

Synthèse bibliographique sur l'analyse non ciblée d'échantillons environnementaux sédimentaires et biologiques

**S. Merel, C. Rigal, T. Ducrocq, C. Miège (INRAE)
R. Singh, Y. Aminot (Ifremer)**

Septembre 2021

Document final

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 2020-2021, au titre de l'action FG1.1a. « Analyse non ciblée (NTS2) : Inventorier et fiabiliser les méthodes d'acquisition et de traitement des données pour la caractérisation chimique non-ciblée de matrices intégratrices (EIP, sédiment, biote) des milieux aquatiques ». Cette action fait partie du thème FG–Nouveaux outils et connaissances pour optimiser les stratégies de surveillance.

Auteurs :

Sylvain Merel, INRAE, sylvain.merel@inrae.fr
Camille Rigal, INRAE, camille.rigal@inrae.fr
Tom Ducrocq, INRAE, tom.ducrocq@inrae.fr
Cécile Miège, INRAE, cecile.miege@inrae.fr
Randolph Singh, Ifremer, randolph.singh@ifremer.fr
Yann Aminot, Ifremer, yann.aminot@ifremer.fr

Vérification du document :

François Lestremau, INERIS, françois.lestremau@ineris.fr

Les correspondants

OFB : Pierre-François Staub, pierre-francois.staub@ofb.gouv.fr

INRAE : Marina Coquery
Ifremer : Anne Grouhel-Pellouin

Référence du document : S. Merel, R. Singh, C. Rigal, Y. Aminot, T. Ducrocq, C. Miège – Synthèse bibliographique sur l'analyse non ciblée d'échantillons environnementaux sédimentaires et biologiques – Rapport AQUAREF 2021 – 42 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>

1. INTRODUCTION.....	7
2. BIBLIOMETRIE SUR L'ANALYSE NON CIBLEE.....	9
3. PREPARATION DES ECHANTILLONS AVANT ANALYSES NON CIBLEES	11
3.1 Les matrices sédimentaires	12
3.2 Les matrices biologiques	16
4. L'ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE ET SPECTROMETRIE DE MASSE	21
5. LES CONTROLES QUALITE	25
6. LE TRAITEMENT DES DONNEES GENEREES - WORKFLOWS	27
7. CONCLUSIONS	32
8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	33
9. ANNEXE : GRILLE DE LECTURE DES PUBLICATIONS COMMENTEES DANS LA PARTIE 3	37

Synthèse bibliographique sur l'analyse non ciblée d'échantillons environnementaux sédimentaires et biologiques

S. Merel, R. Singh, C. Rigal, Y. Aminot, T. Ducrocq, C. Miège

RESUME

A l'heure où l'occurrence des contaminants dans l'environnement est une préoccupation sociétale majeure, il faut s'interroger sur les méthodes analytiques disponibles. Ce rapport se propose donc une note de synthèse bibliographique portant sur l'application de la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) pour l'analyse dite non-ciblée des contaminants organiques dans des échantillons environnementaux sédimentaires et biologiques. Une étude bibliométrique montre que la HRMS a connu un premier essor entre les années 1990 et 2010, puis un autre encore plus important au cours de la dernière décennie. Cependant la distribution des publications révèle une application nettement plus étendue de la HRMS sur la matrice eau, et en particulier eau douce, que sur la matrice sédiment ou biote. La littérature scientifique montre que plusieurs techniques (ultrasons, microondes, liquide pressurisé...) sont employées pour la préparation d'échantillons avant l'analyse instrumentale. Cependant, il semble que les protocoles d'extractions proviennent de développements réalisés pour une analyse ciblée puis qu'ils soient directement transposés à l'analyse HRMS sans plus d'optimisation. La littérature scientifique montre également que pour une détection optimale des contaminants organiques dans un échantillon, il serait indispensable de combiner une analyse HRMS avec une séparation chromatographique préalable en phase liquide (LC-HRMS) d'une part et en phase gazeuse (GC-HRMS) d'autre part. De plus, pour chaque interface il faudrait également tester différents types d'ionisation. Cependant, bien que ces analyses avec différentes interfaces chromatographiques et différentes techniques d'ionisation soient complémentaires, les études réalisant des analyses HRMS se focalisent généralement sur une seule séparation chromatographique et un seul type d'ionisation. En effet, une seule analyse HRMS génère déjà un très large volume de données dont le traitement doit encore être automatisé en suivant une succession de tâches dont la nature et l'ordre varient selon l'objectif de l'étude. Enfin, le développement et la mise en œuvre de contrôles qualité est également un challenge lors de l'analyse HRMS car il n'y a pas d'étalons analytiques permettant de corriger le signal de composés inconnus et qui ne sont identifiés qu'a posteriori selon diverses approches plus ou moins complexes à mettre en œuvre. Néanmoins, les premières applications de la LC-HRMS et GC-HRMS pour l'analyse des contaminants organiques dans les sédiments et les échantillons biologiques se sont révélées positives car plusieurs études ont mis en évidence la présence de multiples classes de contaminants aux propriétés diverses ainsi que de nouvelles substances non détectées lors de l'analyse ciblée traditionnelle.

Mots clés (thématique et géographique) : Analyse non-ciblée, spectrométrie de masse haute résolution, analyse suspectée, élucidation structurale, empreinte chimique, sédiment, biote

Literature survey on non-targeted analysis of environmental biological samples and sediments

S. Merel, R. Singh, C. Rigal, Y. Aminot, T. Ducrocq, C. Miège

ABSTRACT

The occurrence of contaminants in environmental matrices is a major concern and particular attention should be paid to analytical methods currently available. Therefore, this report offers a short bibliography note on the application of high-resolution mass spectrometry (HRMS) for the non-targeted analysis of organic contaminants in sediments and biological samples. A bibliometric survey shows that HRMS gains progressively in importance over the period 1990-2010 and became even more significant over the last decade. However, the distribution of publications reveals a wider HRMS application on water samples, and particularly freshwater samples, compared to sediments or biological samples. The scientific literature indicates that several techniques (sonication, microwave, pressurized liquid...) are used for sample preparation before HRMS analysis. It seems that sample preparation protocols are those usually applied for the conventional targeted analysis without further optimization for non-targeted analysis. Scientific literature also shows that for the optimal detection of organic contaminants in a sample, it would be necessary to combine the HRMS analysis with both liquid chromatography (LC-HRMS) and gas chromatography (GC-HRMS) interface. Moreover, for each type of chromatography, it would also be necessary to apply different ionization methods. However, such a holistic detection is not performed and, in practice, research is usually carried out using a single chromatographic separation and a single ionization technique. Indeed, a single HRMS analysis generates already a very large amount of data that must be processed using automated workflows that differ according to the objective of the study. The development of relevant quality controls is also a challenge with HRMS analysis since there is no analytical standard allowing correcting the signals of unknown chemicals that are only identified a posteriori according to different approaches, more or less complex. Nonetheless, initial applications of LC-HRMS and GC-HRMS for the analysis of organic contaminants in sediments and biological samples proved efficient since several studies have demonstrated the occurrence of multiple classes of contaminants with various properties as well as new substances not detected during the conventional targeted analysis.

Key words (thematic and geographical area): Non-targeted analysis, high resolution mass spectrometry, suspected analysis, structural elucidation, chemical fingerprint, sediment, biota

1. INTRODUCTION

Le nombre de **molécules organiques synthétisées** au niveau industriel est en constante augmentation depuis plusieurs décennies. Plus de 100 millions de substances sont enregistrées au Chemical Abstract Services (CAS) et 140,000 substances sont recensées par REACH dans l'Union Européenne. Ces molécules couvrent une large gamme de propriétés physicochimiques et sont synthétisées pour de multiples usages dans notre société. On y retrouve par exemple des produits pharmaceutiques tels que les antibiotiques, et aussi des biocides, des retardateurs de flammes, des agents conservateurs, des pesticides, des tensioactifs perfluoroalkylés ... Au cours de leur cycle de vie, ces molécules peuvent être partiellement transformées et générer des sous-produits d'identité et de propriétés inconnues. Puis, par des voies différentes comme par exemple le ruissellement des eaux pluviales ou le rejet d'eaux usées, une partie de ces molécules et de leurs produits de transformation aboutissent dans les eaux de surfaces et forment alors un nombre et une diversité de **contaminants** que les scientifiques et régulateurs peinent à caractériser.

L'occurrence des contaminants dans l'environnement est une problématique croissante car nombre d'entre eux ont une activité biologique pouvant avoir des répercussions écologiques sur les systèmes aquatiques mais aussi sur la santé humaine. Dans ce contexte, les techniques analytiques de détection avec couplage chromatographique ont évolué et aujourd'hui la spectrométrie de masse est l'outil privilégié car elle permet la détection à la fois spécifique et sensible (au niveau des effets biologiques constatés) des contaminants dans divers types d'échantillons (eau, sédiment, air, biote...).

La **spectrométrie de masse en tandem** permet ainsi la détection d'une large gamme de contaminants sélectionnés au préalable (**analyse ciblée**). Les contaminants que l'on souhaite analyser sont sélectionnés, puis une méthode adaptée est développée à l'aide d'étalons analytiques. Cette approche robuste présente cependant plusieurs inconvénients. Lorsqu'un composé n'est pas inclus dans la méthode, il ne peut pas être détecté ou si un étalon analytique n'est pas disponible, il ne peut pas être quantifié. Une large majorité de contaminants inconnus, dont les produits de transformation, demeurent alors indétectables. Afin de contourner ces limites, la **spectrométrie de masse à haute résolution** s'est particulièrement développée au cours de la dernière décennie. Cette évolution technologique récente permet la détection plus globale et sans a priori des composés présents dans un échantillon (**analyse non ciblée**) tout en permettant un niveau de sensibilité compatible avec les concentrations des polluants dans l'environnement. Cependant, ce type d'analyse génère un lourd volume de données dont le traitement est complexe et l'ensemble des composés détectés sont initialement des inconnus. Leur identification se fait a posteriori. Par exemple, « **l'analyse suspectée** » consistant à comparer les données acquises (rapport masse/charge, profil isotopique, temps de rétention, fragmentation) à des bases de données, permet l'identification de certains contaminants sans obligatoirement la nécessité d'un étalon analytique. Par ailleurs, une « **identification structurale** » basée sur l'interprétation détaillée des spectres de masse permet

d'identifier de nouveaux contaminants encore inconnus tels que des produits de transformation. Finalement, la détection holistique des constituants d'un échantillon permet également d'étudier son « **empreinte chimique** » et de comparer l'évolution de la composition chimique dans l'espace (série géographique d'échantillons) ou dans le temps (série chronologique d'échantillons).

