montre que l'effet matrice est d'autant plus important que la concentration des molécules est faible.

Nous avons aussi comparé les différences d'aires obtenues pour une même molécule sur les 10 eaux du robinet préalablement testées et pour chaque concentration. Ces différences ont été exprimées à l'aide d'un coefficient de variation calculé sur les 10 aires de chaque matrice pour chaque molécule. Les résultats sont présentés en Figure 110.

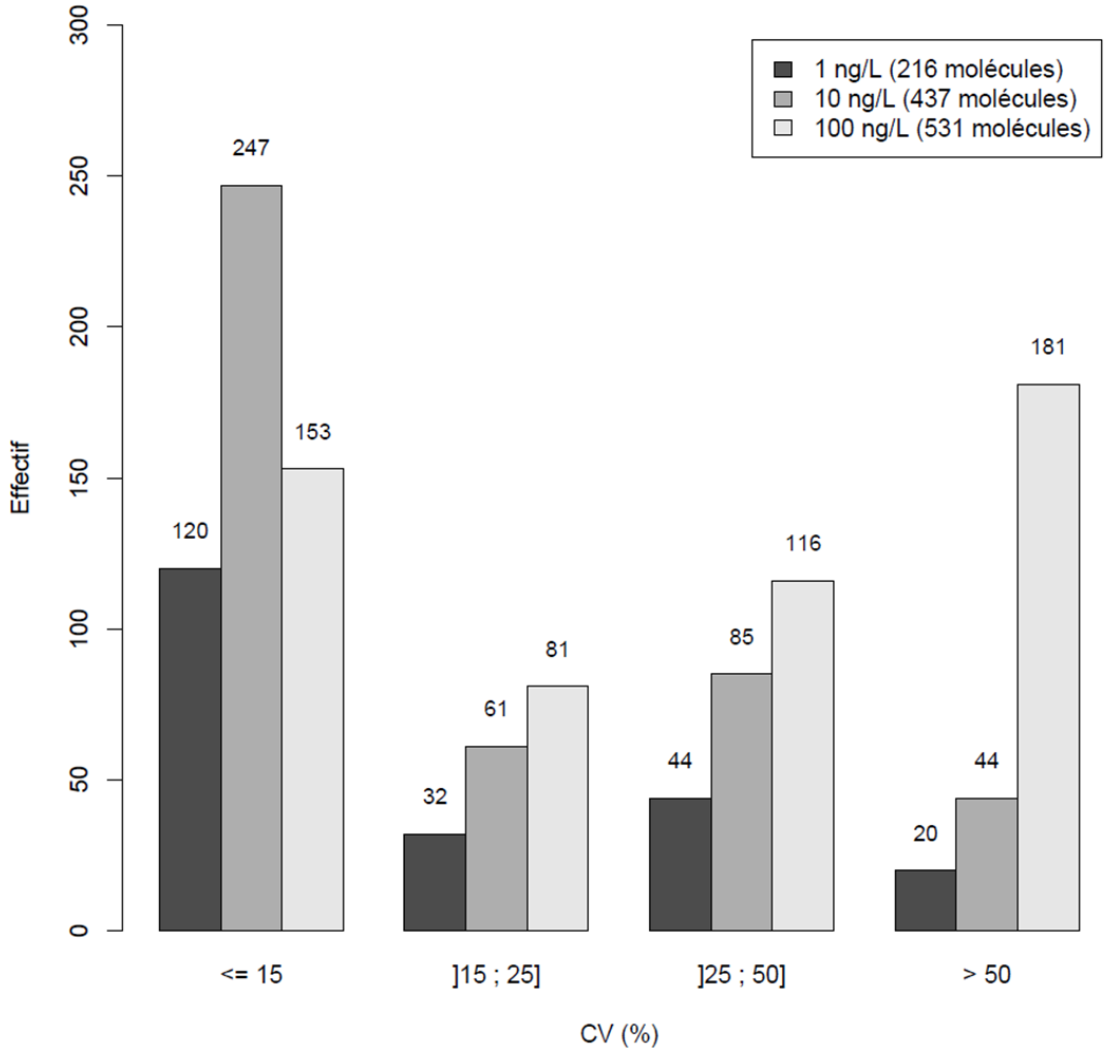



**Figure 110 : Effet matrice sur les aires obtenues sur chaque molécule pour les 10 eaux du robinet sélectionnées**

L'effectif pour chaque concentration est indiqué dans la légende. Il n'est pas le même pour toutes les concentrations en raison de la limite de détection de chaque molécule.

Contrairement aux conclusions réalisées lors du test précédent, on remarque, pour les concentrations 1 ng/L et 10 ng/L, une faible variabilité des aires entre les différentes matrices, ce qui se traduit par un grand nombre de molécules pour lesquelles le CV est inférieur à 15 %. Pour ces deux concentrations, les aires obtenues sont peu dispersées (CV < 15 %) mais très supérieures à l'aire obtenue en eau ultra-pure (rapport d'aire > 120 %). Le constat inverse peut être réalisé pour la concentration de 100 ng/L.

La variabilité inter-individuelle sur les 10 échantillons d'eau du robinet choisis est donc très importante alors qu'ils ont été collectés dans la seule région parisienne sur une échelle géographique très petite avec peu de variabilité prise en compte. Il sera donc nécessaire dans la définition de nos plans d'expérience d'utiliser un contrôle supplémenté de chaque échantillon afin (i) de s'assurer de la détection des molécules analysées indépendamment de la matrice (extinction du signal) et (ii) de réaliser une semi-quantification de chaque échantillon par rapport à son contrôle supplémenté afin de déterminer le dépassement ou non de la limite maximale de résidus.

### III.3.6. Effet mémoire et plan d'expérience

L'effet mémoire (ou *carry-over* en anglais) est une pollution du système analytique par une ou plusieurs molécule(s) provenant généralement d'un échantillon précédent. Ces traces de molécules peuvent polluer un ou plusieurs échantillon(s) injecté(s) à la suite et engendrer des faux positifs. Lors des expériences réalisées avec l'outil MethodComparator, de nombreux cas d'effet mémoire avaient été révélés dans les blancs analytiques suivant les injections de mélange de 763 molécules. Pour remédier à ce problème, des tests de lavage de la seringue d'injection de 5 mL et de la boucle d'injection ont été réalisés associant des cycles de rinçage avec des solvants aqueux et organiques. Pour trouver la meilleure configuration, un échantillon contenant les 539 molécules à la concentration de 100 ng/L a été injecté suivi de 10 blancs analytiques. Les résultats ont ensuite été interprétés pour savoir combien de molécules étaient présentes et jusqu'à quel blanc analytique celles-ci étaient retrouvées. Dans la méthode de rinçage optimisée, une vingtaine de molécules présentaient de l'effet mémoire dans le premier blanc suivant l'injection de l'échantillon avec une intensité 100 à 1000 fois plus faible que dans ce dernier, ce qui a été considéré comme négligeable.

Un plan d'expérience a été fait afin de prendre en compte l'ensemble des problèmes soulevés par cette validation. Pour les problèmes liés à l'effet matrice, chaque échantillon est analysé avec et sans supplémentation des 539 molécules analysables par la méthode. L'ensemble des échantillons tests sont injectés dans une première partie de séquence dans un

ordre aléatoire, puis tous les échantillons supplémentés sont injectés dans une seconde partie de séquence dans un ordre aléatoire différent du premier. Un QC est également injecté tous les 5 échantillons (avec ou sans supplémentation) afin de pouvoir modéliser et corriger la diminution du signal au cours du temps lié notamment à l'encrassement de la source. Il est composé d'un mélange équivolumique de tous les échantillons afin d'être chimiquement le plus proche possible des échantillons analysés. Pour contrôler et mesurer l'effet mémoire, chaque échantillon et chaque QC analysé est suivi d'un ou de deux blanc(s) analytique respectivement (Figure 111).

| Nature de l'injection | Nombre d'injection |
|---|---|
| Blancs de conditionnement | 6 |
| QC analytique 539 molécules | 1 |
| 2 blancs analytiques | 2 |
| … | |
| 5 échantillons | 5 |
| 5 blancs analytiques | 5 |
| … | |
| QC analytique 539 molécules | 1 |
| 2 blancs analytiques | 2 |
| … | |
| 5 échantillons supplémentés de 539 molécules | 5 |
| 5 blancs analytiques | 5 |
| … | |
| 1 Blanc rinçage | 1 |
| **TOTAL** | **140** |

Répété 5 fois

**Figure 111 : Plan d'expérience pour l'analyse des échantillons d'eau**

A l'aide de ce plan d'expérience, il est possible de (i) vérifier la contamination analytique éventuelle avant chaque nouvel échantillon injecté, (ii) de s'assurer de la détection de toutes les molécules dans chacun des échantillons et (iii) de permettre une semi-quantification par rapport à un seuil de concentration grâce à l'échantillon supplémenté. Au total, ce plan d'expérience permet l'analyse de 25 échantillons pour 140 injections soit 3,5 jours d'analyse. Sur une année, 2600 échantillons peuvent être analysés par spectrométrie de masse avec une méthode garantissant une grande fiabilité des résultats. Toutefois, on peut se poser la question de la rentabilité d'une telle analyse compte tenu des prix pratiqués aujourd'hui dans le secteur de l'analyse de l'eau. Rappelons tout de même que cette analyse réalisée hors d'un cadre réglementaire sur un spectromètre de masse à ultra-haute résolution permet l'analyse simultanée de 539 molécules avec de bonnes sensibilités.

### III.3.7. Bilan de la validation

Cette validation a permis de mettre en évidence les performances de la méthode développée. Les résultats montrent que le couplage de la chromatographie ultra-haute performance et de la spectrométrie de masse à ultra-haute résolution aboutit à une très bonne spécificité réduisant ainsi le nombre de faux positifs. Les sensibilités atteintes par le système sont comparables à celles obtenues sur TQ grâce notamment à l'utilisation d'une cartouche de préconcentration en ligne permettant de concentrer les analytes entre 300 et 1000 fois. Cette validation a aussi permis de voir les difficultés de l'analyse de l'eau aussi simple soit-elle en apparence. Un effet matrice fort a été mis en évidence sur des eaux du robinet conduisant à la création d'un plan d'expérience optimisé pour contrôler l'effet matrice à défaut de le supprimer.
Cette méthode a finalement été appliquée à une vingtaine d'échantillons d'eau du robinet de la région parisienne.

## III.4. **Application de la méthode**

### III.4.1. Méthodologie

Un état des lieux de la pollution de l'eau du robinet de la région parisienne a été réalisé à l'aide de la méthode que nous avons développée. Pour cela, 26 échantillons d'eau du robinet ont été collectés avec l'aide de collaborateurs du CEA de Saclay. La répartition géographique des prélèvements est présentée en Figure 112 et montre la bonne homogéinité des points de collecte en région parisienne. Un tube de prélèvement de 60 mL en aluminium ainsi qu'une procédure de prélèvement leur avaient été remis (comme indiqué dans le Matériel et Méthode). Les échantillons prélevés ont été préparés le lendemain de la collecte. Ils ont tout d'abord été filtrés, mis en flacon d'injection puis conservés à 4 °C dans le passeur d'échantillon réfrigéré jusqu'à l'injection.

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel TraceFinder 3.2 (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) qui permet la visualisation rapide des principaux critères d'identification dans le cadre d'une méthode de criblage qualitatif :

- Le temps de rétention de la molécule détectée dans l'échantillon doit correspondre à celui observé dans l'échantillon supplémenté +/- 0,2 minutes.
- La précision de recherche du rapport *m/z* de la molécule a été fixée à 5 ppm.
- Le massif isotopique de la molécule est vérifié en matière de présence des ions isotopes (notamment ceux du $^{34}S$, $^{37}Cl$ et $^{81}Br$) et d'intensité relative.

- Pour chaque molécule détectée, l'absence de signal dans le blanc analytique précédent a été vérifiée.
- Le spectre CID de la molécule détectée dans l'échantillon est comparé avec celui contenu dans la banque de données spectrales MS/MS.

L'ensemble de ces critères permet de s'assurer de la présence de la molécule avec un maximum de confiance.

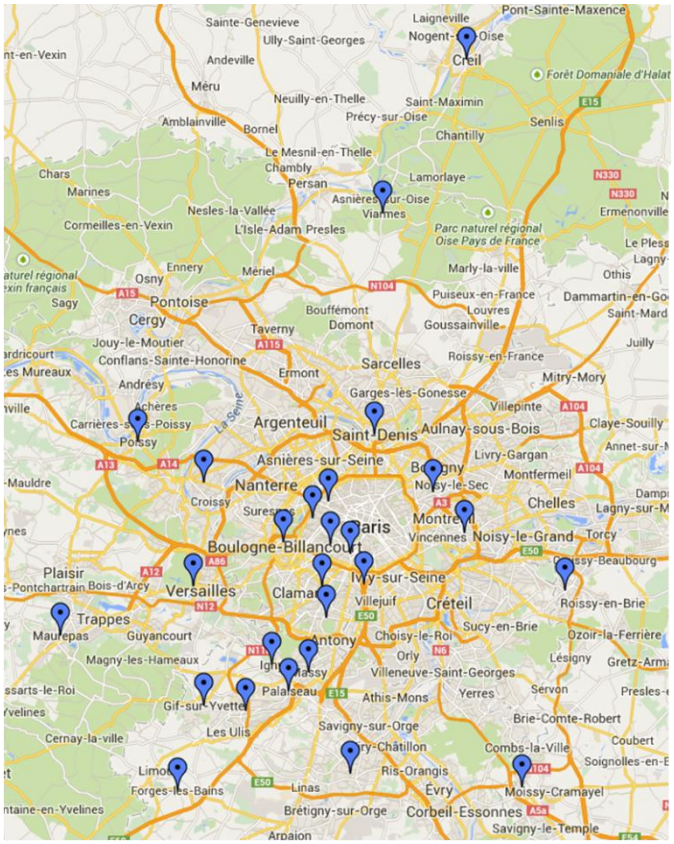



**Figure 112 : Carte de prélèvement des 26 eaux du robinet autour de Paris (GoogleMap)**

Une capture d'écran du logiciel TraceFinder 3.1 avec lequel les données ont été traitées est présentée sur la Figure 113. La fenêtre 1 indique la liste des échantillons injectés durant la séquence d'analyse. Dans la fenêtre 2, on peut voir un code couleur de « pastilles » pour chacun des critères de confirmation de la molécule dans l'échantillon sélectionné (« MZ », « RT » pour *Retention Time*, « IP » pour *Isotopic Pattern* et « LS » pour *Library Spectrum*). La fenêtre 3 permet de visualiser le chromatogramme d'ions extrait, de vérifier le temps de rétention, la forme du pic et de visualiser le bruit de fond des interférents potentiels. On remarque d'ailleurs qu'un autre pic chromatographique est proche de l'ion d'intérêt. Dans la fenêtre 4, deux propositions de spectres CID sont affichées car le rapport *m/z* présenté a été retrouvé deux fois dans la banque de données spectrales (Figure 114).

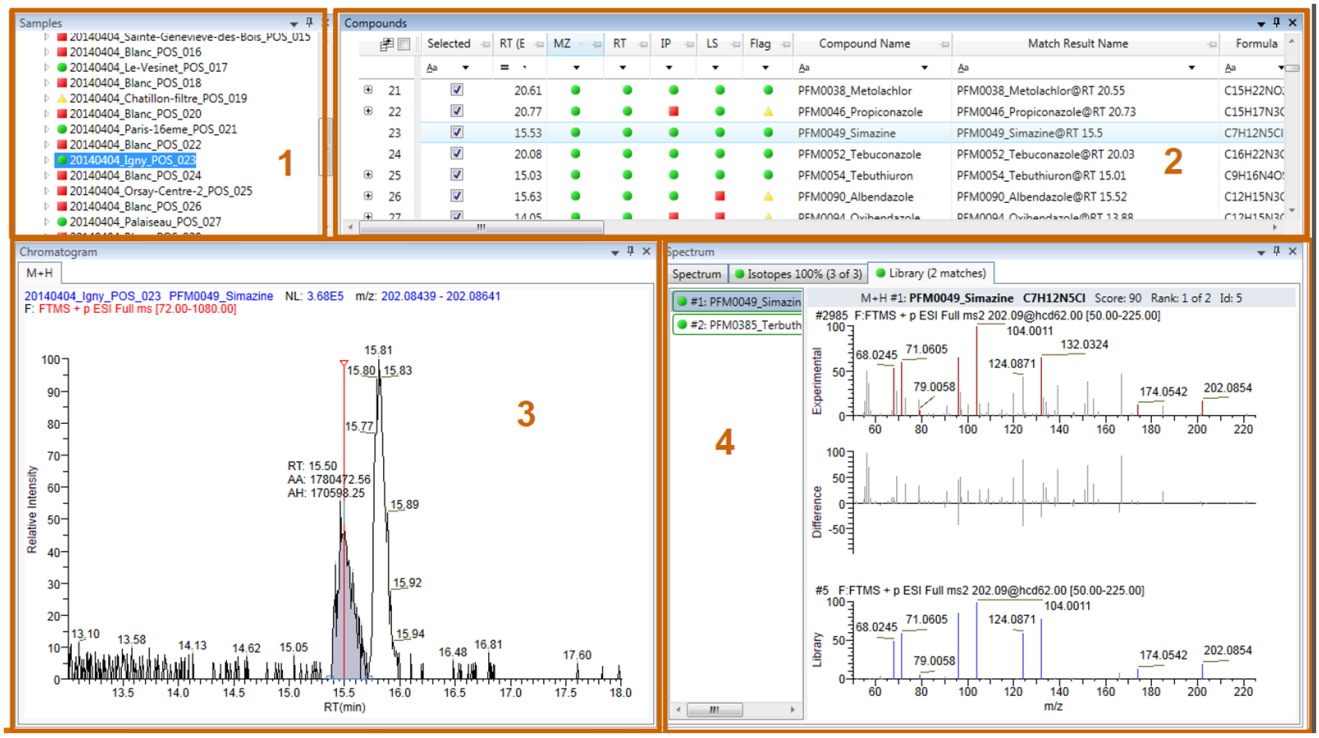



**Figure 113 : Capture d'écran du logiciel TraceFinder 3.1**

Les résultats obtenus avec le logiciel de présentent ainsi : (1) liste des échantillons analysés, (2) liste des molécules détectées, (3) chromatogramme d'ion extrait pour le rapport *m/z* de la molécule sélectionnée dans l'échantillon et (4) fenêtres de confirmation d'identification : comparaison du massif isotopique et des spectres CID.

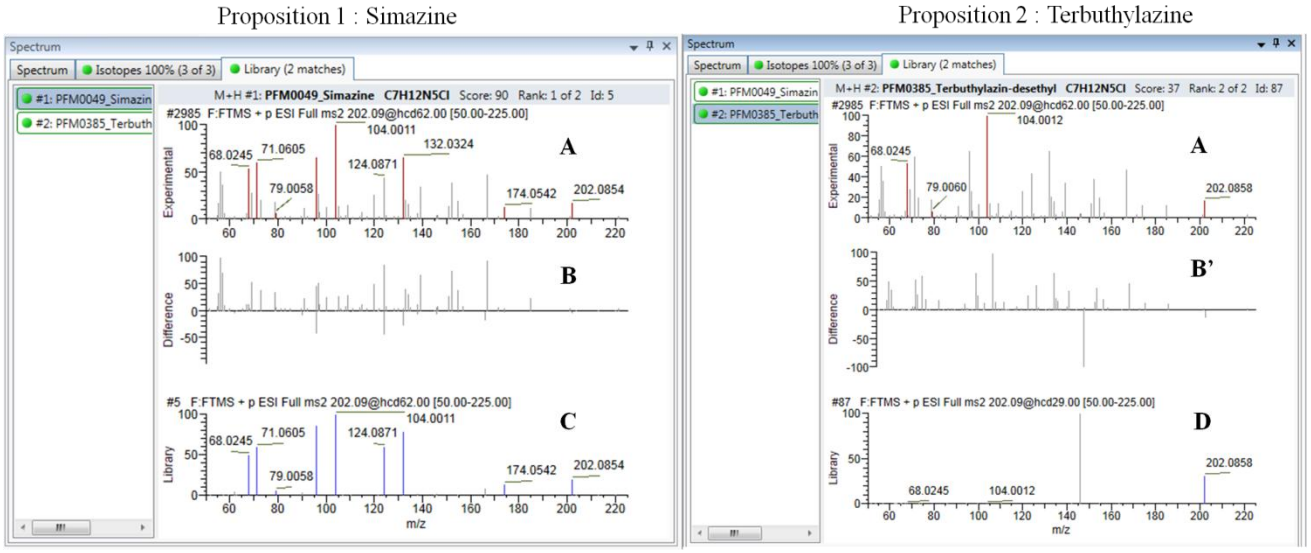



**Figure 114 : Proposition du logiciel TraceFinder pour l'identification de la molécule**

(A) Spectre CID de l'ion de rapport *m/z* 202,09 @ 62 % dans l'échantillon ; (B) et (B') Spectre de la différence entre le spectre CID expérimental et le spectre CID contenu la librairie ; (C) Spectre CID de la Simazine dans la librairie ; (D) Spectre CID de la Terbuthylazine dans la librairie.

Les deux propositions sont présentées en Figure 114. Le spectre CID de l'ion à identifier est plus proche de la proposition 1 (Simazine). La terbuthylazine a été confirmée comme étant le pic chromatographique à 15,8 minutes dans la fenêtre 3.

### III.4.2. Résultats

A l'issue de l'interprétation des données avec le logiciel TraceFinder, 37 molécules différentes ont été détectées dans les 26 échantillons d'eau du robinet de la région parisienne. Parmi ces 37 molécules, on retrouve 30 pesticides dont 5 métabolites, 6 médicaments et 1 hormone. Le Tableau 21 présente les molécules détectées dans les échantillons d'eau du robinet, la catégorie à laquelle elles appartiennent, leur statut en France (pour les pesticides) et le nombre d'échantillons dans lesquels elles ont été retrouvées.

| Nom de la molécule détectée | Statut en France | Catégorie | Métabolite | Nombre d'échantillons pollués |
|---|---|---|---|---|
| Abacavir | - | Médicament | | 2 |
| Ametryne | Interdite | Pesticide | | 1 |
| Atrazine | Interdite (2003) | Pesticide | | 26 |
| Atrazine-2-hydroxy | - | Pesticide | OUI | 26 |
| Atrazine-deisopropyl | - | Pesticide | OUI | 1 |
| Atrazine-desethyl | - | Pesticide | OUI | 26 |
| Atrazine-desethyl- | - | Pesticide | OUI | 2 |
| Boscalid | Autorisée | Pesticide | | 2 |
| Carbamazepine | - | Médicament | | 6 |
| Chlortoluron | Autorisée | Pesticide | | 4 |
| Clotrimazole | - | Médicament | | 3 |
| Cyproconazole | Autorisée | Pesticide | | 15 |
| Diuron | Interdite (2002) | Pesticide | | 2 |
| Acide Fenofibrique | - | Médicament | | 3 |
| Fluopyram | Autorisée | Pesticide | | 1 |
| Hexazinone | Interdite (2008) | Pesticide | | 26 |
| Imazamethabenz-methyl | Interdite (2006) | Pesticide | | 5 |
| Imazamox | Autorisée | Pesticide | | 3 |
| Imazapyr | Interdite | Pesticide | | 1 |
| Isoproturon | Autorisée | Pesticide | | 2 |
| Maraviroc | - | Médicament | | 3 |
| Metazachlore | Autorisée | Pesticide | | 16 |
| Metolachlore | Autorisée | Pesticide | | 17 |
| Oxadixyl | Interdite (2003) | Pesticide | | 23 |
| Progesterone | - | Hormone | | 1 |

| Nom de la molécule détectée | Statut en France | Catégorie | Métabolite | Nombre d'échantillons pollués |
|---|---|---|---|---|
| Prometon | Autorisée | Pesticide | | 2 |
| Propazine | Interdite | Pesticide | | 25 |
| Propiconazole | Autorisée | Pesticide | | 8 |
| Secbumeton | Interdite | Pesticide | | 4 |
| Simazine | Interdite (2002) | Pesticide | | 23 |
| Tebuconazole | Autorisée | Pesticide | | 10 |
| Tebutame | Interdite | Pesticide | | 5 |
| Tebuthiuron | Interdite | Pesticide | | 19 |
| Terbuthylazine-desethyl | - | Pesticide | OUI | 21 |
| Terbuthylazine | Interdite (2003) | Pesticide | | 22 |
| Terbutryne | Interdite | Pesticide | | 1 |
| Valsartan | - | Médicament | | 14 |

**Tableau 21 : Tableau des 37 molécules détectées dans les 26 échantillons d'eau du robinet (triées par ordre alphabétique du nom des molécules)**

On retrouve une plus grande proportion de pesticides et leurs métabolites. Ce sont essentiellement des herbicides ou des fongicides utilisés pour le désherbage des cultures de plein champ tels que le maïs, le tournesol, le blé ou l'orge, ou pour le traitement des champignons de la vigne. On constate surtout que la plupart des pesticides détectés sont interdits d'utilisation en France, dont certains depuis plus de 10 ans. Ce résultat montre le problème de la rémanence de ces molécules et de leurs métabolites dans l'environnement. Ces métabolites sont, aujourd'hui, très peu pris en compte dans les analyses bien qu'ils soient très certainement en plus grand nombre que les molécules mères et que la toxicité reste mal connue. Il sera donc important dans l'avenir de trouver le moyen de les identifier afin de les inclure dans les listes réglementaires au même titre que les molécules mères. C'est le cas des métabolites de l'atrazine déjà bien décrits et inclus dans les listes réglementaires.

On remarque aussi la présence dans les eaux du robinet de médicaments, qui sont, eux aussi, peu surveillés. Il n'existe pas de norme pour ces molécules et la méthode que nous avons développée est l'une des seules qui permettent la détection simultanée de plus de 280 médicaments. Parmi les médicaments détectés, 2 anti-VIH (Abacavir et Maraviroc), 1 anti-hypertenseur (Valsartan), 1 antiépileptique (Carbamazepine), 1 antifongique (Clotrimazole) et 1 hypolipémiant (Acide Fenofibrique) ont été identifiés. Les concentrations de toutes les molécules détectées, pesticides ou médicaments, ont été évaluées entre 0,5 et 10 ng/L par comparaison avec la l'aire des pics chromatographiques des échantillons supplémentés, soit très en deçà des limites maximales de résidus dans l'eau potable fixées à

100 ng/L pour la plupart des molécules. Néanmoins, la présence de ces substances, même en faible quantité dans l'eau, pose la question d'un effet cocktail potentiel non seulement entre elles, mais aussi avec toutes celles consommées à partir de la nourriture ou respirées dans l'air. Cette application n'a toutefois pas pour objectif de tirer des conclusions quant à la toxicité des molécules détectées car il s'agit d'un autre savoir-faire mais plutôt d'alerter sur la présence de ces substances dans l'eau que nous buvons.

La Figure 115 présente la distribution des 37 molécules détectées en fonction des villes d'où proviennent les échantillons. On constate une grande variabilité de la pollution de l'eau du robinet. Elle peut être en partie liée à l'effet matrice donc aux nombres de molécules détectables par la méthode.

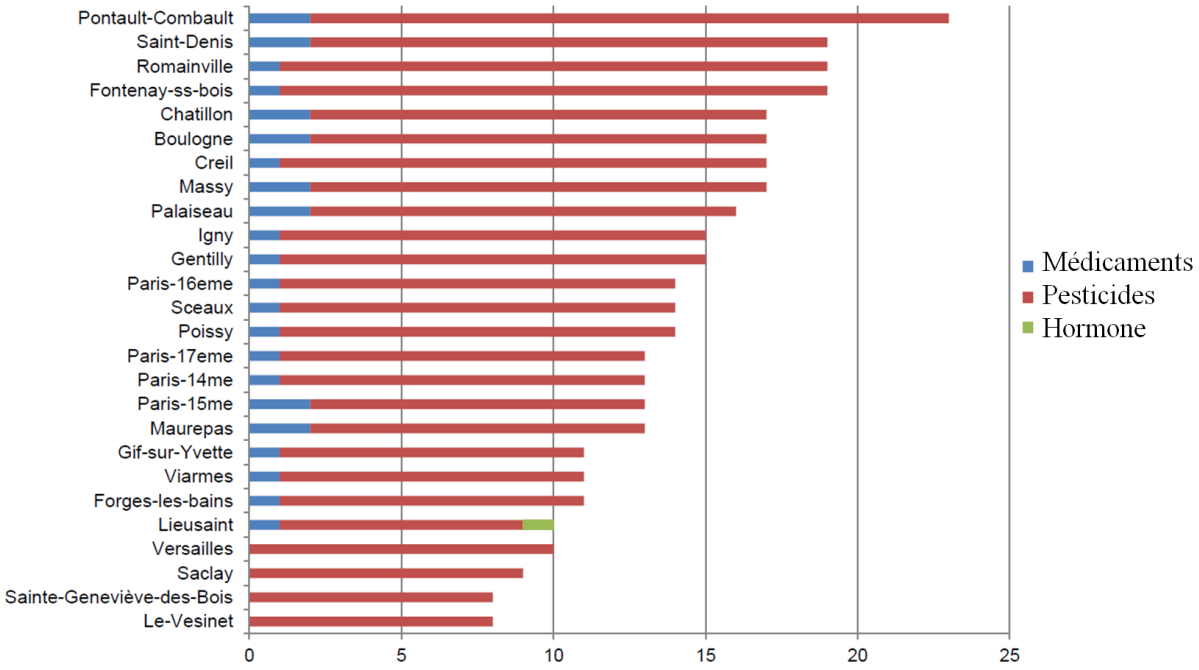



**Figure 115 : Nombre de molécules détectées en fonction des villes collectées**

Ces résultats préliminaires sont une première application de la méthode développée. On constate qu'il existe une pollution de l'eau du robinet par de nombreuses molécules bien que les concentrations retrouvées soient très faibles. Ces observations devront être confirmées par l'analyse d'un deuxième prélèvement.

## III.5. **Conclusion**

L'objectif de ce travail était de développer d'une méthode de criblage multi-résidus de pesticides et de médicaments dans l'eau. Il fait partie intégrante du projet AgriFood GPS qui vise à créer de nouveaux outils analytiques pour améliorer la sécurité alimentaire et générer des alertes précoces de contamination. Dans cette optique, une chimiothèque de 817 composés a été réalisée puis une banque de données de spectres MS et MS/MS a été créée. Ensuite, 4 colonnes analytiques et une cartouche de préconcentration ont été testées avec l'aide de l'outil MethodComparator qui a permis de sélectionner le système analytique le plus performant sans rechercher manuellement l'ensemble des molécules dans les données brutes. La méthode ainsi mise au point permet la détection simultanée de 539 xénobiotiques en 36 minutes à partir de 5 millilitres d'eau. Le système de préconcentration en ligne permet non seulement de gagner du temps de préparation, et de concentrer l'échantillon mais il permet aussi de limiter les coûts logistiques importants de transport et de stockage avec l'utilisation d'un flacon de prélèvement de 60 mL contre 1 ou 2 litres pour une procédure hors ligne. Cette méthode a ensuite été validée afin de proposer un produit commercial permettant un criblage fiable et semi-quantitatif. Plusieurs critères d'identification des molécules ont été pris en compte afin de minimiser les erreurs d'interprétation et les faux positifs. Toutefois, l'injection d'un blanc analytique entre chaque échantillon et d'un contrôle supplémenté de chaque matrice diminue la rentabilité. Une connaissance plus fine du comportement du système analytique et des molécules analysées permettrait d'éliminer certains contrôles et d'améliorer le débit d'analyse.

Les améliorations de la méthode créée pourraient concerner la préparation d'échantillons avec notamment l'utilisation d'un banc de filtration permettant de pour gagner en efficacité et en rapidité. La filtration des échantillons est un point crucial de la préparation car elle permet d'éliminer les particules en suspension qui pourraient boucher le système. Néanmoins, les filtres utilisés peuvent également retenir une partie des substances d'intérêt et ainsi nuire à l'exhaustivité de l'analyse. Il est donc primordial d'évaluer ce consommable avant de l'utiliser en routine.

Afin d'améliorer le nombre de molécules analysables, des acquisitions en modes d'ionisation positive et négative alternés pourraient être envisagées. Parmi les 4 colonnes analytiques testées, nous avons également recherché celles qui permettaient la détection du plus grand nombre de molécules. Les résultats ont montré une bonne complémentarité des colonnes HSS T3 et HSS PFP puisqu'elles permettent à elles deux de détecter 720 molécules parmi les 763 ionisables en mode d'ionisation positive. On peut aussi penser à des colonnes HILIC pour

la rétention des molécules polaires, bien qu'elles ne soient pas toujours très reproductibles et difficiles à utiliser en routine.

L'un des points bloquants dans l'amélioration de cette méthode est aussi l'existence d'une seule cartouche de préconcentration disponible sur le marché. En attendant que les constructeurs proposent d'autres produits, la solution consisterait à diminuer la pression de travail grâce à l'utilisation de colonnes de silice hybrides à noyau dur, dont l'utilisation permet de limiter la perte de charge sans perdre en résolution chromatographique. Il serait alors possible d'utiliser une gamme beaucoup plus vaste de polymère ou de silices pour le piégeage des molécules en préconcentration.

Enfin, pour limiter le nombre d'injection, un spectre de fragmentation dépendant des données (DDS de l'anglais *Data Dependant Scan*) pourrait être utilisé. Il s'agit d'un spectre CID déclenché automatiquement par le spectromètre de masse si un ion d'intérêt est présent. Ainsi, seules les molécules détectées sont fragmentées, ce qui limite le nombre d'évènements et permet de ne pas réinjecter l'échantillon pour confirmer l'identification des polluants.

Cette méthode est aujourd'hui commercialisée par la société Profilomic. C'est l'aboutissement d'un long travail de recherche qui matérialise le succès du projet AgriFood GPS. A titre personnel, cette méthode à forte valeur ajoutée pour la société concrétise l'apport du travail de thèse dans le cadre d'un contrat CIFRE. Une publication à ce sujet est en cours de rédaction.

# CHAPITRE IV. *CONCLUSION ET PERSPECTIVES*

La pollution de notre environnement par les biocides, les médicaments et les produits industriels et domestiques est un problème majeur de santé publique. Elle provient essentiellement de l'activité humaine : industries, agriculture intensive, traitements médicamenteux des hommes et des animaux, gestion des déchets, etc. Malgré les différentes campagnes de sensibilisation et d'incitation à une utilisation limitée de ces produits, les quantités de pesticides et de médicaments utilisées restent très élevées, ce qui contribue à une pollution durable des écosystèmes. Les conséquences pour l'environnement et pour l'Homme sont avérées, bien qu'encore mal connues. Des réglementations européennes et nationales ont donc été mises en place pour limiter les quantités de résidus de xénobiotiques dans des matrices agro-alimentaires et environnementales. De par sa grande polyvalence et sa sensibilité, la spectrométrie de masse s'est fait une place de choix parmi les méthodes d'analyse chimique pour l'analyse de ces polluants. Aujourd'hui, la technologie la plus utilisée est la spectrométrie de masse en tandem sur des appareils de type triple quadripôles qui fonctionnant en mode MRM. Ce type de spectromètre de masse peut être couplé avec les chromatographies en phases liquide et gazeuse, ce qui permet l'analyse d'un grand nombre de polluants présentant des diversités chimiques importantes. De plus, cette technologie qui offre une certaine facilité d'utilisation est considérée comme la référence en matière de spécificité et de sensibilité. Cependant, cette technique est restreinte à une liste préétablie de substances recherchées, ce qui limite le nombre de polluants détectés et ne permet pas la découverte de molécules sans *a priori*. Des molécules non suspectées ou inconnues pourraient ainsi polluer un échantillon sans être détectées. Par ailleurs, il est maintenant avéré que de nombreux métabolites sont générés au cours de processus abiotiques ou biologiques par les stations d'épuration, l'environnement et même l'Homme. La caractérisation de ces molécules, dont la toxicité est mal connue et peu étudiée, fait partie des enjeux actuels. L'acquisition d'une empreinte globale par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution représente une alternative intéressante à ce problème d'exhaustivité. Cette démarche n'est pas sans rappeler l'analyse métabolomique qui se base sur des méthodes d'analyse et des outils de fouille de données.

Dans ce contexte, la première partie de mes travaux de thèse a eu pour objectif de réaliser deux études de preuve de concept de l'application de l'analyse métabolomique par LC-ESI-HRMS à l'étude d'échantillons de miel et d'eaux issues de puits de captage. Dans un premier temps, un protocole analytique basé sur l'analyse métabolomique a été développé et validé dans le cadre d'une étude pour l'Institut National de la Consommation sur la qualité du miel en matière de xénobiotiques. L'analyse ciblée de 83 molécules pré-sélectionnées a montré que 74 miels, sur les 76 que contenait l'étude, étaient pollués par au moins une

molécule. Les concentrations détectées étaient en deçà des limites maximales de résidus autorisées mais la présence de ces nombreux pesticides et antibiotiques interroge, notamment en matière d'antibiorésistance à long terme.

Nous nous sommes également servis des mêmes empreintes spectrales pour réaliser différents types de fouilles de données. Nous avons tout d'abord développé une procédure efficace d'annotation des molécules chlorées, considérant qu'elles étaient probablement des xénobiotiques. Outre les substances chlorées préalablement détectées dans l'analyse ciblée, 12 molécules chlorées ont été mises en évidence dont l'une a été formellement identifiée comme étant le 2,6-dichlorobenzamide. Il s'agit d'un métabolite du dichlobénil, un pesticide interdit en France depuis 2010 et non inclus dans la liste initiale, ce qui confirme l'intérêt d'une telle approche pour la recherche de molécules inconnues ou non suspectées. Toutefois, cette approche ne prend en compte que les xénobiotiques chlorés. L'un des problèmes principaux reste la différenciation des xénobiotiques ou xénométabolites du reste des molécules endogènes ou naturelles.

Des analyses statistiques ont ensuite montré une séparation des échantillons de miel selon leur origine botanique. Parmi les variables discriminantes, 8 ont été identifiées et corrélées avec une origine florale. Finalement, un modèle prédictif a été créé et validé, permettant de déterminer l'origine d'un miel monofloral avec seulement 10 % d'erreur. Cette approche pourrait être intéressante en complément de la technique de référence actuelle de différenciation (analyse mélissopalynologique) car elle est moins dépendante de l'expérimentateur, et donc moins subjective. Des travaux en collaboration avec la société Eurofins sont en cours afin d'améliorer la caractérisation botanique du miel avec l'apport de la RMN. Le développement d'un produit commercial dans le cadre du projet AgriFood GPS est à l'étude. Il permettrait une analyse des xénobiotiques par spectrométrie de masse et la recherche par RMN d'adultération à l'ajout de sucre. Finalement, les deux techniques seraient utilisées en fusionnant les données pour caractériser l'origine florale avec une fiabilité améliorée.

L'approche que nous avons menée dans le cadre de cette étude sur le miel est une première du genre. Elle couple l'acquisition d'une empreinte globale par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution avec les outils traditionnellement utilisés en métabolomique pour la réalisation de plusieurs fouilles de données successives conduisant à une caractérisation plus fine et plus complète de la matrice étudiée.

Nous avons ensuite appliqué cette approche dans le cadre d'une étude en collaboration avec la société SAUR. L'objectif était la caractérisation physico-chimique de 15 puits de captage d'eau destinée à la consommation en France. L'approche métabolomique développée

dans le cadre de la première analyse a été adaptée, notamment en matière de préparation d'échantillon. L'empreinte chimique acquise a permis la réalisation d'un criblage ciblé de 337 polluants connus. Une estimation du niveau de contamination de ces 15 puits de captage par les micropolluants a été effectuée et comparée avec des analyses conventionnelles réalisées dans des laboratoires de référence. Bien que les résultats en matière de quantification soient légèrement différents entre les deux types d'analyses, l'analyse métabolomique permet la détection des molécules polluantes en plus grand nombre et vraisemblablement à de plus faibles concentrations que les analyses conventionnelles. Dans un second temps, le lien entre risque de pollution et caractéristiques des territoires et des aquifères a été étudié afin de mettre en évidence certains paramètres liés à un risque de pollution accru. Parmi ceux-ci, on peut citer une forte densité de population, une géologie de type alluviale, et une présence de cours d'eau important. Un plus large échantillonnage permettrait de confirmer ces premiers résultats en donnant plus de poids statistique aux analyses. Si tel était le cas, ce type d'approche pourrait être généralisé à l'ensemble des puits de captage afin de concentrer les efforts de dépollution et de suivi aux sites de captage les plus pollués. Les analyses statistiques multivariées de type ACP ont également montré que les empreintes chimiques d'échantillons d'eau pouvaient être classées selon leur origine géographique, confirmant ainsi une variabilité chimique inter-individuelle importante.

Au cours de ces expériences de preuve de concept, l'analyse métabolomique par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution couplée à des outils de fouille de données a montré l'étendue de ses possibilités au-delà de la « simple » détection ciblée. Forte de ces expériences, la société Profilomic a mis à profit les compétences acquises au service d'un projet de grande envergure sur la sécurité alimentaire nommé AgriFood GPS. Ce projet s'intéresse au développement de nouvelles approches analytiques pour mieux appréhender les risques alimentaires en détectant les contaminants émergeants ou les fraudes dans les produits alimentaires. Il est composé de deux axes de recherche principaux : l'un concerne le développement d'une méthode de criblage à large spectre pour la détection de xénobiotiques dans une empreinte globale tandis que l'autre concerne l'utilisation de l'empreinte acquise pour la détection sans *a priori* de polluants.

L'objectif du premier axe de recherche était le développement d'une méthode de criblage multi-résidus de pesticides et de médicaments dans l'eau d'environ 2000 molécules. Nous avons débuté par une sélection de 817 composés afin de développer la méthode sur un nombre raisonnable de composés et de réduire les coûts à l'achat. Ces molécules ont été sélectionnées en fonction de leur intérêt pour la thématique mais aussi afin de couvrir la plus large variété chimique possible. Une méthode de SPE en ligne couplée à la LC-ESI-HRMS a

ensuite été développée en testant de nombreuses colonnes et conditions de pH. Ces optimisations ont permis le développement d'une méthode permettant la détection de 539 molécules en 36 minutes avec 5 millilitres d'eau. Une validation a ensuite été réalisée, ce qui a permis de rendre compte des performances et limitations de la méthode. Bien qu'il s'agisse d'une empreinte globale, la sensibilité, la fidélité et la spécificité sont comparables voire meilleures que celles des méthodes effectuées sur les technologies TQ. Toutefois, un effet matrice très prononcé a aussi été observé. Ceci nous a contraints à mettre en place des procédures de contrôle qualité, qui ralentissent considérablement notre débit d'analyse.

Cette étude montre tout le potentiel de l'analyse par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution pour la détection multi-résidus, qui donne aujourd'hui des résultats analogues aux technologies conventionnelles en matière de sensibilité et de fiabilité. Comme précisé plus haut, cette méthode est une première base de travail, il est donc important de continuer les développements afin de parvenir aux objectifs fixés par le projet. L'une des premières actions à entreprendre serait de dresser un rapide bilan des familles de molécules analysables par la méthode actuelle afin de compléter l'analyse par l'inclusion de composés semblables ou proches en structure. De cette manière, le nombre de molécules analysables pourrait dépasser 700 sans optimisation supplémentaire. D'autres colonnes pourraient également être utilisées afin de couvrir un éventail plus large de composés analysés et notamment les composés polaires ou ionisés.

Cette méthode a ensuite été appliquée afin de réaliser un premier état des lieux des eaux du robinet de la région parisienne. Pour ce faire, 26 eaux du robinet ont été collectées puis analysées. Au total, 37 molécules dont 6 médicaments et 31 pesticides ou métabolites de pesticides ont été détectées, toutes en deçà de la limite maximale de résidus dans l'eau potable en France, qui est de 100 ng/L. Parmi les pesticides retrouvés, plus de 50 % d'entre eux sont interdits d'utilisation en France, ce qui montre l'intérêt d'un suivi aussi exhaustif ainsi que la rémanence des substances polluantes.

Le deuxième axe de recherche du projet AgriFood GPS concerne la prise en compte du reste de l'information présent dans l'empreinte chimique acquise, et dans lequel une pollution accidentelle non suspectée ou inconnue peut être recherchée. Le principe repose sur la comparaison statistique d'empreintes chimiques dites de référence avec une ou plusieurs empreintes chimiques à tester. Pour ce faire, l'ensemble de l'information contenu dans les empreintes est détecté et aligné avec l'aide d'outils bioinformatiques tels que XCMS pour l'obtention d'une liste de pics. Ensuite, la liste de pics de l'échantillon à tester est comparée à la liste de pics des échantillons de référence sur la base de la présence/absence et/ou de

l'augmentation d'intensités de pics. Les différences ressortent ainsi comme des alertes qu'il faut caractériser.

Dans le cadre du projet, l'équipe du LIST du CEA de Saclay s'est chargé de cette tâche. Ils se sont appuyés sur les travaux de Lommen et coll., Muller et coll. et Tegenstrand et coll. [473-475]. Le LIST a choisi de considérer un pic comme une alerte si le pic est absent de la liste de référence et présent dans la liste de l'échantillon à tester **ou** si l'aire d'un pic présent dans la liste de l'échantillon à tester est 3 fois plus importante que la variabilité (moyenne + écart type) des aires des échantillons de référence. A ce stade, cette approche est très prometteuse mais de nombreux obstacles à son fonctionnement en routine restent à surmonter. Tout d'abord, l'alignement des variables entre les différents échantillons est primordial afin de ne pas créer d'alertes artéfactuelles. Ce problème exclut par exemple la possibilité de réaliser les empreintes chimiques sur deux systèmes analytiques différents en raison d'une trop grande variabilité. Pour la comparaison d'échantillons analysés sur plusieurs séries d'analyse, il est impératif de normaliser les aires des données, ce qui implique l'utilisation d'un échantillon de QC commun aux différentes séries. Enfin, la variabilité inter-individuelle au sein des échantillons de référence ne doit pas être trop importante au risque de masquer des alertes. Par ailleurs, lorsque la banque de données d'échantillons de référence contient déjà les polluants à détecter, ces derniers ne peuvent pas être considérés comme des alertes.

On le voit, les contraintes de cette approche sont nombreuses et les premiers tests réalisés sont restés infructueux car un trop grand nombre d'alerte était généré, ce qui rendait impossible leur interprétation et le traitement de l'information ainsi obtenue. Cependant, ce type d'approche pourrait particulièrement bien se prêter à des applications pour lesquelles la variabilité est moindre, comme par exemple le suivi d'une station d'épuration (avant/après le traitement), le suivi d'un cours d'eau en amont et en aval du site d'implantation d'une usine ou dans le temps.

A défaut d'utiliser les empreintes globales pour la découverte de polluants suspects ou inconnus, ces derniers pourraient être utilisés pour la caractérisation de métabolites de polluants qui sont actuellement peu étudiés. Des xénométabolites *in vitro* seraient alors générés et étudiés afin de les inclure à des banques de données pour une recherche systématique dans les échantillons analysés. Cependant, il n'existe aujourd'hui aucune méthode de référence pour la découverte de métabolites de xénobiotiques de façon automatisée et rapide. Dans le cadre d'une expérience de preuve de concept, nous avons donc cherché à (re)découvrir les métabolites de l'Atrazine, un herbicide interdit en France depuis 2003 et pourtant régulièrement détecté dans les eaux environnementales. Pour ce faire, la société BertinPharma a mis à notre disposition une collection de 200 micro-organismes

peuplant les eaux et sols afin de reproduire *in vitro* sur des souches isolées le type de transformation se produisant dans l'environnement. Le choix de l'atrazine a été fait car il s'agit d'une molécule déjà très étudiée, ses voies de dégradation sont bien connues [476,477] et ses métabolites sont disponibles commercialement. Nous avons tout d'abord recherché les souches responsables d'une dégradation quasi-totale de l'Atrazine puis nous avons vérifié la présence des métabolites connus. Nous nous sommes ensuite placés en aveugle et avons tenté de découvrir les métabolites créés sans *a priori* par une analyse métabolomique couplée à des analyses statistiques. Malheureusement, ces dernières n'ont pas permis de mettre en évidence les signaux d'intérêt parmi les signaux des molécules endogènes. Nous en avons conclu que l'Atrazine perturbait suffisamment le métabolisme des micro-organismes pour que la présence de ses métabolites soit masquée par ses effets. Cette étude a donc montré les limites de ce type d'approche car nous pouvons craindre que d'autres xénobiotiques ne causent un phénomène semblable sur les micro-organismes.

En conclusion, nous avons montré que les analyses métabolomiques par spectrométrie de masse à ultra-haute résolution représentent un outil puissant pour la sécurité alimentaire de demain. Durant ces travaux de thèse, seules quelques pistes ont été explorées mais de nombreuses applications sont possibles. Les enjeux futurs se situent tant au niveau analytique (amélioration des protocoles de traitement de l'échantillon, de la sensibilité et de la robustesse des méthodes), qu'au niveau du traitement automatisé de la grande quantité de données générée par ces approches.

# *ANNEXES*

# I. ANNEXE 1 : CLASSIFICATION DES MEDICAMENTS

Dans cette annexe, les 25 grandes classes pharmacothérapeutiques sont présentées et organisées selon les modes de classement du Dorosz [9] :

- Analgésiques, antipyrétiques, antispasmodiques et anti-inflammatoires : utilisés pour traiter la douleur, la fièvre ou les inflammations ;
- Antibiotiques et antibactériens : utilisés pour traiter les infections bactériennes ;
- Antiparasitaires : médicaments utilisés pour le traitement contre les parasites tels que les antipaludéens ou les antihelminthiques ;
- Antituberculeux et antilépreux : utilisés pour traiter la tuberculose et la lèpre ;
- Antifongiques : utilisés pour traiter des mycoses (cutanées, digestives, vaginales,…) ;
- Antiviraux : utilisés pour traiter les infections virales telles que le VIH ou les hépatites B et C ;
- Cancérologie : médicaments anticancéreux utilisés dans les protocoles de chimiothérapies ;
- Cardiologie : médicaments utilisés pour le traitement des maladies cardio-vasculaires telles que l'hypertension artérielle ou les troubles du rythme cardiaque ;
- Dermatologie : médicaments utilisés dans l'affection de la peau, du cuir chevelu et des muqueuses comme l'eczéma, l'acné ou le psoriasis ;
- Diététique et nutrition : médicaments utilisés pour les régimes et difficulté à s'alimenter ;
- Endocrinologie : médicaments utilisés pour les troubles hormonaux tels que les dysthyroïdies ;
- Gastro-entérologie et hépatologie : médicaments utilisés pour les troubles digestifs et les affections du foie et la bile telles que les diarrhées et les cirrhoses ;
- Gynécologie obstétrique et contraception : médicaments utilisés pour les troubles gynécologiques et la contraception ;
- Hématologie : médicaments utilisés pour les affections du sang telles sur la leucémie, les anémies ou les anticoagulants, … ;
- Immunologie allergologie : médicaments utilisés pour les maladies auto-immunes ou lors de transplantations (anti-rejets) et les allergies comme les antihistaminiques et les immunodépresseurs ;
- Médicaments des troubles métaboliques : médicaments utilisés dans le traitement du diabète, des dyslipidémies, des hypokaliémies,… ;

- Neurologie : médicaments utilisés dans le traitement des épilepsies, antimigraineux, antiparkinsoniens, la maladie Alzheiner,… ;
- Ophtalmologie : médicaments utilisés pour les affections de l'œil telles que les infections ou les glaucomes ;
- Oto-rhino et laryngologie : médicaments utilisés pour le traitement des otites, rhinites et plus généralement de la sphère ORL (nez, bouche, gorge, oreilles) ;
- Pneumologie : médicaments utilisés dans le traitement des affections respiratoires telles que l'asthme ou la mucoviscidose ;
- Psychiatrie et addictologie : médicaments utilisés dans le traitement des troubles de l'humeur comme les épisodes dépressifs majeurs ou les addictions telles que l'alcoolisme chronique ou le tabagisme ;
- Toxicologie : médicaments utilisés comme antidote lors d'intoxication induit par les digitaliques par exemple ;
- Rhumatologie : médicaments utilisés dans le traitement de l'arthrose et des rhumatismes inflammatoires chroniques ;
- Urologie : médicaments utilisés dans le traitement des affections urologiques telles que l'hypertrophie bénigne de la prostate ou l'énurésie ;
- Vaccins, immunoglobulines : médicament utilisés dans la prévention de maladies telles que la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite et la coqueluche.

# II. ANNEXE 2 : SPECTROMETRIE DE MASSE RAPPEL THEORIQUES

## II.1. Les différentes sources d'ionisation

### II.1.1. Les sources basées sur l'ionisation en phase gazeuse

#### II.1.1.1. Les sources sous vide

##### II.1.1.1.1. L'ionisation par électron (EI)

Cette source a été inventée par Dempster [478] en 1916 puis fut améliorée par Bleakney [208] et Nier [479] en 1929 et 1936 respectivement. Elle est parmi les plus courantes en spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse. Cette source est constituée d'une cathode montée d'un filament chauffé qui émet des électrons. Ceux-ci sont ensuite accélérés vers une anode grâce à une différence de potentiel qui est généralement de 70 V. L'énergie cinétique des électrons ainsi produits est de 70 eV en moyenne dans la distribution. Ils entrent alors en interaction avec les molécules en phase gazeuse de l'échantillon à analyser introduit dans la source (Figure 116). Les ions formés résultent de l'arrachement d'un électron à la molécule M d'intérêt (Équation 5). A une énergie cinétique de 70 eV et dans les conditions habituelles ($10^{-6}$ à $10^{-7}$ mBar) de pression, un ion est produit pour 100 000 molécules entrant dans la source.

$$M + e^- \rightarrow M^{+\cdot} + 2e^- \quad \textbf{Équation 5 : formation de l'ion moléculaire}$$

L'ion moléculaire $M^{+\cdot}$ est un radical-cation c'est-à-dire un ion possédant une charge positive et un électron célibataire. Il est généralement nommé « ion radicalaire ». Cet ion comporte une large distribution d'énergie interne (électronique et vibrationnelle). Cet énergie interne provoque la dissociation (Équation 6) de ces ions moléculaires et la formation de cations ($A^+$) et d'un radical ($B^{\cdot}$) ou à la formation d'une nouvelle espèce radical-cation ($C^{+\cdot}$) et d'une molécule ($D$).

$$A^+ + B^{\cdot} \leftarrow M^{+\cdot} \rightarrow C^{+\cdot} + D \quad \textbf{Équation 6 : dissociation de l'ion moléculaire}$$

Des processus de dissociations analogues peuvent se produire de manière compétitive ou consécutive et conduire ainsi à de nombreux ions fragments de rapports *m/z* inférieurs au rapport *m/z* de la molécule [480]. Cette source induit donc un grand nombre fragmentations si

bien que l'espèce moléculaire n'est pas toujours détectée. Ces fragmentations sont très riches d'informations. L'avantage de cette source réside également dans la robustesse des spectres de masse quel que soit l'instrument utilisé car, pour une distribution d'énergie cinétique donnée, la fragmentation est induite en fonction des états d'énergie vibrationnelle atteints qui sont dépendants de la molécule. Une banque de données spectrales regroupant 10 695 espèces a été créé par le NIST (de l'anglais *National Institute of Standards and Technology*) [481]) qui a mis en ligne environ 200 000 spectres de masse réalisés en ionisation électronique, facilitant ainsi l'identification des composés.

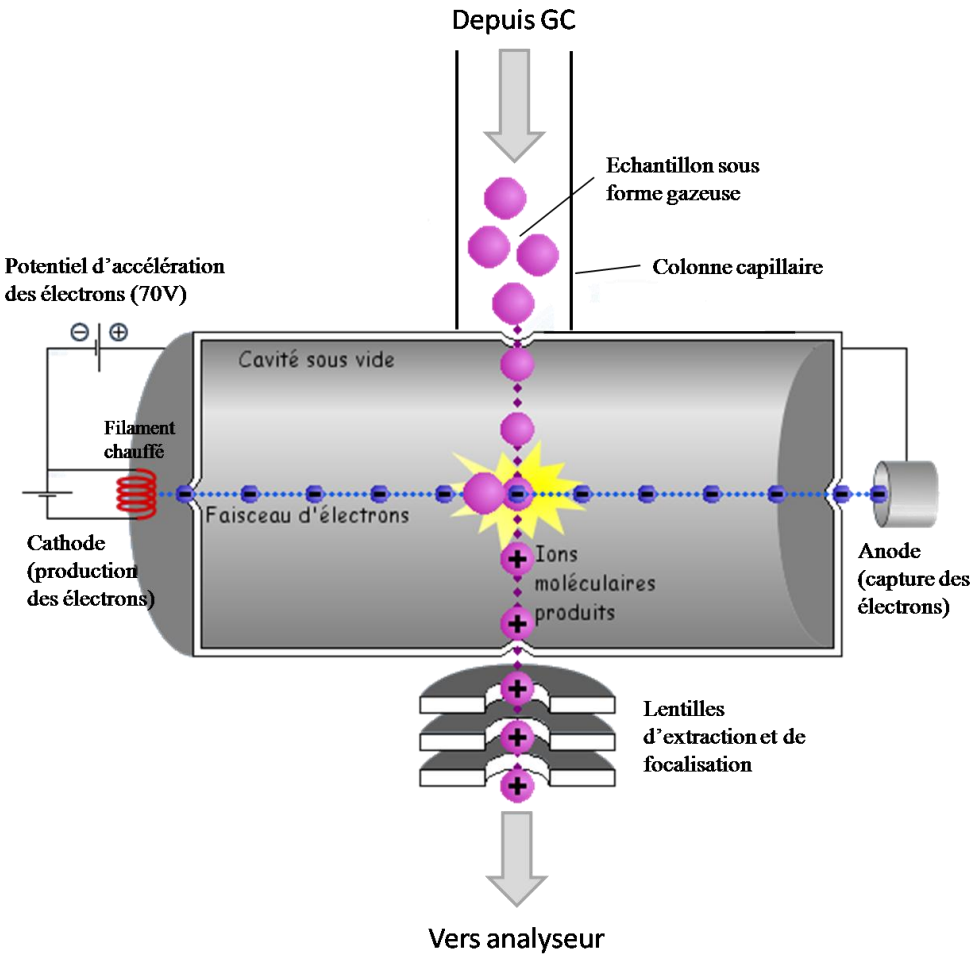



**Figure 116 : Schéma d'une source à impact électronique couplée avec la chromatographie gazeuse (Adapté du travail de Gbdivers [482])**

II.1.1.1.2. L'ionisation chimique (CI)

Cette source a été proposée par Munson and Field [209] en 1966 et se base très largement sur l'appareillage et les mécanismes de la source à ionisation par électron sous plus forte pression (de $10^{-6}$ à $10^{-4}$ mBar). Le principe de cette source consiste à produire des ions par collision de

la molécule d'intérêt avec des ions primaires générés dans la source. Pour cela, l'appareillage d'ionisation électronique a été modifié en incluant une petite enceinte d'environ 1 $cm^3$ hermétique dans laquelle un gaz réactif est introduit à une pression de 0,6 mBar tandis que dans le reste de l'enceinte règne un vide de l'ordre de $10^{-5}$ mBar. Lorsqu'un électron est émis dans l'enceinte, il ionise préférentiellement le gaz réactif car il est très abondant comparativement aux molécules à analysées (Figure 117). L'ion produit à partir du gaz réactif entre en collision très douce avec d'autres molécules de gaz réactif formant ainsi un plasma d'ions positifs et négatifs. Les molécules à analyser présentes à l'état gazeux s'ioniseront *via* des réactions chimiques avec les ions du plasma donnant lieu à des échanges de protons appelés réactions ions-molécule (Équation 7), à l'abstraction d'hydrure, à la formation d'adduit, à l'addition ou le transfert de charge etc. Ces réactions sont également fonction du gaz réactif utilisé.

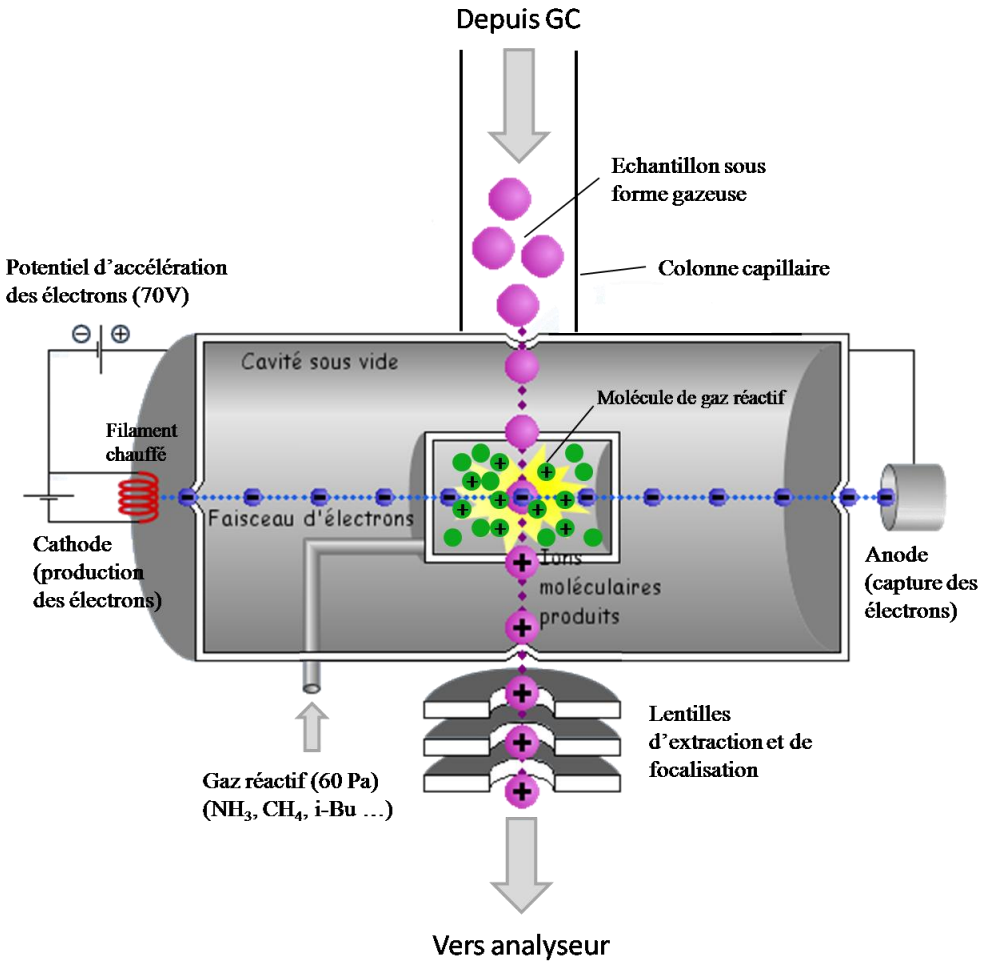



**Figure 117 : Schéma d'une source d'ionisation chimique couplée à la chromatographie gazeuse (Adapté du travail de Gbdivers [483])**

Il s'agit généralement d'une méthode d'ionisation douce qui dépend de la nature du gaz réactif utilisé, préservant l'espèce moléculaire et provoquant peu de fragmentation. Cette source est souvent couplée avec la chromatographie en phase gazeuse.

$$NH_3 + e^- \rightarrow NH_3^{+\cdot} + 2e^-$$
$$NH_3^{+\cdot} + NH_3 \rightarrow NH_4^+ + NH_2^{\cdot}$$
$$NH_4^+ + NH_3 \rightarrow \cdots \rightarrow (NH_3)_nH^+$$
$$M + (NH_3)_nH^+ \rightarrow MH^+ + (NH_3)_n$$

n généralement inférieur ou égal à 5

**Équation 7 : exemple de formation d'un ion par protonation à partir de la réaction avec l'ammoniac comme gaz réactif**

Le choix du gaz réactif est primordial car il va déterminer : (i) la nature des molécules ionisées ainsi que (ii) l'allure du spectre de masse. En effet, le transfert de proton ne peut avoir lieu que si l'affinité protonique de la molécule de gaz réactive est inférieure à l'affinité protonique de la molécule d'intérêt M. L'affinité protonique se mesure par la basicité en phase gazeuse. L'affinité protonique de l'ammoniac est de 858 kJ/mol, ainsi, il y aura transfert de proton uniquement si la molécule d'intérêt M est une amine ou une cétone dont l'affinité protonique en phase gazeuse est supérieure à cette valeur. Comparativement, le méthane $CH_4$ a une affinité protonique de 546 kJ/mol, l'ion réactif obtenu $CH_5^+$ a donc un pouvoir d'ionisation beaucoup plus fort et ionisera beaucoup de fonction chimique comme les esters, les éthers ou les alcools et provoquera également beaucoup plus de fragmentations notamment sur les cétones et amines qui ont une affinité protonique beaucoup plus importante que cet ion réactif. Il existe également la formation d'ions négatifs mais qui n'est pas expliquée dans ce court rappel théorique.

Parce que ces deux sources d'ionisation induisent encore trop de fragmentations, des sources à pression atmosphérique ont fait leur apparition.

### II.1.1.2. Les sources à pression atmosphérique (API)

Les ions sont produits à pression atmosphérique puis transférés vers le spectromètre de masse où règne un vide poussé. Pour cela, les solutions sont introduites dans un nébuliseur composé d'un système qui sous l'effet d'un jet d'air ou d'azote transforme le liquide en un fin brouillard. Ce brouillard contenant du solvant et les analytes d'intérêts est ionisé pour former des agrégats qui vont être désolvatés. Il reste, enfin, à les acheminer vers l'analyseur au moyen d'une interface permettant de passer de la pression atmosphérique de la source au vide

poussé du spectromètre de masse, tout en continuant le processus de désolvatation. Les agrégats ionisés créés dans la source doivent effectivement être transportés d'une pression atmosphérique dans un vide poussé de l'ordre de $10^{-10}$ mBar. La déclusterisation complète n'est pas toujours achevée dans la zone à pression atmosphérique. De plus, une éventuelle reclusterisation peut avoir lieu avec les molécules de solvant neutres, dans la région où les ions sont en expansion supersonique du fait de leur passage à travers l'orifice de petit diamètre [484].

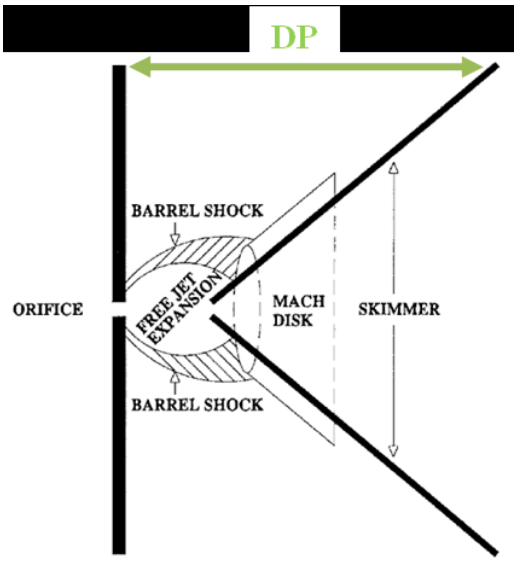



**Figure 118 : Structure d'un jet supersonique [286]**

DP : Différence de Potentiel

La Figure 118 montre la structure en tonneau du jet en expansion qui se termine sous la forme d'un disque de Mach. L'écrêteur (de l'anglais *skimmer*) est généralement placé à l'intérieur de ce disque de manière à optimiser la focalisation et la déclusterisation des ions. L'ensemble de ces étapes permet de passer progressivement de la pression atmosphérique à un vide poussé, avec l'aide de pompes primaire et turbomoléculaires disposées aux endroits adéquats de l'analyseur. Ce transfert induit nécessairement des pertes d'ions lié à l'étroitesse des orifices entre les compartiments permettant de garantir une bonne étanchéité du vide. Cependant, les sources fonctionnant à pression atmosphérique ont révolutionné le couplage des techniques de séparation telles que la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse et offre une grande facilité de mise en œuvre. Les sources basées sur l'ionisation en phase gazeuse à pression atmosphérique sont l'APCI, l'APPI et le DART et sont détaillées ci-après.

II.1.1.2.1. L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

Cette source a été employée pour la première fois en 1973 par Horning et coll. [216]. Cette technique utilisée en couplage avec la chromatographie liquide s'appuie sur des réactions ions-molécules en phase gazeuse à pression atmosphérique. Elle s'inspire donc très largement de l'ionisation chimique sous vide mais utilise une décharge corona pour créer le plasma d'ions réactifs d'espèces chargées négativement et positivement (Figure 119).

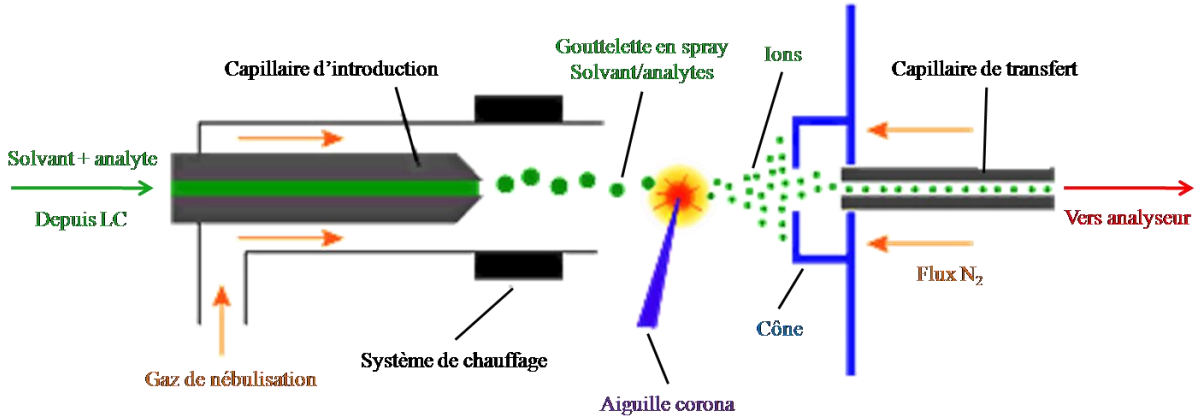



**Figure 119 : Schéma d'une source APCI couplée à la chromatographie liquide (Adapté de la figure de Paul Gates, Université de Bristol, Royaume-Unis [485])**

La solution provient de la chromatographie liquide et entre dans le capillaire d'introduction. Sous l'effet conjoint du gaz de nébulisation et du système de chauffage intense (entre 350 °C et 500 °C), la solution de l'analyte ayant une tension de vapeur est vaporisée. Au sein de la source, une aiguille corona chargée à 5000 V crée un plasma en ionisant l'air ambiant. Autour de la pointe de l'aiguille, les ions radicalaires du plasma participent ensuite à des réactions chimiques qui donnent lieu à l'ionisation des molécules d'analytes. Ce sont, en effet, les molécules de solvant qui, présentes en excès, sont ionisées préférentiellement et jouent le rôle d'ions réactifs (Figure 120). L'ionisation APCI forme des ions simplement chargés.

