

Appel à Projet « Innovation et changements de pratiques : micropolluants des eaux urbaines »  
avec le soutien de :

**AGENCE FRANÇAISE  
POUR LA BIODIVERSITÉ**  
MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT



# REGARD

*RÉduction et Gestion des micropolluants sur la métropole bordelaise*

LOT 1 : Caractérisation des substances et des impacts

**TÂCHE 1.3 Recherche de Substances et caractérisation de l'impact**

**Sous tâche 1.3.1 : substances organiques**

Livrable n°134 : Développement de nouveaux outils d'échantillonnage passif, de diagnostic basé sur les effets biologiques, d'extraction automatisée et d'analyses non ciblée

Version finale - Juillet 2019

Auteurs : C.Gardia-Parège, V. Dufour, C. Chollet, J. Cruz, E. Maillot-Maréchal, S Aït-Aïssa, H. Budzinski

université  
de BORDEAUX



Université  
BORDEAUX  
MONTAIGNE



SUEZ  
INERIS

suez  
le lyre



CAP SCIENCES  
Bordeaux-Montaigne



## Sommaire

I.	Approches bio-analytiques.....	5
a.	L'équilibre des masses.....	5
i.	Principe.....	5
ii.	Résultats .....	5
b.	L'analyse dirigée par l'effet ( <i>Effect Directed Analysis</i> , EDA) .....	6
i.	Principe.....	6
ii.	Résultats .....	7
II.	Innovations techniques dans l'évaluation de la contamination chimique.....	9
a.	Développement d'échantillonneurs passifs de type POCIS pour un suivi intégratif de la contamination .....	9
i.	Problématique.....	9
ii.	Méthodologie .....	11
iii.	Suivi des masses d'eaux .....	11
iv.	Développements du POCIS.....	12
v.	Conclusions.....	14
b.	Automatisation de méthodes d'extraction et d'analyse pour un diagnostic rapide de la contamination .....	15
i.	Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) .....	15
ii.	Solid Phase Micro-Extraction (SPME).....	16
iii.	Solid Phase Extraction (SPE) en ligne .....	18
iv.	Injection directe .....	20
c.	Analyses non ciblées pour une caractérisation globale de la contamination .....	20
i.	Démarche suivie pour l'analyse chimique non ciblée .....	21
ii.	Analyse globale des extraits d'eau brute et traitée de Station de Traitement des Eaux Usées (STEU) .....	23
iii.	Identification des composés non recherchés.....	23
III.	Références bibliographiques.....	26



## Livrable 1.3.4 : Développement de nouveaux outils de diagnostic

### I. Approches bio-analytiques

Les directives en vigueur pour la surveillance du milieu aquatique telles que la DCE se basent sur le suivi d'un nombre défini de molécules. Dans la majorité des cas, ces composés n'expliquent pas ou peu l'(éco)toxicité observée *in situ* et le lien de causalité reste souvent inconnu. Dans ce contexte, différentes approches dites bio-analytiques couplant les analyses biologiques et chimiques ont été développées pour permettre de mieux comprendre et d'identifier les causes des perturbations environnementales (e.g. composés non recherchés ou inconnus, produits de transformation, effets de mélange...).

#### a. L'équilibre des masses

##### i. Principe

L'équilibre des masses est une approche arithmétique permettant de corréler les réponses biologiques mesurées aux concentrations en composés quantifiés dans un échantillon donné (Giesy *et al.* 2002). En d'autres termes, elle consiste à comparer une activité biologique théorique déterminée par le biais des analyses chimiques (Chim-TEQ) à l'activité biologique mesurée par les tests biologiques (Bio-TEQ). Chaque élément est calculé selon les équations suivantes :

$$Bio - TEQ = \frac{CEx \text{ composé de référence}}{CEx \text{ Extrait}} ; \quad Chim - TEQ = \sum (C_i \times TEF_i)$$

avec

*Bio-TEQ* : quantité équivalente toxique déterminée biologiquement

*Chim-TEQ* : quantité équivalente toxique déterminée chimiquement

*CE* : Concentration entraînant x% de l'effet biologique maximal pour l'activité biologique considérée

*C<sub>i</sub>* : Concentration quantifiée en composé *i*

*TEF<sub>i</sub>* : Facteur d'équivalent toxique du composé *i* c'est-à-dire l'activité relative du composé *i* par rapport au composé de référence.

Le rapport Chim-TEQ sur Bio-TEQ permet d'évaluer la contribution des composés identifiés à la réponse biologique mesurée dans l'échantillon analysé.

L'équilibre de masse est une approche basique qui ne s'appuie que sur les phénomènes d'additivité pouvant exister entre les molécules d'un même mélange. Les réactions plus complexes comme la synergie ou l'antagonisme ne sont pas prises en compte dans cette approche.

##### ii. Résultats

Sur la base des concentrations en composés, mesurées dans les échantillons, et de leur activité biologique, l'équilibre des masses a été calculé afin de déterminer si les molécules détectées sont responsables de l'activité biologique des échantillons. Seul un nombre restreint de composés, détectés lors des analyses chimiques ciblées (Livrable 1.3.1 « *Substances organiques* »), sont connues pour être des ligands des récepteurs utilisés (parmi les molécules dont l'activité a été étudiée).

Concernant les échantillons d'eaux ayant les plus fortes activités (eaux brutes et traitées de STEU et des eaux usées), les ligands détectés n'expliquent pas les activités biologiques observées. La contribution des molécules quantifiées et actives (quelques HAP) est inférieure à 1% pour l'activité « HAP-like ». Pour l'activité œstrogénique, les ligands détectés (Gemfibrozil et quelques alkylphénols) expliquent moins de 1% de la réponse ER observée pour les eaux usées et des eaux brutes de STEU. Concernant les eaux traitées de STEU, les alkylphénols quantifiés contribuent à 4% de l'activité œstrogénique, excepté pour la sortie 2 de Louis Fargue où la contribution est de 6,5% (Tableau 1). Pour l'activité AR, aucune des molécules détectées n'est connue pour être un ligand AR.

Ces résultats montrent que les perturbateurs endocriniens majeurs et les composés dits « dioxin-like », n'ont pas été identifiés.

La recherche de stéroïdes ou autres ligands connus par l'analyse chimique ciblée pourraient permettre d'expliquer une partie des effets observés. Cependant, il a été rapporté dans plusieurs études que les composés ciblés expliquent rarement les activités biologiques et qu'une approche alternative telle que l'analyse dirigée par l'effet permet de se focaliser sur les molécules actives et de les identifier (Creusot *et al.* 2013, 2014)

**Tableau 1 : Composés œstrogène-mimétiques détectés dans les eaux brutes et traitées de STEU et comparaison des équivalent toxique (TEQ) dérivés des analyses chimiques (Chim-TEQ) et des bioassays (Bio-TEQ).**

STEU			Pharmaceutique				Alkylphénols			ER		Chim-TEQ/Bio-TEQ
			Gemfibrozil	Nonylphénols	Octylphénols	Acide nonylphénoxyacétique		Bio-TEQ	Chim-TEQ			
Cantinolle	Eau brute	ng/L	152.3	413.2	129.94	688.9		68.2	0.30	0.4%		
	Eau traitée	ng/L	28.2	106.4	24.13	353.3		3.41	0.15	4.3%		
Louis Fargue	Eau brute 1	ng/L	142.9	282.6	32.37	490.8		43.7	0.21	0.5%		
	Eau traitée 1	ng/L	88.0	167.7	17.46	893.2		9.42	0.37	3.9%		
	Eau brute 2	ng/L	100.9	288.7	33.81	555.4		28.09	0.23	0.7%		
	Eau traitée 2	ng/L	83.1	145.6	15.61	1011.6		5.67	0.42	6.5%		
TEF			4.70E-08	3.30E-06	1.10E-04	4.10E-04						

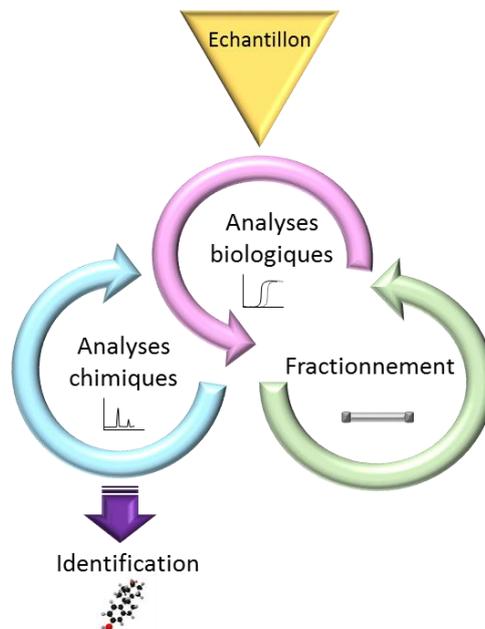
TEF : Facteur d'équivalent toxique du composé *i*

## b. L'analyse dirigée par l'effet (Effect Directed Analysis, EDA)

### i. Principe

L'approche bio-analytique de type EDA est une méthode récente permettant de simplifier les échantillons complexes afin d'identifier les molécules biologiquement actives

Elle repose sur une simplification séquentielle d'un échantillon biologiquement actif en combinant procédés physico-chimiques de fractionnement et tests biologiques (Brack 2003; Brack *et al.* 2016). Le principe est schématisé Figure 1. Après avoir évalué l'activité biologique de l'échantillon, ce dernier est soumis à un ou plusieurs processus de fractionnement afin de réduire la complexité du mélange. Après chaque étape de fractionnement, les fractions générées sont testées biologiquement à l'aide de bio-essais *in vivo* et/ou *in vitro* afin de mettre en évidence les fractions actives, contenant les molécules d'intérêt. Ces dernières sont ensuite identifiées généralement par spectrométrie de masse en tandem et spectrométrie de masse haute résolution. Une fois caractérisées, les molécules sont testées avec les mêmes bio-essais de manière à confirmer leurs effets biologiques.



