

CRITERES QA/QC POUR LE TRAITEMENT SUSPECT D'ANALYSES NON CIBLEES : NOTE DE RECOMMANDATIONS

**Togola A., Lardy-Fontan S., Soulier C., Margoum C., Guillemain C. et
Lestremau F.**

Avril 2022

Document final

En partenariat avec



Avec le soutien de



Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2021, au titre de l'action « FG3.1 Assurance qualité pour les outils innovants » du thème « Nouveaux outils et connaissances pour optimiser les stratégies de surveillance ».

Auteur(s) : Togola A., Lardy-Fontan S., Soulier C., Margoum C., Guillemain C. et Lestremau F.

Anne Togola
BRGM
a.togola@brgm.fr

Sophie Lardy-Fontan
LNE
sophie.lardy-fontan@lne.fr

Coralie Soulier
BRGM
c.soulier@brgm.fr

Christelle Margoum
INRAE
Christelle.margoum@inrae.fr

Céline Guillemain
INRAE
céline.guillemain@inrae.fr

Francois Lestremau
INERIS
f.lestremau@ineris.fr

Vérification du document :

Jean Philippe Ghestem
BRGM
j.p.ghestim@brgm.fr

Les correspondants

OFB : Pierre Francois STAUB pierre-francois.staub@ofb.gouv.fr

BRGM : Jean Philippe Ghestem j.p.ghestim@brgm.fr

- Référence du document : Togola A., Lardy-Fontan S., Soulier C., Margoum C., Guillemain C. et Lestremau F – Critères QA/QC pour le traitement suspect d'analyses non ciblées : note de recommandations – Rapport AQUAREF 2021 –BRGM RP-71775 24 p.

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

CRITERES QA/QC POUR LE TRAITEMENT SUSPECT D'ANALYSES NON CIBLEES : NOTE DE RECOMMANDATIONS
Togola A., Lardy-Fontan S., Soulier C., Margoum C., Guillemain C. et Lestremau F

RESUME

Suite à un exercice large échelle de mise en œuvre du screening non ciblé, ce rapport a permis de recenser les différents éléments permettant de qualifier au mieux les résultats obtenus par screening non ciblé, pour un retraitement en mode suspect. Il montre la complexité de transposer les pratiques habituelles des analyses ciblées. Un certain nombre d'éléments sont proposés (logigramme, recommandations en termes de contrôles qualité analytiques et d'informations à restituer en association avec les résultats) afin de faciliter l'harmonisation et la compréhension des résultats fournis. D'autres propositions restent à éprouver et à consolider avec les laboratoires mettant en œuvre ces techniques, afin d'en vérifier la pertinence et la faisabilité.

Mots clés (thématique et géographique) :

Screening non ciblé, analyse, traitements des données, recommandations

France

QA/QC CRITERIA FOR THE SUSPECT SCREENING IN NON TARGET ANALYSIS

Togola A., Lardy-Fontan S., Soulier C., Margoum C., Guillemain C. et Lestremau F

ABSTRACT

Following a large-scale exercise in the implementation of non-targeted screening, this report identifies the various criteria that make it possible to better qualify the results obtained by non-targeted screening, for reprocessing in suspect mode. It shows the complexity of transposing the usual practices of targeted analyses. A number of elements are proposed (flowchart, recommendations in terms of analytical quality controls and information to be provided in association with the results) in order to facilitate harmonisation and understanding of the results provided. Other proposals remain to be tested and consolidated with the laboratories implementing these techniques, in order to verify their relevance and feasibility.

Key words (thematic and geographical area):

Non target screening, analysis, data processing, recommendations, France



RÉPUBLIQUE
FRANÇAISE

Liberté
Égalité
Fraternité



Géosciences pour une Terre durable

brgm

Document à accès immédiat

Critères QA/QC pour le traitement suspect d'analyses non ciblées : note de recommandations

Rapport Final

BRGM/RP-71775-FR

Version 0 du 15 avril 2022

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

Togola A., Lardy-Fontan S., Soulier C., Margoum C., Guillemain C. et Lestremau F.

Vérificateur :

Nom : Jean Philippe Ghestem

Fonction : Expert scientifique

Date : 12/04/2022

Signature :

Approbateur :

Nom : Laurence Amalric

Fonction : Responsable d'unité

Date : 13/06/2022

Signature :

Le système de management de la qualité et de l'environnement du BRGM est certifié selon les normes ISO 9001 et ISO 14001.

Contact : qualite@brgm.fr

Avertissement

Ce rapport est adressé en communication exclusive au demandeur, au nombre d'exemplaires prévu.

Le demandeur assure lui-même la diffusion des exemplaires de ce tirage initial.

La communicabilité et la réutilisation de ce rapport sont régies selon la réglementation en vigueur et/ou les termes de la convention.

Le BRGM ne saurait être tenu comme responsable de la divulgation du contenu de ce rapport à un tiers qui ne soit pas de son fait et des éventuelles conséquences pouvant en résulter.

Votre avis nous intéresse

Dans le cadre de notre démarche qualité et de l'amélioration continue de nos pratiques, nous souhaitons mesurer l'efficacité de réalisation de nos travaux.