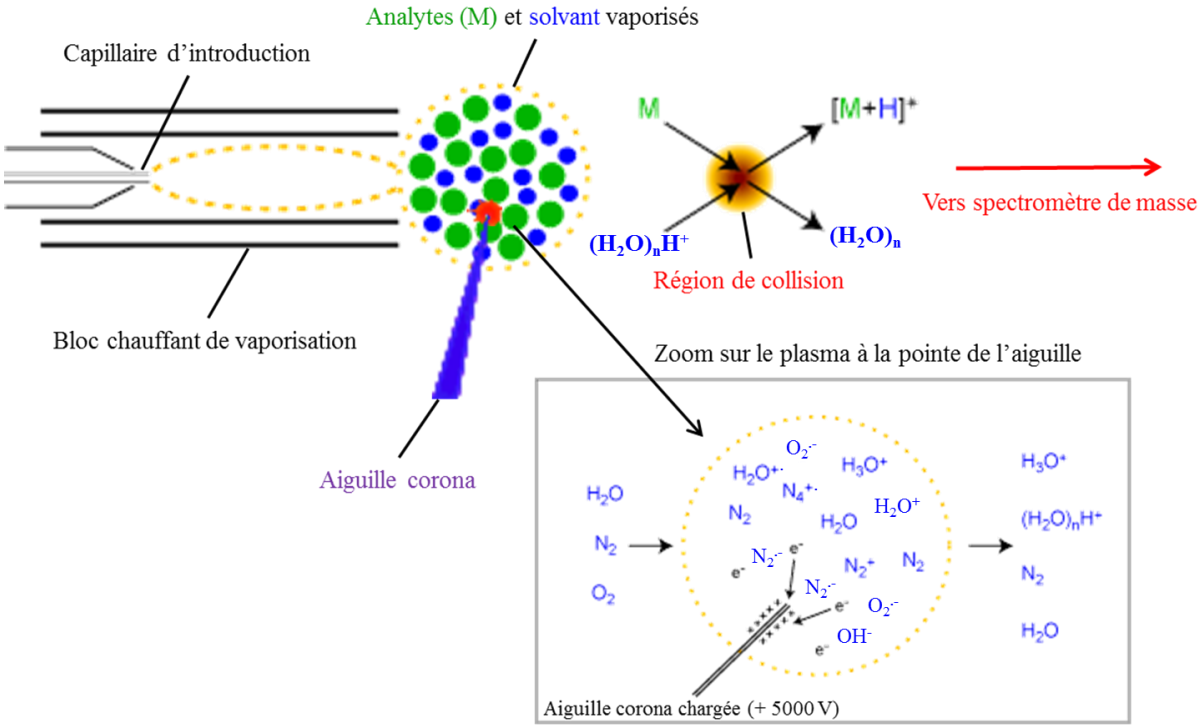



**Figure 120 : Principe imagé de la réaction entre les constituants de l'air ionisé et le solvant conduisant à la protonation de l'analyte (Adapté de la figure de Paul Gates, Université de Bristol, Royaume-Unis [485])**

n généralement inférieur ou égal à 5

II.1.1.2.2. La photoionisation à pression atmosphérique (APPI)

Cette source proposée par Bruins et son équipe [486] permet un couplage avec la chromatographie liquide et s'adresse aux molécules relativement peu polaires. Elle est notamment utilisée pour l'ionisation de molécules ayant de nombreux électrons π (cycle aromatique) comme les HAP (*Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques*) [487] ou les PCB [488]. Cette source fonctionne sur le principe de l'ionisation par électron et de l'ionisation chimique avec un appareillage comparable. L'échantillon en solution est tout d'abord vaporisé à l'aide d'un nébuliseur chauffant (comme l'APCI). Après vaporisation, l'analyte interagit avec des photons émis par une lampe UV (Figure 121). Ces photons induisent l'ionisation de la molécule d'intérêt (Équation 8), mais celle-ci peut être suivie d'autres réactions de recombinaison qui n'aboutissent pas à la molécule ionisée.

$$M + h\nu \rightarrow M^{+\cdot} + e^{-}$$

**Équation 8 : formation de l'ion moléculaire directement à partir de la photoexcitation**

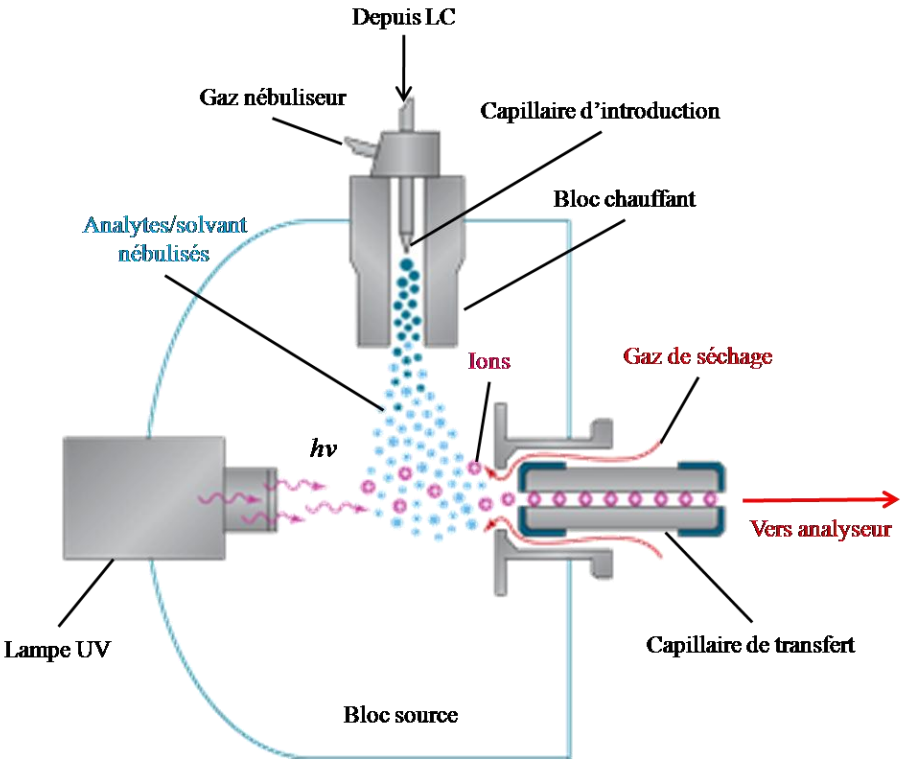



**Figure 121 : Schéma d'une source APPI couplée à la chromatographie liquide (Adapté de la plaquette commerciale PhotoMate™ Agilent [489])**

Il est possible de ne former que des ions à partir de l'échantillon sans ioniser le solvant en choisissant une énergie des photons incidents plus haute que l'énergie d'ionisation des analytes mais plus basse que les constituants de l'air et des solvants (donc insuffisante pour les ioniser). La lampe la plus adaptée est probablement la lampe à Krypton car elle permet d'émettre des photons à 10 eV supérieure à l'énergie nécessaire à ioniser les molécules organiques (7,8 à 12 eV) mais plus faible que la majorité des composants de l'air et des solvants comme $N_2$, $H_2O$, $O_2$, MeOH ou ACN avec des énergies d'ionisation respectivement de 15,58, 12,62, 12,07, 10,84 et 12,20 eV. Les réactions parasites de désexcitation entre la molécule d'intérêt ionisée et le solvant restent toutefois majoritaires. Pour tenter d'augmenter le rendement d'ionisation, on peut avoir recours à un « dopant » en quantité importante par rapport à l'analyte. Le dopant est efficace s'il est photoionisable comme le toluène ou l'acétone (énergies d'ionisation 8,83 et 9,7 eV respectivement). Ils agissent alors comme intermédiaire entre les photons et l'analyte (principe de l'APCI) et conduisent à la formation d'espèces protonées en plus de cations-radicaux (Équation 9).

$$d + h\nu \rightarrow d^{+\cdot} + e^{-}$$
$$d^{+\cdot} + d \rightarrow (d+H)^{+} + (d-H)^{\cdot}$$
$$d^{+} + s \rightarrow \cdots \rightarrow s_n H^{+}$$
$$s_n H^{+} + M \rightarrow MH^{+} + s_n$$

**Équation 9 : formation de l'ion moléculaire suite à la réaction entre le dopant et le solvant**

d : molécule de dopant, s : molécule de solvant et n généralement inférieur ou égal à 5

II.1.1.2.3. L'analyse directe en temps réel (DART)

Cette source d'ionisation a été mise au point par Cody et coll. de la société JEOL [220] et se base sur le principe de l'ionisation Penning. Cette source fonctionne à pression atmosphérique et présente l'avantage de ne requérir aucune préparation d'échantillon, de solvant ou de réactifs spéciaux. Seule une bouteille de gaz est nécessaire, il s'agit généralement d'hélium. En l'absence de réactif, il n'y a pas de bruit de fond et tous les signaux détectés proviennent de l'échantillon. Il est possible d'analyser des vapeurs ou des solides et des liquides ayant une tension de vapeur suffisante. La procédure d'analyse est très simple, il suffit de tenir l'échantillon en face du débit gazeux durant l'enregistrement du spectre qui apparait instantanément. Le principe de cette source utilise des atomes d'hélium excités pour ioniser les molécules de l'échantillon. Pour cela, une décharge électrique (1000 V) est effectuée au sein du gaz inerte pour créer un plasma contenant des ions, des électrons et des atomes excités métastables. Ensuite, un système de lentilles électrostatiques élimine les ions et les électrons ne laissant sortir de la chambre à plasma que les atomes excités (Figure 122). Ces atomes interagissent avec les molécules de l'air ambiant pour former des espèces chargés réactives (sur le principe de l'APCI) qui vont à leur tour ioniser les molécules d'intérêts (Équation 10) avant de les emmener dans le spectromètre de masse.

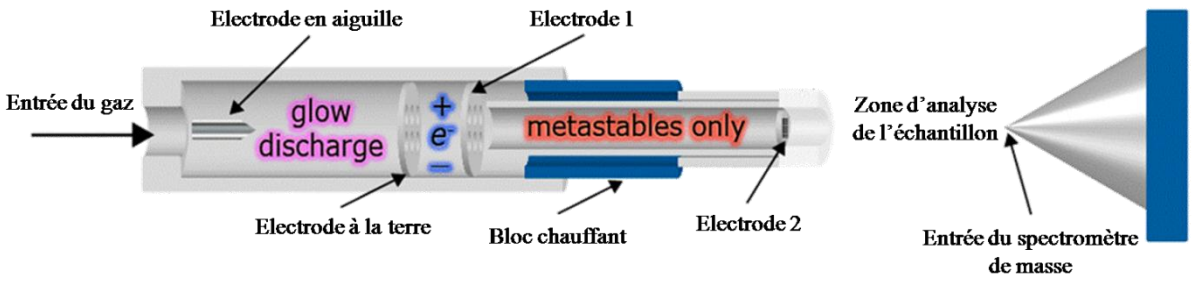



**Figure 122 : Schéma d'une source DART (Adapté de Cody et coll. [220])**

$$He^* + H_2O \rightarrow He + H_2O^{+\cdot} + e^-$$
$$H_2O^{+\cdot} + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^\cdot$$
$$H_3O^+ + H_2O \rightarrow \cdots \rightarrow (H_2O)_nH^+$$
$$M + (H_2O)_nH^+ \rightarrow MH^+ + (H_2O)_n$$

n généralement inférieur ou égal à 5

**Équation 10 : formation des ions réactifs à partir de l'atome d'hélium métastable et de la vapeur d'eau aboutissant à l'ion protoné**

## II.1.2. Les sources basées sur la désorption-ionisation

### II.1.2.1. Les sources sous vide

#### II.1.2.1.1. La désorption-ionisation par laser assistée par matrice (MALDI)

Cette source d'ionisation a été introduite par Karas, Hillenkamp et coll. en 1985 [232] et Tanaka pour le *soft laser desoprtion* [231]. Ce dernier reçut le prix Nobel de chimie en 2002. Cette source a été développée avec l'idée d'analyser les molécules de haute masse moléculaire comme les protéines. Pour l'analyse des polluants, la source MALDI sert plutôt à l'imagerie afin de comprendre les phénomènes de stockage des pesticides dans le cerveau [490] ou les plantes [236]. Le principe consiste à mélanger la substance à analyser à une solution de petites molécules organiques (en excès) appelée matrice. Cet agrégat est ensuite séché sur une plaque MALDI en métal contenant des cibles numérotées pour pouvoir retrouver facilement le dépôt (Figure 123). Un laser (souvent à azote) est utilisé pour irradier les molécules de la matrice qui sont capable d'absorber l'énergie à la longueur d'onde du laser. Cela va provoquer l'accumulation d'une importante quantité d'énergie dans la phase condensée par excitation électronique des molécules de la matrice et une désorption de matières. Il en résulte la formation d'un panache dans lequel les agrégats de matrices et d'analytes vont être désolvatés. Des échanges de protons se font alors au sein des agrégats en mouvement dans le panache permettant, l'ionisation de la molécule d'intérêt (Figure 124). Le choix de la matrice est important. Il s'agit souvent de petites molécules organiques de faible enthalpie de sublimation et absorbant à la longueur d'onde des lasers utilisés, telles que les dérivés d'acide cinnamiques et benzoïques : l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), l'acide sinapinique (SA), l'acide ferrulique, l'acide caféique et l'acide gentistique (DHB).

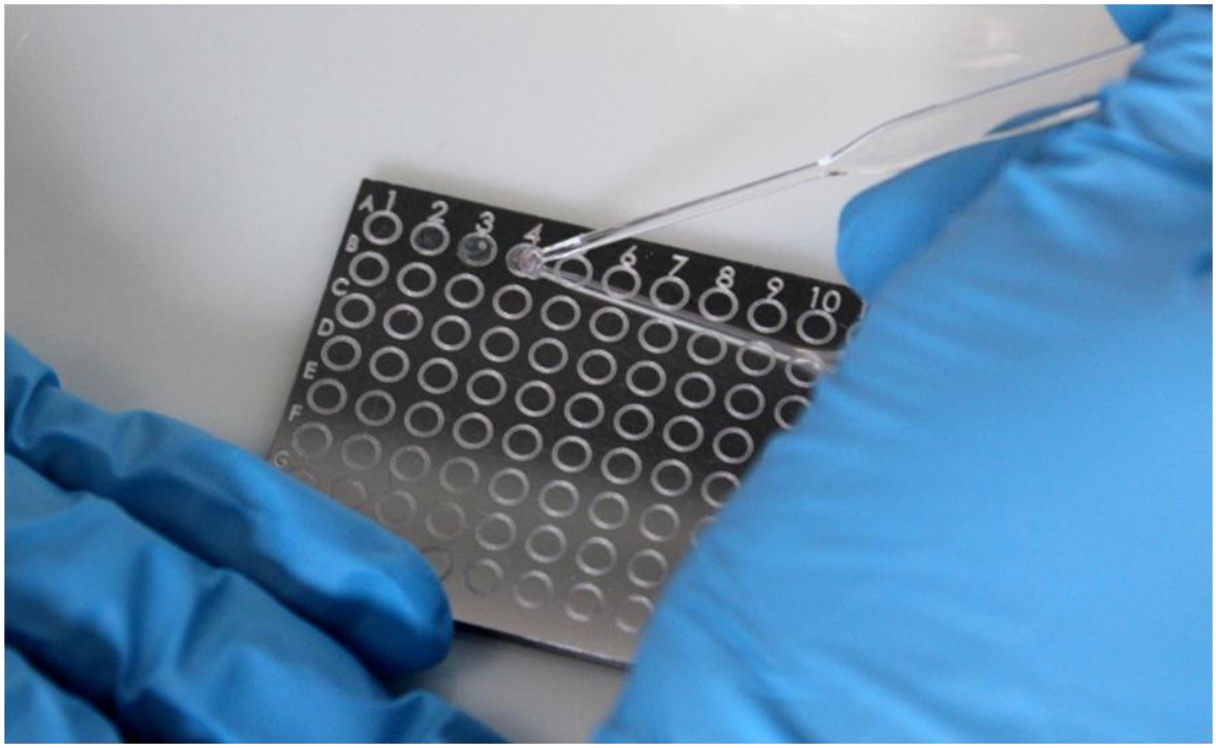


**Figure 123 : Plaque MALDI utilisé pour la réalisation des dépôts (analyte + matrice) (Adapté d'une plaquette commerciale Andromas [491])**

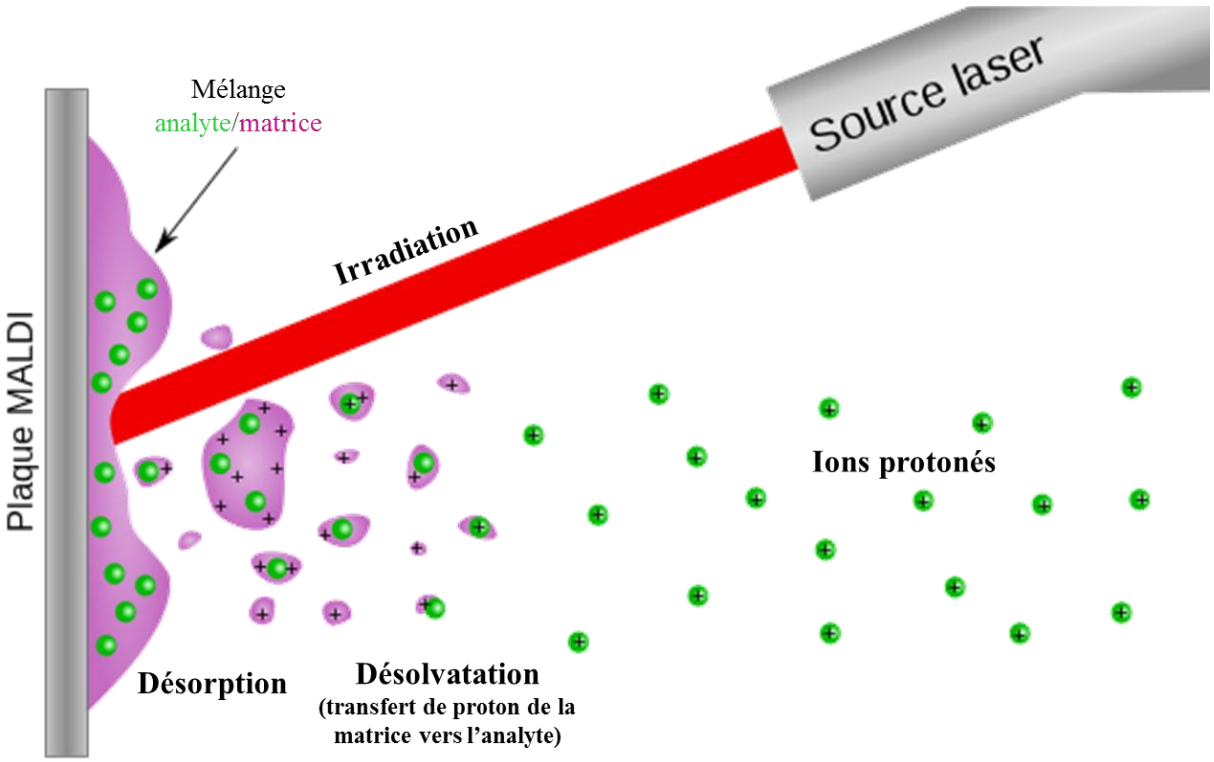



**Figure 124 : Schéma d'une source MALDI avec le principe d'ionisation (Adapté du travail de Mikayé [492])**

### II.1.2.2. Les sources à pression atmosphérique

#### II.1.2.2.1. Les sources d'ionisation electrospray (ESI et HESI)

Cette technique d'ionisation à pression atmosphérique a été développée par Fenn [237] en 1985 ce qui lui valut le prix Nobel de chimie en 2002 au côté de Tanaka (MALDI). Cette source est utilisée en spectrométrie de masse pour produire des ions à partir de composés en solution. L'electrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit. Ce champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de 2 à 6 kV entre le capillaire et la contre-électrode. Il provoque ainsi l'accumulation de charges à la surface du liquide situé à l'extrémité du capillaire formant alors un cône de Taylor. Celui-ci se rompt ensuite pour former des gouttelettes fortement chargées. Ce processus peut être aidé par ajout d'un gaz inerte de nébulisation, typiquement de l'azote, afin de créer un aérosol. L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer la réduction de leur taille par évaporation jusqu'à atteindre la limite de Rayleigh. Cette limite marque le stade où la gouttelette se déforme car la répulsion électrostatique des charges qui la compose est proche de la tension de surface (ce qui traduit la force de cohésion de la gouttelette). Lorsque la répulsion Coulombienne devient trop forte et dépasse la tension de surface, la gouttelette « explose » créant ainsi un grand nombre de petites gouttelettes de moins en moins stables qui explosent à leur tour accélérant le phénomène appelé cascade de fissions (Figure 125).

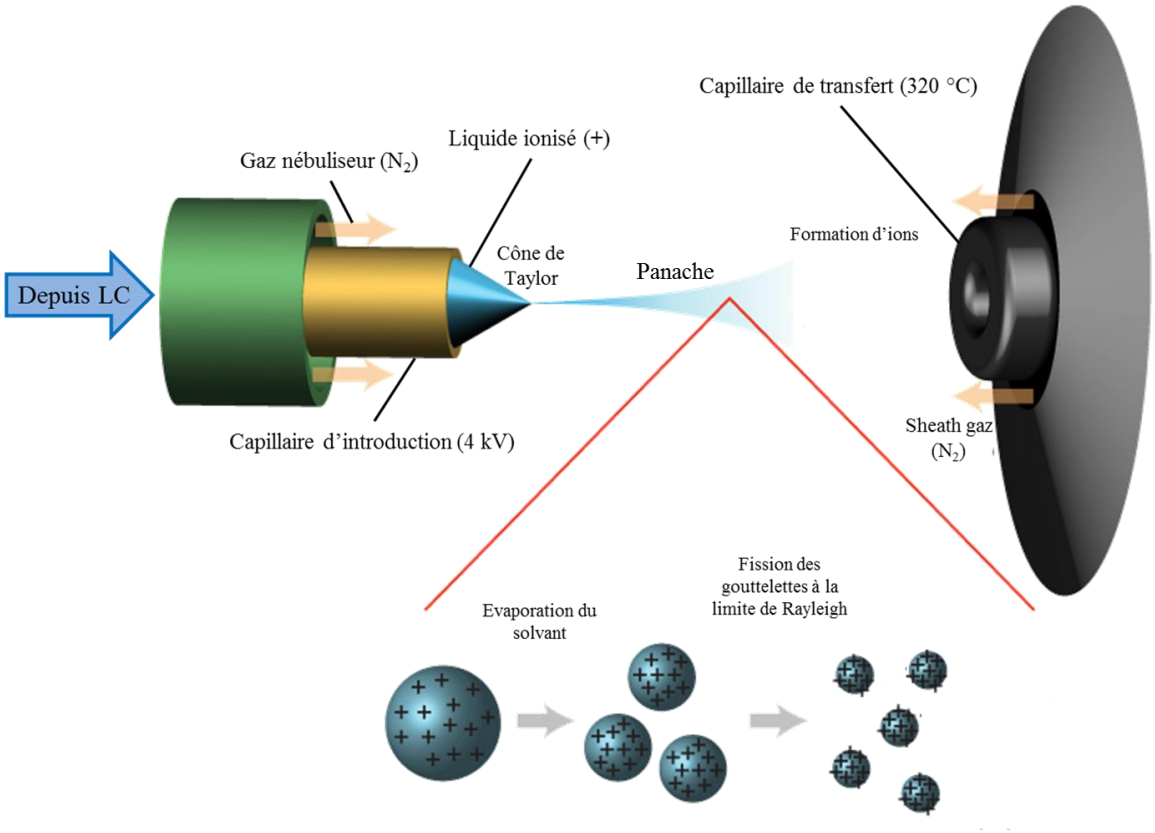



**Figure 125 : Schéma de principe d'une source ESI à pression atmosphérique (Adapté de Peptracker™, Université de Dundee, Royaume-Unis [493])**

La cascade de fissions conduit à des gouttelettes de plus en plus petites jusqu'à atteindre un champ électrique à leur surface suffisamment important pour provoquer la désorption par champs des ions. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation des ions en phase gazeuse à partir de gouttelettes très petites et très chargées. Proposé en 1968 par Dole et coll., le premier mécanisme, du nom de « *Charged Residue Model* » ou CRM, s'adresse aux analytes de haut poids moléculaire [494].

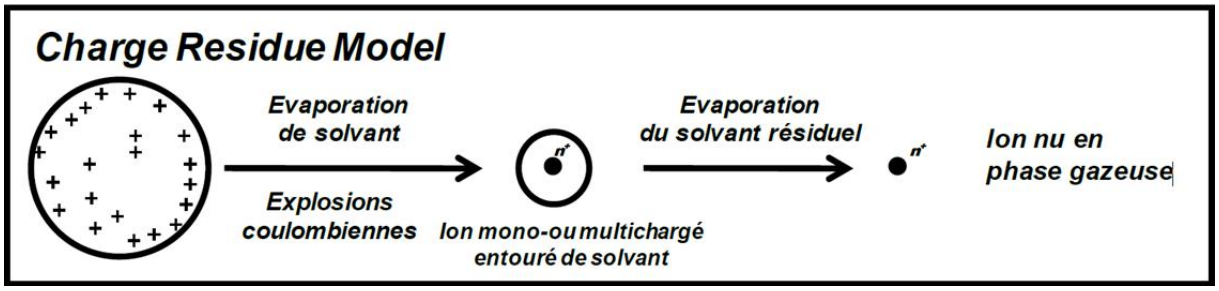



**Figure 126 : Représentation schématique du modèle CRM**

Cette hypothèse consiste à considérer que pour des macromolécules parmi les petites gouttelettes formées au cours du processus d'évaporation et d'explosions coulombiennes, certaines d'entre elles ne sont formées que d'une seune molécule d'analyte associée à une ou plusieurs charges en surface. L'évaporation du solvant résiduel va conduire à la formation d'un ion en phase gazeuse dont la charge proviendra des charges qui étaient à la surface de la gouttelette disparue.

Contrairement au CRM, le second modèle, IEM pour « *Ion Evaporation Model* » d'Iribarne et Thomson (1976), tente d'expliquer la formation d'ions en phase gazeuse issus de molécules de faible poids moléculaire [495].

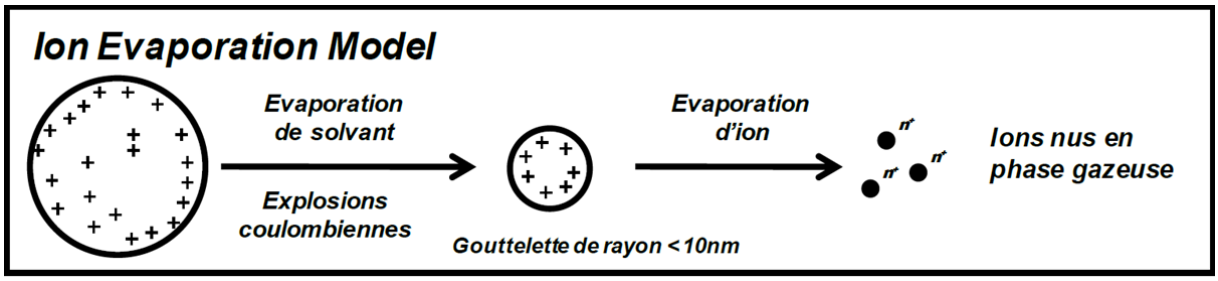



**Figure 127 : Représentation schématique du modèle IEM**

L'IEM est basé sur le principe selon lequel l'ion sera directement émis en phase gazeuse à partir d'une gouttelette, lorsque la réduction de celle-ci, par les processus d'évaporation de solvant et de fission coulombienne, conduira à une gouttelette de rayon inférieur à 10 nm.

La technique d'ionisation ESI permet la production d'ions mono- et multichargés permettant l'analyse de composés de haut rapport *m/z* en plus de pouvoir générer des ions en mode d'ionisation positive et négative ce qui en fait certainement la technique d'ionisation la plus utilisée. Les quelques paramètres sur lesquels l'utilisateur va pouvoir jouer sont : (i) la tension appliquée au capillaire d'introduction ; (ii) la nature des solvants : en prenant des solvants organiques volatils (méthanol, acétonitrile), les gouttelettes vont être évaporées plus rapidement ; (iii) en ajoutant de l'acide formique (HCOOH) ou acétique ($CH_3COOH$) pour faciliter la protonation en mode positif (formation d'ion $[M+H]^+$ ou en mode négatif $[M+HCOO]^-$) ou (iv) la puissance du gaz de nébulisation ainsi que sa température (source HESI, de l'anglais *Heated ElectroSpray Ionization*) augmentant ainsi le rendement d'ionisation. Cependant, ce processus n'est pas compatible avec les composés thermolabiles. Par ailleurs, l'ajout de sels permet la formation d'agrégats composés de sodium ou d'ammonium.

II.1.2.2.2. La source de désorption-ionisation electrospray sur support solide (DESI)

Cette technique a été proposée par le professeur Cooks en 2004 [248]. Elle est mise en œuvre en dirigeant des gouttelettes électronébulisées vers une surface à analyser à pression atmosphérique, conduisant à la désorption des molécules organiques solubles à la surface de contact du matériau analysé. Les analytes sont ensuite ionisés et transférés dans le spectromètre de masse sous forme d'ions entourés de molécules de solvant (Figure 128). La composition du solvant électronébulisé, le débit de gaz, les potentiels appliqués, l'angle de spray et l'angle de récupération ainsi que les distances entre spray, surface et spectromètre de masse sont autant de variables pouvant être optimisées.

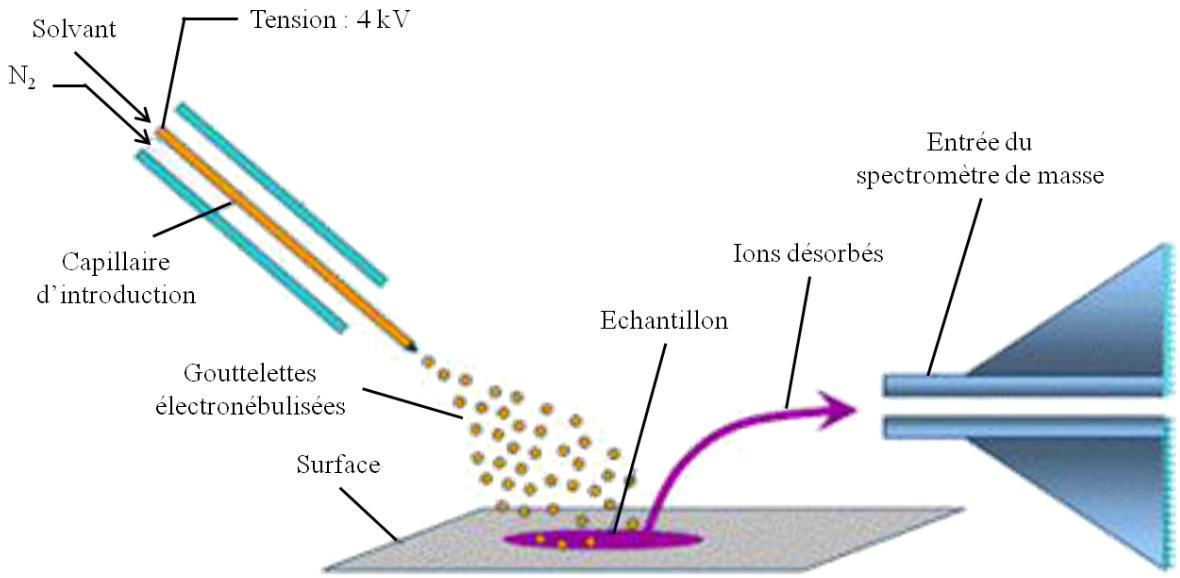



**Figure 128 : Schéma d'une source DESI (Adapté d'une image de l'université de Perdue [496])**

Dans le mécanisme de formation des ions en DESI, les gouttelettes incidentes et multichargées arrivent sur la surface à analyser. Un phénomène de mouillage de la surface intervient, couplé à la dissolution de l'analyte emportant avec lui les molécules d'intérêts. Ce sont ensuite les mêmes processus que lors de l'ionisation electrospray qui ont lieu. Cette technique est proche de celle du DART, vu précédemment. Elle ne requiert aucune préparation d'échantillon et permet l'analyse de toute surface. Elle a déjà été appliquée à l'analyse d'explosif [229], de médicaments, de composés naturels comme les flavonoïdes [230] et ce directement sur les vêtements, les tissus humains, animaux ou sur les plantes [227,228].

## II.2. **Les différents analyseurs**

### II.2.1. Les analyseurs à basse résolution

#### II.2.1.1. L'analyseur quadripolaire et triple quadripolaire (TQ)

L'analyseur quadripolaire, souvent appelé filtre quadripolaire, est décrit par Paul et Steinwedel en 1953 [497]. Il est très souvent utilisé en LC/MS et GC/MS en raison d'une vitesse de balayage élevée, un coût raisonnable et une maintenance aisée. Cet instrument est constitué de quatre électrodes métalliques de section circulaire ou hyperbolique parfaitement parallèles et raccordées électriquement deux à deux (Figure 129). Son principe s'appuie sur la stabilité des trajectoires des ions dans un champ électrique oscillant pour séparer les ions selon leur rapport *m/z*. Pour cela, des potentiels déphasés de 180° dont l'un est continu (U) et l'autre alternatif de radiofréquence $V \cos \omega t$ sont appliqués de manière opposée sur les barres. Par ailleurs, la polarité des électrodes s'inversent à la fréquence ω, ce qui confère aux ions un mouvement hélicoïdal dont l'amplitude dépend de *U* et *V*. Ainsi, pour un temps donné, le quadripôle ne détecte que les ions d'un rapport *m/z* défini (Figure 129). Les autres ions, non stables, heurtent les électrodes ou les parois internes du spectromètre de masse et se déchargent. Ils sont alors entraînés par le système de pompage. Ce sont les équations de Mathieu [498] qui précisent les conditions pour qu'un ion d'un rapport *m/z* soit en mesure de passer à travers un filtre quadripolaire.

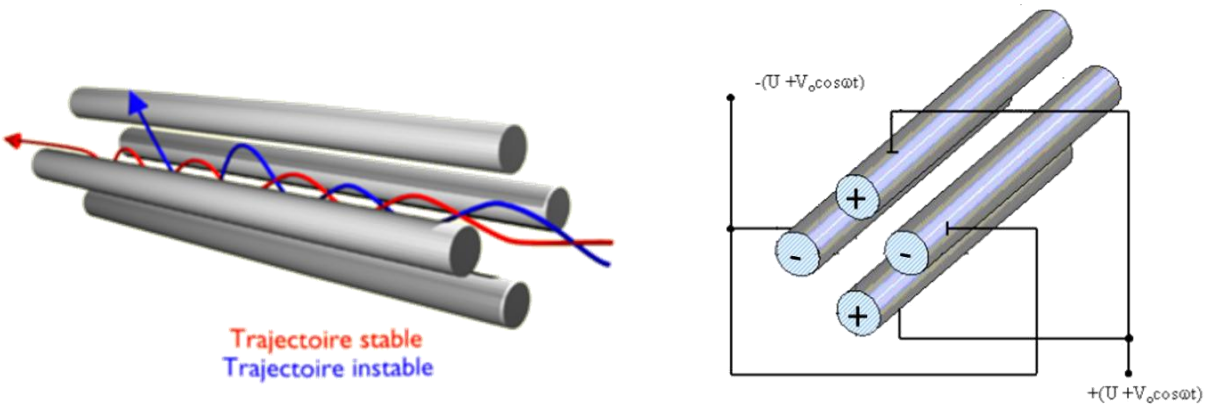



**Figure 129 : Schéma de principe d'un analyseur quadripolaire [499]**

Certains appareils, comme le triple quadripôle, possèdent plusieurs analyseurs en série. Ils sont constitués de deux analyseurs quadripolaires en série avec un quadripôle entre eux utilisé comme cellule de collision et sur lequel l'application de radio fréquence (*RF-only* en anglais) favorise le confinement des ions (Figure 130). La dissociation induite par collistion (CID, de

l'anglais Collision Induced Dissociation) est ainsi plus efficace. Cette configuration de spectromètre de masse est aussi appelée QqQ ou Q1q2Q3 précisant que le quadripole central (q) n'est pas utilisé comme un analyseur (Q). Le gaz introduit dans la cellule de collision est généralement de l'argon ou de l'azote à une pression telle qu'un ion entrant dans le quadripôle subira une collision avant de se dissocier. Dans cet instrument, l'énergie de fragmentation peut être contrôlée en fonction de l'énergie cinétique donnée aux ions par l'application d'une différence de potentiel. Par ailleurs, les triples quadripoles permettent plusieur modes de balayage décrites dans le CHAPITRE IV.II.3.

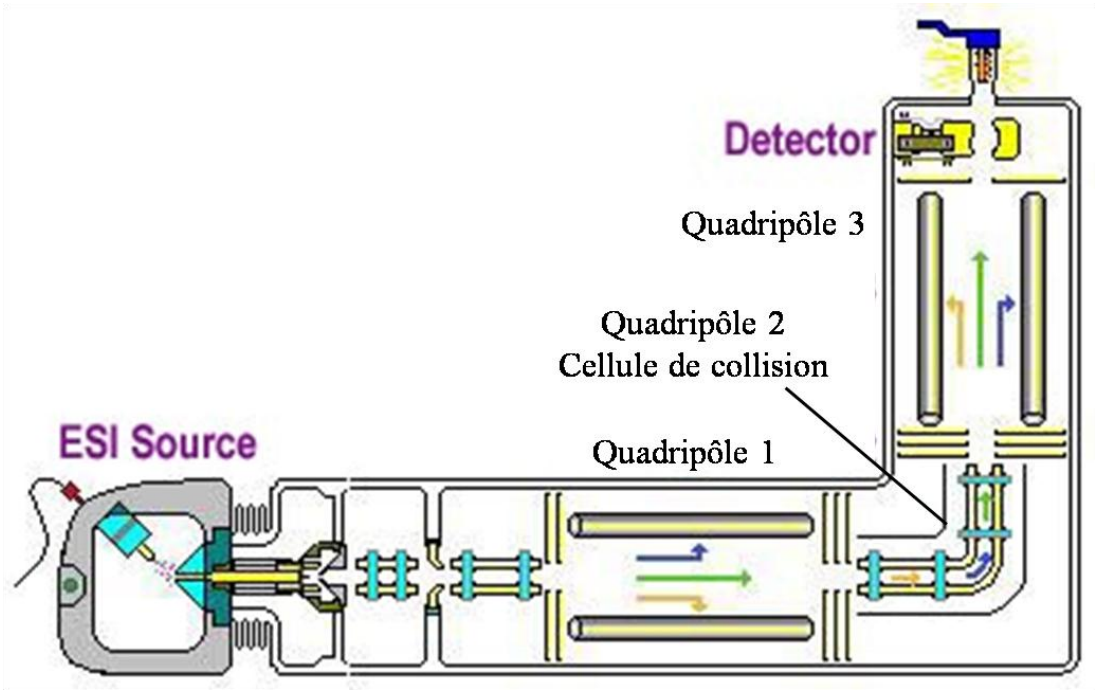



**Figure 130 : Schéma d'un spectromètre de type triple quadripôles [500]**

### II.2.1.2. Les pièges à ions

#### II.2.1.2.1. Le piège 3D

Le piège à ions est une évolution du filtre quadripolaire conçu par Paul et Steinwedel [497]. Il est composé d'une électrode annulaire et de deux électrodes chapeaux (Figure 131). La combinaison de ces électrodes permet l'obtention d'un champ quadripolaire dans l'enceinte du piège. Au même titre que le quadripôle, l'expulsion des ions et leur manipulation dans le piège sont effectuées par déstabilisation de leur trajectoire. Dans le cas du piège, l'amplitude de la tension alternative de piégeage appliquée sur l'électrode annulaire est progressivement augmentée et parallèlement, une modulation axiale déphasée de 180° est appliquée sur les électrodes chapeaux. L'expulsion des ions selon le rapport *m/z* croissants est

donc réalisée de manière consécutive pour les ions qui atteignent la frontière du diagramme de stabilité. L'avantage de cet analyseur réside dans le fait que les ions sont piégés, ils peuvent donc être accumulés et des fragmentations séquentielles ($MS^n$) peuvent être réalisées. On peut, en effet, sélectionner les ions ayant un rapport *m/z* donné en sélectionnant correctement les valeurs de tension de la modulation axiale, les fréquences appliquées sur les électrodes chapeaux et l'amplitude de la tension alternative. Ensuite, ces ions peuvent être fragmentés et le piège se remplit alors des ions produits. La réalisation de ces séquences $MS^n$ « temporelles » plutôt qu'a faisceau d'ions lorsque les analyseurs sont en série permet de réaliser plusieurs expériences de fragmentations successives ($MS^n$). Cet outil est particulièrement adapté aux études structurales car ces expériences $MS^n$ permettent d'établir des filiations entre les différents ions produits.

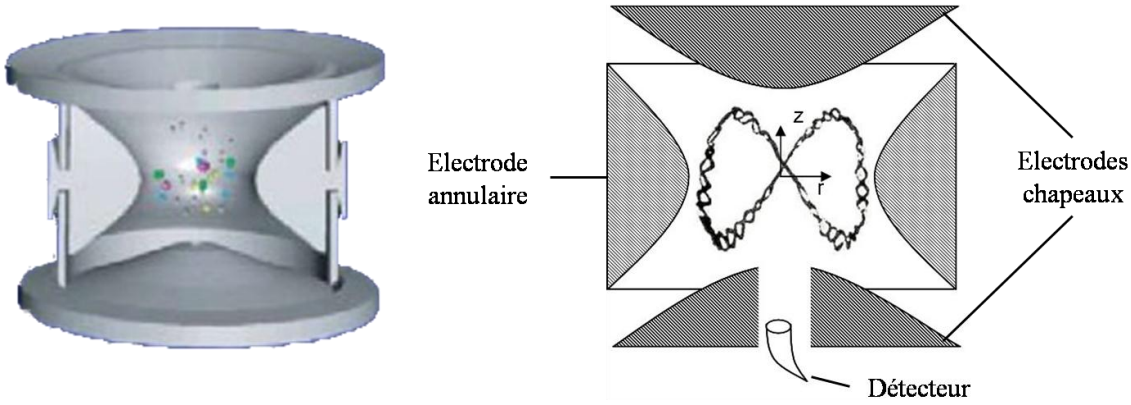



**Figure 131 : Schéma d'un piège tridimensionnel [501]**

Néanmoins, l'utilisation d'un piège à ion présente une limitation importante due à la physique même du piège et du diagramme de stabilité des ions. En effet, un phénomène de LMCO (de l'anglais *Low Mass Cut Off*) limite la détection des ions produits de bas rapports *m/z* en mode MS/MS et $MS^n$. Ce seuil de détection se situe à environ ¼ du rapport *m/z* de l'ion parent. Cette limite est liée à l'activation de l'ion nécessaire à sa fragmentation qui nécessite la mise en oscillation dans le puits de pseudo potentiel dans lequel il se trouve. Or, pour l'accès aux faibles masses, la quantité d'énergie nécessaire est trop importante et entraînerait l'éjection de l'ion précurseur du puits de pseudo potentiel ce qui est impossible pour réaliser la fragmentation. Par ailleurs, le piège 3D possède un faible volume de piégeage ce qui entraîne l'apparition de phénomène de charge d'espace qui se traduit par une dégradation de la résolution donc de la précision en masse et de la gamme de masse dynamique (capacité à différencier des ions d'abondances très différentes dans un même spectre).

II.2.1.2.2. Le piège linéaire

Le piège linéaire 2D [502] constitue une évolution du piège tridimensionnel décrit précédemment. Ce piège est un analyseur constitué de quatre barres comme un quadripôle fermé par des électrodes d'entrée et de sortie permettant de repousser les ions vers l'intérieur du quadripôle. Pour cela, des tensions continues positive ou négative sont appliquées sur les électrodes pour piéger les ions positifs ou négatifs respectivement. De plus, le piège est rempli à faible pression ($10^{-3}$ mbar) d'un gaz inerte (typiquement de l'hélium ou de l'azote) ce qui favorise la relaxation des ions en énergie cinétique et en énergie interne. Ce paramètre a une influence cruciale sur l'efficacité de piégeage et la sensibilité. Les ions sont donc focalisés en faisceau dans un mouvement oscillatoire sur l'axe des 4 électrodes (voir aperçu très simplifié sur la Figure 132) contrairement au piège 3D qui les focalise en un point. Deux types de pièges linéaires existent selon les constructeurs : (i) les pièges linéaires avec éjection radiale (LTQ™, ThermoFisher Scientific) ou les pièges linéaires avec éjection axiale (Q-trap™, Applied Biosystem). Dans un piège à éjection radiale, la sortie des ions se produit à 90° par rapport à l'axe *z* tandis que lors de l'éjection axiale, les ions sont expulsés selon l'axe *z* (Figure 132). L'avantage des pièges linéaires réside dans leur grande capacité de piégeage des ions (10 fois plus que les pièges 3D avant de connaître des problèmes de charge d'espace), les pièges 2D ont donc une meilleure sensibilité mais aussi une vitesse de balayage plus importante. Par ailleurs, les pièges avec éjection axiale ne souffre plus de LMCO comme les pièges 3D mais cette limitation subsiste sur les pièges 2D avec éjection radiale. La société ThermoFisher Scientific a toutefois développé un mode de fragmentation sur son appareil (LTQ™) permettant de supprimer le phénomène de LMCO [503] : le Pulsed-Q-Dissociation (PQD®). De plus, le LTQ™ peut être utilisé comme analyseur seul mais peut également être combiné à un autre analyseur de haute résolution pour former un appareil hybride où deux analyses sont possibles (exemples : LTQ-FTICR™ ou LTQ-Orbitrap™). Enfin, l'utilisation d'un système à éjection axiale permet de conserver les différents modes d'acquisition propre au triple quadripôles (voir CHAPITRE IV.II.3) mais limite en contrepartie la fragmentation séquentielle à l'ordre 3 [504].

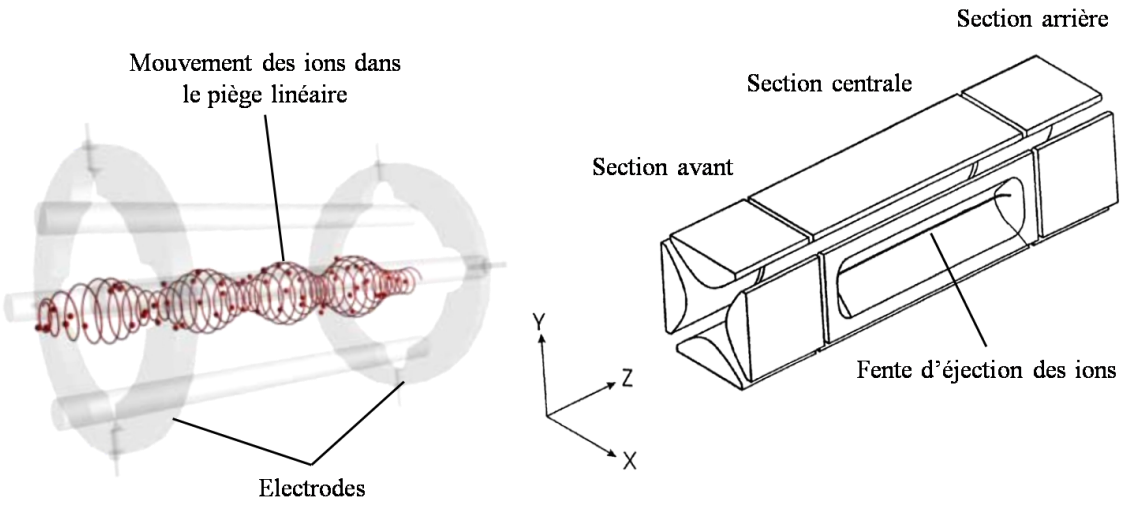



**Figure 132 : Schéma des deux types de pièges 2D à éjection axiale (à gauche) et à éjection radiale (à droite) [505]**

## II.2.2. Les analyseurs à haute résolution

Les appareils de haute résolution sont des spectromètres dont la résolution définis par la relation $\Delta m/m$ est supérieure 20 000. Cela devient suffisant pour distinguer deux masses de 200 u séparés de 0,001 u. De plus, ces instruments permettent de mesurer des rapports *m/z* avec une précision de 10 ppm. Enfin, cette résolution permet de convertir un rapport *m/z* mesuré en compositions élémentaires grâce à la résolution d'équations de diophantine. C'est essentiel dans le cas d'analyse de mélange complexe où le nombre de molécules « parasites » est grand car cela diminue le nombre de faux positifs. On distingue les instruments à temps de vol (TOF) et à transformé de Fourier de type FT-ICR et Orbitrap.

### II.2.2.1. L'analyseur à temps de vol (TOF)

L'analyseur à temps de vol (de l'anglais *Time Of Flight*) a été élaboré par Stephens en 1946 [506]. Les ions de différents rapports *m/z* sont dispersés dans le temps au cours de leur vol dans un tube (pouvant aller jusqu'à 2 mètres) libre de champ électrique dans un vide poussé ($10^{-7}$ mbar) afin de maximiser le libre parcours moyen des ions (vol sans collision). Pour cela, les ions sont accélérés vers le tube de vol par une différence de potentiel appliquée entre une électrode et la grille d'extraction. Les ions accélérées ayant toute la même énergie cinétique passent ensuite dans le tube de vol. Les vitesses acquises par les ions sont inversement proportionnelle à la racine carrée de leur rapport *m/z*. Ainsi, pour des ions de même énergie cinétique, les ions plus légers possèdent une grande vitesse et arrivent plus rapidement au détecteur que les ions plus lourds possédant une vitesse plus faible. Cet analyseur est

particulièrement adapté, du fait de son principe de fonctionnement, aux sources à impulsion (les ions ne sont pas produits en continu) comme le MALDI (voir II.1.2.1.1). A ses débuts, cette technique était limitée par une résolution insuffisante. En effet, pour fonctionner correctement, on considère que tous les ions générés par la source sont accélérés prennent le départ du tube de vol en même temps et au même endroit. Or, il existe une dispersion d'énergie cinétique et spatiale des ions à l'entrée de l'analyseur lié au temps de génération par un tir laser MALDI et à l'épaisseur du dépôt sur la plaque par exemple. Des modifications techniques ont donc été mises au point comme l'extraction retardée [507] couplée ou non à l'utilisation d'un miroir électrostatique appelé également réflectron [508]. Le principe de l'extraction retardée des ions consiste à homogénéiser les temps de départ des ions avant leur injection dans l'analyseur. Cette étape permet de limiter la dispersion temporelle et ainsi gagner en résolution. Elle s'effectue en deux temps : (i) une phase de relaxation cinétique des ions puis (ii) une réaccélération. Le réflectron est un miroir focalisant simultanément les ions de différentes énergies cinétiques. Ainsi, la refocalisation sur le plan énergétique est favorisée pour les ions de mêmes rapports *m/z* mais d'énergies cinétiques différentes. L'avantage de cet instrument est la vitesse de balayage (environ 40 Hz selon les instruments) et une résolution constante le long de la gamme de masse.

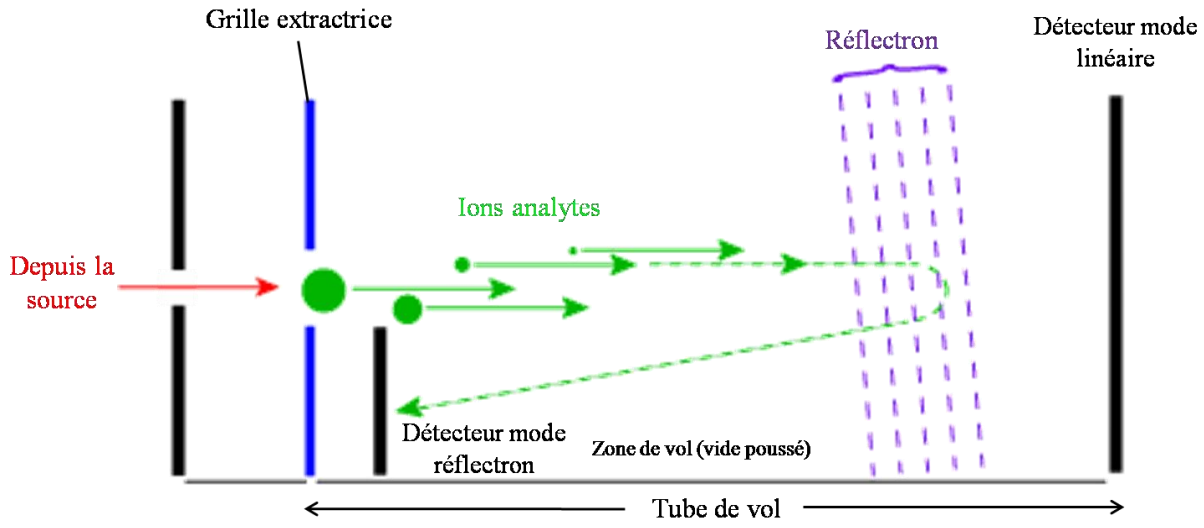



**Figure 133 : Schéma d'un spectromètre de masse à temps de vol (Adapté de la figure de l'Université de Bristol, Royaume Unis [509])**

### II.2.3. Les analyseurs à ultra haute résolution

Les spectromètres de masse à ultra haute résolution présentés dans cette partie ont la particularité d'être des instruments à transformée de Fourier. Le FT-ICR et l'Orbitrap™ sont

des analyseurs les plus résolutifs sur le marché à l'heure actuelle. Au-delà de leur prix très élevé (de 250 000 à 2 000 000 €) lié au coût du développement et aux technologies de dernière génération employées, ils fonctionnent sur un principe comparable. Le signal est acquis par l'intermédiaire d'un courant que les ions induisent sur les électrodes. C'est la fréquence d'oscillation des ions sur leur orbite et qui dépend de leur rapport *m/z* qui est mesurée d'où la nécessité d'une transformée de Fourier pour convertir les fréquences en rapport *m/z*. Ces analyseurs bénéficient aujourd'hui d'un fort pouvoir résolutif et d'une précision en masse permettant de faciliter les études structurales et d'accéder au massif isotopique et à la composition élémentaire des molécules.

#### II.2.3.1. Le FT-ICR

La spectrométrie de masse par FT-ICR [510] est une technique qui permet de déterminer le rapport *m/z* d'un composé par mesure de sa fréquence cyclotronique. Les ions produits sont soumis à un fort champ magnétique (de 7 à 15 teslas par exemple) dans une cellule ICR (de l'anglais *Ion Cyclotron Resonance*) et un vide poussé ($10^{-10}$ mBar). L'application de ce champ orienté parallèlement à la direction de déplacement des ions les entraîne à adopter un mouvement circulaire dans un puits de pseudo-potentiel. La fréquence résultante du mouvement de l'ion dépend du rapport *m/z* des ions et de l'intensité du champ magnétique. Le fonctionnement du FT-ICR repose sur un piégeage axial des ions au moyen de plaques de piégeage. Dès l'entrée des ions dans la cellule ICR, les ions sont proches du centre du fait de leur faible énergie cinétique. L'application de radiofréquences sur les plaques d'excitation permet d'élargir leur orbite et de les regrouper de façon homogène. L'élargissement de l'orbite dû à l'excitation rapproche les ions des plaques de détection qui enregistrent les courants induits par le paquet d'ions circulants suivant les rapports *m/z* des ions et de leur abondance. Le signal détecté est appelé « transient » et correspond à la superposition des différents courants induits (Figure 134). Les différentes fréquences sont extraites du transient grâce à l'utilisation d'une transformée de Fourier. Le spectre des fréquences résultant est ensuite converti en un spectre de rapports *m/z* à l'aide de la relation qui lie le rapport *m/z* et la fréquence (Équation 11). L'avantage de ce spectromètre de masse réside notamment dans ses excellentes performances de précision de masse (< 1 ppm). En effet, pour une molécule de masse 400 u (composée des atomes C, H, N et O), une précision de 1 ppm permet d'aboutir à une composition élémentaire unique tandis qu'une précision de 10 ppm (sur TOF par exemple) permet d'en générer plus d'une dizaine.

$$\omega = \frac{eB}{(m/z)}$$

$\omega$ : fréquence d'oscillation radiale
$e$ : charge élémentaire
$B$ : force du champ magnétique
$m/z$ : rapport masse sur charge

**Équation 11 : relation entre la fréquence d'oscillation radiale et le rapport m/z sur un FT-ICR**

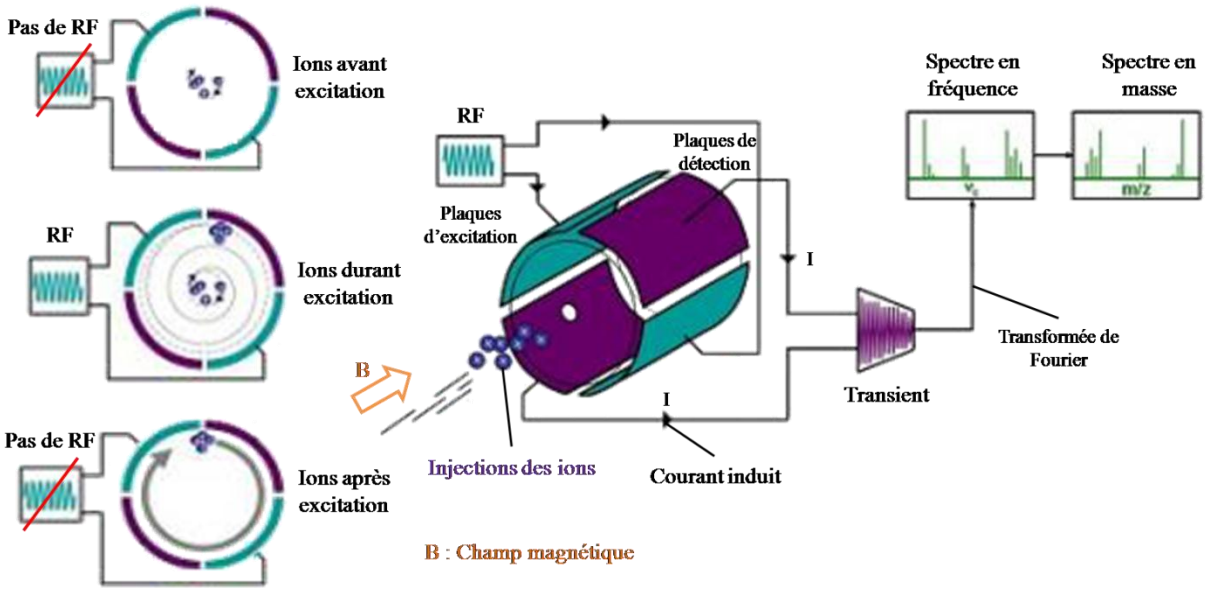



**Figure 134 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse de type FT-ICR (Adapté de l'image de Johnson Lab [511])**

Par ailleurs, la résolution de ce type de machine peut atteindre des valeurs supérieures à 1 000 000 (m/Δm, FWHM) ce qui permet l'analyse de mélanges très complexes comme le pétrole et ses dérivés dont le nombre de molécules de masse mono-isotopique est très important. A titre d'exemple, Marshall et coll. ont pu identifier plus de 10 000 espèces moléculaires distinctes dans un seul spectre de masse réalisé à partir d'huile de pétrole et ce grâce au pouvoir résolutif de cet instrument [512].

### II.2.3.2. L'Orbitrap™

Le spectromètre de masse à piège orbital a été introduit et développé par Makarov en 2000 [513] puis a été commercialisé sous le nom Orbitrap™ [514] en 2005 par ThermoFisher Scientific. C'est une alternative particulièrement intéressante au FT-ICR car ce spectromètre permet un accès à l'ultra-haute résolution sans avoir recours à un champ magnétique intense obtenu par un supraconducteur et n'utilise pas de radiofréquance. L'Orbitrap™ est constitué de deux électrodes : (i) une électrode centrale en forme de fuseau et (ii) une électrode

extérieure en forme de tonneau. Au sein de la cellule de l'Orbitrap™, un potentiel quadri-logarithmique est maintenu par la mise sous tension de l'électrode interne à haut voltage (3,5 kV) et un vide poussé est réalisé ($10^{-10}$ mbar). Les ions sont injectés tangentiellement aux lignes de champ c'est-à-dire à l'électrode centrale par un interstice très étroit (1 mm). Ils sont injectés à une énergie de quelques keV et adoptent, sous l'effet du champ électrique, de la force centrifuge et de la géométrie du piège, un mouvement oscillant qui peut être décomposé en deux composantes indépendantes : (i) un mouvement de rotation autour de l'électrode centrale et un mouvement d'oscillation axiale harmonique (comme un ressort) le long de l'axe *z*. C'est ce mouvement d'oscillation axiale qui est enregistré et qui dépend de la masse de l'ion analysé. Pour détecter cette fréquence, c'est le passage des ions à proximité de la paroi de l'électrode externe qui forme un courant induit (Figure 135). Ce courant est amplifié et mesuré au cours du temps pour former un transient. Il est ensuite déconvolué par une transformée de Fourier en un spectre de fréquence puis transformé à nouveau en rapport m/z grâce à la relation suivante (Équation 12).

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{(m/z)}}$$

ω : fréquence d'oscillation axiale
$k$ : paramètre de courbure du champ électronique
$m/z$ : rapport masse sur charge

**Équation 12 : relation entre la fréquence d'oscillation axiale et le rapport *m/z* sur un Orbitrap™**

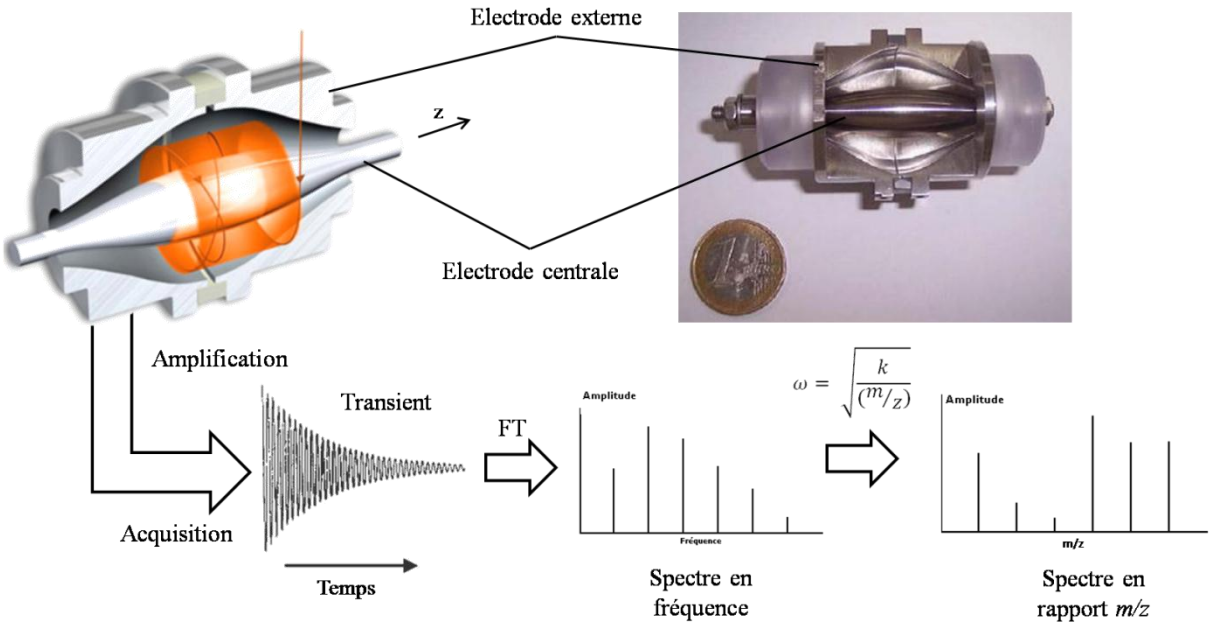



**Figure 135 : Schéma de principe du spectromètre de masse Orbitrap™ (Adapté d'une image de Planète Orbitrap [515])**

L'Orbitrap™ est en constante progression depuis sa mise sur le marché. Depuis 2005, un nouveau spectromètre de masse équipé de l'Orbitrap™ est sorti chaque année en améliorant la fréquence d'acquisition (le point faible de ces machines), la C-Trap, la résolution, l'encombrement (passage au Benchtop™ Exactive par exemple) et la polyvalence (appareil *Hybrid*). Aujourd'hui et en moins de 10 ans, la progression est spectaculaire puisque la société Thermo a lancé en 2014 un Tribrid™ nommé Fusion™ avec une résolution maximale de 450 000 (m/Δm, FWHM) a la masse 400 u avec une fréquence d'échantillonnage de 1,5 Hz. Par ailleurs, l'Orbitrap™ a été initialement couplée avec un piège ionique pour donner le LTQ-Orbitrap™, et maintenant l'appareil Tribrid™ comporte une cellule HCD, un piège 2D linéaire permettant de faire de la CID et un Orbitrap™. Les possibilités sont donc nombreuses pour réaliser des expériences de MS/MS et de $MS^n$ en utilisant l'une ou l'autre des types de fragmentation, et tout cela analysé à une résolution de 450 000 si besoin. Ainsi, la simplicité d'utilisation, les bonnes performances et la grande polyvalence des études (notamment structurales) ont permis à l'Orbitrap™ de s'imposer très rapidement sur le marché rencontrant un réel engouement dans tous les domaines de l'analyse chimique [389,516,517].

### II.2.4. Les performances des instruments

Les performances d'un spectromètre de masse sont évaluées selon 5 paramètres principaux :

- La vitesse d'acquisition (exprimée en Hz) ;
- La gamme des rapports *m/z* (exprimée en u) ;
- La gamme dynamique (exprimée en décade) ;
- La sensibilité (exprimée en concentration massique ou molaire) ;
- La résolution (sans unité) ;
- La précision sur la mesure des rapports *m/z* (exprimée en ppm).

#### II.2.4.1. La vitesse d'acquisition

La vitesse d'acquisition ou fréquence d'échantillonnage définit la vitesse à laquelle un analyseur effectue une acquisition c'est-à-dire l'enregistrement d'un spectre de masse. En fonction des technologies, la vitesse d'acquisition peut être inversement proportionnelle à la résolution. C'est le cas de la technologie Orbitrap™ et FT-ICR, ainsi, l'expérimentateur peut choisir d'augmenter sa vitesse d'acquisition d'un facteur 2 pour obtenir un pic chromatographique constitué de deux fois plus de points mais au détriment d'un facteur 2 sur

la résolution. Les spectromètres de masse TOF, piège 3D et 2D et TQ sont au contraire des systèmes qui bénéficient d'une grande vitesse d'acquisition. Ce paramètre est d'autant plus important dans le cadre d'un couplage avec un système chromatographique en amont car en fonction des technologies, les molécules peuvent sortir sur un temps très court (exemple de la GC, pic chromatographique de l'ordre de la seconde). Or, il est admis dans les règles de l'art qu'un pic chromatographique doit être décrit par au moins 6 à 8 points. Dans le cas d'un pic d'une seconde, le spectromètre de masse doit donc avoir une vitesse d'acquisition d'au moins 6 à 8 Hz soit 6 à 8 spectres par seconde.

#### II.2.4.2. La gamme des *m/z*

La gamme des rapports *m/z* ou injectement appelée gamme de masse (*Mass Range* en anglais) détermine les limites maximales et minimales des rapports m/z selon lesquelles la mesure des ions est possible. La masse des ions mesurables s'expriment, en Dalton (Da) ou en u (unité de masse atomique unifié, de l'anglais *unified atomic mass unit*).

#### II.2.4.3. La gamme dynamique

La gamme dynamique constitue l'étendue des concentrations relatives détectables. En d'autres termes, c'est la capacité du spectromètre de masse à détecter un ion très peu abondant par rapport à un autre beaucoup plus représenté. Elle est calculée à partir du rapport entre la plus grande et la plus petite concentration des composés présents dans la matrice analysée et détectées dans le même spectre de masse. Ce paramètre revêt une importance toute particulière dans l'analyse des polluants car un composé d'intérêt pourrait être masqué par une molécule abondante de la matrice mais ne représentant aucun intérêt pour l'analyse par exemple.

#### II.2.4.4. La sensibilité

La sensibilité du spectromètre de masse est la capacité de ce dernier à détecter une très faible quantité de molécule. Ce paramètre dépend essentiellement de la molécule à détecter, de la matrice dans laquelle elle est contenue mais aussi de la source d'ionisation et des paramètres de balayage (notamment d'accumulation dans les pièges). Par ailleurs, le principe physique même du spectromètre de masse peut avoir une influence. Ainsi, on considère que les appareils de type triple quadripôles sont les spectromètres de masse les plus sensibles. Ce sont, en effet, des spectromètres spatiaux et non temporels, c'est-à-dire que l'ion d'intérêt

parcours le spectromètre de bout en bout avant de frapper le détecteur. Il est donc guidé à travers le spectromètre durant toute l'analyse, il y a donc moins de perte de transmission et donc une sensibilité accrue.

#### II.2.4.5. La résolution

La résolution est la capacité d'un instrument de mesure à distinguer deux signaux voisins. La résolution n'a pas d'unité mais correspond à la largeur à mi-hauteur du pic de masse (FWHM : *Full Width at Half Maximum*) et à une masse donnée (en fonction des instruments, la résolution peut être constante sur la gamme de masse ou non). Ainsi, plus la résolution est élevée, plus les pics sont fins et plus l'écart entre deux signaux distincts est important. A titre d'exemple, la Figure 136 montre l'augmentation de la finesse des pics en fonction de la résolution. Dans cet exemple, 3 molécules de même masse mono-isotopique ont été injectés : l'acide aconitique (*m/z* 173,00916), l'acide shikimique (*m/z* 173,04555) et l'acide suberique (*m/z* 173,08193). On constate donc qu'à une résolution de 400 (FWHM à *m/z* 200, typiquement la résolution des TQ), les trois ions sont confondus sous un seul et même pic. En revanche, dès que la résolution passe à 7500 (FWHM à *m/z* 200), les trois ions sons distincts puis en augmentant la résolution, les pics s'affinent et la vallée entre chaque pic est de plus en plus importante.