**Figure 1 : Principe de l'analyse dirigée par l'effet.**

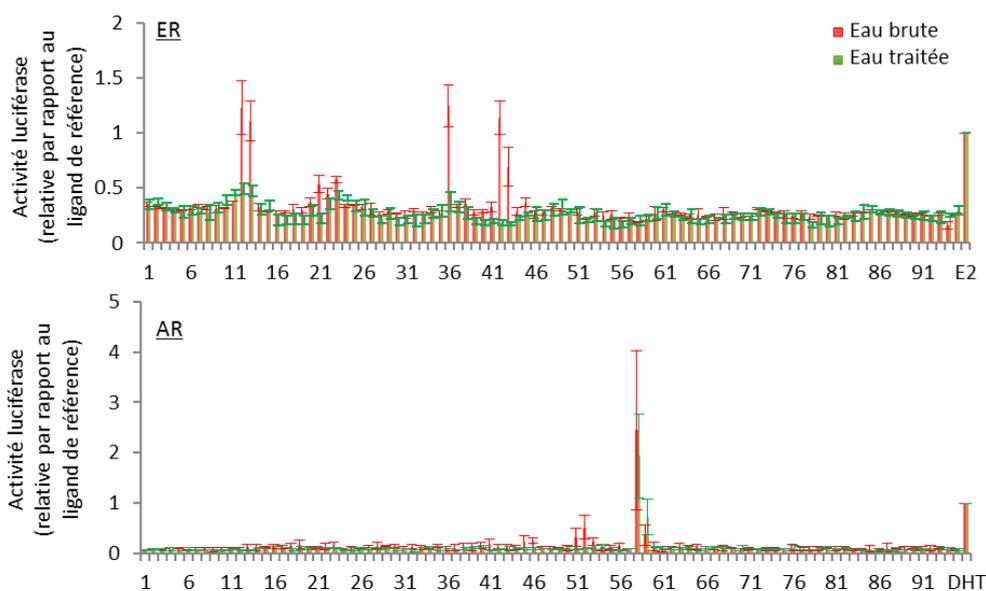
L'EDA permet de guider les analyses chimiques pour se focaliser uniquement sur les fractions d'intérêt et *in fine* sur les composés ayant un effet biologique. Par conséquent, cette approche peut amener à l'identification de molécules non recherchées ou inconnues (e.g. métabolites, photo-produits...). L'avantage d'une telle approche, bien que complexe, est de mettre en évidence le lien de cause à effet existant entre les composés présents dans un échantillon et l'activité biologique mesurée. La simplification de l'échantillon permet également de mettre en évidence des effets de mélange entre les composés. La perte de l'activité biologique après le fractionnement peut résulter de la séparation des molécules interagissant entre elles. La séparation des composés peut également mettre en évidence des effets masqués par le mélange de composés, comme par exemple la présence d'une activité agoniste masquée par la forte proportion de ligands antagonistes dans l'échantillon brut (Weiss *et al.* 2009).

## ii. Résultats

Les profils d'activité obtenus par les bioessais *in vitro* ont montré que les eaux brutes et traitées de la STEU de Cantinolle possèdent une activité œstrogénique (ER) et androgénique (AR) importante (Livrable 1.3 « Détection de composés perturbateurs endocriniens et dioxin-like à l'aide de bioessais *in vitro* dans les eaux usées, pluviales et naturelles »). Une partie de ces activités est maintenue malgré les traitements appliqués sur les eaux suggérant que les molécules responsables des effets biologiques n'ont pas été totalement éliminées par la STEU. Ces composés sont par conséquent rejetés dans le milieu et peuvent représenter un risque pour les organismes aquatiques. Les composés quantifiés lors des analyses chimiques ciblées ne permettent pas d'expliquer ces activités. La démarche EDA a donc été mise en place sur des extraits d'eaux brutes et traitées de STEU prélevés en Décembre 2015 afin 1) d'identifier les composés responsables des activités *in vitro* et 2) de rechercher leurs sources afin de développer *in fine* des procédés de traitement plus adaptés.

Les extraits ont été fractionnés en phase inverse par chromatographie en phase liquide en 96 fractions (collecte d'une fraction toute les 1,2 min). Chaque fraction a été testée avec les bio-essais pour identifier celles contenant les ligands ER et AR.

Après fractionnement, le profil biologique de l'extrait d'eau brute de STEU montre que les activités œstrogéniques et androgéniques se localisent dans un nombre assez restreint de fractions, 7 et 4 fractions respectivement (Figure 2). Ce constat permet de supposer que l'activité *in vitro* est liée à un nombre réduit de molécules. Certaines fractions actives étant contigües (ER : F12-F13, F42-F43 ; AR : F51-F52, F58-F59) ceci suggère que le/les ligands responsables de l'activité sont identiques et ont été élués puis collectés dans les deux fractions. Concernant le profil biologique de l'extrait d'eau traitée, seule l'activité androgénique persiste après le traitement en STEU. L'activité est localisée dans deux fractions (F58-F59).



**Figure 2 : Profil biologique des activités œstrogéniques (ER) et androgéniques (AR) des extraits fractionnés d'eaux brutes et traitées de la STEU de Cantinolle.**

Des analyses chimiques par spectrométrie de masse haute résolution ont été menées sur les fractions actives. Les résultats permettent de dresser une liste de molécules suspectées ou identifiées (Tableau 2). Au total, 16 molécules appartenant à la classe des médicaments, plastifiants ou des phytohormones ont pu être identifiées et 26 composés sont suspectés dans les différentes fractions actives.

Parmi les molécules identifiées, des ligands connus du récepteur des œstrogènes, non recherchés lors des analyses ciblées, ont été détectés et contribuent à l'activité des fractions (F12 : daidzéine ; F12-13 : bisphénol S ; F36 : bisphénol A) (Escande *et al.* 2006; Molina-Molina *et al.* 2013; Le Fol *et al.* 2017). Concernant les autres fractions actives, aucune des molécules identifiées n'est actuellement référencée pour induire une activité œstrogénique ou androgénique. Afin d'identifier des ligands potentiels, les composés identifiés devront être testés sur les modèles cellulaires utilisés lors de l'étude.

**Tableau 2 : Liste des composés suspectés ou identifiés dans les fractions actives des extraits d'eaux brutes et traitées de la STEU de Cantinolle**

Activité	Fraction	Tr (min)	Ion	Nom	Eau brute	Eau Traitée	Niveau ID	Activité	Famille
ER	F12	9.6	[M-H]-	Diadzein	x		Identifié	Ligand ER	Phytoestrogène
	F12- F13	6.5	[M-H]-	Nitrophenol-4	x	x	Suspecté	nd	Produit transformation (paracétamol,
		7.7	[M-H]-	Bisphénol S	x	x	Identifié	Ligand ER	Plastifiant
		2.4	[M+H]+	O Desmethyltramadol	x	x	Suspecté	nd	Produit transformation (Tramadol)
		4	[M+H]+	O Desmethylvenlafaxine	x	x	Suspecté	nd	Produit transformation (Venlafaxine)
		3.6	[M+H]+	Amisulpride	x	x	Identifié	nd	Psychotrope
		5	[M+H]+	Acebutolol	x	x	Identifié	nd	Bétabloquant
		4.3	[M+H]+	Desalkyldisopyramide		x	Suspecté	nd	Produit transformation (Disopyramide)
	F13	9.2	[M+H]+	Carbamazepine 10,11 epoxide		x	Suspecté	nd	Produit transformation (carbamazepine)
		2.3	[M+H]+	Fenspiride	x	x	Suspecté	nd	Anti-inflammatoire
	F36	17.2	[M-H]-	Bisphénol A	x	x	Identifié	Ligand ER	Plastifiant
		6.5	[M+H]+	Disopyramide	x	x	Identifié	nd	Médicament
		14.5	[M+H]+	Nordiazepam	x	x	Suspecté	nd	Produit transformation (Diazepam)
		9.9	[M+H]+	N Desalkylverapamil (D617)		x	Suspecté	nd	Produit transformation (verapamil)
		6.5	[M+H]+	Tiemonium		x	Suspecté	nd	Antispasmodique
		8.4	[M+H]+	Bisoprolol	x	x	Identifié	nd	Bétabloquant
		17.6	[M+H]+	Telmisartan	x	x	Suspecté	nd	Médicament
		2.4	[M+H]+	Pheniramine	x		Suspecté	nd	Antihistaminique
	F43 - F42	24	[M+H]+	(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6 $\alpha$ )-3-Hydroxy-6-methyl-20-oxopregnan-17-yl acetate	x		Suspecté	nd	Métabolite (Stéroïde)
	F43	10	[M+H]+	Propranolol	x	x	Identifié	nd	Médicament
11.4		[M+H]+	5-hydroxypropafenone		x	Suspecté	nd	Produit transformation (Propafenone)	
13.7		[M+H]+	Dipyridamole	x		Identifié	nd	Antiagrégant plaquettaire	
6.5		[M+H]+	Sitagliptin	x		Suspecté	nd	Antidiabétique	
6.4		[M+H]+	Cocaine	x		Identifié	nd	Stupéfiant	
AR	F51	11.2	[M+H]+	Tropium		x	Suspecté	nd	Médicament
	F51-52	14	[M+H]+	Erythromycin	x		Identifié	na	Antibiotique
		13.5	[M+H]+	Diltiazem	x	x	Suspecté	nd	Médicament
		15.2	[M+H]+	Climbazole	x	x	Identifié	nd	Antifongique
		12.5	[M+H]+	Citalopram	x	x	Identifié	nd	Psychotrope
		14.2	[M+H]+	Norverapamil		x	Suspecté	nd	Produit transformation (Verapamil)
		24	[M-H]-	8 Hydroxyefavirenz	x	x	Suspecté	nd	Produit transformation (Efavirenz)
	F52	20.9	[M+H]+	Atazanavir	x	x	Suspecté	nd	Antirétroviral
		13.9	[M+H]+	Raloxifene	x		Suspecté	nd	Traitements hormonaux de substitution
		11.5	[M+H]+	Diphenhydramine	x	x	Suspecté	nd	Antihistaminique
	F58	11	[M+H]+	Betaxolol	x		Suspecté	nd	Bétabloquant
		25.7	[M-H]-	Gemfibrozil	x	x	Identifié	Ligand ER	Médicament
		13.3	[M+H]+	Loxapine	x	x	Suspecté	nd	Psychotrope
		14	[M+H]+	Trimebutine	x		Suspecté	nd	Antispasmodique
	F58-59	18	[M+H]+	Clarithromycin	x	x	Identifié	na	Antibiotique
F59	18.7	[M+H]+	Roxythromycin	x	x	Suspecté	na	Antibiotique	
	15.5	[M+H]+	Propafenone		x	Suspecté	nd	Anti-arythmique	
		15.7	[M+H]+	Hydroxyzine	x	x	Identifié	nd	Psychotrope

nd : non déterminé, na : non active

## II. Innovations techniques dans l'évaluation de la contamination chimique

Les micropolluants organiques sont représentés par de nombreuses classes de molécules, toutes différentes en termes de propriétés physico-chimiques, de structures et de concentrations. De nouvelles techniques d'évaluation de la contamination chimique ont dû être mise en place afin de d'améliorer le suivi de ces molécules. Ces développements se sont basés sur 1) des échantillonneurs passifs de type POCIS pour un suivi intégratif de la contamination, 2) l'automatisation des méthodes d'extraction et d'analyse et 3) sur les analyses non ciblées pour une caractérisation globale de la contamination.