Aussi, nous vous remercions de bien vouloir nous donner votre avis sur le présent rapport en complétant le formulaire accessible par cette adresse <https://forms.office.com/r/yMgFcU6Ctg> ou par ce code :



Mots clés :

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Togola A., Lardy-Fontan S., Soulier C., Margoum C., Guillemain C. et Lestremau F. (2022) – Critères QA/QC pour le traitement suspect d'analyses non ciblées : note de recommandations. Rapport Final V0. BRGM/RP-71775-FR, 24 p.

© BRGM, 2022, ce document ne peut être reproduit en totalité ou en partie sans l'autorisation expresse du BRGM.
IM003-MT008-P2-20/01/2022

Sommaire

1. Contexte et objectifs	11
2. Principaux critères d'identification et de contrôles analytiques.....	13
2.1. Critères d'identification	13
2.2. Critères instrumentaux	14
2.3. Contrôles qualité	14
3. Recommandations sur les critères d'identification traitement suspect.....	15
3.1. Identification des composés	15
3.1.1. Critères	15
3.1.2. Restitution des résultats d'identification.....	16
3.2. Qualification de la mesure	17
3.2.1. QA/QC, étalons de contrôle.....	17
3.2.2. Gestion des blancs.....	19
3.2.3. Liens entre les paramètres.....	19
3.3. Notions de faux positifs/faux négatifs	20
3.3.1. Faux positif.....	20
3.3.2. Faux négatif	20
4. Echange des données/résultats.....	21
5. Conclusion et Perspectives	23

Liste des figures

Figure 1 : Logigramme utilisé pour la restitution des résultats LC-HRMS lors de l'exercice DEMO-NTS. BDD, Base de données ; m/z, masse exacte ; Tr, Temps de rétention ; HR, Haute résolution, BR, Basse résolution.....	17
--	----

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des traceurs mis en œuvre dans l'exercice DEMO-NTS.....	18
---	----

1. Contexte et objectifs

Cette note fait suite aux travaux menés d'une part dans les programmes Aquaref 2016-2018, portant sur la description des outils et méthodologies¹, les initiatives européennes existantes², le positionnement d'Aquaref concernant l'implémentation de l'analyse non-ciblée (NTS) dans le champ de la surveillance³, et d'autre part dans le réseau national de surveillance prospective (RSP) 2018, portant sur l'applicabilité de l'analyse non ciblée pour la surveillance prospective sur une campagne à large échelle⁴. Cette dernière étude, appelée DEMO-NTS, s'appuyant sur la logistique de l'exercice de démonstration d'échantillonneurs intégratifs passifs⁵, avait pour objectif une meilleure compréhension des effets méthodologiques lors de l'acquisition de données de screening non ciblé. Pour cela, les échantillons ont été analysés simultanément par différents laboratoires, et plusieurs types de contrôle qualité ont été mis en œuvre. Cette étude a permis de mettre en évidence certains aspects méthodologiques nécessaires pour garantir la fiabilité des données NTS et l'interprétation des résultats et ainsi harmoniser la restitution des résultats et l'expression du niveau de confiance associée à ces résultats.

Parmi les principaux points mis en évidence dans ces travaux, on peut citer :

- Les différences et complémentarités entre les différentes possibilités de préparation des échantillons.
- La pertinence d'utiliser en parallèle des bases de données (BDD) propres au laboratoire (dites internes) et des BDD externes génériques mises à disposition par d'autres utilisateurs, que ce soit les constructeurs ou les réseaux de chercheurs comme le consortium NORMAN. Ces dernières, malgré une hétérogénéité dans leur niveau de qualification et l'absence de certains critères d'identification, permettent d'obtenir des informations utiles et complémentaires en première approche, de manière plus exhaustive que les BDD internes qui sont plus restreintes en termes de nombre de molécules renseignées.
- Les informations (analytiques, traitements de la donnée) doivent faire partie des informations restituées pour une bonne compréhension, par l'utilisateur final, des résultats et dans un souci de traçabilité pour des retraitements ultérieurs.

Des aspects plus méthodologiques ont été mis en évidence. Des différences de performance (par ex sensibilité) des appareils, dans les conditions de préparation des extraits pour analyse, dans les logiciels de traitement des données analytiques sont autant d'éléments susceptibles d'impacter le rendu des résultats. Si ces mêmes facteurs influencent les analyses conventionnelles (analyses ciblées quantitatives), il est plus difficile d'en évaluer l'impact dans le cas de l'analyse non ciblée puisqu'il n'existe actuellement pas de critères d'acceptation ou

¹ C. Guillemain, F. Lestremou, C. Soulier, C. Coureau, A. Togola, C. Margoum – Comparaison et impact de différentes méthodes d'extraction d'eau sur l'analyse non ciblée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution – Rapport AQUAREF 2019 – 24 p.

² A. Togola, F. Lestremou, C. Margoum, V. Dulio, C. Miège, C. Soulier – Synthèse des actions européennes et nationales sur les techniques d'analyse chimique non ciblée – Rapport AQUAREF 2018 – 36 p

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

⁴ A. Togola, C. Guillemain, F. Lestremou, C. Coureau, C. Margoum, C. Soulier - L'applicabilité du screening non-ciblé pour la surveillance prospective : action DEMO-NTS. 2020.Réseau de Surveillance prospective-AQUAREF ; Rapport BRGM/RP-70108-FR.