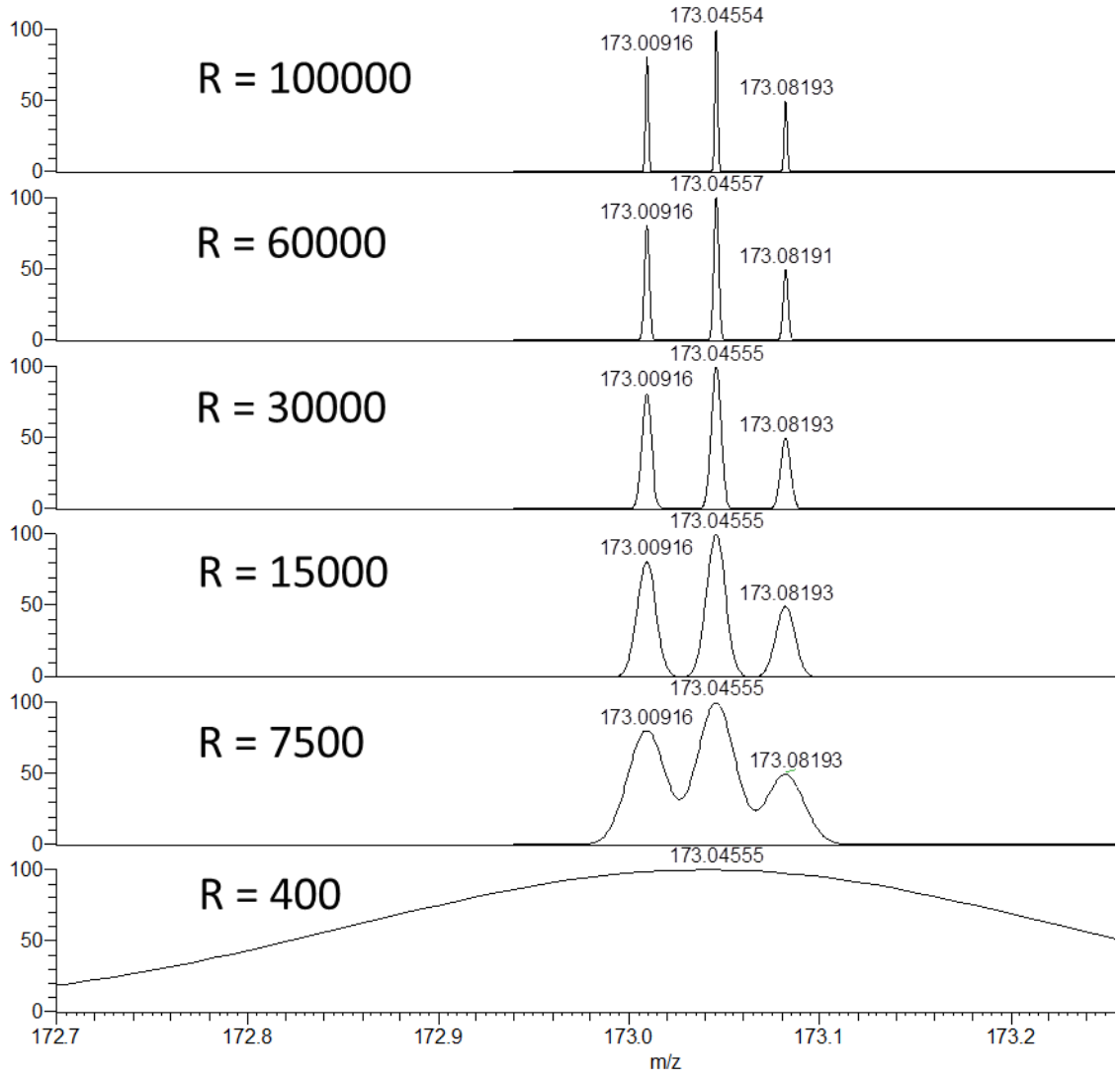



**Figure 136 : Exemple d'affinement des pics *m/z* en fonction de la résolution (données G. Madalinski, LEMM, 2008)**

La valeur de résolution s'obtient avec la relation suivante (Équation 13). Sur les spectromètres de masse bénéficiant de la technologie Orbitrap™, la résolution est inversement proportionnelle à la fréquence d'acquisition. En d'autres termes, plus les ions passent de temps dans la cellule Orbitrap™, plus la résolution et la précision en masse sont élevés. A la résolution maximum de 140 000 (FWHM à *m/z* 200) sur le Q-Exactive™, le temps de transient est de 512 ms soit après transformée de Fourier, l'acquisition de 1,5 balayages par seconde.

$$R = {}^{m}/_{\Delta m}$$ **Équation 13 : calcul de la résolution**

### II.2.4.6. La précision de mesure des rapports *m/z*

La précision de mesure des rapports *m/z* d'un spectromètre de masse est sa capacité à détecter un ion en mesurant sa masse vraie. Pour mesurer l'écart de précision en masse, la différence entre la masse expérimentale d'un ion ($m_{exp}$) et sa masse théorique ($m_{th}$) peut être calculée (Équation 14). La masse théorique est obtenue par addition des masses atomiques de chaque atome multiplié par le nombre de chaque atome dans la molécule. Pour les appareils de haute résolution, l'erreur de masse Δδ est exprimée en ppm (partie par million). Cette valeur dépend fortement des performances du spectromètre de masse ainsi que du type d'étalonnage réalisé (interne *vs* externe). Un étalonnage interne offre généralement une meilleure précision de masse car l'étalonnage est réalisé en temps réel tandis que l'étalonnage externe est réalisé périodiquement. Il est important de noter également la capacité du spectromètre à rester étalonné dans le temps. Les spectromètres de masse TOF souffrent d'une dérive de l'étalonnage constant car le tube de vol peut se dilater au grès des saisons et des températures. Or quelques dixièmes de millimètres suffisent à fausser la mesure de masse car le tube s'allonge ou se raccourcie. Ils sont donc généralement étalonnés en temps réel ce qui nécessite une solution infusée en continue. En revanche, le spectromètre de type Orbitrap™ peut être étalonné toute les deux semaines sans dérive de l'étalonnage au-delà de 10 ppm.

$$\Delta\delta = \frac{[m_{exp} - m_{th}]}{m_{th}} \times 10^6$$

**Équation 14 : calcul d'une précision sur la mesure des rapports *m/z***

## II.3. Les différents modes d'acquisition

Il existe deux principaux modes d'acquisition : le mode de spectrométrie de masse simple (MS) et le mode de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ou à fragmentation consécutives ($MS^n$).

- Pour le mode MS, les spectres peuvent être acquis en mode de balayage (scan) ou en mode de détection d'ions sélectionnés (mode SIM, de l'anglais *Selected Ion Monitoring*) selon les besoins de l'analyste. Ainsi, en mode de balayage, les spectres de masse sont acquis sur une gamme de masse entre deux *m/z* extrêmes et sont accumulés par répétition. Le mode SIM se concentre quant à lui sur un ion en

particuliers afin d'obtenir un maximum de sensibilité. Il est a noté que le mode SIM ne peut être obtenu qu'avec des spectromètres contenant un filtre quadripolaire.

- Les modes d'acquisition MS/MS et $MS^n$ impliquent une activation des ions produisant la fragmentation. On obtient ainsi un spectre contenant l'ensemble des fragments générés lors de l'activation. Il existe différents modes d'activation : la collision par gaz (CID : *Collision Induced Dissociation*), la technique SORI (*Sustained Off-Resonance Irradiation*) et les techniques basés sur l'activation par des électrons : ECD (*Electron Capture Dissociation*), EDD (*Electron Detachment Dissociation*) et ETD (*Electron Transfert Dissociation*). Ces techniques d'activation diffèrent dans la nature des fragments produits [518]. Mise à part la CID, les autres techniques d'activation sont utilisés sur les spectromètres de masse FT-ICR et Orbitrap™.

Le mode de fragmentation CID est certainement la méthode d'activation la plus répandue car elle équipe tous les spectromètres de masse de type tripe quadripôle. Il existe cependant deux types d'expériences de CID (résonante et non résonante). Le mode résonant intervient dans le piège 2D linéaire d'un LTQ-Orbitrap™ par exemple tandis, que le mode non résonant est utilisé dans le q2 (*RF-only*) d'un triple quadripôle ou dans la cellule HCD (de l'anglais *Higher-energy Collisional induced Dissociation*). Quel que soit le mode utilisé, le principe de la fragmentation CID repose sur des collisions entre l'ion précurseur et les molécules d'un gaz neutre cible. La fragmentation est induite grâce à la conversion d'une partie de l'énergie transrationnelle de l'ion en énergie interne lors de la collision [519].

Selon les types d'instrument, les énergies de collisions peuvent être de l'ordre du keV (collisions à haute énergie) ou comprises entre 1 et 200 eV (collisions à basse énergie). Les collisions à haute énergie ont l'avantage d'être très robustes vis-à-vis des variations des conditions expérimentales, conduisant à des spectres de fragmentation très reproductibles. Cependant, les appareils équipés de ces collisionneurs à haute énergies sont principalement des TOF-TOF équipés de sources d'ionisation ne pouvant être couplées aisément avec des systèmes séparatifs comme la chromatographie gazeuse ou liquide. Les spectromètres de masse utilisés avec un couplage chromatographique sont des instruments limités aux collisions de basses énergies peu reproductibles d'une expérience à l'autre et d'un instrument à l'autre ce qui empêche la constitution de base de données spectrales universelles. C'est aussi la raison pour laquelle chaque laboratoire constitue ses propres bases de données même si quelques initiatives tentent de normaliser les conditions

expérimentales entre laboratoire pour l'obtention de spectres de fragmentation comparables entre différents spectromètres de masse.

Pour ce qui est des analyseurs à faisceaux d'ions de type triple quadripôles ou Qq-TOF, différents modes de balayage en mode MS/MS sont possibles (Figure 137) :

- Le balayage d'ions fragments (appelé également ions-fils ou mode descendant) (schéma A) : un ion précurseur à étudier est sélectionné en focalisant le premier analyseur sur son rapport *m/z* puis il est ensuite collisionné dans la cellule de collision CID. Les produits de réactions sont ensuite analysés par le second analyseur. Le spectre de masse obtenu est composé de tous les fragments générés par l'ion choisi en plus du précuseur s'il n'est pas totalement fragmenté (ce qui n'apparait pas sur le schéma).
- Le balayage des ions précurseurs (appelé également ions-parents ou mode ascendant) (schéma B) : le balayage est effectué avec le premier analyseur sur l'ensemble des rapports *m/z* tandis que le deuxième analyseur se focalise sur un rapport *m/z* fixe. Ce mode de balayage permet de détecter les ions parents capables en se fragmentant de produire un ion fragment commun préalablement choisi par l'analyste.
- Le balayage de perte de neutre (schéma C) : Le balayage est simultanément effectué par les deux analyseurs sur le domaine de masse en maintenant constante une certaine différence de masse entre les ions filtrés par chacun d'entre eux. On peut donc rechercher les ions précurseurs qui fragmentent en perdant un même neutre particulier (balayage disponible uniquement sur les spectromètres de masse de type triple quadripôle).
- Le suivi d'une réaction sélectionnée (SRM de l'anglais *Selected Reaction Monitoring*) (schéma D) : ce mode de balayage consiste en la détection d'une réaction de décomposition d'un ion sélectionné et spécifique à la molécule étudiée. Pour cela, le premier analyseur permet la sélection d'un ion parent fixe décidé par l'analyste tandis que le deuxième analyseur ne détecte que l'ion fragment sélectionné. Ce mode permet l'obtention d'un gain de sensibilité et de sélectivité par rapport au mode SIM car on ne suit qu'une transition de masse. Il est très utilisé au même titre que le mode MRM (de l'anglais *Multiple Reaction Monitoring*), qui permet de détecter successivement plusieurs transitions de masse entre un ion précurseur et ses différents fragments (s'il en a plusieurs), permettant de gagner en spécificité car la molécule est identifiée d'un potentiel artefact à l'aide de plusieurs réactions de décomposition qui lui sont propres.

Ces différents configurations sont particulièrement adaptées à la mise en œuvre de dosages spécifiques, ainsi que dans les approches ciblées multi-résidus. Néanmoins, le développement de ces méthodes sont relativement longues car il est nécessaire pour chaque molécule de connaître les ions fragments et une optimisation est requise pour chaque composé afin de déterminer les énergies d'activation ainsi que les temps d'accumulation.

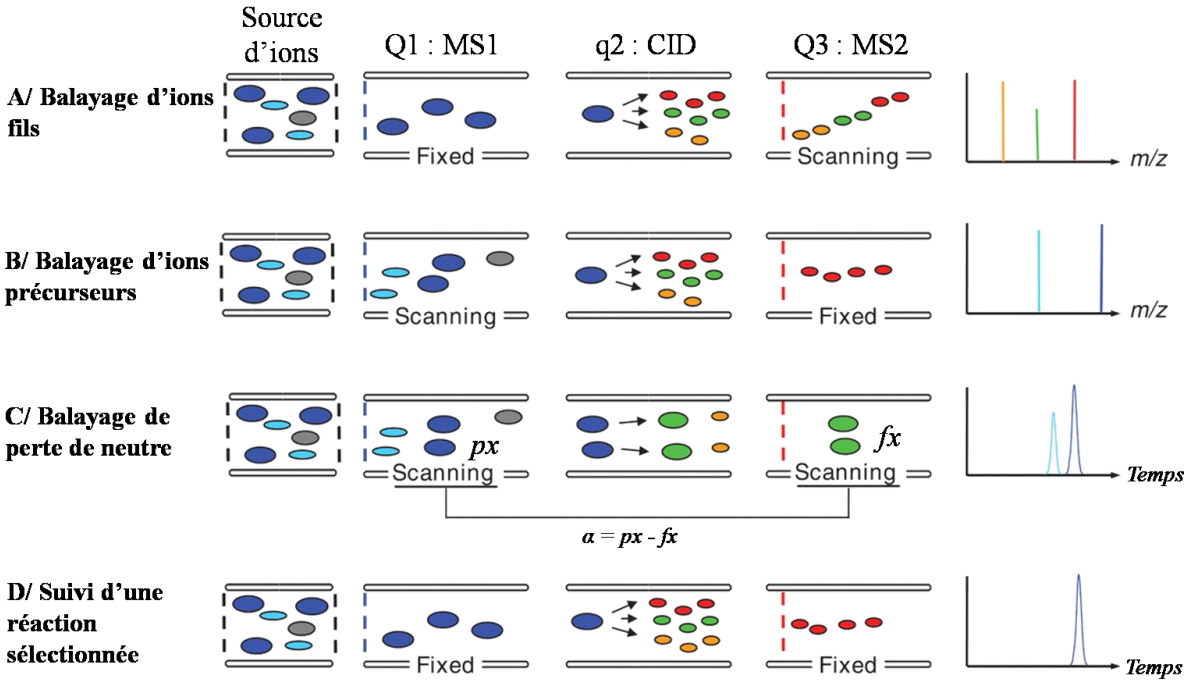



**Figure 137 : Présentation des différents modes de balayage en MS/MS sur des spectromètres de masse spatiaux (adapté de Domon et coll. [520])**

# III. ANNEXE 3 : RAPPELS THEORIQUES SUR LA CHROMATOGRAPHIE

## III.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Un appareil de CPG comprend schématiquement 3 modules (Figure 138) : (i) un injecteur, (ii) une colonne contenue dans une enceinte thermostatée (four) et (iii) un détecteur. Le mélange à analyser est injecté sous forme d'un fluide et est vaporisé dans l'injecteur. Le gaz vecteur l'entraîne dans la colonne de séparation thermostatée. Les composés se répartissent différemment dans les 2 phases, se déplacent donc à des vitesses différentes puis sortent à des temps différents. A leur sortie, ils sont détectés et un pic apparaît sur l'enregistreur.

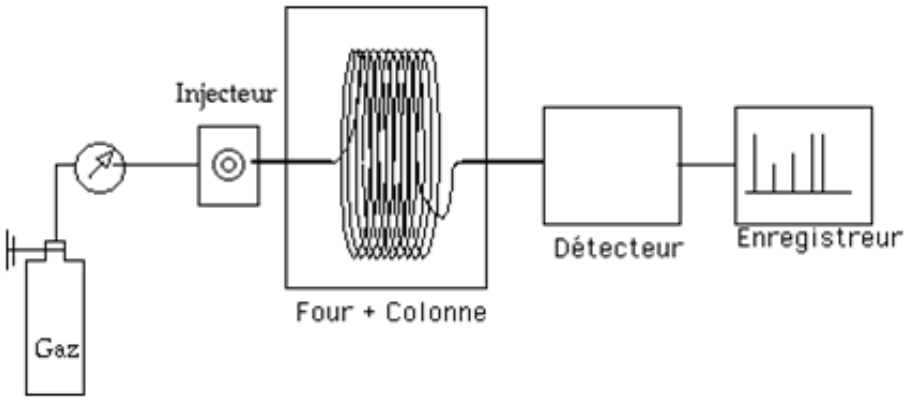



**Figure 138 : Schéma d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse [521]**

L'injecteur permet l'introduction de l'échantillon, son évaporation et son entraînement par le gaz vecteur vers la colonne. L'injection est réalisée automatiquement à l'aide d'une seringue à faible volume pour une meilleure reproductibilité des résultats. Il existe plusieurs types d'injecteur : à fuite (split/splitless) ou par injection à « froid » directement dans la colonne. Les colonnes utilisées sont de deux types : (i) elles peuvent être remplies d'un support poreux et inerte, sous forme de grains sphériques, sur lequel est greffé la phase stationnaire et d'une longueur de 1 à 3 mètres en acier ou en verre, ou (ii) capillaires dans lequel la phase stationnaire est déposée sur la paroi interne de la colonne sur une épaisseur de 0,05 à 5 µm et d'une longueur beaucoup plus importante de 10 à 100 mètres (car pas de perte de charge) et constituées de silice fondue. Le premier type de colonnes est moins utilisé car beaucoup moins résolutif. On distingue trois types de colonne capillaires : WCOT (de l'anglais *Wall Coated Open Tubular*) pour lequel la phase stationnaire forme une pellicule liquide à l'intérieur du tube, PLOT (de l'anglais *Porous Layer Open Tubular*) où la phase stationnaire

forme une couche d'absorbant solide et SCOT (de l'anglais *Support Coated opon Tubular column*) où la phase stationnaire est un liquide imprégné sur un support solide.

Les phases stationnaires sont de deux types :

- Les plus répandues sont les polymères siliconés dérivés du diméthyl polysiloxane (Figure 139). Suivant le pourcentage de groupement **R** par rapport aux groupes $CH_3$, la polarité, et donc de la colonne donc ses propriétés chromatographiques sont modifiées. Si **R** correspond à $CH_3$, la colonne est très apolaire et permet de séparer les produits selon leur point d'ébullition, tandis que si **R** correspond au groupement phényle à hauteur de 5 % par rapport aux groupements $CH_3$, une rétention mixte s'opère.

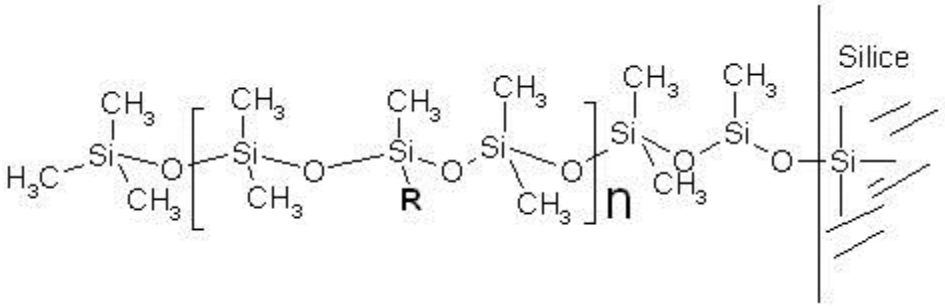


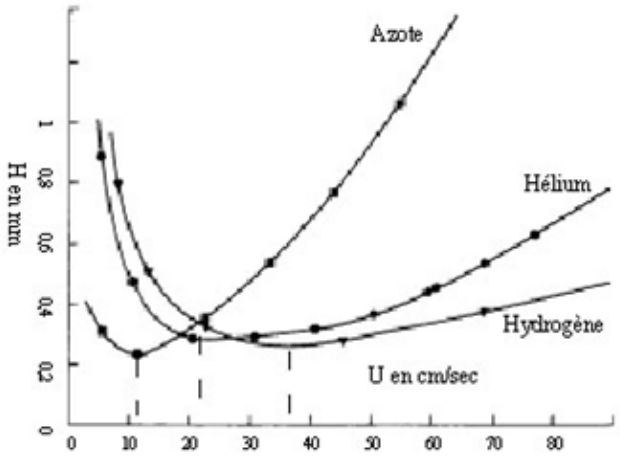

**Figure 139 : Phase stationnaire dérivée du diméthyl polysiloxane [522]**

- D'autres types de phases sont beaucoup plus polaires et à base de polyéthylène glycol (Figure 140).

$$HO\text{-}(\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_n\text{-}O\text{-}(Support)$$

**Figure 140 : Phase stationnaire à base de polyéthylène glycol**

La phase mobile constitue le gaz vecteur. Il s'agit d'un gaz de faible viscosité, inerte, et pur tel que l'hélium, le diazote ou le dihydrogène. La nature du gaz est très importante car elle conditionne l'efficacité de l'analyse. La courbe de Van Deemter (Figure 141) représente la vitesse du gaz vecteur en fonction de la hauteur H qui correspond à la hauteur d'un plateau théorique. Plus celui-ci est faible, plus la colonne contient de plateaux théoriques et plus l'analyse est résolutive. On remarque que le dihydrogène est le meilleur gaz vecteur car il permet, à efficacité constante, de faire migrer les analytes trois fois plus vite que l'azote et 1,5 fois plus vite que l'hélium. Cependant, le dihydrogène est un gaz explosif et donc dangereux lors des manipulations en laboratoire. On lui préfère donc l'hélium.




H correspond à la hauteur équivalente à un plateau théorique, ainsi, plus cette valeur est faible, plus la colonne compte de plateaux théoriques. U correspond à la vitesse linéaire de déplacement de la phase mobile dans la colonne.

**Figure 141 : Courbe de Van Deemter [523]**

## III.2. **La chromatographie en phase liquide**

Un système de chromatographie liquide comprend 4 modules : (i) une réserve de solvant, (ii) un injecteur, (iii) une colonne remplie de phase stationnaire et (iv) un détecteur (Figure 142). Lorsque le mélange de composés à analyser est injecté, la phase mobile entraîne le mélange dans la colonne puis commence à faire migrer les constituants du mélange. La séparation est fondée sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles, l'une stationnaire et l'autre mobile qui permet d'entraîner les analytes. Ces derniers migrent avec des vitesses différentes et sont élués jusqu'au détecteur à des temps différents formant des pics chromatographiques enregistrés sur un ordinateur.

Pour un composé A, l'équilibre est décrit par l'Équation 15.

$$A_{mobile} \leftrightarrow A_{stationnaire}$$ **Équation 15 : Equilibre du composé A en LC**

La constante d'équilibre de cette réaction est appelée coefficient de distribution (ou coefficient de partage) et se définit par l'Équation 16.

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$ **Équation 16 : Coefficient de partage**

où $C_S$ et $C_M$ désignent respectivement les concentrations du soluté à l'équilibre dans les phases stationnaire et liquide.

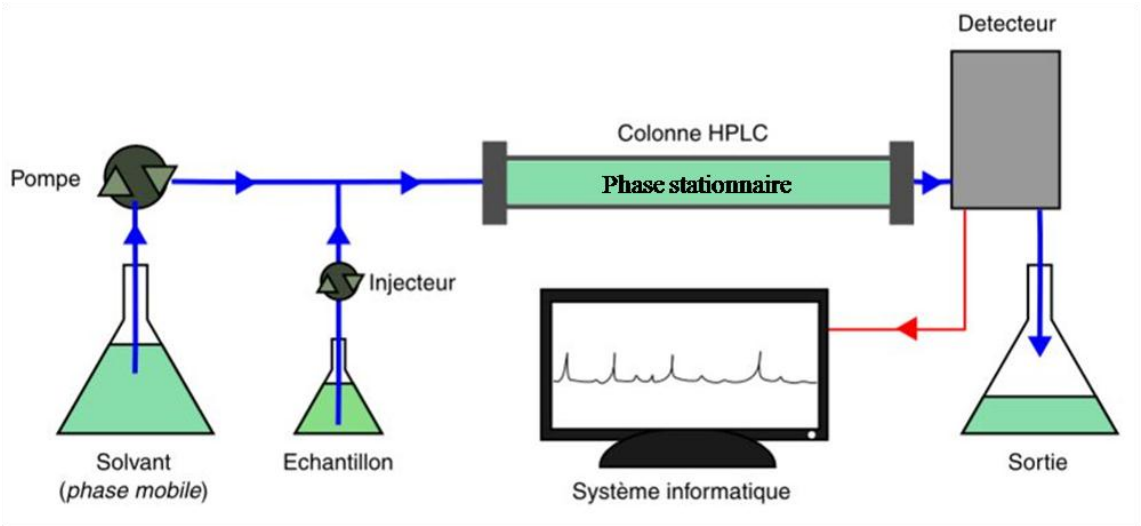



**Figure 142 : Schéma simplifié d'un système de chromatographie liquide [524]**

# IV. ANNEXE 4 : LES TECHNIQUES DE PREPARATION D'ECHANTILLON

## IV.1. Les préparations d'échantillon en phase liquide

### IV.1.1. L'extraction par solvant (LLE de l'anglais *Liquid-Liquid Extraction*)

L'extraction liquide-liquide consiste à séparer les composés polluants d'intérêts de leur phase initiale pour les transférer dans un autre liquide en utilisant leur plus grande affinité pour le solvant d'extraction. Le choix du solvant d'extraction est réalisé selon plusieurs critères. Il doit avoir : (i) une grande capacité d'extraction des molécules d'intérêts, (ii) une bonne sélectivité vis-à-vis de ces molécules afin d'éviter le passage des composés indésirables pour l'analyse, (iii) des caractéristiques physiques permettant un temps de séparation des phases acceptables (masse volumique, viscosité par exemple) et (iv) un impact minimal pour la sécurité de l'opérateur et du matériel. Généralement, la matrice à extraire est aqueuse. On utilise dans ce cas un solvant organique apolaire comme le n-hexane, l'acétate d'éthyle ou le dichlorométhane. Ces techniques ont été employées pour l'extraction de pesticides dans les cheveux [525] ou les eaux usées [319].

### IV.1.2. L'extraction sur phase solide (SPE de l'anglais *Solid Phase Extraction*)

L'extraction sur phase solide est un procédé de séparation et/ou de concentration au cours duquel les composés d'intérêts en solution sont séparés des autres éléments du mélange par adsorption sélective sur une phase solide stationnaire en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Selon les cas, ce sont, soit les impuretés qui sont retenues par la phase stationnaire ce qui purifie l'analyte d'intérêt dans la phase liquide, ou l'analyte qui est retenu sur la phase stationnaire et les interférents sont éliminés avec la phase liquide. Dans ce dernier cas, l'analyte doit ensuite être élué de la phase stationnaire avec un solvant. Une analyse SPE se déroule classiquement selon plusieurs étapes (Figure 143) : (i) conditionnement de la phase adsorbante, (ii) percolation de l'échantillon, (iii) rinçage pour tenter d'éliminer les éventuels interférents et (iv) élution et récupération des analytes d'intérêt. Pour faciliter et augmenter la rapidité du passage du solvant réalisé par simple gravité, une pression positive ou négative peut être exercée en veillant à respecter un débit minimum pour que les échanges chimiques soient efficaces.

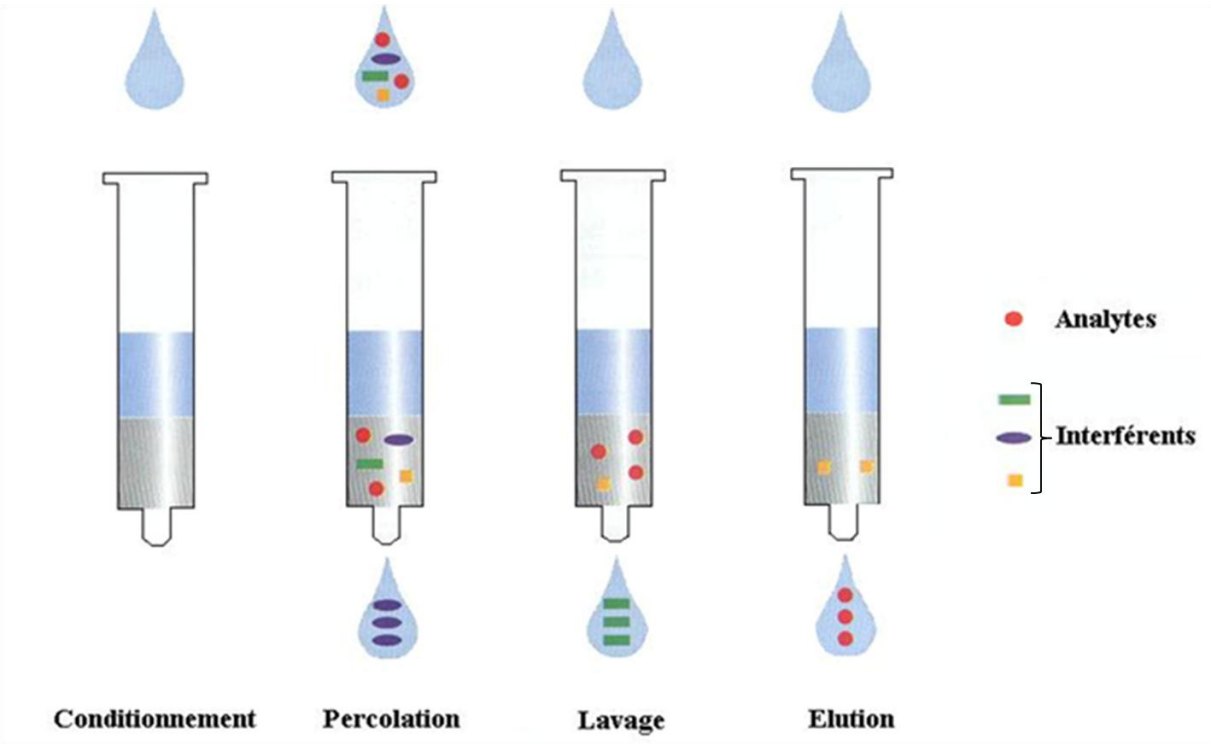



**Figure 143 : Différentes étapes d'une extraction sur phase solide (Illustration tirée du site internet du lsabm [526])**

Une séparation SPE réussie dépend surtout du choix approprié de la phase solide adsorbante ainsi que des solvants d'élution. Le solvant est choisi pour permettre une élution la plus sélective possible du composé d'intérêt. Une série de solvants ou de mélanges de solvants à pouvoirs éluants croissants peut être utilisée pour éluer de manière sélective les composés selon une séquence appropriée. Le pouvoir éluant est relatif et dépend de la nature du sorbant utilisé. On distingue 4 grands types de phases :

- Les silices greffées : il s'agit du même type de greffon que les colonnes analytiques sur des particules de silice de 12 à 40 µm. Il existe plusieurs types de rétention : (i) en phase inverse à l'aide d'une fonctionnalisation de la silice avec des chaînes aliphatiques ($C_{18}$ par exemple) ou (ii) en phase normale avec des groupements polaires de type cyano, amine ou diol. Dans le cas d'une phase inverse, la rétention d'analytes organiques depuis une solution polaire est principalement due aux forces de Van der Waals tandis qu'en phase normale, les interactions sont liées à des liaisons hydrogènes, des interactions π-π, dipôle-dipôle et dipôle-induit. La phase inverse est donc utilisée pour la rétention de polluants apolaires dans une matrice polaire comme la détection de produits pharmaceutiques, de pesticides ou de perturbateurs endocriniens tels que les bisphénols et alkylphénols dans l'eau [527,528]. La phase normale peut être utilisée pour la purification d'extrait organique en vue d'une analyse

GC par exemple. Schenck et coll. avaient pour objectif l'analyse de résidus de pesticides organochlorés et organophosphorés dans les œufs par GC. Ils ont d'abord extrait le contenu des œufs à l'acétonitrile avant de réaliser une procédure de nettoyage des interférents modérément polaires à l'aide d'une SPE [529].

- Les copolymères : ces cartouches résultent de la copolymérisation de 2 monomères notamment de styrène et de divinylbenzène donnant des particules sphériques. Les interactions mises en jeu sont de types hydrophobes, elles sont donc particulièrement adaptées à la rétention de composés apolaires. L'avantage d'un support polymère est sa résistante aux pH extrêmes (1-12) ce qui le rend particulièrement approprié pour des applications environnementales comme l'analyse de composés organiques dans des échantillons aqueux acidifiés. D'autres développements dans ce sens ont été réalisés et aujourd'hui, l'une des cartouches les plus employée est le modèle HLB (de l'anglais *Hydrophilic-Liprophilic Balance*) composé d'un copolymère de divinylbenzène et de N-vinylpyrrolidone (Figure 144). Comme son nom l'indique, cette cartouche d'extraction sur phase solide permet la rétention de composés apolaires à moyennement polaire grâce à deux sites de rétention spécifique. Elle est utilisée aussi bien pour le piégeage des pesticides [530,531] que des médicaments et des produits d'hygiène personnelle [532-534].

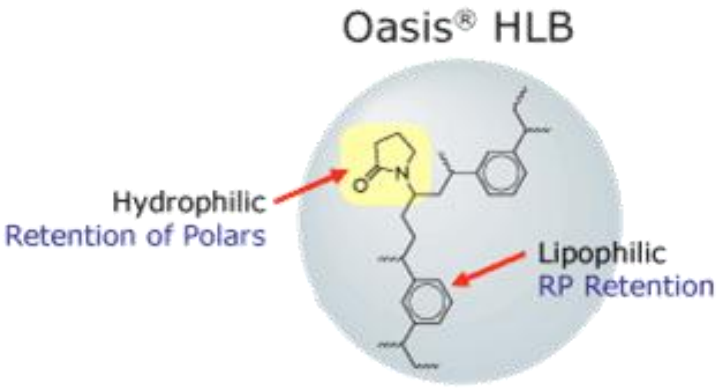



**Figure 144 : Représentation du copolymère HLB (Adaptée de la plaquette commerciale Waters HLB [535])**

- Les échangeurs d'ions : ces cartouches permettent la rétention de composés ionisés lorsqu'ils sont en solution au pH de travail. Il existe deux types de phases échangeuses d'ions : (i) faible lorsque la fonction attaché à la phase stationnaire peut, en fonction du pH, se neutraliser et (ii) forte lorsque cette fonction est ionique dans une gamme de

pH de travail conventionnelle car le pKa de la fonction est inférieur à 1 ou supérieur à 18 (respectivement pour la négative et positive). Les composés anioniques (chargés négativement) sont isolés sur des cartouches fonctionnalisées SAX ou WAX (de l'anglais *Strong Anion eXchange* et *Weak Anion eXchange*) et les composés cationiques (chargés positivement) sont isolés sur des cartouches fonctionnalisées SCX ou WCX (de l'anglais *Strong Cation eXchange* et *Weak Cation eXchange*). Le mécanisme primaire de rétention des composés est basé sur l'attraction électrostatique entre le(s) groupe(s) fonctionnel(s) chargé(s) sur le composé et le groupe chargé sur la cartouche. Ces fonctions échangeuses d'ions sont greffées sur de la silice ou intégrées dans une résine de copolymère avec du divinylbenzène et offrent une rétention mixte (apolaire + échangeuse de cation ou d'anion en fonction des besoins). Ces cartouches sont très utilisées pour l'analyse des composés présentant des amines primaires et des acides qui peuvent très facilement s'ioniser en phase liquide en fonction du pH. C'est le cas de certains médicaments [536] comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'acide salicylique, le diclofénac, le fenoprofen ou le naproxene [537], certains produits illicites [538] ou certaines quinolones comme l'ofloxacine, la norfloxacine ou la ciprofloxacine [539].

- Le carbone graphique poreux (PGC de l'anglais *Porous Graphitic Carbon*) : Le PGC est exclusivement composé de feuillets plans d'atomes de carbone (Figure 145) hybridés $sp^2$ disposés selon un motif hexagonal [540]. La valence de ces atomes étant complètement satisfaite, la surface du PGC est dépourvue de groupement fonctionnel et est comparable à une grande molécule polycyclique aromatique [541]. De par sa structure, le PGC présente une grande stabilité physique et chimique qui permet l'utilisation de phases mobiles ayant des pH de 0 à 14 ainsi que le travail à hautes pressions (supérieures à 400 bars) et à hautes températures (supérieures à 300 °C). Le PGC peut être utilisé dans des conditions que ne supportent pas les supports chromatographiques plus traditionnels à base de silice ou de polymères.

Le PGC a été initialement décrit comme un support très adsorbant et très hydrophobe pour la RPLC (de l'anglais *Reverse Phase Liquid Chromatography*) [540]. Mais ses propriétés de rétention et de sélectivité sont très différentes des supports conventionnels. Ce type de cartouche d'extraction est utilisé aussi bien pour l'analyse de pesticides [336,542] ou les explosifs nitroaromatiques [543].

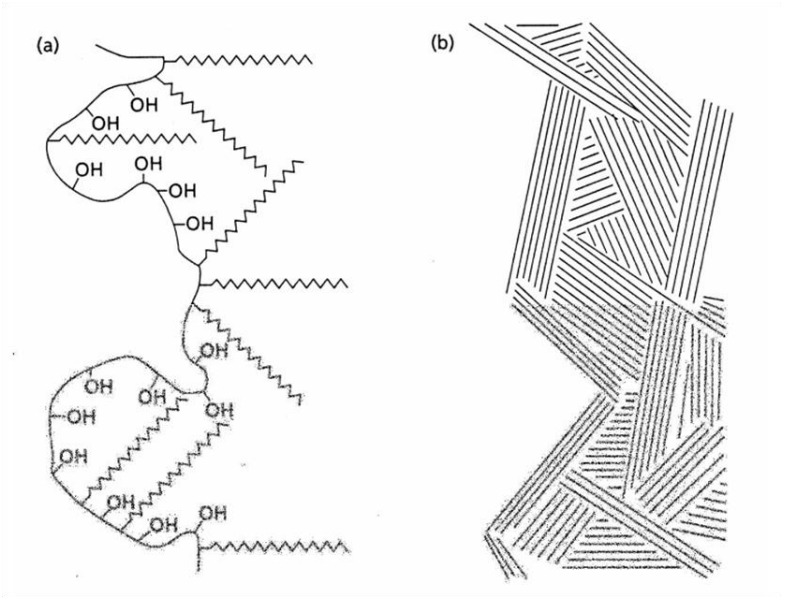



**Figure 145 : Schéma présentant la différence des surfaces d'une silice greffée (a) et du PGC (b) [540]**

En conclusion, l'extraction sur phase solide est une technique bien établie pour les étapes de concentration et de nettoyage lors de l'analyse des composés organiques dans des échantillons environnementaux. Cette méthode est très largement utilisée avant un couplage avec la chromatographie pour l'analyse de composés réglementés comme les pesticides, les perturbateurs endocriniens, les résidus de médicaments, les produits d'hygiène personnel etc. Une équipe de recherche Suisse a même développé ses propres cartouches d'extraction en réalisant des couches successives de phases absorbantes afin de piéger le maximum de composés de natures chimiques très différentes en une seule extraction [467]. Cette technique est notamment utilisée pour la préparation d'échantillons d'eau.

D'un point de vue méthodologique, il existe deux approches :

- Une approche hors ligne : l'extraction est réalisée sur un adsorbant contenu dans une cartouche. Le contenant est en polyéthylène, polypropylène ou en verre selon l'affinité des composés pour le support. L'adsorbant est incorporé dans les fibres inertes d'un disque d'extraction à membrane. Les différentes étapes de la procédure SPE sont réalisées de manière séquentielle sur un nombre élevé de cartouche utilisées simultanément sur des unités d'extraction à pression positive ou négative. La procédure peut être complètement automatisée ce qui a contribué au développement de la technique SPE. Il s'agit d'une technique facile à mettre en œuvre et flexible, avec un grand nombre de phases stationnaires disponibles. Néanmoins, cette méthode est relativement fastidieuse à cause du grand nombre d'étapes et peut être très longue à mettre en œuvre quand il s'agit de concentrer un grand volume d'eau (> 200 mL).

Lorsqu'elle est réalisée manuellement, il est difficile de gérer toutes les cartouches du banc d'extraction à la fois et les erreurs et imprécisions peuvent conduire facilement à des résultats erronés.

- Un couplage en ligne de la SPE et de la chromatographie liquide ou en phase gazeuse. Le couplage avec la LC est facile à mettre en œuvre. Dans ce système, l'adsorbant est contenu dans un tube en inox (comme la colonne chromatographique) sur 2 à 5 cm de longueur. Cette précolonne est insérée dans la boucle d'un système de vannes connecté à une pompe de chargement qui lui est propre tandis que la pompe d'élution conditionne la colonne chromatographique. Les systèmes sont, au départ, indépendants. La précolonne est tout d'abord conditionnée puis l'échantillon est injecté afin que les analytes soient piégés sur cette précolonne. Pour la désorption, les composés piégés sont élués directement de la précolonne vers la colonne analytique (en « flush » ou en « back-flush » selon les méthodes) à l'aide du gradient analytique ce qui induit un décrochage des analytes et une élution de manière séquentielle. Les résultats sont ainsi plus répétables car il n'y a pas de manipulations d'échantillon durant les différentes étapes de la SPE jusqu'à la chromatographie. Par ailleurs, les volumes d'échantillons nécessaires sont plus faibles que les procédures hors ligne car tous les composés piégés durant la phase de chargement de l'échantillon sont transférés et analysés. Cette technique a été très utilisée pour la détection de pesticides dans l'eau [467,544-546].

### IV.1.3. La microextraction sur phase solide (SPME de l'anglais *Solid Phase MicroExtraction*)

La microextraction sur phase solide permet de réaliser une extraction et une concentration de composés qui se trouvent à l'état de traces dans un liquide ou un gaz. La SPME extrait les analytes par adsorption sur une fibre de silice fondue enrobée d'un matériau polymère mélangé parfois avec un adsorbant solide, le tout dans un support qui ressemble à une seringue (Figure 146). Cette fibre peut être utilisée de deux façons :

- Par immersion : la fibre trempe directement dans la matrice aqueuse. Il s'établit un équilibre thermodynamique entre la quantité d'analytes adsorbés sur la fibre et la quantité présente dans l'échantillon. Une agitation du liquide peut s'avérer nécessaire afin d'atteindre plus rapidement l'équilibre de l'adsorption.

- L'extraction par espace de tête (« *headspace* ») : ce mode est utilisé pour protéger la fibre des interférences de molécules organiques. La fibre adsorbe les composés plus ou moins hydrophobes et l'emploi d'un solvant organique risque de saturer la fibre et d'empêcher les composés à analyser de s'adsorber correctement. Pour cela, la fibre est introduite uniquement dans la partie gazeuse au-dessus de la phase liquide. L'échantillon peut être chauffé afin d'accélérer les équilibres entre les trois phases (liquide-vapeur-fibre).

Les composés adsorbés sur la fibre sont ensuite désorbés par chauffage. Classiquement, cette méthode d'extraction est couplée à la chromatographie en phase gazeuse. La fibre est désorbée directement dans l'injecteur chauffé de l'appareil. Pour un couplage avec la LC, il faut avant injection désorber la fibre dans un solvant organique pour lequel les composés ont une affinité plus forte que la fibre. L'extraction par SPME peut être sélective, en fonction de la nature de la fibre et de son diamètre. Les natures de phase sont le plus souvent à base de divinylbenzène, de PDMS (polydiméthylsiloxane) ou de polyacrylate.

Plusieurs paramètres peuvent être optimisés pour l'analyse SPME :

- Le temps de contact entre la fibre et l'échantillon. Il peut varier de quelques secondes à plusieurs heures selon la nature et la concentration des composés mais aussi de la sensibilité souhaitée. Cette durée correspond au temps au bout duquel l'équilibre entre la concentration de composés adsorbés et la concentration de composés présents dans l'échantillon est atteint.
- La température d'extraction : le fait de chauffer l'échantillon au cours de l'extraction permet d'atteindre l'équilibre plus rapidement.
- Le pH de l'échantillon : les composés doivent rester sous une forme indissociée pour être extrait facilement. Il est donc parfois nécessaire de modifier le pH pour obtenir la forme acide ou basique du composé. Certaines fibres comme les PDMS étant sensibles au pH, l'échantillon doit avoir un pH compris entre 4 et 10.
- La concentration en sels : la présence de sels dans l'échantillon augmente la force ionique et diminue la solubilité des composés organiques. Ils migrent plus facilement vers la fibre.
- Le temps de désorption thermique des composés.

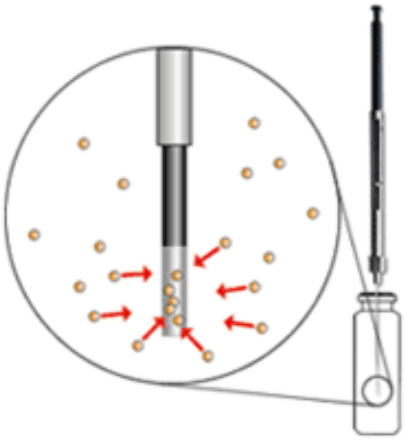


**Figure 146 : Schéma de principe de l'adsorption sur une fibre SPME (Illustration tirée du site internet schambeck [547])**

Cette technique a été employée pour la détection de pesticides dans l'eau [548,549], dans les sols [550] ou pour la détection de résidus médicamenteux dans l'eau [551]. Un dérivé de cette méthode a été adapté sur un barreau aimanté d'agitation dénommé la SBSE (de l'anglais *Stir Bar Sorptive Extraction*). La fibre est greffée directement sur le barreau aimanté qui est plongé dans la solution puis agité durant plusieurs minutes ou plusieurs heures pour adsorber tous les composés d'intérêts. Cette technique est notamment utilisée pour déterminer et quantifier les molécules responsables de « l'odeur » de l'eau [552,553].

## IV.2. **Les préparations d'échantillon en phase solide**

### IV.2.1. L'extraction liquide-solide (LSE, de l'anglais *Liquid-Solid Extraction*)

L'extraction liquide-solide part du même principe que l'extraction liquide-liquide. Un solide est mis en contact avec un solvant afin d'initier un partage de matière entre les deux phases. Il est très important de choisir le bon solvant ou mélange de solvants. Plusieurs méthodes peuvent être mises en œuvre, la technique la plus simple consistant à mélanger ou agiter par ultrason l'échantillon solide avec un solvant organique. En plus de la polarité du solvant, l'efficacité de l'extraction dépend de l'homogénéité de l'échantillon et du temps total de mise en contact avec agitation ou sonication. Des applications de ces techniques ont déjà été réalisées sur des sols et des plantes pour la détection de produits pharmaceutiques et de fongicides [554,555]. L'extraction par Soxhlet est communément utilisée pour extraire des traces de composés organiques non polaires. Dans ce type de système, le solvant (entre 100 et 200 mL) est chauffé puis condensé et se dépose dans la chambre dans lequel est contenu

l'échantillon solide (entre 20 et 200 g). Le solvant va extraire les composés puis retomber dans le ballon de solvant déplaçant ainsi l'équilibre vers la libération des composés à partir du solide. Afin de rendre plus efficace cette extraction, il est conseillé d'humidifier le solide pour que le solvant pénétre à l'intérieur des pores du solide et solvate les composés d'intérêt, ce qui est plus difficile si le solide est parfaitement sec. Cette méthode a été utilisée pour la détection de composés nitrés ou phénoliques dans le sol [556,557]. La mise en œuvre de ces méthodes est très longue et d'autres techniques ont émergé.

### IV.2.2. L'extraction assistée par micro-ondes (MAE de l'anglais *Microwave Assisted Extraction*)

L'extraction assistée par micro-onde consiste à mettre l'échantillon solide ainsi que le solvant dans une enceinte soumise à un champ électrique alternatif haute fréquence (2450 MHz). Les molécules polarisées vont s'exciter et générer des frictions entre elles provoquant un dégagement de chaleur intense. Le principe est d'apporter très sélectivement une grande quantité d'énergie provoquant la rupture des cavités ou des cellules végétales pour libérer les composés d'intérêts sans les dégrader. Comparativement à l'extraction par Soxhlet ou la source de chaleur vient de l'extérieur, les micro-ondes libèrent directement l'énergie à l'intérieur de la biomasse. L'utilisation d'un solvant non polarisé peut accentuer encore cet effet. Les avantages sont nombreux : (i) une extraction plus rapide, (ii) une réduction du ratio solvant/solide, (iii) une meilleure reproductibilité et (iv) une sélectivité de l'extraction accrue. Les paramètres doivent être bien maîtrisés comme la sélection du solvant, la durée et la puissance des micro-ondes. Les applications pour la détection de polluants environnementaux sont nombreux comme la détermination de triazines dans le sol [558], la détermination de parabènes et de perturbateurs endocriniens de type alkylphénol dans le sol [559] ou la détection de produits pharmaceutiques, des hormones ou des produits d'hygiène personnel dans le sol, les sédiments ou les boues [560].

### IV.2.3. L'extraction accélérée par solvant (ASE de l'anglais *Accelerated Solvent Extraction*)

L'extraction accélérée par solvant utilise l'effet combiné d'une température élevée et de la pression avec des solvants classiques pour augmenter l'efficacité du processus d'extraction. Il en résulte des temps d'extraction plus rapides et une réduction significative de l'utilisation de solvants. Pour cela, le solide est placé dans la chambre d'extraction. Celle-ci est remplie de

solvant (aqueux ou organique) puis mise sous pression et chauffée. Du solvant est pompé au travers de l'échantillon pour extraire les analytes qui sont récoltés dans un autre flacon. L'utilisation de solvants à haute température sous pression permet une meilleure solubilité des analytes, une diminution des interactions matrice-analyte, une meilleure diffusion des composés de la matrice vers le solvant et une réduction de la viscosité pour une meilleure pénétrabilité du solvant dans la matrice. Les extractions sont très rapides, de l'ordre d'une dizaine de minutes. Une extraction séquentielle est possible pour éluer les composés d'intérêts les uns après les autres ou pour éliminer les interférents éventuels. Cette technique a été utilisée pour la détection de produits pharmaceutiques dans des boues issues de station d'épuration [561], pour la détermination de la trifloxystrobine et de ses métabolites dans le sol Hawaïen [562] ou pour une détection multi-résidus d'organochlorés aromatiques [563].

### IV.2.4. L'extraction par fluide super critique (SFE de l'anglais *Supercritical Fluid Extraction*)

L'extraction par fluide supercritique est très proche de l'extraction accélérée par solvant à la différence que le solvant utilisé est amené à un état supercritique. C'est généralement le $CO_2$ qui est employé. Il est obtenu en élevant la température et la pression d'un fluide au-dessus de son point critique, à plus de 75 bars et 31 °C dans le cas du $CO_2$. Ce gaz présente de nombreuses propriétés qui en font un solvant de choix : (i) non toxique, (ii) chimiquement inerte (pas de problème d'oxydation par exemple), (iii) basse température critique, (iv) non inflammable et (v) pas de solvant résiduel à la fin du traitement (évacuation sous pression atmosphérique). L'avantage du fluide supercritique réside dans ses propriétés physico-chimiques qui se trouvent à la frontière entre l'état gazeux et l'état liquide en ayant les avantages des deux phases. Il possède une viscosité proche de celle d'un gaz, une densité proche de celle du liquide avec un pouvoir de diffusivité très élevé par rapport au fluide liquide, ce qui facilite leur pénétration dans des milieux poreux. L'absence de tension de surface augmente le pouvoir de pénétrabilité du fluide supercritique au sein de l'échantillon solide. D'un point de vue pratique, l'échantillon solide est placé dans une chambre qui est traversée par le fluide supercritique. Celui-ci va extraire les composés de l'échantillon solide. L'extrait est ensuite récolté dans un flacon indépendant après séparation du fluide supercritique qui est recyclé. Le $CO_2$ supercritique permet de solubiliser des composés apolaires et de faibles poids moléculaires. Ce procédé est très polyvalent car il permet l'extraction de pesticides de natures chimiques très variées : du diquat dont le logP est de -4,6 jusqu'à la cypermethrine dont le logP est de 6,6 [564]. Ce procédé est utilisé pour l'extraction

de pesticides dans les céréales [565,566], le sol [567], ou les fruits et les légumes [568,569]. La technique d'extraction par $CO_2$ supercritique présente un large spectre de potentialités au-delà de l'analyse de produits polluants. C'est par exemple la technique utilisée à ce jour pour extraire la caféine du café.

# V. ANNEXE 5 : PRINCIPE GENERAL DU FONCTIONNEMENT DU LOGICIEL XCMS

En raison du très grand nombre de données obtenues pour chaque échantillon, et du principe des expériences qui repose souvent sur la comparaison de plusieurs dizaines voir centaines d'échantillons, il est indispensable de disposer d'outils informatiques afin de traiter l'ensemble des données obtenues avec efficacité. Après acquisition, il convient de convertir les données en format propriétaire vers un format libre (mzXML, netCDF par exemple), ce qui permet de les traiter avec un logiciel indépendant.

Il existe une grande variété de logiciels en rapport avec le traitement des données acquises par LC-MS pour la métabolomique. Leur principe général consiste à identifier des variables définies par un rapport *m/z* et un temps de rétention, puis à leur associer l'aire sous la courbe du pic chromatographique qu'elles représentent dans chacun des échantillons où elles sont retrouvées. Nous avons choisi d'utiliser le logiciel libre XCMS [368] constitué d'un groupement de fonctions écrites en langage R. Le libre accès à son code source permet de connaître avec précision les étapes réalisées par les algorithmes. Ce logiciel se décompose en 4 parties distinctes :

## V.1. La détection des signaux

La première étape consiste à détecter les ions et chromatogrammes dans chacun des échantillons séparément. Pour cela, deux étapes sont nécessaires : (i) la résolution en masse qui consiste à détecter des chromatogrammes d'ions extraits (EIC de l'anglais *Extracted Ion Chromatogram*) et (ii) le placement des pics en temps de rétention sur chacun de ces chromatogrammes, qui a pour but de placer le sommet et les bornes du pic chromatographique afin de déterminer son aire. Enfin, des filtres de bruit basés sur le rapport signal sur bruit ou sur la ligne de base du chromatogramme sont utilisés pour éliminer les variables artéfactuelles.

### V.1.1. La résolution en masse

La première étape de la détection consiste à découper des tranches de masse aussi appelées EIC. La largeur de ces EIC est qualifiée de tolérance en masse et est basée sur l'amplitude des pics de masse afin de ne pas découper un pic en deux tranches de masse sur

un même spectre. De plus, cette tolérance en masse doit aussi prendre en compte de légers décalages de masse pouvant survenir entre deux spectres consécutifs pour la détection d'un même signal afin de s'assurer que l'ensemble d'un pic chromatographique soit situé dans la même tranche de masse. Cette étape permettra de raisonner sur un nombre fini d'EIC et non plus sur une infinité de valeurs de masse pour le placement des pics chromatographiques. Deux approches sont disponibles dans XCMS et correspondent à deux algorithmes nommés MatchedFilter et centWave.

#### V.1.1.1. L'approche MatchedFilter

L'algorithme de MatchedFilter fonctionne indifféremment sur des données dont le format est en mode « profile » ou en mode « centroïde ». Il s'agit de l'algorithme de détéction des pics historique proposé par XCMS. Il est dit de « binning », c'est-à-dire qu'il découpe des tranches de masse régulières et chevauchantes (Figure 147).

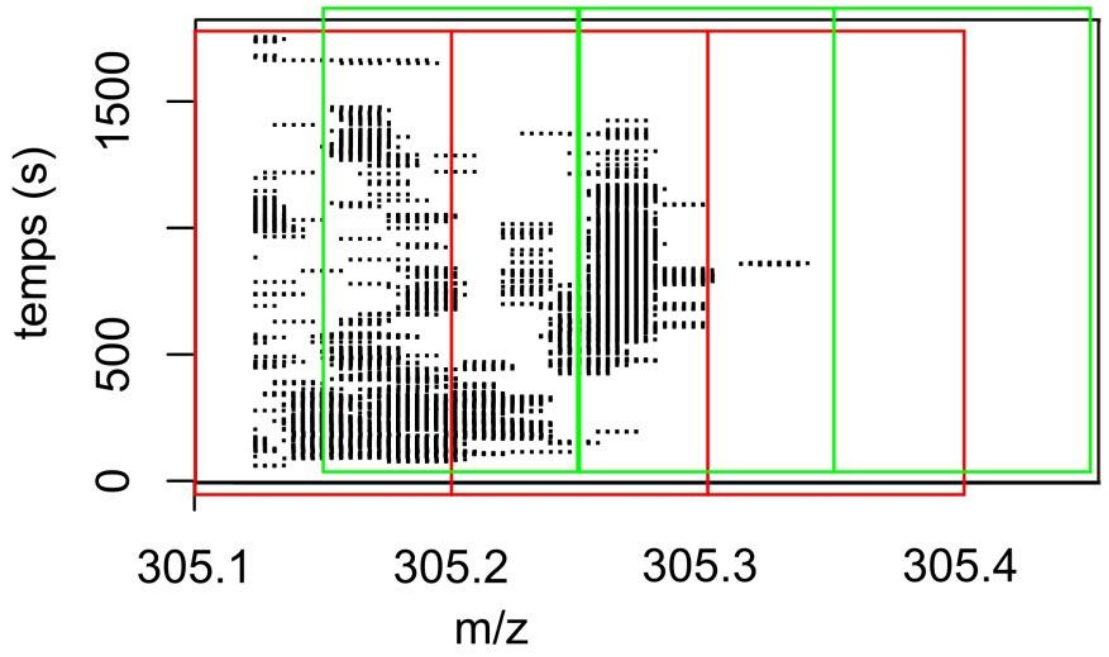



**Figure 147 : Découpe des tranches de masse par l'algorithme MatchedFilter [570]**

Découpe de tranches de masse chevauchantes par l'algorithme MatchedFilter sur des données en mode profile. Un pic de masse dans un scan se visualise par une série horizontale de points. Lorsqu'un pic de masse est detecté sur plusieurs scans consécutifs cela forme des bandes verticales parallèles.

La largeur de découpe des EIC et le nombre de chevauchements à effectuer sont définis par deux paramètres choisis par l'utilisateur. Une fois cette première découpe effectuée, les chevauchements sont résolus en essayant de déterminer quels EIC contiennent les pics de masse entiers sans les découper. Pour cela sont conservées uniquement les tranches dont la somme des intensités est la plus élevée. Dans chaque spectre, c'est la valeur d'intensité la plus élevée présente entre les bornes de l'EIC qui est retenue.

#### V.1.1.2. Approche centWave

L'algorithme de CentWave se base uniquement sur des données de masse dont le format est en mode « centroïdes ». Il est présenté par ses auteurs comme plus adapté aux jeux de données à haute résolution que l'algorithme matchedFilter [416]. Pour chaque centroïde existant dans le premier spectre, une tranche de signal continu appelée région d'intérêt (ROI, de l'anglais *Region Of Interest*) est créée. Les spectres sont alors traités les uns après les autres, et chaque centroïde étend une ROI déjà existante s'il est compris dans son erreur de masse tolérée ou en crée une nouvelle si il ne correspond à aucune ROI. A la fin du traitement de chaque spectre, les ROI qui n'ont pas été étendues sont supprimées si elles ne remplissent pas des critères de longueur et d'intensités minimales ou validées et conservées si elles remplissent ces critères. L'absence d'une ou plusieurs valeurs d'intensité au milieu de la ROI peut être permise en fonction de sa longueur. La tolérance de masse est choisie arbitrairement par paramètre et il est recommandé de la choisir de manière à éviter qu'un trop grand nombre de centroïdes soient placés dans la même ROI alors qu'ils sont sur le même spectre. Néanmoins, lorsque cela arrive, seul le centroïde de plus haute intensité est conservé. Une ROI est alors définie par ses limites supérieures et inférieures de masse, ainsi que par son numéro de spectre de début et de fin (Figure 148).

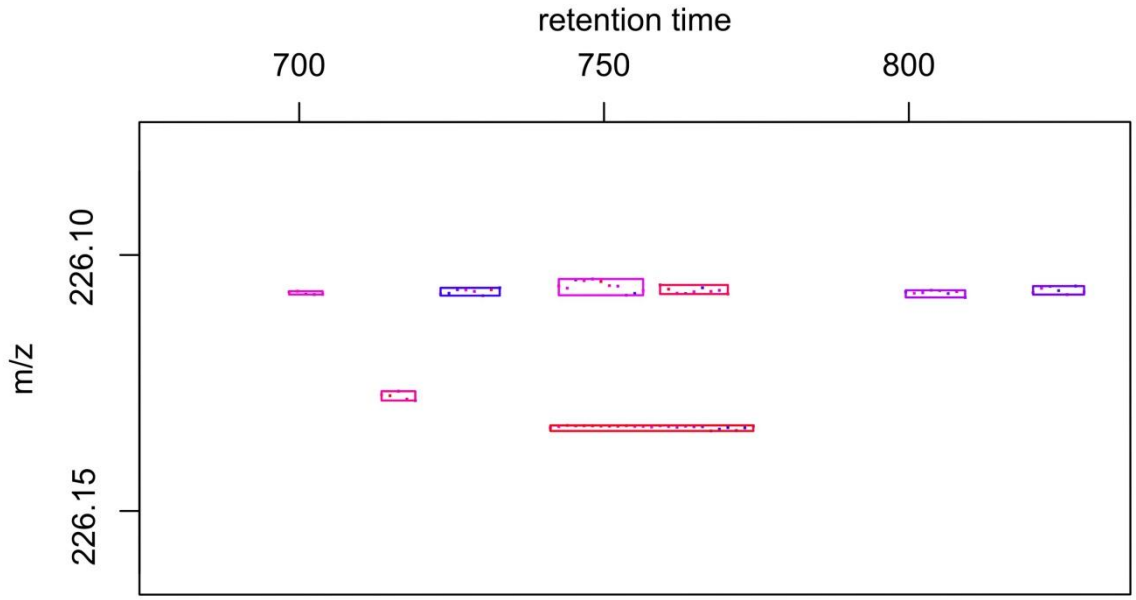



**Figure 148 : Découpe des tranches de masse par l'algorithme centWave [570]**

Création des ROI par centWave, chaque point placé en dimension *m/z* et RT représente un centroïde tandis que les rectangles autours indiquent les dimensions de la ROI créé.

### V.1.2. Le placement des pics en temps de rétention

Suite à l'obtention des EIC, il est nécessaire de déterminer le nombre et l'emplacement des pics chromatographiques existants sur chacun d'entre eux. Après avoir localisé le sommet de chaque pic, il convient de déterminer quelles en sont les limites d'intégration puis de calculer son aire. Deux algorithmes existent une fois encore à cette étape.

#### V.1.2.1. L'approche MatchedFilter

L'algorithme de MatchedFilter applique un modèle à l'ensemble de l'EIC qui permet d'exacerber la notion de pente des pics et de minimiser l'importance de l'intensité absolue et du bruit de fond (Figure 149). Le modèle utilisé est la dérivée seconde d'une gaussienne définie par la largeur à mi-hauteur (FWHM) des pics. Cette FWHM est définie en paramètre par l'utilisateur qui doit la déterminer par observation visuelle des données brutes d'un échantillon. Les limites de chaque pic sont alors situées aux points où le filtre dérivé gaussien devient négatif et l'aire du pic est intégrée sur les vraies données entre les deux bornes.

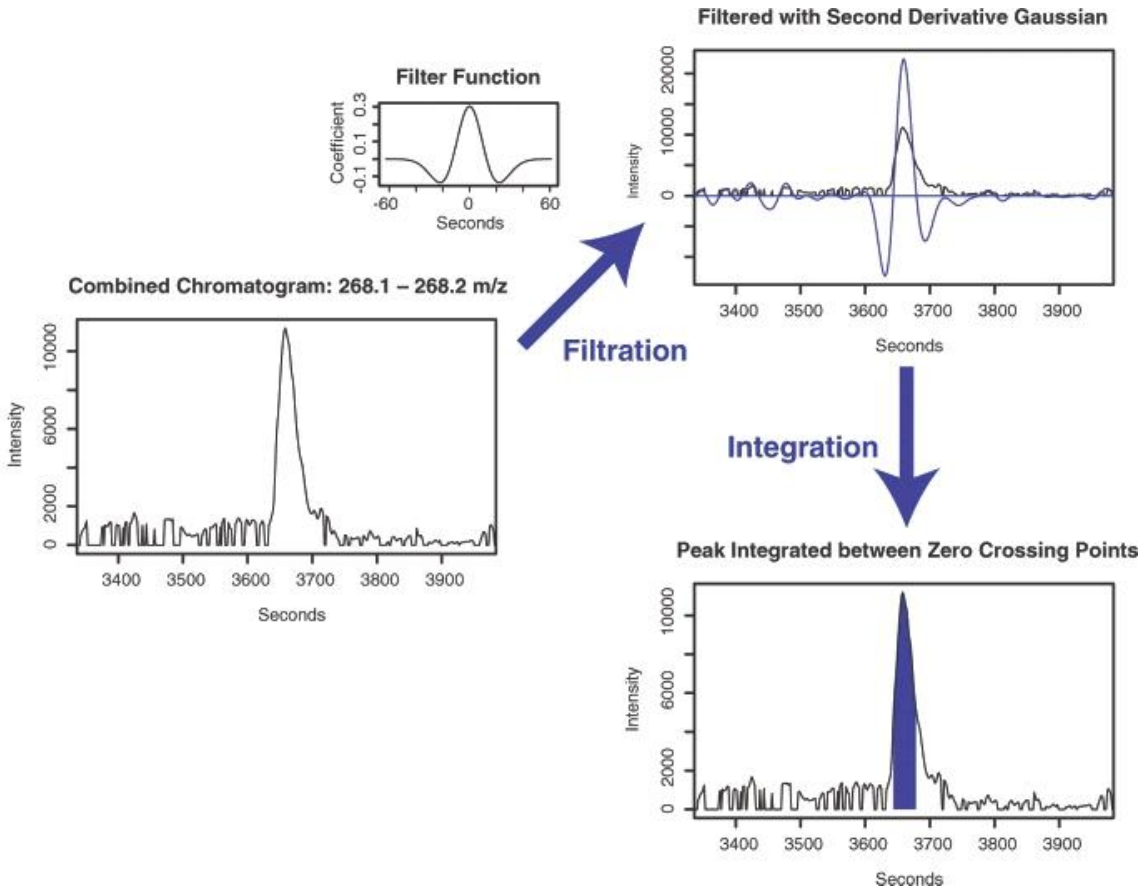



**Figure 149 : Placement des pics en RT par l'approche MatchedFilter (Adapté de la publication de Smith et coll. [368])**

Lissage avec modèle gaussien dérivé par MatchedFilter sur un chromatogramme. L'aire d'intégration du pic est colorée sur le dernier graphique.

### V.1.2.2. L'approche centWave

Une transformée en ondelettes continues dont le modèle mère est la dérivée seconde d'une gaussienne normalisée est appliquée aux intensités du ROI (Figure 150). Le modèle mère est identique au modèle de matchedFilter, mais l'intérêt est qu'il est appliqué à différentes valeurs de FWHM dont les bornes inférieures et supérieures sont fixées en paramètres par l'utilisateur. Cela permet de sélectionner l'échelle expliquant le mieux les données localement et donc de gérer la présence de pics de largeur variable dans le même échantillon. Les limites du pic sont alors placées par descente à partir du sommet sur le modèle gaussien ou sur les données brutes, au choix, puis l'aire est intégrée entre ces limites.

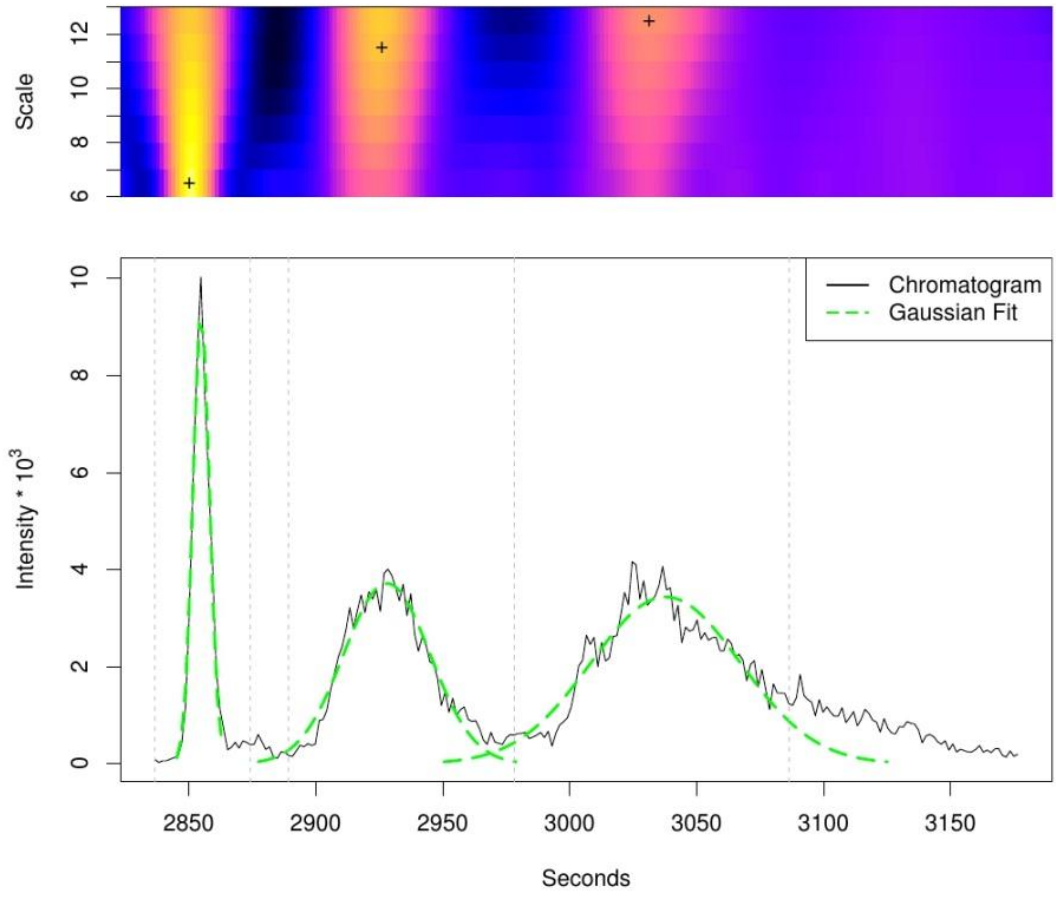



**Figure 150 : Placement des pics en RT par l'approche centWave [416]**

Application de modèles gaussiens par centWave sur un chromatogramme. Les croix positionnées dans le dégradé représentent l'échelle des ondelettes séléctionnées pour représenter au mieux les données.

## V.2. **L'alignement inter-échantillons**

La seconde étape du processus XCMS est de déterminer quelles sont les variables qui correspondent à la détection d'un même signal dans différents échantillons. Cela revient à créer des groupes de variables alignées selon un *m/z* et un temps de rétention proche. Parmi les fonctions proposées par XCMS pour cette étape, celle qui a été utilisée dans le cadre des travaux de cette thèse est la fonction « density » [368]. Cette fonction commence par créer des tranches de masse chevauchantes communes à tous les echantillons dont la largeur est spécifiée par l'utilisateur afin de regrouper les variables ayant une masse proche. Au sein de chacune de ces tranches de masse, la distribution des pics dans la dimension chromatographique a été lissée grâce à la méthode de Parzen-Rozenblatt (estimateur par noyau de densité) afin de constituer des groupes cohérents de variables. Finalement, les

groupes pour lesquels la variable n'est pas présente dans un nombre suffisant d'échantillons sont supprimés. Le choix du paramètre de pourcentage de présence nécessaire à la conservation d'un groupe est stratégique car il permet d'éliminer un grand nombre de signaux artefactuels non répétables tout en conservant les variables d'intérêt. Il doit notamment prendre en compte le degré de similarité entre les échantillons (réplicas d'injection, réplicas de prélèvement, prélèvement d'origines multiples) mais aussi la nature de la variation des variables d'intérêt (forte problématique de présence/absence ou majoritairement une évolution de concentration).

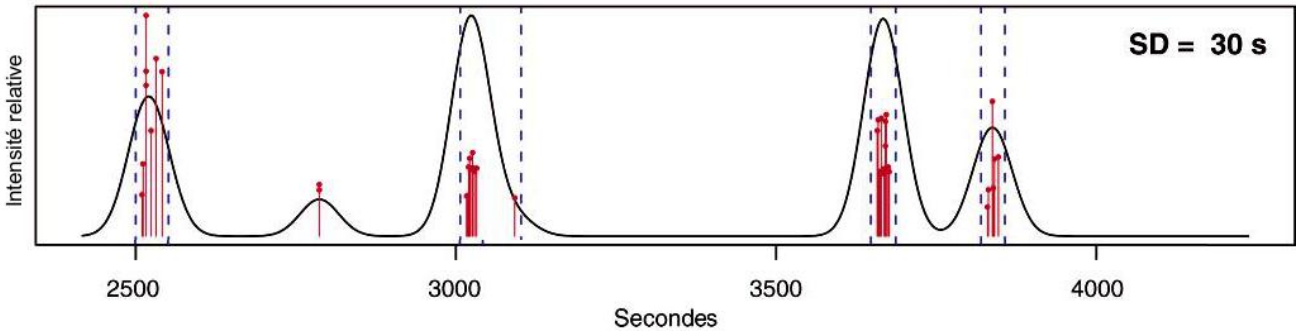



**Figure 151 : Courbe de densité des pics d'une tranche de masse dans la dimension chromatographique (Adapté de la publication de Smith et coll. [368])**

Exemple de création des groupes de pics au sein d'une tranche de masse à l'aide d'une courbe de densité dans la dimension chromatographique. Les pics sont représentés par des bâtonnets rouges indiquant leur temps de rétention ainsi que leur intensité relative. Les limites des groupes constitués sont représentées par des pointillés verticaux.