### a. Développement d'échantillonneurs passifs de type POCIS pour un suivi intégratif de la contamination

#### i. Problématique

Les POCIS (Polar Organic Chemicals Integrative Sampler) sont des échantillonneurs passifs constitués d'une phase accumulatrice entourée par deux membranes semi-perméables, elles même

maintenues par deux anneaux en acier inoxydable. Ils sont issus des travaux de thèse d'Alvarez (Alvarez 1999). La version classiquement utilisée, ou version « pharmaceutiques », est constituée par 0,2 g d'une phase Oasis HLB et des membranes en polyethersulfone (PES) de 0,1 µm de porosité. Ce dispositif permet d'échantillonner les composés organiques polaires possédant un coefficient de partage octanol/eau (log Kow) compris entre 1 et 4. L'accumulation des composés dans la phase suit une loi du premier ordre. Deux phases peuvent être identifiées : (1) une accumulation proportionnelle au temps d'exposition, et (2) la mise en place progressive d'un équilibre entre les quantités accumulées dans la phase et la concentration de l'eau au contact de l'outil. Afin de pouvoir relier la quantité de composé accumulé dans le POCIS à une concentration moyenne de la masse d'eau en fonction du temps, il est nécessaire de rester dans la zone de linéarité de la cinétique (phase 1). Cependant chaque composé possède sa propre vitesse d'accumulation, le taux d'échantillonnage ou  $R_s$  (L/j), qui représente le volume journalier d'eau que le POCIS est capable d'échantillonner pour la molécule considérée. L'estimation de ce paramètre nécessite la calibration de l'outil en amont de son déploiement sur le terrain.

Le  $R_s$ , donc l'accumulation des composés organiques au sein du POCIS, est influencé par les paramètres environnementaux tels que le débit (Vrana *et al.* 2005; Belles 2012), la température (Togola & Budzinski 2007; Bailly *et al.* 2013; Wund 2013), le pH (Li *et al.* 2011), la salinité (Togola & Budzinski 2007), etc. Afin de tenir compte de ce phénomène, une correction est appliquée sur la base de l'utilisation de composés de référence de performance (PRC) : ces composés sont introduits dans la phase Oasis HLB par enrobage, avant le montage des POCIS, à des concentrations de l'ordre de 10 µg/g de phase. Ils vont désorber de la phase au cours de l'exposition selon une loi isotrope à la loi d'accumulation des composés et permettre de corriger le  $R_s$  théorique en calculant un  $R_s$  *in-situ*. Dans le cadre de cette étude, les PRC choisis sont : la caféine 13C, la désisopropylatrazine d5 et le salbutamol d3. L'isoproturon d6 sert, lui, de témoin de non désorption permettant de vérifier le bon déroulement de l'exposition, de l'extraction et de la caractérisation des POCIS.

L'utilisation de l'échantillonnage passif présente des avantages par rapport à un échantillonnage ponctuel ou moyenné dans le temps réalisé plus classiquement. Tout d'abord, la durée de l'échantillonnage est de l'ordre d'une quinzaine de jours dans le milieu naturel. Durant cette période l'outil va échantillonner en continu la masse d'eau et intégrer les variations de concentration, ce qui présente un très fort intérêt dans le cadre de l'identification de sources de micropolluants : il permet de calculer des flux plus précis que via un échantillonnage traditionnel. C'est un gain non négligeable dans le cadre du suivi de masses d'eaux complexes comme le réseau d'assainissement où les concentrations en micropolluants organiques et les débits vont fluctuer sur une base horaire.

Le POCIS va également permettre d'abaisser les limites de quantification selon la formule :

$$LQ_{eau} = \frac{LQ_{phase} \times m_{phase}}{R_s \times t}$$

En effet, l'accumulation des contaminants organiques sur une longue période de temps permet de travailler sur une quantité plus importante de matériel et de concentrer davantage la masse d'eau qu'avec une simple extraction en phase solide. *In fine*, il permet de détecter davantage de composés à des concentrations inférieures au ng/L.

Enfin, cet outil est simple à utiliser sur le terrain et, de par la large gamme de composés qu'il est capable d'échantillonner, il permet un suivi multi-résidu des masses d'eaux. Dans le cadre de ce projet, seuls les pesticides et les médicaments ont été suivis, bien que les POCIS soient à même d'échantillonner un large panel de molécules comme des biocides ou des tensioactifs par exemple.

## ii. Méthodologie

Les échantillonneurs passifs sont montés en laboratoire à l'aide de 2 anneaux en acier inoxydable, de 200 mg de phase Oasis HLB et de 2 membranes en PES avec un seuil de coupure de 0,1 µm.

Trois outils sont immergés par site d'échantillonnage dans des cages d'exposition en acier inoxydable. La période d'immersion choisie est de 15 jours dans le milieu naturel et de 7 jours dans réseau d'assainissement. A la fin de la période d'échantillonnage, les POCIS sont sortis de la cage, nettoyés à l'eau ultrapure et stockés à -20°C jusqu'à l'extraction.

**Tableau 3. Méthodes d'injection des extraits POCIS**

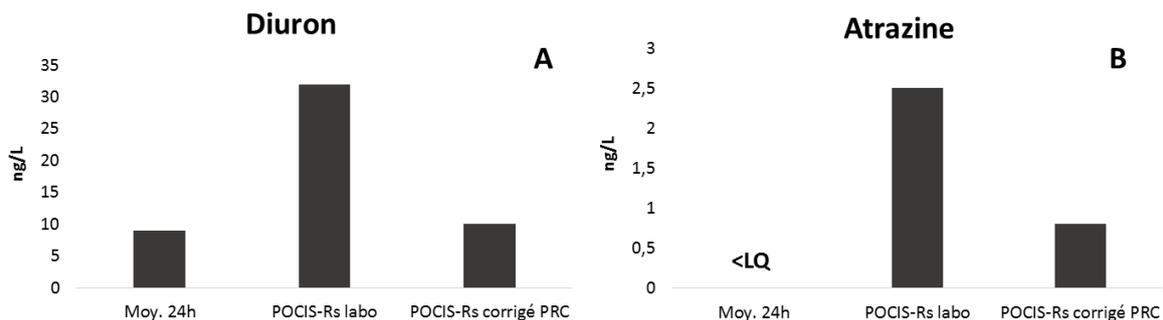
Classe de molécule	Méthode	Appareil	Ionisation
Pesticides	LC-MS/MS	Agilent 6460	ESI +
	GC-MS/MS	Agilent 7000B	IE
Médicaments	LC-MS/MS	Agilent 6410	ESI +
	LC-MS/MS	Agilent 6410	ESI -
PRC	LC-MS/MS	Agilent 6410	ESI +

(LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem ; GC-MS/MS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem ; ESI+ : ionisation positive par électrospray ; ESI- : ionisation négative par électrospray ; IE : ionisation par impact électronique)

En laboratoire, les POCIS sont ouverts et la phase est récupérée dans des cartouches en verre, entre 2 frittés en téflon. L'extraction des composés retenus par la phase accumulatrice est effectuée à l'aide de solvants organiques (dichlorométhane et méthanol), et est basée sur une dilution isotopique. L'extrait ainsi obtenu est reconcentré sous flux d'azote (300 µL) puis analysé selon la filière appropriée. Cinq méthodes d'injection différentes sont nécessaires à la caractérisation des pesticides, médicaments et PRC présents dans la phase accumulatrice. Le détail des méthodes est présenté dans le Tableau 3.

## iii. Suivi des masses d'eaux

Les POCIS ont été déployés sur 7 jours dans le réseau d'assainissement et 15 jours dans la Jalle de Blanquefort afin de caractériser plus précisément les concentrations en pesticides par rapport aux prélèvements moyennés réalisés dans le cadre du Plan Micropolluants Bordeaux Métropole. La Figure 3 présente les concentrations estimées en diuron et atrazine pour l'échantillon Mn\_Jal\_RES6-3 (échantillon du milieu naturel prélevé au niveau de la réserve naturel de Bruges) à la fois par échantillonnage moyenné 24h, et via les POCIS, avec et sans la démarche corrective PRC.



**Figure 3. Comparaison des échantillonnages moyennés 24h et des POCIS pour le Diuron (A) et l'Atrazine (B)**  
(Application de la démarche PRC par utilisation de la DIA d5)

Le POCIS permet d'intégrer les variations de concentration en pesticides dans le cours d'eau. Cependant, dans ce cas précis, l'utilisation du Rs sans correction entraîne une surestimation de la concentration calculée. En revanche, l'utilisation des PRC afin de calculer un Rs *in-situ* permet de prendre en compte l'impact des variables environnementales sur les capacités d'échantillonnage de l'outil tel que l'illustre l'exemple du diuron (Figure 3A).