⁵ B. Mathon, et al Surveillance prospective – évaluation de la pertinence des échantillonneurs intégratifs passifs (EIP) pour la surveillance réglementaire des milieux aquatiques - Rapport AQUAREF 2022 – 175 p + 20 annexes (149 p).

d'évaluation associés à ces différents paramètres (comme la justesse, la limite de quantification en analyse ciblée).

L'objectif du présent rapport est donc de lister les critères de performance/d'acceptation, selon les facteurs les plus sensibles et de proposer des moyens de les évaluer.

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

Le but est ainsi de déterminer quels sont les moyens d'évaluer ces critères de contrôle qualité applicables à une analyse non ciblée.

Différents contrôles qualité ont été mis en œuvre dans l'étude DEMO-NTS. Le travail complémentaire proposé ici, a pour objectif, pour chacun de ces critères, de proposer des valeurs de référence et des recommandations en termes de décision sur les résultats fournis (niveau de confiance sur les identifications, qualité des identifications...).

Cela permettra de pondérer l'effet « opérateur » ou matériel/équipement sur la restitution des résultats afin d'harmoniser et de faciliter l'interprétation et la compréhension par les utilisateurs finaux.

Ces propositions sont à considérer :

- Pour une mise en œuvre hors du champ des projets de recherche. Ce choix délibéré de se positionner dans un domaine plus opérationnel peut mener à des compromis liés aux impératifs pragmatiques du déploiement large échelle.
- Pour les techniques d'analyses non ciblées par chromatographie liquide
- Uniquement pour le traitement suspect des données NTS, qui semble actuellement le seul pouvant sortir du champ des laboratoires de recherche.

D'autres initiatives similaires se développent pour tenter d'encadrer au mieux ce type d'approches, principalement dans le but de garantir une harmonisation des résultats et leur comparabilité. Dans le cadre du réseau NORMAN, les travaux pilotés par l'équipe de T Schulze (UFZ) tendent à établir quelques règles consensuelles. Les travaux, en cours depuis début 2020 devraient être finalisés courant 2022 sous forme d'un guide méthodologique.

Aucune action spécifique de normalisation n'est initiée au niveau national (AFNOR), mais plutôt l'intégration d'un GT qui devrait être initié au niveau du CEN TC 230. Au niveau des comités de normalisation internationaux (ISO TC 147/SC2), un projet de norme est en discussion, basé sur les travaux des équipes allemandes.

Les réflexions apportées dans le présent rapport permettront aux représentants français à ces groupes de travail de contribuer efficacement à ces initiatives.

2. Principaux critères d'identification et de contrôles analytiques

Les analyses non ciblées permettent d'obtenir une liste « d'entités » pour chaque échantillon. Un signal est l'information rapport masse sur charge (m/z) / temps de rétention (tr) associé à une intensité. Une d'entité est définie par l'ensemble des signaux (ion monoisotopique, isotopes, adduits, fragments) qui caractérise l'identité d'une molécule⁶.

2.1. CRITERES D'IDENTIFICATION

Dans le cas du traitement en mode suspect d'une analyse non ciblée, une substance est dite « identifiée » **à partir d'une base de données prédéfinie**, quand les informations associées à la substance dans cette base de données sont identiques (avec une certaine tolérance) à celles d'une des entités de l'échantillon. Les comparaisons sont effectuées à l'aide de logiciels sur la base des paramètres suivants qui doivent être acquis avec la plus grande précision possible :

- Le rapport masse sur charge (m/z) de l'ion moléculaire propre à chaque molécule en fonction de sa formule chimique.
- Le temps de rétention (tr), correspond au **temps** nécessaire à un composé pour être élué de la colonne et détecté. Il dépend de la méthode chromatographique utilisée. Il peut être acquis (par l'injection du standard) ou prédit (par l'utilisation de modèles⁷).
- Le profil isotopique notamment pour les molécules comportant des halogènes (chlore et brome) qui produisent des massifs isotopiques caractéristiques.
- Le profil de fragmentation de chaque molécule.
- Potentiellement, pour certains équipements de technologie récente, un nouveau paramètre, la section efficace de collision (CCS), qui permet d'améliorer l'identification, en discriminant des isomères⁸.

Lors de l'étape d'identification des composés, les paramètres de chaque entité sont comparés à ceux des molécules présentes dans les bases de données. Différentes bases de données (BDD) peuvent être utilisées :

- Des BDD « internes » dont les paramètres d'identification ont été obtenus par l'injection d'étalons analytiques selon la méthode analytique propre au laboratoire. Ces BDD contiennent tous les paramètres d'identification.
- Des BDD « externes » dont les paramètres d'identification ont été obtenus par l'injection d'étalons analytiques par d'autres laboratoires, potentiellement avec une méthode analytique différente et/ou un autre instrument. Ces BDD ne sont pas forcément toujours complètes concernant les paramètres d'identification ou bien certains paramètres présents ne peuvent être réutilisés directement compte tenu des différences de méthodes d'analyse (exemple notamment du temps de rétention). Ces BDD peuvent provenir de données en ligne (NORMAN, MassBank, etc.), de données bibliographiques, fournies par les constructeurs, etc.

⁶ Soulier et al, 2021. La spectrométrie de masse haute résolution pour la recherche de micropolluants organiques dans l'environnement. TSM 6. pp 43-54.

⁷ F. Lestremou, E Bride, C. Margoum– Prédiction des temps de rétention chromatographique dans le cadre de l'analyse non-ciblée – Rapport AQUAREF 2018 – 69 p.