Depuis 2016, plusieurs actions AQUAREF ont été menées concernant l'application de l'analyse non ciblée pour la détection des contaminants dans l'eau. En particulier l'action DEMO-NTS présente l'analyse non-ciblée de 20 échantillons d'eaux de surface par 3 laboratoires. Ces travaux ont conduit à une réflexion sur la construction des bases de données nécessaires à la recherche suspectée, sur les critères d'identification des polluants et sur la présentation des résultats. L'action EMNAT-NTS a ensuite mis en œuvre le traitement de données issues d'analyse non-ciblée d'eaux de surface prélevées sur 82 sites. Les actions AQUAREF ont permis de mettre en évidence l'intérêt de l'analyse non-ciblée pour l'identification de nouveaux composés pour la surveillance de la qualité des eaux. Cependant l'application de l'analyse non-ciblée aux matrices complexes comme le sédiment et le biote reste relativement limitée.

Dans ce rapport, l'objectif est d'étudier la mise en œuvre de la spectrométrie de masse à haute résolution pour l'analyse des contaminants organiques dans les matrices sédimentaires et biologiques. Cette revue offre un état de l'art récent des approches et bonnes pratiques propres à ce sujet. Elle comprend une analyse strictement bibliométrique. Puis, une synthèse bibliographique sur les pratiques de préparation d'échantillons est ensuite proposée qui inclut également des protocoles utilisés en analyse ciblée du fait du manque de publications sur l'analyse non-ciblée. De plus, une synthèse sur l'acquisition des données par analyse non-ciblée, sur les stratégies et outils pour leur traitement, et sur les contrôles qualités envisageables est également incluse dans ce rapport. A noter que ces dernières parties ne sont pas spécifiques à l'analyse des matrices sédimentaires et biote.

2. BIBLIOMETRIE SUR L'ANALYSE NON CIBLEE

La popularité croissante de la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) est principalement la conséquence de la grande spécificité et sensibilité qu'offre la spectrométrie de masse et qui ne cessent d'augmenter, année après année, grâce aux progrès technologiques constants dans ce domaine. De plus, au cours des dernières décennies, la HRMS s'est également démocratisée peu à peu dans les laboratoires de recherche car le coût des appareils est devenu abordable et que cette approche offre en particulier la possibilité de détecter des micropolluants encore inconnus tels que des produits de transformation.

Une étude bibliométrique indique, en recherchant par thème, que le terme « mass spectrometry » dans le moteur de recherche « Web Of Science » renvoie un total de 494 559 articles. La publication des 7 premiers articles remonte à 1955. Le nombre d'articles publiés chaque année ne cesse d'augmenter pour atteindre plus de 31 094 documents pour l'année 2020. De la même manière, le premier article publié en recherchant le terme « high resolution mass spectrometry » remonte à l'année 1960. La publication d'articles au sujet de la HRMS demeure encore relativement faible jusqu'à la fin des années 1980 avec moins de 30 documents par an (**Figure 1**). A partir de l'année 1991, plus de 200 articles par an sont publiés concernant la HRMS et ce chiffre augmente progressivement jusqu'à atteindre 834 documents en 2009. La commercialisation du premier instrument équipé de la technologie Orbitrap en 2005 et les progrès qui s'en sont suivis sur la technologie concurrente de temps de vol ont ouvert de nouvelles applications de HRMS. Depuis 2010, l'augmentation du nombre de publications annuelles augmente de manière encore plus significative, passant de 1063 à 3105 documents en 2020. Actuellement, le nombre de publications annuelles concernant la HRMS représente 10% des publications annuelles concernant la spectrométrie de masse.

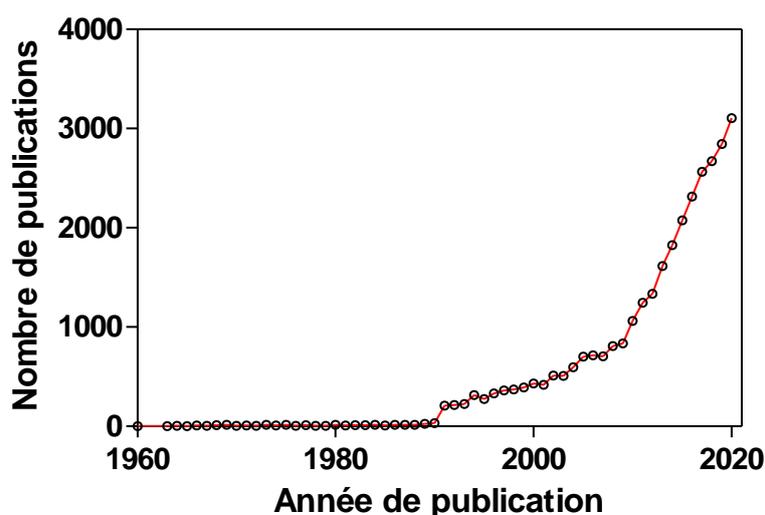


Figure 1 : Evolution du nombre de publications concernant la spectrométrie de masse à haute résolution sur les six dernières décennies.

Parmi l'ensemble des publications retrouvées sur Web Of Science concernant la HRMS, 30% proviennent des USA et 14% de Chine. Derrière l'Allemagne et l'Angleterre produisant respectivement 13% et 6,3% des publications, la France qui génère 6,2% des articles concernant la HRMS apparaît donc comme le cinquième pays le plus productif dans ce domaine. Les pays suivants dans le classement sont l'Italie, le Canada, l'Espagne, le Japon et la Suisse qui génèrent chacun entre 4 et 5% des articles.

La spectrométrie de masse à haute résolution a un champ d'application très vaste. Le domaine des sciences environnementales ne représente que 8,5% des publications concernant la HRMS. L'ingénierie environnementale (2,8%), les ressources en eau (0,75%), la biologie marine et d'eau douce (0,41%) ainsi que l'océanographie (0,4%) ne représentent que peu d'articles supplémentaires. Afin d'obtenir une image plus détaillée de la distribution des publications concernant la HRMS appliquée au domaine environnemental, une recherche supplémentaire dans Web Of Science a été réalisée en combinant le terme « high resolution mass spectrometry » avec les termes « water », « wastewater », « river », « ocean », « fish », « biota », and « sediment » individuellement. Au total, 4890 publications ont été retrouvées concernant HRMS et eau ; 926 concernant HRMS et sédiments ; 788 concernant HRMS et rivière ; 692 concernant HRMS et poisson ; 552 concernant HRMS et eaux usées ; 399 concernant HRMS et océan ; et 117 concernant HRMS et biote. Cette distribution révèle donc une application plus étendue de la HRMS sur la matrice eau, et en particulier eau douce, que sur la matrice sédiment ou biote.

Points clés sur la bibliométrie

- Premier article sur la HRMS dès 1960
- Envol des publications sur la HRMS en 1991 puis en 2009
- USA et Chine génère 44% des publications sur la HRMS
- Cinq fois moins de publications sur la matrice sédiment que sur la matrice eau
- Sept fois moins de publications sur la matrice biote que sur la matrice eau

3. PREPARATION DES ECHANTILLONS AVANT ANALYSES NON CIBLEES

Comme vu dans la partie 2 sur la bibliométrie, il existe moins de publications sur l'analyse strictement non ciblée de sédiments ou de matrices biologiques que de publications sur les eaux. Comme pour les analyses ciblées, les extractions peuvent être réalisées par ultrasons, Soxhlet, QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe), PLE (Pressurized Liquid Extraction), ou encore microondes (Massei et al., 2018). L'augmentation de la température (par Soxhlet, microonde ou PLE) et/ou de la pression (par PLE) permet d'accélérer le processus d'extraction mais peut également favoriser la dégradation de certains contaminants. Lors d'une analyse ciblée, le comportement du composé recherché est connu et les pertes éventuelles par dégradation peuvent être corrigées (en particulier par dopage avec un isotope stable). Mais lors de l'analyse non-ciblée ce phénomène n'est pas maîtrisé et une dégradation de certains composés lors de l'extraction peut changer significativement l'empreinte chimique acquise tout d'abord en rendant indétectables les composés dégradés et ensuite en générant des produits de transformation initialement absents dans l'échantillon collecté. De plus, ces extractions « forcées » conduisent également à l'extraction d'un plus grand nombre d'interférents organiques, constituants de la matrice. Le défi à relever pour une analyse non ciblée est d'extraire la plus large gamme possible de composés, du plus polaires au plus apolaires, ionisés ou neutres, tout en limitant au mieux la présence d'interférents (purification de l'extrait) pouvant perturber l'identification de ces composés. Une étape de purification est envisageable au préalable à l'analyse non-ciblée. Cette étape doit être la plus légère possible, afin de ne pas perdre d'information (Escher et al., 2020). Par exemple, la SPE (Solid Phase Extraction) et la d-SPE (dispersive SPE) peuvent être utilisées en analyse non-ciblée mais peuvent conduire à une perte de composés (Pourchet et al., 2020). Cependant, selon l'objectif de l'étude, il convient de considérer que le but de l'analyse non-ciblée n'est pas toujours de détecter tous les composés présents dans un échantillon. En effet, une analyse non-ciblée peut être également envisagée dans le but de détecter les composés inconnus d'une famille de molécules en particulier tels que les composés halogénés. Dans ce cas, une méthode de purification même très sélective resterait adaptée, mais les données acquises devront alors être considérées avec une grande précaution si elles sont évaluées dans un autre contexte.