La Figure 3B présente les concentrations en atrazine dans le cours d'eau. Aucune concentration en atrazine n'a pu être mise en évidence sur le prélèvement moyenné 24h (LQ= 1 ng/L) alors que l'utilisation du POCIS permet d'estimer une concentration moyenne sur la durée d'échantillonnage de l'ordre de 0,7 ng/L, avec une limite de quantification de 0,1 ng/L. Cela atteste de l'intérêt du POCIS dans le cadre du suivi de molécules à l'état de traces et sur le moyen terme.

Concernant le déploiement de POCIS dans les réseaux d'assainissements, une calibration en entrée de STEU a mis en évidence que la durée d'immersion choisie, soit 7 jours, était trop importante au vu de la cinétique d'accumulation des pesticides. En effet, la majorité des molécules ayant pu être calibrées ont un  $t_{1/2}$  de l'ordre de 3-5 jours dans ces effluents particuliers (diuron = 1,5 j), ce qui ne permet pas de calculer des concentrations robustes dans les effluents avec un temps d'exposition supérieur à 2 jours.

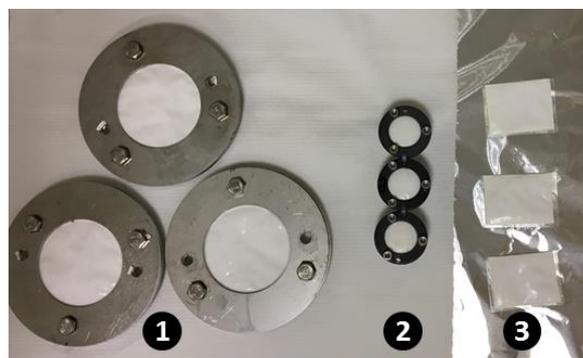
Le développement du POCIS semble donc essentiel afin de suivre au mieux et sur le long terme le réseau d'assainissement.

#### iv. Développements du POCIS

Comme expliqué précédemment, dans le cadre du déploiement du POCIS au sein du réseau d'assainissement, il est apparu que bien que très facile d'utilisation, il était nécessaire d'adapter cet outil notamment en raison de l'encombrement du dispositif de protection (cage en inox). Ce dispositif ne permettait pas une immersion homogène du triplicata de POCIS déployé sur chacun des sites. En effet, dans le cas de l'étude de nœuds du réseau d'assainissement de faible diamètre de section, 1 à 2 POCIS sur les 3 n'étaient pas immergés. De plus, l'encombrement de la cage a conduit à la rétention de flottants (lingettes) pouvant conduire à terme à une obstruction de la section, à une mise en charge du réseau ou encore à l'arrachement de la cage.

De plus, suite à la calibration *in-situ* des POCIS dans le bassin de rétention de la STEU de Louis Fargue, il est apparu que la période d'immersion pour laquelle l'accumulation est proportionnelle au temps n'excède pas 5 jours dans le réseau d'assainissement et tend plutôt vers 2 à 3 jours.

Dans ce contexte, 2 modifications ont été apportées au POCIS (présentées dans la Figure 4) : (1) une miniaturisation du dispositif afin de réduire la masse et limiter l'encombrement, et (2) une miniaturisation des POCIS associée au retrait des anneaux inox afin de réduire également la masse de l'outil. Les cages inox ont été remplacées par des filets en nylon. Ces modifications ont pour but de rendre l'outil plus petit et plus léger, réduisant ainsi les possibilités d'accumulation de flottants dans le réseau et permettant une meilleure immersion des POCIS.



**Figure 4. Présentation des versions modifiées du POCIS**

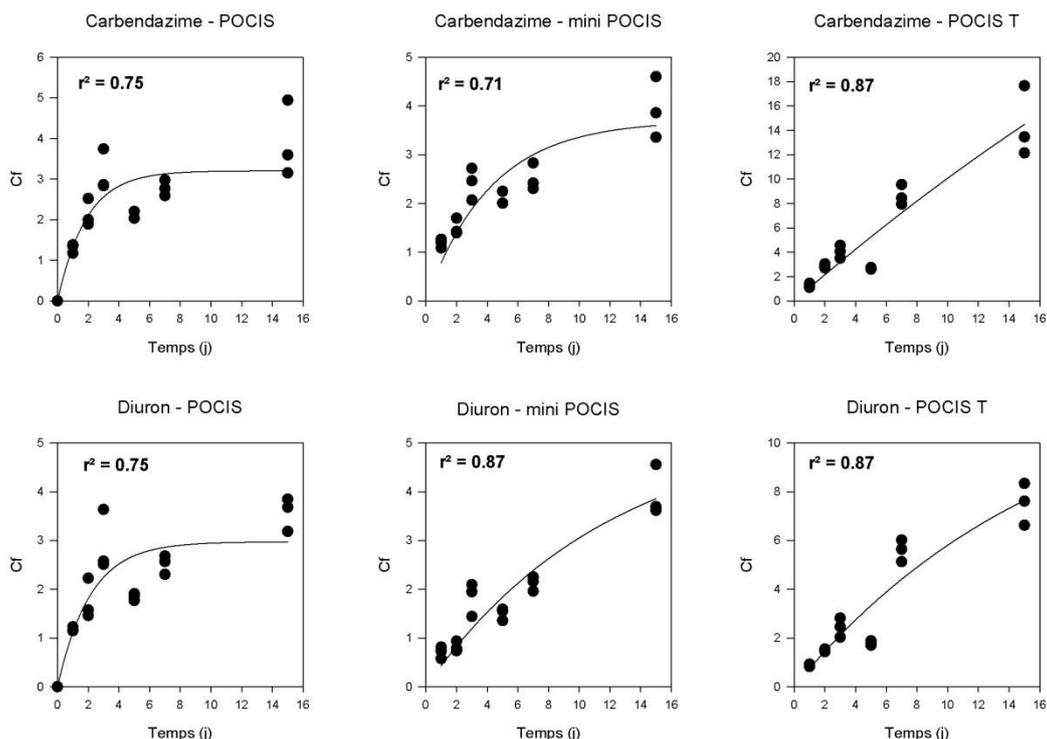
(1- POCIS classiques, 2- POCIS miniaturisés ou « mini-POCIS », 3- POCIS sans anneaux ou « POCIS-T »)



**Figure 5 : Filet en Nylon pour l'immersion des nouveaux outils sans obstruction des canalisations du réseau d'assainissement**

Ces outils ont été calibrés *in-situ* dans les effluents d'entrée de la STEU de Louis Fargue de Bordeaux, afin de se rapprocher le plus possible des conditions d'exposition du réseau d'assainissement, notamment en termes de nature et de complexité de la masse d'eau. Des résultats sont présentés dans la Figure 6 pour la carbendazime et le diuron. Ces deux composés mettent en évidence que la cinétique d'accumulation est trop rapide dans les POCIS classiques pour permettre un suivi quantitatif du réseau d'assainissement puisque la durée d'immersion, ou  $t_{1/2}$ , est respectivement de 1,3 et 1,6 jours.

En revanche, avec les mini-POCIS, la cinétique est ralentie, entraînant une zone de linéarité plus étendue, donc une durée d'immersion de l'outil potentiellement plus importante, respectivement de 2,9 et 8,4 jours pour la carbendazime et le diuron. La principale contrainte des mini-POCIS est la plus faible quantité de phase accumulatrice qu'ils contiennent : la masse de contaminants accumulés est moins importante que pour la version classique du dispositif ce qui va affecter les limites de quantification.



**Figure 6. Cinétique d'accumulation de la carbendazime et du diuron dans les POCIS, mini-POCIS et POCIS-T**

Les POCIS-T eux présentent un intérêt de par leurs capacités d'accumulations : alors que sur 15 jours les POCIS classiques et mini-POCIS ont un facteur de concentration de l'ordre de 3 à 4 L/g pour les 2 molécules présentées en Figure 6, le POCIS-T a un facteur de concentration de 8 pour le diuron et de 15 pour la carbendazime. Ce dispositif va donc théoriquement permettre de quantifier davantage de composés à l'état de traces. De plus, comparativement aux POCIS classiques, cette nouvelle version accumule plus lentement les molécules présentes dans la masse d'eau, avec pour conséquence une linéarisation de la cinétique d'accumulation, et donc une période d'immersion plus longue : estimée à 11 jours pour le diuron et 39 jours pour la carbendazime.

Le coefficient de partage phase/eau, ou KSW, peut être défini à partir de la modélisation de la cinétique d'équilibre. Il est alors possible travailler à l'équilibre et de calculer les concentrations en pesticides dans l'eau au moment du retrait de l'outil.

#### v. Conclusions

Les POCIS sont des outils adaptés au suivi des contaminants organiques polaires dans le milieu naturel. Ils permettent un échantillonnage de 7-15 jours selon les composés recherchés et ainsi qu'une intégration des fluctuations des concentrations, ce qui est appréciable dans le cadre de l'identification des sources en micropolluants puisque permettant le calcul de flux sur une base temporelle plus large. Leur capacité d'accumulation abaisse les limites de quantifications par rapport à un échantillonnage classique et permet la quantification de molécules présentes à l'état de traces. Cependant, en réseau d'assainissement, l'outil montre ses limites de par son encombrement, et donc la difficulté de le positionner de façon appropriée dans le réseau.

Les mini-POCIS et POCIS-T testés au cours de cette étude en conditions réelles présentent une bonne alternative puisqu'ils conservent les capacités de l'outil dans sa forme classique tout en permettant un gain de masse et de place non négligeable, associé à une plus grande facilité de déploiement, de récupération et de conditionnement de l'outil.

Les données obtenues en calibration *in-situ* pourront permettre de suivre des sections du réseau d'assainissement et de remonter à des concentrations moyennes dans les effluents.