⁸ [Introduction à la spectrométrie de masse, Gabelica. RSC 2022](#)

L'identification d'une substance étant totalement liée aux bases de données utilisées, il est indispensable d'associer les références de ces bases avec les résultats fournis. Par ailleurs, ces bases peuvent influencer sur les niveaux de confiance attribués aux résultats.

Quand l'association de l'entité ne peut se faire de manière certaine avec une seule substance de la BDD (manques d'informations dans la BDD, doute sur l'identification...), on parle alors de candidats.

2.2. CRITERES INSTRUMENTAUX

En spectrométrie de masse haute résolution, le critère prépondérant est l'exactitude de la masse, qui aura un effet sur la capacité d'identification mais aussi le temps de rétention. Il est donc nécessaire d'assurer de façon régulière que les critères de masse et de temps de rétention sont stables et conformes aux réglages de départ de l'appareil. Pour cela différentes alternatives peuvent être proposées par les fournisseurs (calibration en masse, masses d'étalonnage en continu, etc.).

Des solutions de référence, contenant un mélange de substances, peuvent également être injectées régulièrement afin de vérifier l'absence de dérive du système (exactitude des masses, T_r) au cours d'une même séquence analytique et entre différentes séquences, par exemple par la réalisation de cartes de contrôle.

2.3. CONTROLES QUALITE

Tout au long de la méthodologie analytique, il est important d'introduire des contrôles qualité dont les principaux sont listés ci-dessous.

Des solutions d'étalons marqués doivent être injectées et ajoutées dans les échantillons :

- Des étalons traceurs d'extraction, permettant d'obtenir des rendements d'extraction sur la méthodologie de préparation des échantillons, utilisés pour vérifier que l'extraction s'est bien déroulée, de façon identique entre les échantillons et au cours des différentes séries d'analyses.
- Des étalons traceurs d'injection, permettant d'évaluer la bonne réalisation de l'injection et les effets matrices éventuels

Ne connaissant pas a priori les substances qui pourront être identifiées dans les échantillons une grande attention doit être portée à l'absence de contamination et donc à la réalisation de blancs aux différents niveaux du processus de mesure :

- Blanc terrain, tient compte de toute la méthodologie analytique de l'échantillonnage à l'analyse, permet de mettre en évidence une potentielle contamination au cours de l'échantillonnage, du transport, du stockage de l'échantillon avant extraction et lors du processus d'analyse (extraction et injection)
- Blanc extraction, permet de mettre en évidence une potentielle contamination des échantillons au cours de l'extraction et du stockage de l'extrait avant analyse et lors de l'injection
- Blanc injection, permet de mettre en évidence une contamination potentielle par le système analytique, solvants, effet mémoire, etc.

3. Recommandations sur les critères d'identification traitement suspect

3.1. IDENTIFICATION DES COMPOSES

3.1.1. Critères

Lors de la comparaison des paramètres d'identification des composés entre les BDD et les échantillons, il est nécessaire de fixer une tolérance accordée à chacun d'entre eux. Quelques préconisations sont listées ci-dessous :

Tolérance sur la précision en masse :

L'expertise de l'opérateur reste prépondérante pour le choix de cette tolérance : une tolérance trop large peut donner lieu à l'identification de « faux positifs » (attribution d'une identification à tort), tandis qu'un critère trop restrictif conduira à des « faux négatifs » (non-identification d'une substance présente dans l'échantillon).

Considérant le retour d'expérience sur différentes études, une tolérance maximale de 10 ppm sur le rapport masse sur charge (m/z) est préconisée. Dans le cadre de travaux européens en cours⁹, une tolérance maximale de 5 ppm a été recommandée, mais ce choix paraît difficile à mettre en œuvre pour l'ensemble des technologies de spectromètre de masse à haute résolution (SMHR) (notamment pour les technologies de type Temps de vol) sans que le gain d'information (diminution du nombre de faux positif) ne semble significativement accru.

Critères sur la fragmentation :

La fragmentation de chaque molécule donne accès à des fragments caractéristiques. Plus la concentration d'une substance sera faible moins certains de ces fragments seront visibles, complexifiant son identification.

- Au minimum un fragment doit être confirmé pour identifier un composé
- Une tolérance maximale de 10 ppm doit être appliquée pour la validation de la masse de chaque fragment détecté.

Généralement, une substance est caractérisée par différents fragments. Le ratio entre l'intensité de l'ion moléculaire et celle du fragment (notamment le majoritaire) est aussi un élément de confirmation qui doit être pris en compte.

Tolérance sur le temps de rétention (Tr) :

La tolérance accordée au Tr dépend du type de BDD utilisée. En effet dans le cas de l'utilisation d'une BDD « interne », les Tr de référence sont maîtrisés et la comparaison avec les Tr expérimentaux (analyses effectuées dans les mêmes conditions chromatographiques que celles utilisées pour l'établissement de la base) est réalisable avec une tolérance faible. Dans le cadre de l'exercice DEMO-NTS, une tolérance de $\pm 0,2$ min a été appliquée avec succès.

⁹ W. Schulz, T. Lucke et al. – Non-target screening in water analysis – Guideline regarding the application of LC-ESI-HRMS for screening. 2019. Download at <http://www.wasserchemische-gesellschaft.de>

Dans le cas de l'utilisation de BDD « externes », le Tr n'est qu'indicatif (car les conditions chromatographiques mises en œuvre par les auteurs sont rarement semblables à celles du laboratoire utilisateur) et la tolérance doit être augmentée.