Dans cette partie, nous avons sélectionné et nous présentons quelques publications adaptées à de l'analyse non ciblée car ayant comme objectif l'extraction de composés couvrant la plus large gamme possible de propriétés physico-chimiques. Généralement, les stratégies mises en place prévoient plusieurs extractions successives ou en parallèle avec des analyses combinées par chromatographie en phase liquide (LC) ou gazeuse (GC) couplées à de la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS). En complément au texte, une grille de lecture de chaque publication, avec des informations sur les protocoles mis en œuvre, est donnée en **Annexe**.

3.1 LES MATRICES SEDIMENTAIRES

Dans la plupart des publications, au préalable à l'extraction, les sédiments sont soumis à tamisage puis à une étape de séchage (sous azote ou par lyophilisation) et homogénéisation. Ces étapes préliminaires à l'extraction peuvent déjà avoir un impact sur la donnée acquise par la suite lors de l'analyse non ciblée. En effet, il faut envisager que les quantités de contaminants adsorbés sur les sédiments soit dépendantes de la granulométrie. Le matériel utilisé pour le prélèvement et le tamisage peut également apporter certaines molécules telles que des composés perfluorés. De plus, il faut également envisager une perte partielle des composés les plus volatiles lors de la phase de séchage. Finalement, la préservation des contaminants après la préparation de l'échantillon demeure aussi inconnue dans le cas où l'extraction n'est pas réalisée immédiatement. Cependant, ces points ne sont généralement pas abordés dans la littérature et ne seront pas considérés dans ce rapport dont l'objectif est centré sur l'évaluation des méthodes d'extraction.

Une étude récente a développé un protocole d'extraction par ultrasons pour l'étude des contaminations dans des carottes de sédiment par analyse suspectée et ciblée par HRMS couplée à une séparation chromatographique en phase liquide et gazeuse (Nishimuta et al., 2021). Les sédiments (2,5 g de matière sèche, MS) sont au préalable séchés sous azote pendant plusieurs jours à température ambiante. Pour une analyse par GC-HRMS, deux extractions successives sont réalisées ; les solvants utilisés sont de l'acétone, puis un mélange acétone / dichlorométhane (50/50, v/v). Une purification avec de la poudre de cuivre activé est mise en œuvre pour éliminer les interférents soufrés. Pour une analyse par LC-HRMS, une seule extraction est réalisée avec un mélange acétonitrile / eau ultrapure (50/50, v/v). Les extraits sont purifiés par filtration à 0,2 µm avant analyse LC. Les analyses conduites (suspectées et ciblées) ont permis de mettre en évidence l'extraction effective de différents types de composés : des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), alcanes, stérols, des produits chimiques industriels dont des persistants (Persistent Organic Pollutants) comme des retardateurs de flammes (isomères de tris(isopropylphényl)phosphate-TIPPP, Polychlorobenzènes (PCB), DDT, HCH, chlordane...

Une autre étude a utilisé le dopage de 310 composés pour développer un protocole par PLE (avec un ASE 200 de Dionex), sous forte pression et température, en vue de caractériser les fractions neutres, acides et basiques des contaminants organiques dans les sédiments (Massei et al., 2018). Pour cela, 3 extractions successives sont mises en œuvre sur chaque échantillon. Trois températures sont testées : 80, 100 et 120°C ; la pression étant de 100 bars environ. Les moins bons résultats sont obtenus à 120°C, probablement à cause d'une dégradation thermique des composés. Différentes masses de sédiments à extraire, en équivalent COT (carbone organique total), ont été testées pour déterminer le ratio optimal (quantité de sédiments) / (volume de solvant final dans le vial d'injection) ; au final, 50 mg COT/mL de solvant permet d'obtenir le meilleur compromis signal/bruit. Les solvants utilisés ainsi que les purifications appliquées à chaque fraction sont illustrés **Figure 2**.

Cette méthode nécessite beaucoup de solvants et elle est longue, chaque échantillon subissant 3 extractions et 3 injections (1 en GC, 2 en LC). Bien que la fraction neutre contienne le plus grand nombre de composés, les fractions acides et basiques permettent de détecter d'autres types de composés, anioniques ou cationiques, notamment des pharmaceutiques.

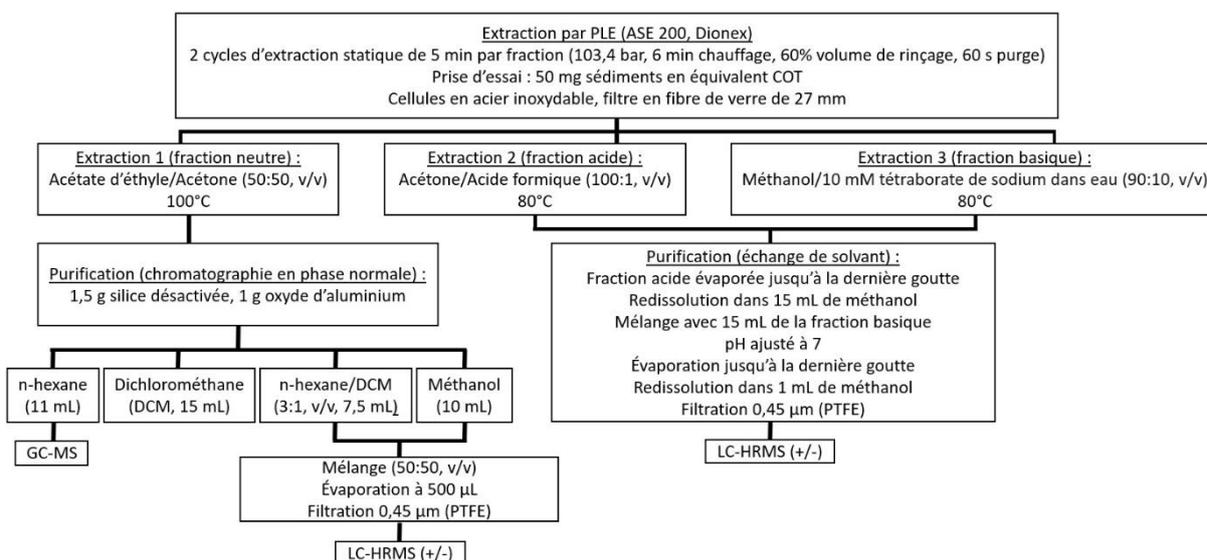


Figure 2 : Protocole d'extraction et de purification (Massei et al., 2018).

L'efficacité de leur protocole a été validée par des analyses ciblées de 310 composés fréquemment retrouvés dans les milieux aquatiques et les sédiments et couvrant une large gamme de propriétés physico-chimiques (205 composés neutres, 49 composés anioniques, 56 composés cationiques ; à pH = 7, le coefficient de distribution octanol-eau, s'échelonne entre : $-6 < \log \text{Dow} < 8$). Ce protocole a été appliqué aux sédiments de la rivière Holtemme (Allemagne), sur différentes zones d'amont en aval, soumises à différentes sources de pollution. Il a permis de caractériser une grande variété de composés (par analyse suspectée) dont différentes familles de pharmaceutiques, des herbicides, des insecticides, des fongicides, des retardateurs de flamme...

En vue d'une étude rétrospective visant à comparer la distribution spatiale des contaminants pour en identifier les sources (Lübeck et al., 2020), une extraction est réalisée par PLE (avec un ASE 200, Dionex) sur des échantillons de sédiments humide (7,5 g masse humide) mélangés et broyés avec 22,5 g de sable d'Ottawa traité thermiquement (550°C, pendant une nuit). Deux types d'extraction sont réalisés successivement : une pour la fraction polaire (MeOH, 50°C, 100 bars, 2 cycles successifs) et une autre pour la fraction non-polaire (dichlorométhane/acétone, 3/1, v/v, 100°C, 100 bars, 2 cycles successifs), mais seulement la fraction non-polaire est analysée (GC-HRMS).

Le domaine d'application de la méthode est vérifié par analyse ciblée de 115 composés dopés, dont des acides aliphatiques et aromatiques, des HAP, des stéroïdes, des pesticides, des composés perfluorés, et des composés aromatiques

polycyclique oxygénés ou azotés. La chromatographie gazeuse bidimensionnelle (GCxGC) ne couvre en fait que 61% de ces composés car elle ne permet pas d'observer les acides gras, les stéroïdes, les composés de haute polarité ou basse volatilité et les HAP alkylés à 4, 5 ou 6 cycles. Cela souligne l'utilité de combiner LC et GC pour des analyses plus exhaustives. Pour l'analyse non-ciblée, de nombreuses entités (i.e. signal HRMS caractérisé par le couple masse/charge, m/z et temps de rétention, t_r) sont identifiés comme des composés généralement issus de la biosynthèse végétale ou animale. Les signaux prioritaires sont identifiés et un niveau de confiance est donné allant de 1 (structure confirmée avec étalon de référence) à 4 (formule moléculaire sans équivoque) proposée par Schymansky et al. Ce protocole permet de mettre en évidence une grande disparité des contaminants à 2 points de prélèvement différents mais tout de même proches géographiquement. Cela souligne l'importance d'une stratégie réfléchie de prélèvement des sédiments, et une prudence pour l'interprétation des contaminations, sachant que les contaminants polaires peuvent être mobiles dans certaines couches profondes sédimentaires (Lübeck et al., 2020).

Une autre étude récente (Chiaia-Hernández et al., 2020) a mis en œuvre 2 protocoles d'extraction par PLE, pour des analyses ciblées et suspectées de sols et de sédiments, par LC et GC-HRMS. Les solvants et conditions d'extraction sont illustrés **Figure 3**. Une purification sur phase solide (SPE) est réalisée par ajout de phase Florisil activée (LC) ou alumine activée (GC) directement dans la cellule d'extraction ASE.