## b. Automatisation de méthodes d'extraction et d'analyse pour un diagnostic rapide de la contamination

Etant donné le nombre de classes de molécules à étudier ainsi que les différences de propriétés physico-chimiques entre elles, plusieurs méthodes analytiques automatisées ont dû être mises en place. Toutes ces méthodes répondent néanmoins à des critères communs de qualité, que ce soit au niveau de l'extraction ou au niveau de l'analyse. En effet, l'extraction est une étape primordiale permettant de libérer les composés de leur matrice, souvent très complexe. Ces méthodes d'extraction doivent allier performance et robustesse mais également permettre la simplification de matrices complexes tout en ayant une sensibilité suffisante pour l'analyse de polluants présents à l'état de traces. A cela s'ajoute des critères de faisabilité devant prendre en compte un très grand nombre d'échantillons. Le développement de méthodes spécifiques a donc été mis en place. Il s'agit de méthodes simples à mettre en œuvre en termes d'échantillonnage (volume de la prise d'essai), nécessitant peu de manipulation afin de traiter un grand nombre d'échantillons dans un temps restreint et utilisant de plus faibles quantités de solvants dans le but de limiter le coût ainsi que l'impact environnemental. A l'heure actuelle 4 types de méthodes automatisées ont été développées. Il s'agit de la Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), de la Solid-Phase Micro-Extraction (SPME), de la Solid Phase Extraction (SPE) en ligne et de l'injection directe.

### i. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)

#### 1. Principe

La SBSE est une technique d'extraction récente dont le principe est détaillé dans la Figure 7. Les composés sont extraits de leur matrice aqueuse par un barreau magnétique recouvert d'une phase absorbante en polydiméthylsiloxane (PDMS). Cette méthode permet d'extraire des composés présents à l'état de traces dans l'échantillon sans utiliser de solvant. Une fois l'extraction réalisée, les composés sont thermiquement désorbés du barreau magnétique, le plus souvent directement dans un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse. Un système de chauffage de l'injecteur (le thermo désorbeur TD) permet la volatilisation des composés dans le système. Les composés sont ensuite refocalisés puis un flash thermique permet leur transfert vers le GC puis leur analyse par spectrométrie de masse. La SBSE est donc une méthode semi-automatisée et pouvant être très sensible en raison du grand volume de PDMS utilisé (Cruz 2015).

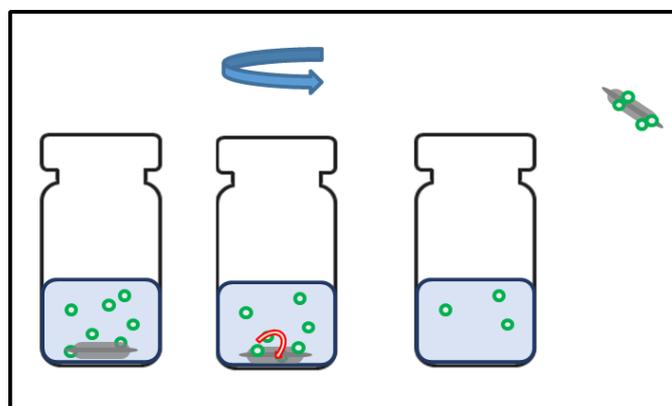


Figure 7. Principe de fonctionnement de la Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) (Cruz 2015)

## 2. Exemples d'application

La SBSE a été mise en œuvre pour l'analyse d'un composé pesticide, le diazinon. Le volume d'échantillon nécessaire pour une extraction de diazinon par SBSE est de 100ml, alors qu'il est de 200ml lorsque l'échantillon est traité par SPE. Les avantages de la SBSE dans ce cas sont : la diminution des prises d'essai, l'absence de solvant et l'abaissement des limites de quantification.

## 3. Performances

Les performances obtenues pour l'analyse du diazinon par SBSE dans les eaux usées domestiques sont exprimées dans le Tableau 4. Ces performances sont très bonnes et permettent d'obtenir une limite de quantification à 1ng/L.

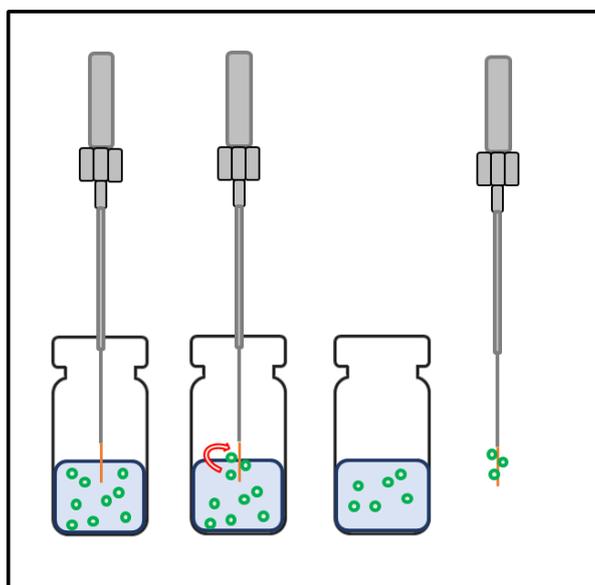
**Tableau 4. Performances analytiques obtenues pour le diazinon analysé par SBSE**

		EAUX USÉES DOMESTIQUES			Contamination des blancs de manipulation (ng/L)
		Justesse (%)	cv (%)	LQ moyenne (ng/L)	
Pesticides	Diazinon	93	7	1	<LQ

## ii. Solid Phase Micro-Extraction (SPME)

### 1. Principe

La Solid Phase Micro-Extraction (SPME) est une technique d'extraction dont le principe est détaillé dans la Figure 8. Les composés d'intérêt sont extraits par affinité pour une fibre recouverte d'une phase absorbante. La fibre est soit plongée dans l'échantillon à analyser, on parle alors d'immersion en phase liquide, soit dans l'espace de tête au-dessus de la solution dans le cas de composés volatils. Une fois l'extraction réalisée, les composés sont thermiquement désorbés de la fibre et analysés par un chromatographe en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse ou un détecteur à capture d'électron ( $\mu$ ECD) (Cruz 2015).



**Figure 8. Principe de fonctionnement de la Solid Phase Micro-Extraction (SPME)(Cruz 2015)**

### 2. Exemples d'application

La SPME est une technique complètement automatisée, simple à mettre en place en termes d'échantillonnage (8ml de prise d'essai), nécessitant peu de manipulations et permettant ainsi de

traiter un grand nombre d'échantillons dans un temps restreint. De ce fait, cette méthode a été développée pour les familles de composés cités dans le Tableau 5.

**Tableau 5. Récapitulatif des classes de composés analysées par SPME**

Classe/Famille de composés	Préparation des échantillons	Méthode analytique
Alkylphénols	<ul style="list-style-type: none"> <li>Filtration (GF/F, 0.7µm)</li> <li>Fibre SPME : PA 85µm</li> <li>T° extraction : 80°C</li> <li>Temps extraction : 80min</li> <li>Vitesse agitation : 250rpm</li> <li>Immersion phase gazeuse espace de tête</li> </ul>	SPME/GC/MS/MS
HAP	<ul style="list-style-type: none"> <li>Filtration (GF/F, 0.7 µm)</li> <li>Fibre SPME: PDMS 100µm</li> <li>T° extraction : 40°C</li> <li>Temps extraction : 60min</li> <li>Vitesse agitation : 250rpm</li> <li>Immersion phase liquide</li> </ul>	SPME/GC/MS
BTEX	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fibre SPME: PDMS /DVB 65µm</li> <li>T° extraction : 40°C</li> <li>Temps extraction : 30min</li> <li>Vitesse agitation : 250rpm</li> <li>Immersion phase gazeuse espace de tête</li> </ul>	SPME/GC/MS
PCB	<ul style="list-style-type: none"> <li>Filtration (GF/F, 0,7 µm)</li> <li>Fibre SPME: PDMS 100µm</li> <li>T° extraction : 80°C</li> <li>Temps extraction : 60min</li> <li>Vitesse agitation : 250rpm</li> <li>Immersion phase gazeuse espace de tête</li> </ul>	SPME/GC/µECD
DEHP	<ul style="list-style-type: none"> <li>Filtration (GF/F, 0,7 µm)</li> <li>Fibre SPME: PDMS 100µm</li> <li>T° extraction : 65°C</li> <li>Temps extraction : 30min</li> <li>Vitesse agitation : 250rpm</li> <li>Immersion phase liquide</li> </ul>	SPME/GC/MS/MS
Fipronil et ses métabolites	<ul style="list-style-type: none"> <li>Filtration (GF/F, 0,7 µm)</li> <li>Fibre SPME: PDMS-DVB</li> <li>Prise d'essai = 8ml</li> <li>Immersion phase liquide</li> </ul>	SPME/GC/MS/MS

### 3. Performances

Globalement, les performances obtenues pour les composés analysés par SPME sont très bonnes, et ce, grâce à la limitation des contaminations extérieures (ex. alkylphénols) et des pertes durant le protocole d'extraction (ex. HAP). Les limites de quantification, présentées dans le Tableau 6,

sont en moyenne de 17ng/L pour les alkylphénols, 15ng/L pour les BTEX, 0,4ng/L pour les PCB, 1ng/L pour les HAP, 20ng/L pour le DEHP et 1ng/L pour le fipronil et ses métabolites.