Dans le cas de l'utilisation d'un modèle de prédiction pour documenter les Tr dans une BDD externe, une tolérance de 2 minutes est applicable et permet d'éliminer un grand nombre de candidats erronés. Ces modèles sont en constante évolution pour améliorer la justesse des Tr modélisés.

Autres critères d'identification utilisables :

Le profil isotopique est un paramètre qui améliore fortement l'identification mais les concentrations dans les échantillons environnementaux sont souvent faibles, ne permettant pas toujours d'avoir accès au massif isotopique complet. Ce paramètre est utilisé principalement pour les substances halogénées, au profil isotopique très caractéristique. Il est utilisé de manière indicative sans critère particulier.

Les ratios d'intensité entre fragments doivent être relativement constants. Cela peut être un point indicatif d'identification.

Pour certaines substances analysables par plusieurs méthodes, des acquisitions obtenues avec les deux modes d'ionisation (ESI+/ESI-), ou par une autre méthode chromatographique (LC / GC) permettent de renforcer l'identification ou d'éliminer des candidats.

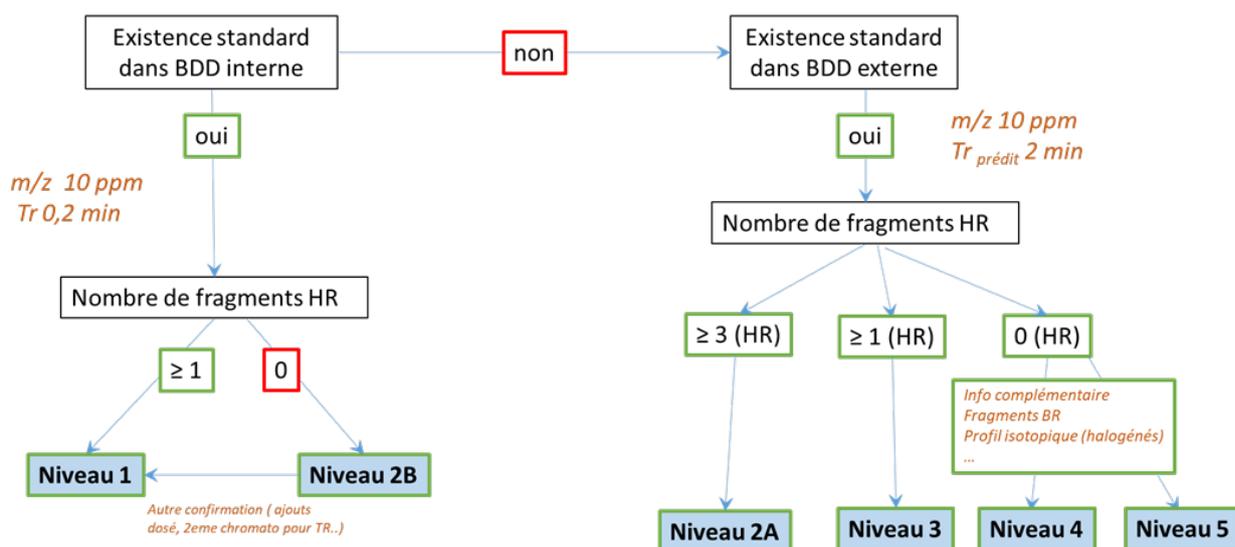
3.1.2. Restitution des résultats d'identification

Comme décrit précédemment, pour identifier une substance, la comparaison des paramètres d'identification d'un échantillon et ceux présents dans la BDD choisie est primordiale, en prenant soin de respecter des tolérances fixées pour chacun d'entre eux. En fonction de la sensibilité de l'instrument/méthode, de la concentration de la substance et des BDD utilisées, tous les paramètres d'identification ne seront pas systématiquement visibles et donc comparables à la BDD.

La confiance liée à l'identification d'une substance est ainsi basée sur le nombre de paramètres d'identification visibles et vérifiés. Afin d'harmoniser le rendu de résultat avec un indice de confiance lié à l'identification et en s'appuyant sur le travail mené par Schymanski et al. (2014)¹⁰, un logigramme a été proposé au cours de l'exercice DEMO-NTS (Figure 1).

Cinq niveaux de confiance sont définis (et deux sous-niveaux pour le niveau 2), du niveau 5, considéré comme peu fiable (faible nombre de critères d'identification confirmés entre entité et référence), au niveau 1 considéré comme le plus fiable (référence très fiable et plusieurs critères d'identification confirmés).

¹⁰ E. Schymanski, J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H. Singer and J. Hollender (2014) – Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environmental Science & Technology*, 48, 2097-2098.



HR Haute résolution ///BR basse Résolution

Figure 1 : Logigramme utilisé pour déterminer le niveau de confiance associé aux résultats LC-HRMS lors de l'exercice DEMO-NTS. BDD, Base de données ; m/z, masse exacte ; Tr, Temps de rétention ; HR, Haute résolution, BR, Basse résolution

Ce schéma intègre à la fois la source des données de comparaison (BDD interne ou externe) et certains critères d'identification des substances.

Pour confirmer l'identité d'une substance de manière non équivoque (passage des niveaux 2A/3/4/5 au 2B ou 1), l'injection de l'étalon selon la même méthode analytique que les échantillons reste nécessaire.