## V.3. **La correction des temps de rétention**

Une fois que les variables ont été alignées au sein de groupes entres les différents échantillons, il est possible d'étudier les variations de leur temps de rétention afin de modéliser des potentiels décalages en temps de rétention communs à toutes les variables d'un même échantillon. Parmi les fonctions proposées par XCMS pour cette étape, celle qui a été utilisée dans le cadre des travaux de cette thèse est la fonction « loess » [368]. Cette fonction s'appuie sur des groupes de référence, c'est-à-dire des groupes dont les variables sont présentes dans quasiment tous les échantillons. Si ces groupes de référence sont correctement répartis dans le domaine chromatographique, il est possible d'interpoler au sein de chaque échantillon la déviation du temps de rétention en fonction du temps de rétention. La correction de ces légers décalages permet de recommencer l'étape d'alignement en regroupant cette fois-

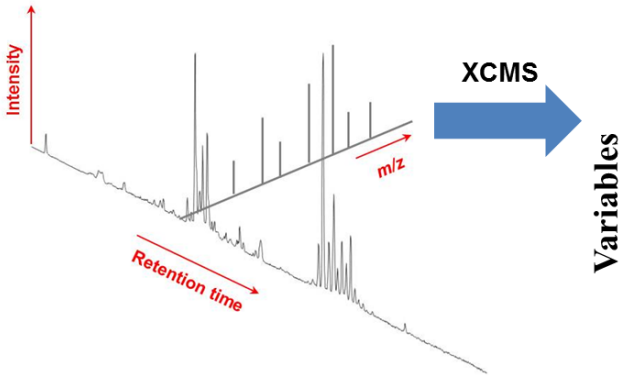
ci des variables dont l'écart en temps de rétention était trop important lors du premier alignement.

## V.4. **La complétion des données manquantes**

Lorsque le paramètre de « minfrac » n'est pas fixé à 100% de présence nécessaire pour valider un groupe lors de l'étape d'alignement inter-échantillons, il est très fréquent que les variables soient détectées dans certains échantillons et absentes dans d'autres. Pour chaque variable l'étape de complétion des données va déterminer des limites de temps de rétention et de *m/z* basées sur les différents échantillons dans lesquels celle-ci est présente, puis va intégrer le signal présent dans cette plage de temps de rétention et *m/z* dans les échantillons où la variable étudiée est absente. Le premier objectif visé est de rattraper des pics qui auraient été manqués lors de l'étape de détection du signal. Cela peut arriver lorsque des pics présentent une forme atypique (épaulement par exemple) ou lorsqu'ils sont situés dans des régions fortement bruitées. Le second objectif est d'intégrer le bruit de fond lorsqu'aucun pic n'est présent dans la plage de temps de rétention et de *m/z* concerné. Cela est important pour la réalisation de tests statistiques et permet par exemple de mitiger le caractère discriminant d'une variable dont le signal dans certains échantillons ne se démarque pas suffisamment du bruit de fond dans d'autres échantillons.

## V.5. **Fichier de sortie du processus XCMS**

Une fois le processus XCMS terminée, la sortie est une matrice de données contenant les informations sur les variables détectées. Chaque variable est caractérisée par un couple rapport *m/z* et un temps de rétention et contient l'information de l'aire sous pic chromatographique dans chaque échantillon (Figure 152). Cette matrice de données à deux dimensions peut être à son tour traitée par des algorithmes ou des programmes d'exploration de données.




*m/z* Temps de rétention

Echantillons

Variables

| mz | rt (min) | sample 1 | sample 2 | sample 3 |
|---|---|---|---|---|
| 253.2176 | 5.0158 | 100389.18 | 179281.75 | 11680522.45 |
| 255.2329 | 3.3128 | 1803290.63 | 844766.84 | 7608274.00 |
| 255.2332 | 5.6466 | 861539.36 | 104555.93 | 459500.83 |
| 271.2284 | 4.6058 | 2139674.26 | 8588552.91 | 165748.43 |
| 279.2335 | 5.3532 | 989715.71 | 2474635.06 | 7174107.83 |
| 281.2491 | 5.9028 | 1943275.96 | 334597.23 | 2868945.15 |
| 283.2646 | 4.7613 | 776431.50 | 3033012.14 | 1484998.37 |
| 283.2647 | 6.4626 | 1103303.14 | 2371107.30 | 679112.48 |
| 295.2283 | 2.2832 | 3947888.84 | 11476473.47 | 1418184.26 |
| 301.2176 | 2.9659 | 1200036.91 | 879929.33 | 928091.15 |
| 303.2336 | 5.3675 | 648757.78 | 3295930.93 | 496339.85 |
| 327.2337 | 5.3275 | 1165779.00 | 5938058.75 | 580469.27 |
| 452.2788 | 3.4879 | 9956850.07 | 6033152.50 | 1347407.95 |
| 474.2631 | 2.4173 | 248481.83 | 3046517.89 | 8719333.47 |
| 476.2786 | 3.0433 | 15145172.29 | 11680522.45 | 2419877.93 |
| 478.2945 | 2.4969 | 1007996.58 | 7608274.00 | 1395088.41 |
| 478.2946 | 4.0352 | 9562770.21 | 459500.83 | 1245097.74 |
| 480.3098 | 3.3338 | 49365118.47 | 165748.43 | 3380825.61 |
| 480.3102 | 4.8566 | 12487994.84 | 7174107.83 | 832926.04 |

**Figure 152 : Conversion des données brutes en une table de variables à 2 dimensions**

# VI. ANNEXE 6 : TABLEAU DES 817 MOLECULES SELECTIONNEES DANS LE CADRE DE LA COLLECTE 1 DU PROJET AGRIFOOD

Le tableau est trié par ordre croissant des masses des molécules. Il contient les informations suivantes : le nom usuel de la molécule, la formule brute, les masses exactes des molécules protonées et déprotonées, l'information quant à son mode d'ionisation, si la molécule est détectable par la méthode développée, le temps de rétention (en minute), la limite de détection (LOD) en ng/L et le $R^2$ calculée sur la linéarité réalisée lors de la validation.

| Nom | Formule Brute | $[M+H]^+$ | $[M-H]^-$ | Mode d'ionisation | Nombre ions | Detectable methode HLB-T3 | RT (min) | LOD (ng/L) | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Butylamine | $C_4H_{11}N$ | 74,09643 | 72,08187 | pos | 1 | | | | |
| Semicarbazide | $CH_5N_3O$ | 76,05054 | 74,03599 | pos | 3 | | | | |
| Hydroxyuree | $CH_4N_2O_2$ | 77,03455 | 75,02000 | pos | 2 | | | | |
| Fluoroacetamide | $C_2H_4NOF$ | 78,03497 | 76,02042 | pos | 1 | | | | |
| Bisulfite | $H_2O_3S$ | 82,97974 | 80,96519 | non ionisable | 0 | | | | |
| Aminotriazole | $C_2H_4N_4$ | 85,05087 | 83,03632 | pos/neg | 5 | | | | |
| Acide Chloroacetique | $C_2H_3O_2Cl$ | 94,98943 | 92,97488 | neg | 4 | | | | |
| 2-Aminopyridine | $C_5H_6N_2$ | 95,06037 | 93,04582 | pos | 1 | | | | |
| Metam | $C_2H_5NS_2$ | 107,99362 | 105,97906 | pos/neg | 4 | OUI | 16,5 | 50 | 0,991 |
| 4-Aminophenole | $C_6H_7NO$ | 110,06004 | 108,04549 | pos | 3 | | | | |
| Phloroglucinol | $C_6H_6O_3$ | 127,03897 | 125,02442 | pos/neg | 2 | | | | |
| Melamine | $C_3H_6N_6$ | 127,07267 | 125,05812 | pos | 1 | | | | |
| Atrazine-desethyl-desisopropyl-2-hydroxy | $C_3H_5N_5O$ | 128,05669 | 126,04213 | pos/neg | 4 | | | | |
| Metformine | $C_4H_{11}N_5$ | 130,10872 | 128,09417 | pos | 3 | | | | |
| 5-Fluorouracil | $C_4H_3N_2O_2F$ | 131,02513 | 129,01058 | pos/neg | 6 | | | | |
| Acide glutaconique | $C_5H_6O_4$ | 131,03389 | 129,01933 | neg | 6 | | | | |
| D-Amphetamine | $C_9H_{13}N$ | 136,11208 | 134,09752 | pos | 3 | | | | |
| Allopurinol | $C_5H_4N_4O$ | 137,04579 | 135,03123 | pos/neg | 3 | | | | |
| 2-Propylphenol | $C_9H_{12}O$ | 137,09609 | 135,08154 | non ionisable | 0 | | | | |
| Limonene | $C_{10}H_{16}$ | 137,13248 | 135,11792 | non ionisable | 0 | | | | |
| Fosfomycine | $C_3H_7O_4P$ | 139,01547 | 137,00092 | pos/neg | 6 | | | | |
| Acide salicylique | $C_7H_6O_3$ | 139,03897 | 137,02442 | pos/neg | 7 | | | | |
| Methamidophos | $C_2H_8NO_2PS$ | 142,00861 | 139,99406 | pos | 8 | OUI | 9,2 | 100 | 0,705 |
| Dimetridazole | $C_5H_7N_3O_2$ | 142,06111 | 140,04655 | pos | 1 | OUI | 11,2 | 10 | 0,983 |
| Dalapon | $C_3H_4O_2Cl_2$ | 142,96611 | 140,95156 | neg | 7 | | | | |
| Acide Valproique | $C_8H_{16}O_2$ | 145,12231 | 143,10775 | neg | 1 | | | | |
| Atrazine-desethyl-desisopropyl | $C_3H_4ClN_5$ | 146,02280 | 144,00824 | pos/neg | 4 | OUI | 15,8 | 5 | 0,993 |
| NAPQI | $C_8H_7NO_2$ | 150,05496 | 148,04040 | non ionisable | 0 | | | | |
| Paracetamol | $C_8H_9NO_2$ | 152,07061 | 150,05605 | pos/neg | 3 | OUI | 10,9 | 50 | 0,838 |
| Amantadine | $C_{10}H_{17}N$ | 152,14338 | 150,12882 | pos | 3 | OUI | 11,8 | 5 | 1,000 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6-Mercaptopurine | $C_5H_4N_4S$ | 153,02294 | 151,00839 | pos/neg | 10 | | | | |
| Oxypurinol | $C_5H_4N_4O_2$ | 153,04071 | 151,02615 | pos/neg | 4 | | | | |
| Resorcinol-monoacetate | $C_8H_8O_3$ | 153,05462 | 151,04007 | pos/neg | 9 | | | | |
| Methyl-Paraben | $C_8H_8O_3$ | 153,05462 | 151,04007 | pos/neg | 4 | | | | |
| Mesalazine | $C_7H_7NO_3$ | 154,04987 | 152,03532 | pos/neg | 9 | | | | |
| Dopamine | $C_8H_{11}NO_2$ | 154,08626 | 152,07170 | pos/neg | 6 | | | | |
| Acide gentisique | $C_7H_6O_4$ | 155,03389 | 153,01933 | neg | 4 | | | | |
| Atrazine-desisopropyl-2-hydroxy | $C_5H_9N_5O$ | 156,08799 | 154,07343 | pos/neg | 4 | OUI | 8,4 | 50 | 0,991 |
| Acide 4-Chlorobenzoique | $C_7H_5O_2Cl$ | 157,00508 | 154,99053 | pos/neg | 7 | | | | |
| Methomyl | $C_5H_{10}N_2O_2S$ | 163,05357 | 161,03902 | pos | 6 | OUI | 12,1 | 10 | 0,891 |
| Nicotine | $C_{10}H_{14}N_2$ | 163,12298 | 161,10842 | pos | 6 | | | | |
| Acetylcysteine | $C_5H_9NO_3S$ | 164,03759 | 162,02304 | pos/neg | 10 | | | | |
| Chloral | $C_2H_3O_2Cl_3$ | 164,92714 | 162,91259 | neg | 1 | | | | |
| 6-Thioguanine | $C_5H_5N_5S$ | 168,03384 | 166,01929 | pos/neg | 9 | | | | |
| Glyphosate | $C_3H_8NO_5P$ | 170,02129 | 168,00673 | pos/neg | 8 | | | | |
| Diphenylamine | $C_{12}H_{11}N$ | 170,09643 | 168,08187 | pos | 1 | OUI | 20,4 | 0,1 | 0,938 |
| Atrazine-desethyl-2-hydroxy | $C_6H_{11}N_5O$ | 170,10364 | 168,08908 | pos/neg | 8 | | | | |
| Crimidine | $C_7H_{10}N_3Cl$ | 172,06360 | 170,04905 | pos | 2 | OUI | 13,4 | 0,5 | 0,978 |
| Metronidazole | $C_6H_9N_3O_3$ | 172,07167 | 170,05711 | pos/neg | 5 | OUI | 10,6 | 50 | 0,847 |
| Moroxydine | $C_6H_{13}N_5O$ | 172,11929 | 170,10473 | pos | 6 | OUI | 8,2 | 50 | 0,999 |
| Gabapentine | $C_9H_{17}NO_2$ | 172,13321 | 170,11865 | pos/neg | 4 | | | | |
| Atrazine-deisopropyl | $C_5H_8N_5Cl$ | 174,05410 | 172,03955 | pos | 5 | OUI | 12,5 | 10 | 0,850 |
| Carbocisteine | $C_5H_9NO_4S$ | 180,03251 | 178,01795 | pos/neg | 12 | | | | |
| Rimantadine | $C_{12}H_{21}N$ | 180,17468 | 178,16012 | pos | 6 | OUI | 13,9 | 0,5 | 0,997 |
| Aspirine | $C_9H_8O_4$ | 181,04954 | 179,03498 | pos/neg | 12 | | | | |
| Mono-methyl-phtalate | $C_9H_8O_4$ | 181,04954 | 179,03498 | pos/neg | 13 | | | | |
| Theophylline | $C_7H_8N_4O_2$ | 181,07200 | 179,05744 | pos/neg | 8 | OUI | 10,7 | 1 | 0,958 |
| Propyl-Paraben | $C_{10}H_{12}O_3$ | 181,08592 | 179,07137 | pos/neg | 4 | | | | |
| Acamprosate | $C_5H_{11}NO_4S$ | 182,04816 | 180,03360 | pos/neg | 14 | | | | |
| Pyridostigmine | $C_9H_{13}N_2O_2$ | 182,10498 | 180,09043 | pos | 5 | | | | |
| Simazine-2-hydroxy | $C_7H_{13}N_5O$ | 184,11929 | 182,10473 | pos/neg | 5 | OUI | 10,7 | 5 | 0,996 |
| Fuberidazole | $C_{11}H_8N_2O$ | 185,07094 | 183,05639 | pos/neg | 3 | OUI | 12,0 | 0,5 | 0,988 |
| Diquat | $C_{12}H_{12}N_2$ | 185,10733 | 183,09277 | pos | 3 | | | | |
| Isocarbamide | $C_8H_{15}N_3O_2$ | 186,12370 | 184,10915 | pos | 4 | OUI | 13,3 | 5 | 0,995 |
| AMPA | $C_7H_{10}N_2O_4$ | 187,07133 | 185,05678 | pos/neg | 11 | | | | |
| Iprymidam | $C_7H_{11}N_4Cl$ | 187,07450 | 185,05995 | pos | 4 | OUI | 12,4 | 1 | 0,996 |
| Paraquat | $C_{12}H_{14}N_2$ | 187,12298 | 185,10842 | pos | 3 | | | | |
| Chloroxynil | $C_7H_3NOCl_2$ | 187,96645 | 185,95189 | neg | 4 | | | | |
| Hydroxymetronidazole | $C_6H_9N_3O_4$ | 188,06658 | 186,05202 | pos/neg | 4 | | | | |
| Atrazine-desethyl | $C_6H_{10}N_5Cl$ | 188,06975 | 186,05519 | pos | 2 | OUI | 13,6 | 0,5 | 0,998 |
| Phenazone | $C_{11}H_{12}N_2O$ | 189,10224 | 187,08768 | pos | 4 | OUI | 12,8 | 0,5 | 0,998 |
| 2,6-Dichlorobenzamide | $C_7H_5Cl_2NO$ | 189,98210 | 187,96754 | pos | 2 | OUI | 13,2 | 100 | 0,919 |
| Aldicarb | $C_7H_{14}N_2O_2S$ | 191,08488 | 189,07032 | pos | 6 | OUI | 15,0 | 1 | 0,971 |
| Dicyclanil | $C_8H_{10}N_6$ | 191,10397 | 189,08941 | pos | 1 | OUI | 9,8 | 10 | 0,994 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Carbendazim | $C_9H_9N_3O_2$ | 192,07676 | 190,06220 | pos | 4 | OUI | 11,1 | 5 | 0,996 |
| Acide citrique | $C_6H_8O_7$ | 193,03428 | 191,01973 | pos/neg | 12 | | | | |
| Temozolomide | $C_6H_6N_6O_2$ | 195,06250 | 193,04795 | pos/neg | 8 | | | | |
| Dimethyl-phtalate | $C_{10}H_{10}O_4$ | 195,06519 | 193,05063 | pos | 5 | | | | |
| Cafeine | $C_8H_{10}N_4O_2$ | 195,08765 | 193,07310 | pos | 2 | | | | |
| Butyl-Paraben | $C_{11}H_{14}O_3$ | 195,10157 | 193,08701 | pos/neg | 4 | | | | |
| m-CPP | $C_{10}H_{13}N_2Cl$ | 197,08400 | 195,06945 | pos | 3 | OUI | 13,1 | 5 | 0,988 |
| Levodopa | $C_9H_{11}NO_4$ | 198,07609 | 196,06153 | pos/neg | 9 | | | | |
| Atrazine-2-hydroxy | $C_8H_{15}N_5O$ | 198,13494 | 196,12038 | pos/neg | 10 | OUI | 11,6 | 5 | 0,998 |
| Nitrofurazone | $C_6H_6N_4O_4$ | 199,04618 | 197,03162 | pos/neg | 9 | OUI | 12,6 | 500 | 0,914 |
| Cymoxanil | $C_7H_{10}N_4O_3$ | 199,08257 | 197,06801 | pos/neg | 13 | OUI | 14,5 | 5 | 0,997 |
| Acide Clavulanique | $C_8H_9NO_5$ | 200,05534 | 198,04080 | pos/neg | 8 | | | | |
| Pyrimethanil | $C_{12}H_{13}N_3$ | 200,11822 | 198,10367 | pos | 3 | OUI | 16,1 | 0,1 | 0,996 |
| MCPA | $C_9H_9O_3Cl$ | 201,03130 | 199,01675 | neg | 7 | | | | |
| Cloprop | $C_9H_9O_3Cl$ | 201,03130 | 199,01675 | neg | 8 | | | | |
| Ronidazole | $C_6H_8N_4O_4$ | 201,06183 | 199,04727 | pos/neg | 4 | OUI | 11,4 | 50 | 0,974 |
| Bisphenol-F | $C_{13}H_{12}O_2$ | 201,09101 | 199,07645 | pos | 1 | | | | |
| Pipobroman | $C_{10}H_{24}N_4$ | 201,20737 | 199,19282 | pos | 5 | | | | |
| Thiabendazole | $C_{10}H_7N_3S$ | 202,04334 | 200,02879 | pos | 3 | OUI | 11,8 | 1 | 0,993 |
| Simazine | $C_7H_{12}N_5Cl$ | 202,08540 | 200,07084 | pos | 2 | OUI | 15,4 | 0,5 | 0,984 |
| Sebuthylazin-desethyl | $C_7H_{12}N_5Cl$ | 202,08540 | 200,07085 | pos | 4 | OUI | 14,8 | 0,5 | 0,996 |
| Terbuthylazin-desethyl | $C_7H_{12}N_5Cl$ | 202,08540 | 200,07085 | pos | 3 | OUI | 15,8 | 0,5 | 0,995 |
| Carbaryl | $C_{12}H_{11}NO_2$ | 202,08626 | 200,07170 | pos/neg | 5 | OUI | 16,9 | 1 | 0,998 |
| Fenfuram | $C_{12}H_{11}NO_2$ | 202,08626 | 200,07170 | pos/neg | 7 | OUI | 17,4 | 0,5 | 0,998 |
| Metamitron | $C_{10}H_{10}N_4O$ | 203,09274 | 201,07818 | pos/neg | 5 | OUI | 13,3 | 5 | 0,998 |
| Dinotefuran | $C_7H_{14}N_4O_3$ | 203,11387 | 201,09931 | pos/neg | 8 | OUI | 11,0 | 10 | 0,867 |
| Levamisol | $C_{11}H_{12}N_2S$ | 205,07940 | 203,06484 | pos | 3 | OUI | 11,2 | 5 | 0,999 |
| Chlorthiamide | $C_7H_5NSCl_2$ | 205,95925 | 203,94470 | pos/neg | 7 | | | | |
| Chloramben | $C_7H_5NO_2Cl_2$ | 205,97701 | 203,96246 | pos/neg | 10 | OUI | 14,3 | 50 | 0,936 |
| Dichloran | $C_6H_4N_2O_2Cl_2$ | 206,97226 | 204,95771 | neg | 2 | | | | |
| Aminopyralid | $C_6H_4N_2O_2Cl_2$ | 206,97226 | 204,95771 | pos/neg | 12 | OUI | 11,2 | 50 | 0,673 |
| Pyridafol | $C_{10}H_7N_2OCl$ | 207,03197 | 205,01741 | pos/neg | 7 | OUI | 14,0 | 1 | 0,835 |
| Ibuprofen | $C_{13}H_{18}O_2$ | 207,13796 | 205,12340 | pos/neg | 6 | | | | |
| Isoproturon | $C_{12}H_{18}N_2O$ | 207,14919 | 205,13463 | pos | 2 | OUI | 17,3 | 0,1 | 0,989 |
| 4-Octylphenole | $C_{14}H_{22}O$ | 207,17435 | 205,15979 | non ionisable | 0 | | | | |
| Fenobucarb | $C_{12}H_{17}NO_2$ | 208,13321 | 206,11865 | pos | 10 | OUI | 18,8 | 0,1 | 0,996 |
| Promecarb | $C_{12}H_{17}NO_2$ | 208,13321 | 206,11865 | pos/neg | 7 | OUI | 19,2 | 5 | 0,997 |
| Aminocarb | $C_{11}H_{16}N_2O_2$ | 209,12845 | 207,11390 | pos | 6 | OUI | 10,2 | 5 | 0,996 |
| Ethirimol | $C_{11}H_{19}N_3O$ | 210,16009 | 208,14554 | pos/neg | 10 | OUI | 12,8 | 0,5 | 0,998 |
| Propachlor | $C_{11}H_{14}NOCl$ | 212,08367 | 210,06912 | pos | 5 | OUI | 17,9 | 0,5 | 0,999 |
| Zalcitabine | $C_9H_{13}N_3O_3$ | 212,10297 | 210,08841 | pos | 7 | OUI | 15,6 | 100 | 0,994 |
| Mebenil | $C_{14}H_{13}NO$ | 212,10699 | 210,09244 | pos | 5 | OUI | 18,1 | 0,5 | 0,999 |
| Isouron | $C_{10}H_{17}N_3O_2$ | 212,13935 | 210,12480 | pos | 6 | OUI | 15,6 | 0,1 | 0,991 |
| Atraton | $C_9H_{17}N_5O$ | 212,15059 | 210,13603 | pos | 2 | OUI | 13,5 | 0,5 | 0,976 |
| Chlortoluron | $C_{10}H_{13}N_2OCl$ | 213,07891 | 211,06436 | pos | 3 | OUI | 16,8 | 0,5 | 0,992 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rabenzazol | $C_{12}H_{12}N_4$ | 213,11347 | 211,09892 | neg | 2 | | | | |
| Carmustine | $C_5H_9N_3O_2Cl_2$ | 214,01446 | 211,99991 | pos | 2 | | | | |
| Omethoate | $C_5H_{12}NO_4PS$ | 214,02974 | 212,01519 | pos/neg | 11 | OUI | 10,3 | 10 | 0,995 |
| Chlorpropham | $C_{10}H_{12}NO_2Cl$ | 214,06293 | 212,04838 | pos | 3 | | | | |
| Baclofen | $C_{10}H_{12}NO_2Cl$ | 214,06294 | 212,04838 | pos/neg | 4 | OUI | 11,4 | 10 | 0,999 |
| Acide Clofibrique | $C_{10}H_{11}O_3Cl$ | 215,04695 | 213,03240 | neg | 5 | | | | |
| Mecoprop | $C_{10}H_{11}O_3Cl$ | 215,04695 | 213,03240 | neg | 7 | | | | |
| Monolinuron | $C_9H_{11}N_2O_2Cl$ | 215,05818 | 213,04363 | pos | 4 | OUI | 17,2 | 1 | 0,999 |
| 2,4-Dihydroxybenzophenone | $C_{13}H_{10}O_3$ | 215,07027 | 213,05571 | pos/neg | 10 | OUI | 17,9 | 1 | 0,999 |
| Metribuzin | $C_8H_{14}N_4OS$ | 215,09611 | 213,08156 | pos/neg | 5 | OUI | 15,9 | 0,5 | 0,998 |
| Atrazine | $C_8H_{14}N_5Cl$ | 216,10105 | 214,08649 | pos | 2 | OUI | 17,0 | 0,1 | 0,995 |
| Desmethylnaproxen | $C_{13}H_{12}O_3$ | 217,08592 | 215,07136 | pos/neg | 6 | | | | |
| 5-Hydroxythiabendazole | $C_{10}H_7N_3OS$ | 218,03826 | 216,02371 | pos/neg | 5 | OUI | 11,0 | 5 | 0,941 |
| Pyracarbolid | $C_{13}H_{15}NO_2$ | 218,11756 | 216,10300 | pos | 5 | OUI | 16,7 | 0,5 | 0,993 |
| Ethoxyquine | $C_{14}H_{19}NO$ | 218,15394 | 216,13939 | pos | 5 | OUI | 18,7 | 0,5 | 0,997 |
| Primidone | $C_{12}H_{14}N_2O_2$ | 219,11281 | 217,09825 | pos | 2 | OUI | 13,0 | 5 | 0,995 |
| Oxamyl | $C_7H_{13}N_3O_3S$ | 220,07504 | 218,06049 | pos | 7 | OUI | 11,7 | 10 | 0,993 |
| Dichlorvos | $C_4H_7O_4PCl_2$ | 220,95318 | 218,93862 | pos/neg | 6 | OUI | 15,7 | 5 | 0,991 |
| 2,4-D | $C_8H_6O_3Cl_2$ | 220,97668 | 218,96212 | neg | 7 | | | | |
| Dicamba | $C_8H_6O_3Cl_2$ | 220,97668 | 218,96212 | pos/neg | 8 | | | | |
| 4-Nonylphenol | $C_{15}H_{24}O$ | 221,18999 | 219,17544 | non ionisable | 0 | | | | |
| Quinmerac | $C_{11}H_8NO_2Cl$ | 222,03163 | 220,01708 | pos/neg | 9 | OUI | 13,6 | 5 | 1,000 |
| Methabenzthiazuron | $C_{10}H_{11}N_3OS$ | 222,06956 | 220,05501 | pos/neg | 6 | OUI | 16,5 | 0,5 | 0,998 |
| Carbofuran | $C_{12}H_{15}NO_3$ | 222,11247 | 220,09791 | pos | 4 | OUI | 16,5 | 1 | 0,997 |
| Formetanate | $C_{11}H_{15}N_3O_2$ | 222,12370 | 220,10915 | pos | 4 | OUI | 10,3 | 10 | 0,998 |
| Cyclafuramid | $C_{13}H_{19}NO_2$ | 222,14886 | 220,13430 | pos | 7 | OUI | 18,6 | 0,1 | 0,997 |
| Acetamipride | $C_{10}H_{11}N_4Cl$ | 223,07450 | 221,05995 | pos/neg | 8 | OUI | 14,0 | 0,5 | 0,998 |
| Diethyl-phtalate | $C_{12}H_{14}O_4$ | 223,09649 | 221,08193 | pos | 4 | | | | |
| Mono-butyl-phtalate | $C_{12}H_{14}O_4$ | 223,09649 | 221,08193 | pos/neg | 13 | | | | |
| 1-Hydroxyibuprofen | $C_{13}H_{18}O_3$ | 223,13287 | 221,11831 | pos/neg | 9 | | | | |
| 2-Hydroxyibuprofen | $C_{13}H_{18}O_3$ | 223,13287 | 221,11831 | neg | 6 | | | | |
| Isonoruron | $C_{13}H_{22}N_2O$ | 223,18049 | 221,16594 | pos | 10 | OUI | 17,6 | 0,1 | 0,997 |
| Monocrotophos | $C_7H_{14}NO_5P$ | 224,06824 | 222,05368 | pos/neg | 10 | OUI | 11,7 | 5 | 0,989 |
| Bendiocarb | $C_{11}H_{13}NO_4$ | 224,09173 | 222,07718 | pos | 5 | OUI | 16,4 | 1 | 0,997 |
| Fadrozole | $C_{14}H_{13}N_3$ | 224,11822 | 222,10367 | pos | 2 | OUI | 12,3 | 5 | 0,998 |
| cis-mevinphos | $C_7H_{13}PO_6$ | 225,05225 | 223,03770 | pos | 8 | | | | |
| trans-mevinphos | $C_7H_{13}PO_6$ | 225,05225 | 223,03770 | pos | 7 | | | | |
| Stavudine | $C_{10}H_{12}N_2O_4$ | 225,08698 | 223,07243 | pos/neg | 9 | | | | |
| Tripropyl-phosphate | $C_9H_{21}O_4P$ | 225,12502 | 223,11047 | pos | 9 | OUI | 18,3 | 0,5 | 0,991 |
| Furazolidone | $C_8H_7N_3O_5$ | 226,04585 | 224,03129 | pos | 6 | OUI | 13,5 | 50 | 0,953 |
| Mercaptodimethur | $C_{11}H_{15}NO_2S$ | 226,08963 | 224,07507 | pos | 6 | | | | |
| Aciclovir | $C_8H_{11}N_5O_3$ | 226,09347 | 224,07891 | pos/neg | 12 | | | | |
| Cyprodinile | $C_{14}H_{15}N_3$ | 226,13388 | 224,11932 | pos | 1 | OUI | 18,1 | 0,5 | 0,999 |
| Terbutaline | $C_{12}H_{19}NO_3$ | 226,14377 | 224,12922 | pos/neg | 5 | OUI | 9,9 | 10 | 0,997 |
| Prometon | $C_{10}H_{19}N_5O$ | 226,16624 | 224,15168 | pos | 5 | OUI | 14,5 | 0,1 | 0,995 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Secbumeton | $C_{10}H_{19}N_5O$ | 226,16624 | 224,15168 | pos | 6 | OUI | 14,5 | 0,1 | 0,995 |
| Ametryn | $C_9H_{17}N_5S$ | 228,12774 | 226,11319 | pos | 5 | OUI | 15,5 | 0,1 | 0,975 |
| Chlorfenazole | $C_{13}H_9N_2Cl$ | 229,05270 | 227,03815 | pos/neg | 3 | OUI | 13,2 | 0,5 | 0,999 |
| MCPB | $C_{11}H_{13}O_3Cl$ | 229,06260 | 227,04805 | neg | 8 | | | | |
| Metoxuron | $C_{10}H_{13}N_2O_2Cl$ | 229,07383 | 227,05928 | pos/neg | 7 | OUI | 15,1 | 0,5 | 0,984 |
| Resveratrol | $C_{14}H_{12}O_3$ | 229,08592 | 227,07137 | pos/neg | 3 | OUI | 15,5 | 1000 | - |
| Tebuthiuron | $C_9H_{16}N_4OS$ | 229,11176 | 227,09721 | pos | 3 | OUI | 15,0 | 0,1 | 0,998 |
| Ethiozin | $C_9H_{16}N_4OS$ | 229,11176 | 227,09721 | pos/neg | 13 | OUI | 17,4 | 0,1 | 0,996 |
| Bisphenol-A | $C_{15}H_{16}O_2$ | 229,12231 | 227,10775 | pos | 1 | | | | |
| Dimethoate | $C_5H_{12}NO_3PS_2$ | 230,00690 | 227,99234 | pos/neg | 11 | OUI | 13,8 | 5 | 0,998 |
| Cypromid | $C_{10}H_9NOCl_2$ | 230,01340 | 227,99884 | pos/neg | 8 | OUI | 19,0 | 5 | 0,999 |
| Terbuthylazine | $C_9H_{16}N_5Cl$ | 230,11670 | 228,10215 | pos | 2 | OUI | 18,8 | 0,1 | 0,995 |
| Sebuthylazine | $C_9H_{16}N_5Cl$ | 230,11670 | 228,10215 | pos | 6 | OUI | 18,3 | 0,1 | 0,995 |
| Propazine | $C_9H_{16}N_5Cl$ | 230,11670 | 228,10215 | pos | 4 | OUI | 18,4 | 0,1 | 0,997 |
| Methfuroxam | $C_{14}H_{15}NO_2$ | 230,11756 | 228,10300 | pos/neg | 8 | OUI | 19,1 | 0,1 | 0,995 |
| Asulam | $C_8H_{10}N_2O_4S$ | 231,04340 | 229,02885 | pos/neg | 13 | | | | |
| Naproxene | $C_{14}H_{14}O_3$ | 231,10157 | 229,08702 | pos/neg | 8 | OUI | 16,5 | 100 | 0,984 |
| Propyphenazone | $C_{14}H_{18}N_2O$ | 231,14919 | 229,13464 | pos | 5 | OUI | 16,5 | 0,1 | 0,997 |
| Paracetamol-sulfate | $C_8H_9NO_5S$ | 232,02741 | 230,01286 | pos/neg | 9 | | | | |
| Aminophenazone | $C_{13}H_{17}N_3O$ | 232,14444 | 230,12989 | pos | 7 | OUI | 10,6 | 5 | 0,999 |
| Diuron | $C_9H_{10}N_2OCl_2$ | 233,02430 | 231,00974 | pos/neg | 5 | OUI | 17,4 | 1 | 0,998 |
| Acide nalidixique | $C_{12}H_{12}N_2O_3$ | 233,09207 | 231,07751 | pos | 7 | OUI | 16,0 | 0,5 | 0,993 |
| Phenobarbital | $C_{12}H_{12}N_2O_3$ | 233,09207 | 231,07752 | pos/neg | 8 | | | | |
| Melatonine | $C_{13}H_{16}N_2O_2$ | 233,12845 | 231,11390 | pos/neg | 12 | OUI | 14,0 | 0,5 | 0,996 |
| Siduron | $C_{14}H_{20}N_2O$ | 233,16484 | 231,15029 | pos/neg | 11 | OUI | 18,6 | 0,5 | 0,998 |
| Lomustine | $C_9H_{16}N_3O_2Cl$ | 234,10038 | 232,08583 | pos | 6 | | | | |
| Tebutam | $C_{15}H_{23}NO$ | 234,18524 | 232,17069 | pos | 8 | OUI | 20,5 | 0,1 | 0,994 |
| Dichlorprop | $C_9H_8O_3Cl_2$ | 234,99233 | 232,97777 | neg | 6 | | | | |
| Lenacil | $C_{13}H_{18}N_2O_2$ | 235,14410 | 233,12955 | pos/neg | 5 | OUI | 16,1 | 0,5 | 0,998 |
| Carboxine | $C_{12}H_{13}NO_2S$ | 236,07398 | 234,05942 | pos/neg | 9 | OUI | 17,2 | 1 | 0,998 |
| Thioquinox | $C_9H_4N_2S_3$ | 236,96094 | 234,94638 | pos | 7 | | | | |
| Fenpiclonil | $C_{11}H_6N_2Cl_2$ | 236,99808 | 234,98353 | pos/neg | 7 | | | | |
| Didanosine | $C_{10}H_{12}N_4O_3$ | 237,09822 | 235,08366 | pos/neg | 11 | | | | |
| Carbamazepine | $C_{15}H_{12}N_2O$ | 237,10224 | 235,08768 | pos | 5 | OUI | 16,1 | 0,5 | 0,991 |
| Carboxyibuprofen | $C_{13}H_{16}O_4$ | 237,11214 | 235,09758 | pos/neg | 13 | OUI | 15,3 | 500 | 0,999 |
| Carbetamide | $C_{12}H_{16}N_2O_3$ | 237,12337 | 235,10881 | pos/neg | 9 | OUI | 15,1 | 1 | 0,996 |
| Drazoxolon | $C_{10}H_8N_3O_2Cl$ | 238,03778 | 236,02323 | pos/neg | 11 | OUI | 20,4 | 5 | 0,997 |
| Cartap | $C_7H_{15}N_3O_2S_2$ | 238,06784 | 236,05329 | pos | 4 | OUI | 8,6 | 100 | 0,973 |
| Nitrofurantoine | $C_8H_6N_4O_5$ | 239,04110 | 237,02654 | pos/neg | 9 | OUI | 20,4 | 50 | 0,997 |
| Pirimicarb | $C_{11}H_{18}N_4O_2$ | 239,15025 | 237,13570 | pos | 6 | OUI | 13,0 | 0,5 | 0,987 |
| Monalide | $C_{13}H_{18}NOCl$ | 240,11497 | 238,10042 | pos/neg | 7 | OUI | 21,1 | 0,5 | 0,999 |
| Salbutamol | $C_{13}H_{21}NO_3$ | 240,15942 | 238,14487 | pos/neg | 9 | OUI | 10,0 | 10 | 0,997 |
| Picloram | $C_6H_3N_2O_2Cl_3$ | 240,93329 | 238,91873 | pos/neg | 12 | OUI | 12,9 | 100 | 0,999 |
| Thiazafluron | $C_6H_7N_4OSF_3$ | 241,03654 | 239,02199 | pos/neg | 11 | OUI | 15,7 | 1 | 0,995 |
| Bentazon | $C_{10}H_{12}N_2O_3S$ | 241,06413 | 239,04959 | pos/neg | 3 | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dinoseb | $C_{10}H_{12}N_2O_5$ | 241,08190 | 239,06734 | neg | 3 | | | | |
| Cyanazine | $C_9H_{13}N_6Cl$ | 241,09630 | 239,08174 | pos/neg | 14 | OUI | 15,8 | 0,5 | 0,997 |
| Mefenamic-acid | $C_{15}H_{15}NO_2$ | 242,11756 | 240,10300 | pos/neg | 6 | OUI | 21,1 | 10 | 0,997 |
| Terbutryn | $C_{10}H_{19}N_5S$ | 242,14339 | 240,12884 | pos | 6 | OUI | 16,9 | 0,1 | 0,998 |
| Prometryn | $C_{10}H_{19}N_5S$ | 242,14339 | 240,12884 | pos | 5 | OUI | 16,8 | 0,1 | 0,998 |
| Amicarbazone | $C_{10}H_{19}N_5O_2$ | 242,16115 | 240,14660 | pos | 7 | OUI | 15,1 | 0,1 | 0,984 |
| Clofibrate | $C_{12}H_{15}O_3Cl$ | 243,07825 | 241,06370 | pos | 5 | | | | |
| Benazoline | $C_9H_6NO_3SCl$ | 243,98297 | 241,96841 | pos/neg | 14 | OUI | 15,4 | 50 | 0,986 |
| Cyanophos | $C_9H_{10}NO_3PS$ | 244,01918 | 242,00462 | pos/neg | 12 | | | | |
| Cytarabine | $C_9H_{13}N_3O_5$ | 244,09280 | 242,07824 | pos/neg | 8 | | | | |
| Azacytidine | $C_8H_{12}N_4O_5$ | 245,08805 | 243,07349 | pos/neg | 19 | | | | |
| Oxydemeton-methyl | $C_6H_{15}S_2PO_4$ | 247,02221 | 245,00766 | pos/neg | 6 | | | | |
| Busulfan | $C_6H_{14}O_6S_2$ | 247,03046 | 245,01590 | pos | 6 | | | | |
| Emtricitabine | $C_8H_{10}N_3O_3SF$ | 248,04997 | 246,03541 | pos/neg | 8 | OUI | 10,2 | 50 | 0,997 |
| 2,4-DB | $C_{10}H_{10}O_3Cl_2$ | 249,00798 | 246,99342 | neg | 7 | | | | |
| Linuron | $C_9H_{10}N_2O_2Cl_2$ | 249,01921 | 247,00466 | pos/neg | 6 | OUI | 19,0 | 1 | 0,999 |
| Fludioxonil | $C_{12}H_6F_2N_2O_2$ | 249,04701 | 247,03246 | neg | 2 | | | | |
| Clothianidine | $C_6H_8N_5O_2SCl$ | 250,01600 | 248,00144 | pos/neg | 9 | OUI | 13,4 | 5 | 0,998 |
| Alendronate | $C_4H_{13}NO_7P_2$ | 250,02400 | 248,00945 | pos/neg | 5 | | | | |
| Sulfapyridine | $C_{11}H_{11}N_3O_2S$ | 250,06448 | 248,04992 | pos/neg | 9 | OUI | 12,2 | 5 | 0,996 |
| Oxibendazole | $C_{12}H_{15}N_3O_3$ | 250,11862 | 248,10406 | pos | 4 | OUI | 14,0 | 0,5 | 0,997 |
| Difenzoquat-methyl | $C_{17}H_{17}N_2$ | 250,14645 | 248,13190 | pos | 1 | | | | |
| O-Desmethyltramadol | $C_{15}H_{23}NO_2$ | 250,18016 | 248,16560 | pos | 3 | OUI | 11,5 | 5 | 0,998 |
| Vinclozoline | $C_{12}H_9NO_3Cl$ | 251,03437 | 249,01982 | non ionisable | 0 | | | | |
| Bisphenol-S | $C_{12}H_{10}O_4S$ | 251,03726 | 249,02270 | pos/neg | 12 | OUI | 14,3 | 50 | 0,999 |
| Sulfadiazine | $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ | 251,05973 | 249,04517 | pos/neg | 13 | OUI | 12,1 | 10 | 0,996 |
| Gemfibrozil | $C_{15}H_{22}O_3$ | 251,16417 | 249,14961 | pos/neg | 8 | | | | |
| Furmecyclox | $C_{14}H_{21}NO_3$ | 252,15942 | 250,14487 | pos | 9 | OUI | 20,9 | 0,1 | 0,997 |
| Thiacloprid | $C_{10}H_9ClN_4S$ | 253,03092 | 251,01636 | pos/neg | 9 | OUI | 14,9 | 1 | 0,996 |
| Phenytoine | $C_{15}H_{12}N_2O_2$ | 253,09715 | 251,08260 | pos/neg | 3 | OUI | 16,1 | 5 | 0,991 |
| 10,11-Epoxycarbamazepine | $C_{15}H_{12}N_2O_2$ | 253,09715 | 251,08260 | pos | 8 | OUI | 14,7 | 1 | 0,983 |
| Cimetidine | $C_{10}H_{16}N_6S$ | 253,12299 | 251,10844 | pos/neg | 9 | OUI | 10,1 | 10 | 0,996 |
| Hexazinone | $C_{12}H_{20}N_4O_2$ | 253,16590 | 251,15135 | pos | 6 | OUI | 15,1 | 0,1 | 0,994 |
| Sulfamethoxazole | $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ | 254,05939 | 252,04483 | pos/neg | 11 | OUI | 13,9 | 5 | 0,996 |
| Penciclovir | $C_{10}H_{15}N_5O_3$ | 254,12477 | 252,11021 | pos/neg | 14 | | | | |
| 2,4,5-T | $C_8H_5O_3Cl_3$ | 254,93770 | 252,92315 | neg | 6 | | | | |
| Daidzein | $C_{15}H_{10}O_4$ | 255,06519 | 253,05063 | pos/neg | 9 | OUI | 14,8 | 5 | 0,994 |
| Ketoprofen | $C_{16}H_{14}O_3$ | 255,10157 | 253,08702 | pos/neg | 10 | OUI | 17,9 | 1 | 0,998 |
| Triclopyr | $C_7H_4NO_3Cl_3$ | 255,93295 | 253,91840 | pos/neg | 12 | | | | |
| Sulfathiazole | $C_9H_9N_3O_2S_2$ | 256,02090 | 254,00634 | pos/neg | 9 | OUI | 12,2 | 5 | 0,981 |
| Imidaclopride | $C_9H_{10}N_5O_2Cl$ | 256,05958 | 254,04503 | pos/neg | 9 | OUI | 13,6 | 5 | 0,999 |
| Ganciclovir | $C_9H_{13}N_5O_4$ | 256,10403 | 254,08948 | pos/neg | 11 | | | | |
| Dipropetryne | $C_{11}H_{21}N_5S$ | 256,15904 | 254,14449 | pos | 6 | OUI | 18,0 | 0,5 | 0,998 |
| Trichlorfon | $C_4H_8O_4PCl_3$ | 256,92985 | 254,91530 | pos | 4 | OUI | 13,0 | 50 | 0,989 |
| Mono-benzyl-phtalate | $C_{15}H_{12}O_4$ | 257,08084 | 255,06628 | pos/neg | 18 | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Benfuresate | $C_{12}H_{16}O_4S$ | 257,08421 | 255,06965 | pos | 1 | | | | |
| Dextrorphan | $C_{17}H_{23}NO$ | 258,18524 | 256,17069 | pos | 1 | OUI | 12,8 | 1 | 0,989 |
| Methoxymorphinane | $C_{17}H_{23}NO$ | 258,18524 | 256,17069 | pos | 2 | OUI | 14,8 | 0,1 | 0,995 |
| Metobromuron | $C_9H_{11}N_2O_2Br$ | 259,00767 | 256,99311 | pos | 8 | OUI | 17,7 | 5 | 1,000 |
| Propranolol | $C_{16}H_{21}NO_2$ | 260,16451 | 258,14995 | pos | 1 | OUI | 14,6 | 0,1 | 0,989 |
| Bromacil | $C_9H_{13}N_2O_2Br$ | 261,02332 | 259,00876 | pos/neg | 9 | OUI | 15,3 | 5 | 0,997 |
| Cyclophosphamide | $C_7H_{15}N_2O_2PCl_2$ | 261,03210 | 259,01754 | pos | 5 | OUI | 14,3 | 1 | 0,996 |
| Ifosfamide | $C_7H_{15}N_2O_2PCl_2$ | 261,03210 | 259,01754 | pos | 5 | OUI | 14,1 | 1 | 0,993 |
| Acide Tolfenamique | $C_{14}H_{12}ClNO_2$ | 262,06294 | 260,04838 | pos/neg | 7 | OUI | 21,5 | 50 | 0,990 |
| Acide Oxolinique | $C_{13}H_{11}NO_5$ | 262,07100 | 260,05644 | pos | 2 | OUI | 14,6 | 1 | 0,992 |
| Flumequine | $C_{14}H_{12}NO_3F$ | 262,08740 | 260,07284 | pos | 5 | OUI | 16,3 | 0,1 | 0,993 |
| Imazapyr | $C_{13}H_{15}N_3O_3$ | 262,11862 | 260,10406 | pos/neg | 14 | OUI | 12,6 | 5 | 0,847 |
| Carbadox | $C_{11}H_{10}N_4O_4$ | 263,07748 | 261,06293 | pos/neg | 13 | OUI | 12,2 | 5 | 0,997 |
| Parathion-methyl | $C_8H_{10}NO_5PS$ | 264,00901 | 261,99445 | pos/neg | 5 | | | | |
| Nortriptyline | $C_{19}H_{21}N$ | 264,17468 | 262,16012 | pos | 5 | OUI | 16,3 | 0,1 | 0,995 |
| Tramadol | $C_{16}H_{25}NO_2$ | 264,19580 | 262,18125 | pos | 2 | OUI | 12,9 | 0,5 | 0,997 |
| Desmethylvenlafaxine | $C_{16}H_{25}NO_2$ | 264,19581 | 262,18125 | pos | 4 | | | | |
| Aclonifen | $C_{12}H_9N_2O_3Cl$ | 265,03745 | 263,02289 | pos | 1 | OUI | 21,1 | 100 | 0,998 |
| Ethidimuron | $C_7H_{12}N_4O_3S_2$ | 265,04236 | 263,02780 | pos/neg | 11 | OUI | 13,5 | 5 | 0,998 |
| Sulfamerazine | $C_{11}H_{12}N_4O_2S$ | 265,07538 | 263,06082 | pos/neg | 12 | OUI | 12,4 | 5 | 0,999 |
| Mianserine | $C_{18}H_{20}N_2$ | 265,16993 | 263,15537 | pos | 5 | OUI | 15,2 | 0,1 | 0,994 |
| Brompyrazon | $C_{10}H_8N_3OBr$ | 265,99235 | 263,97780 | pos/neg | 7 | OUI | 13,9 | 5 | 0,993 |
| Albendazole | $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ | 266,09578 | 264,08122 | pos/neg | 7 | OUI | 15,6 | 0,5 | 0,991 |
| Streptozotocine | $C_8H_{15}N_3O_7$ | 266,09828 | 264,08372 | pos/neg | 11 | | | | |
| Oxprenolol | $C_{15}H_{23}NO_3$ | 266,17507 | 264,16052 | pos | 7 | OUI | 13,8 | 0,5 | 0,997 |
| Nevirapine | $C_{15}H_{14}N_4O$ | 267,12404 | 265,10948 | pos/neg | 10 | OUI | 13,7 | 1 | 0,997 |
| Dienestrol | $C_{18}H_{18}O_2$ | 267,13796 | 265,12340 | pos/neg | 3 | OUI | 16,1 | 100 | 0,995 |
| Atenolol | $C_{14}H_{22}N_2O_3$ | 267,17031 | 265,15577 | pos | 3 | | | | |
| Trimetazidine | $C_{14}H_{22}N_2O_3$ | 267,17032 | 265,15577 | pos | 5 | | | | |
| Tributyl-phosphate | $C_{12}H_{27}O_4P$ | 267,17197 | 265,15742 | pos | 9 | | | | |
| Desipramine | $C_{18}H_{22}N_2$ | 267,18558 | 265,17102 | pos | 1 | OUI | 16,1 | 0,1 | 0,993 |
| Tiadinil | $C_{11}H_{10}N_3OSCl$ | 268,03059 | 266,01603 | pos/neg | 7 | OUI | 19,5 | 5 | 0,997 |
| Sulfisoxazole | $C_{11}H_{13}N_3O_3S$ | 268,07504 | 266,06048 | pos/neg | 9 | OUI | 14,3 | 1 | 0,997 |
| Zidovudine | $C_{10}H_{13}N_5O_4$ | 268,10403 | 266,08948 | pos/neg | 14 | OUI | 12,4 | 50 | 0,993 |
| Vidarabine | $C_{10}H_{13}N_5O_4$ | 268,10403 | 266,08948 | pos/neg | 8 | | | | |
| Silthiofam | $C_{13}H_{21}NOSSi$ | 268,11859 | 266,10403 | pos | 9 | OUI | 21,0 | 1 | 0,991 |
| Diethofencarb | $C_{14}H_{21}NO_4$ | 268,15433 | 266,13978 | pos | 7 | OUI | 19,1 | 1 | 0,998 |
| Metoprolol | $C_{15}H_{25}NO_3$ | 268,19072 | 266,17617 | pos | 3 | OUI | 12,8 | 0,5 | 0,999 |
| Coumestrol | $C_{15}H_8O_5$ | 269,04445 | 267,02990 | pos/neg | 8 | OUI | 16,2 | 50 | 0,986 |
| Formononetine | $C_{16}H_{12}O_4$ | 269,08084 | 267,06628 | pos/neg | 9 | OUI | 17,2 | 0,1 | 0,999 |
| Diethylstilbestrol | $C_{18}H_{20}O_2$ | 269,15361 | 267,13905 | pos/neg | 4 | | | | |
| Alachlor | $C_{14}H_{20}NO_2Cl$ | 270,12553 | 268,11098 | pos | 6 | OUI | 20,6 | 1 | 0,999 |
| Sulfamethizole | $C_9H_{10}N_4O_2S_2$ | 271,03180 | 269,01724 | pos/neg | 9 | OUI | 12,8 | 5 | 0,997 |
| Genisteine | $C_{15}H_{10}O_5$ | 271,06010 | 269,04555 | pos/neg | 7 | OUI | 16,1 | 0,1 | 0,998 |
| Desmethyldiazepam | $C_{15}H_{11}N_2OCl$ | 271,06328 | 269,04871 | pos/neg | 6 | OUI | 16,8 | 0,5 | 0,998 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nitenpyram | $C_{11}H_{15}N_4O_2Cl$ | 271,09563 | 269,08108 | pos/neg | 11 | OUI | 11,7 | 5 | 0,996 |
| Tolbutamide | $C_{12}H_{18}N_2O_3S$ | 271,11109 | 269,09654 | pos/neg | 7 | OUI | 17,4 | 0,5 | 0,997 |
| Trenbolone | $C_{18}H_{22}O_2$ | 271,16925 | 269,15470 | pos | 6 | OUI | 16,9 | 1 | 0,998 |
| Estrone | $C_{18}H_{22}O_2$ | 271,16926 | 269,15470 | pos | 1 | | | | |
| Hexestrol | $C_{18}H_{22}O_2$ | 271,16926 | 269,15470 | neg | 2 | | | | |
| Dextromethorphan | $C_{18}H_{25}NO$ | 272,20089 | 270,18633 | pos | 1 | OUI | 14,9 | 0,1 | 0,994 |
| b-Naphthoflavone | $C_{19}H_{12}O_2$ | 273,09101 | 271,07645 | pos | 5 | OUI | 11,7 | 50 | 0,996 |
| Pyrinuron | $C_{13}H_{12}N_4O_3$ | 273,09822 | 271,08366 | pos/neg | 11 | OUI | 12,5 | 50 | 0,999 |
| Sotalol | $C_{12}H_{20}N_2O_3S$ | 273,12674 | 271,11218 | pos/neg | 3 | OUI | 10,2 | 50 | 0,994 |
| Spiromesifen-Metabolite-M01 | $C_{17}H_{20}O_3$ | 273,14852 | 271,13396 | pos/neg | 5 | OUI | 19,0 | 0,5 | 0,996 |
| 17a-Estradiol | $C_{18}H_{24}O_2$ | 273,18491 | 271,17035 | pos | 2 | OUI | 18,2 | 10 | 0,976 |
| Amidithion | $C_7H_{16}NO_4PS_2$ | 274,03311 | 272,01856 | pos/neg | 14 | OUI | 14,6 | 5 | 0,991 |
| Adefovir | $C_8H_{12}N_5O_4P$ | 274,06997 | 272,05541 | pos/neg | 14 | | | | |
| Zineb | $C_4H_6N_2S_4Zn$ | 274,87780 | 272,86325 | pos/neg | 2 | | | | |
| Anilazine | $C_9H_5N_4Cl_3$ | 274,96526 | 272,95070 | pos/neg | 3 | OUI | 19,6 | 5 | 0,999 |
| 19-Nortestosterone | $C_{18}H_{26}O_2$ | 275,20056 | 273,18600 | pos | 6 | OUI | 17,5 | 5 | 0,999 |
| Bromoxynil | $C_7H_3NOBr_2$ | 275,86542 | 273,85086 | neg | 4 | | | | |
| Nifuroxazide | $C_{12}H_9N_3O_5$ | 276,06150 | 274,04694 | pos/neg | 7 | OUI | 14,3 | 50 | 0,966 |
| 4-Hydroxypropranolol | $C_{16}H_{21}NO_3$ | 276,15942 | 274,14486 | pos/neg | 3 | | | | |
| 5-hydroxypropranolol | $C_{16}H_{21}NO_3$ | 276,15942 | 274,14486 | pos/neg | 3 | OUI | 16,2 | 1 | 0,998 |
| Ametoctradine | $C_{15}H_{25}N_5$ | 276,21827 | 274,20372 | pos/neg | 9 | OUI | 18,9 | 0,5 | 0,989 |
| Flutamide | $C_{11}H_{11}N_2O_3F_3$ | 277,07945 | 275,06490 | pos/neg | 4 | | | | |
| Clenbuterol | $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O$ | 277,08690 | 275,07234 | pos | 6 | OUI | 13,0 | 1 | 0,990 |
| Fenitrothion | $C_9H_{12}NO_5PS$ | 278,02466 | 276,01010 | pos/neg | 6 | OUI | 17,1 | 100 | 0,996 |
| Metazachlor | $C_{14}H_{16}N_3OCl$ | 278,10547 | 276,09091 | pos/neg | 8 | OUI | 18,0 | 0,5 | 0,997 |
| Amitriptyline | $C_{20}H_{23}N$ | 278,19033 | 276,17577 | pos | 1 | OUI | 16,5 | 0,5 | 0,992 |
| Venlafaxine | $C_{17}H_{27}NO_2$ | 278,21146 | 276,19690 | pos | 4 | OUI | 14,1 | 5 | 0,999 |
| Sulfamethazine | $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ | 279,09103 | 277,07647 | pos/neg | 11 | OUI | 12,7 | 5 | 0,999 |
| Oxadixyl | $C_{14}H_{18}N_2O_4$ | 279,13393 | 277,11938 | pos | 8 | OUI | 15,6 | 0,5 | 0,973 |
| Dibutyl-phtalate | $C_{16}H_{22}O_4$ | 279,15909 | 277,14453 | pos | 5 | | | | |
| Cidofovir | $C_8H_{14}N_3O_6P$ | 280,06930 | 278,05474 | pos/neg | 16 | | | | |
| Metalaxyl | $C_{15}H_{21}NO_4$ | 280,15433 | 278,13978 | pos | 7 | OUI | 17,4 | 0,1 | 0,989 |
| Metalaxyl-M | $C_{15}H_{21}NO_4$ | 280,15433 | 278,13978 | pos | 7 | | | | |
| Doxepine | $C_{19}H_{21}NO$ | 280,16959 | 278,15504 | pos | 11 | OUI | 15,5 | 0,1 | 0,996 |
| Sulfamethoxypyridazine | $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ | 281,07029 | 279,05573 | pos/neg | 13 | OUI | 12,8 | 0,1 | 0,999 |
| Sulfamonomethoxine | $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ | 281,07029 | 279,05573 | pos/neg | 12 | OUI | 13,3 | 0,1 | 0,999 |
| Imipramine | $C_{19}H_{24}N_2$ | 281,20123 | 279,18667 | pos | 7 | OUI | 16,3 | 0,1 | 0,990 |
| Azidithion | $C_6H_{12}N_5O_2PS_2$ | 282,02428 | 280,00973 | pos/neg | 10 | | | | |
| Fenamidone-metabolite | $C_{16}H_{15}N_3O_2$ | 282,12370 | 280,10915 | pos/neg | 7 | OUI | 16,6 | 1 | 0,998 |
| Pendimethaline | $C_{13}H_{19}N_3O_4$ | 282,14483 | 280,13028 | pos/neg | 7 | | | | |
| Procymidon | $C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$ | 284,02396 | 282,00941 | pos | 1 | | | | |
| Penconazol | $C_{13}H_{15}N_3Cl_2$ | 284,07158 | 282,05703 | pos | 3 | OUI | 20,3 | 0,5 | 0,998 |
| Metolachlor | $C_{15}H_{22}NO_2Cl$ | 284,14118 | 282,12663 | pos | 8 | OUI | 20,6 | 0,5 | 0,998 |
| Tris(2-chloroethyl)-phosphate | $C_6H_{12}O_4PCl_3$ | 284,96116 | 282,94660 | pos | 6 | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sulfachloropyridazine | $C_{10}H_9N_4O_2SCl$ | 285,02075 | 283,00619 | pos/neg | 10 | OUI | 13,6 | 5 | 0,997 |
| Biochanin-A | $C_{16}H_{12}O_5$ | 285,07575 | 283,06120 | pos/neg | 8 | OUI | 18,8 | 5 | 0,999 |
| Diazepam | $C_{16}H_{13}N_2OCl$ | 285,07892 | 283,06436 | pos | 9 | OUI | 18,3 | 1 | 0,997 |
| Metribolone | $C_{19}H_{24}O_2$ | 285,18491 | 283,17035 | pos | 4 | OUI | 17,4 | 1 | 0,999 |
| Cladribine | $C_{10}H_{12}N_5O_3Cl$ | 286,07014 | 284,05559 | pos/neg | 10 | OUI | 11,2 | 50 | 0,994 |
| Oxazepam | $C_{15}H_{11}N_2O_2Cl$ | 287,05818 | 285,04363 | pos/neg | 10 | OUI | 16,5 | 5 | 0,997 |
| Ethofumesate | $C_{13}H_{18}O_5S$ | 287,09477 | 285,08022 | pos | 5 | | | | |
| Schradan | $C_8H_{24}N_4O_3P_2$ | 287,13964 | 285,12509 | pos | 10 | OUI | 13,0 | 1 | 0,999 |
| Abacavir | $C_{14}H_{18}N_6O$ | 287,16149 | 285,14693 | pos | 6 | OUI | 11,1 | 5 | 0,995 |
| 4-Androstene-3,17-dione | $C_{19}H_{26}O_2$ | 287,20056 | 285,18600 | pos | 5 | OUI | 18,9 | 1 | 0,998 |
| Boldenone | $C_{19}H_{26}O_2$ | 287,20056 | 285,18600 | pos | 6 | OUI | 17,3 | 1 | 0,999 |
| Tenofovir | $C_9H_{14}N_5O_4P$ | 288,08562 | 286,07106 | pos/neg | 14 | | | | |
| Triclosan | $C_{12}H_7Cl_3O_2$ | 288,95844 | 286,94388 | neg | 3 | | | | |
| Myclobutanil | $C_{15}H_{17}N_4Cl$ | 289,12145 | 287,10690 | pos/neg | 6 | OUI | 19,5 | 0,5 | 0,996 |
| Imazamethabenz-methyl | $C_{16}H_{20}N_2O_3$ | 289,15467 | 287,14011 | pos/neg | 8 | OUI | 14,6 | 0,1 | 0,994 |
| Estriol | $C_{18}H_{24}O_3$ | 289,17982 | 287,16526 | pos | 1 | | | | |
| Dehydroepiandrosterone | $C_{19}H_{28}O_2$ | 289,21621 | 287,20165 | pos | 3 | | | | |
| Testosterone | $C_{19}H_{28}O_2$ | 289,21621 | 287,20165 | pos | 7 | OUI | 18,1 | 0,5 | 0,999 |
| Isocarbophos | $C_{11}H_{16}NO_4PS$ | 290,06104 | 288,04649 | pos/neg | 14 | OUI | 18,7 | 5 | 0,998 |
| Benzoylecgonine | $C_{16}H_{19}NO_4$ | 290,13868 | 288,12413 | pos | 7 | OUI | 12,3 | 5 | 0,999 |
| Trimethoprim | $C_{14}H_{18}N_4O_3$ | 291,14517 | 289,13061 | pos | 1 | OUI | 11,8 | 5 | 0,998 |
| Benomyl | $C_{14}H_{18}N_4O_3$ | 291,14517 | 289,13061 | pos/neg | 10 | | | | |
| Octinoxate | $C_{18}H_{26}O_3$ | 291,19547 | 289,18092 | pos | 4 | | | | |
| Epiandrosterone | $C_{19}H_{30}O_2$ | 291,23186 | 289,21730 | pos | 4 | | | | |
| Androsterone | $C_{19}H_{30}O_2$ | 291,23186 | 289,21730 | pos | 6 | | | | |
| Etiocholan-3a-ol-17-one | $C_{19}H_{30}O_2$ | 291,23186 | 289,21730 | pos | 3 | | | | |
| Dihydrotestosterone | $C_{19}H_{30}O_2$ | 291,23186 | 289,21730 | pos | 3 | OUI | 19,5 | 10 | 0,984 |
| Thiamethoxam | $C_8H_{10}ClN_5O_3S$ | 292,02656 | 290,01201 | pos/neg | 9 | OUI | 12,8 | 10 | 0,988 |
| Parathion | $C_{10}H_{14}NO_5PS$ | 292,04031 | 290,02575 | pos/neg | 8 | | | | |
| Crufomate | $C_{12}H_{19}NO_3PCl$ | 292,08638 | 290,07183 | pos | 7 | OUI | 19,6 | 50 | 0,902 |
| Naptalam | $C_{18}H_{13}NO_3$ | 292,09682 | 290,08227 | pos/neg | 12 | OUI | 16,3 | 5 | 0,983 |
| Cyproconazol | $C_{15}H_{18}N_3OCl$ | 292,12112 | 290,10656 | pos/neg | 6 | OUI | 19,0 | 0,1 | 0,998 |
| Chlorbromuron | $C_9H_{10}N_2O_2ClBr$ | 292,96869 | 290,95414 | pos/neg | 11 | OUI | 19,3 | 5 | 1,000 |
| Etrimfos | $C_{10}H_{17}N_2O_4PS$ | 293,07194 | 291,05739 | pos/neg | 12 | OUI | 21,7 | 50 | 0,865 |
| 17b-diol5a-androstane-3a | $C_{19}H_{32}O_2$ | 293,24751 | 291,23295 | non ionisable | 3 | | | | |
| Paclobutrazol | $C_{15}H_{20}N_3OCl$ | 294,13677 | 292,12221 | pos/neg | 4 | | | | |
| Ondansetron | $C_{18}H_{19}N_3O$ | 294,16009 | 292,14553 | pos | 4 | OUI | 13,6 | 0,5 | 0,996 |
| Amitraz | $C_{19}H_{23}N_3$ | 294,19648 | 292,18192 | pos | 4 | | | | |
| Triamiphos | $C_{12}H_{19}N_6OP$ | 295,14307 | 293,12852 | pos | 6 | OUI | 15,9 | 0,1 | 0,998 |
| Diclofenac | $C_{14}H_{11}NO_2Cl_2$ | 296,02396 | 294,00941 | pos/neg | 15 | OUI | 20,0 | 5 | 1,000 |
| Mebendazole | $C_{16}H_{13}N_3O_3$ | 296,10297 | 294,08841 | pos/neg | 8 | OUI | 15,6 | 0,5 | 0,996 |
| Norfluoxetine | $C_{16}H_{16}NOF_3$ | 296,12568 | 294,11112 | pos | 3 | OUI | 16,5 | 5 | 0,997 |
| Imazalil | $C_{14}H_{14}N_2OCl_2$ | 297,05560 | 295,04104 | pos | 1 | OUI | 16,1 | 0,1 | 0,995 |
| Trifluorothymidine | $C_{10}H_{11}N_2O_5F_3$ | 297,06928 | 295,05473 | pos/neg | 10 | | | | |
| 17a-Ethinylestradiol | $C_{20}H_{24}O_2$ | 297,18491 | 295,17035 | pos | 4 | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hydrochlorothiazide | $C_7H_8N_3O_4S_2Cl$ | 297,97175 | 295,95720 | pos/neg | 20 | | | | |
| Cythioate | $C_8H_{12}NO_5PS_2$ | 297,99673 | 295,98217 | pos/neg | 11 | OUI | 16,1 | 50 | 0,998 |
| Nelarabine | $C_{11}H_{15}N_5O_5$ | 298,11460 | 296,10004 | pos/neg | 13 | OUI | 10,2 | 50 | 0,995 |
| Tridemorph | $C_{19}H_{39}NO$ | 298,31044 | 296,29589 | pos | 4 | | | | |
| Quinalphos | $C_{12}H_{15}N_2O_3PS$ | 299,06138 | 297,04682 | pos/neg | 7 | OUI | 21,3 | 1 | 0,996 |
| Carazolol | $C_{18}H_{22}N_2O_2$ | 299,17540 | 297,16085 | pos | 4 | OUI | 14,0 | 0,5 | 0,998 |
| 19-Norethindrone | $C_{20}H_{26}O_2$ | 299,20056 | 297,18600 | pos | 2 | OUI | 15,4 | 1 | 0,999 |
| Fenbendazole | $C_{15}H_{13}N_3O_2S$ | 300,08013 | 298,06557 | pos/neg | 12 | OUI | 17,2 | 0,5 | 0,998 |
| Metoclopramide | $C_{14}H_{22}N_3O_2Cl$ | 300,14733 | 298,13278 | pos | 6 | OUI | 12,6 | 0,5 | 0,995 |
| Codeine | $C_{18}H_{21}NO_3$ | 300,15942 | 298,14487 | pos | 10 | OUI | 10,9 | 5 | 0,997 |
| Tazobactam | $C_{10}H_{12}N_4O_5S$ | 301,06012 | 299,04556 | pos/neg | 8 | | | | |
| Sulfaquinoxaline | $C_{14}H_{12}N_4O_2S$ | 301,07538 | 299,06082 | pos/neg | 12 | OUI | 15,0 | 5 | 0,998 |
| Bifenazate | $C_{17}H_{20}N_2O_3$ | 301,15467 | 299,14012 | pos | 8 | OUI | 20,2 | 10 | 0,916 |
| Fenhexamid | $C_{14}H_{17}NO_2Cl_2$ | 302,07091 | 300,05636 | pos/neg | 4 | OUI | 19,8 | 5 | 0,999 |
| Fenoxycarb | $C_{17}H_{19}NO_4$ | 302,13868 | 300,12413 | pos | 3 | OUI | 20,5 | 5 | 0,999 |
| Trihexyphenidyl | $C_{20}H_{31}NO$ | 302,24784 | 300,23328 | pos | 1 | OUI | 16,3 | 0,1 | 0,994 |
| Methidathion | $C_6H_{11}N_2O_4PS_3$ | 302,96913 | 300,95458 | pos | 5 | OUI | 19,0 | 10 | 0,991 |
| Clofentezine | $C_{14}H_8N_4Cl_2$ | 303,01988 | 301,00533 | pos | 4 | OUI | 22,2 | 50 | 0,989 |
| Quercetin | $C_{15}H_{10}O_7$ | 303,04993 | 301,03538 | pos/neg | 11 | | | | |
| Olsalazine | $C_{14}H_{10}N_2O_6$ | 303,06116 | 301,04661 | pos/neg | 14 | OUI | 19,6 | 100 | 0,991 |
| Cumyluron | $C_{17}H_{19}N_2OCl$ | 303,12587 | 301,11131 | pos/neg | 11 | OUI | 19,5 | 0,5 | 0,994 |
| 17a-Methyltestosterone | $C_{20}H_{30}O_2$ | 303,23186 | 301,21730 | pos | 4 | OUI | 18,8 | 1 | 0,999 |
| Norflurazon | $C_{12}H_9N_3OClF_3$ | 304,04590 | 302,03134 | pos/neg | 5 | OUI | 17,7 | 1 | 0,996 |
| Cyanofenphos | $C_{15}H_{14}NO_2PS$ | 304,05556 | 302,04101 | pos/neg | 10 | OUI | 22,1 | 500 | 0,942 |
| Fenoterol | $C_{17}H_{21}NO_4$ | 304,15433 | 302,13978 | pos/neg | 8 | OUI | 13,5 | 0,5 | 0,987 |
| Cocaine | $C_{17}H_{21}NO_4$ | 304,15433 | 302,13978 | pos | 9 | OUI | 13,5 | 0,5 | 0,987 |
| Fenpropimorph | $C_{20}H_{33}NO$ | 304,26349 | 302,24894 | pos | 6 | OUI | 17,6 | 0,5 | 0,997 |
| Melphalan | $C_{13}H_{18}N_2O_2Cl_2$ | 305,08181 | 303,06726 | pos/neg | 6 | OUI | 14,4 | 10 | 0,995 |
| Diazinon | $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ | 305,10833 | 303,09377 | pos | 4 | | | | |
| Sertraline | $C_{17}H_{17}NCl_2$ | 306,08108 | 304,06653 | pos | 2 | OUI | 16,9 | 1 | 0,995 |
| Pirimiphos-methyl | $C_{11}H_{20}N_3O_3PS$ | 306,10358 | 304,08902 | pos/neg | 15 | OUI | 21,7 | 0,5 | 0,995 |
| Imazamox | $C_{15}H_{19}N_3O_4$ | 306,14483 | 304,13028 | pos/neg | 12 | OUI | 13,5 | 0,5 | 0,999 |
| Fluconazole | $C_{13}H_{12}N_6OF_2$ | 307,11134 | 305,09679 | pos/neg | 8 | OUI | 13,0 | 5 | 0,999 |
| Tebuconazole | $C_{16}H_{22}N_3OCl$ | 308,15242 | 306,13786 | pos/neg | 8 | OUI | 20,0 | 0,5 | 0,998 |
| Zolpidem | $C_{19}H_{21}N_3O$ | 308,17574 | 306,16119 | pos | 8 | OUI | 13,7 | 0,5 | 0,999 |
| Buflomedil | $C_{17}H_{25}NO_4$ | 308,18563 | 306,17108 | pos | 2 | OUI | 13,4 | 0,1 | 0,994 |
| Betaxolol | $C_{18}H_{29}NO_3$ | 308,22202 | 306,20746 | pos | 1 | OUI | 14,9 | 1 | 0,995 |
| Alprazolam | $C_{17}H_{13}N_4Cl$ | 309,09015 | 307,07560 | pos | 10 | OUI | 16,8 | 1 | 0,967 |
| Warfarine | $C_{19}H_{16}O_4$ | 309,11214 | 307,09758 | pos/neg | 15 | OUI | 18,9 | 0,1 | 0,996 |
| Glyodine | $C_{20}H_{40}N_2$ | 309,32642 | 307,31187 | pos | 7 | | | | |
| Fluoxetine | $C_{17}H_{18}NOF_3$ | 310,14133 | 308,12677 | pos | 3 | OUI | 16,7 | 0,5 | 0,998 |
| Nadolol | $C_{17}H_{27}NO_4$ | 310,20128 | 308,18673 | pos/neg | 10 | OUI | 11,5 | 5 | 0,996 |
| Diflubenzuron | $C_{14}H_9N_2O_2F_2Cl$ | 311,03934 | 309,02478 | pos/neg | 5 | OUI | 20,2 | 50 | 0,998 |
| Sulfadimethoxine | $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ | 311,08086 | 309,06630 | pos/neg | 13 | OUI | 15,0 | 1 | 0,998 |
| Desloratadine | $C_{19}H_{19}N_2Cl$ | 311,13095 | 309,11640 | pos | 4 | OUI | 13,2 | 1 | 0,992 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Altrenogest | $C_{21}H_{26}O_2$ | 311,20056 | 309,18600 | pos | 7 | OUI | 19,4 | 1 | 0,996 |
| Mestranol | $C_{21}H_{26}O_2$ | 311,20056 | 309,18600 | pos | 2 | OUI | 22,1 | 50 | 0,965 |
| Thiosultap | $C_5H_{13}NO_6S_4$ | 311,96985 | 309,95529 | pos/neg | 19 | | | | |
| Metamizole | $C_{13}H_{17}N_3O_4S$ | 312,10126 | 310,08670 | neg | 1 | | | | |
| Fenamidone | $C_{17}H_{17}N_3OS$ | 312,11651 | 310,10196 | pos | 7 | OUI | 19,6 | 0,1 | 0,997 |
| Diclocymet | $C_{15}H_{18}N_2OCl_2$ | 313,08690 | 311,07234 | pos/neg | 8 | OUI | 20,9 | 5 | 0,987 |
| Benzyl-butyl-phtalate | $C_{19}H_{20}O_4$ | 313,14343 | 311,12888 | pos | 6 | | | | |
| Olanzapine | $C_{17}H_{20}N_4S$ | 313,14814 | 311,13359 | pos | 7 | OUI | 11,0 | 50 | 0,995 |
| Oseltamivir | $C_{16}H_{28}N_2O_4$ | 313,21218 | 311,19763 | pos/neg | 16 | OUI | 14,1 | 0,5 | 0,975 |
| Norgestrel | $C_{21}H_{28}O_2$ | 313,21621 | 311,20165 | pos | 2 | OUI | 19,5 | 500 | 0,992 |
| Isazophos | $C_9H_{17}N_3O_3PSCl$ | 314,04895 | 312,03440 | pos | 5 | OUI | 21,1 | 0,5 | 0,997 |
| Triazophos | $C_{12}H_{16}N_3O_3PS$ | 314,07228 | 312,05772 | pos/neg | 9 | OUI | 20,5 | 1 | 0,996 |
| Hexaconazole | $C_{14}H_{17}N_3OCl_2$ | 314,08214 | 312,06759 | pos/neg | 7 | OUI | 20,3 | 0,5 | 0,998 |
| Flubendazole | $C_{16}H_{12}N_3O_3F$ | 314,09355 | 312,07899 | pos/neg | 6 | OUI | 16,1 | 0,5 | 0,998 |
| Triclocarban | $C_{13}H_9N_2OCl_3$ | 314,98532 | 312,97077 | pos/neg | 11 | | | | |
| Sulfaphenazole | $C_{15}H_{14}N_4O_2S$ | 315,09103 | 313,07647 | pos/neg | 8 | OUI | 15,2 | 5 | 0,998 |
| Ranitidine | $C_{13}H_{22}N_4O_3S$ | 315,14854 | 313,13398 | pos/neg | 9 | OUI | 10,3 | 10 | 0,992 |
| Progesterone | $C_{21}H_{30}O_2$ | 315,23186 | 313,21730 | pos | 5 | OUI | 21,2 | 5 | 0,992 |
| Bromazepam | $C_{14}H_{10}N_3OBr$ | 316,00800 | 313,99345 | pos | 5 | OUI | 13,2 | 5 | 0,990 |
| Clonazepam | $C_{15}H_{10}N_3O_3Cl$ | 316,04835 | 314,03379 | pos/neg | 13 | OUI | 16,9 | 1 | 0,994 |
| Oxfendazole | $C_{15}H_{13}N_3O_3S$ | 316,07504 | 314,06048 | pos/neg | 13 | OUI | 13,9 | 0,5 | 0,998 |
| Fotemustine | $C_9H_{19}N_3O_5PCl$ | 316,08236 | 314,06781 | pos | 15 | OUI | 16,1 | 0,5 | 0,983 |
| Flusilazole | $C_{16}H_{15}N_3F_2Si$ | 316,10760 | 314,09305 | pos | 2 | OUI | 20,1 | 0,5 | 0,995 |
| Timolol | $C_{13}H_{24}N_4O_3S$ | 317,16419 | 315,14963 | pos | 2 | OUI | 12,6 | 5 | 0,999 |
| Bupirimate | $C_{13}H_{24}N_4O_3S$ | 317,16419 | 315,14963 | pos/neg | 15 | OUI | 18,6 | 0,5 | 0,998 |
| Acide Fenofibrique | $C_{17}H_{15}O_4Cl$ | 319,07317 | 317,05861 | pos/neg | 6 | OUI | 20,0 | 5 | 0,999 |
| Fluvoxamine | $C_{15}H_{21}N_2O_2F_3$ | 319,16279 | 317,14823 | pos | 1 | OUI | 16,2 | 0,5 | 0,996 |
| Norfloxacine | $C_{16}H_{18}N_3O_3F$ | 320,14050 | 318,12594 | pos/neg | 12 | OUI | 12,0 | 5 | 0,995 |
| Lorazepam | $C_{15}H_{10}N_2O_2Cl_2$ | 321,01921 | 319,00466 | pos/neg | 10 | OUI | 16,8 | 1 | 0,999 |
| Ethaboxam | $C_{14}H_{16}N_4OS_2$ | 321,08383 | 319,06928 | pos/neg | 10 | OUI | 16,4 | 1 | 0,996 |
| Iprovalicarb | $C_{18}H_{28}N_2O_3$ | 321,21727 | 319,20272 | pos | 4 | OUI | 19,4 | 0,5 | 0,995 |
| Chlorpyrifos-methyl | $C_7H_7Cl_3NO_3PS$ | 321,90226 | 319,88770 | pos | 1 | OUI | 19,4 | 100 | 0,996 |
| Flamprop | $C_{16}H_{13}NO_3FCl$ | 322,06408 | 320,04952 | pos/neg | 17 | OUI | 18,3 | 5 | 0,996 |
| Clopidogrel | $C_{16}H_{16}NO_2SCl$ | 322,06630 | 320,05175 | pos | 5 | OUI | 19,4 | 0,5 | 0,998 |
| Pyriproxyfen | $C_{20}H_{19}NO_3$ | 322,14377 | 320,12922 | pos | 4 | OUI | 23,7 | 5 | 0,966 |
| Famciclovir | $C_{14}H_{19}N_5O_4$ | 322,15098 | 320,13643 | pos/neg | 12 | OUI | 11,8 | 5 | 0,998 |
| Chloramphenicol | $C_{11}H_{12}N_2O_5Cl_2$ | 323,01961 | 321,00505 | pos/neg | 7 | | | | |
| Dinitramine | $C_{11}H_{13}N_4O_4F_3$ | 323,09617 | 321,08161 | pos/neg | 7 | OUI | 21,8 | 50 | 0,992 |
| Benodanil | $C_{13}H_{10}NOI$ | 323,98798 | 321,97343 | pos/neg | 9 | OUI | 18,6 | 5 | 0,999 |
| Clomeprop | $C_{16}H_{15}NO_2Cl_2$ | 324,05526 | 322,04071 | pos/neg | 5 | OUI | 23,0 | 50 | 0,985 |
| Thenylchlor | $C_{16}H_{18}NO_2SCl$ | 324,08195 | 322,06740 | pos | 12 | OUI | 20,7 | 1 | 0,998 |
| Cyamemazine | $C_{19}H_{21}N_3S$ | 324,15290 | 322,13834 | pos | 2 | OUI | 16,2 | 0,5 | 0,993 |
| Cyazofamide | $C_{13}H_{13}N_4O_2SCl$ | 325,05205 | 323,03750 | pos/neg | 6 | OUI | 21,3 | 5 | 0,999 |
| Prazepam | $C_{19}H_{17}N_2OCl$ | 325,11022 | 323,09566 | pos | 7 | OUI | 20,5 | 0,5 | 0,997 |
| Furaltadone | $C_{13}H_{16}N_4O_6$ | 325,11426 | 323,09970 | pos/neg | 11 | OUI | 10,9 | 50 | 0,883 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Valacyclovir | $C_{13}H_{20}N_6O_4$ | 325,16188 | 323,14733 | pos/neg | 18 | | | | |
| Citalopram | $C_{20}H_{21}N_2OF$ | 325,17107 | 323,15651 | pos | 1 | OUI | 15,3 | 0,5 | 0,994 |
| Benalaxyl | $C_{20}H_{23}NO_3$ | 326,17507 | 324,16052 | pos | 6 | OUI | 21,5 | 0,5 | 0,998 |
| Norpropoxyphene | $C_{21}H_{27}NO_2$ | 326,21146 | 324,19690 | pos | 3 | OUI | 16,3 | 1 | 0,995 |
| Bisoprolol | $C_{18}H_{31}NO_4$ | 326,23259 | 324,21803 | pos | 1 | OUI | 14,1 | 0,5 | 0,998 |
| TCPP | $C_9H_{18}O_4PCl_3$ | 327,00811 | 324,99355 | pos | 7 | | | | |
| Triphenyl-phosphate | $C_{18}H_{15}O_4P$ | 327,07807 | 325,06352 | pos | 4 | | | | |
| Clozapine | $C_{18}H_{19}N_4Cl$ | 327,13710 | 325,12255 | pos | 7 | OUI | 14,1 | 1 | 0,995 |
| Dimoxystrobine | $C_{19}H_{22}N_2O_3$ | 327,17031 | 325,15576 | pos | 11 | OUI | 20,8 | 0,5 | 0,981 |
| 1-Docosanol | $C_{22}H_{46}O$ | 327,36214 | 325,34759 | non ionisable | 0 | | | | |
| Paracetamol-glucuronide | $C_{14}H_{17}NO_8$ | 328,10269 | 326,08813 | pos/neg | 8 | OUI | 13,8 | 50 | 0,547 |
| Loxapine | $C_{18}H_{18}N_3OCl$ | 328,12112 | 326,10656 | pos | 5 | OUI | 15,6 | 1 | 0,978 |
| Sulcotrione | $C_{14}H_{13}O_5SCl$ | 329,02450 | 327,00995 | pos/neg | 13 | OUI | 16,5 | 5 | 0,995 |
| Pencycuron | $C_{19}H_{21}ClN_2O$ | 329,14152 | 327,12696 | pos/neg | 4 | | | | |
| Iprodione | $C_{13}H_{13}N_3O_3Cl_2$ | 330,04067 | 328,02612 | pos/neg | 5 | | | | |
| Epoxiconazole | $C_{17}H_{13}N_3OFCl$ | 330,08039 | 328,06584 | pos | 5 | OUI | 19,7 | 1 | 0,998 |
| Paroxetine | $C_{19}H_{20}NO_3F$ | 330,15000 | 328,13545 | pos | 2 | OUI | 15,9 | 0,5 | 0,998 |
| Chlorthal-dimethyl | $C_{10}H_6O_4Cl_4$ | 330,90930 | 328,89474 | non ionisable | 0 | | | | |
| Urbacid | $C_7H_{15}N_2S_4As$ | 330,94068 | 328,92613 | pos | 2 | OUI | 15,8 | 100 | 0,735 |
| Furosemide | $C_{12}H_{11}N_2O_5SCl$ | 331,01500 | 329,00044 | pos/neg | 6 | | | | |
| Malathion | $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ | 331,04334 | 329,02879 | pos | 8 | OUI | 20,4 | 5 | 0,997 |
| Bexarotene | $C_{24}H_{26}O$ | 331,20564 | 329,19109 | non ionisable | 0 | | | | |
| Hydroxyprogesterone | $C_{21}H_{30}O_3$ | 331,22677 | 329,21222 | pos | 9 | OUI | 19,1 | 1 | 0,999 |
| Deoxycorticosterone | $C_{21}H_{30}O_3$ | 331,22677 | 329,21222 | pos | 9 | OUI | 18,5 | 0,1 | 0,999 |
| Piroxicam | $C_{15}H_{13}N_3O_4S$ | 332,06995 | 330,05540 | pos/neg | 10 | OUI | 16,5 | 0,5 | 0,998 |
| Ciprofloxacine | $C_{17}H_{18}N_3O_3F$ | 332,14050 | 330,12594 | pos/neg | 7 | OUI | 12,2 | 5 | 0,978 |
| Tetramethrine | $C_{19}H_{25}NO_4$ | 332,18563 | 330,17108 | pos | 9 | OUI | 23,5 | 50 | 0,978 |
| Dichlofluanid | $C_9H_{11}N_2O_2S_2FCl_2$ | 332,96958 | 330,95503 | pos | 2 | | | | |
| Clorazepate | $C_{16}H_{13}N_2O_4Cl$ | 333,06367 | 331,04911 | pos/neg | 8 | OUI | 16,8 | 0,5 | 0,998 |
| Sanguinarine | $C_{20}H_{14}NO_4$ | 333,09956 | 331,08501 | pos | 3 | OUI | 14,8 | 5 | 0,989 |
| Spectinomycine | $C_{14}H_{24}N_2O_7$ | 333,16563 | 331,15107 | pos/neg | 14 | | | | |
| Fenoxaprop | $C_{16}H_{12}NO_5Cl$ | 334,04768 | 332,03312 | pos/neg | 13 | OUI | 19,9 | 100 | 0,877 |
| Pyrimiphos-ethyl | $C_{13}H_{24}N_3O_3PS$ | 334,13488 | 332,12032 | pos | 3 | OUI | 23,6 | 0,5 | 0,985 |
| Diflufenzopyr | $C_{15}H_{12}N_4O_3F_2$ | 335,09502 | 333,08047 | pos/neg | 21 | OUI | 16,3 | 5 | 0,995 |
| Penicilline-G | $C_{16}H_{18}N_2O_4S$ | 335,10600 | 333,09145 | pos/neg | 15 | OUI | 12,0 | 5 | 0,998 |
| Trifluraline | $C_{13}H_{16}N_3O_4F_3$ | 336,11657 | 334,10201 | pos | 1 | | | | |
| Fenbuconazol | $C_{19}H_{17}N_4Cl$ | 337,12145 | 335,10690 | pos/neg | 4 | OUI | 20,3 | 5 | 0,997 |
| Acebutolol | $C_{18}H_{28}N_2O_4$ | 337,21218 | 335,19763 | pos/neg | 8 | OUI | 12,7 | 0,5 | 0,999 |
| Benzoylprop | $C_{16}H_{13}NO_3Cl_2$ | 338,03453 | 336,01997 | pos/neg | 19 | OUI | 19,1 | 5 | 0,999 |
| Famotidine | $C_8H_{15}N_7O_2S_3$ | 338,05221 | 336,03766 | pos/neg | 15 | OUI | 10,1 | 50 | 0,995 |
| Linezolid | $C_{16}H_{20}N_3O_4F$ | 338,15106 | 336,13651 | pos/neg | 6 | OUI | 13,7 | 1 | 0,999 |
| Bitertanol | $C_{20}H_{23}N_3O_2$ | 338,18630 | 336,17175 | pos | 7 | OUI | 20,5 | 5 | 0,989 |
| Dimefuron | $C_{15}H_{19}N_4O_3Cl$ | 339,12185 | 337,10729 | pos/neg | 10 | OUI | 18,4 | 1 | 0,997 |
| Piperonyl-butoxide | $C_{19}H_{30}O_5$ | 339,21660 | 337,20205 | pos | 6 | | | | |
| Trichlamide | $C_{13}H_{16}NO_3Cl_3$ | 340,02685 | 338,01230 | pos/neg | 13 | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mesotrione | $C_{14}H_{13}NO_7S$ | 340,04855 | 338,03400 | pos/neg | 13 | OUI | 16,2 | 10 | 0,981 |
| Perindoprilat | $C_{17}H_{28}N_2O_5$ | 341,20710 | 339,19254 | pos/neg | 5 | OUI | 12,6 | 5 | 0,849 |
| Propiconazole | $C_{15}H_{17}N_3O_2Cl_2$ | 342,07706 | 340,06251 | pos | 4 | OUI | 20,7 | 0,5 | 0,998 |
| Boscalid | $C_{18}H_{12}N_2OCl_2$ | 343,03995 | 341,02539 | pos/neg | 2 | OUI | 19,9 | 5 | 1,000 |
| Methoxychlor | $C_{16}H_{15}O_2Cl_3$ | 345,02104 | 343,00649 | non ionisable | 0 | | | | |
| Quizalofop-p | $C_{17}H_{13}N_2O_4Cl$ | 345,06366 | 343,04911 | pos/neg | 13 | OUI | 19,7 | 5 | 0,999 |
| Clotrimazole | $C_{22}H_{17}N_2Cl$ | 345,11531 | 343,10075 | pos | 3 | OUI | 17,1 | 0,5 | 0,999 |
| Medroxyprogesterone | $C_{22}H_{32}O_3$ | 345,24242 | 343,22787 | pos | 8 | OUI | 20,1 | 5 | 0,993 |
| Azinphos-ethyl | $C_{12}H_{16}N_3O_3PS_2$ | 346,04435 | 344,02979 | pos/neg | 17 | OUI | 20,8 | 5 | 1,000 |
| Omeprazole | $C_{17}H_{19}N_3O_3S$ | 346,12199 | 344,10744 | pos/neg | 8 | OUI | 16,0 | 50 | 0,998 |
| Tolylfluanide | $C_{10}H_{13}N_2O_2S_2FCl_2$ | 346,98523 | 344,97068 | pos | 7 | | | | |
| Oryzaline | $C_{12}H_{18}N_4O_6S$ | 347,10198 | 345,08742 | pos/neg | 11 | OUI | 20,5 | 50 | 0,992 |
| Corticosterone | $C_{21}H_{30}O_4$ | 347,22169 | 345,20713 | pos/neg | 9 | OUI | 16,7 | 1 | 0,999 |
| Cefalexine | $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ | 348,10126 | 346,08670 | pos/neg | 10 | | | | |
| Enalaprilat | $C_{18}H_{24}N_2O_5$ | 349,17580 | 347,16124 | pos/neg | 6 | OUI | 12,2 | 5 | 0,991 |
| Chlorpyrifos | $C_9H_{11}NO_3PSCl_3$ | 349,93356 | 347,91900 | pos | 1 | | | | |
| Fentrazamide | $C_{16}H_{20}N_5O_2Cl$ | 350,13783 | 348,12328 | pos | 10 | OUI | 22,1 | 1 | 0,988 |
| Penicilline-V | $C_{16}H_{18}N_2O_5S$ | 351,10092 | 349,08636 | pos/neg | 14 | OUI | 16,4 | 5 | 0,998 |
| Estrone-3-sulfate | $C_{18}H_{22}O_5S$ | 351,12607 | 349,11152 | pos/neg | 12 | | | | |
| Prodiamine | $C_{13}H_{17}N_4O_4F_3$ | 351,12747 | 349,11291 | pos/neg | 6 | | | | |
| Benfluorex | $C_{19}H_{20}NO_2F_3$ | 352,15189 | 350,13734 | pos | 6 | OUI | 16,8 | 0,5 | 0,997 |
| Dichloraluree | $C_5H_6N_2O_3Cl_6$ | 352,85823 | 350,84368 | pos/neg | 15 | | | | |
| Hexythiazox | $C_{17}H_{21}N_2O_2SCl$ | 353,10850 | 351,09395 | pos | 1 | OUI | 24,1 | 50 | 0,973 |
| Tebufenozide | $C_{22}H_{28}N_2O_2$ | 353,22235 | 351,20780 | pos/neg | 12 | OUI | 21,1 | 5 | 0,995 |
| Ibacitabine | $C_9H_{12}N_3O_4I$ | 353,99453 | 351,97997 | pos/neg | 12 | | | | |
| Idoxuridine | $C_9H_{11}N_2O_5I$ | 354,97854 | 352,96399 | pos/neg | 10 | | | | |
| Thiodicarb | $C_{10}H_{18}N_4O_4S_3$ | 355,05629 | 353,04174 | pos | 5 | OUI | 16,5 | 0,5 | 0,968 |
| Valganciclovir | $C_{14}H_{22}N_6O_5$ | 355,17244 | 353,15789 | pos/neg | 15 | | | | |
| Iminoctadine | $C_{18}H_{41}N_7$ | 356,34962 | 354,33507 | pos | 5 | | | | |
| Florfenicol | $C_{12}H_{14}NO_4SFCl_2$ | 358,00774 | 355,99319 | pos/neg | 13 | OUI | 14,0 | 50 | 0,990 |
| Rosiglitazone | $C_{18}H_{19}N_3O_3S$ | 358,12199 | 356,10744 | pos/neg | 8 | OUI | 13,3 | 0,5 | 0,997 |
| Danofloxacine | $C_{19}H_{20}N_3O_3F$ | 358,15614 | 356,14159 | pos/neg | 5 | OUI | 12,4 | 5 | 0,978 |
| Chlorfenvinphos | $C_{12}H_{14}O_4PCl_3$ | 358,97681 | 356,96225 | pos | 6 | OUI | 21,2 | 5 | 0,992 |
| Prednisone | $C_{21}H_{26}O_5$ | 359,18530 | 357,17075 | pos/neg | 16 | OUI | 15,3 | 5 | 0,999 |
| Isoxaflutole | $C_{15}H_{12}NO_4SF_3$ | 360,05119 | 358,03664 | pos/neg | 6 | | | | |
| Capecitabine | $C_{15}H_{22}N_3O_6F$ | 360,15654 | 358,14199 | pos/neg | 15 | OUI | 15,1 | 1 | 0,999 |
| Enrofloxacine | $C_{19}H_{22}N_3O_3F$ | 360,17180 | 358,15724 | pos/neg | 13 | OUI | 12,6 | 5 | 0,995 |
| Pyraclofos | $C_{14}H_{18}N_2O_3PSCl$ | 361,05370 | 359,03915 | pos | 10 | OUI | 21,7 | 10 | 0,982 |
| Fenofibrate | $C_{20}H_{21}O_4Cl$ | 361,12012 | 359,10556 | pos | 3 | OUI | 24,1 | 100 | 0,955 |
| Aldosterone | $C_{21}H_{28}O_5$ | 361,20095 | 359,18640 | pos/neg | 14 | OUI | 14,8 | 5 | 0,999 |
| Prednisolone | $C_{21}H_{28}O_5$ | 361,20095 | 359,18640 | pos/neg | 7 | OUI | 15,3 | 5 | 0,999 |
| Cortisone | $C_{21}H_{28}O_5$ | 361,20095 | 359,18640 | pos/neg | 12 | OUI | 15,5 | 1 | 0,992 |
| Bezafibrate | $C_{19}H_{20}NO_4Cl$ | 362,11537 | 360,10081 | pos/neg | 12 | OUI | 18,2 | 5 | 0,999 |
| Omeprazole-sulfone | $C_{17}H_{19}N_3O_4S$ | 362,11691 | 360,10235 | pos/neg | 8 | | | | |
| 5-hydroxyomeprazole | $C_{17}H_{19}N_3O_4S$ | 362,11691 | 360,10235 | pos/neg | 15 | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ofloxacine | $C_{18}H_{20}N_3O_4F$ | 362,15106 | 360,13651 | pos/neg | 6 | OUI | 12,0 | 5 | 0,996 |
| Coumaphos | $C_{14}H_{16}O_5PSCl$ | 363,02174 | 361,00718 | pos | 3 | OUI | 22,2 | 10 | 0,979 |
| Pyrasulfotole | $C_{14}H_{13}N_2O_4SF_3$ | 363,06209 | 361,04754 | pos/neg | 16 | OUI | 14,6 | 1 | 0,996 |
| Marbofloxacine | $C_{17}H_{19}N_4O_4F$ | 363,14631 | 361,13176 | pos/neg | 10 | OUI | 11,8 | 5 | 0,999 |
| 2-Ethylhexyl-diphenyl-phosphate | $C_{20}H_{27}O_4P$ | 363,17197 | 361,15742 | pos | 6 | | | | |
| Hydrocortisone | $C_{21}H_{30}O_5$ | 363,21660 | 361,20205 | pos/neg | 13 | OUI | 15,4 | 1 | 0,999 |
| Amoxicilline | $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ | 366,11182 | 364,09726 | pos/neg | 11 | | | | |
| Drospirenone | $C_{24}H_{30}O_3$ | 367,22677 | 365,21222 | pos | 4 | OUI | 19,2 | 50 | 0,997 |
| Cefaclor | $C_{15}H_{14}N_3O_4SCl$ | 368,04663 | 366,03207 | pos/neg | 8 | OUI | 11,1 | 50 | 0,999 |
| Diacerein | $C_{19}H_{12}O_8$ | 369,06050 | 367,04594 | pos/neg | 6 | | | | |
| Tritolyl-phosphate | $C_{21}H_{21}O_4P$ | 369,12502 | 367,11047 | pos | 7 | | | | |
| Methoxyfenozide | $C_{22}H_{28}N_2O_3$ | 369,21727 | 367,20272 | pos/neg | 7 | OUI | 20,3 | 0,5 | 0,998 |
| Perindopril | $C_{19}H_{32}N_2O_5$ | 369,23840 | 367,22384 | pos/neg | 8 | OUI | 14,8 | 0,1 | 0,998 |
| Amidosulfuron | $C_9H_{15}N_5O_7S_2$ | 370,04857 | 368,03401 | pos/neg | 16 | OUI | 16,9 | 5 | 0,995 |
| Thiophanate | $C_{14}H_{18}N_4O_4S_2$ | 371,08422 | 369,06967 | pos/neg | 16 | OUI | 18,2 | 5 | 0,997 |
| Thioridazine | $C_{21}H_{26}N_2S_2$ | 371,16102 | 369,14646 | pos | 5 | OUI | 17,8 | 5 | 0,988 |
| Tamoxifen | $C_{26}H_{29}NO$ | 372,23219 | 370,21764 | pos | 1 | OUI | 19,6 | 10 | 0,971 |
| Pyrazophos | $C_{14}H_{20}N_3O_5PS$ | 374,09340 | 372,07885 | pos/neg | 12 | OUI | 22,0 | 5 | 0,982 |
| Spirotetramat | $C_{21}H_{27}NO_5$ | 374,19620 | 372,18165 | pos | 6 | OUI | 19,3 | 1 | 0,994 |
| Famoxadone | $C_{22}H_{18}N_2O_4$ | 375,13393 | 373,11938 | non ionisable | 0 | | | | |
| Hydroxyzine | $C_{21}H_{27}N_2O_2Cl$ | 375,18338 | 373,16883 | pos | 5 | OUI | 16,2 | 0,5 | 0,991 |
| 6a-Methylprednisolone | $C_{22}H_{30}O_5$ | 375,21660 | 373,20204 | pos/neg | 8 | OUI | 16,2 | 5 | 0,999 |
| Prochloraz | $C_{15}H_{16}N_3O_2Cl_3$ | 376,03809 | 374,02353 | pos | 5 | OUI | 19,0 | 5 | 0,998 |
| Haloperidol | $C_{21}H_{23}NO_2FCl$ | 376,14741 | 374,13286 | pos | 3 | OUI | 15,6 | 0,5 | 0,988 |
| b-Estradiol-3-benzoate | $C_{25}H_{28}O_3$ | 377,21112 | 375,19656 | pos | 1 | | | | |
| Pyrimidifen | $C_{20}H_{28}N_3O_2Cl$ | 378,19428 | 376,17973 | pos | 4 | OUI | 19,9 | 5 | 0,987 |
| Dieldrine | $C_{12}H_8OCl_6$ | 378,87791 | 376,86335 | non ionisable | 0 | | | | |
| Clorsulon | $C_8H_8Cl_3N_3O_4S_2$ | 379,90946 | 377,89490 | pos/neg | 7 | | | | |
| Perfluidone | $C_{14}H_{12}NO_4S_2F_3$ | 380,02326 | 378,00871 | pos/neg | 17 | OUI | 14,8 | 100 | 0,330 |
| Donepezil | $C_{24}H_{29}NO_3$ | 380,22202 | 378,20746 | pos | 5 | OUI | 14,8 | 0,1 | 0,994 |
| Methicilline | $C_{17}H_{20}N_2O_6S$ | 381,11148 | 379,09693 | pos/neg | 11 | OUI | 12,5 | 50 | 0,972 |
| Carbosulfan | $C_{20}H_{32}N_2O_3S$ | 381,22064 | 379,20609 | pos | 6 | | | | |
| Celecoxib | $C_{17}H_{14}N_3O_2SF_3$ | 382,08316 | 380,06861 | pos/neg | 11 | OUI | 20,7 | 5 | 0,996 |
| Benthiavalicarb-isopropyl | $C_{18}H_{24}N_3O_3SF$ | 382,15952 | 380,14496 | pos/neg | 10 | OUI | 18,9 | 0,5 | 0,997 |
| Fluopicolide | $C_{14}H_8N_2OF_3Cl_3$ | 382,97271 | 380,95815 | pos | 9 | OUI | 20,0 | 5 | 0,999 |
| Loratadine | $C_{22}H_{23}N_2O_2Cl$ | 383,15208 | 381,13753 | pos | 3 | OUI | 17,3 | 0,1 | 0,998 |
| Pantoprazole | $C_{16}H_{15}N_3O_4SF_2$ | 384,08241 | 382,06785 | pos/neg | 9 | OUI | 14,6 | 50 | 0,997 |
| Tolfenpyrad | $C_{21}H_{22}N_3O_2Cl$ | 384,14733 | 382,13278 | pos | 3 | OUI | 23,2 | 100 | 0,942 |
| Quetiapine | $C_{21}H_{25}N_3O_2S$ | 384,17402 | 382,15947 | pos | 6 | OUI | 14,7 | 0,5 | 0,991 |
| Nafronyl | $C_{24}H_{33}NO_3$ | 384,25332 | 382,23877 | pos | 2 | OUI | 16,9 | 0,5 | 0,995 |
| Pyraflufen | $C_{13}H_9N_2O_4F_3Cl_2$ | 384,99642 | 382,98187 | pos/neg | 15 | OUI | 19,1 | 5 | 0,999 |
| Megestrol-acetate | $C_{24}H_{32}O_4$ | 385,23734 | 383,22278 | pos | 2 | OUI | 21,1 | 5 | 0,991 |
| Sulfentrazone | $C_{11}H_{10}N_4O_3SF_2Cl_2$ | 386,98915 | 384,97460 | pos/neg | 13 | OUI | 17,1 | 10 | 0,992 |
| Thifensulfuron-methyl | $C_{12}H_{13}N_5O_6S_2$ | 388,03800 | 386,02345 | pos/neg | 11 | OUI | 16,0 | 5 | 0,994 |
| Pyraclostrobine | $C_{19}H_{18}N_3O_4Cl$ | 388,10586 | 386,09131 | pos | 9 | OUI | 22,1 | 5 | 0,990 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dimethomorph | $C_{21}H_{22}NO_4Cl$ | 388,13101 | 386,11646 | pos | 7 | OUI | 18,8 | 5 | 0,999 |
| Trimebutine | $C_{22}H_{29}NO_5$ | 388,21185 | 386,19730 | pos/neg | 7 | OUI | 15,8 | 1 | 0,998 |
| Zopiclone | $C_{17}H_{17}N_6O_3Cl$ | 389,11234 | 387,09779 | pos | 11 | OUI | 12,8 | 5 | 0,991 |
| Cetirizine | $C_{21}H_{25}N_2O_3Cl$ | 389,16265 | 387,14809 | pos/neg | 12 | OUI | 16,5 | 0,5 | 0,998 |
| Coprostanol | $C_{27}H_{48}O$ | 389,37780 | 387,36324 | non ionisable | 0 | | | | |
| Permethrine | $C_{21}H_{20}O_3Cl_2$ | 391,08623 | 389,07167 | non ionisable | 4 | | | | |
| Di-n-octyl-phtalate | $C_{24}H_{38}O_4$ | 391,28429 | 389,26973 | pos | 5 | | | | |
| DEHP | $C_{24}H_{38}O_4$ | 391,28429 | 389,26973 | pos | 7 | | | | |
| Orysastrobine | $C_{18}H_{25}N_5O_5$ | 392,19284 | 390,17829 | pos | 7 | OUI | 19,7 | 0,5 | 0,995 |
| Dexamethasone | $C_{22}H_{29}O_5F$ | 393,20718 | 391,19263 | pos/neg | 10 | OUI | 16,4 | 5 | 0,999 |
| Betamethasone | $C_{22}H_{29}O_5F$ | 393,20718 | 391,19263 | pos/neg | 7 | OUI | 16,4 | 5 | 0,999 |
| Amsacrine | $C_{21}H_{19}N_3O_3S$ | 394,12199 | 392,10744 | pos/neg | 9 | OUI | 14,3 | 0,5 | 0,994 |
| Diflufenican | $C_{19}H_{11}N_2O_2F_5$ | 395,08135 | 393,06679 | pos/neg | 4 | OUI | 22,6 | 50 | 0,974 |
| Cefalotine | $C_{16}H_{16}N_2O_6S_2$ | 397,05225 | 395,03770 | pos/neg | 15 | OUI | 14,9 | 5 | 0,999 |
| Fluopyram | $C_{16}H_{11}N_2OF_6Cl$ | 397,05369 | 395,03913 | pos/neg | 8 | OUI | 20,1 | 1 | 0,996 |
| Sulfasalazine | $C_{18}H_{14}N_4O_5S$ | 399,07577 | 397,06121 | pos/neg | 6 | OUI | 16,0 | 10 | 0,998 |
| Valifenalate | $C_{19}H_{27}N_2O_5Cl$ | 399,16813 | 397,15357 | pos/neg | 17 | OUI | 19,2 | 1 | 0,994 |
| Sunitinib | $C_{22}H_{27}N_4O_2F$ | 399,21908 | 397,20453 | pos/neg | 9 | OUI | 15,4 | 1 | 0,981 |
| Tris-(2-butoxyethyl)-phosphate | $C_{18}H_{39}O_7P$ | 399,25062 | 397,23606 | pos | 7 | | | | |
| Oxacilline | $C_{19}H_{19}N_3O_5S$ | 402,11182 | 400,09726 | pos/neg | 9 | OUI | 17,0 | 10 | 0,995 |
| Ochratoxine-A | $C_{20}H_{18}NO_6Cl$ | 404,08954 | 402,07499 | pos/neg | 22 | OUI | 19,2 | 5 | 1,000 |
| Azoxystrobine | $C_{22}H_{17}N_3O_5$ | 404,12410 | 402,10954 | pos | 6 | OUI | 19,7 | 1 | 0,998 |
| Zopiclone-N-oxide | $C_{17}H_{17}N_6O_4Cl$ | 405,10726 | 403,09270 | pos | 3 | OUI | 13,2 | 5 | 1,000 |
| Acetate de chlormadinone | $C_{23}H_{29}O_4Cl$ | 405,18272 | 403,16816 | pos | 2 | OUI | 21,4 | 10 | 0,990 |
| Diclosulam | $C_{13}H_{10}N_5O_3SFCl_2$ | 405,99382 | 403,97927 | pos/neg | 15 | OUI | 18,4 | 5 | 0,998 |
| Difenoconazol | $C_{19}H_{17}N_3O_3Cl_2$ | 406,07197 | 404,05742 | pos | 5 | OUI | 21,5 | 5 | 0,987 |
| Carvedilol | $C_{24}H_{26}N_2O_4$ | 407,19653 | 405,18198 | pos/neg | 8 | OUI | 15,9 | 5 | 0,992 |
| Lincomycine | $C_{18}H_{34}N_2O_6S$ | 407,22103 | 405,20648 | pos/neg | 10 | | | | |
| Flazasulfuron | $C_{13}H_{12}N_5O_5SF_3$ | 408,05840 | 406,04385 | pos/neg | 11 | OUI | 18,3 | 10 | 0,978 |
| Trifluoperazine | $C_{21}H_{24}N_3SF_3$ | 408,17158 | 406,15703 | pos | 5 | OUI | 17,4 | 5 | 0,995 |
| Trifloxystrobin | $C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$ | 409,13697 | 407,12241 | pos | 4 | OUI | 22,9 | 50 | 0,968 |
| Amlodipine | $C_{20}H_{25}N_2O_5Cl$ | 409,15248 | 407,13792 | pos/neg | 5 | OUI | 16,2 | 5 | 0,993 |
| Beclomethasone | $C_{22}H_{29}O_5Cl$ | 409,17763 | 407,16307 | pos/neg | 16 | OUI | 16,7 | 5 | 1,000 |
| Spirodiclofen | $C_{21}H_{24}O_4Cl_2$ | 411,11244 | 409,09789 | pos/neg | 6 | | | | |
| Risperidone | $C_{23}H_{27}N_4O_2F$ | 411,21908 | 409,20453 | pos | 6 | OUI | 13,7 | 1 | 0,991 |
| Carfentrazone-ethyl | $C_{15}H_{14}N_3O_3F_3Cl_2$ | 412,04371 | 410,02915 | pos | 4 | OUI | 21,3 | 10 | 0,987 |
| Ziprasidone | $C_{21}H_{21}N_4OSCl$ | 413,11974 | 411,10518 | pos | 8 | OUI | 14,9 | 10 | 0,996 |
| Bixafen | $C_{18}H_{12}N_3OF_3Cl_2$ | 414,03823 | 412,02368 | pos/neg | 12 | OUI | 20,9 | 5 | 0,998 |
| Cinosulfuron | $C_{15}H_{19}N_5O_7S$ | 414,10780 | 412,09324 | pos/neg | 15 | OUI | 16,4 | 5 | 0,996 |
| Acide Perfluorooctanoique | $C_8HO_2F_{15}$ | 414,98098 | 412,96643 | neg | 7 | | | | |
| Chlorimuron-ethyl | $C_{15}H_{15}N_4O_6SCl$ | 415,04736 | 413,03281 | pos/neg | 17 | OUI | 19,5 | 5 | 0,999 |
| Pyrazosulfuron-ethyl | $C_{14}H_{18}N_6O_7S$ | 415,10304 | 413,08849 | pos/neg | 21 | OUI | 19,2 | 5 | 1,000 |
| Nafcilline | $C_{21}H_{22}N_2O_5S$ | 415,13222 | 413,11766 | pos/neg | 13 | OUI | 14,0 | 5 | 0,999 |
| Diltiazem | $C_{22}H_{26}N_2O_4S$ | 415,16860 | 413,15405 | pos | 5 | OUI | 15,5 | 0,5 | 0,992 |
| Cypermethrine | $C_{22}H_{19}NO_3Cl_2$ | 416,08148 | 414,06692 | pos | 2 | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ramipril | $C_{23}H_{32}N_2O_5$ | 417,23840 | 415,22385 | pos/neg | 14 | OUI | 15,8 | 1 | 0,998 |
| Metosulam | $C_{14}H_{13}N_5O_4SCl_2$ | 418,01381 | 415,99925 | pos/neg | 9 | OUI | 17,4 | 5 | 0,998 |
| Lofepramine | $C_{26}H_{27}N_2OCl$ | 419,18847 | 417,17391 | pos | 4 | OUI | 18,9 | 10 | 0,990 |
| Simvastatine | $C_{25}H_{38}O_5$ | 419,27920 | 417,26465 | pos/neg | 11 | OUI | 23,2 | 50 | 0,931 |
| Prosulfuron | $C_{15}H_{16}N_5O_4SF_3$ | 420,09479 | 418,08023 | pos/neg | 14 | OUI | 19,1 | 5 | 0,996 |
| Topotecan | $C_{23}H_{23}N_3O_5$ | 422,17105 | 420,15649 | pos/neg | 11 | OUI | 12,1 | 5 | 0,996 |
| Bifenthrine | $C_{23}H_{22}O_2F_3Cl$ | 423,13332 | 421,11876 | non ionisable | 0 | | | | |
| Losartan | $C_{22}H_{23}ClN_6O$ | 423,16946 | 421,15491 | pos/neg | 6 | OUI | 17,0 | 1 | 0,999 |
| Fludrocortisone | $C_{23}H_{31}O_6F$ | 423,21774 | 421,20319 | pos/neg | 11 | OUI | 17,5 | 5 | 1,000 |
| Clindamycine | $C_{18}H_{33}N_2O_5SCl$ | 425,18715 | 423,17259 | pos/neg | 8 | OUI | 13,8 | 1 | 0,983 |
| Pravastatine | $C_{23}H_{36}O_7$ | 425,25338 | 423,23883 | pos/neg | 17 | OUI | 15,9 | 50 | 0,996 |
| Domperidone | $C_{22}H_{24}N_5O_2Cl$ | 426,16913 | 424,15457 | pos/neg | 6 | OUI | 14,2 | 5 | 0,999 |
| TDCPP | $C_9H_{15}O_4PCl_6$ | 428,89119 | 426,87663 | pos/neg | 9 | | | | |
| Azocyclotine | $C_{20}H_{35}N_3Sn$ | 430,19520 | 428,18064 | pos/neg | 3 | OUI | 22,6 | 100 | 0,979 |
| Bispyribac | $C_{19}H_{18}N_4O_8$ | 431,11974 | 429,10519 | pos/neg | 19 | OUI | 18,7 | 5 | 0,998 |
| Budesonide | $C_{25}H_{34}O_6$ | 431,24282 | 429,22826 | pos/neg | 9 | OUI | 18,5 | 5 | 0,999 |
| Etravirine | $C_{20}H_{15}N_6OBr$ | 435,05635 | 433,04180 | pos/neg | 5 | | | | |
| Flunisolide | $C_{24}H_{31}O_6F$ | 435,21774 | 433,20319 | pos/neg | 14 | OUI | 17,0 | 5 | 0,999 |
| Tris-(2-ethylhexyl)-phosphate | $C_{24}H_{51}O_4P$ | 435,35977 | 433,34522 | pos | 10 | | | | |
| Cloxacilline | $C_{19}H_{18}N_3O_5SCl$ | 436,07285 | 434,05829 | pos/neg | 10 | OUI | 17,6 | 10 | 0,998 |
| Valsartan | $C_{24}H_{29}N_5O_3$ | 436,23432 | 434,21976 | pos/neg | 8 | OUI | 18,8 | 5 | 0,994 |
| Fipronil | $C_{12}H_4N_4OSF_6Cl_2$ | 436,94598 | 434,93143 | neg | 5 | | | | |
| Tianeptine | $C_{21}H_{25}ClN_2O_4S$ | 437,12963 | 435,11508 | pos/neg | 12 | OUI | 15,5 | 0,5 | 0,997 |
| Phloridzine | $C_{21}H_{24}O_{10}$ | 437,14422 | 435,12967 | pos/neg | 10 | OUI | 14,0 | 5 | 0,998 |
| Doxycycline | $C_{22}H_{24}N_2O_8$ | 445,16054 | 443,14598 | pos/neg | 13 | OUI | 14,0 | 5 | 0,999 |
| Tetracycline | $C_{22}H_{24}N_2O_8$ | 445,16054 | 443,14599 | pos/neg | 10 | OUI | 12,5 | 5 | 0,981 |
| Mitoxantrone | $C_{22}H_{28}N_4O_6$ | 445,20816 | 443,19361 | pos/neg | 18 | OUI | 12,0 | 50 | 0,833 |
| Tecloftalam | $C_{14}H_5NO_3Cl_6$ | 445,84733 | 443,83278 | pos/neg | 13 | | | | |
| Tritosulfuron | $C_{13}H_9N_5O_4SF_6$ | 446,03522 | 444,02067 | pos/neg | 18 | OUI | 19,6 | 5 | 0,996 |
| Febantel | $C_{20}H_{22}N_4O_6S$ | 447,13329 | 445,11873 | pos/neg | 12 | OUI | 20,4 | 10 | 0,985 |
| Aripiprazole | $C_{23}H_{27}N_3O_2Cl_2$ | 448,15531 | 446,14076 | pos | 8 | OUI | 16,4 | 5 | 0,993 |
| Sisomicine | $C_{19}H_{37}N_5O_7$ | 448,27658 | 446,26202 | pos/neg | 6 | | | | |
| Cyhalothrine | $C_{23}H_{19}NO_3F_3Cl$ | 450,10783 | 448,09328 | non ionisable | 0 | | | | |
| Foramsulfuron | $C_{17}H_{20}N_6O_7S$ | 453,11869 | 451,10414 | pos/neg | 24 | OUI | 15,8 | 1 | 0,999 |
| Cefazoline | $C_{14}H_{14}N_8O_4S_3$ | 455,03729 | 453,02274 | pos/neg | 11 | | | | |
| Methotrexate | $C_{20}H_{22}N_8O_5$ | 455,17859 | 453,16404 | pos/neg | 10 | OUI | 11,6 | 10 | 0,996 |
| Verapamil | $C_{27}H_{38}N_2O_4$ | 455,29043 | 453,27588 | pos | 7 | OUI | 16,5 | 0,5 | 0,983 |
| Cefotaxime | $C_{16}H_{17}N_5O_7S_2$ | 456,06422 | 454,04966 | pos/neg | 25 | OUI | 12,2 | 5 | 0,999 |
| Delavirdine | $C_{22}H_{28}N_6O_3S$ | 457,20164 | 455,18708 | pos/neg | 12 | OUI | 15,3 | 5 | 0,999 |
| Fluoxastrobine | $C_{21}H_{16}N_4O_5FCl$ | 459,08660 | 457,07205 | pos | 5 | OUI | 20,8 | 5 | 0,996 |
| Oxytetracycline | $C_{22}H_{24}N_2O_9$ | 461,15546 | 459,14090 | pos/neg | 11 | OUI | 12,1 | 5 | 0,991 |
| Azlocilline | $C_{20}H_{23}N_5O_6S$ | 462,14418 | 460,12962 | pos/neg | 11 | OUI | 14,6 | 5 | 0,997 |
| Fluazinam | $C_{13}H_4N_4O_4F_6Cl_2$ | 464,95866 | 462,94410 | pos/neg | 2 | OUI | 23,6 | 500 | 0,987 |
| Amisulbrom | $C_{13}H_{13}N_5O_4S_2FBr$ | 465,96491 | 463,95036 | neg | 3 | | | | |
| Profoxydim | $C_{24}H_{32}NO_4SCl$ | 466,18133 | 464,16678 | pos/neg | 17 | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Toxine-T2 | $C_{24}H_{34}O_9$ | 467,22756 | 465,21301 | pos/neg | 12 | | | | |
| Tobramycin | $C_{18}H_{37}N_5O_9$ | 468,26640 | 466,25185 | pos/neg | 12 | | | | |
| Buprenorphine | $C_{29}H_{41}NO_4$ | 468,31084 | 466,29628 | pos | 4 | OUI | 15,5 | 0,5 | 0,991 |
| Primisulfuron-methyl | $C_{15}H_{12}N_4O_7SF_4$ | 469,04356 | 467,02901 | pos/neg | 13 | OUI | 20,0 | 10 | 0,997 |
| Dicloxacilline | $C_{19}H_{17}N_3O_5SCl_2$ | 470,03388 | 468,01932 | pos/neg | 8 | OUI | 18,6 | 10 | 0,999 |
| Sulfosulfuron | $C_{16}H_{18}N_6O_7S_2$ | 471,07511 | 469,06056 | pos/neg | 17 | OUI | 18,0 | 5 | 0,997 |
| Raloxifene | $C_{28}H_{27}NO_4S$ | 474,17336 | 472,15880 | pos/neg | 8 | OUI | 15,3 | 5 | 0,997 |
| Netilmicine | $C_{21}H_{41}N_5O_7$ | 476,30788 | 474,29332 | pos/neg | 15 | | | | |
| Loperamide | $C_{29}H_{33}N_2O_2Cl$ | 477,23034 | 475,21578 | pos/neg | 5 | OUI | 17,8 | 1 | 0,996 |
| Gentamicine | $C_{21}H_{43}N_5O_7$ | 478,32353 | 476,30897 | pos/neg | 12 | | | | |
| Chlortetracycline | $C_{22}H_{23}ClN_2O_8$ | 479,12157 | 477,10701 | pos/neg | 15 | | | | |
| Nicardipine | $C_{26}H_{29}N_3O_6$ | 480,21292 | 478,19836 | pos/neg | 4 | OUI | 16,3 | 1 | 0,995 |
| Chlorantraniliprole | $C_{18}H_{14}N_5O_2Cl_2Br$ | 481,97807 | 479,96352 | pos/neg | 11 | OUI | 18,6 | 5 | 0,999 |
| BDE-No49-solution | $C_{12}H_6Br_4O$ | 482,72250 | 480,70794 | non ionisable | 0 | | | | |
| Kanamycine | $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$ | 485,24534 | 483,23078 | pos/neg | 8 | | | | |
| Flufenoxuron | $C_{21}H_{11}N_2O_3F_6Cl$ | 489,04352 | 487,02896 | pos/neg | 8 | | | | |
| Glybenclamide | $C_{23}H_{28}N_3O_5SCl$ | 494,15110 | 492,13654 | pos/neg | 8 | | | | |
| Imatinib | $C_{29}H_{31}N_7O$ | 494,26629 | 492,25173 | pos/neg | 11 | OUI | 13,4 | 50 | 0,431 |
| Orlistat | $C_{29}H_{53}NO_5$ | 496,39965 | 494,38510 | pos/neg | 11 | | | | |
| Saflufenacil | $C_{17}H_{17}N_4O_5SF_4Cl$ | 501,06171 | 499,04715 | pos/neg | 20 | OUI | 19,5 | 5 | 0,997 |
| Fluvalinate | $C_{26}H_{22}N_2O_3F_3Cl$ | 503,13438 | 501,11983 | pos/neg | 9 | | | | |
| Deltamethrine | $C_{22}H_{19}NO_3Br_2$ | 503,98045 | 501,96589 | pos | 2 | | | | |
| Mesosulfuron-methyl | $C_{17}H_{21}N_5O_9S_2$ | 504,08535 | 502,07079 | pos/neg | 17 | OUI | 17,4 | 5 | 0,998 |
| Amprenavir | $C_{25}H_{35}N_3O_6S$ | 506,23193 | 504,21738 | pos/neg | 13 | OUI | 18,3 | 5 | 0,999 |
| Iodosulfuron-methyl | $C_{14}H_{14}N_5O_6SI$ | 507,97822 | 505,96367 | pos/neg | 12 | OUI | 18,5 | 5 | 0,991 |
| Flumethrine | $C_{28}H_{22}NO_3FCl_2$ | 510,10335 | 508,08880 | neg | 7 | | | | |
| Lufenuron | $C_{17}H_8N_2O_3F_8Cl_2$ | 510,98570 | 508,97114 | neg | 1 | | | | |
| Maraviroc | $C_{29}H_{41}N_5OF_2$ | 514,33519 | 512,32064 | pos/neg | 11 | OUI | 14,3 | 0,5 | 0,995 |
| Piperacilline | $C_{23}H_{27}N_5O_7S$ | 518,17040 | 516,15584 | pos/neg | 4 | OUI | 15,3 | 5 | 1,000 |
| Sulcofuron | $C_{19}H_{12}N_2O_5SCl_4$ | 520,92938 | 518,91483 | pos/neg | 15 | | | | |
| Ceftiofur | $C_{19}H_{17}N_5O_7S_3$ | 524,03629 | 522,02173 | pos/neg | 15 | | | | |
| Cefotiam | $C_{18}H_{23}N_9O_4S_3$ | 526,11079 | 524,09624 | pos/neg | 11 | | | | |
| Pristinamycine-IIA | $C_{28}H_{35}N_3O_7$ | 526,25477 | 524,24022 | pos/neg | 10 | OUI | 17,4 | 1 | 0,993 |
| Sulfluramide | $C_{10}H_6NO_2SF_{17}$ | 527,99206 | 525,97750 | neg | 5 | | | | |
| Indoxacarb | $C_{22}H_{17}N_3O_7F_3Cl$ | 528,07799 | 526,06343 | pos | 3 | OUI | 22,7 | 0,5 | 0,138 |
| Daunorubicine | $C_{27}H_{29}NO_{10}$ | 528,18642 | 526,17187 | pos/neg | 18 | OUI | 15,6 | 10 | 0,994 |
| Cefquinome | $C_{23}H_{24}N_6O_5S_2$ | 529,13224 | 527,11768 | pos/neg | 10 | | | | |
| Milbemectine-A3 | $C_{31}H_{44}O_7$ | 529,31598 | 527,30143 | pos | 23 | | | | |
| Ketoconazole | $C_{26}H_{28}N_4O_4Cl_2$ | 531,15604 | 529,14148 | pos | 5 | OUI | 16,2 | 5 | 0,983 |
| Apramycine | $C_{21}H_{41}N_5O_{11}$ | 540,28753 | 538,27298 | pos | 5 | | | | |
| Acrinathrine | $C_{26}H_{21}NO_5F_6$ | 542,13967 | 540,12511 | neg | 1 | | | | |
| Epirubicine | $C_{27}H_{29}NO_{11}$ | 544,18134 | 542,16678 | pos/neg | 12 | OUI | 14,8 | 5 | 0,996 |
| Doxorubicine | $C_{27}H_{29}NO_{11}$ | 544,18134 | 542,16678 | pos/neg | 14 | OUI | 14,5 | 10 | 0,995 |
| Ceftazidime | $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$ | 547,10641 | 545,09186 | pos/neg | 13 | | | | |
| Darunavir | $C_{27}H_{37}N_3O_7S$ | 548,24250 | 546,22794 | pos/neg | 12 | OUI | 18,3 | 5 | 1,000 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ceftriaxone | $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$ | 555,05333 | 553,03878 | pos/neg | 8 | | | | |
| Atorvastatine | $C_{33}H_{35}N_2O_5F$ | 559,26028 | 557,24572 | pos/neg | 4 | OUI | 20,0 | 50 | 0,972 |
| BDE-No99-solution | $C_{12}H_5Br_5O$ | 560,63301 | 558,61845 | non ionisable | 0 | | | | |
| Nelfinavir | $C_{32}H_{45}N_3O_4S$ | 568,32035 | 566,30580 | pos/neg | 6 | OUI | 17,4 | 5 | 0,992 |
| Lapatinib | $C_{29}H_{26}ClFN_4O_4S$ | 581,14201 | 579,12746 | pos/neg | 10 | OUI | 16,0 | 500 | 0,374 |
| Streptomycine | $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ | 582,27295 | 580,25839 | pos/neg | 8 | | | | |
| Dihydrostreptomycine | $C_{21}H_{41}N_7O_{12}$ | 584,28860 | 582,27404 | pos/neg | 10 | | | | |
| Bilirubine | $C_{33}H_{36}N_4O_6$ | 585,27076 | 583,25621 | pos/neg | 9 | | | | |
| Amikacine | $C_{22}H_{43}N_5O_{13}$ | 586,29301 | 584,27846 | pos/neg | 12 | | | | |
| Irinotecan | $C_{33}H_{38}N_4O_6$ | 587,28641 | 585,27186 | pos/neg | 14 | OUI | 14,1 | 5 | 0,943 |
| Etoposide | $C_{29}H_{32}O_{13}$ | 589,19157 | 587,17701 | pos/neg | 11 | OUI | 15,2 | 10 | 0,999 |
| Tipranavir | $C_{31}H_{33}N_2O_5SF_3$ | 603,21350 | 601,19895 | pos/neg | 13 | | | | |
| Diosmin | $C_{28}H_{32}O_{15}$ | 609,18140 | 607,16684 | pos/neg | 4 | | | | |
| Novobiocine | $C_{31}H_{36}N_2O_{11}$ | 613,23919 | 611,22463 | pos/neg | 19 | | | | |
| Indinavir | $C_{36}H_{47}N_5O_4$ | 614,37008 | 612,35553 | pos/neg | 11 | OUI | 14,9 | 5 | 0,997 |
| Diatrizoate | $C_{11}H_9N_2O_4I_3$ | 614,77692 | 612,76236 | pos/neg | 8 | | | | |
| Neomycine | $C_{23}H_{46}N_6O_{13}$ | 615,31956 | 613,30501 | pos/neg | 11 | | | | |
| Paromomycine | $C_{23}H_{45}N_5O_{14}$ | 616,30358 | 614,28902 | pos/neg | 11 | | | | |
| Amiodarone-desethyl | $C_{23}H_{25}I_2NO_3$ | 617,99966 | 615,98510 | pos | 1 | OUI | 19,9 | 50 | 0,960 |
| Pirarubicine | $C_{32}H_{37}NO_{12}$ | 628,23885 | 626,22430 | pos/neg | 12 | | | | |
| BDE-No153-solution | $C_{12}H_4OBr_6$ | 638,54352 | 636,52896 | non ionisable | 0 | | | | |
| Amiodarone | $C_{25}H_{29}NO_3I_2$ | 646,03096 | 644,01640 | pos | 2 | OUI | 20,7 | 500 | 0,843 |
| Natamycine | $C_{33}H_{47}NO_{13}$ | 666,31202 | 664,29746 | pos | 4 | | | | |
| Saquinavir | $C_{38}H_{50}N_6O_5$ | 671,39154 | 669,37699 | pos/neg | 8 | OUI | 17,5 | 10 | 0,988 |
| Monensine | $C_{36}H_{62}O_{11}$ | 671,43649 | 669,42194 | pos/neg | 9 | | | | |
| TBPP | $C_9H_{15}O_4PBr_6$ | 692,58810 | 690,57354 | pos/neg | 7 | | | | |
| Atazanavir | $C_{38}H_{52}N_6O_7$ | 705,39702 | 703,38247 | pos/neg | 15 | OUI | 18,1 | 5 | 0,988 |
| Ritonavir | $C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$ | 721,32004 | 719,30548 | pos/neg | 18 | OUI | 20,5 | 50 | 0,943 |
| Spinosad | $C_{41}H_{65}NO_{10}$ | 732,46812 | 730,45357 | pos | 7 | OUI | 19,5 | 50 | 0,857 |
| Erythromycin-A | $C_{37}H_{67}NO_{13}$ | 734,46852 | 732,45396 | pos/neg | 6 | OUI | 19,5 | 100 | 0,992 |
| Troxerutine | $C_{33}H_{42}O_{19}$ | 743,23931 | 741,22475 | pos/neg | 13 | OUI | 12,9 | 50 | 0,999 |
| Clarithromycine | $C_{38}H_{69}NO_{13}$ | 748,48417 | 746,46961 | pos | 4 | OUI | 16,8 | 5 | 0,992 |
| Azithromycine | $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ | 749,51580 | 747,50125 | pos/neg | 12 | OUI | 13,5 | 1 | 0,996 |
| Vindesine | $C_{43}H_{55}N_5O_7$ | 754,41742 | 752,40287 | pos | 8 | OUI | 13,3 | 5 | 0,998 |
| Digitoxine | $C_{41}H_{64}O_{13}$ | 765,44197 | 763,42742 | pos/neg | 9 | | | | |
| Thyroxine | $C_{15}H_{11}NO_4I_4$ | 777,69396 | 775,67940 | pos/neg | 13 | OUI | 16,7 | 10 | 0,994 |
| Levothyroxine | $C_{15}H_{11}NO_4I_4$ | 777,69396 | 775,67940 | pos/neg | 6 | OUI | 16,7 | 10 | 0,994 |
| Iomeprole | $C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$ | 777,86137 | 775,84682 | pos/neg | 14 | | | | |
| Iopamidole | $C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$ | 777,86137 | 775,84682 | pos/neg | 13 | | | | |
| Vinorelbine | $C_{45}H_{54}N_4O_8$ | 779,40144 | 777,38689 | pos | 5 | OUI | 15,7 | 5 | 0,984 |
| 25-Desacetyl-Rifampicine | $C_{41}H_{56}N_4O_{11}$ | 781,40184 | 779,38728 | pos/neg | 8 | | | | |
| Digoxine | $C_{41}H_{64}O_{14}$ | 781,43688 | 779,42233 | pos/neg | 8 | OUI | 15,9 | 50 | 0,992 |
| Iopromide | $C_{18}H_{24}N_3O_8I_3$ | 791,87702 | 789,86247 | pos/neg | 15 | | | | |
| Docetaxel | $C_{43}H_{53}NO_{14}$ | 808,35388 | 806,33933 | pos/neg | 10 | | | | |
| Vinblastine | $C_{46}H_{58}N_4O_9$ | 811,42766 | 809,41310 | pos | 8 | OUI | 14,9 | 5 | 0,996 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Iohexol | $C_{19}H_{26}N_3O_9I_3$ | 821,88758 | 819,87303 | pos/neg | 14 | | | | |
| Rifampicine | $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ | 823,41240 | 821,39784 | pos/neg | 6 | OUI | 18,8 | 50 | 0,976 |
| Virginiamycin-S1 | $C_{43}H_{49}N_7O_{10}$ | 824,36137 | 822,34681 | pos/neg | 4 | OUI | 19,5 | 10 | 0,994 |
| Vincristine | $C_{46}H_{56}N_4O_{10}$ | 825,40692 | 823,39237 | pos/neg | 13 | OUI | 14,5 | 5 | 0,997 |
| Josamycine | $C_{42}H_{69}NO_{15}$ | 828,47400 | 826,45944 | pos/neg | 2 | OUI | 17,5 | 10 | 0,989 |
| Roxithromycine | $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$ | 837,53185 | 835,51729 | pos/neg | 14 | OUI | 16,9 | 10 | 0,987 |
| Spiramycine | $C_{43}H_{74}N_2O_{14}$ | 843,52128 | 841,50673 | pos/neg | 8 | OUI | 13,4 | 1 | 0,993 |
| Paclitaxel | $C_{47}H_{51}NO_{14}$ | 854,33823 | 852,32368 | pos/neg | 14 | | | | |
| Pristinamycine-IA | $C_{45}H_{54}N_8O_{10}$ | 867,40357 | 865,38901 | pos/neg | 9 | OUI | 18,0 | 5 | 0,993 |
| Tilmicosine | $C_{46}H_{80}N_2O_{13}$ | 869,57332 | 867,55876 | pos/neg | 11 | OUI | 14,5 | 5 | 0,990 |
| Abamectine | $C_{48}H_{72}O_{14}$ | 873,49948 | 871,48493 | pos/neg | 8 | | | | |
| Ivermectine-B | $C_{48}H_{74}O_{14}$ | 875,51514 | 873,50058 | pos/neg | 13 | | | | |
| Doramectine | $C_{50}H_{74}O_{14}$ | 899,51513 | 897,50058 | pos/neg | 15 | | | | |
| Tylosine | $C_{46}H_{77}NO_{17}$ | 916,52643 | 914,51187 | pos/neg | 17 | OUI | 15,9 | 50 | 0,986 |
| Amphotericine-B | $C_{47}H_{73}NO_{17}$ | 924,49512 | 922,48057 | non ionisable | 0 | | | | |
| Oxytocine | $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$ | 1007,44373 | 1005,42918 | pos/neg | 7 | | | | |
| Temsirolimus | $C_{56}H_{87}NO_{16}$ | 1030,60976 | 1028,59521 | pos/neg | 11 | | | | |
| Colistine | $C_{52}H_{98}N_{16}O_{13}$ | 1155,75720 | 1153,74265 | pos/neg | 11 | | | | |
| Polymyxine-B | $C_{55}H_{96}N_{16}O_{13}$ | 1189,74155 | 1187,72700 | pos/neg | 13 | | | | |
| Bleomycine | $C_{55}H_{84}N_{17}O_{21}S_3$ | 1415,52626 | 1413,51170 | pos | 7 | | | | |
| Bacitracine | $C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$ | 1422,75622 | 1420,74166 | pos/neg | 5 | | | | |
| Vancomycine | $C_{66}H_{75}N_9O_{24}Cl_2$ | 1448,43747 | 1446,42292 | pos/neg | 3 | OUI | 10,6 | 50 | 0,990 |
| Teicoplanine-A2 | $C_{88}H_{97}N_9O_{33}Cl_2$ | 1878,56385 | 1876,54930 | pos/neg | 5 | | | | |
| Ramoplanine | $C_{119}H_{154}ClN_{21}O_{40}$ | 2553,04232 | 2551,02777 | pos | 4 | | | | |