**Tableau 6. Performances analytiques obtenues pour les classes de composés analysées par SPME**

		EAUX USEES DOMESTIQUES				EAUX PLUVIALES				Gamme de contamination des blancs de manipulation (ng/L)	
		% juste sse	cv (%)	LQ min (ng/L)	LQ max (ng/L)	% justesse	cv (%)	LQ min (ng/L)	LQ max (ng/L)		
Fipronil + métabolites	fipronil	97	19	1,0		91	14	1		<LQ	
	fipronil desulfanyl	101	6	1,0		101	6	1		<LQ	
	fipronil sulfide	100	20	1,0		95	18	1		<LQ	
	fipronil sulfone	102	38	1,0		92	27	1		<LQ	
AkP	4-ter octylphénol	100	6	10,0		99	x	3,0	10,0	0,8	5,4
	4-nonylphénol (mélange isomères)	97	5	35,0		95	x	20,0	35,0	7,4	13,3
BTEX	benzène	90	x	40,0						13,7	
	éthylbenzène	102	x	3,0						2,7	
	toluène	101	x	10,0						0,7	
	(o+p+m)xylènes	105	x	5,0						2,1	
PCB	PCB 28	98	10	0,3	0,5					<LQ	
	PCB 50	98	11	0,3						<LQ	
	PCB 52	99	1	0,5						0,1	0,2
	PCB 101	100	7	0,4	0,7					0,1	0,2
	PCB 118	105	10	0,4						0,1	0,2
	PCB 138	104	5	0,2	0,3					0,1	0,1
	PCB 153	104	8	0,2						<LQ	0,1
	PCB 180	102	2	0,1						<LQ	
HAP	naphthalène	102	2	5,0		103	x	4,0	5,0	0,4	2,0
	acénaphthylène	111	7	1,0		101	x	0,3	1,0	<LQ	0,1
	acénaphthène	100	9	1,5		102	x	0,3	1,0	<LQ	0,1
	fluorène	102	2	0,8		103	x	0,3	0,5	<LQ	0,1
	phénanthrène	102	5	0,5		100	x	0,2	0,6	<LQ	0,3
	anthracène	99	7	0,5		100	x	0,2	0,3	<LQ	
	fluoranthène	110	12	1,0		101	x	0,2	0,2	<LQ	0,1
	pyrène	94	10	1,0		105	x	0,2	0,2	<LQ	0,1
	benzo(a)anthracène	96	9	2,0		102	x	0,2	0,5	<LQ	
	chrysène + triphénylène	92	1	0,5		102	x	0,2	0,5	<LQ	
	benzo(b+j+k)fluoranthène	98	28	1,0		99	x	0,3	1,0	<LQ	
	benzo(a)pyrène	87	21	1,0		92	x	0,3	1,0	<LQ	
	indéno(1, 2, 3-cd)pyrène	97	9	3,0		96	x	0,3	1,0	<LQ	
	benzo(g, h, i)pérylène	96	18	3,0		89	x	0,3	1,0	<LQ	
phthalates	di(2-éthylhexyl)phthalate	106	13	20,0	40,0					1,1	1,3

### iii. Solid Phase Extraction (SPE) en ligne

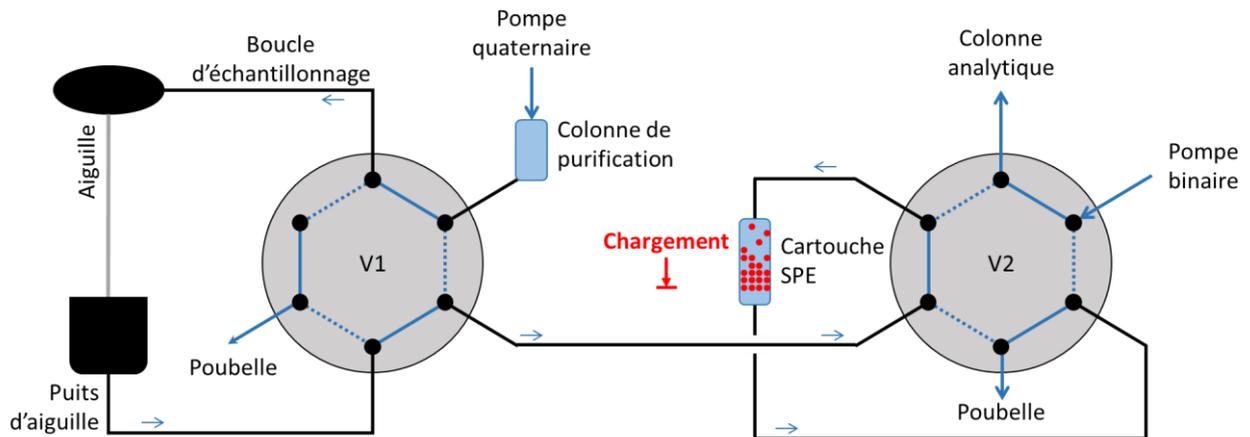
#### 1. Principe

Le principe de la SPE en ligne est détaillé dans la Figure 9. L'échantillon, préalablement enrichi en étalon interne, est chargé sur une cartouche SPE puis élué directement sur la colonne analytique reliée à un spectromètre de masse. Les avantages de la SPE en ligne sont nombreux. Cette méthode permet de reconcentrer de faibles volumes d'échantillon (moins de 1ml) afin d'analyser des composés présents même à l'état de traces. Cette étape de reconcentration permet d'augmenter la sensibilité en diminuant les limites de quantification. De plus, les échantillons ne demandent aucune préparation préalable, mis à part l'ajout d'étalon interne avant l'extraction, et ne nécessite pas d'utilisation de solvant puisque l'éluion se fait avec la phase éluante de la chromatographie en phase liquide. Il s'agit d'une méthode entièrement automatisée permettant d'analyser un grand nombre d'échantillons en peu de temps, contrairement à la SPE manuelle.

La préparation consiste en une étape de chargement de l'échantillon dans une cartouche SPE, suivie d'une éluion directe des composés de la cartouche sur la colonne analytique. Le système SPE en ligne est constitué d'une pompe quaternaire Agilent 1260 Infinity, d'un injecteur automatique, d'un passeur d'échantillons et de deux vannes 6 positions / 2 positions, notées V1 et V2, connectées comme décrit dans la Figure 9. V1 est une vanne d'injection permettant le transfert de l'échantillon de la boucle

vers la cartouche SPE. V2 permet la commutation entre la position de chargement et la position d'éluion. Pendant l'étape de chargement, l'aiguille prélève l'échantillon pour charger complètement la boucle d'injection (900 µL). Ensuite, la vanne d'injection commute permettant ainsi le transfert de l'échantillon dans la cartouche SPE (ici remplie d'une phase PLRP (polystyrène divinyle benzène)) grâce à un débit d'eau ultrapure de 1 ml / min délivré par la pompe quaternaire. Les composés retenus sur la cartouche SPE sont ensuite directement élués sur la colonne analytique via le gradient de la pompe binaire de la chaîne HPLC.

### CHARGEMENT DE L'ÉCHANTILLON



### ÉLUTION DE L'ÉCHANTILLON

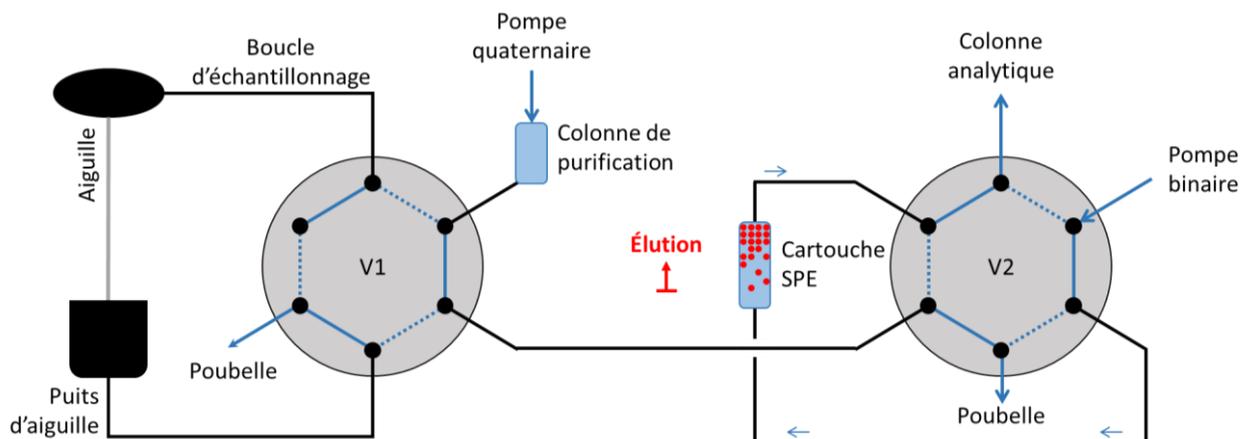


Figure 9. Principe de fonctionnement de la SPE en ligne

### 2. Exemple d'application

La SPE en ligne a été développée pour l'analyse du Bisphénol A (BPA) dans la phase dissoute. Le BPA étant une molécule ubiquiste très présente dans l'environnement, de nombreuses contaminations sont susceptibles d'apparaître durant le processus d'analyse. La SPE en ligne a permis de s'affranchir de nombreuses étapes de manipulations pouvant être à l'origine de contaminations. De plus, la rapidité de la méthode a permis de réaliser l'analyse de nombreux échantillons en un temps restreint et avec de faibles volumes de prélèvement (900 µL).

### 3. Performances

Les performances analytiques obtenues pour le BPA en phase dissoute (Tableau 7) offrent une bonne sensibilité (LQ comprise entre 0,7 et 2,5 ng/L) et une bonne justesse de quantification quel que soit le type d'eaux visé, ce qui permet l'analyse de matrices très chargées.

**Tableau 7. Performances analytiques obtenues pour l'analyse du BPA en phase dissoute**

	EAUX USEES DOMESTIQUES					MILIEU NATUREL				
	%justesse	cv (%)	LQ min (ng/L)	LQ max (ng/L)	Gamme de contamination des blancs de manipulation (ng/L)	%justesse	cv (%)	LQ min (ng/L)	LQ max (ng/L)	Gamme de contamination des blancs de manipulation (ng/L)
BPA	110	9	0,7	0,9	0,3	99	4	2,5		0,8

#### iv. Injection directe

##### 1. Principe

L'injection directe est utilisée pour analyser un composé sans extraction préalable. L'échantillon, auquel ont été ajoutés des étalons internes, est directement injecté dans un chromatographe en phase liquide couplé à un spectromètre de masse. Le volume d'injection conditionne les limites de quantification obtenues et peut-être ajusté de 5 à 100 µl.

L'injection directe est une méthode entièrement automatisée qui nécessite de faibles volumes d'échantillons mais qui a cependant certaines limites. En effet cette technique ne comporte pas de phase d'extraction/purification, ce qui peut être problématique dans le cas de matrices très chargées en matière organique (extinction de signal). De plus, il n'y a également pas d'étape de reconcentration. Cela signifie que les composés doivent être présents dans l'échantillon à des concentrations assez élevées afin que l'on puisse les détecter.

##### 2. Exemples d'application

L'injection directe a été développée pour l'analyse de 2 antibiotiques (ciprofloxacine et ofloxacine) ainsi que pour un anticancéreux (cyclophosphamide). En effet, le protocole préexistant au laboratoire pour ces molécules était particulièrement long à mettre en œuvre. La mise en place de l'injection directe pour ces molécules a permis un gain de temps certain, tout en permettant une bonne sensibilité.