Ce logigramme propose une approche systématique. L'expertise technique du laboratoire en charge du traitement des données, l'utilisation d'autres méthodes de confirmation, la connaissance des contextes d'acquisition des échantillons (suivi temporel par exemple) sont autant de critères qui peuvent permettre d'améliorer le niveau de confiance dans les résultats.

3.2. QUALIFICATION DE LA MESURE

3.2.1. QA/QC, étalons de contrôle

Les conditions de préparation et d'analyses des échantillons vont influencer fortement les résultats. L'utilisation des étalons analytiques ont pour but d'évaluer ces impacts.

Les étalons marqués utilisés en tant que traceurs d'injection et d'extraction doivent couvrir la gamme d'analyse chromatographique et être représentatif des conditions d'extraction...). Les concentrations de ces étalons dans les échantillons doivent tenir compte des typologies des matrices, de la sensibilité de l'appareil analytique...

Dans le cas de l'exercice DEMO-NTS, une sélection de traceurs d'injection et d'extraction a été mise en œuvre. L'objectif était de choisir des substances marquées couvrant le domaine chromatographique de la méthode, analysables dans un des deux modes d'ionisation (ESI+/ESI-) ou dans les 2, voire analysables avec les deux types de chromatographies déployés (GC/LC).

Des traceurs particulièrement sensibles à certains paramètres (aux effets matrices par exemple) peuvent être recherchés.

La liste des traceurs testés dans le cadre de l'exercice DEMO-NTS est présentée ci-dessous à titre indicatif.

Tableau 1 : Liste des traceurs mis en œuvre dans l'exercice DEMO-NTS

Molécules	Traceurs d'extraction - mode d'ionisation	Traceurs injection - mode d'ionisation	Tr (min)	Log Kow
Acide fénofibrique D6	+		10,95	4
Aténolol D7	+		2,59	0,4
Acétochlore ESA D5	-		12,63	0,79
Alachlore OXA D3	-		12,4	2,3
Atrazine D5	+		8,1	2,6
Carbamazépine 13C6	+		7,82	2,3
Clarithromycine 13C-D3	+		8,58	3,16
Beflubutamide D7	+		12,15	4,96
Benzotriazole D4	-		6,68	1,4
DEA D6	+		5,26	1,5
Furosémide D5	-		10,17	2
Diclofénac 13C6		+/-	11,27 / 15,27	4,3
Diuron D6		+/-	8,72 / 12,47	2,7
Diazinon D10	+		12,82	3,69
MCPA 13C6	-		12,73	-0,8
Méthylparabène 13C6	-		9,06	2
Gemfibrozil D6		-	16,46	3,4
DMST D3	+		8,46	1,2
Erythromycine 13C-D3	+		7,38	2,5
Mecoprop D3		-	13,82	-0,2
Metsulfuron méthyl D3	+/-		7,64 / 10,74	-2
Imidaclopride D4	+		5,31	0,3
Metoprolol D7	+		4,75	0,6
Sucralose D6	-		6,87	-1,5
NBBS D9	+		9,15	2,1
Norfloxacine D5	+		3,94	-2
Simazine D10		+	6,72	2,2
Oxazépam D5	+		8,51	2,2
Sotalol D7	+		2,63	0,24
Sulfadiméthoxine D6		+	6,95	0,6

Néanmoins, une réflexion doit être menée à l'échelle nationale. En effet, la mise en place d'une liste minimale commune de traceurs permettrait une meilleure inter-comparaison des jeux de données acquis par différents laboratoires. Un des enjeux du screening non ciblé étant la réutilisation des données acquises, cette liste minimale commune semble être un prérequis.

Parmi les considérations analytiques à fort impact sur les résultats, un point d'attention particulier concerne la prise en compte des effets matrices. Via par exemple le phénomène d'extinction de signal, ces effets vont directement impacter la capacité de

détection/identification d'un composé dans l'échantillon : cela peut conduire à de faux-négatifs car des substances présentes dans l'échantillon ne seront pas identifiables du fait de la matrice.

Du fait de l'approche qualitative du screening non-ciblé, il est très difficile de caractériser explicitement l'impact des effets matrices. Le traitement de données n'étant pas réalisé sur une liste de composés ciblés, l'effet matrice ne peut être évalué que via l'utilisation de traceurs. La transposition de l'effet constaté sur une molécule à une autre reste entachée d'une très forte incertitude.

Les principales préconisations peuvent alors être de caractériser les effets matrices via les traceurs d'injection et de viser à les limiter au maximum en diluant les extraits. L'établissement d'un seuil maximal d'extinction/intensification de signal à ne pas dépasser pour pouvoir conclure sur la présence d'un composé semble complexe à fixer. Il semble en tout cas intéressant de conserver ou transférer lors de la restitution des résultats l'information quant au « niveau » des effets matrices caractérisés dans l'échantillon sur les étalons internes.

Aucun critère n'est proposé dans ce travail, des échanges avec les laboratoires concernant leurs pratiques s'avèrent nécessaires pour une définition pertinente.

3.2.2. Gestion des blancs

La présence de composés ubiquistes liés à l'imprégnation de l'ambiance du laboratoire est inéluctable. Les blancs analytiques, associés à chaque séquence analytique et sur lesquels le protocole de préparation d'échantillon a été intégralement appliqué, sont essentiels pour distinguer ces contaminations ambiantes des substances réellement inhérentes à l'échantillon.