**Tableau 22 : Tableau récapitulatif des 817 molécules achetées dans le cadre de la collecte 1 du projet Agrifood contenant les informations suivantes : formule brute, rapport *m/z* des ions protonés et déprotonés, le mode d'ionisation dans lequel est détectée la molécule, le nombre d'ions interprétés en FIA-MS, la potentialité de détection de la molécule dans la méthode HLB-T3 ainsi que le temps de rétention, la LOD et le $R^2$ de la linéarité réalisée pour la validation.**

# *PRODUCTION SCIENTIFIQUE*

**Publication dans des revues à comité de lecture**

**[1]** *Development and validation of a multiresidue analysis for 539 pollutants in water based on SPE on-line and liquid chromatography coupled to Q-Orbitrap.*
J. Cotton, F.Leroux, S. Broudin, S. Grousset, R. Sikorski, D. Fournier, B. Corman, C. Junot, C. Ducruix
*En préparation*

**[2]** *High resolution mass spectrometry associated to data mining tools for the detection of pollutants and chemical characterization of honey samples.*
J. Cotton, F. Leroux, S. Broudin, M. Marie, B. Corman, J.C. Tabet, C. Ducruix, C. Junot
Journal of Agricultural Food Chemistry (2014), xxxx : xxxx
DOI : 10.1021/jf504400c

**[3]** *Utilisation de l'approche métabolomique pour l'évaluation de la composition en micropolluants des eaux souterraines destinées à la production d'eau potable.*
J. Cotton, V. Sabarly, C. Ducruix, F. Nauleau, S. Masclet, S. Piel, C. Junot
*Acceptée au journal Techniques Sciences Méthodes, en attente de parution*

**[4]** *First pass intestinal and liver metabolism of paracetamol in a microfluidic platform coupled with a mathematical modeling as a means of evaluating ADME processes in humans.*
J.M. Prot, L. Maciel, T. Bricks, F. Merlier, J. Cotton, P. Paullier, F.Y. Bois, E. Leclerc
Biotechnol. Bioeng. (2014), 111(10) : 2027-2040.
DOI : 10.1002/bit.25232

**[5]** *Investigation of the hepatotoxicity of flutamide : pro-survival/apoptotic and necrotic switch in primary rat hepatocytes characterized by metabolic and transcriptomic profiles in microfluidic liver biochips.*
A. Legendre, S. Jacques, F. Dumont, J. Cotton, P. Paullier, M.J. Fleury, E. Leclerc
Toxicol. In Vitro (2014), 28(5) : 1075-1087.
DOI : 10.1016/j.tiv.2014.04.008

**[6]** *Evaluation of a liver microfluidic biochip to predict in vivo clearances of seven drugs in rats.*
R. Baudoin, A. Legendre, S. Jacques, J. Cotton, F. Bois, E. Leclerc
J. Pharm. Sci. (2014), 103(2) : 706-718.
DOI : 10.1002/jps.23796

**[7]** *Metabolic characterization of primary rat hepatocytes cultivated in parallel microfluidic biochips.*
A. Legendre, R. Baudoin, G. Alberto, P. Paullier, M. Naudot, T. Bricks, J. Brocheton, S. Jacques, J. Cotton, E. Leclerc
J. Pharm. Sci. (2013) 102(9) : 3264-3276.
DOI : 10.1002/jps.23466

**Communications orales dans des congrès**

20th International Mass Spectrometry Conference, Genève, Suisse, Août 2014
*High resolution mass spectrometry based metabolomics: a new tool to detect and characterize emerging pollutants in water and food matrices.*
J. Cotton, F. Leroux, S. Broudin, B. Corman, J.C. Tabet, C. Ducruix, C. Junot

7ème Journées Scientifiques du RFMF, Amiens, Juin 2013
*Analyse métabolomique des miels par spectrométrie de masse : caractérisation chimique et détection de polluants.*
J. Cotton, F. Leroux, S. Broudin, M. Marie, C. Corman, C. Ducruix, C. Junot

**Communications par affiche dans des congrès**

62nd Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Baltimore, USA, Juin 2014
*High resolution mass spectrometry based metabolomics: a new tool to detect and characterize emerging pollutants in water and food matrices.*
J. Cotton, F. Leroux, S. Broudin, C. Corman, J.C. Tabet, C. Ducruix, C. Junot

8ème Journées Scientifiques du RFMF, Lyon, Juin 2014
*Application de l'analyse métabolomique de contaminants organiques dans l'environnement par spectrométrie de masse haute résolution.*
J. Cotton, F. Leroux, S. Broudin, B. Corman, C. Junot, C. Ducruix

# *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*


1. Association Française de NORmalisation (AFNOR). Dictionnaire de l'environnement. ISBN : 2-12-473022-3
2. [Site Internet] http://www.cnrtl.fr/ (Consulté le 07/07/2014)
3. [Rapport] ANSES. Les produits biocides. 2013
4. [Rapport] Observatoire des résidus de pesticides (ORP). Les pesticides, définitions et propriétés. 2014
5. [Site Internet] http://fr.wikipedia.org/wiki/Pesticide#mediaviewer/Fichier:BiocidesClassificationPhytosanitairesPesticidesR%C3%A9sidus.jpg (Consulté le 16/07/2014)
6. [Site Internet] http://www.alanwood.net/pesticides/class_pesticides.html (Consulté le 07/07/2014)
7. [Site Internet] http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=380 (Consulté le 2008)
8. Code de la santé publique 2013, Article du code de la santé publique. ISBN : 978-2-247-12608-8
9. Guide pratique des médicaments 2009, Dorosz 2009. ISBN : 9782224029906
10. [Site Internet] http://www.leem.org/article/marche-interieur-0 (Consulté le 08/07/2014)
11. [Site Internet] http://www.leem.org/article/marche-mondial-0 (Consulté le 08/07/2014)
12. Marine Pollution Fifth édition by R.B. Clark, 2001. ISBN : 9780198792925
13. [Site Internet] http://webpeda.ac-montpellier.fr/wspc/ABCDORGA/Famille/TENSIOACTIFS.html (Consulté le 15/07/2014)
14. [Site Internet] http://lesplastifiants.fr/ (Consulté le 17/07/2014)
15. [Site Internet] http://fr.wikipedia.org/wiki/Chronologie_de_catastrophes_industrielles (Consulté le 09/07/2014)
16. [Site Internet] http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=61 (Consulté le 13/07/2014)
17. [Rapport] Bonnefoy N. Pesticides : vers le risque zéro. 2014
18. Racke K., Carazo E., and Roberts G. Advancement of Harmonized Approaches for Crop Protection Chemistry in Latin America. 2005. Chemistry International 27, 5,
19. [Rapport] Rapport d'office parlementaire. Annexe 45 - Données statistiques sur les pesticides. 2001
20. [Site Internet] http://www.peninsulachemical.com/SERVICES.html (Consulté le 21/07/2014)
21. [Site Internet] http://www.independent.co.uk/news/science/noahs-ark-of-the-fruit-world-where-the-banana-seeds-of-1600-varieties-are-grown-9239477.html (Consulté le 21/07/2014)
22. [Site Internet] http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=259 (Consulté le 21/07/2014)

23. Leonard R.A. Movement of Pesticides into Surface Waters. 1990. Soil Science Society of America Book Series N°2, 303-349.

24. Schiavon, M., Perrin-Ganier, C., and Portal, J. M. La pollution de l'eau par les produits phytosanitaires : état et origine. 1995. Agronomie 15, 3-4, 157-170.

25. Taylor A.W. and Spencer W.F. Volatilization and vapor transport processes. 1990. Soil Science Society of America Book Series N°2, 213-269.

26. Glotfelty, Dwight E., Taylor, Alan W., Turner, Benjamin C., and Zoller, William H. Volatilization of surface-applied pesticides from fallow soil. 1984. Journal of Agricultural and Food Chemistry 32, 3, 638-643.