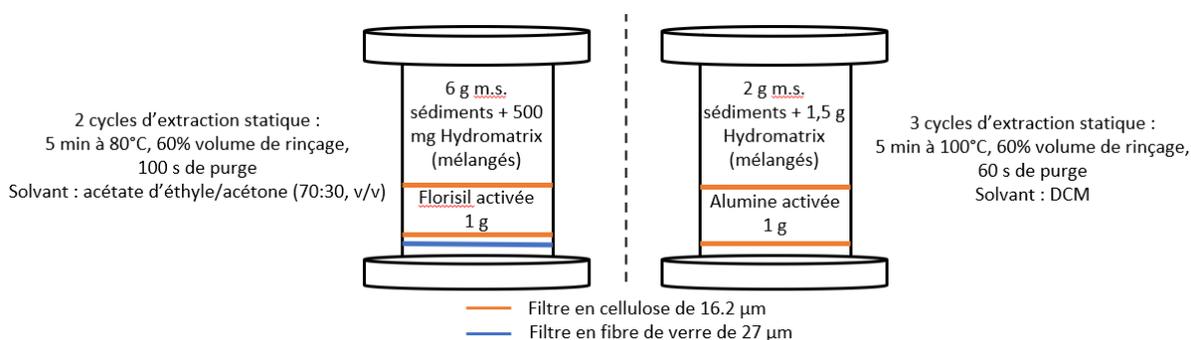


Figure 3 : Contenu des cellules d'extraction et paramètres de l'extraction par ASE avant analyse par LC-HRMS (à gauche) ou GC-HRMS (à droite), (Chiaia-Hernández et al., 2020).

Pour la GC, une dérivation est mise en œuvre (avec du MTBSTFA) pour améliorer la chromatographie et le signal de certains composés porteurs de groupes polaires. Les extraits sont filtrés sur des filtres PTFE (polytétrafluoroéthylène) de 0,2 µm avant injection.

Une analyse ciblée a été mise en œuvre pour valider les performances d'extraction du protocole pour une grande diversité de composés, sur la base de 67 composés : 51 en LC-HRMS (35 pesticides, 5 pharmaceutiques, 5 cosmétiques, 2 produits chimiques industriels, 2 produits de transformation, 1 antimicrobien, 1 inhibiteur de corrosion) et 20 en GC-HRMS (5 pesticides, 10 cosmétiques, 5 additifs). Quatre composés ont été détectés à la fois par LC et GC : le pesticide terbutryne et les cosmétiques DEET, octocrylène et tonalide. Ces

résultats ont été complétés par une analyse suspectée plus large et l'identification de 15 nouveaux composés (Chiaia-Hernández et al., 2020).

Une étude compare les extractions par ultrasons et par PLE pour la caractérisation de matières en suspension (MES) sur une gamme large de composés (Boulard et al., 2020). Au final, l'extraction par PLE (ASE 350) s'avère être plus efficace du point de vue des taux de récupération des composés étudiés (100 composés dont des pharmaceutiques, métabolites et produits de transformation choisis pour la large gamme de polarité qu'ils couvrent, $-5,7 < \log Kow < 4,9$). Les extractions sont réalisées sur des MES lyophilisées (0,5 g) mélangées à du sable de quartz. Plusieurs températures, pH et ratios de mélange de solvants ont été testés. Au final, l'extraction optimisée est celle à 100°C, 100 bars, 3 cycles d'extraction statique incluant un 1^{er} cycle avec un mélange méthanol / eau ultrapure, 1/1, v/v, un 2^{ème} et 3^{ème} cycles d'extraction avec un mélange méthanol / 2% acide formique, 1/1, v/v. L'ajout d'acide formique favorise l'extraction des composés cationiques mais diminue celle des composés anioniques. L'augmentation du pH par ajout d'ammoniaque n'améliore pas l'extraction des composés anioniques. Une purification des extraits est faite par échange de solvants, moins spécifique que la SPE, incluant une évaporation à sec et une redissolution des résidus dans un mélange de 100 µL d'eau ultrapure et 900 µL d'acétonitrile afin de précipiter les impuretés. Le tout est centrifugé et le surnageant est analysé par LC sur phase inverse et aussi sur phase HILIC.

Points clés sur l'extraction des matrices sédimentaires

- Les étapes préalables à l'extraction (tamisage, séchage, homogénéisation) peuvent altérer l'analyse non-ciblée (perte de composé et/ou contamination) mais aucune estimation disponible dans la littérature.
- Les méthodes d'extractions sont généralement développées sur la base d'analyse ciblée ou d'analyse suspectée à l'aide de sédiments préalablement dopés en contaminants.
- Deux méthodes d'extraction employées : ultrasons et ASE (accelerated solvent extraction).
- L'extraction par ASE permet a priori un meilleur taux de récupération des composés que l'extraction par ultrasons.
- Une température et une pression trop élevées ont un effet négatif sur l'extraction par ASE.
- Une température de 100°C, une pression de 100 bars et 50 mg COT/mL de solvant semblent être optimales pour l'extraction par ASE.
- Le choix des solvants pour l'extraction dépend du type de chromatographie utilisée pour l'analyse (GC ou LC).
- Pour une analyse par LC les solvants d'extraction sont généralement : eau, acétonitrile et méthanol.
- Pour une analyse par GC les solvants d'extraction sont généralement : acétone, dichlorométhane et hexane.
- Des cycles d'extraction successifs peuvent être réalisés avec différents solvants et différents pH pour élargir la gamme des composés extraits.
- Une purification sur phase solide peut être réalisée pendant l'extraction à l'aide de phase Florisil activée ou d'alumine activée si cela est compatible avec les

composés d'intérêt recherchés. La perte d'information liée à la purification n'est pas caractérisée.

- L'extraction pour analyse par GC permet de détecter des notamment HAPs, des retardateurs de flammes.
- L'extraction pour analyse par LC permet de détecter notamment des pesticides, des résidus pharmaceutiques et des cosmétiques.

3.2 LES MATRICES BIOLOGIQUES

Si l'évaluation de l'exposition des organismes marins à la contamination chimique par analyse non ciblée est l'approche de choix pour identifier de nouveaux contaminants bioaccumulables, elle repose sur des choix opérationnels de préparation d'échantillons préalables à l'analyse instrumentale. Les composés d'intérêt doivent être d'abord extraits des tissus biologiques puis les extraits doivent être purifiés des composés co-extraits. Les tissus biologiques sont en effet composés de macromolécules telles que les lipides ou les protéines qui sont susceptibles d'interférer avec l'analyse des contaminants, par « effet de matrice », un terme regroupant les perturbations que sont l'augmentation du bruit de fond, l'altération de la chromatographie (modification de rétention, élargissement des pics) ou l'extinction de signal causée par l'ionisation préférentielle de molécules de la matrice. Les méthodes d'extraction et de purification développées pour les analyses ciblées s'appliquent, en connaissance des limitations précisées ci-dessous. Comme pour l'analyse ciblée multi-résidu, la mise au point d'une méthode universelle satisfaisante pour toutes les familles de composés est illusoire, et le choix des techniques à utiliser résulte d'un compromis entre les familles chimiques envisagées, le niveau de purification requis, et la technique instrumentale considérée. Dans le groupe sur l'analyse non ciblée du réseau Norman (<http://www.normandata.eu/?q=node/252>), deux méthodes de préparation de tissus de poissons distinctes étaient recommandées aux participants d'un essai inter-laboratoire selon que l'analyse ultérieure soit conduite par LC ou par GC. Les organismes marins étant particulièrement exposés aux composés bioaccumulables et bioamplifiables, l'emploi de techniques préparatives permettant une bonne récupération des polluants organiques persistants (POP) historiques et émergents est privilégiée. Cette revue cible donc préférentiellement des études utilisant la GC plutôt que la LC.

Extraction :

Comme indiqué dans l'**Annexe**, les matrices biologiques sont le plus souvent extraites par liquide pressurisé (PLE) sur un extracteur de type ASE, avec utilisation de dichlorométhane (parfois en mélange avec de l'hexane). L'extraction par simple contact liquide-solide est également employée. Celle-ci étant plus souvent combinée à une analyse ultérieure par LC, l'acétonitrile ou le méthanol sont les solvants de choix. Elle peut être réalisée dans un bain à ultrasons pour promouvoir la désorption des composés ou sur une table d'agitation pour favoriser le transfert des composés vers le solvant extractant. Une comparaison de 5 méthodes d'extraction et trois purifications a été conduite à l'aide du dopage de 60 composés dont des retardateurs de flamme organophosphorés, des pesticides, des PCBs et des PBDEs (Dubocq et al. 2022). Les auteurs concluent que les techniques d'extraction liquide-solide (sur colonne ou par ultrasons) donnent des rendements satisfaisants proches de 100% lorsqu'ils étaient compris entre 20 et

80% par ASE (avec utilisation de terre de diatomée). Cependant, l'ajout à l'échantillon d'un dispersant (terre de diatomée) ou adsorbant (Florasil®) dans la cellule peut piéger irréversiblement les composés d'intérêt. Dans une application de criblage large spectre, l'ajout d'un dispersant inerte (billes de verre) semble préférable. Les auteurs notent également que l'examen de l'influence de l'extraction seule est limité par la nécessité d'une étape de purification ultérieure, puisque l'injection d'extrait de matrice biologique sans nettoyage préalable cause une forte suppression de signal.

L'élimination de l'eau de l'échantillon étant essentielle pour la récupération des composés hydrophobes, l'extraction est généralement conduite sur un échantillon lyophilisé, ou un desséchant est ajouté à l'échantillon frais avant extraction. En comparant les rendements de composés dopés dans des muscles de poisson frais et lyophilisés, Dubocq et al. (2022) ont constaté qu'une plus grande quantité de matrice a été extraite de l'échantillon lyophilisé, ce qui affectait les rendements, puisque les interférents n'ont pas pu être éliminés par les purifications ultérieures. Ce compromis entre la coextraction d'interférents matriciels et l'exhaustivité de l'extraction, dépendant du niveau de purification qui s'ensuit, mérite d'être exploré dans de futures études.

Enfin, Dubocq et al. (2022) note que certaines familles de composés (ici les esters d'organophosphate) ne sont récupérées par aucune des méthodes d'extraction examinées, probablement en lien avec leur polarité et/ou leur log Kow modéré (0.8 – 4.6). Cette sélectivité des méthodes de préparation est inévitable et démontre l'impossibilité d'une méthode universelle permettant une analyse exhaustive de l'exposome chimique.