La valeur seuil à choisir (en-dessous de laquelle la présence d'un composé n'est pas rapportée) fait l'objet d'un consensus : classiquement un rapport d'intensité minimal de 10 entre blanc et échantillon est préconisé pour confirmer la présence d'une substance dans l'échantillon étudié. Cette approche conduit souvent à l'exclusion systématique de certaines familles de composés ubiquistes.

3.2.3. Liens entre effets matrice et blancs

Les effets matrices ont un effet « direct » sur la capacité de détection d'un composé dans l'échantillon et de manière indirecte lors de la prise en compte des blancs. Les effets matrices sur des échantillons d'eau propre étant généralement beaucoup plus faibles que dans un échantillon complexe, l'intensité du signal d'un composé sera plus élevée dans le blanc que dans l'échantillon, à concentration équivalente. De ce fait, lors de l'étape de prise en compte du blanc (évaluation du ratio entre le blanc et l'échantillon), des composés pourraient être mis de côté à tort dans le cas d'un échantillon complexe, alors qu'ils ne le seraient pas dans le cas d'un échantillon d'eau propre, à concentration équivalente.

Une piste pourrait être de pondérer l'intensité mesurée dans le blanc du taux d'extinction de signal associé à l'échantillon. Mais cette approche est très complexe à mettre en œuvre de manière reproductible et systématique. Ce verrou sera lui aussi présenté aux laboratoires pratiquant ces analyses pour échanger sur leurs pratiques.

Cette complexité souligne encore une fois la nécessité du regard critique des experts tout au long des étapes de traitement des données.

La qualification de la donnée reste un point complexe dans les analyses par screening non ciblé. En complément, le guide EURACHEM¹¹ donne des informations supplémentaires sur la gestion de l'incertitude dans le cadre des analyses qualitatives, notamment concernant les définitions des faux positifs/faux négatifs comme discuté ci-dessous.

3.3. Notions de faux positifs/faux négatifs

3.3.1. Faux positif

Un faux positif est une molécule identifiée alors qu'elle n'est pas présente dans l'échantillon. La source d'erreur peut être liée à l'identification, du fait notamment de :

- Une dérive dans les critères d'identification,
- Inadéquation des tolérances acceptées
- Mauvaise information dans la BDD
- Mauvaise prise en compte des blancs

Le risque vient principalement lors de l'utilisation de BDD externes dans lesquelles les critères sont moins robustes (comme discuté sur le TR).

Un faux positif peut aussi provenir d'une contamination de l'échantillon, soit lors du prélèvement, soit lors des étapes de préparation et d'analyse. La prise en compte des résultats des blancs permet de limiter cette source d'erreur, avec toutes les limites que l'approche qualitative induit. De plus, l'acquisition systématique d'un blanc (terrain par exemple) associé à chaque échantillon est assez exceptionnelle.

Encore une fois, le fait de ne pas travailler sur une liste finie de substances mais de manière générique, sans *a priori* sur les molécules à rechercher (et donc sans levier identifiable pour limiter les pollutions parasites) complexifie le travail de maîtrise des blancs. En parallèle des efforts pour limiter les pollutions ubiquistes, la multiplication des blancs et leur traitement permet de sécuriser les identifications. L'utilisateur de NTS doit capitaliser sur les analyses de blancs qui permettent de tester les étapes dont il est responsable : flaconnage/extraction/analyse et de façon globale environnement de travail.

3.3.2. Faux négatif

Par défaut, un résultat de screening suspect permet de qualifier essentiellement la présence. Un faux négatif est un composé présent dans l'échantillon, **recherché** et non identifié. En effet dans le cas de l'approche suspecte, il y a confrontation à une BDD de référence, qui doit être renseignée pour la substance d'intérêt. En général, les rapports d'analyses ne mentionnent que les molécules identifiées.

Les sources d'erreur concernant les faux négatifs peuvent être multiples :

- Les méthodes d'analyses ou d'extraction peuvent ne pas être adéquates.

Le seul moyen de confirmer l'efficacité de la méthode serait de l'appliquer systématiquement à la substance d'intérêt ce qui s'avère très fastidieux. La comparaison à des molécules de

¹¹ Bettencourt da Silva and S.L.R Elison (eds) Eurachem/ CITAC guide : Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis. First edition. Eurachem 2021 ISBN 978-0-948926-39-6. [Lien](#)

structure proche peut permettre d'évaluer cette applicabilité, mais reste moins fiable que l'application de la méthode à la substance d'intérêt.

Lorsque l'information sur des molécules non identifiées est demandée/transmise, il est important d'indiquer la liste des molécules recherchées dans l'échantillon, avec l'information sur la vérification préalable ou non de la capacité des méthodes à les prendre en compte.

- Les méthodes d'analyses ne sont pas assez sensibles

Cette notion de sensibilité induit l'évaluation d'une limite d'identification, correspondant à « la concentration minimale présente dans l'échantillon permettant l'identification d'une substance à un niveau de confiance donné ». Ce critère « limite d'identification » de la méthode est très complexe à évaluer, puisque cela nécessiterait encore une fois une évaluation des performances de la méthode pour la molécule donnée ainsi que des rendements d'extraction et des potentiels effets matrice spécifiques de l'échantillon. Une estimation pourrait néanmoins être effectuée *a posteriori*, en s'appuyant sur les QA/QC (rendement/effet matrice) pour des molécules d'enjeu spécifique par exemple.