27. [Rapport] Comité de prévention et de protection - CORPEN. Indicateurs pour des actions locales de maîtrise des pollutions de l'eau d'origine agricole : Eléments méthodologiques - application aux produits phytosanitaires. 2003

28. [Rapport] ANSES and Observatoire des résidus de pesticides (ORP). Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France. 2010

29. Vidal. 85, Vidal 2009 : Le Dictionnaire. ISBN : 978-2850911781

30. [Rapport] Association Santé Environnement France (ASEF). Quand les médicaments polluent notre eau. 2013

31. Daughton, C. G. and Ternes, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change ? 1999. Environ.Health Perspect. 107 Suppl 6, 907-938.

32. Spiroux J. Recherche, quantification et suivi des résidus médicamenteux dans les effluents hospitaliers du CHU de Rouen. 2009.

33. Bourgin, M., Bichon, E., Antignac, J. P., Monteau, F., Leroy, G., Barritaud, L., Chachignon, M., Ingrand, V., Roche, P., and Le, Bizec B. Chlorination of bisphenol A: non-targeted screening for the identification of transformation products and assessment of estrogenicity in generated water. 2013. Chemosphere 93, 11, 2814-2822.

34. [Rapport] ANSES. Campagne nationale d'occurence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine. 2011

35. Mompelat, S., Le, Bot B., and Thomas, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. 2009. Environ.Int. 35, 5, 803-814.

36. [Rapport] Association suisse des cosmétiques et des détergents. Les produits de lessive sont-ils dégradables ? 2005

37. [Rapport] ANSES. PCB, carte d'identité. 2013

38. [Rapport] ANSES. Dioxines et aliments, l'ANSES fait le point. 2011

39. [Rapport] EFSA. Les retardateurs de flamme bromés. 2012

40. [Rapport] Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Public health impact of pesticides used in Agriculture. 1990

41. Darwin, Charles and Wallace, Alfred. On the Tendency of Species to form Varieties; and on the Perpetuation of Varieties and Species by Natural Means of Selection. 1858. Journal of the Proceedings of the Linnean Society of London.Zoology 3, 9, 45-62.

42. Chapin, F. Stuart, Zavaleta, Erika S., Eviner, Valerie T., Naylor, Rosamond L., Vitousek, Peter M., Reynolds, Heather L., Hooper, David U., Lavorel, Sandra, Sala, Osvaldo E., Hobbie, Sarah E., Mack, Michelle C., and Diaz, Sandra. Consequences of changing biodiversity. 2000. Nature 405, 6783, 234-242.

43. Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Duffy, J. E., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M., and Jouseau, C. Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. 2006. Nature 443, 7114, 989-992.

44.

45. de Snoo, G. R. Unsprayed field margins: effects on environment, biodiversity and agricultural practice. 1999. Landscape and Urban Planning 46, 1â€“3, 151-160.

46. Birgersson, A., Jonsson, P., and Holmberg, O. Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders. 1992. Vet.Microbiol. 31, 2-3, 181-189.

47. Nystrom, Bo, Bjornsater, Bo, and Blanck, Hans. Effects of sulfonylurea herbicides on non-target aquatic micro-organisms: Growth inhibition of micro-algae and short-term inhibition of adenine and thymidine incorporation in periphyton communities. 1999. Aquatic Toxicology 47, 1, 9-22.

48. Sjollema, S. B., Martinezgarcia, G., van der Geest, H. G., Kraak, M. H., Booij, P., Vethaak, A. D., and Admiraal, W. Hazard and risk of herbicides for marine microalgae. 2014. Environ.Pollut. 187, 106-111.

49. [Rapport] United States - Environmental Protection Agency. Registration Eligibility Decision : Hexazinone. 1994

50. Perez, G. L., Torremorell, A., Mugni, H., Rodriguez, P., Solange, Vera M., do, Nascimento M., Allende, L., Bustingorry, J., Escaray, R., Ferraro, M., Izaguirre, I., Pizarro, H., Bonetto, C., Morris, D. P., and Zagarese, H. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. 2007. Ecol.Appl. 17, 8, 2310-2322.

51. Vera, M. S., Di, Fiori E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M. M., Juarez, A., Rios de Molina, Mdel C., Tell, G., and Pizarro, H. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor(R) on freshwater microbial communities. 2012. Ecotoxicology. 21, 7, 1805-1816.

52. Maeder, Paul, Fliessbach, Andreas, Dubois, David, Gunst, Lucie, Fried, Padruot, and Niggli, Urs. Soil Fertility and Biodiversity in Organic Farming. 2002. Science 296, 5573, 1694-1697.

53. Jacobsen, Carsten Suhr and Hjelmso¸, Mathis Hjort. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. 2014. Current Opinion in Biotechnology 27, 0, 15-20.

54. Boldt, Tina S. and Jacobsen, Carsten S. Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil. 1998. FEMS Microbiology Letters 161, 1, 29-35.

55. el-Ghamry, A. M., Huang, C. Y., and Xu, J. M. Combined effects of two sulfonylurea herbicides on soil microbial biomass and N-mineralization. 2001. J.Environ.Sci.(China) 13, 3, 311-317.

56. Baxter, J. and Cummings, S. P. The degradation of the herbicide bromoxynil and its impact on bacterial diversity in a top soil. 2008. J.Appl.Microbiol. 104, 6, 1605-1616.

57. Widenfalk, Anneli, Bertilsson, Stefan, Sundh, Ingvar, and Goedkoop, Willem. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes : responses at various levels of microbial community organization. 2008. Environmental Pollution 152, 3, 576-584.

58. Madhun Y.A. and Freed V.H. Impact of pesticides on the environment. 1990. Soil Science Society of America Book Series N°2, 429-466.

59. Milton, M., Ambrose, K., Abraham, C., Charles, N., and Kiriamiti, K. Dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT) and its observed effects on body functions in vertebrates. 2011. East Afr.J.Public Health 8, 4, 271-274.

60. Hall R.J. Impact of pesticides on bird populations. 1987. American Chemical Society *Silent Spring Revisited*, 85-111.

61. Carson R. Silent Spring. ISBN : 0-618-24906-0.

62. [Site Internet] http://www.ebcc.info/seedbirdindicators.html (Consulté le 15/07/2014)

63. Goulson, Dave. Ecology: Pesticides linked to bird declines. 2014. Nature advance online publication,

64. Berny, Philippe J., Buronfosse, Thierry, Buronfosse, Florence, Lamarque, François, and Lorgue, Guy. Field evidence of secondary poisoning of foxes (Vulpes vulpes) and buzzards (Buteo buteo) by bromadiolone, a 4-year survey. 1997. Chemosphere 35, 8, 1817-1829.

65. BRAKES, C. R. and SMITH, R. H. Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. 2005. Journal of Applied Ecology 42, 1, 118-128.

66. LeBlanc, G. A. Are environmental sentinels signaling? 1995. Environ.Health Perspect. 103, 10, 888-890.

67. [Rapport] Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Protéger les pollinisateurs. 2005

68. Barnett, E. A., Charlton, A. J., and Fletcher, M. R. Incidents of bee poisoning with pesticides in the United Kingdom, 1994-2003. 2007. Pest.Manag.Sci. 63, 11, 1051-1057.

69. Henry, Mickael, Bertrand, Colette, Le Faon, Violette, Requier, Fabrice, Odoux, Jean François, Aupinel, Pierrick, Bretagnolle, Vincent, and Decourtye, Axel. Pesticide risk assessment in free-ranging bees is weather and landscape dependent. 2014. Nat Commun 5,

70. Feltham, Hannah, Park, Kirsty, and Goulson, Dave. Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. 2014. Ecotoxicology 23, 3, 317-323.

71. Alford, Ross A., Dixon, Philip M., and Pechmann, Joseph H. K. Ecology: Global amphibian population declines. 2001. Nature 412, 6846, 499-500.

72. Houlahan, Jeff, Findlay, C. Scott, Schmidt, Benedikt R., Meyer, Andrea H., and Kuzmin, Sergius L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. 2000. Nature 404, 6779, 752-755.

73. Sparling, D. W., Fellers, G., and McConnell, L. Pesticides are involved with population declines of amphibians in the California Sierra Nevadas. 2001. ScientificWorldJournal. 1, 200-201.

74. Bradford, D. F., Knapp, R. A., Sparling, D. W., Nash, M. S., Stanley, K. A., Tallent-Halsell, N. G., McConnell, L. L., and Simonich, S. M. Pesticide distributions and population declines of California, USA, alpine frogs, Rana muscosa and Rana sierrae. 2011. Environ.Toxicol.Chem. 30, 3, 682-691.

75. Fellers, G. M., McConnell, L. L., Pratt, D., and Datta, S. Pesticides in mountain yellow-legged frogs (Rana muscosa) from the Sierra Nevada Mountains of California, USA. 2004. Environ.Toxicol.Chem. 23, 9, 2170-2177.

76. Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. A., and Vonk, A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. 2002. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99, 8, 5476-5480.

77. Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., and Vonk, A. Herbicides: feminization of male frogs in the wild. 2002. Nature 419, 6910, 895-896.

78. Pimentel, David, Acquay, H., Biltonen, M., Rice, P., Silva, M., Nelson, J., Lipner, V., Giordano, S., Horowitz, A., and D'Amore, M. The Pesticide Question Assessment of Environmental and Economic Impacts of Pesticide Use. ISBN : 978-0-412-03581-4

79. Campbell, K. R. and Campbell, T. S. A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: a review of available data. 2002. Environ.Toxicol.Chem. 21, 5, 894-898.

80. de, Solla, Sr., Palonen, K. E., and Martin, P. A. Toxicity of pesticides associated with potato production, including soil fumigants, to snapping turtle eggs (Chelydra serpentina). 2014. Environ.Toxicol.Chem. 33, 1, 102-106.

81. Crain, D. A. and Guillette, L. J., Jr. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. 1998. Anim Reprod.Sci. 53, 1-4, 77-86.

82. Gibbs, Katherine E., Mackey, Robin L., and Currie, David J. Human land use, agriculture, pesticides and losses of imperiled species. 2009. Diversity and Distributions 15, 2, 242-253.

83. Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., Rideout, B. A., Shivaprasad, H. L., Ahmed, S., Chaudhry, M. J., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., and Khan, A. A. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. 2004. Nature 427, 6975, 630-633.

84. Green, R. E., Taggart, M. A., Senacha, K. R., Raghavan, B., Pain, D. J., Jhala, Y., and Cuthbert, R. Rate of decline of the Oriental white-backed vulture population in India estimated from a survey of diclofenac residues in carcasses of ungulates. 2007. PLoS.One. 2, 8, e686-

85. Brandao, F. P., Rodrigues, S., Castro, B. B., Goncalves, F., Antunes, S. C., and Nunes, B. Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: biochemical and behavioural effects. 2013. Aquat.Toxicol. 144-145, 218-229.

86. Gonzalez-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganes, F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E., and Fernandez-Pinas, F. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. 2013. Water Res. 47, 6, 2050-2064.

87. Park, S. and Choi, K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. 2008. Ecotoxicology 17, 6, 526-538.

88. Sumpter, J. P. Feminized responses in fish to environmental estrogens. 1995. Toxicol.Lett. 82-83, 737-742.

89. Gimeno, S., Gerritsen, A., Bowmer, T., and Komen, H. Feminization of male carp. 1996. Nature 384, 6606, 221-222.

90. Jobling, S., Casey, D., Rogers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A. P., and Tyler, C. R. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. 2004. Aquat.Toxicol. 66, 2, 207-222.

91. Parrella, A., Lavorgna, M., Criscuolo, E., Russo, C., Fiumano, V., and Isidori, M. Acute and chronic toxicity of six anticancer drugs on rotifers and crustaceans. 2014. Chemosphere

92. [Rapport] Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Les enfants sont exposés à des risques élevés d'intoxication par les pesticides. 2004

93. [Rapport] Ministère chargé de l'environnement (ARIA). Pollution du Rhin par des pesticides, Schweirhalle, Suisse. 2006

94. [Journaux de presse] Bailly O. Bhopal, l'infinie catastrophe. Le Monde diplomatique. 2004

95. [Site Internet] http://www.getipm.com/articles/seveso-italy.htm (Consulté le 17/07/2014)

96. [Rapport] Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Assesment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI). 1998

97. [Rapport] Organisation Mondiale de la Santé (OMS). World suicide prevention day. 2007

98. [Rapport] Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Pesticides are a leading suicide method. 2006

99. Sengupta S. On India's Farms, a Plague of suicide. 2006. The New York Times

100. Zouaoui, K., Dulaurent, S., Gaulier, J. M., Moesch, C., and Lachatre, G. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: about 13 cases of acute intoxication. 2013. Forensic Sci.Int. 226, 1-3, e20-e25.

101. Demirel, Y., Yilmaz, A., Gursoy, S., Kaygusuz, K., and Mimaroglu, C. Acute amitraz intoxication: retrospective analysis of 45 cases. 2006. Hum.Exp.Toxicol. 25, 10, 613-617.

102. Ulukaya, S., Demirag, K., and Moral, A. R. Acute amitraz intoxication in human. 2001. Intensive Care Med. 27, 5, 930-933.

103. Kutluhan, S., Akhan, G., Gultekin, F., and Kurdoglu, E. Three cases of recurrent epileptic seizures caused by Endosulfan. 2003. Neurol.India 51, 1, 102-103.

104. [Rapport] Institut National de Médecine Agricole (INMA) and Mutuelle de Santé Agricole (MSA). Phyt'attitude : Synthèse des observations 2002-2003. 2005

105. [Site Internet] http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=86 (Consulté le 17/07/2014)

106. Hill C. and Doyon F. La fréquence des cancers en France en 2005 : évolution de la mortalité depuis 1950 et résumé du rapport sur les causes de cancer. 2008. Bulletin du cancer 95, 1, 5-10.

107. [Rapport] Imbernon E.(Institut de veille sanitaire). Estimation du nombre de cas de certains cancers attribuables à des facteurs professionnels en France. 2002

108. [Site Internet] http://aghealth.nih.gov/ (Consulté le 21/07/2014)

109. [Site Internet] http://www.grecan.org/agrican.html (Consulté le 21/07/2014)

110. Alavanja, M. C., Sandler, D. P., Lynch, C. F., Knott, C., Lubin, J. H., Tarone, R., Thomas, K., Dosemeci, M., Barker, J., Hoppin, J. A., and Blair, A. Cancer incidence in the agricultural health study. 2005. Scand.J.Work Environ.Health 31 Suppl 1, 39-45.

111. Leveque-Morlais, N., Tual, S., Clin, B., Adjemian, A., Baldi, I., and Lebailly, P. The AGRIculture and CANcer (AGRICAN) cohort study: enrollment and causes of death for the 2005-2009 period. 2014. Int.Arch.Occup.Environ.Health

112. Alavanja, M. C., Samanic, C., Dosemeci, M., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C. F., Knott, C., Thomas, K., Hoppin, J. A., Barker, J., Coble, J., Sandler, D. P., and Blair, A. Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. 2003. Am.J.Epidemiol. 157, 9, 800-814.

113. Flower, K. B., Hoppin, J. A., Lynch, C. F., Blair, A., Knott, C., Shore, D. L., and Sandler, D. P. Cancer risk and parental pesticide application in children of Agricultural Health Study participants. 2004. Environ.Health Perspect. 112, 5, 631-635.

114. Beard, J. D., Umbach, D. M., Hoppin, J. A., Richards, M., Alavanja, M. C., Blair, A., Sandler, D. P., and Kamel, F. Pesticide Exposure and Depression among Male Private Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. 2014. Environ.Health Perspect.

115. Baldi, I., Robert, C., Piantoni, F., Tual, S., Bouvier, G., Lebailly, P., and Raherison, C. Agricultural exposure and asthma risk in the AGRICAN French cohort. 2014. Int.J.Hyg.Environ.Health 217, 4-5, 435-442.

116. Tual, S., Clin, B., Leveque-Morlais, N., Raherison, C., Baldi, I., and Lebailly, P. Agricultural exposures and chronic bronchitis: findings from the AGRICAN (AGRIculture and CANcer) cohort. 2013. Ann.Epidemiol. 23, 9, 539-545.

117. Greenlee, A. R., Arbuckle, T. E., and Chyou, P. H. Risk factors for female infertility in an agricultural region. 2003. Epidemiology 14, 4, 429-436.

118. Andersen, H. R., Schmidt, I. M., Grandjean, P., Jensen, T. K., Budtz-Jorgensen, E., Kjaerstad, M. B., Baelum, J., Nielsen, J. B., Skakkebaek, N. E., and Main, K. M. Impaired reproductive development in sons of women occupationally exposed to pesticides during pregnancy. 2008. Environ.Health Perspect. 116, 4, 566-572.

119. Mehrpour, O., Karrari, P., Zamani, N., Tsatsakis, A. M., and Abdollahi, M. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: A review. 2014. Toxicol.Lett.

120. Swan, S. H., Kruse, R. L., Liu, F., Barr, D. B., Drobnis, E. Z., Redmon, J. B., Wang, C., Brazil, C., and Overstreet, J. W. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. 2003. Environ.Health Perspect. 111, 12, 1478-1484.

121. Rauh, V. A., Perera, F. P., Horton, M. K., Whyatt, R. M., Bansal, R., Hao, X., Liu, J., Barr, D. B., Slotkin, T. A., and Peterson, B. S. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. 2012. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 109, 20, 7871-7876.

122. Baldi, I., Gruber, A., Rondeau, V., Lebailly, P., Brochard, P., and Fabrigoule, C. Neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides: results from the 4-year follow-up of the PHYTONER study. 2011. Occup.Environ.Med. 68, 2, 108-115.

123. Blanc-Lapierre, A., Bouvier, G., Gruber, A., Leffondre, K., Lebailly, P., Fabrigoule, C., and Baldi, I. Cognitive disorders and occupational exposure to organophosphates: results from the PHYTONER study. 2013. Am.J.Epidemiol. 177, 10, 1086-1096.

124. Hayden, K. M., Norton, M. C., Darcey, D., Ostbye, T., Zandi, P. P., Breitner, J. C., and Welsh-Bohmer, K. A. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. 2010. Neurology 74, 19, 1524-1530.

125. Parron, T., Requena, M., Hernandez, A. F., and Alarcon, R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. 2011. Toxicol.Appl.Pharmacol. 256, 3, 379-385.

126. Baldi, I., Lebailly, P., Mohammed-Brahim, B., Letenneur, L., Dartigues, J. F., and Brochard, P. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. 2003. Am.J.Epidemiol. 157, 5, 409-414.

127. Rugbjerg, K., Harris, M. A., Shen, H., Marion, S. A., Tsui, J. K., and Teschke, K. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease--a population-based case-control study evaluating the potential for recall bias. 2011. Scand.J.Work Environ.Health 37, 5, 427-436.

128. Costello, S., Cockburn, M., Bronstein, J., Zhang, X., and Ritz, B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. 2009. Am.J.Epidemiol. 169, 8, 919-926.

129. Roberts, E. M., English, P. B., Grether, J. K., Windham, G. C., Somberg, L., and Wolff, C. Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley. 2007. Environ.Health Perspect. 115, 10, 1482-1489.

130. [Site Internet] http://www.populationmondiale.com/ (Consulté le 21/07/2014)

131. [Rapport] Departement of Health and Humans Services - Centers for Disease Control and Prevention. Third national report on human exposure to environmental chemicals. 2005

132. [Rapport] Site internet effet retardé. 2014

133. [Rapport] Académie nationale de Pharmacie. Médicaments et Environnement. 2008

134. Joyeux M. Résidus médicamenteux et risques sanitaires d'origine hydrique. 2006. Environnement, Risques & Santé 5, 4, 1-9.

135. Webb, S., Ternes, T., Gibert, M., and Olejniczak, K. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. 2003. Toxicol.Lett. 142, 3, 157-167.

136. Ternes, Thomas A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. 2001. TrAC Trends in Analytical Chemistry 20, 8, 419-434.

137. Martinez-Navarro, J. F. Food poisoning related to consumption of illicit beta-agonist in liver. 1990. Lancet 336, 8726, 1311-

138. Pulce, C., Lamaison, D., Keck, G., Bostvironnois, C., Nicolas, J., and Descotes, J. Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver. 1991. Vet.Hum.Toxicol. 33, 5, 480-481.

139. Brambilla, G., Loizzo, A., Fontana, L., Strozzi, M., Guarino, A., and Soprano, V. Food poisoning following consumption of clenbuterol-treated veal in Italy. 1997. JAMA 278, 8, 635-

140. Barbosa, J., Cruz, C., Martins, J., Silva, J. M., Neves, C., Alves, C., Ramos, F., and Da Silveira, M. I. Food poisoning by clenbuterol in Portugal. 2005. Food Addit.Contam 22, 6, 563-566.

141. Schulman, Lisa J., Sargent, Edward V., Naumann, Bruce D., Faria, Ellen C., Dolan, David G., and Wargo, John P. A Human Health Risk Assessment of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment. 2002. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 8, 4, 657-680.

142. [Rapport] ANSES. Suivi des ventes d'antibiotiques vétérinaires. 2013

143. Stolker, A. A. and Brinkman, U. A. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals--a review. 2005. J.Chromatogr.A 1067, 1-2, 15-53.

144. Boonk, W. J. and van Ketel, W. G. The role of penicillin in the pathogenesis of chronic urticaria. 1982. Br.J.Dermatol. 106, 2, 183-190.

145. de Albuquerque Fernandes, S. A., Magnavita, A. P., Ferrao, S. P., Gualberto, S. A., Faleiro, A. S., Figueiredo, A. J., and Matarazzo, S. V. Daily ingestion of tetracycline residue present in pasteurized milk: a public health problem. 2014. Environ.Sci.Pollut.Res.Int. 21, 5, 3427-3434.

146. Knappstein, Karin, Suhren, Gertraud, and Walte, Hans Georg. Influence of milking frequency on withdrawal period after application of Î²-lactam antibiotic-based drugs. 2003. Analytica Chimica Acta 483, 1â€“2, 241-249.

147. Piddock, L. J. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? 1996. J.Antimicrob.Chemother. 38, 1, 1-3.

148. Piddock, L. J. Fluoroquinolone resistance: overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. 1998. BMJ 317, 7165, 1029-1030.

149. van den Bogaard, A. E., Jensen, L. B., and Stobberingh, E. E. Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers. 1997. N.Engl.J.Med. 337, 21, 1558-1559.

150. Levy, S. B., FitzGerald, G. B., and Macone, A. B. Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. 1976. N.Engl.J.Med. 295, 11, 583-588.

151. Cabello, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. 2006. Environ.Microbiol. 8, 7, 1137-1144.

152. Salyers, A. A., Gupta, A., and Wang, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. 2004. Trends Microbiol. 12, 9, 412-416.

153. Moubarek C., Bourgeois N., and Doucet-Populaire F. L'utilisation des antibiotiques en pratique vétérinaire et ses risques pour la santé humaine. 2003. Environnement, Risques & Santé 2, 2,

154. Neu, H. C. The crisis in antibiotic resistance. 1992. Science 257, 5073, 1064-1073.

155. [Rapport] Panisset J.C., Dewailly E., and Doucet-Leduc H. Contamination alimentaire. 2003

156. Smith, K. E., Besser, J. M., Hedberg, C. W., Leano, F. T., Bender, J. B., Wicklund, J. H., Johnson, B. P., Moore, K. A., and Osterholm, M. T. Quinolone-resistant Campylobacter jejuni infections in Minnesota, 1992-1998. Investigation Team. 1999. N.Engl.J.Med. 340, 20, 1525-1532.

157. [Rapport] Organisation Mondiale de la Santé (OMS). The Medical impact of antimicrobial use in food animals. 1997

158. Khachatourians, G. G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. 1998. CMAJ. 159, 9, 1129-1136.

159. Sorum H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens - In antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. 2006. American Society for Microbiology Press 213-238.

160. Goldburg, Rebecca and Naylor, Rosamond. Future seascapes, fishing, and fish farming. 2005. Frontiers in Ecology and the Environment 3, 1, 21-28.

161. Angulo, F. J., Nargund, V. N., and Chiller, T. C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. 2004. J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health 51, 8-9, 374-379.

162. Jacoby, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. 2005. Clin.Infect.Dis. 41 Suppl 2, S120-S126.

163. McLachlan, J. A., Simpson, E., and Martin, M. Endocrine disrupters and female reproductive health. 2006. Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab 20, 1, 63-75.

164. Christensen, F. M. Pharmaceuticals in the environment--a human risk? 1998. Regul.Toxicol.Pharmacol. 28, 3, 212-221.

165. Couper J.M. and Leise E.M. Serotonin injections induce metamorphois in larvae og the gastropod mollusc llynassa obsoleta. 1996. The Biological Bulletin 191, 178-186.

166. Fagin, D. Toxicology: The learning curve. 2012. Nature 490, 7421, 462-465.

167. [Rapport] Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE). Convention de Bâle sur le contrôle des mouvements transfrontières de déchets dangereux et de leur élimination. 1989

168. [Rapport] Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE). Convention de Rotterdam sur la procédure de consentement préalable en connaissance de cause applicable à certains produits chimiques et pesticides dangereux qui font l'objet d'un commerce international. 1998

169. [Rapport] Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE). Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants (POP). 2001

170. [Site Internet] http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=124 (Consulté le 26/07/2014)

171. [Site Internet] http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000887727 (Consulté le 26/07/2014)

172. [Site Internet] http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000242262 (Consulté le 26/07/2014)

173. [Site Internet] http://www.data.gouv.fr/dataset/produits-biocides-30381961 (Consulté le 30/07/2014)

174. [Site Internet] http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0001:0050:FR:PDF (Consulté le 26/07/2014)

175. [Site Internet] http://www.sante.gouv.fr/autorisation-du-medicament-specialite-pharmaceutique.html (Consulté le 27/07/2014)

176. [Site Internet] http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage (Consulté le 27/07/2014)

177. [Site Internet] http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=348 (Consulté le 28/07/2014)

178. [Site Internet] http://europa.eu/legislation_summaries/internal_market/single_market_for_goods/chemical_products/l21282_fr.htm (Consulté le 28/07/2014)

179. [Site Internet] http://europa.eu/legislation_summaries/agriculture/environment/l28002b_fr.htm#Key (Consulté le 27/08/2014)

180. [Site Internet] http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=662 (Consulté le 28/07/2014)

181. Schechter, Milton S. and Haller, H. L. Colorimetric tests for DDT and related compounds. 1944. Journal of the American Chemical Society 66, 12, 2129-2130.

182. Lisk, DonaldJ. Residue Reviews 1, Pesticide residue analysis by oxygen flask combustion. ISBN : 978-1-4615-8373-8

183. GUNTHER, FRANCIS A. and BLINN, ROGER C. Analysis of Insecticides and Acaricides. 1955. Soil Science 80, 2,

184. Wagner, C. D., Campanile, V. A., and Guinn, V. P. Techniques of chemical research with the electron Van de Graaff. 1959. Nuclear Instruments and Methods 6, 0, 238-242.

185. Martin, A. J. and Synge, R. L. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. 1941. Biochem.J. 35, 12, 1358-1368.

186. Sakodynskii, K. and Chmutov, K. M. S. Tswett and Chromatography. 1972. Chromatographia 5, 8, 471-476.

187. WINTERINGHAM, F. P. Separation and detection of the pyrethrin-type insecticides and their derivatives by reversed phase paper chromatography. 1952. Science 116, 3017, 452-453.

188. BRAITHWAITE, D. P. Detection of Phosphorothioate pesticides. 1963. Nature 200, 1011-

189. Carter, B. G., Yo, S. L., and Sehon, A. H. The use of bacteriophage neutralization technique for the detection of anti-hapten antibody. 1968. Can.J.Biochem. 46, 3, 261-265.

190. ADLARD, E. R. and WHITHAM, B. T. Behavior of 5A molecular sieve in subtractive gas chromatography. 1961. Nature 192, 966-

191. [Site Internet] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed (Consulté le 30/07/2014)

192. Commoner, B. and Lipkin, D. The Application of the Beer-Lambert Law to Optically Anisotropic Systems. 1949. Science 110, 2845, 41-43.

193. WILLIS, J. B. Determination of calcium in blood serum by atomic absorption spectroscopy. 1960. Nature 186, 249-250.

194. STAHL, E. [Thin-layer chromatography; methods, influencing factors and an example of its use]. 1956. Pharmazie 11, 10, 633-637.

195. [Rapport] BRGM. Applicabilité des kits ELISA dans le cadre de la surveillance des eaux souterraines et eaux superficielles. 2010

196. RAY, N. H. Effect of the carrier gas on the sensitivity of a thermal conductivity detector in gas chromatography. 1958. Nature 182, 4650, 1663-

197. NDREATCH, A. J. Flame ionization detector. Application to industrial hygiene and air pollution studies. 1962. Arch.Environ.Health 4, 317-319.

198. LODI, F. [GAS CHROMATOGRAPHIC DETECTION AND DETERMINATION OF PARATHION WITH AN ELECTRON-CAPTURE DETECTOR]. 1964. Farmaco Prat. 19, 560-566.

199. Stanley, C. W. and Morrison, J. I. Identification of organophosphate pesticides by gas chromatography with the flame photometric detector. 1969. J.Chromatogr. 40, 2, 289-293.

200. Mavrodineanu, R. and Hughes, R. C. A multichannel spectrometer for simultaneous atomic absorption and flame emission analysis. 1968. Appl.Opt. 7, 7, 1281-1285.

201. Facchinetti, T., D'Incalci, M., Martelli, G., Cantoni, L., Belvedere, G., and Salmona, M. Simple and sensitive method for the determination of cyclophosphamide by means of a nitrogen--phosphorus-selective detector. 1978. J.Chromatogr. 145, 2, 315-318.

202. Lipsett, F. R., Bechthold, G., Blair, F. D., Cairns, F. V., and O'Hara, D. H. Apparatus for measurement of luminescence spectra with a digital recording system. 1970. Appl.Opt. 9, 6, 1312-1318.

203. Byast, T. H. and Cotterill, E. G. Two methods for estimating terbutryne residues in water using high-pressure liquid chromatography and gas-liquid chromatography with a conductivity detector. 1975. J.Chromatogr. 104, 1, 211-214.

204. Zech, K., Huber, R., and Elgass, H. On-line screening for drug metabolites by high-performance liquid chromatography with a diode array UV detector. 1983. J.Chromatogr. 282, 161-167.

205. Riggin, R. M., Schmidt, A. L., and Kissinger, P. T. Determination of acetaminophen in pharmaceutical preparations and body fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. 1975. J.Pharm.Sci. 64, 4, 680-683.

206. Thomson, J. J. On the appearance of Helium and Neon in vacuum tubes. 1913. Science 37, 949, 360-364.

207. Boudah S., Roux A., and Junot C. Advances and challenges in Liquid Chromatography - Mass Spectrometry based metabolomics. 2012. Spectra Analyse 284, 52-68.

208. Bleakney, Walker. A New Method of Positive Ray Analysis and Its Application to the Measurement of Ionization Potentials in Mercury Vapor. 1929. Physical Review 34, 1, 157-160.

209. Munson, M. S. B. and Field, F. H. Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction. 1966. Journal of the American Chemical Society 88, 12, 2621-2630.

210. Gamon, M., Lleo, C., Ten, A., and Mocholi, F. Multiresidue determination of pesticides in fruit and vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry. 2001. J.AOAC Int. 84, 4, 1209-1216.

211. Banerjee, K., Utture, S., Dasgupta, S., Kandaswamy, C., Pradhan, S., Kulkarni, S., and Adsule, P. Multiresidue determination of 375 organic contaminants including pesticides, polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in fruits and vegetables by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with introduction of semi-quantification approach. 2012. J.Chromatogr.A 1270, 283-295.

212. Frenich, A. G., Bolanos, P. P., and Vidal, J. L. Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry. 2007. J.Chromatogr.A 1153, 1-2, 194-202.

213. Guo, Q., Deng, M., Yu, B., and Tan, L. Analysis of the residues of 20 organochlorine pesticides in Herba epimedii, a Chinese herbal medicine, by solid-phase extraction with gas chromatography/negative chemical ionization-mass spectrometry. 2010. J.AOAC Int. 93, 1, 295-305.

214. Da Silva, R. L., Da Silva, C. P., and Navickiene, S. Multiresidue determination of carbamate, organochlorine, organophosphorus, and dicarboximide pesticides in lettuce by GC/MS. 2010. J.Environ.Sci.Health B 45, 6, 589-594.

215. Zhu, P., Miao, H., Du, J., Zou, J. H., Zhang, G. W., Zhao, Y. F., and Wu, Y. N. Organochlorine Pesticides and Pyrethroids in Chinese Tea by Screening and Confirmatory Detection Using GC-NCI-MS and GC-MS/MS. 2014. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62, 29, 7092-7100.

216. Horning, E. C., Horning, M. G., Carroll, D. I., Dzidic, I., and Stillwell, R. N. New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. 1973. Analytical Chemistry 45, 6, 936-943.

217. Robb, Damon B., Covey, Thomas R., and Bruins, Andries P. Atmospheric Pressure Photoionization:â€‰An Ionization Method for Liquid Chromatographyâ€’Mass Spectrometry. 2000. Analytical Chemistry 72, 15, 3653-3659.

218. Raffaelli, Andrea and Saba, Alessandro. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. 2003. Mass Spectrometry Reviews 22, 5, 318-331.

219. Marchi, Ivano, Rudaz, Serge, and Veuthey, Jean Luc. Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: A review. 2009. Talanta 78, 1, 1-18.

220. Cody, R. B., Laramee, J. A., and Durst, H. D. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. 2005. Analytical Chemistry 77, 8, 2297-2302.

221. Portoles, T., Mol, J. G., Sancho, J. V., Lopez, F. J., and Hernandez, F. Validation of a qualitative screening method for pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. 2014. Anal.Chim.Acta 838, 76-85.

222. Ramirez, C. E., Wang, C., and Gardinali, P. R. Fully automated trace level determination of parent and alkylated PAHs in environmental waters by online SPE-LC-APPI-MS/MS. 2014. Anal.Bioanal.Chem. 406, 1, 329-344.

223. Chiaia-Hernandez, A. C., Krauss, M., and Hollender, J. Screening of lake sediments for emerging contaminants by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization coupled to high resolution mass spectrometry. 2013. Environ.Sci.Technol. 47, 2, 976-986.

224. Suominen, T., Haapala, M., Takala, A., Ketola, R. A., and Kostiainen, R. Neurosteroid analysis by gas chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry. 2013. Anal.Chim.Acta 794, 76-81.

225. Hurtado-Fernandez, E., Pacchiarotta, T., Longueira-Suarez, E., Mayboroda, O. A., Fernandez-Gutierrez, A., and Carrasco-Pancorbo, A. Evaluation of gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry as an alternative to gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry: avocado fruit as example. 2013. J.Chromatogr.A 1313, 228-244.

226. Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M. J., and Barcelo, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. 2004. J.Chromatogr.A 1045, 1-2, 85-92.

227. Crawford, E. and Musselman, B. Evaluating a direct swabbing method for screening pesticides on fruit and vegetable surfaces using Direct Analysis in Real Time (DART) coupled to an Exactive benchtop orbitrap mass spectrometer. 2012. Anal.Bioanal.Chem. 403, 10, 2807-2812.

228. Duvivier, W. F., van Beek, T. A., Pennings, E. J., and Nielen, M. W. Rapid analysis of Delta-9-tetrahydrocannabinol in hair using direct analysis in real time ambient ionization orbitrap mass spectrometry. 2014. Rapid Communications in Mass Spectrometry 28, 7, 682-690.

229. Sisco, E., Dake, J., and Bridge, C. Screening for trace explosives by AccuTOF-DART(R): an in-depth validation study. 2013. Forensic Sci.Int. 232, 1-3, 160-168.

230. Gross, J. H. Direct analysis in real time--a critical review on DART-MS. 2014. Anal.Bioanal.Chem. 406, 1, 63-80.

231. Tanaka, Koichi, Waki, Hiroaki, Ido, Yutaka, Akita, Satoshi, Yoshida, Yoshikazu, Yoshida, Tamio, and Matsuo, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. 1988. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2, 8, 151-153.

232. Hillenkamp, Franz, Karas, Michael, Beavis, Ronald C., and Chait, Brian T. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. 1991. Analytical Chemistry 63, 24, 1193A-1203A.

233. Madla, S., Miura, D., and Wariishi, H. Potential applicability of MALDI-MS for low-molecular-weight pesticide determination. 2012. Anal.Sci. 28, 3, 301-303.

234. Lagarrigue, M., Lavigne, R., Tabet, E., Genet, V., Thome, J. P., Rondel, K., Guevel, B., Multigner, L., Samson, M., and Pineau, C. Localization and in situ absolute quantification of chlordecone in the mouse liver by MALDI imaging. 2014. Analytical Chemistry 86, 12, 5775-5783.

235. Mullen, A. K., Clench, M. R., Crosland, S., and Sharples, K. R. Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. 2005. Rapid Communications in Mass Spectrometry 19, 18, 2507-2516.

236. Anderson, D. M., Carolan, V. A., Crosland, S., Sharples, K. R., and Clench, M. R. Examination of the translocation of sulfonylurea herbicides in sunflower plants by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. 2010. Rapid Communications in Mass Spectrometry 24, 22, 3309-3319.

237. Yamashita, Masamichi and Fenn, John B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. 1984. The Journal of Physical Chemistry 88, 20, 4451-4459.

238. Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., and Fenn, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. 1985. Analytical Chemistry 57, 3, 675-679.

239. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. 1989. Science 246, 4926, 64-71.

240. Takats, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B., and Cooks, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. 2004. Science 306, 5695, 471-473.

241. Hu, F. Y., He, L. M., Yang, J. W., Bian, K., Wang, Z. N., Yang, H. C., and Liu, Y. H. Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC-MS/MS. 2014. J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci. 949-950, 79-86.

242. Wu, X., Conkle, J. L., and Gan, J. Multi-residue determination of pharmaceutical and personal care products in vegetables. 2012. J.Chromatogr.A 1254, 78-86.

243. Bichon, E., Dupuis, M., Le, Bizec B., and Andre, F. LC-ESI-MS/MS determination of phenylurea and triazine herbicides and their dealkylated degradation products in oysters. 2006. J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci. 838, 2, 96-106.

244. Kock-Schulmeyer, M., Olmos, M., Lopez de, Alda M., and Barcelo, D. Development of a multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. 2013. J.Chromatogr.A 1305, 176-187.

245. Robles-Molina, J., Lara-Ortega, F. J., Gilbert-Lopez, B., Garcia-Reyes, J. F., and Molina-Diaz, A. Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. 2014. J.Chromatogr.A 1350, 30-43.

246. Wang, H. X., Zhou, Y., and Jiang, Q. W. Enhanced screening efficiency for endocrine-disrupting chemicals in milk and powdered milk using UPLC/QTOF-MS by the introduction of dansyl chloride derivatisation. 2013. Food Addit.Contam Part A Chem.Anal.Control Expo.Risk Assess. 30, 1, 166-180.

247. Mottier, P., Frank, N., Dubois, M., Tarres, A., Bessaire, T., Romero, R., and Delatour, T. LC-MS/MS analytical procedure to quantify tris(nonylphenyl)phosphite, as a source of the endocrine disruptors 4-nonylphenols, in food packaging materials. 2014. Food Addit.Contam Part A Chem.Anal.Control Expo.Risk Assess. 31, 5, 962-972.

248. Takats, Z., Cotte-Rodriguez, I., Talaty, N., Chen, H., and Cooks, R. G. Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry. 2005. Chem.Commun.(Camb.) 15, 1950-1952.

249. Berchtold, C., Muller, V., Meier, L., Schmid, S., and Zenobi, R. Direct detection of chlorpropham on potato skin using desorption electrospray ionization. 2013. J.Mass Spectrom. 48, 5, 587-593.

250. Biros, Francis J. and Walker, Annita C. Pesticide residue analysis in human tissue by combined gas chromatography---mass spectrometry. 1970. Journal of Agricultural and Food Chemistry 18, 3, 425-429.

251. Biros, FrancisJ. Residue Reviews 40, Recent applications of mass spectrometry and combined gas chromatography-mass spectrometry to pesticide residue analysis. ISBN : 978-1-4615-8478-0

252. Sanchez-Brunete, C., Salto, T., Garcia-Baudin, J. M., and Tadeo, J. L. Analysis of triallate residues in cereals and soil by gas chromatography with ion-trap detection. 1991. J.Chromatogr. 562, 1-2, 525-530.

253. Chichila, T. M. and Erney, D. R. Full scan confirmation of tetrahydrophthalimide in whole milk using gas chromatography/ion trap mass spectrometry. 1994. J.AOAC Int. 77, 6, 1574-1580.

254. Bichon, E., Richard, C. A., and Le, Bizec B. Development and validation of a method for fipronil residue determination in ovine plasma using 96-well plate solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. 2008. J.Chromatogr.A 1201, 1, 91-99.

255. Pico, Y., Farre, Ml, Tokman, N., and Barcelo, D. Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the quantification of amitraz and identification of its degradation products in fruits. 2008. J.Chromatogr.A 1203, 1, 36-46.

256. Ucles, S., Belmonte, N., Mezcua, M., Martinez, A. B., Martinez-Bueno, M. J., Gamon, M., and Fernandez-Alba, A. R. Validation of a multiclass multiresidue method and monitoring results for 210 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. 2014. J.Environ.Sci.Health B 49, 8, 557-568.

257. Soler, C., Manes, J., and Pico, Y. Determination of carbosulfan and its metabolites in oranges by liquid chromatography ion-trap triple-stage mass spectrometry. 2006. J.Chromatogr.A 1109, 2, 228-241.

258. Hernando, M. D., Ferrer, C., Ulaszewska, M., Garcia-Reyes, J. F., Molina-Diaz, A., and Fernandez-Alba, A. R. Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil. 2007. Anal.Bioanal.Chem. 389, 6, 1815-1831.

259. Hogenboom, A. C., Niessen, W. M., Little, D., and Brinkman, U. A. Accurate mass determinations for the confirmation and identification of organic microcontaminants in surface water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography electrospray orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometry. 1999. Rapid Communications in Mass Spectrometry 13, 2, 125-133.

260. Ferrer, I., Garcia-Reyes, J. F., Mezcua, M., Thurman, E. M., and Fernanndez-Alba, A. R. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. 2005. J.Chromatogr.A 1082, 1, 81-90.

261. Hernandez, F., Ibanez, M., Sancho, J. V., and Pozo, O. J. Comparison of different mass spectrometric techniques combined with liquid chromatography for confirmation of pesticides in environmental water based on the use of identification points. 2004. Analytical Chemistry 76, 15, 4349-4357.

262. Pico, Y., Blasco, C., and Font, G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. 2004. Mass Spectrometry Reviews 23, 1, 45-85.

263. Hernandez, F., Sancho, J. V., Ibanez, M., Abad, E., Portoles, T., and Mattioli, L. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. 2012. Anal.Bioanal.Chem. 403, 5, 1251-1264.

264. Kaufmann, A. The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis. 2012. Anal.Bioanal.Chem. 403, 5, 1233-1249.

265. Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., and Widmer, M. Development of an improved high resolution mass spectrometry based multi-residue method for veterinary drugs in various food matrices. 2011. Anal.Chim.Acta 700, 1-2, 86-94.

266. Petrovic, M., Farre, M., de Alda, M. L., Perez, S., Postigo, C., Kock, M., Radjenovic, J., Gros, M., and Barcelo, D. Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. 2010. J.Chromatogr.A 1217, 25, 4004-4017.

267. Botitsi, H. V., Garbis, S. D., Economou, A., and Tsipi, D. F. Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices. 2011. Mass Spectrometry Reviews 30, 5, 907-939.

268. Peterson, A. C., Balloon, A. J., Westphall, M. S., and Coon, J. J. Development of a GC/Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer, Part II: New Approaches for Discovery Metabolomics. 2014. Analytical Chemistry 86, 20, 10044-10051.

269. He, Z., Wang, L., Peng, Y., Luo, M., Wang, W., and Liu, X. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry-based method. 2015. Food Chem. 169, 372-380.

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

271. Chen, X., Bian, Z., Hou, H., Yang, F., Liu, S., Tang, G., and Hu, Q. Development and validation of a method for the determination of 159 pesticide residues in tobacco by gas chromatography-tandem mass spectrometry. 2013. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 24, 5746-5757.

272. Fillatre, Yoann, Rondeau, David, Daguin, Antoine, Jadas-Hecart, Alain, and Communal, Pierre Yves. Multiresidue determination of 256 pesticides in lavandin essential oil by LC/ESI/sSRM: advantages and drawbacks of a sampling method involving evaporation under nitrogen. 2014. Anal Bioanal Chem 406, 5, 1541-1550.

273. Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., and Guwy, A. J. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. 2008. Anal.Bioanal.Chem. 391, 4, 1293-1308.

274. Gilbert-Lopez, B., Garcia-Reyes, J. F., and Molina-Diaz, A. Determination of fungicide residues in baby food by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. 2012. Food Chem. 135, 2, 780-786.

275. Cazorla-Reyes, R., Fernandez-Moreno, J. L., Romero-Gonzalez, R., Frenich, A. G., and Vidal, J. L. Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. 2011. Talanta 85, 1, 183-196.

276. Savant, R. H., Banerjee, K., Utture, S. C., Patil, S. H., Dasgupta, S., Ghaste, M. S., and Adsule, P. G. Multiresidue analysis of 50 pesticides in grape, pomegranate, and mango by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. 2010. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 3, 1447-1454.

277. Sivaperumal, P., Anand, P., and Riddhi, L. Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. 2015. Food Chem. 168, 356-365.

278. Nurmi, J. and Pellinen, J. Multiresidue method for the analysis of emerging contaminants in wastewater by ultra performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. 2011. J.Chromatogr.A 1218, 38, 6712-6719.

279. Patil, S. H., Banerjee, K., Dasgupta, S., Oulkar, D. P., Patil, S. B., Jadhav, M. R., Savant, R. H., Adsule, P. G., and Deshmukh, M. B. Multiresidue analysis of 83 pesticides and 12 dioxin-like polychlorinated biphenyls in wine by gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. 2009. J.Chromatogr.A 1216, 12, 2307-2319.

280. Rajski, L., Gomez-Ramos, Mdel M., and Fernandez-Alba, A. R. Large pesticide multiresidue screening method by liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry in full scan mode applied to fruit and vegetables. 2014. J.Chromatogr.A 1360, 119-127.

281. Gomez-Perez, M. L., Romero-Gonzalez, R., Plaza-Bolanos, P., Genin, E., Martinez Vidal, J. L., and Garrido, Frenich A. Wide-scope analysis of pesticide and veterinary drug residues in meat matrices by high resolution MS: detection and identification using Exactive-Orbitrap. 2014. J.Mass Spectrom. 49, 1, 27-36.

282. Wode, F., Reilich, C., van, Baar P., Dunnbier, U., Jekel, M., and Reemtsma, T. Multiresidue analytical method for the simultaneous determination of 72 micropollutants in aqueous samples with ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. 2012. J.Chromatogr.A 1270, 118-126.

283. Nanita, S. C., Pentz, A. M., and Bramble, F. Q. High-throughput pesticide residue quantitative analysis achieved by tandem mass spectrometry with automated flow injection. 2009. Analytical Chemistry 81, 8, 3134-3142.

284. Nakazawa, H., Takahashi, N., Inoue, K., Ito, Y., Goto, T., Kato, K., Yoshimura, Y., and Oka, H. Rapid and simultaneous analysis of dichlorvos, malathion, carbaryl, and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid in citrus fruit by flow-injection ion spray ionization tandem mass spectrometry. 2004. Talanta 64, 4, 899-905.

285. Nanita, S. C., Stry, J. J., Pentz, A. M., McClory, J. P., and May, J. H. Fast extraction and dilution flow injection mass spectrometry method for quantitative chemical residue screening in food. 2011. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59, 14, 7557-7568.

286. [Rapport] Yoann Fillatre. Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. 2012

287. Banerjee, K., Mujawar, S., Utture, S. C., Dasgupta, S., and Adsule, P. G. Optimization of gas chromatography-single quadrupole mass spectrometry conditions for multiresidue analysis of pesticides in grapes in compliance to EU-MRLs. 2013. Food Chem. 138, 1, 600-607.

288. Cervera, M. I., Medina, C., Portoles, T., Pitarch, E., Beltran, J., Serrahima, E., Pineda, L., Munoz, G., Centrich, F., and Hernandez, F. Multi-residue determination of 130 multiclass pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. 2010. Anal.Bioanal.Chem. 397, 7, 2873-2891.

289. Hou, X., Han, M., Dai, X., Yang, X., and Yi, S. A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. 2013. Food Chem. 138, 2-3, 1198-1205.

290. Feo, M. L., Eljarrat, E., and Barcelo, D. Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. 2011. Rapid Communications in Mass Spectrometry 25, 7, 869-876.

291. Portoles, T., Mol, J. G., Sancho, J. V., and Hernandez, F. Use of electron ionization and atmospheric pressure chemical ionization in gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for screening and identification of organic pollutants in waters. 2014. J.Chromatogr.A 1339, 145-153.

292. Hayward, D. G., Wong, J. W., Zhang, K., Chang, J., Shi, F., Banerjee, K., and Yang, P. Multiresidue pesticide analysis in ginseng and spinach by nontargeted and targeted screening procedures. 2011. J.AOAC Int. 94, 6, 1741-1751.

293. Veyrand, B., Venisseau, A., Marchand, P., Antignac, J. P., and Le, Bizec B. Determination of toxaphene specific congeners in fish liver oil and feedingstuff using gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. 2008. J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci. 865, 1-2, 121-126.

294. Zhang, F., Wang, H., Zhang, L., Zhang, J., Fan, R., Yu, C., Wang, W., and Guo, Y. Suspected-target pesticide screening using gas chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry with high resolution deconvolution and retention index/mass spectrum library. 2014. Talanta 128, 156-163.

295. Gomez, M. J., Gomez-Ramos, M. M., Aguera, A., Mezcua, M., Herrera, S., and Fernandez-Alba, A. R. A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters. 2009. J.Chromatogr.A 1216, 18, 4071-4082.

296. Gary D.Christian. Analytical Chemistry 5th Edition. ISBN :

297. Ibanez, M., Guerrero, C., Sancho, J. V., and Hernandez, F. Screening of antibiotics in surface and wastewater samples by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. 2009. J.Chromatogr.A 1216, 12, 2529-2539.

298. Pizzutti, Ionara R., de Kok, Andre, Scholten, Jos, Righi, LaÃ s W., Cardoso, Carmem D., Necchi Rohers, Graciele, and da Silva, Rosselei C. Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatographyâ€“tandem mass spectrometry. 2014. Talanta 129, 0, 352-363.

299. Wode, Florian, Reilich, Christa, van Baar, Patricia, DÃ¼nnbier, Uwe, Jekel, Martin, and Reemtsma, Thorsten. Multiresidue analytical method for the simultaneous determination of 72 micropollutants in aqueous samples with ultra high performance liquid chromatographyâ€“high resolution mass spectrometry. 2012. Journal of Chromatography A 1270, 0, 118-126.

300. Kirkland, J. J. Development of some stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. 2004. J.Chromatogr.A 1060, 1-2, 9-21.

301. Greulich, Kerstin and Alder, Lutz. Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS. 2008. Anal Bioanal Chem 391, 1, 183-197.

302. Banerjee, Kaushik, Oulkar, Dasharath P., Patil, Shubhangi B., Jadhav, Manjusha R., Dasgupta, Soma, Patil, Sangram H., Bal, Sunita, and Adsule, Pandurang G. Multiresidue Determination and Uncertainty Analysis of 87 Pesticides in Mango by Liquid Chromatographyâˆ’Tandem Mass Spectrometry. 2009. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 10, 4068-4078.

303. Garcia-Galan, Maria Jesus, Diaz-Cruz, Silvia, and Barcelo, Damia. Multiresidue trace analysis of sulfonamide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatographyâ€“electrospray-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. 2013. Journal of Chromatography A 1275, 0, 32-40.

304. Kaufmann, Anton, Butcher, Patrick, Maden, Kathryn, and Widmer, Mirjam. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2-Î¼m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. 2008. Journal of Chromatography A 1194, 1, 66-79.

305. Ibanez, M., Sancho, J. V., and Hernandez, F. Determination of melamine in milk-based products and other food and beverage products by ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2009. Anal Chim.Acta 649, 1, 91-97.

306. Castro, R., Moyano, E., and Galceran, M. T. Determination of quaternary ammonium pesticides by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. 2001. J.Chromatogr.A 914, 1-2, 111-121.

307. Martos, P. A., Jayasundara, F., Dolbeer, J., Jin, W., Spilsbury, L., Mitchell, M., Varilla, C., and Shurmer, B. Multiclass, multiresidue drug analysis, including aminoglycosides, in animal tissue using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. 2010. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 10, 5932-5944.

308. Chiaochan, C., Koesukwiwat, U., Yudthavorasit, S., and Leepipatpiboon, N. Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. 2010. Anal.Chim.Acta 682, 1-2, 117-129.

309. Botero-Coy, A. M., Ibanez, M., Sancho, J. V., and Hernandez, F. Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. 2013. J.Chromatogr.A 1313, 157-165.

310. Kittlaus, S., Schimanke, J., Kempe, G., and Speer, K. Development and validation of an efficient automated method for the analysis of 300 pesticides in foods using two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2013. J.Chromatogr.A 1283, 98-109.

311. Hayama, T., Yoshida, H., Todoroki, K., Nohta, H., and Yamaguchi, M. Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. 2008. Rapid Communications in Mass Spectrometry 22, 14, 2203-2210.

312. Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., and Vieth, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? 2006. Mass Spectrometry Reviews 25, 6, 838-865.

313. Blasco, C., Pico, Y., and Andreu, V. Analytical method for simultaneous determination of pesticide and veterinary drug residues in milk by CE-MS. 2009. Electrophoresis 30, 10, 1698-1707.

314. Simo, C., Garcia-Canas, V., and Cifuentes, A. Chiral CE-MS. 2010. Electrophoresis 31, 9, 1442-1456.

315. Herrero, M., Garcia-Canas, V., Simo, C., and Cifuentes, A. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. 2010. Electrophoresis 31, 1, 205-228.

316. Garrison, A. W., Avants, J. K., and Miller, R. D. Loss of propiconazole and its four stereoisomers from the water phase of two soil-water slurries as measured by capillary electrophoresis. 2011. Int.J.Environ.Res.Public Health 8, 8, 3453-3467.

317. [Site Internet] http://www.doping.chuv.ch/lad_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations-laboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ec.htm (Consulté le 17/11/2014)

318. Farré M., Martinez E., and Barcelo D. Techniques de détermination de composés organiques dans l'environnement. ISBN :

319. Robles-Molina, J., Gilbert-Lopez, B., Garcia-Reyes, J. F., and Molina-Diaz, A. Comparative evaluation of liquid-liquid extraction, solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the gas chromatography-mass spectrometry determination of multiclass priority organic contaminants in wastewater. 2013. Talanta 117, 382-391.

320. Gfrerer, M., Chen, S., Lankmayr, E. P., Quan, X., and Yang, F. Comparison of different extraction techniques for the determination of chlorinated pesticides in animal feed. 2004. Anal.Bioanal.Chem. 378, 7, 1861-1867.

321. Wang, W., Meng, B., Lu, X., Liu, Y., and Tao, S. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: a comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. 2007. Anal.Chim.Acta 602, 2, 211-222.

322. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., and Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. 2003. J.AOAC Int. 86, 2, 412-431.

323. Lehotay, S. J., Mastovska, K., and Lightfield, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. 2005. J.AOAC Int. 88, 2, 615-629.

324. [Site Internet] http://www.sepscience.com/Techniques/Sample-Prep/Articles/865-/QuEChERS-A-Primer (Consulté le 17/09/2014)

325. Cherta, L., Portoles, T., Beltran, J., Pitarch, E., Mol, J. G., and Hernandez, F. Application of gas chromatography-(triple quadrupole) mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization for the determination of multiclass pesticides in fruits and vegetables. 2013. J.Chromatogr.A 1314, 224-240.

326. Walorczyk, S. and Drozdzynski, D. Development and validation of a routine multiresidue method for determining 140 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/tandem quadrupole mass spectrometry. 2011. J.AOAC Int. 94, 5, 1625-1642.

327. Garrido, Frenich A., Martinez Vidal, J. L., Pastor-Montoro, E., and Romero-Gonzalez, R. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2008. Anal.Bioanal.Chem. 390, 3, 947-959.

328. Wang, J., Chow, W., Leung, D., and Chang, J. Application of ultrahigh-performance liquid chromatography and electrospray ionization quadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometry for determination of 166 pesticides in fruits and vegetables. 2012. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, 49, 12088-12104.

329. Wang, S., Xu, Y., Pan, C., Jiang, S., and Liu, F. Application of matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry to fungicide residue analysis in fruits and vegetables. 2007. Anal.Bioanal.Chem. 387, 2, 673-685.

330. Lacina, O., Zachariasova, M., Urbanova, J., Vaclavikova, M., Cajka, T., and Hajslova, J. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2012. J.Chromatogr.A 1262, 8-18.

331. Lee, S. W., Choi, J. H., Cho, S. K., Yu, H. A., bd El-Aty, A. M., and Shim, J. H. Development of a new QuEChERS method based on dry ice for the determination of 168 pesticides in paprika using tandem mass spectrometry. 2011. J.Chromatogr.A 1218, 28, 4366-4377.

332. Gilbert-Lopez, B., Garcia-Reyes, J. F., Lozano, A., Fernandez-Alba, A. R., and Molina-Diaz, A. Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. 2010. J.Chromatogr.A 1217, 39, 6022-6035.

333. Tomasini, D., Sampaio, M. R., Caldas, S. S., Buffon, J. G., Duarte, F. A., and Primel, E. G. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. 2012. Talanta 99, 380-386.

334. Pizzutti, I. R., de, Kok A., Scholten, J., Righi, L. W., Cardoso, C. D., Necchi, Rohers G., and da Silva, R. C. Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2014. Talanta 129, 352-363.

335. Jiang, Y., Li, X., Xu, J., Pan, C., Zhang, J., and Niu, W. Multiresidue method for the determination of 77 pesticides in wine using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with mass spectrometry. 2009. Food Addit.Contam Part A Chem.Anal.Control Expo.Risk Assess. 26, 6, 859-866.

336. Shoeibi, S., Amirahmadi, M., Rastegar, H., Khosrokhavar, R., and Khaneghah, A. M. An applicable strategy for improvement recovery in simultaneous analysis of 20 pesticides residue in tea. 2013. J.Food Sci. 78, 5, T792-T796.

337. Romero-Gonzalez, R., Garrido, Frenich A., and Martinez Vidal, J. L. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. 2008. Talanta 76, 1, 211-225.

338. Gomez, M. J., Herrera, S., Sole, D., Garcia-Calvo, E., and Fernandez-Alba, A. R. Spatio-temporal evaluation of organic contaminants and their transformation products along a river basin affected by urban, agricultural and industrial pollution. 2012. Sci.Total Environ. 420, 134-145.

339. Bourgin, M., Gervais, G., Bichon, E., Antignac, J. P., Monteau, F., Leroy, G., Barritaud, L., Chachignon, M., Ingrand, V., Roche, P., and Le, Bizec B. Differential chemical profiling to identify ozonation by-products of estrone-sulfate and first characterization of estrogenicity in generated drinking water. 2013. Water Res. 47, 11, 3791-3802.

340. Luft, A., Wagner, M., and Ternes, T. A. Transformation of biocides irgarol and terbutryn in the biological wastewater treatment. 2014. Environ.Sci.Technol. 48, 1, 244-254.

341. Fenner K., Caronica S., Wackett L.P., and Elsner M. Evaluating Pesticide Degradation in the Environment: Blind Spots and Emerging Opportunities. 2013. Science 341, 752-758.

342. Escher, B. I. and Fenner, K. Recent advances in environmental risk assessment of transformation products. 2011. Environ.Sci.Technol. 45, 9, 3835-3847.

343. Neuwoehner, J., Fenner, K., and Escher, B. I. Physiological modes of action of fluoxetine and its human metabolites in algae. 2009. Environ.Sci.Technol. 43, 17, 6830-6837.

344. Neuwoehner, J., Zilberman, T., Fenner, K., and Escher, B. I. QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids. 2010. Aquat.Toxicol. 97, 1, 58-67.

345. Boxall, A. B., Sinclair, C. J., Fenner, K., Kolpin, D., and Maund, S. J. When synthetic chemicals degrade in the environment. 2004. Environ.Sci.Technol. 38, 19, 368A-375A.

346. Buth, J. M., Steen, P. O., Sueper, C., Blumentritt, D., Vikesland, P. J., Arnold, W. A., and McNeill, K. Dioxin photoproducts of triclosan and its chlorinated derivatives in sediment cores. 2010. Environ.Sci.Technol. 44, 12, 4545-4551.

347. Balmer, M. E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P. A., Muller, M. D., and Buser, H. R. Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. 2004. Environ.Sci.Technol. 38, 2, 390-395.

348. Nalecz-Jawecki, G., Wojcik, T., and Sawicki, J. Evaluation of in vitro biotransformation of propranolol with HPLC, MS/MS, and two bioassays. 2008. Environ.Toxicol. 23, 1, 52-58.

349. Escher, B. I., Bramaz, N., Lienert, J., Neuwoehner, J., and Straub, J. O. Mixture toxicity of the antiviral drug Tamiflu((R)) (oseltamivir ethylester) and its active metabolite oseltamivir acid. 2010. Aquat.Toxicol. 96, 3, 194-202.

350. D'Ascenzo, G., Di, Corcia A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., and Samperi, R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. 2003. Sci.Total Environ. 302, 1-3, 199-209.

351. Gomes, R. L., Scrimshaw, M. D., and Lester, J. N. Fate of conjugated natural and synthetic steroid estrogens in crude sewage and activated sludge batch studies. 2009. Environ.Sci.Technol. 43, 10, 3612-3618.

352. Krauss, M., Singer, H., and Hollender, J. LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. 2010. Anal.Bioanal.Chem. 397, 3, 943-951.

353. Hernandez, F., Ibanez, M., Gracia-Lor, E., and Sancho, J. V. Retrospective LC-QTOF-MS analysis searching for pharmaceutical metabolites in urban wastewater. 2011. J.Sep.Sci. 34, 24, 3517-3526.

354. Thurman, E. M., Ferrer, I., Zweigenbaum, J. A., Garcia-Reyes, J. F., Woodman, M., and Fernandez-Alba, A. R. Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry. 2005. J.Chromatogr.A 1082, 1, 71-80.

355. Garcia-Reyes, J. F., Molina-Diaz, A., and Fernandez-Alba, A. R. Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via "fragmentation-degradation" relationships. 2007. Analytical Chemistry 79, 1, 307-321.

356. Ibanez, M., Sancho, J. V., Pozo, O. J., and Hernandez, F. Use of quadrupole time-of-flight mass spectrometry in environmental analysis: elucidation of transformation products of triazine herbicides in water after UV exposure. 2004. Analytical Chemistry 76, 5, 1328-1335.

357. Peschka, M., Petrovic, M., Knepper, T. P., and Barcelo, D. Determination of two phototransformation products of bentazone using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. 2007. Anal.Bioanal.Chem. 388, 5-6, 1227-1234.

358. Lambropoulou, D. A., Konstantinou, I. K., Albanis, T. A., and Fernandez-Alba, A. R. Photocatalytic degradation of the fungicide Fenhexamid in aqueous TiO(2) suspensions: identification of intermediates products and reaction pathways. 2011. Chemosphere 83, 3, 367-378.

359. Kosjek, T., Zigon, D., Kralj, B., and Heath, E. The use of quadrupole-time-of-flight mass spectrometer for the elucidation of diclofenac biotransformation products in wastewater. 2008. J.Chromatogr.A 1215, 1-2, 57-63.

360. Perez, S., Eichhorn, P., and Barcelo, D. Structural characterization of photodegradation products of enalapril and its metabolite enalaprilat obtained under simulated environmental conditions by hybrid quadrupole-linear ion trap-MS and quadrupole-time-of-flight-MS. 2007. Analytical Chemistry 79, 21, 8293-8300.

361. Postigo, C., Sirtori, C., Oller, I., Malato, S., Maldonado, M. I., Lopez de, Alda M., and Barcelo, D. Photolytic and photocatalytic transformation of methadone in aqueous solutions under solar irradiation: kinetics, characterization of major intermediate products and toxicity evaluation. 2011. Water Res. 45, 16, 4815-4826.

362. Radjenovic, J., Perez, S., Petrovic, M., and Barcelo, D. Identification and structural characterization of biodegradation products of atenolol and glibenclamide by liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion trap mass spectrometry. 2008. J.Chromatogr.A 1210, 2, 142-153.

363. Junot, C., Madalinski, G., Tabet, J. C., and Ezan, E. Fourier transform mass spectrometry for metabolome analysis. 2010. Analyst 135, 9, 2203-2219.

364. Darghouth, D., Koehl, B., Madalinski, G., Heilier, J. F., Bovee, P., Xu, Y., Olivier, M. F., Bartolucci, P., Benkerrou, M., Pissard, S., Colin, Y., Galacteros, F., Bosman, G., Junot, C., and Romeo, P. H. Pathophysiology of sickle cell disease is mirrored by the red blood cell metabolome. 2011. Blood 117, 6, e57-e66.

365. Bennett, D. A. and Waters, M. D. Applying biomarker research. 2000. Environ.Health Perspect. 108, 9, 907-910.

366. Roux, A., Lison, D., Junot, C., and Heilier, J. F. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. 2011. Clin.Biochem. 44, 1, 119-135.

367. Katajamaa, M., Miettinen, J., and Oresic, M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. 2006. Bioinformatics. 22, 5, 634-636.

368. Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., and Siuzdak, G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. 2006. Analytical Chemistry 78, 3, 779-787.

369. Shortreed, M. R., Lamos, S. M., Frey, B. L., Phillips, M. F., Patel, M., Belshaw, P. J., and Smith, L. M. Ionizable isotopic labeling reagent for relative quantification of amine metabolites by mass spectrometry. 2006. Analytical Chemistry 78, 18, 6398-6403.

370. Dunn, W. B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J. D., Halsall, A., Haselden, J. N., Nicholls, A. W., Wilson, I. D., Kell, D. B., and Goodacre, R. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. 2011. Nat.Protoc. 6, 7, 1060-1083.

371. Lee, J., Park, J., Lim, M. S., Seong, S. J., Seo, J. J., Park, S. M., Lee, H. W., and Yoon, Y. R. Quantile normalization approach for liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomic data from healthy human volunteers. 2012. Anal.Sci. 28, 8, 801-805.

372. Trygg, J., Holmes, E., and Lundstedt, T. Chemometrics in metabonomics. 2007. J.Proteome.Res. 6, 2, 469-479.

373. Kanehisa, M. The KEGG database. 2002. Novartis.Found.Symp. 247, 91-101.

374. Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorndahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., Allen, F., Neveu, V., Greiner, R., and Scalbert, A. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. 2013. Nucleic Acids Res. 41, Database issue, D801-D807.

375. Smith, C. A., O'Maille, G., Want, E. J., Qin, C., Trauger, S. A., Brandon, T. R., Custodio, D. E., Abagyan, R., and Siuzdak, G. METLIN: a metabolite mass spectral database. 2005. Ther.Drug Monit. 27, 6, 747-751.

376. Wagner, A. B. SciFinder Scholar 2006: an empirical analysis of research topic query processing. 2006. J.Chem.Inf.Model. 46, 2, 767-774.

377. Sayers, E. W., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L. Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D. J., Madden, T. L., Maglott, D. R., Miller, V., Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K. D., Schuler, G. D., Sequeira, E., Sherry, S. T., Shumway, M., Sirotkin, K., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusova, T. A., Wagner, L., Yaschenko, E., and Ye, J. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. 2009. Nucleic Acids Res. 37, Database issue, D5-15.

378. Werner, E., Heilier, J. F., Ducruix, C., Ezan, E., Junot, C., and Tabet, J. C. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: current status and future trends. 2008. J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci. 871, 2, 143-163.

379. Werner, E., Croixmarie, V., Umbdenstock, T., Ezan, E., Chaminade, P., Tabet, J. C., and Junot, C. Mass spectrometry-based metabolomics: accelerating the characterization of discriminating signals by combining statistical correlations and ultrahigh resolution. 2008. Analytical Chemistry 80, 13, 4918-4932.

380. Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W., Reily, M. D., Thaden, J. J., and Viant, M. R. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). 2007. Metabolomics. 3, 3, 211-221.

381. [Journaux de presse] Tardieu V. Les apiculteurs accusent le Gaucho d'empoisonner leurs abeilles. Le Monde. 18-4-1998

382. [Journaux de presse] Cougard M.J. La disparition mystérieuse des abeilles. Le Figaro. 2-11-1999

383. Maus C., Curé G., and Schmuck R. Safety of imidacloprid seed dressings to honey bees: a comprehensive overview and compilation of the current state of knowledge. 2003. Bulletin of Insectology 56, 1, 51-57.

384. [Rapport] ANSM. Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles. 2009

385. Yang, X. and Cox-Foster, D. Effects of parasitization by Varroa destructor on survivorship and physiological traits of Apis mellifera in correlation with viral incidence and microbial challenge. 2007. Parasitology 134, Pt 3, 405-412.

386. Rosenkranz, P., Aumeier, P., and Ziegelmann, B. Biology and control of Varroa destructor. 2010. J.Invertebr.Pathol. 103 Suppl 1, S96-119.

387. Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., Kretzchmar, A., and Le, Conte Y. Flight behavior and pheromone changes associated to Nosema ceranae infection of honey bee workers (Apis mellifera) in field conditions. 2013. J.Invertebr.Pathol. 113, 1, 42-51.

388. [Journaux de presse] Chauveau L. Les abeilles ont besoin d'un plan d'urgence. Sciences & Avenir. 26-3-2009

389. Farre, M., Pico, Y., and Barcelo, D. Application of ultra-high pressure liquid chromatography linear ion-trap orbitrap to qualitative and quantitative assessment of pesticide residues. 2014. J.Chromatogr.A 1328, 66-79.

390. Bernal, J., Martin, M. T., Toribio, L., Martin-Hernandez, R., Higes, M., Bernal, J. L., and Nozal, M. J. Determination of tylosins A, B, C and D in bee larvae by liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry. 2011. J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci. 879, 19, 1596-1604.

391. Yanez, K. P., Bernal, J. L., Nozal, M. J., Martin, M. T., and Bernal, J. Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column. 2013. J.Chromatogr.A 1285, 110-117.

392. Yanez, K. P., Martin, M. T., Bernal, J. L., Nozal, M. J., and Bernal, J. Determination of spinosad at trace levels in bee pollen and beeswax with solid-liquid extraction and LC-ESI-MS. 2014. J.Sep.Sci. 37, 3, 204-210.

393. Paradis, D., Berail, G., Bonmatin, J. M., and Belzunces, L. P. Sensitive analytical methods for 22 relevant insecticides of 3 chemical families in honey by GC-MS/MS and LC-MS/MS. 2014. Anal.Bioanal.Chem. 406, 2, 621-633.

394. Wiest, L., Bulete, A., Giroud, B., Fratta, C., Amic, S., Lambert, O., Pouliquen, H., and Arnaudguilhem, C. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. 2011. J.Chromatogr.A 1218, 34, 5743-5756.

395. Gomez-Perez, M. L., Plaza-Bolanos, P., Romero-Gonzalez, R., Martinez-Vidal, J. L., and Garrido-Frenich, A. Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry. 2012. J.Chromatogr.A 1248, 130-138.

396. Jovanov, P., Guzsvany, V., Franko, M., Lazic, S., Sakac, M., Saric, B., and Banjac, V. Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2013. Talanta 111, 125-133.

397. Xu, J. Z., Ding, T., Wu, B., Yang, W. Q., Zhang, X. Y., Liu, Y., Shen, C. Y., and Jiang, Y. Analysis of tetracycline residues in royal jelly by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2008. J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci. 868, 1-2, 42-48.