##### 3. Performances

Les performances analytiques obtenues pour la ciprofloxacine, l'ofloxacine et le cyclophosphamide en phase dissoute (Tableau 8) offrent à la fois des bonnes performances de justesse de quantification et de limites de quantification, y compris pour l'analyse de matrices d'eaux usées.

**Tableau 8. Performances analytiques obtenues pour la ciprofloxacine, l'ofloxacine et la cyclophosphamide**

	EAUX USEES DOMESTIQUES				EAUX NATURELLES				Gamme de contamination des blancs de manipulation (ng/L)	
	% justesse	cv (%)	LQ min (ng/L)	LQ max (ng/L)	% justesse	cv (%)	LQ min (ng/L)	LQ max (ng/L)		
ciprofloxacine	112	8	20,0	35,0	81	3	6,0	20,0	<LQ	
ofloxacine	100	9	5,0	50,0	93	6	3,0	5,0	1	15
cyclophosphamide	90	8	2,0	2,5	115	10	0,4	0,6	<LQ	

#### c. Analyses non ciblées pour une caractérisation globale de la contamination

Autrefois réservée à la protéomique, la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) a connu, au cours de ces 15 dernières années, des avancées technologiques telles (e.g. augmentation de

la sensibilité, large panel de sources d'ionisation, création de système hybride...) qu'elle peut aujourd'hui être employée dans le domaine de l'environnement pour la détection et l'identification de molécules à l'état de traces/ultra-traces (Dévier *et al.* 2011).

La précision en masse et la résolution des analyseurs HRMS, comme par exemple l'analyseur à temps de vol (TOF), permet de déterminer grâce à la masse exacte et au massif isotopique, la formule moléculaire du composé détecté. Cependant, l'identification de la molécule ne peut être complète à ce stade du fait du manque d'informations sur sa structure. Ce type d'analyse, non sélective d'une classe de composés, détecte une grande partie des molécules présentes dans l'échantillon et permet d'obtenir ainsi son profil chimique. La comparaison des empreintes chimiques de plusieurs échantillons apporte de riches informations comme par exemple la présence/absence de composés, le suivi de la contamination voire même la classification de différents sites. Ces analyses permettent donc d'appréhender, d'une façon globale, la contamination.

Récemment, le développement d'instruments hybrides couplant les analyseurs HRMS à des systèmes de fragmentation (*e.g.* cellule de collision) offrent la possibilité de pallier le manque d'informations structurales. Ils permettent, en plus, l'acquisition du spectre de fragmentation du composé. Le spectromètre de masse hybride quadropôle/temps de vol (*i.e.* *Quadrupole/ Time Of Flight*, QTOF) appartient à cette nouvelle génération d'instrument. Il allie la sélectivité du quadropôle à la résolution en masse de l'analyseur à temps de vol. Combiné à la chromatographie en phase liquide (LC-QTOF) ou à la phase gazeuse (GC-QTOF), il représente un dispositif puissant, à la fois pour obtenir l'empreinte chimique de l'échantillon analysé (mode TOF), mais également pour l'identification de molécules connues, non recherchées ou inconnues (*e.g.* composés émergents, produits de transformation) lorsqu'il est employé en mode QTOF.

#### i. Démarche suivie pour l'analyse chimique non ciblée

Pour les échantillons complexes tels que les extraits d'eaux de STEU, l'analyse chimique non ciblée est effectuée en plusieurs étapes. La démarche suivie est exposée Figure 10.

Après l'acquisition des spectres de masse des molécules détectées, une liste d'ions est établie pour chaque extrait. Dans un premier temps, les résultats obtenus sont comparés à ceux acquis pour le blanc expérimental. L'objectif est de sélectionner les composés spécifiques aux eaux de STEU et d'écarter les autres molécules qui pourraient provenir d'une contamination des échantillons au cours de leur préparation. Une fois filtrées, les données sont utilisées pour l'interprétation.

Après l'analyse globale des extraits, l'identification des molécules détectées uniquement dans les extraits d'eaux de STEU est réalisée. Les ions sont à nouveau analysés et fragmentés. Les spectres de fragmentation acquis sont ensuite comparés à ceux disponibles dans les bibliothèques spectrales commerciales et internes. Une correspondance entre les spectres obtenus et ceux des bases de données permet de déterminer la structure probable de la molécule. Si aucune correspondance avec les bibliothèques spectrales n'est obtenue, une liste de structures probables peut être établie avec des logiciels *in silico* et/ou en utilisant d'autres paramètres, tels que les propriétés physico-chimiques, le temps de rétention, les références bibliographiques, permettant de réduire la liste des composés candidats.

Après la mise en évidence de structure probable, une étape de confirmation doit être effectuée pour terminer l'identification. Elle consiste en l'achat de l'étalon analytique de la molécule suspectée puis à son analyse et à sa fragmentation. La comparaison de ces données avec celles du composé inconnu détecté dans l'extrait permet de conclure sur son identification.

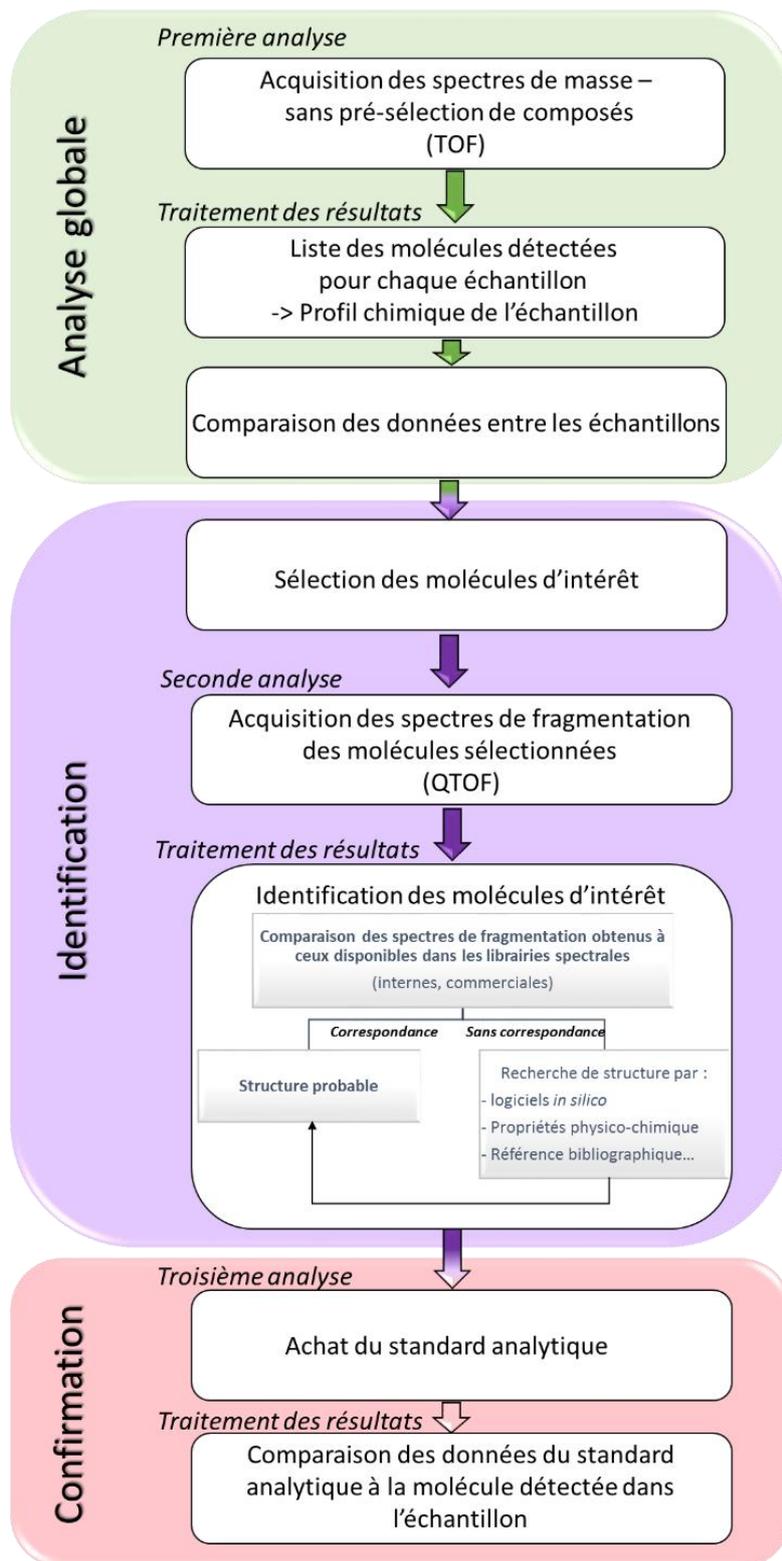
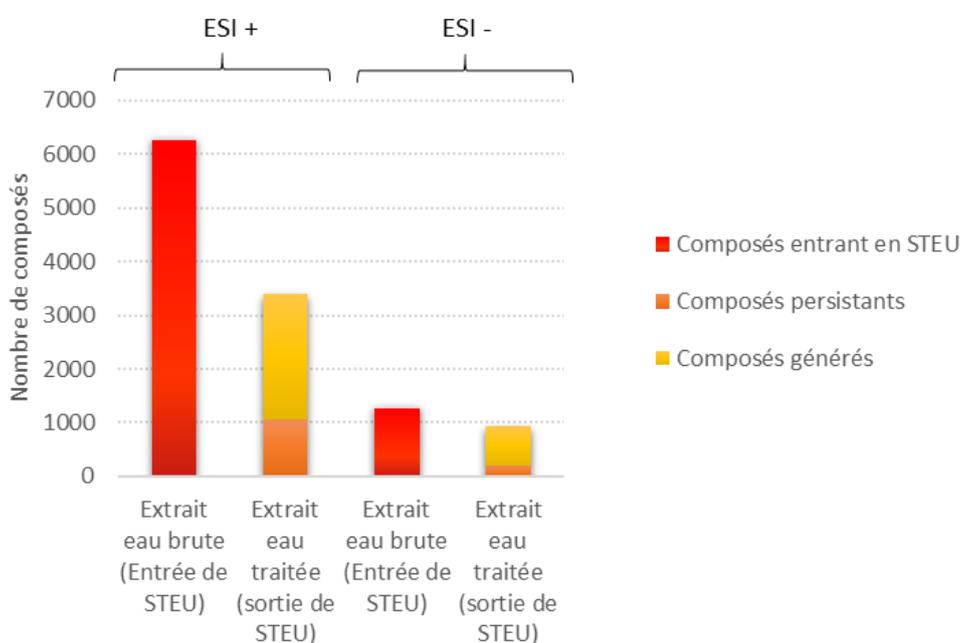