Purification :

Les méthodes de purification développées pour les analyses ciblées s'appliquent, en connaissance des principes et limitations précisées dans le **Tableau 1**. Comme pour l'analyse ciblée multi-résidu, la mise au point d'une méthode universelle de purification satisfaisante pour toutes les familles de composés est illusoire, et le choix des protocoles à mettre en œuvre résulte d'un compromis entre les familles chimiques envisagées et le niveau de purification requis.

Tableau 1 : Méthodes de purification, principes et limitations.

Méthode de purification	Principe	Limitations
Chromatographie de perméation sur gel (GPC)	Egalement appelée chromatographie d'exclusion stérique, cette méthode permet de séparer les molécules par taille. Les lipides de grande taille, peu retenus, sont éliminés des échantillons par fractionnement selon le temps de rétention.	Les contaminants d'intérêt de large taille moléculaire sont peu retenus et peuvent être élués dans la première fraction éliminée (cas du BEH-TEBP). Volumes de solvant élevés.
SPE et Chromatographie sur colonne (silice, alumine, Florisil®, aminopropyl, silice greffée octadecyl, carbone graphite...)	Une phase stationnaire polaire (e.g. silice) ou apolaire (e.g. C ₁₈) disposée dans une colonne (ou une cartouche pour la SPE) va retenir de façon préférentielle les composés. Des fractions de polarités différentes peuvent être collectées selon la polarité des éluants employés. Cette technique peut être automatisée sur HPLC préparative avec une colonne de phase stationnaire adéquate et un collecteur de fraction	Les contaminants les plus polaires sont perdus sur phases normales (silice), puisque l'emploi d'un solvant très polaire (100% méthanol) entraîne l'éluion des lipides polaires de la matrice et réduit la purification de l'échantillon. C'est le cas des PFAS anioniques.
SPE dispersive (mêmes phases)	L'adsorbant est directement ajouté à un extrait, puis la phase liquide est collectée après vortex et centrifugation.	Il n'est pas possible de collecter différentes fractions de polarités différentes en appliquant un balayage de solvant comme c'est le cas sur colonne. Emploi usuel (mais évitable) de contenants polymériques et de phases ensachées présentant un risque de contamination externe.

La GPC présente l'avantage d'offrir une méthode de séparation orthogonale, indépendante de la polarité des analytes. Elle est couramment employée pour l'analyse ciblée de POP et c'est une méthode de purification usuelle pour l'analyse non ciblée en préalable de la GC. De plus, des systèmes existent pour permettre son automatisation. Rebyk et Haglund (2020) ont développé une purification par GPC en deux étapes (une colonne Phenogel puis 2 colonnes PLgel en série) pour des échantillons particulièrement gras (lard de phoque), qui permet d'éliminer 93% des lipides présents dans les échantillons (1ère étape -53%, 2ème -86%). Ils notent cependant que les 7% de lipides restants étaient trop pour permettre une analyse non ciblée fiable par GC. Cossaboon et al. (2019) ont choisi une purification par GPC uniquement, pour laquelle ils ont démontré qu'elle permettait de détecter le plus grand nombre de composés, par opposition au traitement par H₂SO₄ ou à la GPC combinée avec la chromatographie sur gel de silice. Le traitement par H₂SO₄ dégrade certains composés d'intérêt (cas de certains pesticides organochlorés) et présente également le risque de générer des produits de transformation, rendant impossible l'identification univoque d'un contaminant. Dans plusieurs études, une purification sur phase normale en colonne est employée en complément ou remplacement de la GPC. Dans Rebyk et Haglund (2020), les échantillons ont été fractionnés sur colonne Florisil®, à la fois pour simplifier la complexité des extraits, favoriser l'identification en apportant une donnée complémentaire sur la polarité des composés inconnus, et éliminer les

interférents matriciels les plus polaires. Dans cette étude, la plupart des lipides restants et des autres composants polaires de la matrice sont concentrés dans une quatrième fraction plus polaire, qu'il n'a pas été possible d'analyser. Mais les fractions précédentes se sont révélées suffisamment propres pour éviter une distorsion des pics ou une augmentation du bruit de fond. C'est l'approche qui a également été employée sur des extraits de moules par l'Ifremer, où 3 fractions de polarité croissantes sont collectées sur silice. Comme dans le cas de l'étude de Rebryk et Haglund (2020), l'analyse des fractions les plus polaires par GC est impossible en raison d'un fort effet de matrice, mais celle des fractions précédentes est satisfaisante. D'une manière générale, sur phase normale, l'emploi de solvants (ou mélange de solvant) plus polaires (riche en dichlorométhane-DCM, ou contenant du méthanol-MeOH) améliore la récupération des composés les plus polaires mais entraîne aussi l'élution des constituants interférents polaires de la matrice. Par exemple, la forte affinité des perfluoroalkylées (PFAS) polaires pour la silice requiert leur élution par du méthanol ce qui causerait la coélution des lipides polaires (Aminot et al., 2020). Pour cette famille de composés, des méthodes alternatives sont préférables mais ne seront pas examinées ici car d'une manière générale leur analyse reste encore un challenge. Dans Dubocq et al. (2022), la purification sur silice « multicouche » (silice acide, neutre et basique) produisait un minimum d'effets de matrice et des récupérations plus élevées en comparaison aux purifications sur silice, Florisil® et sans purification, mais certains composés (principalement des pesticides) ont été perdus dans les conditions acides utilisées. Les auteurs recommandent alors une purification sur silice désactivée comme le meilleur compromis pour une approche combinée ciblée et non ciblée. À l'inverse, en analyse non ciblée par LC-MS, Dürig et al. (2020), ont opté dans leurs conditions pour un traitement d'échantillon sans purification afin de privilégier une récupération plus élevée sur une large gamme de composés plutôt que de faibles effets de matrice. Ils ont montré que si la purification cause des effets de matrice moindres et plus répétables sur une sélection de composés ciblés, les rendements de récupération étaient meilleurs en l'absence de purification, favorisant des résultats précis et reproductibles. Cette approche demande néanmoins d'être éprouvée sur une large gamme de matrice avec différentes teneurs en lipide.

L'utilisation de solvants et consommables et la manipulation supplémentaire requises pour mener ces purifications peut également impacter la qualité des résultats. Les contaminants présents dans les blancs de protocole comme il a été déterminé par expérience avec les protocoles d'analyse ciblée sont également susceptibles de contaminer les échantillons préparés pour l'analyse non ciblée. Ces contaminants incluent typiquement les esters de phtalates, les esters d'organophosphate, certains retardateurs de flamme bromés, des HAP, des contaminants associés aux pharmaceutiques ou produits d'hygiène tels que la caféine, la nicotine ou les filtres UV etc. Rebryk et Haglund (2020) ont fréquemment détecté une série de 1H-perfluoroalcanes et un certain nombre de composés antioxydants qui ont pu être attribués à l'étape de GPC (probablement à partir des tubes en téflon) ou à des impuretés du solvant. Cela souligne l'importance d'intégrer plusieurs blancs de protocole aux séries d'analyses et d'appliquer une approche stricte de seuil d'exclusion des signaux afin d'éviter des faux positifs.

Rebryk et Haglund (2020) émettent également des recommandations sur les futurs développements à mener sur la préparation d'échantillons. Ils suggèrent de remplacer les colonnes ouvertes à écoulement par gravité par un autre système de fractionnement tel que la chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi-préparative, notamment pour séparer les PCB et autres contaminants présents à des concentrations relativement élevées des contaminants émergents moins abondants. De manière alternative et pour réduire davantage le risque de coélution, ils proposent également d'utiliser la GC bidimensionnelle (GCxGC) à la place de la GC.

Points clés sur l'extraction des matrices biologiques

- Deux méthodes d'extraction employées : ultrasons et ASE (accelerated solvent extraction).
- Extraction par ASE semble permettre un meilleur rendement que l'extraction par ultrasons
- L'extraction par ASE est généralement employée pour une analyse par GC-HRMS avec pour solvant du dichlorométhane.
- L'extraction par ultrasons est plus généralement employée pour une analyse par LC-HRMS avec pour solvant de l'acétonitrile ou du méthanol.
- Une étape de purification après extraction semble indispensable pour éliminer les interférences, en particuliers les lipides.
- La purification est généralement réalisée par chromatographie de perméation sur gel (GPC), SPE ou SPE dispersive.
- Certains protocoles de purification peuvent retenir de manière définitive des molécules et empêcher leur détection tandis que d'autres protocoles peuvent dégrader des polluants comme par exemple l'ajout de H₂SO₄ conduisant à la dégradation de certains pesticides organochlorés.
- Une méthode d'extraction et de purification en amont d'une analyse par HRMS ne permet donc pas une détermination exhaustive de la composition d'un échantillon mais oriente plutôt vers l'analyse élargie d'un groupe de molécules d'intérêt afin de compléter une analyse ciblée traditionnelle.
- En cas de purification, le degré de pureté des solvants pose également certaines difficultés car ceux-ci peuvent introduire des contaminations observables dans les blancs.

4. L'ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE ET SPECTROMETRIE DE MASSE

L'acquisition des données par la spectrométrie de masse à haute résolution est indépendante de la matrice à analyser. Ce rapport s'attache donc à présenter l'utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution pour l'analyse d'échantillons de sédiment ou de biote de manière générale et vise également à permettre la compréhension par un lecteur non spécialiste.

La spectrométrie de masse, et en particulier la spectrométrie de masse à haute résolution, est de nos jours l'outil fondamental pour la détection des micropolluants organiques dans les matrices environnementales telles que les sédiments ou le biote. En raison de la complexité de ces matrices, la détection et l'identification des contaminants est très significativement améliorée lorsque la spectrométrie de masse est couplée au préalable à une séparation chromatographique (**Figure 4**). Selon les caractéristiques physico-chimiques des contaminants, la chromatographie peut être réalisée en phase liquide (LC) ou en phase gazeuse (GC).