398. Giannetti, L., Longo, F., Buiarelli, F., Russo, M. V., and Neri, B. Tetracycline residues in royal jelly and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry: validation study according to Commission Decision 2002/657/EC. 2010. Anal.Bioanal.Chem. 398, 2, 1017-1023.

399. Giroud, B., Vauchez, A., Vulliet, E., Wiest, L., and Bulete, A. Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2013. J.Chromatogr.A 1316, 53-61.

400. Lombardo-Agui, M., Garcia-Campana, A. M., Gamiz-Gracia, L., and Cruces-Blanco, C. Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure. 2012. Talanta 93, 193-199.

401. Martel A.C., Schweitzer P., Cailteau C., and Faucon J.P. Les antibiotiques et l'apiculture : Conséquences sur la qualité sanitaire des miels. 2009. Société des Experts Chimistes de France

402. [Journaux de presse] Hopquin B. Les apiculteurs accusent un insecticide de tuer les abeilles. Le Monde. 25-6-2002

403. [Journaux de presse] Valo M. En France, la production du miel est en chute libre. Le Monde. 13-2-2014

404. [Site Internet] http://www.planetoscope.com/agriculture-alimentation/922-production-de-miel-en-france.html (Consulté le 14/09/2014)

405. Guler, A., Kocaokutgen, H., Garipoglu, A. V., Onder, H., Ekinci, D., and Biyik, S. Detection of adulterated honey produced by honeybee (Apis mellifera L.) colonies fed with different levels of commercial industrial sugar (C(3) and C(4) plants) syrups by the carbon isotope ratio analysis. 2014. Food Chem. 155, 155-160.

406. Tosun, M. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with 13C/12C isotope ratio analysis method. 2013. Food Chem. 138, 2-3, 1629-1632.

407. Cometto, P. M., Faye, P. F., Di Paola Naranjo, R. D., Rubio, M. A., and Aldao, M. A. Comparison of free amino acids profile in honey from three Argentinian regions. 2003. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 17, 5079-5087.

408. Zhou, J., Yao, L., Li, Y., Chen, L., Wu, L., and Zhao, J. Floral classification of honey using liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry and chemometric analysis. 2014. Food Chem. 145, 941-949.

409. Debayle, D., Dessalces, G., and Grenier-Loustalot, M. F. Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. 2008. Anal.Bioanal.Chem. 391, 3, 1011-1020.

410. Amendola, G., Pelosi, P., and Dommarco, R. Solid-phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in honey. 2011. J.Environ.Sci.Health B 46, 1, 24-34.

411. Bohm, D. A., Stachel, C. S., and Gowik, P. Validation of a multi-residue method for the determination of several antibiotic groups in honey by LC-MS/MS. 2012. Anal.Bioanal.Chem. 403, 10, 2943-2953.

412. Pirard, C., Widart, J., Nguyen, B. K., Deleuze, C., Heudt, L., Haubruge, E., De, Pauw E., and Focant, J. F. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2007. J.Chromatogr.A 1152, 1-2, 116-123.

413. Staub, Sporri A., Jan, P., Cognard, E., Ortelli, D., and Edder, P. Comprehensive screening of veterinary drugs in honey by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. 2014. Food Addit.Contam Part A Chem.Anal.Control Expo.Risk Assess. 31, 5, 806-816.

414. Pizzutti, I. R., de, Kok A., Hiemstra, M., Wickert, C., and Prestes, O. D. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2009. J.Chromatogr.A 1216, 21, 4539-4552.

415. Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D., and Mallick, P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. 2008. Bioinformatics. 24, 21, 2534-2536.

416. Tautenhahn, R., Bottcher, C., and Neumann, S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. 2008. BMC.Bioinformatics. 9, 504-

417. Brown, M., Dunn, W. B., Dobson, P., Patel, Y., Winder, C. L., Francis-McIntyre, S., Begley, P., Carroll, K., Broadhurst, D., Tseng, A., Swainston, N., Spasic, I., Goodacre, R., and Kell, D. B. Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. 2009. Analyst 134, 7, 1322-1332.

418. [Site Internet] 12/11/2014)

419. Dubreil-Cheneau, E., Pirotais, Y., Verdon, E., and Hurtaud-Pessel, D. Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring plans: validation according to European Union Decision 2002/657/EC. 2014. J.Chromatogr.A 1339, 128-136.

420. [Rapport] Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. 2009

421. [Rapport] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Chlorfenvinphos No 97. 2008

422. Higes, Mariano, Martin-Hernandez, Raquel, Martinez-Salvador, Amparo, Garrido-Bailon, Encarna, Gonzalez-Porto, Amelia Virginia, Meana, Aranzazu, Bernal, José Luis, Del Nozal, Maria Jesus, and Bernal, José. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. 2010. Environmental Microbiology Reports 2, 2, 243-250.

423. Nobeli, I., Ponstingl, H., Krissinel, E. B., and Thornton, J. M. A structure-based anatomy of the E.coli metabolome. 2003. J.Mol.Biol. 334, 4, 697-719.

424. Gupta, S. and ires-de-Sousa, J. Comparing the chemical spaces of metabolites and available chemicals: models of metabolite-likeness. 2007. Mol.Divers. 11, 1, 23-36.

425. Dobson, P. D., Patel, Y., and Kell, D. B. 'Metabolite-likeness' as a criterion in the design and selection of pharmaceutical drug libraries. 2009. Drug Discov.Today 14, 1-2, 31-40.

426. Peironcely, J. E., Reijmers, T., Coulier, L., Bender, A., and Hankemeier, T. Understanding and classifying metabolite space and metabolite-likeness. 2011. PLoS.One. 6, 12, e28966-

427. Kind, T. and Fiehn, O. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. 2007. BMC.Bioinformatics. 8, 105-

428. Wolf, S., Schmidt, S., Muller-Hannemann, M., and Neumann, S. In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. 2010. BMC.Bioinformatics. 11, 148-

429. Gattuso G., Barreca D., Garguilli C., Leuzzi U., and Caristi C. Flavonoid composition of *Citrus* Juices. 2007. Molecules 12, 1641-1673.

430. Gerlich, M. and Neumann, S. MetFusion: integration of compound identification strategies. 2013. J.Mass Spectrom. 48, 3, 291-298.

431. Schymanski, E. L., Meringer, M., and Brack, W. Automated strategies to identify compounds on the basis of GC/EI-MS and calculated properties. 2011. Analytical Chemistry 83, 3, 903-912.

432. [Journaux de presse] Des traces de pesticides et de médicaments retrouvées dans des bouteilles d'eau. Le Monde. 2014

433. [Site Internet] http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/liste_capt_grenelle_260509.pdf (Consulté le 06/10/2014)

434. Humbert D. La protection des aires d'alimentation de captages contre les pollutions diffuses. 2009. Géologues 163, 41-46.

435. Cotton J., Sabarly V., Ducruix C., Nauleau F., Masclet S., Piel S., and Junot C. Utilisation de l'approche métabolomique pour l'évaluation de la composition en micropolluants des eaux souterraines destinées à la production d'eau potable. 2014. Techniques, Sciences, Méthodes

436. Petrovic, M., Skrbic, B., Zivancev, J., Ferrando-Climent, L., and Barcelo, D. Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia. 2014. Sci.Total Environ. 468-469, 415-428.

437. Lopez-Serna, R., Perez, S., Ginebreda, A., Petrovic, M., and Barcelo, D. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. 2010. Talanta 83, 2, 410-424.

438. Mezcua, M., Aguera, A., Lliberia, J. L., Cortes, M. A., Bago, B., and Fernandez-Alba, A. R. Application of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of priority pesticides in groundwater. 2006. J.Chromatogr.A 1109, 2, 222-227.

439. [Rapport] World Trade Organization (WTO). Rapport sur le commerce mondial 2013. 2014

440. [Rapport] 11ème édition du baromètre consommateur de l'Agence Bio. 2014

441. Moreno-Bondi, M. C., Marazuela, M. D., Herranz, S., and Rodriguez, E. An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. 2009. Anal.Bioanal.Chem. 395, 4, 921-946.

442. Gros, M., Petrovic, M., and Barcelo, D. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. 2006. Anal.Bioanal.Chem. 386, 4, 941-952.

443. Chamkasem, N., Ollis, L. W., Harmon, T., Lee, S., and Mercer, G. Analysis of 136 pesticides in avocado using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. 2013. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 10, 2315-2329.

444. Montesano, C., Johansen, S. S., and Nielsen, M. K. Validation of a method for the targeted analysis of 96 drugs in hair by UPLC-MS/MS. 2014. J.Pharm.Biomed.Anal. 88, 295-306.

445. Geis-Asteggiante, L., Lehotay, S. J., Lightfield, A. R., Dutko, T., Ng, C., and Bluhm, L. Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2012. J.Chromatogr.A 1258, 43-54.

446. Mol, H. G., Zomer, P., and de, Koning M. Qualitative aspects and validation of a screening method for pesticides in vegetables and fruits based on liquid chromatography coupled to full scan high resolution (Orbitrap) mass spectrometry. 2012. Anal.Bioanal.Chem. 403, 10, 2891-2908.

447. Peters, R. J., Bolck, Y. J., Rutgers, P., Stolker, A. A., and Nielen, M. W. Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. 2009. J.Chromatogr.A 1216, 46, 8206-8216.

448. Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., and Widmer, M. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2-microm particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. 2008. J.Chromatogr.A 1194, 1, 66-79.

449. Boix, C., Ibanez, M., Sancho, J. V., Leon, N., Yusa, V., and Hernandez, F. Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry: potential application to quantitative analysis. 2014. Food Chem. 160, 313-320.

450. Ortelli, D., Cognard, E., Jan, P., and Edder, P. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. 2009. J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci. 877, 23, 2363-2374.

451. Jia, W., Chu, X., Ling, Y., Huang, J., and Chang, J. High-throughput screening of pesticide and veterinary drug residues in baby food by liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry. 2014. J.Chromatogr.A 1347, 122-128.

452. Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., and Zuccato, E. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. 2005. J.Chromatogr.A 1092, 2, 206-215.

453. Shao, B., Chen, D., Zhang, J., Wu, Y., and Sun, C. Determination of 76 pharmaceutical drugs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in slaughterhouse wastewater. 2009. J.Chromatogr.A 1216, 47, 8312-8318.

454. Lopez-Serna, R., Petrovic, M., and Barcelo, D. Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)-tandem mass spectrometry (MS/MS). 2011. Chemosphere 85, 8, 1390-1399.

455. Grabic, R., Fick, J., Lindberg, R. H., Fedorova, G., and Tysklind, M. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. 2012. Talanta 100, 183-195.

456. Greulich, K. and Alder, L. Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS. 2008. Anal.Bioanal.Chem. 391, 1, 183-197.

457. Rodil, R., Quintana, J. B., Lopez-Mahia, P., Muniategui-Lorenzo, S., and Prada-Rodriguez, D. Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2009. J.Chromatogr.A 1216, 14, 2958-2969.

458. Lopez-Serna, R., Petrovic, M., and Barcelo, D. Direct analysis of pharmaceuticals, their metabolites and transformation products in environmental waters using on-line TurboFlow chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2012. J.Chromatogr.A 1252, 115-129.

459. Hernandez, F., Ibanez, M., Portoles, T., Cervera, M. I., Sancho, J. V., and Lopez, F. J. Advancing towards universal screening for organic pollutants in waters. 2014. J.Hazard.Mater.

460. [Rapport] ANSES. Etude de l'alimentation totale française 2 Tome 1 et 2. 2011

461. [Rapport] ANSES. Evaluation des risques liés aux résidus de pesticides dans l'eau de distribution. 2013

462. [Rapport] ANSM. Hiérarchisation des résidus de médicaments d'intérêt pour l'analyse des ressources et des eaux traitées. 2008

463. [Rapport] ANSM. Synthèse des résultats de campagnes d'analyses de résidus de médicaments dans les eaux effectuées par les DRASS dans trois bassins pilotes. 2009

464. [Rapport] EFSA. 2007 Annual Report on Pesticide Residues. 2009

465. [Rapport] Diago O. and Lestremau F. Analyse de substances prioritaires dans les eaux. 2011

466. Oberacher, H. Applying Tandem Mass Spectral Libraries for Solving the Critical Assessment of Small Molecule Identification (CASMI) LC/MS Challenge 2012. 2013. Metabolites. 3, 2, 312-324.

467. Huntscha, S., Singer, H. P., McArdell, C. S., Frank, C. E., and Hollender, J. Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2012. J.Chromatogr.A 1268, 74-83.

468. Togola, A., Baran, N., and Coureau, C. Advantages of online SPE coupled with UPLC/MS/MS for determining the fate of pesticides and pharmaceutical compounds. 2014. Anal.Bioanal.Chem. 406, 4, 1181-1191.

469. [Rapport] SANCO/12571/2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2013

470. Diaz, R., Ibanez, M., Sancho, J. V., and Hernandez, F. Qualitative validation of a liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry screening method for organic pollutants in waters. 2013. J.Chromatogr.A 1276, 47-57.

471. Garrido, Frenich A., Gonzalez-Rodriguez, M. J., Arrebola, F. J., and Martinez Vidal, J. L. Potentiality of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in vanguard and rearguard methods of pesticide residues in vegetables. 2005. Analytical Chemistry 77, 14, 4640-4648.

472. Portoles, T., Pitarch, E., Lopez, F. J., and Hernandez, F. Development and validation of a rapid and wide-scope qualitative screening method for detection and identification of organic pollutants in natural

water and wastewater by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. 2011. J.Chromatogr.A 1218, 2, 303-315.

473. Lommen, A., van der, Weg G., van Engelen, M. C., Bor, G., Hoogenboom, L. A., and Nielen, M. W. An untargeted metabolomics approach to contaminant analysis: pinpointing potential unknown compounds. 2007. Anal.Chim.Acta 584, 1, 43-49.

474. Muller, A., Schulz, W., Ruck, W. K., and Weber, W. H. A new approach to data evaluation in the non-target screening of organic trace substances in water analysis. 2011. Chemosphere 85, 8, 1211-1219.

475. Tengstrand, E., Rosen, J., Hellenas, K. E., and Aberg, K. M. A concept study on non-targeted screening for chemical contaminants in food using liquid chromatography-mass spectrometry in combination with a metabolomics approach. 2013. Anal.Bioanal.Chem. 405, 4, 1237-1243.

476. Boundy-Mills, K. L., de Souza, M. L., Mandelbaum, R. T., Wackett, L. P., and Sadowsky, M. J. The atzB gene of Pseudomonas sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. 1997. Appl.Environ.Microbiol. 63, 3, 916-923.

477. Ralebits, T. K., Senior, E., and van Verseveld, H. W. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. 2002. Biodegradation. 13, 1, 11-19.

478. Dempster, A. J. LII. The ionization and dissociation of hydrogen molecules and the formation of H 3. 1916. Philosophical Magazine Series 6 31, 185, 438-443.

479. Nier, Alfred O. and Hanson, Elmo E. A Mass-Spectrographic Analysis of the Ions Produced in HCl Under Electron Impact. 1936. Physical Review 50, 8, 722-726.

480. Bouchoux G. and Sablier M. Techniques d'analyse, Spectrométrie de masse - Principe et appareillage. ISBN :

481. [Site Internet] http://webbook.nist.gov/chemistry/ (Consulté le 04/08/2014)

482. [Site Internet] http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectrom%C3%A9trie_de_masse#mediaviewer/Fichier:Ionisation_electronique.png (Consulté le 04/08/2014)

483. [Site Internet] http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectrom%C3%A9trie_de_masse#mediaviewer/Fichier:Ionisation_chimique.png (Consulté le 04/08/2014)

484. Campargue, R. Progress in overexpanded supersonic jets and skimmed molecular beams in free-jet zones of silence. 1984. The Journal of Physical Chemistry 88, 20, 4466-4474.

485. [Site Internet] http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html (Consulté le 04/08/2014)

486. Robb, Damon B., Covey, Thomas R., and Bruins, Andries P. Atmospheric Pressure Photoionization:â€‰ An Ionization Method for Liquid Chromatographyâ€“Mass Spectrometry. 2000. Analytical Chemistry 72, 15, 3653-3659.

487. Ghislain, T., Faure, P., and Michels, R. Detection and monitoring of PAH and oxy-PAHs by high resolution mass spectrometry: comparison of ESI, APCI and APPI source detection. 2012. J.Am.Soc.Mass Spectrom. 23, 3, 530-536.

488. Luosujarvi, L., Karikko, M. M., Haapala, M., Saarela, V., Huhtala, S., Franssila, S., Kostiainen, R., Kotiaho, T., and Kauppila, T. J. Gas chromatography/mass spectrometry of polychlorinated biphenyls using atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization microchips. 2008. Rapid Communications in Mass Spectrometry 22, 4, 425-431.

489. [Site Internet] http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Instruments-Systems/Mass-Spectrometry/Atmospheric-Pressure-Photoionization-Source-%28APPI%29/Pages/gp2294.aspx (Consulté le 04/08/2014)

490. Zimmerman, L. J., Valentine, H. L., and Valentine, W. M. Characterization of S-(N,N-Dialkylaminocarbonyl)cysteine Adducts and Enzyme Inhibition Produced by Thiocarbamate Herbicides in the Rat. 2004. Chem.Res.Toxicol. 17, 2, 258-267.

491. [Site Internet] http://andromas.com/le-dispositif-d-identification/les-protocoles/ (Consulté le 25/11/2014)

492. [Site Internet] http://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9sorption-ionisation_laser_assist%C3%A9e_par_matrice#mediaviewer/Fichier:Maldi.svg (Consulté le 04/08/2014)

493. [Site Internet] http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php (Consulté le 04/08/2014)

494. Dole M., Mack L.L., Hines R.L., Mobley R.C., Ferguson L.D., and Alice M.B. Molecular Beams of Macroions. 1968. J.Chem.Phys. 49, 2240,

495. Iribarne J.V. and Thomson B.A. On the evaporation of small ions from charged droplets. 1976. Journal of Chemical Physics 64, 6, 2287-2294.

496. [Site Internet] http://www.medgadget.com/2006/10/desi_delivers_i.html (Consulté le 04/08/2014)

497. Paul W. and Steinwedel H.S. A new mass spectrometer without magnetic field. 1953. Naturforsch 8a, 448-450.

498. Mathieu E. Mémoire sur le mouvement vibratoire d'une membrane de forme elliptique. 1868. Journal de Mathématiques pures et appliquées 137-203.

499. [Site Internet] http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Analyseur-quadripolaire-MS.png (Consulté le 25/11/2014)

500. [Site Internet] http://www.epa.gov/esd/chemistry/ice/asms04/asms04.htm (Consulté le 25/11/2014)

501. [Site Internet] http://www.doping.chuv.ch/lad_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations-laboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ms.htm (Consulté le 25/11/2014)

502. Douglas, D. J., Frank, A. J., and Mao, D. Linear ion traps in mass spectrometry. 2005. Mass Spectrometry Reviews 24, 1, 1-29.

503. Bantscheff, M., Boesche, M., Eberhard, D., Matthieson, T., Sweetman, G., and Kuster, B. Robust and sensitive iTRAQ quantification on an LTQ Orbitrap mass spectrometer. 2008. Mol.Cell Proteomics. 7, 9, 1702-1713.

504. Schwartz, J. C., Senko, M. W., and Syka, J. E. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. 2002. J.Am.Soc.Mass Spectrom. 13, 6, 659-669.

505. [Site Internet] http://www.google.st/patents/US6797950 (Consulté le 25/11/2014)

506. Proceedings of the American Physical Society. 1946. Physical Review 69, 11-12, 674-674.

507. Vestal, M. L., Juhasz, P., and Martin, S. A. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. 1995. Rapid Communications in Mass Spectrometry 9, 11, 1044-1050.

508. Mamyrin B.A., Karataev V.I., Shmikk D.V., and Zagulin V.A. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-filght mass spectrometer with high resolution. 1973. Zh.Eksp.Teor.Fiz. 64, 82-89.

509. [Site Internet] http://tomographyblog.com/2007/10/05/time-of-flight-takes-off-in-petct/ (Consulté le 06/08/2014)

510. Marshall, A. G., Hendrickson, C. L., and Jackson, G. S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. 1998. Mass Spectrometry Reviews 17, 1, 1-35.

511. [Site Internet] http://jlab.chem.yale.edu/research/techniques/fourier-transform-icr) (Consulté le 06/08/2014)

512. Hughey, C. A., Rodgers, R. P., and Marshall, A. G. Resolution of 11,000 compositionally distinct components in a single electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrum of crude oil. 2002. Analytical Chemistry 74, 16, 4145-4149.

513. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. 2000. Analytical Chemistry 72, 6, 1156-1162.

514. Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., and Graham, Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. 2005. J.Mass Spectrom. 40, 4, 430-443.

515. [Site Internet] http://planetorbitrap.com/ (Consulté le 06/08/2014)

516. Padilla-Sanchez, J. A., Plaza-Bolanos, P., Romero-Gonzalez, R., Grande-Martinez, A., Thurman, E. M., and Garrido-Frenich, A. Innovative determination of polar organophosphonate pesticides based on high-resolution Orbitrap mass spectrometry. 2012. J.Mass Spectrom. 47, 11, 1458-1465.

517. Choi, J. H., Lamshoft, M., Zuhlke, S., Park, K. H., Shim, J. H., and Spiteller, M. Determination of sedatives and adrenergic blockers in blood meal using accelerated solvent extraction and Orbitrap mass spectrometry. 2012. J.Chromatogr.A 1260, 111-119.

518. Frese, Christian K., Altelaar, A. F. M., Hennrich, Marco L., Nolting, Dirk, Zeller, Martin, Griep-Raming, Jens, Heck, Albert J. R., and Mohammed, Shabaz. Improved Peptide Identification by Targeted Fragmentation Using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. 2011. Journal of Proteome Research 10, 5, 2377-2388.

519. Levsen, Karsten and Holmes, John L. Karsten Levsen. Progress in mass spectrometry, volume 4â€"fundamental aspects of organic mass spectrometry. Verlag Chemie, Weinheim/New York, 1978. pp. 312 $47.60. 1979. Organic Mass Spectrometry 14, 7, 404-404.

520. Domon, Bruno and Aebersold, Ruedi. Mass Spectrometry and Protein Analysis. 2006. Science 312, 5771, 212-217.

521. [Site Internet] http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A3.html (Consulté le 25/11/2014)

522. [Site Internet] http://www.masterchimie1.u-psud.fr/Chromatoweb/CPG.html (Consulté le 25/11/2014)

523. van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J., and Klinkenberg, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. 1956. Chemical Engineering Science 5, 6, 271-289.

524. [Site Internet] http://www.puerh.fr/article/science_sante_vers_une_empreinte_des_thes_puerh.htm (Consulté le 25/11/2014)

525. Duca, R. C., Salquebre, G., Hardy, E., and Appenzeller, B. M. Comparison of solid phase- and liquid/liquid-extraction for the purification of hair extract prior to multi-class pesticides analysis. 2014. J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci. 955-956, 98-107.

526. [Site Internet] http://www.lsabm.espci.fr/spip.php?rubrique32 (Consulté le 14/09/2014)

527. Maldaner, L. and Jardim, I. C. Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2012. Talanta 100, 38-44.

528. Shan, X. M., Shen, D. H., Wang, B. S., Lu, B. B., and Huang, F. Y. Simultaneous determination of bisphenols and alkylphenols in water by solid phase extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2014. Biomed.Environ.Sci. 27, 6, 471-474.

529. Schenck, F. J., Wagner, R., Hennessy, M. K., and Okrasinski, J. L., Jr. Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in eggs using a solid-phase extraction cleanup and gas chromatographic detection. 1994. J.AOAC Int. 77, 4, 1036-1040.

530. Fenoll, J., Hellin, P., Sabater, P., Flores, P., and Navarro, S. Trace analysis of sulfonylurea herbicides in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2012. Talanta 101, 273-282.

531. Perez-Ortega, P., Gilbert-Lopez, B., Garcia-Reyes, J. F., Ramos-Martos, N., and Molina-Diaz, A. Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography-mass spectrometry. 2012. J.Chromatogr.A 1249, 32-40.

532. Gracia-Lor, E., Martinez, M., Sancho, J. V., Penuela, G., and Hernandez, F. Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. 2012. Talanta 99, 1011-1023.

533. Racamonde, I., Rodil, R., Quintana, J. B., Villaverde-de-Saa, E., and Cela, R. Determination of benzodiazepines, related pharmaceuticals and metabolites in water by solid-phase extraction and liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. 2014. J.Chromatogr.A 1352, 69-79.

534. Bjork, M. K., Simonsen, K. W., Andersen, D. W., Dalsgaard, P. W., Sigurethardottir, S. R., Linnet, K., and Rasmussen, B. S. Quantification of 31 illicit and medicinal drugs and metabolites in whole blood by fully automated solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2013. Anal.Bioanal.Chem. 405, 8, 2607-2617.

535. [Site Internet] http://www.waters.com/waters/en_US/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209& (Consulté le 14/09/2014)

536. Fontanals, N., Miralles, N., Abdullah, N., Davies, A., Gilart, N., and Cormack, P. A. Evaluation of strong cation-exchange polymers for the determination of drugs by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2014. J.Chromatogr.A 1343, 55-62.

537. Gilart, N., Marce, R. M., Borrull, F., and Fontanals, N. Determination of pharmaceuticals in wastewaters using solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2012. J.Sep.Sci. 35, 7, 875-882.

538. Fontanals, N., Borrull, F., and Marce, R. M. On-line weak cationic mixed-mode solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry to determine illicit drugs at low concentration levels from environmental waters. 2013. J.Chromatogr.A 1286, 16-21.

539. Lee, H. B., Peart, T. E., and Svoboda, M. L. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography--tandem mass spectrometry. 2007. J.Chromatogr.A 1139, 1, 45-52.

540. Knox, John H., Kaur, Bulvinder, and Millward, G. R. Structure and performance of porous graphitic carbon in liquid chromatography. 1986. Journal of Chromatography A 352, 0, 3-25.

541. Ross, P. and Knox, J. H. Carbon-based packing materials for liquid chromatography: applications. 1997. Adv.Chromatogr. 37, 121-162.

542. Asperger, A., Efer, J., Koal, T., and Engewald, W. Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation. 2002. J.Chromatogr.A 960, 1-2, 109-119.

543. Crescenzi, C., Albinana, J., Carlsson, H., Holmgren, E., and Batlle, R. On-line strategies for determining trace levels of nitroaromatic explosives and related compounds in water. 2007. Journal of Chromatography A 1153, 1â€“2, 186-193.

544. Hurtado-Sanchez, M. C., Romero-Gonzalez, R., Rodriguez-Caceres, M. I., Duran-Meras, I., and Frenich, A. G. Rapid and sensitive on-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis of pesticides in surface waters. 2013. J.Chromatogr.A 1305, 193-202.

545. Kuster, M., Lopez de Alda, M. J., Barata, C., Raldua, D., and Barcelo, D. Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2008. Talanta 75, 2, 390-401.

546. Palma, P., Kuster, M., Alvarenga, P., Palma, V. L., Fernandes, R. M., Soares, A. M., Lopez de Alda, M. J., Barcelo, D., and Barbosa, I. R. Risk assessment of representative and priority pesticides, in surface water of the Alqueva reservoir (South of Portugal) using on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2009. Environ.Int. 35, 3, 545-551.

547. [Site Internet] http://www.schambeck-sfd.com/en/hplc-gpc-products/gc-autosampler.php (Consulté le 14/09/2014)

548. Martinez, C., Ramirez, N., Gomez, V., Pocurull, E., and Borrull, F. Simultaneous determination of 76 micropollutants in water samples by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. 2013. Talanta 116, 937-945.

549. Scheyer, A., Morville, S., Mirabel, P., and Millet, M. Analysis of trace levels of pesticides in rainwater using SPME and GC-tandem mass spectrometry. 2006. Anal.Bioanal.Chem. 384, 2, 475-487.

550. Durovic, R. D., Dordevic, T. M., Santric, L. R., Gasic, S. M., and Ignjatovic, L. M. Headspace solid phase microextraction method for determination of triazine and organophosphorus pesticides in soil. 2010. J.Environ.Sci.Health B 45, 7, 626-632.

551. de Lima Gomes, P. C., Barletta, J. Y., Nazario, C. E., Santos-Neto, A. J., Von Wolff, M. A., Coneglian, C. M., Umbuzeiro, G. A., and Lancas, F. M. Optimization of in situ derivatization SPME by experimental design for GC-MS multi-residue analysis of pharmaceutical drugs in wastewater. 2011. J.Sep.Sci. 34, 4, 436-445.

552. Benanou, D., Acobas, F., de Roubin, M. R., David, F., and Sandra, P. Analysis of off-flavors in the aquatic environment by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC/MS/olfactometry. 2003. Anal.Bioanal.Chem. 376, 1, 69-77.

553. Benanou, D., Acobas, F., and de Roubin, M. R. Optimization of stir bar sorptive extraction applied to the determination of odorous compounds in drinking water. 2004. Water Sci.Technol. 49, 9, 161-170.

554. Prestes, O. D., Padilla-Sanchez, J. A., Romero-Gonzalez, R., Lopez, Grio S., Garrido, Frenich A., and Martinez-Vidal, J. L. Comparison of several extraction procedures for the determination of biopesticides in soil samples by ultrahigh pressure LC-MS/MS. 2012. J.Sep.Sci. 35, 7, 861-868.

555. Chitescu, C. L., Oosterink, E., de, Jong J., and Stolker, A. A. Ultrasonic or accelerated solvent extraction followed by U-HPLC-high mass accuracy MS for screening of pharmaceuticals and fungicides in soil and plant samples. 2012. Talanta 88, 653-662.

556. Helaleh, M. I., Tanaka, K., Fujii, S., and Korenaga, T. GC/MS determination of phenolic compounds in soil samples using Soxhlet extraction and derivatization techniques. 2001. Anal.Sci. 17, 10, 1225-1227.

557. Bajerova, P., Eisner, A., Jezova, V., Adam, M., and Ventura, K. Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the isolation of nitro compounds from soils. 2008. J.Sep.Sci. 31, 8, 1408-1414.

558. Shen, G. and Lee, H. K. Determination of triazines in soil by microwave-assisted extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. 2003. J.Chromatogr.A 985, 1-2, 167-174.

559. Perez, R. A., Albero, B., Miguel, E., and Sanchez-Brunete, C. Determination of parabens and endocrine-disrupting alkylphenols in soil by gas chromatography-mass spectrometry following matrix solid-phase dispersion or in-column microwave-assisted extraction: a comparative study. 2012. Anal.Bioanal.Chem. 402, 7, 2347-2357.

560. Azzouz, A. and Ballesteros, E. Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge. 2012. Sci.Total Environ. 419, 208-215.

561. Ding, Y., Zhang, W., Gu, C., Xagoraraki, I., and Li, H. Determination of pharmaceuticals in biosolids using accelerated solvent extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. 2011. J.Chromatogr.A 1218, 1, 10-16.

562. Chen, J., Loo, B., and Ray, C. Determination of trifloxystrobin and its metabolites in Hawaii soils by ASE-LC-MS/MS. 2008. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 6, 1829-1837.

563. Rouviere, F., Bulete, A., Cren-Olive, C., and Arnaudguilhem, C. Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction. 2012. Talanta 93, 336-344.

564. Ishibashi, M., Ando, T., Sakai, M., Matsubara, A., Uchikata, T., Fukusaki, E., and Bamba, T. High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. 2012. J.Chromatogr.A 1266, 143-148.

565. Valverde, A., Aguilera, A., Rodriguez, M., and Brotons, M. Evaluation of a multiresidue method for pesticides in cereals using supercritical fluid extraction and gas chromatographic detection. 2009. J.Environ.Sci.Health B 44, 3, 204-213.

566. Ono, Y., Yamagami, T., Nishina, T., and Tobino, T. Pesticide multiresidue analysis of 303 compounds using supercritical fluid extraction. 2006. Anal.Sci. 22, 11, 1473-1476.

567. Kreuzig, R., Koinecke1 A, and Bahadir, M. Use of supercritical fluid extraction in the analysis of pesticides in soil. 2000. J.Biochem.Biophys.Methods 43, 1-3, 403-409.

568. Lehotay, S. J. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. 1997. J.Chromatogr.A 785, 1-2, 289-312.

569. Motohashi, N., Nagashima, H., and Parkanyi, C. Supercritical fluid extraction for the analysis of pesticide residues in miscellaneous samples. 2000. J.Biochem.Biophys.Methods 43, 1-3, 313-328.

570. [Rapport] Broudin S. Traitement du signal en métabolomique. 2012

# *PUBLICATIONS*

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Article

pubs.acs.org/JAFC

# High-Resolution Mass Spectrometry Associated with Data Mining Tools for the Detection of Pollutants and Chemical Characterization of Honey Samples

Jérôme Cotton,[†,§] Fanny Leroux,[§] Simon Broudin,[§] Mylène Marie,[§] Bruno Corman,[§] Jean-Claude Tabet,[†,#] Céline Ducruix,[§] and Christophe Junot*[,†]

[†]CEA, iBiTec-S, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, MetaboHUB Paris, 91191 Gif-sur-Yvette, France

[§]Profilomic, 31 rue d'Aguesseau, 92100 Boulogne Billancourt, France

[#]Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique, IPCM/CNRS UMR 7201, Université Pierre et Marie Curie, MetaboHUB Paris, 75252 Paris, France

Supporting Information

**ABSTRACT:** Analytical methods for food control are mainly focused on restricted lists of well-known contaminants. This paper shows that liquid chromatography−high-resolution mass spectrometry (LC/ESI-HRMS) associated with the data mining tools developed for metabolomics can address this issue by enabling (i) targeted analyses of pollutants, (ii) detection of untargeted and unknown xenobiotics, and (iii) detection of metabolites useful for the characterization of food matrices. A proof-of-concept study was performed on 76 honey samples. Targeted analysis indicated that 35 of 83 targeted molecules were detected in the 76 honey samples at concentrations below regulatory limits. Furthermore, untargeted metabolomic-like analyses highlighted 12 chlorinated xenobiotics, 1 of which was detected in lavender honey samples and identified as 2,6-dichlorobenzamide, a metabolite of dichlobenil, a pesticide banned in France since 2010. Lastly, multivariate statistical analyses discriminated honey samples according to their floral origin, and six discriminating metabolites were characterized thanks to the MS/MS experiments.

**KEYWORDS:** *high-resolution mass spectrometry, honey, metabolomics, data mining, metabolite, xenobiotics, pollutants, liquid chromatography, multiresidue, food analysis, electrospray, veterinary drugs, pesticides, bees*

## INTRODUCTION

The international globalization of the food market significantly increases the risk of contamination and fraud as illustrated by the several food scandals over the past 20 years, such as dioxin chicken in 1999 and milk adulterated with melamine in 2008. These crises have a huge impact on the economy and on the credibility of the agrifood business and may also have dramatic consequences for the health of consumers. Furthermore, pesticides and drugs are commonly used in agriculture and farming to increase production yields and treat infection or insect pests.[1] Their extensive use has become a major environmental concern and a public health problem[2] that has prompted health authorities to strengthen controls.

Pesticides and drugs are traditionally detected using multiplexed methods involving gas or liquid chromatography coupled to triple-quadrupole (QqQ) mass spectrometers operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode.[3−9] These methods are considered as a reference in terms of sensitivity and specificity.[10,11] New simple and fast sample preparations (i.e., "QuEChERS" for quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) have extended the analytical possibilities to a wide variety of compounds with different physical−chemical properties.[12−15] However, as more pesticides become available, the number of pollutants to be monitored increases significantly,[1] and MRM-based methods, which focus on a limited number of targeted compounds, are not adapted to the detection of untargeted and also unknown chemical contaminants.[16]

The implementation of high-resolution mass spectrometry (HRMS)-based methods, including time-of-flight (TOF), Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR), and Orbitrap-based instruments, which operate in the full scan mode and provide accurate mass measurements,[1,17−21] have improved screening capabilities by enabling not only targeted but also retrospective analyses for the detection of non-preselected molecules through their elemental composition. Thus, LC-HRMS approaches have been developed as an alternative to those relying on triple-quadrupole instruments for the screening and also quantification of xenobiotics in environment and food matrices and also mammal biofluids.[1,18,22−25]

Furthermore, the access to resolved isotopic patterns provides useful information to confirm metabolite identification,[17,21,22,26] and HRMS instruments may be used as tandem to perform MS/MS experiments by collisional activation (CID) of selected precursor ions. This ion excitation proceeds either through "in axis" mode (CID in Qq/TOF and Qh/ICR and

Received: September 15, 2014
Revised: October 25, 2014
Accepted: October 30, 2014
Published: October 30, 2014

ACS Publications © 2014 American Chemical Society



dx.doi.org/10.1021/jf504400c | J. Agric. Food Chem. 2014, 62, 11335−11345

**Table 1. Xenobiotics of the Targeted Analysis**

| ID | name of molecule | formula | classification |
|---|---|---|---|
| 1 | 5-hydroxythiabendazole | $C_{10}H_7N_3OS$ | antibiotic |
| 2 | acetamiprid | $C_{10}H_{11}ClN_4$ | pesticide |
| 3 | albendazole | $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ | antibiotic |
| 4 | aldicarb | $C_7H_{14}N_2O_2S$ | pesticide |
| 5 | amitraz | $C_{19}H_{23}N_3$ | pesticide |
| 6 | atrazine | $C_8H_{14}ClN_5$ | pesticide |
| 7 | azoxystrobin | $C_{22}H_{17}N_3O_5$ | pesticide |
| 8 | boscalid | $C_{18}H_{12}Cl_2N_2O$ | pesticide |
| 9 | carbaryl | $C_{12}H_{11}NO_2$ | pesticide |
| 10 | carbendazim | $C_9H_9N_3O_2$ | pesticide |
| 11 | carbofuran | $C_{12}H_{15}NO_3$ | pesticide |
| 12 | carfentrazone-ethyl | $C_{15}H_{14}Cl_2F_3N_3O_3$ | pesticide |
| 13 | chlorfenvinphos | $C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$ | pesticide |
| 14 | clothianidin | $C_6H_8ClN_5O_2S$ | pesticide |
| 15 | coumaphos | $C_{14}H_{16}ClO_5PS$ | pesticide |
| 16 | cyproconazol | $C_{15}H_{18}ClN_3O$ | pesticide |
| 17 | cyprodinil | $C_{14}H_{15}N_3$ | pesticide |
| 18 | diazinon | $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ | pesticide |
| 19 | dichlorvos | $C_4H_7Cl_2O_4P$ | pesticide |
| 20 | difenoconazol | $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$ | pesticide |
| 21 | diflubenzuron | $C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$ | pesticide |
| 22 | dimethoate | $C_5H_{12}NO_3PS_2$ | pesticide |
| 23 | dimethomorph | $C_{21}H_{22}ClNO_4$ | pesticide |
| 24 | dimetridazole | $C_5H_7N_3O_2$ | antibiotic |
| 25 | diphenylamine | $C_{12}H_{11}N$ | pesticide |
| 26 | febantel | $C_{20}H_{22}N_4O_6S$ | antibiotic |
| 27 | fenbendazole | $C_{15}H_{13}N_3O_2S$ | antibiotic |
| 28 | fenoxycarb | $C_{17}H_{19}NO_4$ | pesticide |
| 29 | flubendazole | $C_{16}H_{12}FN_3O_3$ | antibiotic |
| 30 | flusilazole | $C_{16}H_{15}F_2N_3Si$ | pesticide |
| 31 | fluvalinate | $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$ | pesticide |
| 32 | furazolidone | $C_8H_7N_3O_5$ | antibiotic |
| 33 | hexaconazol | $C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$ | pesticide |
| 34 | imidacloprid | $C_9H_{10}ClN_5O_2$ | pesticide |
| 35 | indoxacarb | $C_{22}H_{17}ClF_3N_3O_7$ | pesticide |
| 36 | iprodione | $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$ | pesticide |
| 37 | malathion | $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ | pesticide |
| 38 | mebendazole | $C_{16}H_{13}N_3O_3$ | antibiotic |
| 39 | metalaxyl | $C_{15}H_{21}NO_4$ | pesticide |
| 40 | methoxyfenozide | $C_{22}H_{28}N_2O_3$ | pesticide |
| 41 | metolachlor | $C_{15}H_{22}ClNO_2$ | pesticide |
| 42 | metronidazole | $C_6H_9N_3O_3$ | antibiotic |
| 43 | myclobutanil | $C_{15}H_{17}ClN_4$ | pesticide |
| 44 | nifuroxazide | $C_{12}H_9N_3O_5$ | antibiotic |
| 45 | oxfendazole | $C_{15}H_{13}N_3O_3S$ | antibiotic |
| 46 | oxibendazole | $C_{12}H_{15}N_3O_3$ | antibiotic |
| 47 | penconazol | $C_{13}H_{15}Cl_2N_3$ | pesticide |
| 48 | pendimethalin | $C_{13}H_{19}N_3O_4$ | pesticide |
| 49 | piperonyl-butoxide | $C_{19}H_{30}O_5$ | pesticide |
| 50 | pirimiphos-ethyl | $C_{13}H_{24}N_3O_3PS$ | pesticide |
| 51 | pirimiphos-methyl | $C_{11}H_{20}N_3O_3PS$ | pesticide |
| 52 | prochloraz | $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$ | pesticide |
| 53 | propiconazole | $C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$ | pesticide |
| 54 | pyraclostrobin | $C_{19}H_{18}ClN_3O_4$ | pesticide |
| 55 | pyrimethanil | $C_{12}H_{13}N_3$ | pesticide |
| 56 | pyriproxifen | $C_{20}H_{19}NO_3$ | pesticide |
| 57 | ronidazole | $C_6H_8N_4O_4$ | antibiotic |
| 58 | simazine | $C_7H_{12}ClN_5$ | pesticide |
| 59 | spinosad | $C_{41}H_{65}NO_{10}$ | pesticide |
| 60 | spirodiclofen | $C_{21}H_{24}Cl_2O_4$ | pesticide |
| 61 | sulfachloropyridazine | $C_{10}H_9ClN_4O_2S$ | antibiotic |
| 62 | sulfadiazine | $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ | antibiotic |
| 63 | sulfadimethoxine | $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ | antibiotic |
| 64 | sulfamerazine | $C_{11}H_{12}N_4O_2S$ | antibiotic |
| 65 | sulfamethazine | $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ | antibiotic |
| 66 | sulfamethizole | $C_9H_{10}N_4O_2S_2$ | antibiotic |
| 67 | sulfamethoxazole | $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ | antibiotic |
| 68 | sulfamethoxypyridazine | $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ | antibiotic |
| 69 | sulfamonomethoxine | $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ | antibiotic |
| 70 | sulfaphenazole | $C_{15}H_{14}N_4O_2S$ | antibiotic |
| 71 | sulfapyridine | $C_{11}H_{11}N_3O_2S$ | antibiotic |
| 72 | sulfaquinoxaline | $C_{14}H_{12}N_4O_2S$ | antibiotic |
| 73 | sulfathiazole | $C_9H_9N_3O_2S_2$ | antibiotic |
| 74 | sulfisoxazole | $C_{11}H1_3N_3O_3S$ | antibiotic |
| 75 | tebuconazole | $C_{16}H_{22}ClN_3O$ | pesticide |
| 76 | tebufenozide | $C_{22}H_{28}N_2O_2$ | pesticide |
| 77 | tebuthiuron | $C_9H_{16}N_4OS$ | pesticide |
| 78 | tetramethrin | $C_{19}H_{25}NO_4$ | pesticide |
| 79 | thiabendazole | $C_{10}H_7N_3S$ | pesticide |
| 80 | thiacloprid | $C_{10}H_9ClN_4S$ | pesticide |
| 81 | thiamethoxam | $C_8H_{10}ClN_5O_3S$ | pesticide |
| 82 | trifloxystrobin | $C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$ | pesticide |
| 83 | trimethoprim | $C_{14}H_{18}N_4O_3$ | antibiotic |

HCD in the LTQ/Orbitrap) or by resonance (radial excitation with LTQ and SORI-CID Qh/ICR). Although the recorded CID spectra are instrument-dependent, they are a very useful tool for confirming metabolite structure, especially when the product ions from CID are analyzed under high-resolution conditions yielding their respective elemental composition.[27]

Beside improvements brought in the fields of screening and multiplexed quantification of pollutants in various matrices, LC-HRMS methods have also been coupled to untargeted data processing approaches[28] or to effect directed analysis studies[29] to highlight untargeted chemical contaminants in wastewater effluents and river sediments. Furthermore, HRMS is nowadays the tool most used for metabolomics, which deals with the large-scale detection and quantification of metabolites in biological media. Metabolomics is an interdisciplinary approach,[30] which combines analytical chemistry, mathematics, statistics, and bioinformatics. In this context, the main objective of the present study is to demonstrate that LC-HRMS combined with a metabolomics data treatment workflow, which is mostly used for systems biology and biomarker discovery studies, is highly relevant to the field of food control by enabling the monitoring and identification of emerging pollutants and also by improving the chemical characterization of food matrices.

We chose to focus on the analysis of honey as a proof-of-concept study. Honey is a complex matrix obtained from bees during the harvest of nectar and pollen. Bees also play a major role in biodiversity as well as in the pollination[31,32] of plants, which is very important in agriculture. However, they are exposed to pesticides sprayed on fields and fruit trees. The European Union has established maximum residue levels (MRLs) for some pesticides in honey, the lowest of them being 10 $\mu$g/kg.[33] Three types of collateral damage may occur: (i) pollution of harvests and hence honey; (ii) poisoning of the

bees and decimation of their colonies; and (iii) chronic intoxication of consumers. The decline in the number of bee colonies in Europe in general and France in particular has considerably reduced honey production, whereas consumption has remained stable. As a consequence, most of the honey consumed in France is imported from around the world, and advanced methods are required to improve the chemical characterization of honey to highlight adulteration or contamination.

We report here the development, validation, and application of an LC-HRMS approach enabling the detection of 83 pollutants known to occur in honey samples and indicating whether or not their concentrations are above or below regulatory limits. We show that the same raw data can be processed using metabolomics like workflow, including automatic peak detection and alignment software, data mining, and multivariate statistical analysis tools to highlight untargeted and unknown chlorinated chemical contaminants and also to discriminate honey samples according to their floral origin.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and Reagents.** All standards (see Table 1, 28 antibiotics and 55 pesticides, >95% purity), magnesium sulfate salt ($MgSO_4$, >99%), sodium acetate ($CH_3COONa$, >97%), and glycine (>99% purity) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). HPLC grade acetonitrile (ACN), formic acid (HCOOH, content >99%), dichloromethane ($CH_2Cl_2$), methyl *tert*-butyl ether (MTBE), sterile Falcon tubes (50 mL), and propylene tubes (5 mL) were from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). HPLC grade methanol (MeOH) was from Carlo Erba reagents (Val de Reuil, France). HPLC grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). The standard mixtures used for the external calibration of the MS instrument (Calmix-positive, for the positive ion mode, consisting of caffeine, L-methionylarginyl-phenylalanyl-alanine acetate, and Ultramark 1621; and Calmix-negative, for the negative ion mode, consisting of the same mixture plus sodium dodecyl sulfate and sodium taurocholate) were from Thermo Fisher Scientific (Les Ulis, France).

**Preparation of Stock Solutions.** Stock solution (1 mg/mL when possible) of each standard was prepared by dissolving 1 mg of each substance in 1 mL of an appropriate solvent consisting of $H_2O$, ACN, MeOH, $H_2O$/ACN, or $H_2O$/MeOH (50:50, v/v. containing or not 0.1% formic acid). A working mixed standard solution (1 $\mu$g/mL) was prepared by diluting each standard stock solution by a factor of 1000 with water. To minimize degradation of standards, stock and working standard solutions were stored at −20 °C immediately after preparation.

**Honey Samples.** A panel of 76 honeys was purchased by Institut National de la Consommation (INC, which is the French national institute for consumer protection) from different stores in the Paris region (France). These honeys were produced from around the world and from different types of flowers (multifloral, lavender, acacia, mountain, orange tree, and eucalyptus). They were of various prices and quality, ranging from discount, private label, handmade, to luxury, and of different kinds of label (i.e., none, organic farming, red label, and protected environmental indication (IGP)).

**Sample Preparation.** Honey samples were processed by liquid−liquid extraction with acetonitrile solvent, by adapting the protocol developed by Pizzuti et al.[34] to extract pesticides from soybeans to honey samples. Each honey sample (5 g) was weighed into a 50 mL polypropylene Falcon tube with a screw cap, and 4 mL of water was added to homogenize the samples of various consistencies (liquid, solid, or creamy). Each sample was then prepared in six replicates. Three of six replicates were spiked with an appropriate volume of working solution (1 $\mu$g/mL) to obtain a concentration of 10 ng/g for each targeted pollutant. Samples were then extracted with 10 mL of ACN with 2 g of magnesium sulfate and 2.5 g of sodium acetate added. The 50 mL Falcon tubes were rotated end-over-end for 1 h. After centrifugation at 3500 rpm for 5 min, an aliquot of 4 mL of the upper layer extract (acetonitrile) was transferred into a 5 mL propylene tube. The eluents were evaporated to dryness under nitrogen. Samples were then reconstituted to 200 $\mu$L of $H_2O$/ACN (95:5, v/v) before injection into the LC-HRMS system.

**Liquid Chromatography and Mass Spectrometry.** Analyses were performed using a Nexera LC-30AD liquid chromatographic system (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France) coupled to an Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) fitted with an electrospray source operated in the positive ionization mode. The software interface was Xcalibur (version 2.1) (Thermo Fisher Scientific). To ensure the accuracy of the mass measurements, the instrument was calibrated every week in both polarities with a homemade modified Calmix solution (Thermo Fisher Scientific) with the addition of 100 $\mu$L of glycine solution (10 $\mu$g/mL) to 150 $\mu$L of Calmix. For singly charged ions, the mass resolution power of the analyzer was set to 25 000 ($m/\Delta m$, full width at half-maximum at $m/z$ 200) and the mass accuracy over the range of $m/z$ 70−1000 was below 5 ppm. The AGC target and the maximum injection time were set to $10^6$ and 50 ms, respectively. The high-performance liquid chromatographic (HPLC) separation was performed on an Xterra C18 (5 $\mu$m, 150 mm × 2.1 mm) column (Waters, Guyancourt, France) with a Javelin column filter 0.5 $\mu$m (Thermo Fisher Scientific). The mobile phases were composed of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid. The elution consisted of an isocratic step of 2 min at 5% phase B, followed by a linear gradient from 5 to 100% of phase B from 2 to 22 min. These proportions were kept constant for 4 min before returning to 5% B from 26.1 to 30 min. The flow rate of the mobile phase was 0.3 mL/min, and the injection volume was 10 $\mu$L. The column and the automatic sample injector were kept at 30 and 4 °C, respectively. For the ESI source, the capillary voltage was set to 4800 V. For droplet evaporation, the sheath and auxiliary gas ($N_2$) flows were fixed at 28 and 9 arbitrary units, respectively. The capillary temperature was set to 280 °C. For MS/MS experiments, a Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) was used with the same source parameters and chromatography conditions as previously described. Two scan events were used: (i) an MS scan with a mass resolution power, AGC target, and maximum injection time set to 70 000 ($m/\Delta m$, full width at half-maximum at 200 u), $10^6$, and 50 ms, respectively; and (ii) an MS/MS scan (in HCD mode without LMCO limit) at normalized collision energies of 20 and 40%, with a mass resolution power, AGC target, maximum injection time, isolation width set to 17500 ($m/\Delta m$, full width at half-maximum at 200 u), $10^6$, 250 ms, and 0.4 $m/z$, respectively.

**Experimental Design.** Samples were randomized and analyzed in three batches of 152 samples (76 spiked and nonspiked samples). Within each batch, nonspiked samples were injected first. A blank and a pool of the 83 compounds of interest (in buffer at 100 ng/mL) were injected every 5 and 10 biological samples, respectively.

**Data Processing.** *Targeted Data Processing.* All raw data were processed with two application managers of Xcalibur 2.1 software: Qualbrowser (for peak detection) and Quanbrowser (for peak integration). The identification of the xenobiotics of interest from raw data was based on four criteria: (1) retention time of the expected molecule compared with the retention time of standard compound in a time window of ±0.15 min; (2) accurate mass measurement of the analyte (mass tolerance ±5 ppm); (3) reliability of the isotopic pattern compared with that of the reference compound; and (4) increase of the chromatographic peaks area in honey spiked with xenobiotics.

*Data Processing for the Nontargeted Approach.* Peak detection, alignment, and integration were performed with the XCMS software package. Raw files were first converted to mzXML format with MSconvert (ProteoWizard[35]). Data were processed using XCMS version 1.30.3 running under R version 3.0.0. The R software was installed on a Lenovo ThinkStation C20X 24 core Intel Xeon E5645 2.4 GHz with 24 Go RAM running Linux (Centos release 6.4 Final x86_64). The CentWave algorithm was used.[36] The list of the parameters used is available as Supporting Information (Table 3s). The resulting peak table was then processed as described below. First,

features were quantile normalized.[37] Features were then kept if they were detected with the same trend (i.e., present or absent) in the three replicates of 90% of honeys, with a coefficient of variation below 30% and with a sample to blank concentration ratio above a factor of 10. Finally, features were annotated by matching their mass accurate measured mass at ±10 ppm with theoretical ones contained in the KEGG,[38] HMDB,[39] and Metlin[40] databases by using an informatics tool developed in R language.

*Identification of Chlorinated Xenobiotics in Honey Samples.* A script was written in R language to highlight the chlorinated molecules thanks to the specific isotopic patterns provided by chlorine atoms. This script uses the peak table generated by XCMS. It groups two variables with the same retention time (±5 s) and differing by 1.9970 ± 0.0010 $m/z$, which corresponds to the accurate $m/z$ difference between the two natural chlorine isotope masses (i.e., $^{35}Cl$ and $^{37}Cl$).

*Statistical Analyses. (a) Multivariate Statistical Analyses.* The data resulting from the XCMS process were mean-centered and logarithm-scaled and then analyzed using SIMCA-P11 software (Umetrics, Umea, Sweden) for multivariate analyses using principal component analysis (PCA) and projection to latent structure discriminant analysis (PLS-DA). This software returns a variable importance in projection (VIP) score, which reflects the contribution of the variables to the model. A variable is considered as important for the model when its VIP is above 1. The PLS-DA models were validated using the cross-validation function of SIMCA-P11 and by permutation tests ($k$ = 100).

*(b) Univariate Statistical Analyses.* For each VIP feature, the normality assumption was checked (Shapiro–Wilk test, $\alpha$ = 5%). Then, the Wilcoxon test was used with $\alpha$ = 5% to determine the significance ($p$ value) between the two groups.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Screening of Emerging Pollutants in Honey Samples Using a Targeted Approach.** *Method Development and Validation.* An HRMS-based metabolomic approach was first developed and implemented with honey samples as a proof-of-concept study. A list of 83 pollutants (55 pesticides and 28 antibiotics) of interest was drawn up (Table 1). A liquid–liquid extraction method and a UHPLC-HRMS method were developed and validated to (i) detect these 83 pollutants, (ii) indicate whether their concentrations in honeys are above or below regulatory limits, and (iii) detect a wide range of chemicals present in honeys.

Method development and validation are detailed in the Supporting Information. Briefly, a spectral database including chromatographic retention times and MS information (i.e., protonated, adduct, isotope, and in-source fragment ions for each molecule of interest) was built to select the ions to be extracted from raw data. Table 1s displays retention times and ions used for detection and quantification. Metabolite extraction from honey samples was achieved using acetonitrile supplemented with magnesium sulfate and sodium acetate (please refer to Materials and Methods for additional information), and an LC-HRMS method was optimized to achieve chromatographic separation of the 83 xenobiotics of interest within 30 min. This method was validated by studies of linearity, matrix effect, and intra-assay precision and by determination of the limit of detection (LOD), which corresponds in our case to the lowest concentration for which the coefficient of variation of the areas of triplicates was <15%. Intra-assay precision was satisfactory with RSD below 15%. Linearity was evaluated in the range from 0.01 to 1000 μg/kg and the determination coefficient ($r^2$) was >0.99 for all compounds. LOD values ranged from 0.1 to 10 μg/kg.

Finally, the sensitivity achieved with our method is comparable to[12] or even better[1,34] than that achieved with triple-quadrupole instruments operated in the MRM mode. In addition, all LOD values determined are below the regulatory values imposed by the European Union, when available (Table 2s).

*Targeted Analysis of Honey Samples.* Seventy-six honey samples from different countries and of different floral origins were selected. The results of the targeted analysis indicate that 74 of 76 honeys are contaminated with at least one molecule of the 83 selected xenobiotics. Figure 1a displays the number of molecules detected in each honey. A bimodal distribution seems to emerge with maximum points corresponding to two and seven molecules per honey. Classifications of the number of molecules per honey were made by country, floral origin, and organic farming, but did not show significant correlation (data not shown). Two honeys, in which no pollutants were found, came from organic farming in Australia and Mexico.

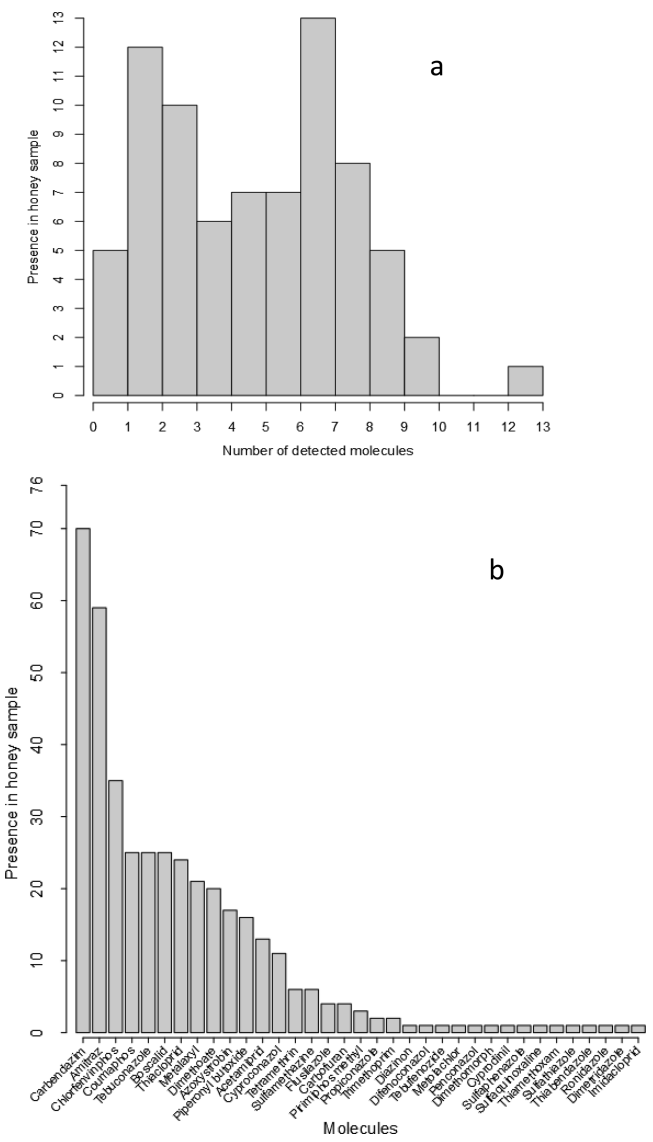



**Figure 1.** Targeted analysis of xenobiotics in honey samples: (a) histogram representing the number of molecules found in honey; (b) representation of the number of honey samples in which each molecule was found.

Figure 1b displays the number of xenobiotics detected and their presence in honey samples. It indicates that 35 of 83

**Table 2. Xenobiotics Detected in Honey Samples**

| ID | *m/z* | RT (min) | interpretation | occurrence in honey samples (floral origin) | ID status[a] |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 189.9817 | 7.9 | 2,6-dichlorobenzamide ($C_7H_5ONCl_2$) | 6 (lavender) | identified (a, b, c) |
| 2 | 236.1407 | 12.5 | $C_{11}H_{22}NO_2Cl$ | 70 (miscellaneous) | a, e |
| 3 | 243.0971 | 2.9 | $C_5H_{15}N_6O_3Cl$ | 15 (miscellaneous) | a, e |
| 4 | 253.0308 | 11.2 | thiacloprid ($C_{10}H_9N_4SCl$) | 20 (miscellaneous) | identified (a, b, c) |
| 5 | 256.0598 | 9.6 | imidacloprid ($C_9H_{10}N_5O_2Cl$) | 1 (orange tree) | identified (a, b, c) |
| 6 | 277.1069 | 13.7 | $C_{10}H_{17}N_4O_3Cl$ | 1 (multifloral) | a, e |
| 7 | 277.2158 | 12.5 | $C_{13}H_{29}\ N_4Cl$ | 13 (miscellaneous) | a, e |
| 8 | 284.0834 | 6.0 | $C_{11}H_{19}NO_3Cl_2$ | 38 (miscellaneous) | a, e |
| 9 | 292.1204 | 15.3 | cyproconazole ($C_{15}H_{18}N_3OCl$) | 9 (miscellaneous) | identified (a, b, c) |
| 10 | 308.1520 | 16.3 | tebuconazole ($C_{16}H_{22}N_3OCl$) | 30 (miscellaneous) | identified (a, b, c) |
| 11 | 325.1255 | 9.4 | $C_{17}H_{22}N_2\ Cl_2$ | 39 (miscellaneous) | a, e |
| 12 | 341.0610 | 12.7 | $C_{11}H_{18}N_4O_2S\ Cl_2$ | 56 (miscellaneous) | a, e |
| 13 | 347.1973 | 16.5 | $C_{18}H_{31}O_4Cl$ | 48 (miscellaneous) | a, e |
| 14 | 357.1520 | 8.5 | $C_{12}H_{25}N_4O_6Cl$ | 38 (miscellaneous) | a, e |
| 15 | 369.1526 | 9.7 | U50488[b] ($C_{19}H_{26}N_2OCl_2$) | 15 (miscellaneous) | a, e |
| 16 | 387.1622 | 9.9 | $C_{17}H_{27}N_4O_2SCl$ | 47 (miscellaneous) | a, e |

[a]a, elemental composition; b, retention times matching with that of a standard; c, MS/MS matching with that of a standard; d, MS/MS matching with a structural hypothesis; e, MS/MS experiment available. [b]Structural hypothesis obtained from the Scifinder database (elemental composition).

targeted molecules were detected. The three most frequently recovered compounds were carbendazim, amitraz, and chlorfenvinphos (i.e., 70, 59, and 35 times in 76). Carbendazim is a fungicide belonging to the carbamate family, which is commonly used in cereal and fruit crops. It has been banned in the European Union (EU) since 2009.[41] Amitraz is an acaricide belonging to the family of formamidines. It is commonly used by beekeepers to protect their hives against the parasite *Varroa destructor*.[42] Finally, chlorfenvinphos is an insecticide and an acaricide belonging to the family of organophosphates. It was mainly used against fly larvae in farmed chicken or beef.[43] Because of its toxicity, it was banned in the EU in 2007. Some beekeepers may still use it to combat *Varroa* because it is more effective than amitraz.[44] However, our results, which provide an order of magnitude of concentration, indicate that no xenobiotics were found at concentrations above the regulatory threshold levels of the EU.

**Data Mining from LC-HRMS Fingerprints.** Unlike data acquired on a triple-quadrupole mass spectrometer operated in the MRM mode, HRMS-based data can be subjected to subsequent data mining procedures to highlight unanticipated information, as already performed with metabolomics in systems biology or for biomarker discovery. Proof-of-concept studies detailed below emphasize the relevance of such an approach for the detection of unexpected xenobiotics and for an improved chemical characterization of honeys.

To this end, raw data were processed using XCMS software, a collection of algorithms written in R language for the detection and alignment of peaks. XCMS output is a data matrix that can thus be processed by data mining algorithms and can also be subjected to multivariate statistical analyses.

*Detection of Unexpected Xenobiotics.* How to discriminate between signals related to metabolites (i.e., all organic substances naturally occurring from the metabolism of the living organism studied) or xenobiotics and contained in LC-HRMS fingerprints is a key question. It was addressed at the beginning of the 2000s by chemoinformatic analysis that describes metabolites present in the *Escherichia coli* bacteria listed in the EcoCyc and KEGG databases in terms of fragment-based fingerprints and descriptors based on physicochemical properties.[45] Other studies, such as those of Gupta et al.,[46] Dobson et al.,[47] and Peironcely et al.,[48] were subsequently published. Peironcely et al., for example, found some discrimination trends between metabolites and nonmetabolites on a PCA score plot on the basis that metabolites tend to have a higher water solubility, lower molecular mass, fewer C, N, and S atoms, and a lower number of cycles and rotatable bonds than nonmetabolites.[48]

However, from the analysis of these studies, it is difficult to establish rules to discriminate between signals related to either metabolites or xenobiotics in LC-HRMS data sets. The fact that xenobiotics can be metabolized by living organisms or degraded by the environment, and also the difficulty of automatically generating relevant elemental compositions from accurate measured mass despite the availability of chemical and empirical rules,[49] further complicates this task. Thus, we decided to focus on chlorine-containing compounds for this proof-of-concept study.

As chlorine atoms mainly occur in biological media as sodium chloride, chlorine-containing organic compounds are assumed to be, or at least to come from, xenobiotics produced by human industrial activity. Note that 35% of our 83 targeted xenobiotics contain at least one chlorine atom. In addition, chlorinated compounds can be easily and selectively detected in biological media using HRMS-based instruments thanks to their particular natural isotopic signature consisting of two stable isotopes, $^{35}Cl$ and $^{37}Cl$, the latter having a relative abundance of 33% of the first one and these two isotope masses being separated by 1.9970 u. We therefore developed an algorithm written in R language that highlights features differing by 1.9970 ± 0.0010 u (for singly charged ions) and occurring at the same retention time (±5 s) from peak tables produced by an automatic peak detection and alignment software.

First, 76 XCMS peak tables (see Supporting Information for the XCMS parameters, Table 3s) were produced on triplicates of each honey sample to improve the accuracy of RT and measured masses when compared with a single peak table containing 228 samples. These peak tables were then annotated with public databases (see Materials and Methods) and processed by our algorithm. Features highlighted by this algorithm in all 76 peak tables were then merged, leading to a

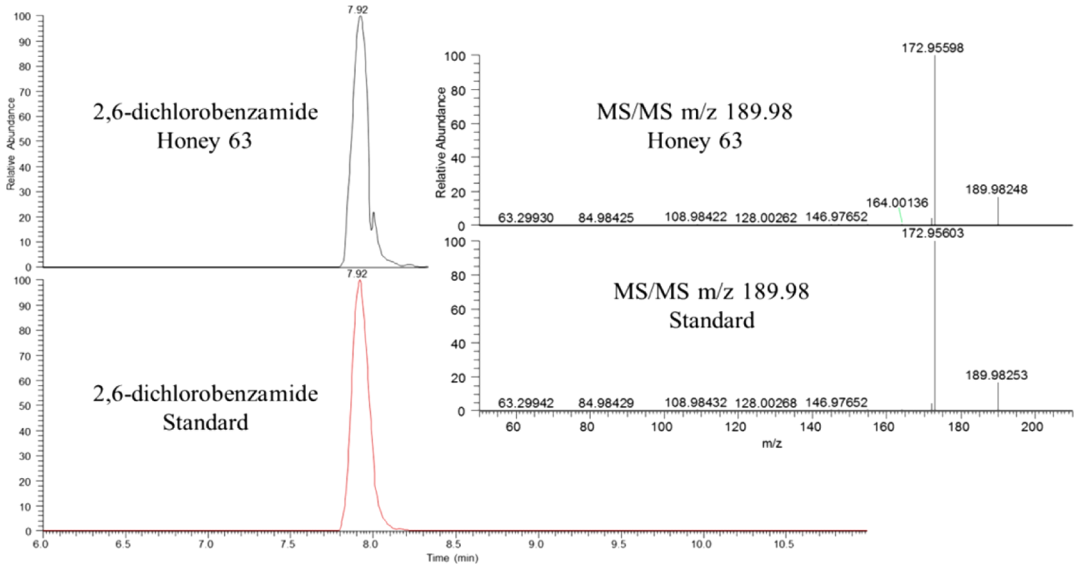



**Figure 2.** Identification of 2,6-dichlorobenzamide in honey ($[M + H]^+$ = 189.9821, $m/z$ ± 8 ppm).

peak table containing 25000 features. First, it is of note that 97% of the chlorinated molecules previously monitored in the course of the targeted approach were present in this peak table. Then, due to the high number of features, manual inspection was limited to the 1300 most represented features, which were sorted by increasing $m/z$ values. Features corresponding to a unique molecule were then merged in 143 clusters corresponding to couples of potential $^{35}$Cl- and $^{37}$Cl-containing ions and which were manually inspected. Only 28 of them were confirmed to correspond to chlorinated ions, among which 13 chlorinated compounds were detected in honeys (i.e., the others features were artifacts generated by the automatic peak detection process). The inspection of a fraction of the peak table shows that too many false positives are selected using only the criteria retention time and $m/z$ difference.

Additional criteria were then applied: (i) the relative abundance the $^{37}$Cl ion had to be between 20 and 120% of the $^{35}$Cl, which ensures the detection of ions bearing one to four chlorine atoms; (ii) the retention time had to be above 90 s (to avoid false positives due to the huge number of molecules present in the void volume); (iii) the area of the chromatographic peak related to the monoisotopic ion should be above $10^6$ AU; and (iv) sample (i.e., mean of the three replicates per honey) to blank concentration ratio should be above a factor of 3. By these means, only 4 chlorinated molecules of 35 previously detected in the targeted analysis (i.e., thiacloprid, imidacloprid, cyproconazole, tebuconazole) were detected, but the number of clusters generated was much smaller, thus allowing manual inspection. Moreover, this led to the detection of 18 new chlorinated compounds that are present in at least one honey sample, in addition to the 4 chlorinated compounds that were part of our list.

An XCMS peak table including the 228 samples (i.e., 76 honeys analyzed in triplicate) was generated without any specific criteria (see the Supporting Information for the XCMS parameters, Table 4s) to confirm the presence of these new chlorinated compounds. This led to the confirmation of 12 chlorinated molecules of the 18 initial ones, and 10 of them were present in at least 10 kinds of honey samples (Table 2).

MS/MS information, elemental composition, and isotope pattern regarding the number of Cl atoms were obtained successfully for these 12 compounds. However, only two structures were proposed on the basis of the MS/MS interpretation. The CID spectrum of compound **15** matched with U50488, a compound present in the Scifinder database (Table 2), whereas compound **1** was identified as 2,6-dichlorobenzamide by matching its retention time, accurate measured mass, isotopic pattern, and CID spectrum to those of the purchased compound (Figure 2), and it was found in 6 of 11 French lavender honeys (Table 2). Interestingly, this molecule is the metabolite of dichlobenil, a herbicide that was not part on our list of xenobiotics and which was widely used in lavender and lavendin plantations until it was banned in France in 2010.

*Honey Typing.* Besides the detection of chemical contaminants and/or their metabolites, we would also like to show that LC-HRMS and associated data mining could be relevant to improving the chemical characterization of honey samples. Here we focus on the discovery of biomarkers of floral origin that could help to detect fraud and provide a preliminary experiment. To this end, we used the XCMS peak table previously produced on the 76 kinds of honey samples (see Table 4s for XCMS parameters). This peak table contained 121,000 features and 300 samples (i.e., 76 honeys analyzed in triplicate and 72 analytical blanks). It was filtered out (see Materials and Methods for more detail), and 42500 analytically relevant signals were kept for multivariate statistical analyses.

The PCA score plot displayed in Figure 3a shows a clear discrimination between single-flower (acacia, lavender and orange) and multifloral (multiple flowers and mountain) honeys, except for eucalyptus honey samples for which the sampling was too small (four honey samples only). It also indicates that acacia honey samples are well separated of orange and lavender honey samples. We then focused on the discrimination between single and multifloral honey samples and used PLS-DA, the score plot of which is shown in Figure 3b, to confirm these results. This PLS-DA model was validated using the cross-validation function of the SIMCA P11 software and by permutation tests ($k$ = 500), which dramatically reduced the performances of the model, thus confirming its validity (Figure 3c).