Figure 10 : Stratégie d'identification suivie pour l'analyse non ciblée des extraits d'eau brute et traitée de STEU par LC-QTOF

## ii. Analyse globale des extraits d'eau brute et traitée de Station de Traitement des Eaux Usées (STEU)

Les analyses chimiques non ciblées effectuées par LC-QTOF sur les extraits d'eau brute et traitée de la STEU de Cantinolle montrent que plus de 6000 composés arrivent en entrée de STEU (Figure 11). Ce nombre prend en compte toutes les molécules ayant une intensité supérieure à 10 fois le bruit de fond du chromatogramme et correspond à la quantité totale de composés détectés en mode d'ionisation positive (ESI+) et négative (ESI-). La comparaison des résultats entre l'extrait d'eau brute et d'eau traitée permet de constater que le traitement de la STEU est relativement efficace vis-à-vis des composés organiques puisque 83% des molécules entrantes sont éliminées de la phase dissoute, amenant par conséquent à 17% la proportion de composés persistants (Figure 11). Si une partie des molécules est éliminée, certains composés sont détectés uniquement dans l'extrait d'eau traitée. Ces molécules peuvent être issues du processus de traitement (produits de transformation) et/ou correspondre à des composés qui n'ont pas été détectés dans l'extrait d'eau brute à cause d'un effet matriciel important lors de l'analyse. Ces composés représentent environ 70% des molécules détectées en sortie de STEU.



**Figure 11 : Comparaison du nombre de molécules, en amont et aval du traitement de la STEU, détectées par LC-QTOF dans les modes d'ionisation positif (ESI+) et négatif (ESI-).**

## iii. Identification des composés non recherchés

Les analyses chimiques non ciblées sur les extraits de STEU révèlent la présence importante de tensioactifs tels que les polyéthylènes glycol utilisés par exemple dans les cosmétiques ou les alcools éthoxylates utilisés comme détergents. Les traitements de la STEU ne sont que partiellement efficaces sur ce type de molécules puisqu'une majorité de ces composés persistent dans l'eau traitée (Figure 12).

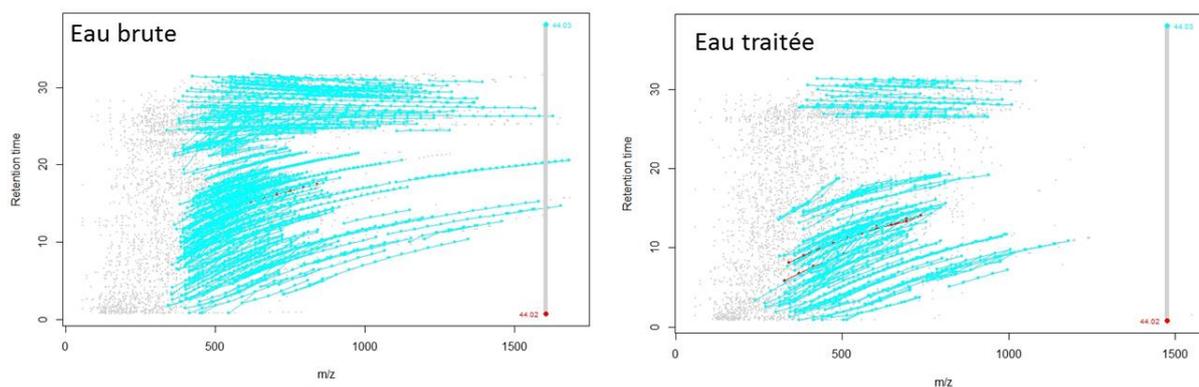


Figure 12 : Détection de séries d'homologues ayant une différence en masse de  $m/z$  44,025 ( $C_2H_4O$ ) correspondant aux groupements éthoxylates. Les points gris correspondent aux signaux détectés ; les traits bleus représentent les séries homologues ( $m/z$  44,025).

Tableau 9: Exemples de molécules identifiées par LC-QTOF dans les extraits d'eaux de STEU

Nom	Structure	Formule	Ion	Masse (Da)	Eau brute	Eau traitée	Famille
Polyéthylène glycol					x	x	
Vérapamil		$C_{27}H_{38}N_2O_4$	$[M+H]^+$	454.2832		x	Vasodilatateur
n-désalkyl vérapamil		$C_{17}H_{26}N_2O_2$	$[M+H]^+$	290.1994	x	x	Métabolite
Propafénone		$C_{21}H_{27}NO_3$	$[M+H]^+$	341.1991		x	Antiarythmique
5-hydroxypropafénone		$C_{21}H_{27}NO_4$	$[M+H]^+$	357.1940		x	Métabolite
Venlafaxine		$C_{17}H_{27}NO_2$	$[M+H]^+$	277.2042		x	Antidépresseur
o-desméthylvenlafaxine		$C_{16}H_{25}NO_2$	$[M+H]^+$	263.1885		x	Métabolite
Androstérone sulfate		$C_{19}H_{30}O_5S$	$[M-H]^-$	370.1814	x		Stéroïde
Daidzéine		$C_{15}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	254.057907	x		Phytoestrogène
Bisphénol S		$C_{12}H_{10}O_4S$	$[M-H]^-$	250.0300	x	x	Plastifiant

Les analyses mettent également en évidence la présence de pharmaceutiques, autre que ceux recherchés par les analyses ciblées, mais aussi de leurs métabolites (Tableau 9). Des médicaments comme le vérapamil, le propafénone et leur produit de transformation le n-désalkyl vérapamil et le 5-hydroxypropafénone ainsi que des psychotropes comme la venlafaxine et son métabolite O-desméthylvenlafaxine en sont des exemples. Les extraits analysés contiennent également d'autres classes de molécules. Ainsi, des stéroïdes comme par exemple l'androstérone sulfate, des

phytoœstrogènes telles que la daidzéine et des substituts de certaines molécules comme le bisphénol S ont été identifiés. Ces derniers sont des ligands ER connus et contribuent à l'activité œstrogénique des extraits (Escande *et al.* 2006; Molina-Molina *et al.* 2013; Le Fol *et al.* 2017). Non recherchés lors des analyses ciblées, leur détection par HRMS dans l'extrait d'eau brute et traitée illustre l'intérêt d'employer l'analyse non ciblée pour l'identification de composés à risque pour l'environnement, en complément des analyses ciblées effectuée de façon plus routinière.

### III. Références bibliographiques

Alvarez, D. (1999). Development of an integrative sampling device for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. University of Missouri-Columbia.

Bailly, E., Levi, Y., and Karolak, S. (2013). Calibration and field evaluation of polar organic chemical integrative sampler (POCIS) for monitoring pharmaceuticals in hospital wastewater. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 174, 100–105.

Belles, A. (2012). Développement et applications environnementales des échantillonneurs passifs pour la surveillance des écosystèmes aquatiques. Thèse en Chimie analytique et environnementale - Université de Bordeaux.

Brack, W. (2003). Effect-directed analysis: A promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal Bioanal Chem* 397–407.

Brack, W., Ait-Aïssa, S., Burgess, R.M., Busch, W., Creusot, N., Di Paolo, C., Escher, B.I., Mark Hewitt, L., Hilscherova, K., Hollender, J., et al. (2016). Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview. *Sci. Total Environ.* 544, 1073–1118.

Creusot, N., Budzinski, H., Balaguer, P., Kinani, S., Porcher, J.-M., and Aït-Aïssa, S. (2013). Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: Identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2553–2566.

Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.-M., and Budzinski, H. (2014). Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Env. Sci Technol* 3649–3657.

Cruz, J.M. (2015). Etude de la contamination par les pesticides des milieux eau, air et sols : développement de nouveaux outils et application à l'estuaire de la Gironde. Thèse en Chimie analytique et environnementale à l'Université de Bordeaux.

Dévier, M.-H., Mazellier, P., Aït-Aïssa, S., and Budzinski, H. (2011). New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. *Green Sustain. Chem. Verte Chim. Durable* 14, 766–779.

Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.-P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.-C., Cavallès, V., and Balaguer, P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.* 71, 1459–1469.

Giesy, J.P., Hilscherova, K., Jones, P.D., Kannan, K., and Machala, M. (2002). Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 3–16.

Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Sonavane, M., Porcher, J.-M., Balaguer, P., Cravedi, J.-P., Zalko, D., and Brion, F. (2017). In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 150–156.

Li, H., Helm, P. a, Paterson, G., and Metcalfe, C.D. (2011). The effects of dissolved organic matter and pH on sampling rates for polar organic chemical integrative samplers (POCIS). *Chemosphere* 83, 271–280.

Molina-Molina, J.-M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.-M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P., and Olea, N. (2013). In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 127–136.

Togola, A., and Budzinski, H. (2007). Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *Anal. Chem.* 79, 6734–6741.

Vrana, B., Allan, I.J., Greenwood, R., Mills, G. a., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., and Morrison, G. (2005). Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *TrAC Trends Anal. Chem.* 24, 845–868.

Weiss, J.M., Hamers, T., Thomas, K.V., Van Der Linden, S., Leonards, P.E.G., and Lamoree, M.H. (2009). Masking effect of anti-androgens on androgenic activity in European river sediment unveiled by effect-directed analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1385–1397.

Wund, P. (2013). Développements d'échantillonneurs passifs pour l'étude de la contamination des eaux par les micropolluants organiques. Thèse en Chimie analytique et environnementale à l'Université de Bordeaux.