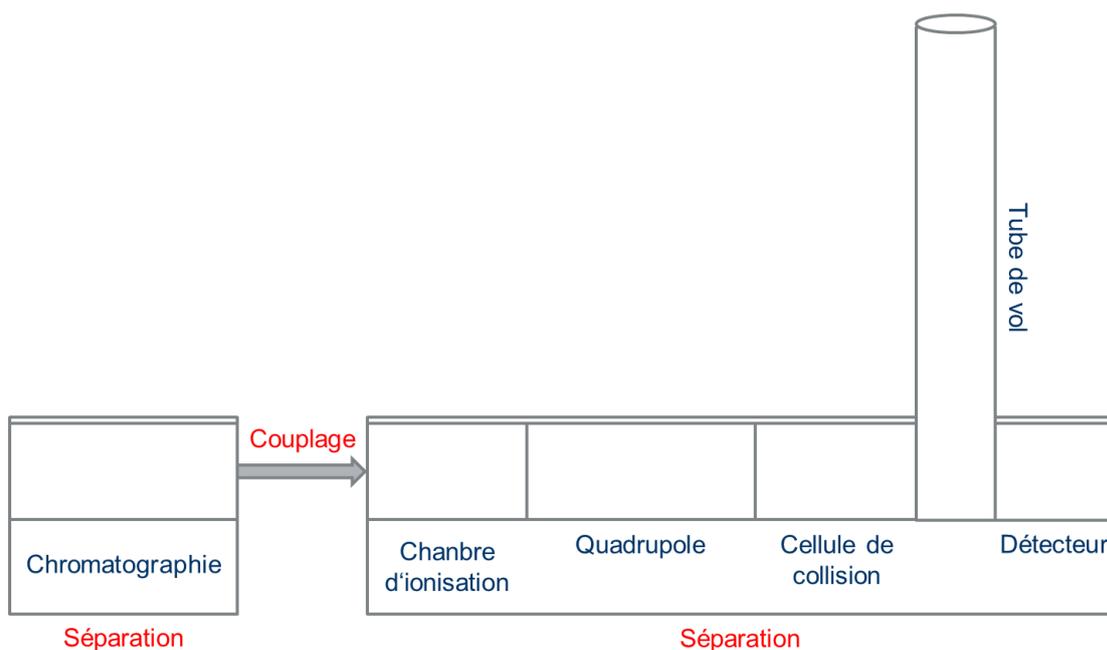


Figure 4 : représentation schématique du couplage de la chromatographie à la spectrométrie de masse à haute résolution selon le principe du temps de vol.

À la suite de la séparation chromatographique, les contaminants organiques sont envoyés vers le spectromètre de masse pour être détectés. Généralement, les spectromètres de masse sont cloisonnés en plusieurs compartiments (**Figure 4**). La spectrométrie de masse détectant les contaminants selon leur rapport masse/charge (m/z), le premier compartiment est donc une chambre d'ionisation. Selon la technique chromatographique en amont du spectromètre de masse et leurs propriétés physicochimiques, les contaminants organiques peuvent y être ionisés à l'aide de différents procédés (**Figure 5**). Par exemple, avec la

chromatographie en phase gazeuse on utilise généralement l'impact électronique (IE) tandis qu'avec la chromatographie liquide on utilise majoritairement l'ionisation par électrospray (ESI). Cependant, après la chromatographie liquide, certaines molécules seront plus facilement ionisées avec des techniques d'ionisation chimique (APCI) ou de photo-ionisation (APPI). Pour une détection holistique des contaminants il faudra donc combiner les interfaces chromatographiques ainsi que les techniques d'ionisation (Singh et al., 2020).

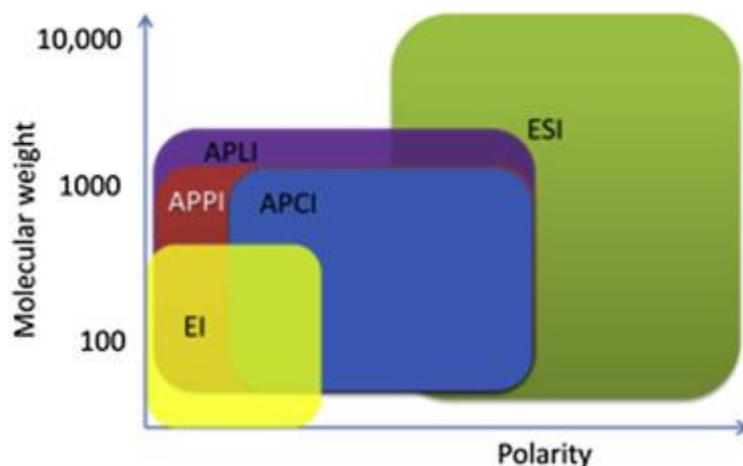


Figure 5 : domaine d'application des techniques d'ionisation en spectrométrie de masse en fonction de la polarité des contaminants organiques et de leur masse moléculaire (Li et al., 2015).

Les ions formés dans la chambre d'ionisation entrent ensuite dans le quadropole (**Figure 4**) qui agit comme un filtre. En effet, grâce au champ électrique qu'il génère, les ions sont déviés et seulement ceux qui ont la trajectoire adéquate peuvent le traverser. En adaptant ce champ électrique, l'utilisateur peut donc choisir : soit de laisser passer tous les ions pour une analyse de la composition globale de l'échantillon ; soit de ne laisser passer que des ions avec un rapport m/z d'intérêt particulier afin de mieux caractériser leur structure. Les ions traversant le quadropole atteignent ensuite la cellule de collision où l'impact avec un gaz neutre tel que l'azote ou l'argon provoque leur fragmentation. La fragmentation dépend de l'énergie de collision appliquée dans la cellule et le profil formé par les fragments représente la signature spécifique de chaque ion parent. Pour finir, les ions et/ou leurs fragments sont alors envoyés par « paquets » à travers le tube de vol afin de venir impacter le détecteur. Sachant que, selon l'équation de l'énergie cinétique, les ions et fragments les plus légers traversent le tube de vol plus rapidement que les plus lourds, la mesure du temps écoulé entre l'envoi du « paquet » d'ions dans le tube de vol et l'impact sur le détecteur permet de déterminer avec une grande précision la masse de chaque ion. Outre la technologie basée sur le temps de vol, une autre technologie appelée orbitrap permet également l'analyse non-ciblée par HRMS. Dans ce cas, le tube de vol est remplacé par une trappe où les ions décrivent une certaine trajectoire autour d'une électrode centrale. Et, à l'aide d'une transformée de Fourier, cette trajectoire est traduite en rapport m/z précis.

En pratique, les échantillons sont fréquemment analysés plusieurs fois par HRMS. Généralement, un échantillon est analysé une première fois sans filtrer aucun ion au niveau du quadropole et sans générer de fragmentation dans la cellule de collision. Cette approche souvent appelée « MS scan » permet alors de détecter l'ensemble des composés présents dans l'échantillon. Cependant, ne bénéficiant à ce stade que de la masse bien que précise des composés, seule une potentielle formule brute peut être proposée en guise d'identification. Afin d'identifier plus précisément les composés jugés d'intérêt, d'autres analyses HRMS successives sont réalisées. Les composés d'intérêt sont alors isolés dans le quadropole puis fragmentés dans la cellule de collision (MS²) pour que l'étude des fragments puisse révéler la structure moléculaire. Néanmoins, cette approche avec des analyses successives est très laborieuse et chronophage. Dans le but d'optimiser la détection et l'identification des composés présents dans un échantillon, une approche dite « Data Independent Analysis » ou « DIA » est de plus en plus fréquemment employée (Guo et al., 2020). Selon cette approche, l'instrument acquiert successivement un spectre en mode MS scan puis un ou plusieurs spectres en mode MS². Cela permet d'obtenir lors d'une seule acquisition les masses de l'ensemble des composés présents dans un échantillon ainsi que les fragments de composés présélectionnés par l'utilisateur. De la même manière, il existe également une approche dite « Data Dependent Analysis » ou « DDA » (Guo et al., 2020). Dans ce cas, l'instrument acquiert un spectre en mode MS scan puis un ou plusieurs spectres en mode MS², les ions fragmentés ne sont plus définis par l'utilisateur mais par les données acquises en mode MS scan. En effet, le spectromètre de masse détermine alors quels sont les ions les plus abondants en mode MS scan et les fragmente en mode MS².

La chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS) a prouvé son efficacité pour l'analyse non-ciblée de pesticides, produits pharmaceutiques et mycotoxins dans les matrices environnementales (Cancapá-Cartagena 2019). Lors d'une étude de sédiments lacustres, la LC-HRMS a mis en évidence la présence de pesticides, d'agents antimicrobiens, de produits pharmaceutiques, de produits d'hygiène personnelle, d'agents de protection pour les plantes, et de leurs produits de transformation (Chiaia-Hernandez et al., 2017). De la même manière, la LC-HRMS a également montré son efficacité à identifier certains contaminants organiques dans le biote. Par exemple, l'analyse de tortues vertes de la grande barrière de corail a révélé la présence de dérivés d'acides sulfoniques (n = 9), un métabolite d'insecticide de la famille des carbamates, ainsi que d'autres composés chimiques industriels (Heffernan et al., 2017). Une autre étude portant sur les mammifères marins de l'hémisphère nord a également permis de mettre en évidence l'occurrence de 37 substances perfluoroalkylées (PFAS) non détectées avec l'analyse ciblée par spectrométrie de masse conventionnelle, portant ainsi à 63 le nombre de PFAS détectés (Spaan et al., 2020). D'une manière générale il convient de noter que des analyses LC-HRMS d'échantillons de sédiment pourraient également être réalisées avec des conditions chromatographiques différentes, par exemple l'utilisation d'une colonne de type HILIC. Ces analyses permettraient probablement de mettre en lumière d'autres contaminants non retenus sur les colonnes chromatographiques en phase inverse. Seulement une publication combinant séparation sur phase inverse et HILIC et a été trouvée (Boulard et al., 2020) mais seulement les résultats d'analyse suspectées sont présentés et la

complémentarité des deux séparations n'est pas explorée. Ce sujet reste donc à explorer, de même que le couplage de la HRMS à la mobilité ionique qui permettrait d'améliorer la confiance dans l'identification des contaminants dans une matrice complexe comme les sédiments.