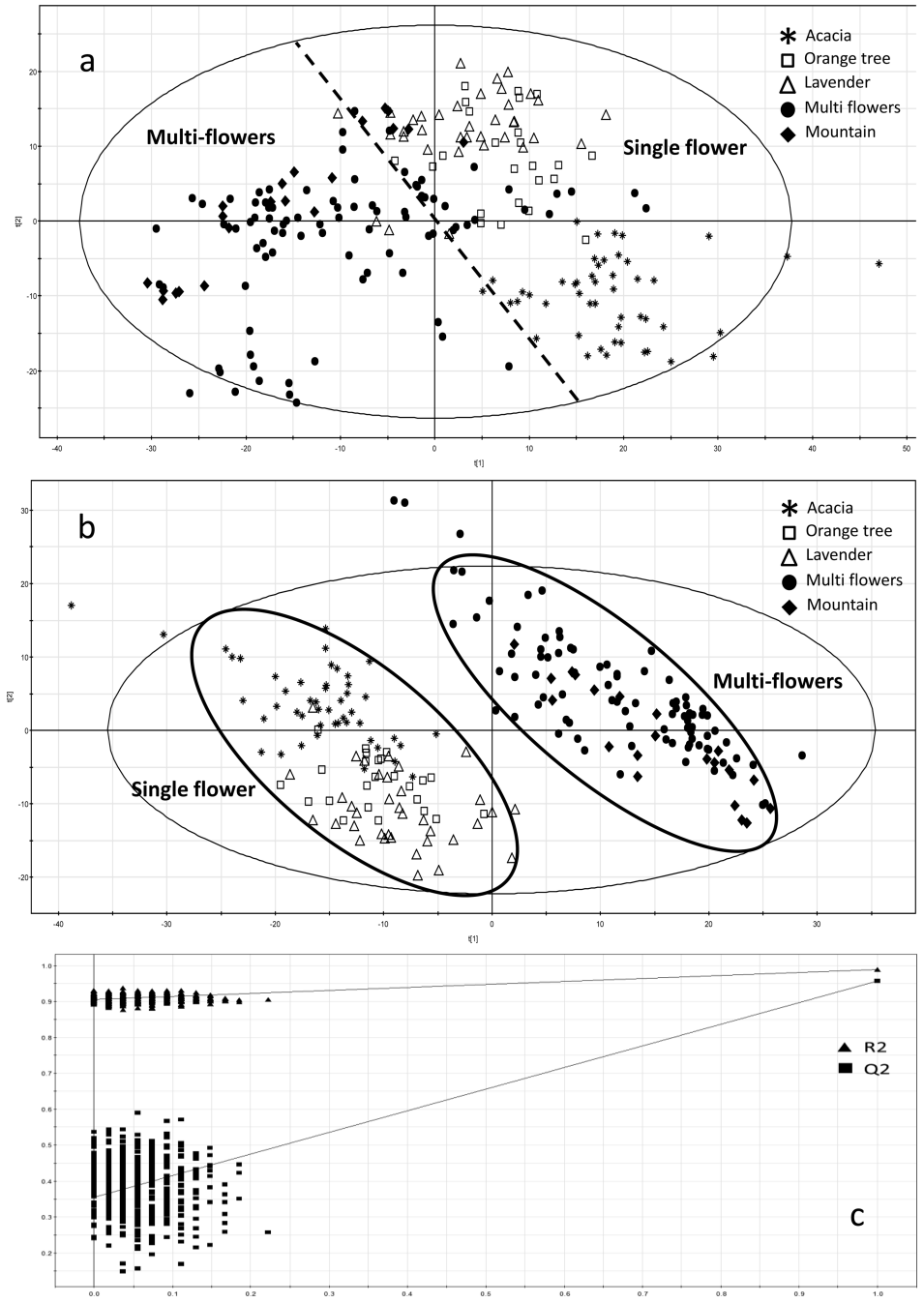



**Figure 3.** Multivariate statistical analyses of the data set of 76 honey samples. Multifloral (●), mountain (◆), acacia (*), orange tree (□), and lavender (△) honey samples. (a) PCA score plot of honey samples (excluding eucalyptus). Data were log-transformed and centered before multivariate statistical analysis. (b) PLSDA score plot of honey samples. (c) Validation model of PLSDA by permutation tests ($k$ = 500) on the first component. R2(Y) corresponds to the proportion of the variance of the response variable that is explained by the model, and Q2 (cum) expresses the cumulative proportion of the variance of the variables that can be predicted by the model. Permutation of data from multifloral samples related to data from single-flower samples dramatically decreased the performance of the model, thus confirming its validity.

Variables exhibiting a VIP score (please refer to the Materials and Methods for more details) above a value of 2 were then annotated using public databases such as KEGG,[38] HMDB,[39] and METLIN.[40] Six of the most significant annotated variables (VIP > 2) were selected. Their significance was confirmed by the Wilcoxon test with $\alpha$ = 5% (after verification of the normality assumption with the Shapiro−Wilk test; see Materials and Methods for more details), and their box and whisker plots are displayed in Figure 4.

Five of these six variables were putatively identified and exhibited MS spectra compatible with the proposed structure; a flavone-like structure was proposed for the last one (Table 3). CID spectra (in HCD mode) are available as Supporting Information. Figure 5 displays CID spectra of $m/z$ 438 (i.e., X84952) and a proposed fragmentation scheme suggesting that the precursor ion could be lunarine, an alkaloid occurring in plants of the *Lunaria* genus, native to central and southern Europe. A complete fragmentation scheme of lunarine is provided as Supporting Information (Figure 6s).


dx.doi.org/10.1021/jf504400c | *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 11335−11345

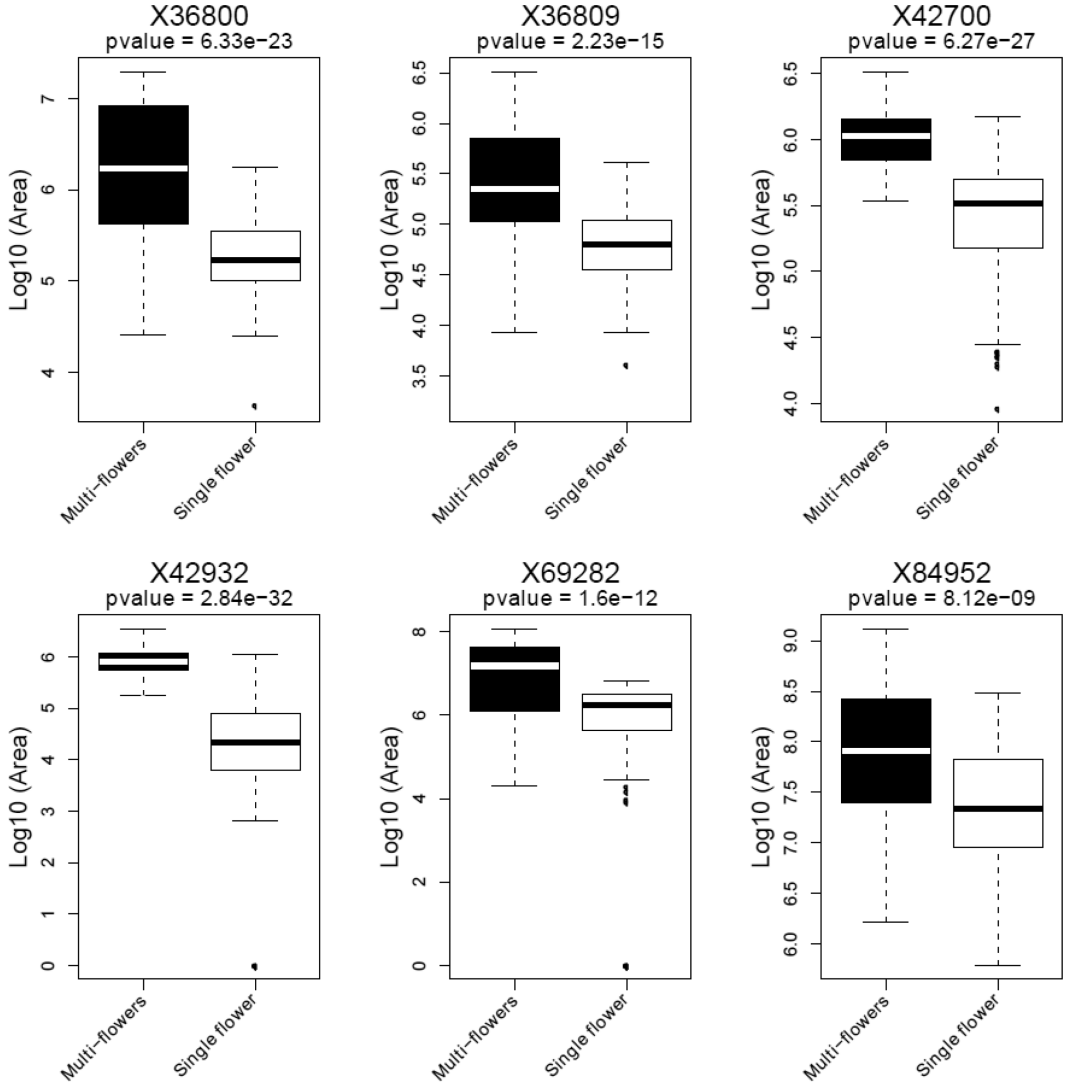



**Figure 4.** Box-plot of the six features of the most significance from PLS-DA. The thick line corresponds to the median. The box corresponds to the first and third quartiles. The whiskers represent 1.5 times the interquartile range. The outliers are marked by dots. Names of molecules putatively identified: X36800, methyl 2-(2-ethoxyacetamido)-4-methylpentanoate; X36809, methyl 2-(2-ethoxyacetamido)-2-methylpentanoate; X42700, *N*-D-glucosylarylamine; X42932, piscidic acid; X69282, flavone with ramification C18H16O8; X84952, lunarine.

**Table 3. Significant Features for the Discrimination between Single-Flower and Multifloral Honey Samples**

| feature | *m/z* | RT (min) | interpretation | ID status[a] |
|---|---|---|---|---|
| X36800 | 232.15433 | 5.5 | methyl 2-(2-ethoxyacetamido)-2-methylpentanoate or methyl 2-(2-ethoxyacetamido)-4-methylpentanoate | a, d |
| X36809 | 232.15433 | 5.7 | methyl 2-(2-ethoxyacetamido)-2-methylpentanoate or methyl 2-(2-ethoxyacetamido)-4-methylpentanoate | a, d |
| X42700 | 256.11795 | 1.6 | *N*-D-glucosylarylamine | a, d |
| X42932 | 257.0654 | 3.8 | piscidic acid | a, d |
| X69282 | 361.09179 | 11 | flavone with ramification $C_{18}H_{16}O_8$ | a, d |
| X84952 | 438.23873 | 7.9 | lunarine | a, d |

[a]a, *m/z* matching structure; b, retention times matching with that of a standard; c, CID spectrum matching with that of a standard; d, CID spectrum experiment available.

These molecules enable discrimination between multifloral and single-flower honeys and could be used for fraud detection (i.e., selling of multifloral honeys instead of single-flower honeys) after confirmation studies. Indeed, these are preliminary results based on information indicated on labels. Additional data mining procedures should be developed to improve these results, and confirmatory studies have to be undertaken, based on confirmation of floral origins of honey by melissopalinological, sensory, or chemical analyses.

In conclusion, this study demonstrates that LC-HRMS and LC-HRMS/MS associated with "metabolomics like" data mining tools are versatile tools allowing both target and global analyses for a better characterization of food matrices by enabling (i) conventional multiplexed and targeted analyses of xenobiotics, (ii) the detection of untargeted and unknown chemical contaminants, and (iii) the detection of metabolites useful for the characterization of food matrices. This was achieved by performing a proof-of-concept study on honey samples. Our results for a panel of 76 honeys showed that at least 1 of the 83 targeted pollutants was detected in 74 of the 76 honeys and that an average of 5 xenobiotics were found per

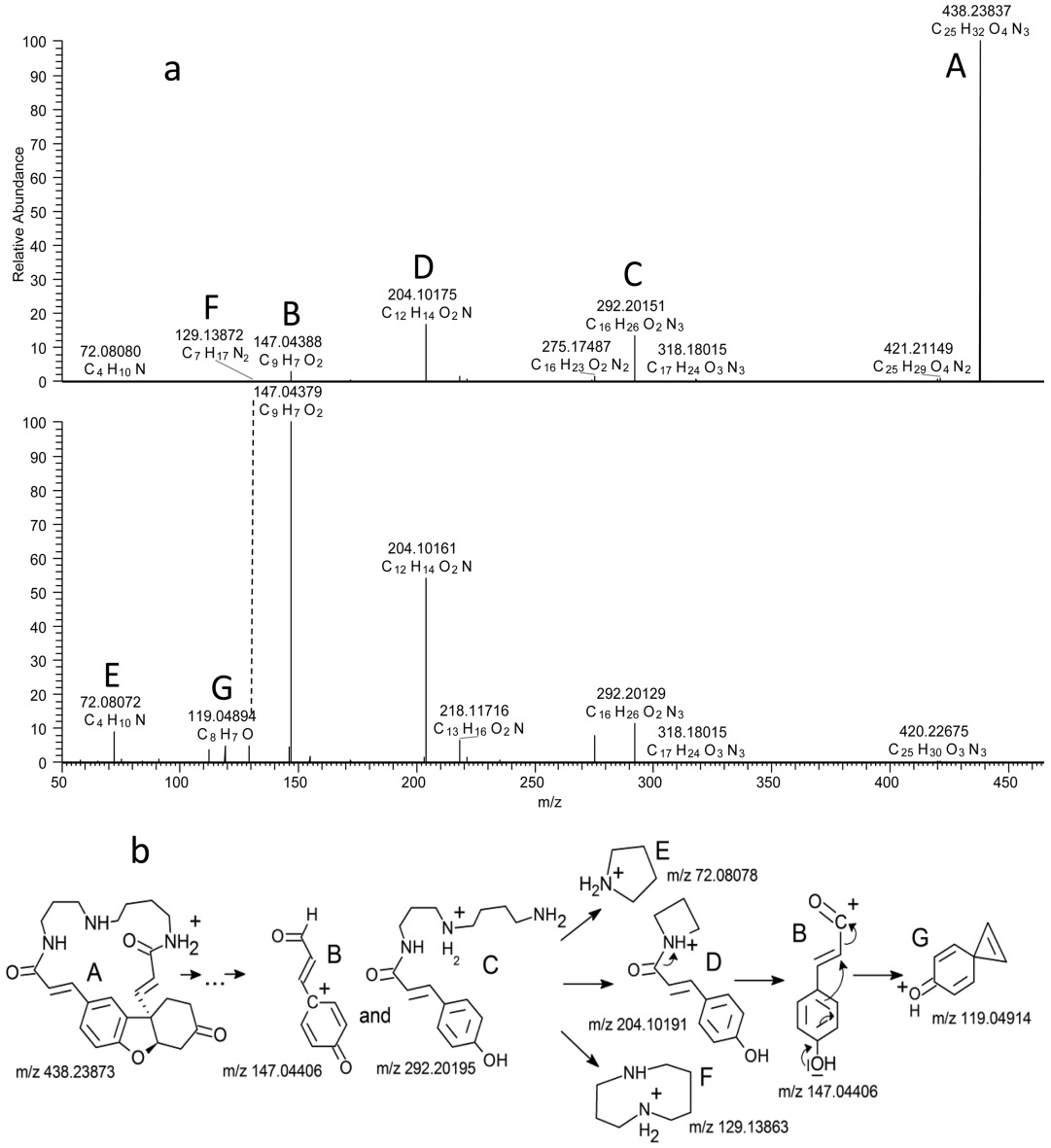



**Figure 5.** Characterization of lunarine from a honey sample: (a) CID spectrum of protonated variable X84952 annotated as lunarine recorded in HCD mode under (a) 20% and (b) 40% normalized collision energies; (b) summary of the proposed formal mechanism of fragmentations for lunarine (a complete scheme is available as Supporting Information, Figure 6s).

honey, with concentrations below the regulatory limits. Multivariate statistical analyses performed on analytically relevant features discriminated honey samples according to their floral origin. The data mining procedure also highlighted the presence of 12 unknown chlorinated chemicals in honey samples. One of these compounds was present in 4 lavender honeys and was formally identified as 2,6-dichlorobenzamide (a metabolite of dichlobenil, a herbicide that was widely used in lavender plantations before 2010).

Such an approach could be applied to any other food matrix to build (i) spectral databases of metabolites and pollutants to improve data set annotation and compound identification and (ii) metabolite fingerprint databases related to any given food matrix that could be coupled with data mining tools to highlight the presence of unexpected compounds. However, this requires the development of standardization and normalization tools to handle batch-to-batch variations of signal intensities and chromatographic retention times and also the analysis of a large number of samples to build a robust model. Furthermore, and as emphasized by our results, the characterization of untargeted and unknown chemicals by using MS and CID information remains highly challenging, but informatics tools such as in silico fragmenters and software for fragment ion prediction[50−53] that could be combined with other physical−chemical properties such as retention time index or octanol−water partitioning coefficients[54] could be of value to address this issue.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Building of the spectral database, the choice of chromatographic conditions, metabolite extraction, validation of the developed method, and detailed scheme for lunarine fragmentation; table with information about the molecules present in the spectral database (name, formula, detected ions, extracted masses, retention time and log $K_{o/w}$), table with

information about the validation parameters (i.e., recovery (%), RSD (%), LOD ($\mu$g/kg)) and EU MLR ($\mu$g/kg), two tables that list the two sets of XCMS parameters used for the detection of features in honey samples, and $MS^2$ spectra of the six features that discriminate between floral origins. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

## AUTHOR INFORMATION


### Corresponding Author

*(C.J.) Phone: +33 1 69 08 43 66. Fax: +33 1 69 08 59 07. E-mail: christophe.junot@cea.fr.



### Funding

This work was funded by the French National Institutes of Consumers (INC) and by Bpi France as part of the Agrifood GPS collaborative project. J.C. is supported by a grant from Association Nationale de Recherche et de Technologie.


### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. François Fenaille for helpful discussion.

## ABBREVIATIONS USED

EU MRL, European maximal residue level; HCD, higher collision-induced dissociation; LC-HRMS, liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry; LOD, limit of detection; MRM, multiple reaction monitoring; PCA, principal component analysis; PLS-DA, projection on latent structures-discriminant analysis; QqQ, triple quadrupole; QuEChERS, quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe; RSD, relative standard deviation; VIP, variable importance in projections

## REFERENCES


(1) Gomez-Perez, M. L.; Plaza-Bolanos, P.; Romero-Gonzalez, R.; Martinez-Vidal, J. L.; Garrido-Frenich, A. *J. Chromatogr., A* **2012**, *1248*, 130−138.

(2) Jackson, R. J.; Minjares, R.; Naumoff, K. S.; Shrimali, B. P.; Martin, L. K. *J. Hunger Environ. Nutr.* **2009**, *4*, 393−408.

(3) Bohm, D. A.; Stachel, C. S.; Gowik, P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 2943−2953.

(4) Cherta, L.; Portoles, T.; Beltran, J.; Pitarch, E.; Mol, J. G. J.; Hernandez, F. *J. Chromatogr., A* **2013**, *1314*, 224−240.

(5) Feo, M. L.; Eljarrat, E.; Barcelo, D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 869−876.

(6) Gros, M.; Petrovic, M.; Barcelo, D. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 941−952.

(7) Herrmann, A.; Rosen, J.; Jansson, D.; Hellenas, K. E. *J. Chromatogr., A* **2012**, *1235*, 115−124.

(8) Ho, Y. B.; Zakaria, M. P.; Latif, P. A.; Saari, N. *J. Chromatogr., A* **2012**, *1262*, 160−168.

(9) Wiest, L.; Bulete, A.; Giroud, B.; Fratta, C.; Amic, S.; Lambert, O.; Pouliquen, H.; Arnaudguilhem, C. *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 5743−5756.

(10) Cannon, W. R.; Jarman, K. H.; Webb-Robertson, B. J.; Baxter, D. J.; Oehmen, C. S.; Jarman, K. D.; Heredia-Langner, A.; Auberry, K. J.; Anderson, G. A. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 1687−1698.

(11) Kapp, E. A.; Schutz, F.; Connolly, L. M.; Chakel, J. A.; Meza, J. E.; Miller, C. A.; Fenyo, D.; Eng, J. K.; Adkins, J. N.; Omenn, G. S.; Simpson, R. J. *Proteomics* **2005**, *5*, 3475−3490.

(12) Kmellar, B.; Fodor, P.; Pareja, L.; Ferrer, C.; Martinez-Uroz, M. A.; Valverde, A.; Fernandez-Alba, A. R. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1215*, 37−50.

(13) Lehotay, S. J.; de Kok, A.; Hiemstra, M.; Van, B. P. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 595−614.

(14) Schenck, F. J.; Hobbs, J. E. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *73*, 24−30.

(15) Wang, J.; Chow, W.; Leung, D.; Chang, J. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 12088−12104.

(16) Masia, A.; Ibanez, M.; Blasco, C.; Sancho, J. V.; Pico, Y.; Hernandez, F. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *761*, 117−127.

(17) De, D. E.; Commissati, I.; Suman, M. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1232−1241.

(18) Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *700*, 86−94.

(19) Peters, R. J.; Bolck, Y. J.; Rutgers, P.; Stolker, A. A.; Nielen, M. W. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 8206−8216.

(20) Petrovic, M.; Gros, M.; Barcelo, D. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1124*, 68−81.

(21) Polgar, L.; Garcia-Reyes, J. F.; Fodor, P.; Gyepes, A.; Dernovics, M.; Abranko, L.; Gilbert-Lopez, B.; Molina-Diaz, A. *J. Chromatogr., A* **2012**, *1249*, 83−91.

(22) Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M. *Analyst* **2011**, *136*, 1898−1909.

(23) Leon, N.; Roca, M.; Igualada, C.; Martins, C. P.; Pastor, A.; Yusa, V. *J. Chromatogr., A* **2012**, *1258*, 55−65.

(24) Masia, A.; Campo, J.; Blasco, C.; Pico, Y. *J. Chromatogr., A* **2014**, *1345*, 86−97.

(25) Farre, M.; Pico, Y.; Barcelo, D. *J. Chromatogr., A* **2014**, *1328*, 66−79.

(26) Hernandez, F.; Sancho, J. V.; Ibanez, M.; Abad, E.; Portoles, T.; Mattioli, L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1251−1264.

(27) Junot, C.; Madalinski, G.; Tabet, J. C.; Ezan, E. *Analyst* **2010**, *135*, 2203−2219.

(28) Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 2097−2098.

(29) Weiss, J. M.; Simon, E.; Stroomberg, G. J.; de, B. R.; de, B. J.; van der Linden, S. C.; Leonards, P. E.; Lamoree, M. H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 3141−3149.

(30) Junot, C.; Fenaille, F.; Colsch, B.; Bécher, F. *Mass Spectrom. Rev.* **2013**, *33*, 471−500.

(31) Klein, A. M.; Vaissiere, B. E.; Cane, J. H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S. A.; Kremen, C.; Tscharntke, T. *Proc. Biol. Sci.* **2007**, *274*, 303−313.

(32) Steffan-Dewenter, I.; Potts, S. G.; Packer, L. *Trends Ecol. Evol.* **2005**, *20*, 651−652.

(33) Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC; http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage (accessed April 18, 2014); *Off. J. Eur. Communities* **2005**, *L 70* (1).

(34) Pizzutti, I. R.; de Kok, A.; Hiemstra, M.; Wickert, C.; Prestes, O. D. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 4539−4552.

(35) Kessner, D.; Chambers, M.; Burke, R.; Agus, D.; Mallick, P. *Bioinformatics* **2008**, *24*, 2534−2536.

(36) Tautenhahn, R.; Bottcher, C.; Neumann, S. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 504.

(37) Lee, J.; Park, J.; Lim, M. S.; Seong, S. J.; Seo, J. J.; Park, S. M.; Lee, H. W.; Yoon, Y. R. *Anal. Sci.* **2012**, *28*, 801−805.

(38) Kanehisa, M. *Novartis Found. Symp.* **2002**, *247*, 91−101.

(39) Wishart, D. S.; Jewison, T.; Guo, A. C.; Wilson, M.; Knox, C.; Liu, Y.; Djoumbou, Y.; Mandal, R.; Aziat, F.; Dong, E.; Bouatra, S.; Sinelnikov, I.; Arndt, D.; Xia, J.; Liu, P.; Yallou, F.; Bjorndahl, T.; Perez-Pineiro, R.; Eisner, R.; Allen, F.; Neveu, V.; Greiner, R.; Scalbert, A. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D801−D807.

(40) Smith, C. A.; O'Maille, G.; Want, E. J.; Qin, C.; Trauger, S. A.; Brandon, T. R.; Custodio, D. E.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. *Ther. Drug Monit.* **2005**, *27*, 747−751.

(41) Regulation (EC) No. 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant

protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC; *Off. J. Eur. Communities* **2009**.
(42) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA). Commitee for veterinary medicinal products: Amitraz (Bees); EMEA/MRL/572/99-FINAL, 1999.
(43) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological Profile for Chlorfenvinphos*; U.S. Department of Health and Human Services: Public Health Service: Washington, DC, USA, 1997.
(44) Higes, M.; Martin-Hernandez, R.; Martinez-Salvador, A.; Garrido-Bailon, E.; Gonzalez-Porto, A. V.; Meana, A.; Bernal, J. L.; Del Nozal, M. J.; Bernal, J. *Environ. Microbiol. Rep.* **2010**, *2*, 243−250.
(45) Nobeli, I.; Ponstingl, H.; Krissinel, E. B.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 697−719.
(46) Gupta, S.; ires-de-Sousa, J. *Mol. Divers.* **2007**, *11*, 23−36.
(47) Dobson, P. D.; Patel, Y.; Kell, D. B. *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 31−40.
(48) Peironcely, J. E.; Reijmers, T.; Coulier, L.; Bender, A.; Hankemeier, T. *PLoS One* **2011**, *6*, No. e28966.
(49) Kind, T.; Fiehn, O. *BMC Bioinformatics* **2007**, *8*, 105.
(50) Wolf, S.; Schmidt, S.; Muller-Hannemann, M.; Neumann, S. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 148.
(51) Gerlich, M.; Neumann, S. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 291−298.
(52) Allen, F.; Pon, A.; Wilson, M.; Greiner, R.; Wishart, D. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W94−W99.
(53) Wang, Y.; Kora, G.; Bowen, B. P.; Pan, C. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 9496−9503.
(54) Schymanski, E. L.; Meringer, M.; Brack, W. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 903−912.

Utilisation de l'approche métabolomique pour l'évaluation de la composition en micropolluants des eaux souterraines destinées à la production d'eau potable

Application of metabolomics to assess the micro-pollutant content of groundwater used for the production of drinking water

J. Cotton[(1,3)] *, V. Sabarly[(1)], C.Ducruix[(1)], F. Nauleau[(2)], S. Masclet[(2)], S. Piel [(2)], C. Junot[(3)]

(1) Profilomic - Laboratoire du CEA - Centre d'Etude de Saclay Bâtiment 136– 91191 Gif-Sur-Yvette

(2) SAUR R&D – 1 rue Antoine Lavoisier – Guyancourt – 78 064 St Quentin en Yvelines Cedex

(3) CEA de Saclay – DSV/iBiTeC-S/SPI/LEMM – 91191 Gif-Sur-Yvette

* : auteur correspondant (jerome.cotton@profilomic.com)

Mots-clés : français/anglais

Métabolomique, eau souterraine, puits de captage, méthode globale, micropolluants, pesticides, médicaments, Profilomic, Saur, empreinte chimique.

Metabolomic, groundwater, production wells, comprehensive method, micro pollutants, pesticides, drugs, Profilomic, Saur, chemical fingerprint.

## Résumé

La pollution environnementale est un problème majeur qui n'épargne pas les ressources en eau. A ce jour, les eaux de surface et les eaux souterraines sont très surveillées car particulièrement exposées aux pesticides mais des interrogations demeurent quant à la présence d'autres substances organiques (produits pharmaceutiques, plastifiants et autres produits industriels…).
La société Saur souhaitant élargir ses connaissances sur les ressources en eau souterraine afin de proposer des solutions de traitement adaptées, une nouvelle méthode basée sur une approche métabolomique a été développée en collaboration avec la société Profilomic. Elle s'appuie sur l'acquisition d'une empreinte chimique globale de l'échantillon et permet la recherche de listes exhaustives de polluants connus lors d'une seule analyse. Cette méthode de criblage a été testée sur une sélection de 15 puits de captage exploités par Saur ; l'objectif étant d'estimer l'état des nappes en fonction des caractéristiques des aquifères tout en étant le plus exhaustif possible vis-à-vis du nombre de molécules présentes. Ainsi, 3 campagnes de prélèvements ont été menées par l'équipe R&D Saur sur les 15 puits de captage sélectionnés et les analyses ont été réalisées par le laboratoire Profilomic et 2 laboratoires de références. Les résultats montrent que l'approche métabolomique permet de détecter un plus grand nombre de polluants que les analyses conventionnelles. Le couplage des résultats met en évidence une pollution relativement faible excepté ponctuellement pour certains pesticides. Enfin, les analyses statistiques ont permis d'identifier les différents profils de pollution des captages et ainsi mettre en évidence les points sensibles qui pourront faire l'objet d'une fouille de données approfondie pour la recherche de molécules inconnues ou non recherchées.

## Abstract

Environmental pollution is a major problem that does not spare water resources. Whereas, surface waters and groundwaters are closely monitored given they are particularly prone to pesticides, questions remain about the presence of others organic substances (pharmaceuticals, plasticizers and other industrial products ...). Saur company wishing to broaden their knowledge on groundwater resources in order to offer solutions suitable for treatment, a new method based on a metabolomic approach was developed in collaboration with Profilomic company. It relies on the acquisition of a comprehensive chemical fingerprint of the sample and allows searching for exhaustive lists of known pollutants in a single analysis. This screening method was tested on a selection of 15 collection wells operated by Saur, the objective being to estimate the state of the water depending to the characteristics of aquifers while being as comprehensive as possible regarding the number of molecules present. Thus, three sampling campaigns were conducted by the Saur R&D team on the 15 selected wells and the analyses were performed by the laboratory Profilomic and 2 reference laboratories. The results show that the metabolomic approach can detect more pollutants than the conventional analysis. The coupling of the results showed a relatively low pollution except occasionally for some pesticides. Finally, statistical analyzes were used to identify different profiles of pollution in collection wells and highlight the sensitive points whose data could be searched more thoroughly for unknown or unintended molecules.

# Introduction et éléments de contexte

La problématique des substances émergentes et plus généralement des micropolluants organiques préoccupe et prend une place de plus en plus importante dans le domaine du contrôle chimique de l'eau en France. Leur recherche et leur détection a d'abord concerné les eaux de surface, considérées comme les plus vulnérables à ce genre de pollution (rejets des ruissellements, rejets de stations d'épuration, etc.). Cependant les interrogations se sont multipliées au sujet de la présence de ces substances dans les eaux souterraines [1].

Au niveau national, les tables rondes du Grenelle de l'Environnement de 2007 ont identifié comme objectif prioritaire la préservation à long terme des ressources en eau utilisées pour l'alimentation en eau potable des 500 captages les plus menacés [2]. Ces derniers sont répartis sur l'ensemble du territoire français, dont 238 situés sur le bassin Seine-Normandie [3]. Parmi les polluants recherchés, les pesticides figurent en bonne place. Les niveaux de contamination sont souvent inférieurs à la limite de 0,1 µg/L fixée par le Code de la Santé Publique dans l'eau potable, même si ponctuellement des dépassements sont mesurés. Les produits pharmaceutiques commencent également à être recherchés, notamment au travers de grandes campagnes nationales (à titre d'exemple l'ANSES). Les niveaux de concentration rencontrés sont généralement très faibles, de l'ordre de la dizaine de ng/L [4].

Les approches conventionnelles consistent à rechercher des listes de molécules a priori en multipliant les analyses dédiées. Une alternative à ces nombreuses analyses serait l'analyse en une seule fois du plus grand nombre de molécules recherchées. Dans ce contexte, une méthode d'analyse innovante développée par la société Profilomic se basant sur l'acquisition d'empreintes chimiques globales par approche métabolomique sera évaluée sur un panel de 15 puits de captages exploités par Saur pour la production d'eau potable. Cette nouvelle approche permettra d'estimer l'état des nappes en fonction des caractéristiques des aquifères, tout en étant le plus exhaustif possible vis-à-vis du nombre de molécules présentes. Ainsi, 3 campagnes de prélèvements ont été menées par l'équipe R&D Saur sur les 15 puits de captage sélectionnés et les analyses ont été réalisées par le laboratoire Profilomic et 2 laboratoires de références.

Dans un premier temps, le panel de captages retenus ainsi que la méthode d'empreintes chimiques globale proposée par Profilomic seront détaillés. Puis les résultats obtenus à partir des campagnes d'analyses seront présentés et discutés sur le plan du niveau de contamination par les micropolluants organiques des puits de captage étudiés.

# 1. Aspect méthodologique

## *1.1. Sélection du panel de captages*

Au début 2011, la société Saur exploitait en France 871 champs captants, constitués de forages actifs en permanence, ou bien de manière discontinue (captages d'appoint, etc.). La Figure 1 illustre leur répartition géographique.

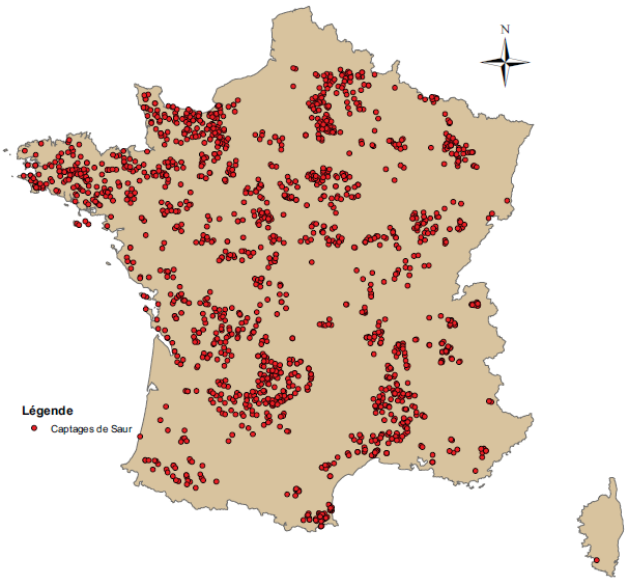



**Figure 1. Répartition géographique des captages d'eaux souterraines gérés par la société Saur.**

Pour limiter les coûts d'analyses et simplifier les campagnes de prélèvements, 15 captages ont été sélectionnés de la façon suivante (figure 2) :

- En respectant les diverses typologies de masses d'eau (caractéristiques hydrogéologiques, caractère karstique ou non de l'écoulement…) présentes dans le parc des 871 captages,
- En privilégiant les captages avec les débits les plus élevés ou bien historiquement mieux renseignés, suivis,
- En réalisant des entretiens téléphoniques avec les exploitants concernés,
- En respectant certaines contraintes géographiques pour une meilleure logistique (sélection de captages regroupés…).

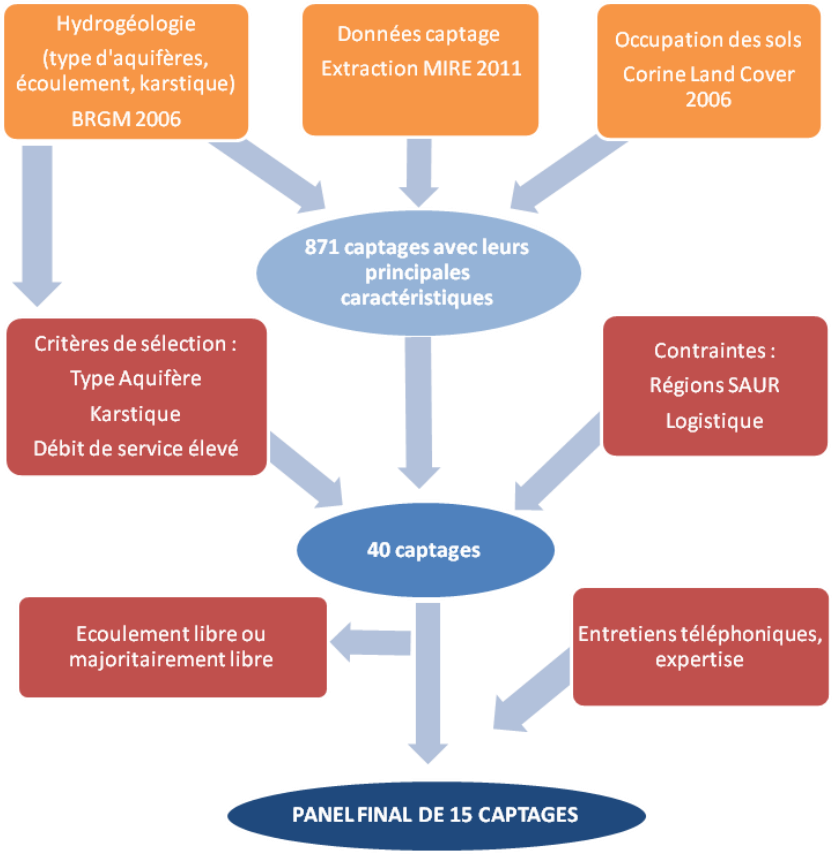



**Figure 2. Schéma récapitulatif de la méthodologie mise en œuvre pour sélectionner le panel de captages**

Afin de caractériser au mieux ces captages, différentes sources d'informations ont été consultées :

- La base de données patrimoniale de Saur recensant les installations, leur position, etc. ;
- La typologie des aquifères réalisée par le BRGM (Bureau de Recherches Géologiques et Minières) en 2006, suite à la demande des Agences de l'Eau. Cette base de données a pour but d'installer un réseau de surveillance des masses d'eau dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau [5] et décrit les aquifères sur 2 niveaux :
    - $1^{er}$ niveau, principal, avec les caractéristiques hydrogéologiques (type de réservoir, nature des écoulements) ;
    - $2^{ème}$ niveau, avec le type d'écoulement rencontré (karstique, présence en frange littorale, regroupement d'aquifère) ;
- La base de données Corine Land Cover 2006, issue d'un projet réalisé par l'Agence Européenne de l'Environnement. Elle décrit l'occupation des sols dans 38 Etats européens. La base de données est obtenue par photo-interprétation humaine d'images satellites de précision 20 m.

Connaissant la position GPS des captages, un traitement sous le logiciel ARCMAP (suite ARCGIS 9.3.1.) a permis de regrouper l'ensemble de ces informations.

Les caractéristiques des 15 captages retenus sont présentées dans le Tableau I. Deux catégories de captages apparaissent (i) ceux à faible densité de population, en zone naturelle, isolés, au sud-est ou

à l’est, avec une faible présence de cours d’eau, composés de nappes sédimentaires et karstiques et (ii) ceux à forte densité de population, en zone urbaine ou agricole, à l’ouest, avec une forte présence de cours d’eau, composés de nappes alluviales et non karstiques.

**Tableau I. Les captages retenus pour les campagnes, leurs principales caractéristiques et les dates des campagnes de prélèvement** *(pour les paramètres densité de population, activité et cours d'eau, la valeur présentée est celle majoritaire dans un cercle de 5 km autour du captage)*

| Dénomination des captages | Position géographique | Densité de population | Type géologique | Karst ou problème de turbidité | Type d'activités | Présence Cours ou Plan d'eau | Date des campagnes de prélèvement |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A** | Ouest | Forte | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | NON | Zone urbaine ou assimilée | Faible ou nulle | 06.2011<br>05.2012<br>10.2012 |
| **B** | Ouest | Faible | Sédimentaire | OUI | Zone Agricole | Faible ou nulle | 06.2011<br>05.2012<br>10.2012 |
| **C** | Ouest | Forte | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | NON | Zone urbaine ou assimilée | Forte | 07.2011<br>04.2012<br>10.2012 |
| **D** | Centre ouest | Moyenne | Sédimentaire | OUI | Zone Agricole | Faible ou nulle | 07.2011<br>04.2012<br>10.2012 |
| **E** | Centre ouest | Forte | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | NON | Zone Agricole | Forte | 06.2011<br>03.2012<br>11.2012 |
| **F** | Centre est | Forte | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | NON | Mixte | Moyenne | 06.2011<br>03.2012<br>10.2012 |
| **G** | Centre est | Moyenne | Sédimentaire | NON | Zone Agricole | Moyenne | 06.2011<br>03.2012<br>10.2012 |
| **H** | Nord | Faible | Sédimentaire | OUI | Zone Agricole | Faible ou nulle | 06.2011<br>03.2012<br>05.2012 |
| **I** | Sud ouest | Faible | Autre | OUI | Zone Agricole | Faible ou nulle | 07.2011<br>03.2012<br>12.2012 |
| **J** | Centre est | Forte | Autre | NON | Zone naturelle ou assimilée | Faible ou nulle | 07.2011<br>02.2012<br>06.2012 |
| **K** | Centre est | Moyenne | Alluviale ou proche d'un | NON | Zone Agricole | Forte | 07.2011 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | grand cours d'eau | | | | 02.2012<br>11.2012 |
| **L** | Centre est | Moyenne | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | NON | Zone Agricole | Forte | 07.2011<br>02.2012<br>11.2012 |
| **M** | Sud est | Moyenne | Autre | NON | Zone Agricole | Forte | 07.2011<br>04.2012<br>10.2012 |
| **N** | Sud est | Faible | Alluviale ou proche d'un grand cours d'eau | OUI | Zone agricole | Faible ou nulle | 07.2011<br>04.2012<br>10.2012 |
| **O** | Sud est | Faible | Sédimentaire | OUI | Zone naturelle ou assimilée | Faible ou nulle | 07.2011<br>04.2012<br>10.2012 |

## *1.2. Analyse métabolomique*

L'acquisition d'une empreinte chimique globale s'effectue en deux temps :

- Les échantillons sont tout d'abord extraits et concentrés à l'aide d'un protocole sur cartouche d'extraction sur phase solide (SPE, de l'anglais Solid Phase Extraction).
- Ces échantillons sont analysés sur un appareil couplant la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse à haute résolution.

Les fichiers générés contiennent des informations de type chromatographique (temps de rétention sur la colonne chromatographique) et spectrométrique (rapport masse sur charge) permettant de connaître la masse précise des molécules analysées et ainsi générer une liste restreinte de formules brutes associées.

Tous les composés chimiques de référence (337 polluants > 95 % de pureté) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH) de qualité analytique ainsi que l'acide formique (HCOOH, > 99 %) ont été achetés via VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). L'eau ultra pure (de qualité analytique) a été obtenue à partir d'un système Milli-Q (Millipore, Molsheim, France). Les cartouches d'extraction SPE Oasis HLB (1 g/20 mL) ont été achetées chez Waters (Guyancourt, France).

Trois campagnes de prélèvements ont été réalisées entre mi-2011 et fin 2012. Les échantillons d'eau brute souterraine ont été prélevés dans des bidons de 3 L en Nalgène. Si possible, les échantillons étaient prélevés au niveau du refoulement de la pompe du captage considéré, sinon, au niveau de la bâche de mélange des eaux brutes, lorsque l'alimentation était assurée par plusieurs puits de captage. Les échantillons étaient ensuite envoyés par transporteurs réfrigérés à 4°C pour une analyse débutant dans les 24 à 48 heures après le prélèvement.

Dès leur arrivée, les échantillons ont été extraits extemporanément sur des cartouches SPE. La nature chimique du copolymère de cette phase extractive combinant un site hydrophile et hydrophobe lui confère des propriétés particulièrement intéressantes. En effet, le piégeage des molécules d'intérêt comme les pesticides (plutôt hydrophobes) et des médicaments (plutôt hydrophiles) a été réalisé avec une efficacité variant de 60 à 100% selon les molécules et un rendement moyen de 92%. Ce protocole de pré-concentration des échantillons permet d'extraire et de concentrer jusqu'à 1000 fois les échantillons initiaux.

Les échantillons concentrés ont ensuite été injectés sur un appareil couplant la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse à haute résolution utilisant la technologie Orbitrap™. Le système chromatographique Nexera LC-30AD (Shimadzu, Marne la Vallée, France) composé d'un passeur d'échantillon thermostaté à 4°C, d'une pompe binaire et d'un four à colonne confiné à 30°C a été utilisé. Les échantillons ont été injectés en utilisant un gradient dans la colonne chromatographique Xterra C18 (150 × 2.1mm et 5µm de particules, Waters, Guyancourt, France) permettant une analyse résolutive des polluants. Le spectromètre de masse Exactive (ThermoFischer scientific, Les Ulis, France) en mode d'ionisation positif et négatif à une résolution de 50 000 à la masse 200 uma a été utilisé. L'acquisition a été effectuée sur la gamme de masse 85 et 1000 uma avec une précision inférieure à 5 ppm sur la base de la masse exacte. Les données générées sont donc des empreintes globales de chaque eau contenant plusieurs milliers de pics.

## *1.3. Traitement des données*

Les spectres de masse ont ensuite été traités à l'aide de la librairie XCMS [6] du logiciel R [7] afin d'obtenir une matrice de données regroupant l'ensemble des signaux détectés, caractérisées par leur temps de rétention en chromatographie liquide et leur rapport masse sur charge, ainsi que par leurs intensités dans les échantillons analysés. Une liste de polluants à rechercher de manière ciblée a été constituée en prioritisant sur les médicaments en se basant notamment sur le rapport « Médicaments et Environnement » de l'Académie Nationale de Pharmacie [8] sur les molécules jugées préoccupantes. Elle a ensuite été complétée par des médicaments rares, notamment des anticancéreux, ou fréquemment prescrits : antihypertenseurs, antidépresseurs, analgésiques et hormones. Des pesticides ont également été ajoutés en prenant soin de sélectionner des substances déjà utilisées en France, mais pouvant être interdites à ce jour, et toxiques pour l'homme et/ou l'environnement. Finalement, un total de 337 polluants a été recherché, dont la répartition en 9 catégories de molécules est indiquée tableau 2. La recherche de ces polluants est basée sur la comparaison avec une base de données interne à Profilomic en s'appuyant non seulement sur les temps de rétention et les rapports masse sur charge mais aussi sur les similitudes des massifs isotopiques observés ainsi que la présence éventuelle d'adduits et/ou de fragments. Seuls les signaux dont l'intensité était supérieure au bruit de fond et aux observations faites dans les échantillons contrôles (eau déminéralisée) ont été considérés comme des détections positives. L'ensemble des résultats positifs a enfin été soumis à une validation experte basée sur l'inspection manuelle des spectres de masse.

**Tableau 2. Répartition des 337 polluants en 9 catégories**

| Catégories | Nombre de molécules |
|---|---|
| Acaricides | 8 |
| Antibiotiques | 57 |
| Autres médicaments | 148 |
| Fongicides | 31 |
| Herbicides | 41 |
| Insecticides | 26 |
| Toxines | 1 |
| Plastifiants / produits industriels | 17 |
| Substances vétérinaires | 8 |

Certaines molécules étant attendues d'après l'expertise Saur, il a été décidé de quantifier leur présence afin d'offrir un point de comparaison avec la méthode développée par la société Profilomic et ainsi mieux appréhender sa sensibilité. Pour cela, des analyses conventionnelles ont été réalisées par 2 laboratoires de référence (accrédités COFRAC pour leurs analyses).

# 2. Résultats et discussion

## *2.1. Comparaison des résultats des deux méthodes analytiques*

Les échantillons fournis par Saur ont été analysés par 2 méthodes :

- Une méthode globale et sans a priori de type métabolomique. Contrairement à la technique dite conventionnelle réalisée sur des spectromètres de masse de type quadripolaire utilisant le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring), l'approche de la société Profilomic ne cible pas de composés en particulier. Cette méthode permet la détection d'un maximum de molécules possibles afin de constituer des empreintes riches en informations qui pourront se prêter à de multiples fouilles de données avec différents objectifs. Les outils de retraitement de données utilisés lors des approches métabolomiques sont ici utilisés et un plusieurs centaines de molécules sont suivies, cette approche est appelée ci-dessous « criblage large spectre »

- Un ensemble d'analyses ciblées et réglementaires appelées ci-dessous analyses conventionnelles (réalisées par des laboratoires de référence).

Parmi les 337 polluants recherchés par criblage large spectre, 51 ont été détectés au moins une fois. Les zones de recouvrement des deux approches ont été évaluées afin permettre de mieux appréhender leurs intérêts respectifs. Pour cela, seules les molécules recherchées de façon commune par les deux méthodes ont été étudiées, soit 37 polluants. Parmi eux, 6 n'ont été détectés que par les analyses conventionnelles (Figure 3). Cette différence provient de la démarche même des techniques utilisées. En effet, dans la méthodologie conventionnelle, les analyses sont spécifiques à chaque classe de molécule. Ainsi les étapes d'extraction et de détection des molécules sont optimisées et adaptées à chacune des classes de molécules que l'on cherche à quantifier. A l'inverse, les analyses de criblage se veulent globales et les plus universelles possible. Ainsi une méthode d'extraction unique est employée et les composés extraits sont tous analysés avec les mêmes paramètres. Par conséquent certaines molécules ne sont pas détectées ou avec des sensibilités très faibles. La méthode utilisée résulte d'un compromis : si elle était optimisée en vue de détecter les 6 composés qui n'ont pas été décelés, cela réduirait le nombre total d'espèces chimiques détectées et limiterait donc la polyvalence de l'approche. En revanche, 17 molécules n'ont été détectées que par le criblage large spectre. En effet les analyses conventionnelles sont réalisées dans un cadre réglementaire avec des exigences en termes de sensibilité souvent supérieures aux limites de détection des appareillages récents employés pour les analyses de criblage.

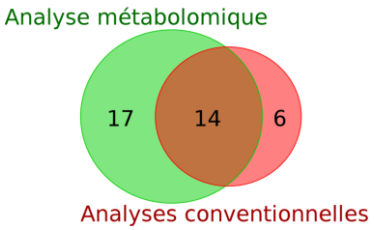



**Figure 3. Nombre de polluants détectés au moins une fois selon chaque méthode d'analyse parmi les 37 polluants recherchés en commun.**

Enfin, 14 polluants parmi les 37 molécules recherchées de façon commune ont été retrouvés au moins une fois par chacune des 2 méthodes. Pour chacune de ces molécules et chacune des campagne, des tests statuant sur sa présence dans un puit de captage ont alors été réalisés : 14 molécules × 15 captages × 3 campagnes de prélèvements, soit un total de 630 tests.. Dans 47% des cas (296 tests), les 2 méthodes sont négatives (la molécule n'est détectée ni par criblage, ni par l'analyse conventionnelle) et dans 66 tests, les 2 méthodes sont positives. Dans 10% des cas (66 tests), l'analyse conventionnelle est positive tandis que l'analyse métabolomique est négative. Enfin dans 41% des cas (262 tests), l'analyse conventionnelle est négative tandis que les approches de criblage sont positives. Ces résultats montrent tout d'abord que les 2 méthodes aboutissent à des résultats cohérents et par ailleurs que le criblage large spectre semble beaucoup plus sensible. Cette différence de sensibilité pourrait en partie être liée à la technologie de l'appareil utilisé.

## *2.2. Polluants quantifiés par les analyses conventionnelles*

L'approche de criblage large spectre employé n'étant pas une méthode quantitative, des analyses conventionnelles ont été menées afin de déterminer les concentrations de polluants détectés pour certaines des molécules des catégories médicaments et pesticides. Des méthodes reposant sur l'utilisation de chromatographie liquide ou gazeuse couplées à de la spectrométrie de masse ont été utilisées, quatre pour l'analyse des pesticides et deux pour l'analyses des produits pharmaceutiques. Ainsi, sur les 66 tests positifs (cf. §2.1) les concentrations de polluants quantifiées par analyse conventionnelle varient de 0,005 µg/L (sulfaméthoxazole) à 0,55 µg/L (2-hydroxyatrazine). On peut donc penser que pour les 262 tests positifs uniquement par criblage, les quantités détectées sont inférieures aux concentrations des molécules détectées par les 2 méthodes et quantifiées par les analyses conventionnelles. Ces observations montrent la pertinence et la sensibilité de l'approche globale par spectrométrie de masse haute résolution mais surtout que les quantités de polluants retrouvées dans les puits de captage sont globalement inférieures aux limites réglementaires. Les niveaux de concentrations en pesticides et en produits pharmaceutiques sont présentés Figures 4 et 5.

Les captages sélectionnés présentent différents types de réponses en termes de pollution en pesticides. Le nombre de molécules quantifiées par captage varie de 0 (captages J et O) à 9 (captage H) et reste de manière générale inférieur ou égal à 4. La valeur extrême retrouvée pour le captage H peut s'expliquer par un taux de précipitation important la veille de la campagne de prélèvement, aux alentours de 25 mm, pouvant entraîner une pénétration directe de la pollution dans la nappe de cet aquifère karstique. De plus, parmi les 15 captages suivis, 3 (A, B et H) présentent une concentration totale en pesticides supérieure ou égale à 0,5 µg/L. Pour les autres, la concentration totale est inférieure ou égale à 0,2 µg/L. La famille des triazines est majoritairement représentée, et plus particulièrement la 2-hydroxyatrazine (métabolite de l'atrazine) dépassant 0,1 µg/L dans 7 cas, seuls les captages J et O n'en ont pas présentée. Même si l'atrazine a été interdite en 2003, sa persistance dans l'environnement entraîne une présence importante de ses métabolites dans les eaux souterraines.

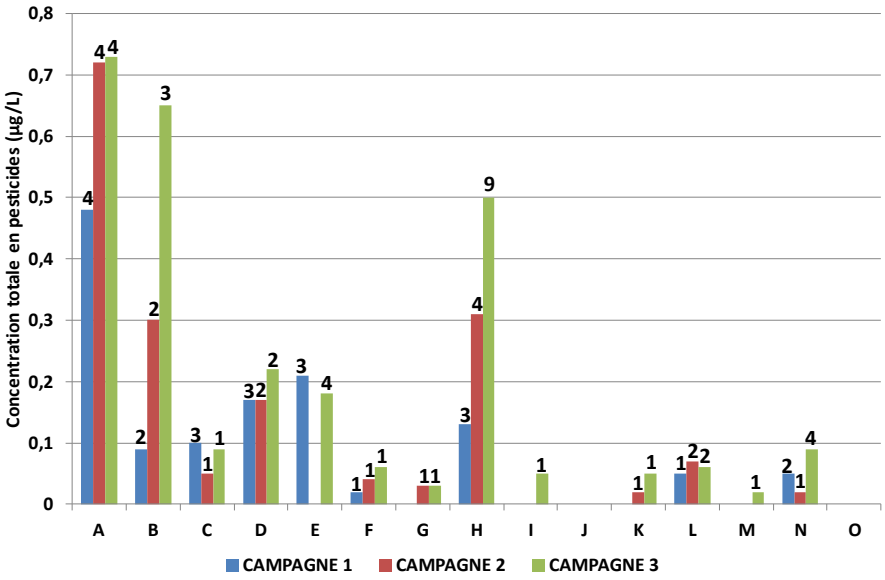



**Figure 4. Concentration totale en pesticides par captage et par campagne** *(Le nombre de substances retrouvées est mentionné au-dessus des séries de données)*

Concernant les produits pharmaceutiques, 4 captages (D, F, G et H) n'ont pas montré de contamination. Près de la moitié des échantillons contaminés ne le sont qu'avec une substance. En termes de concentration, près d'un tiers des échantillons positifs ont une concentration totale inférieure ou égale à 20 ng/L. La concentration totale maximale est de 157 ng/L dont 151 ng/L de caféine (captage K). Notons que seuls les captages K et L présentent une contamination à un ou plusieurs produits pharmaceutiques lors des 3 campagnes. Les molécules les plus retrouvées sont la carbamazépine (antiépileptique), la caféine (stimulant psychotrope) et le sulfaméthoxazole (antibiotique humain et vétérinaire).

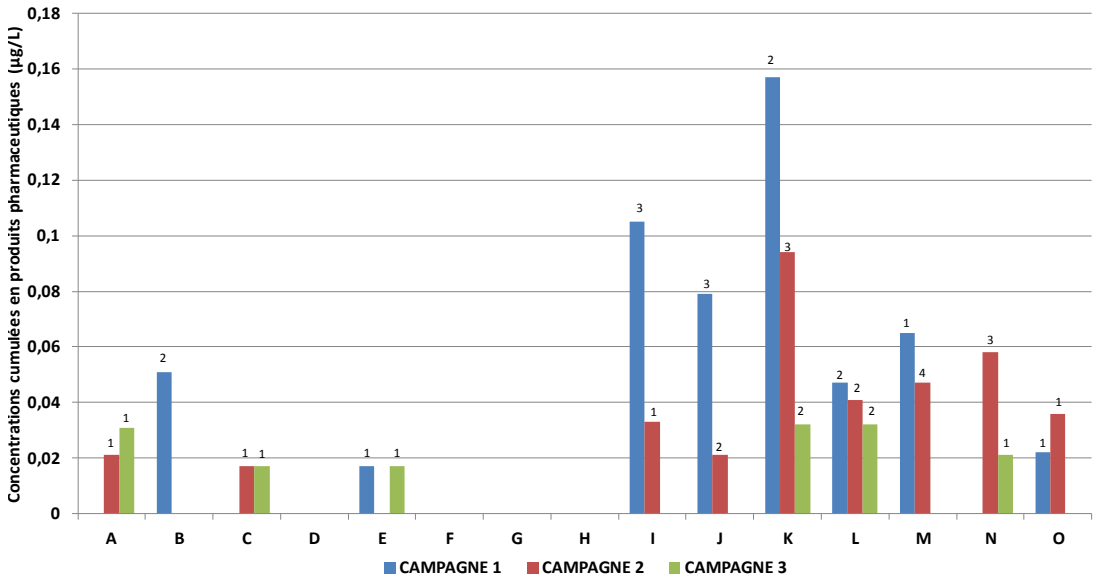



**Figure 5. Concentration totale en produits pharmaceutiques par captage et par campagne** *(Le nombre de substances retrouvées est mentionné au-dessus des séries de données)*

## *2.3. Polluants détectés par criblage large spectre*

La Figure 6 présente les fréquences auxquelles a été détecté chacun des 51 polluants repérés au moins une fois parmi les 45 tests effectués par molécule (15 captages x 3 campagnes de prélèvement). Ces fréquences de détection vont de 2 % à 84 % pour les polluants les plus courants. Un quart de ces 51 molécules est détecté dans plus de 46 % des cas. 6 catégories de polluants ont été retrouvées : 3 antibiotiques, 15 autres médicaments, 7 fongicides, 21 herbicides, 3 insecticides et 2 plastifiants.

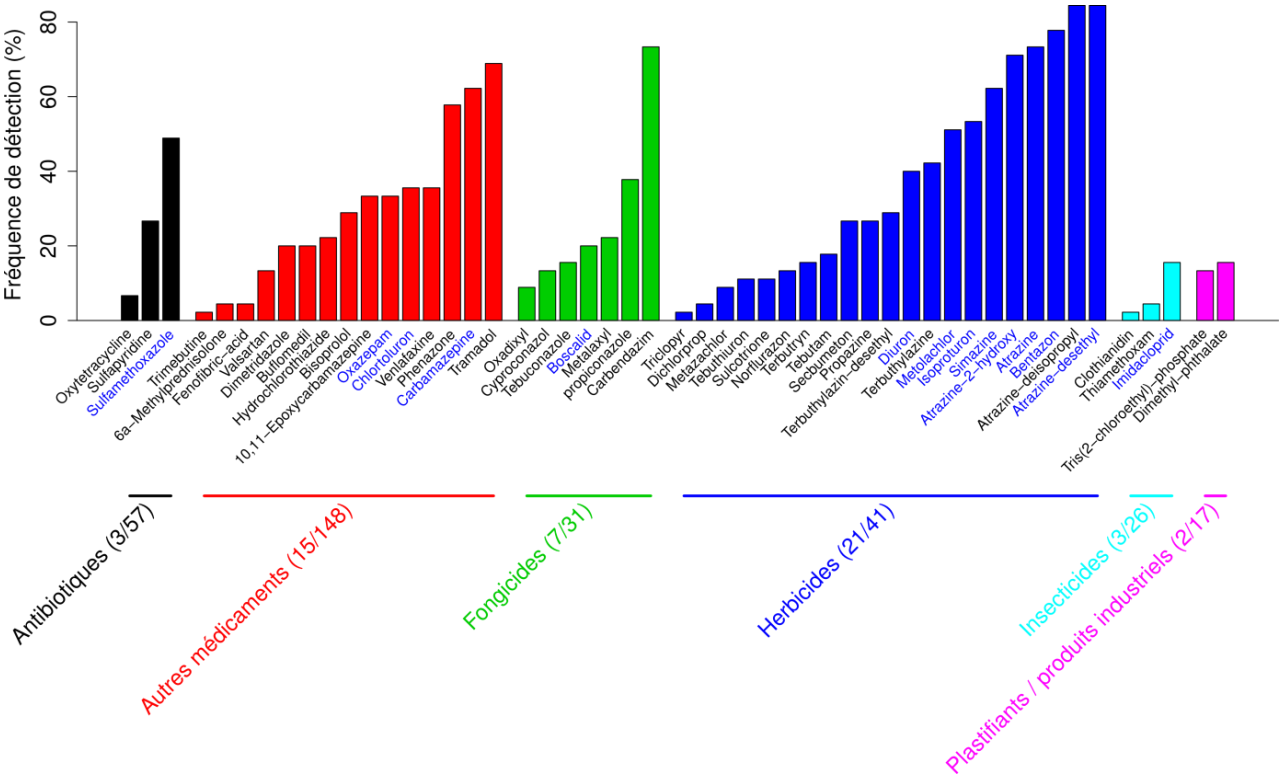



**Figure 6. Fréquences de détection des 51 polluants parmi les 45 tests effectués.** Les noms des composés détectés par les deux approches sont indiqués en bleu.

Les polluants retrouvés correspondent à l'occupation du territoire et aux pratiques locales. Ainsi, les acaricides n'étant pas détectés, il semblerait qu'ils soient peu ou pas utilisés dans les régions concernées. Des insecticides à spectre large sont plus souvent utilisés tel que l'imidacloprid. Concernant les produits pharmaceutiques vétérinaires, ils sont excrétés, de la même façon que les produits pharmaceutiques humains, dans les urines et fécès des animaux sous forme inchangée ou métabolisée. Cependant l'approche de la contamination est différente car leur utilisation est moins systématique (seulement en cas de maladie par ordonnance vétérinaire) et la pollution est diffuse. En effet, ces substances sont introduites indirectement par lessivage des biosolides issus de déjections animales épandues sur les sols agricoles puis, par infiltration [9]. Ce qui peut expliquer leur faible occurrence dans les eaux souterraines. La même constatation a été faite en eau de surface [10] : soit ils ne sont pas quantifiés soit à des concentrations très faibles, de l'ordre du ng/L. A noter, que certains antibiotiques vétérinaires et humains sont analogues tels que le sulfaméthoxazole et l'oxytetracycline.

La Figure 7 représente le nombre de polluants détectés au moins une fois par puits de captage. Seulement 2 polluants ont été retrouvés dans le captage le moins pollué contre 37 dans le plus pollué. En moyenne, pour chaque captage, les deux tiers des molécules ont été détectées à plusieurs reprises. 2 exceptions sont à noter : le captage I pour lequel 23 des 25 polluants détectés ont uniquement été repérés lors de la 3ème campagne de prélèvement et le captage L pour lequel seulement un seul des 24 polluants détectés a été repéré lors de la 3ème campagne de prélèvement. Par ailleurs la répartition des molécules détectées diffère selon les puits de captage, conséquence probable d'une pollution de nature différente selon le territoire concerné.

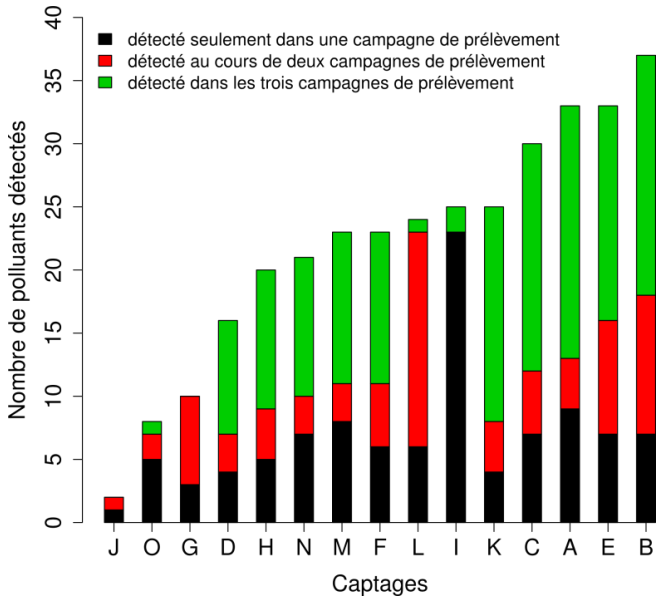



**Figure 7. Nombre de polluants détectés au moins une fois par puits de captage.**

## *2.4. Liens entre les caractéristiques du territoire et des aquifères et le risque de pollution par les micropolluants*

L'existence ou l'absence de relation entre les caractéristiques du territoire ou le type d'aquifère de chacun des captages présentés Tableau 1 et le risque global de pollution a été estimé par des tests du Chi². Les résultats sont présentés dans le Tableau3.

**Tableau 3. *P-value* des tests du Chi²** *(N.S. : Non Significatif ; S. : Significatif)*

| | ***P-values*** **des tests du chi² sur le nombre de polluants détectés** |
|---|---|
| **Campagne** | N.S. 0,12 |
| **Densité de population** | S. $2{,}01.10^{-4}$ |
| **Type de nappe** | S. $<2{,}2.10^{-16}$ |
| **Karst** | S. 0,012 |
| **Type d'activité** | S. $<2{,}2.10^{-16}$ |
| **Présence cours d'eau** | S. $3{,}47.10^{-10}$ |
| **Position géographique** | S. $<2{,}2.10^{-16}$ |

| Captage | S. $<2{,}2.10^{-16}$ |
|---|---|

Sur l'ensemble des captages, le risque global de présence des polluants est indépendant (*p-value* du test du chi² = 0,12) de la campagne, bien que les conditions climatiques aient différées entre les 3 prélèvements, notamment la pluviométrie.

De plus, ces tests statistiques permettent de dégager les tendances suivantes :

- Une forte densité de population est associée à un plus grand risque de pollution qu'une densité faible ou moyenne.
- Les nappes alluviales paraissent plus polluées que les nappes sédimentaires.
- Les nappes non karstiques sont ici plus polluées que les nappes karstiques, ce qui n'est pas forcément vérifié sur le terrain puisqu'une étude à long terme est menée sur le captage H et montre une pollution importante en période de fortes pluies.
- Un captage en zone urbaine est plus sensible qu'en zone agricole ou naturelle, un captage en zone agricole est plus sensible qu'en zone naturelle.
- Les captages en zone agricole présentent une pollution en pesticides plus importante qu'en produits pharmaceutiques.
- Une présence importante de cours d'eau est plus associée à un risque accru de pollution qu'une présence nulle, faible ou moyenne.
- Les captages situés à l'ouest sont associés à un risque plus fort de pollution que les captages isolés, à l'est ou au sud-est. Les captages isolés sont plus pollués en pesticides qu'en produits pharmaceutiques.

Ces tendances ne traduisent pas nécessairement des liens de cause à effet et certaines peuvent être la conséquence de facteurs partiellement confondants du fait du plan d'expérience assujetti à des contraintes, notamment logistiques et de représentativité du parc exploité par Saur. Finalement, ces résultats vont permettre de renforcer la surveillance des captages présentant le plus grand risque de pollution.

# Conclusion

Cette étude avait pour objectif la caractérisation physico-chimique de 15 puits de captage en France. Une approche innovante et sensible a donc été développée lors de ce travail collaboratif entre Saur et Profilomic avec pour objectifs, l'estimation du niveau de contamination de ces 15 puits de captage par les micropolluants organiques à l'aide d'un criblage ciblé d'une large liste de polluants connus.

Les résultats de cette étude montrent que l'acquisition d'une empreinte chimique permet de détecter des molécules polluantes en plus grand nombre et vraisemblablement à de plus faibles concentrations que les analyses conventionnelles. Cependant, les analyses conventionnelles ont permis la quantification des principaux polluants retrouvés et ont ainsi montré des niveaux de concentrations généralement faibles pour l'ensemble des molécules, exceptés pour certains pesticides, lesquels peuvent dépasser ponctuellement les 0,1 µg/L. Le criblage large spectre conforte cette idée de pollution relativement faible considérant que les polluants supplémentaires détectés le sont à des concentrations plus faibles. De plus, différents polluants peuvent être retrouvés selon l'occupation majeure du territoire (zone à dominante urbaine, agricole ou naturelle). Cette approche

nouvelle est une technique d'avenir complémentaire aux analyses conventionnelles permettant la détection de nombreuses molécules analysables par spectrométrie de masse. Ainsi, des analyses ciblées sur des listes prédéfinies de polluants de plus en plus vaste seront alors possibles, notamment grâce à l'incrémentation en continu par la société Profilomic de ses bases de données.

De plus, il existe une micro pollution environnementale peu ou pas prise en compte à l'heure actuelle composée principalement de composés inconnus ou non suivis. Les listes de polluants recherchés ne contiennent donc qu'une infime partie de la multitude des molécules potentiellement présentes dans l'environnement, pouvant notamment être générées par des transformations abiotiques ou biologiques formant ainsi des sous-produits de dégradation et de métabolisation. Une autre approche, plus globale et permettant la mise en évidence de certaines de ces molécules, consisterait à comparer, par une étude statistique, les empreintes chimiques de plusieurs échantillons pour en faire ressortir sans a priori les molécules qui les discriminent.

Enfin, les analyses statistiques réalisées sur les données obtenues par le criblage et les données recensées par Saur pour la caractérisation de ses captages a permis de mettre en évidence certains paramètres liés à un risque de pollution accru. Parmi ceux-ci peuvent être cités une forte densité de population, une géologie de type alluviale, et une présence forte de cours d'eau.

Grâce à cette étude, Saur possède une meilleure connaissance de ses ressources pour la surveillance de ses captages ainsi que pour l'adaptation des filières de traitement pour la production d'eau potable. En réponse à cette étude, une solution de traitement, à base de charbon actif micro grain fluidisé (procédé CarboPlus®G) va être proposée. Des essais en laboratoire sont en cours avec des eaux souterraines, répertoriées comme les plus vulnérables dans notre étude, dopées avec des substances pertinentes (financés par l'Agence de l'Eau Seine Normandie). Les résultats obtenus permettront d'adapter ce procédé à la ressource et à la micropollution et ainsi de le proposer aux collectivités.

# Bibliographie


[1]LeMonde.fr : http://www.lemonde.fr/planete/article/2013/03/25/des-traces-de-pesticides-et-de-medicaments-retrouvees-dans-des-eaux-en-bouteille_1853519_3244.html (consulté le 28 mars 2013).

[2]Liste des captages retenus dans le cadre du « Grenelle » : « Grenelle » : http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/liste_capt_grenelle_260509.pdf (consulté le 2 avril 2013).

[3]Humbert D,. 2009. « La protection des aires d'alimentation de captages contre les pollutions diffuses ». Géologues, 163, pp. 41-46.

[4]ANSES : « Campagne national d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine ». ANSES, 2011, 31p.

[5]Gourcy L., Vernoux J.F. : « Elaboration des réseaux de surveillance des masses d'eau souterraine du Bassin Seine-Normandie – Rapport final de phase 1 ». BRM, 2006, BRGM/RP-54557-FR, 49p.

[6]Smith, C.A. and Want, E.J. and O'Maille, G. and Abagyan,R. and Siuzdak, G.: XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching and identification, Analytical Chemistry, 78:779-787 (2006)

[7]R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/.

[8]www.acadpharm.org/dos_public/1_Rapport_Med_Env_version_JMH_def_JPC.pdf (consulté le 02 août 2013)

[9]Mompelat S., Le Bot B., Thomas O., 2009, Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. Environment international ; 35, 803–14.

[10]Kemper N., 2008, Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecol Indicat ; 8:1-13.