- Erreur dans la BDD
 - Mauvaise information dans la BDD sur les critères d'identification des substances
 - Evolution dans le temps de la BDD (ajout/suppression de molécules) entre différents retraitements (cas des suivis par exemple)

Comme décrits dans le chapitre 3.2, les effets matrice (par l'extinction de signal) peuvent conduire à de faux négatifs. La mauvaise prise en compte des blancs peut conduire, selon les cas à de faux positifs ou de faux négatifs.

4. Echange des données/résultats

Lors de la transmission des résultats, un certain nombre d'informations présentées préalablement dans le rapport doivent être mises à disposition, voire bancarisées, avec les résultats, notamment dans l'éventualité d'une réutilisation (potentiellement par des tiers) des données acquises.

Tout résultat concernant l'identification d'une substance (ou candidat) doit être accompagné de l'indice accordé à l'identification comme indiqué dans le logigramme de la Figure 1, ce qui permet de préciser la confiance dans le résultat.

Une attention particulière doit être portée sur les substances recherchées mais non identifiées dans les échantillons ; on rappelle ici que non identifiées ne signifie pas forcément absentes. En effet, elles peuvent être présentes mais en-dessous des seuils d'identification ou non retenue par la méthode d'extraction ou d'analyse. Cette alerte doit être portée à connaissance car elle peut orienter l'interprétation des résultats.

Les BDD sont par nature non exhaustives et en constante évolution : il est important de préciser l'origine, la source et les dates de mises à jour des BDD. Cet élément sera essentiel, notamment dans des suivis sur le long terme, pour orienter l'interprétation des résultats.

De manière générale, l'information sur les modalités d'acquisition de l'information (extraction/analyse/BDD) doit être disponible.

Si l'on essaie de synthétiser la liste des informations pertinentes dans un rapport d'essai dans le contexte de l'analyse non ciblée, les éléments ci-dessous semblent les plus utiles.

1. Base(s) de données utilisée(s)
 - a. Internes/externes
 - b. Principales caractéristiques (origine, familles de substances, nombre de substances, ...)
 - c. Référence/version/date.

2. Méthode d'analyse
 - a. Instrument (marque/type)
 - b. Description succincte de la méthode d'extraction/séparation/analyse
 - c. Traceurs d'extraction
 - d. Traceurs d'injection
 - e. Blancs
 - i. Type de blancs mis en œuvre et utilisés pour les résultats
 - ii. Critères de prise en compte des blancs (niveau vs échantillons ?)

3. Par substance, le niveau de confiance suivant le logigramme

4. Information au destinataire des résultats sur les notions
 - a. D'identification : respects des critères d'identification mentionnés.
 - b. Donc présence probable à très probable de la substance dans l'échantillon
 - c. Non identification : non-respect de des critères d'identification ce qui ne veut pas dire que la substance est absente. En aucun cas le rapport ne fera référence à la notion d'absence de la substance, en absence d'information concernant la sensibilité/performance de la méthode sur la substance (à mentionner).

5. Conclusion et Perspectives

Cet exercice a permis de recenser les différents éléments permettant de qualifier au mieux les résultats obtenus par screening non ciblé, pour un retraitement en mode suspect. Il montre la complexité de transposer les pratiques habituelles des analyses ciblées par le fait que les molécules d'intérêt sont, de fait, inconnues lors de l'acquisition de la donnée. Un certain nombre d'éléments restent à éprouver et à consolider avec les laboratoires mettant en œuvre ces techniques pour un objectif de « semi-routine », afin d'en vérifier la pertinence et la faisabilité.

Différentes initiatives sont en cours, notamment les travaux menés dans le cadre du consortium NORMAN. Les éléments proposés dans ce rapport devront être confrontés à ceux proposés dans le travail européen, particulièrement sur les spécificités inhérentes aux différentes technologies de HRMS déployées.

D'autres évolutions peuvent être proposées. Le logigramme concernant les niveaux de confiance associés aux résultats est une première étape, mais pourrait évoluer en utilisant un système de pondération des différents critères, avec un nombre de points à atteindre pour revendiquer un niveau de confiance. Cela permettrait d'intégrer les autres critères d'identification utilisables.

Enfin, de premières recommandations en termes de contrôle qualité et d'informations à fournir dans un rapport d'analyse de screening non ciblé /retraitement suspect ont été formulées et feront l'objet de discussions avec les laboratoires opérateurs, pour vérifier leur pertinence et leur applicabilité dans le cadre de la surveillance opérationnelle des masses d'eau.

Au niveau de l'AFNOR, des échanges sont en cours pour discuter sur les exigences minimales requises pour un laboratoire souhaitant effectuer un screening non ciblé qualitatif.

Au niveau des comités de normalisation internationaux (ISO), un projet de norme est en discussion, basé sur les travaux d'équipes allemandes.

Les réflexions apportées dans le présent rapport permettront d'enrichir les contributions des équipes françaises présentes dans ces instances.



Centre scientifique et technique
3, avenue Claude-Guillemin
BP 36009
45060 – Orléans Cedex 2 – France
Tél. : 02 38 64 34 34

www.brgm.fr