L'application de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (GC-HRMS) et parfois même de la GC bidimensionnelle (GCxGC-HRMS) a aussi montré son bien-fondé pour l'analyse des contaminants organiques. L'interface GC permet principalement la détection de composés volatiles et majoritairement des familles de contaminants organiques persistants. Par exemple, une étude récente utilisant cette approche analytique a mis en évidence la présence de terpènes, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), de composés contenant des hétérocycles ou encore de sesquiterpènes sulfurés dans les sédiments d'eau douce collectés en zone urbaine (Lübeck et al., 2020).

De la même manière, une autre étude des sédiments et moules de la baie de Hiroshima (Japon) a mis en évidence l'existence de nouvelles substances organochlorées bioaccumulables (Goto et al., 2020).

Deux autres études récentes ont également mis à profit la GC-HRMS pour mettre en évidence la présence de HAP, de polychlorobiphényles (PCBs), ainsi que de pesticides organophosphorés et organochlorés dans des sédiments (Ieda et al., 2019; Nieto-García et al., 2019).

Points clés sur l'analyse par chromatographie et HRMS

- L'analyse instrumentale n'est pas spécifique aux échantillons de sédiment ou de biote
- Deux approches chromatographiques sont employées suivant le type de polluants d'intérêt : la GC pour les composés volatiles et semi-volatiles, ou la LC pour les composés non-volatiles.
- Pour l'analyse par LC-HRMS la séparation est très majoritairement réalisée sur phase inverse puis l'ionisation est obtenue par electrospray.
- Pour l'analyse par GC-HRMS la séparation est très majoritairement réalisée sur une colonne de type DB5 puis l'ionisation est obtenue par impact électronique.
- Les données sont généralement acquises par un simple « scan » des rapports m/z compris entre 100 et 1000.
- Des données complémentaires sur la fragmentation (MS²) des composés d'intérêt sont généralement acquises après une première évaluation des données.
- Depuis quelques années une approche analytique de plus en plus employée consiste en une seule acquisition à basse et haute énergie de collision en parallèle. La basse énergie permet d'étudier les ions précurseurs tandis que la haute énergie permet de connaître les ions fragments. Les ions fragments ne peuvent pas être associés de manière catégorique à un seul ion précurseur, mais cette approche est particulièrement utile en cas d'analyse rétrospective des données lorsque l'échantillon n'est plus disponible au laboratoire car elle permet d'obtenir plus d'information qu'un simple « scan ».
- De nouvelles techniques analytiques comme la mobilité ionique couplée à la LC-HRMS sont récemment apparues dans la littérature mais n'ont pas encore été appliquées à l'analyse d'extrait de sédiment ou de biote. Cependant pour ces matrices particulièrement complexes, la mobilité ionique permettra d'améliorer le niveau de confiance lors de l'identification de polluants.

5. LES CONTROLES QUALITE

Les contrôles qualités (CQs) sont indispensables lors de l'acquisition de données HRMS comme dans tout type d'analyse. Cependant, contrairement à l'analyse ciblée, l'élaboration et l'utilisation des CQs se complexifie en analyse non-ciblée du fait que la majorité des composés détectés demeurent des composés non-identifiés. Néanmoins plusieurs CQs existent pour l'analyse et le traitement des données HRMS quel que soit le type de matrice en question (eau, sédiment, biote...).

Un premier contrôle qualité (CQ) consiste à s'assurer de la précision de l'instrument sur la masse. La calibration du spectromètre de masse se fait par injection de substances de masses connues directement dans la source. Elle peut être externe, c'est-à-dire que des solutions étalons sont injectées entre 2 séquences d'analyse ; ou interne, c'est-à-dire que tout au long de la séquence, une solution de référence (lockmass) est injectée. La leucine enképhaline peut être injectée toutes les 10 s (Grébert, 2020), d'autres auteurs utilisent une solution de sulfadiméthoxine méthanolique (Li et al., 2014). Les données peuvent être corrigées immédiatement, ou après l'acquisition (plus précis, mais risque de suppression d'ions plus grand) (Schulze et al., 2020). Une calibration périodique faisant partie de la maintenance de l'appareil permet de s'assurer que l'électronique reste stable (Schulze et al., 2020).

La particularité de l'analyse non ciblée est qu'il s'agit de considérer sans a priori tous les features HRMS (couples m/z en fonction des t_r) d'un échantillon. Des échantillons d'eau de rivière, de sédiments ou de moule peuvent contenir entre 1000 et 10000 features. Les contrôles qualité à mettre en place doivent permettre de contrôler, voire corriger les dérives de ces features, autant du point de vue de leurs m/z que de leur temps de rétention (t_r), voir aussi de leur intensité. Ils doivent permettre de fiabiliser la comparaison des features d'un échantillon à un autre, dans une même séquence d'analyse et aussi d'une séquence à une autre plus ou moins proches dans le temps. Les contrôles qualité sont très peu décrits dans les publications scientifiques dans le domaine de l'environnement alors que des « guidelines » sont disponibles dans des domaines comme la metabolomic (Broadhurst et al., 2018). Le verrou dans le domaine reste le défaut d'étalon adapté à la diversité des échantillons réels analysés, i.e. des étalons avec des features représentatifs des eaux de rivière ou des sédiments ou des matrices biologiques.

Une façon de répondre en partie à cette lacune est de mettre en œuvre des CQ_{pool}, mélange d'une quantité égale de tous les échantillons injectés dans la séquence d'analyse. Des étalons internes (homologues de molécules deutérées par exemple) peuvent être utilisés pour contrôler la qualité d'injection, la stabilité du système (masses, temps de rétention, intensités), ou encore corriger les effets matrice (Soulier et al., 2021). Ces étalons peuvent être dopés dans les blancs, les CQ, ou directement dans les échantillons. Il n'existe pas de norme quant au nombre d'étalons internes à utiliser pour l'analyse non-ciblée, où les features sont inconnus. L'idéal est d'en utiliser un grand nombre couvrant le domaine

d'application de la méthode employée (Dudzik et al., 2018). Si ces CQ sont relativement efficaces pour contrôler les dérives intra-séquences, une solution reste à trouver pour corriger la dérive inter-séquence.

Par ailleurs, comme avec les analyses ciblées, des blancs doivent être réalisés à chaque étape (extraction, phase mobile, nettoyage) pour vérifier les éventuelles contaminations apportées par le matériel et les solutions utilisées (Dudzik et al., 2018). Pour l'analyse non-ciblée des sédiments, Chiaia-Hernández et al. ont utilisé un échantillon de sédiments vieux de 100 ans (contamination peu probable pour de nombreux composés traces comme les biocides ou les pharmaceutiques par exemple) comme blanc (Chiaia-Hernández et al., 2020).

Enfin, il est conseillé de limiter le nombre d'injections par séquence d'analyse. Par exemple, Grébert (2020) préconise 150 échantillons à injecter au maximum par séquence, avec injection d'un CQ_{Pool} tous les 10 échantillons (Grébert, 2020). En analyse non-ciblée, l'optimum est d'injecter 100 échantillons par séquences d'après Dudzik et al. (2018), en commençant par 1 blanc puis 5 à 10 CQ pour le conditionnement de l'appareil, puis injecter régulièrement des CQ tous les 4 à 10 échantillons et enfin terminer la séquence par 1 blanc (Dudzik et al., 2018). Des CQ_{Pool} et des blancs solvants dopés avec des étalons internes sont injectés régulièrement, et idéalement, les échantillons sont injectés aléatoirement en duplicats (Schulze et al., 2020), ou en triplicats (Grébert, 2020; Lèbre, 2020).

Points clés sur les contrôles qualité

- Les contrôles qualités existent pour l'analyse HRMS mais sont encore peu documenté dans le domaine de l'environnement alors que des « guidelines » existent en métabolomique.
- L'injection régulière d'un mélange de composés connus permet de vérifier l'absence de déviation en masse et en temps de rétention lors de la séquence d'analyse.
- Le dopage des échantillons à analyser avec quelques composés deutérés dont la concentration est connue permet également de suivre la dérive instrumentale, mais également de vérifier d'éventuels problèmes liés à l'injection et de mettre en évidence de manière très ponctuelle la présence d'effet matrice lors de l'analyse.
- La création d'un échantillon CQ pool est également une bonne pratique consistant à « créer » un échantillon à l'aide d'un aliquote de chaque échantillon à analyser. Cela permet en théorie de suivre la dérive de l'instrument au cours de la séquence d'analyse même pour des composés inconnus.
- L'analyse de triplicats est également une bonne pratique pour le traitement des données, afin de réaliser un traitement statistique. Ces triplicats doivent alors être distribués de manière aléatoire durant la séquence d'analyse afin d'éviter les potentiels biais liés à des injections successives d'un même échantillon.

6. LE TRAITEMENT DES DONNEES GENEREES - WORKFLOWS

L'analyse d'échantillons par LC-HRMS ou GC-HRMS génère une très grande quantité de données. Celles-ci doivent alors être traitées de manière plus ou moins automatisée à l'aide de multiples étapes successives formant un « workflow ». La **Figure 6** illustre toutes les étapes possibles à considérer pour l'élaboration d'un workflow de traitement des données générées par HRMS.

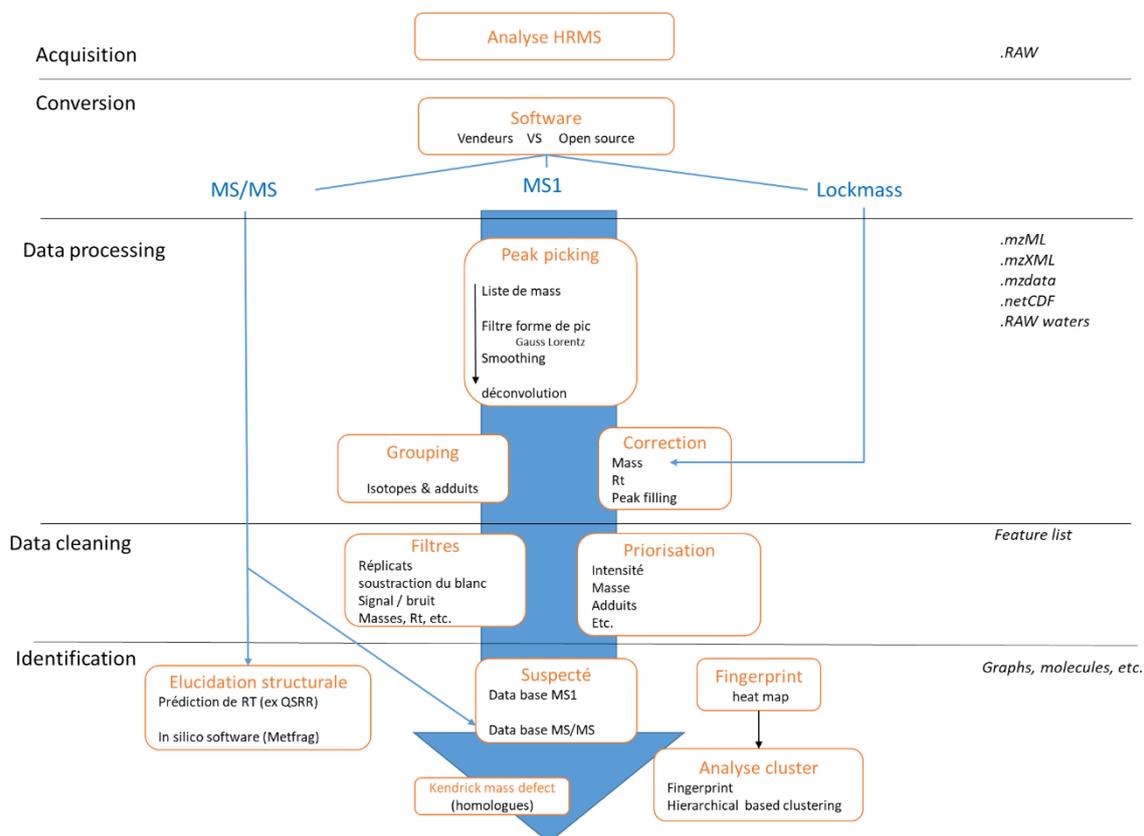


Figure 6 : Etapes à considérer pour l'élaboration d'un workflow de traitement de données HRMS.

Conversion

Une fois la donnée HRMS acquise, il y a deux types de traitement : les logiciels vendeurs et les logiciels en libres accès. Chaque vendeur acquiert les données HRMS dans un format qui lui est propre et propose également des logiciels adaptés pour leur traitement. Par opposition, pour un traitement des données avec des logiciels en libre d'accès, il faut tout d'abord convertir la donnée en format libre. Le logiciel MSconvert est largement utilisé pour cela (Adusumilli and Mallick, 2017).

Peak picking

La première étape du traitement de donnée HRMS est le « Peak Picking ». Lors de cette étape un algorithme observe les scans pour en sortir **une liste de signaux**. Un signal forme un pic sur le chromatogramme. Il est possible de filtrer les pics s'ils n'ont pas **une forme gaussienne ou lorentzienne**. Les pics peuvent aussi être lissés en utilisant un algorithme de **smoothing** comme celui de Savitsky-Golay. Pour finir, la **déconvolution** sépare les signaux en utilisant le m/z, le tr et la forme du pic. Après cette étape, on obtient une liste de **features**. Un feature est défini par un temps de rétention (tr), un rapport masse sur charge (m/z) et une intensité (Escher et al., 2020).

Un échantillon peut comporter plusieurs milliers de features et ce nombre peut varier selon les critères que l'on fixe pour le peak picking. Par exemple, un seuil d'intensité peut être mis en deçà duquel les signaux ne sont pas considérés.

Suite au peak picking, une liste de features est donc générée pour chaque échantillon. Afin de prendre en compte la variabilité analytique des rapports m/z et temps de rétention entre différents échantillons, il faut ensuite procéder à l'alignement des features. L'utilisateur définit alors la tolérance souhaitée vis-à-vis du rapport m/z et du temps de rétention. Ainsi, lorsque la différence entre deux features dans deux échantillons est inférieure au seuil de tolérance, l'alignement fusionne ces deux features (moyenne des m/z et tr) et considère que le feature résultant est présent dans les deux échantillons. A l'issue de l'alignement, on obtient alors une unique liste de features indiquant leurs intensités respectives dans chaque échantillon analysé.

Grouping

Lors de l'interprétation des résultats de HRMS, il est important de garder en mémoire qu'un contaminant peut être représenté par plusieurs features. En effet, le carbone par exemple est majoritairement présent sous sa forme ^{12}C , mais il existe aussi naturellement à plus faible niveau sous la forme ^{13}C . En HRMS, un contaminant contenant du carbone donnera donc lieu à un feature dont le rapport m/z correspond à sa composition exclusive par du ^{12}C , et il donnera aussi lieu à d'autres features dont le rapport m/z correspond à l'inclusion d'un ou plusieurs ^{13}C . Ainsi, afin de faciliter l'interprétation de données HRMS, les features ayant le même temps de rétention mais un m/z qui diffère par la masse d'un neutron (1.0087 unité de masse atomique) sont considérés comme des isotopes et peuvent être regroupés lors d'une opération appelée « grouping ».

De la même manière, dans la chambre d'ionisation en ESI+, un contaminant capte généralement un proton comme élément porteur de charge et forme l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$. Mais il peut également capter un atome de sodium comme porteur de charge pour former des adduits comme l'ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Ces deux ions appartenant au même contaminant auront donc une masse différente et donneront lieu à deux features

différents. Le grouping permet également de regrouper ou simplement d'annoter les features correspondant à un même contaminant mais formés par différents adduits (Backe, 2021). Cette étape est particulièrement importante dans le cas de la GC avec ionisation par impact électronique, pour laquelle plusieurs ions fragments sont générés lors de l'ionisation. Leur regroupement permet d'obtenir, au-delà de l'ion moléculaire (parfois intégralement fragmenté) un spectre de masse propre au composé. Cela est également observé, mais dans une moindre mesure, dans le cas de l'ionisation chimique à pression atmosphérique qui est moins énergétique. D'une manière générale cette fragmentation des molécules lors de l'ionisation et la difficulté du grouping sur les pics chromatographiques étroits obtenus en GC complexifie très fortement la réalisation d'empreinte chimique et l'identification des constituants d'un échantillon.

Contrôles qualités et correction

Au cours de l'analyse, des échantillons de contrôle qualité sont injectés. Ceux-ci peuvent être de nature différente mais permettent de vérifier l'injection de l'échantillon dans le système (LC-HRMS ou GC-HRMS), de **corriger a posteriori les temps de rétention et éventuellement l'intensité mesurée**. Les contrôles qualité faisant l'objet de la partie 5 de ce rapport, ils ne seront pas repris en détail ici.

Filtre et priorisation

Malgré l'opération de « grouping », les données HRMS restent très complexes et l'analyste dispose de plusieurs filtres qu'il peut appliquer en fonction du but de l'étude. Si des répliquas ont été injectés, il peut par exemple retirer les features qui ne sont pas présent dans 100% des répliquas, et/ou éliminer les features qui ne sont pas significativement différents entre les échantillons et les blancs (Di Marcantonio et al., 2020), etc.

Pour hiérarchiser les features à étudier, il existe aussi des stratégies de priorisation. Cela peut être simplement de classer les features en fonction de leur intensité, ou de la tendance de celle-ci (augmentation ou diminution du signal dans un échantillon précis par rapport aux autres). D'autres priorisations plus complexes associent une note en fonction de plusieurs critères (Dürig et al., 2019). Finalement, les multiples possibilités de hiérarchiser les features par ordre d'importance dépend entièrement de l'objectif que se fixe l'analyste.

Analyse suspectée

Une façon relativement rapide d'identifier des composés parmi les données acquises en HRMS est l'analyse suspectée. Pour cela, l'analyste doit généralement avoir une idée du type de molécules qu'il recherche afin de sélectionner une base de donnée adaptée; il suspecte leur présence dans ses échantillons (Escher et al., 2020). En effet, cette méthode d'identification consiste à comparer les données acquises en HRMS à une ou plusieurs bases de données contenant les signatures spécifiques de certains composés. Une tolérance est accordée par l'analyste vis-à-vis du rapport m/z (généralement 2 à 3 mDa) et du temps de rétention s'il est disponible (généralement limité au cas des bases de données internes élaborées par le laboratoire qui fait l'analyse). Les spectres de fragmentation obtenus par la MS^2 viennent aussi renforcer la précision de l'identification. Bien que l'analyse suspectée soit effectuée rapidement à l'aide de l'automatisation, l'étape de validation des résultats par l'utilisateur afin d'identifier

les éventuels faux positifs reste un facteur limitant en raison du temps qu'elle requiert.

Hormis les bases de données internes que chaque laboratoire élabore avec les étalons analytiques dont il dispose, il existe de nombreuses bases de données accessibles. Certaines sont générales comme Chemspider, MZcloud ou MassBank. D'autres sont spécifiques à certains pays ou types de molécules. Enfin, il y a des banques de données qui regroupent différentes bases de données et les classes selon les familles de composés chimiques pour couvrir le plus grand nombre de molécules. C'est le cas de la base de données du réseau européen NORMAN (Dulio et al., 2020, <https://www.norman-network.net/>).

Elucidation structurale

L'identification structurale nécessite obligatoirement une acquisition en MS². Cette méthode se base sur l'observation des fragments d'une molécule et essaie de reconstituer la structure de la molécule à la manière d'un puzzle. Des logiciels comme Metfrag or CSI:FingerID utilisent des bases de données de spectres de fragmentation et des règles venant de la littérature pour tenter de guider vers l'identification d'une molécule. L'élucidation structurale est principalement utilisée afin d'identifier de nouvelles molécules tels que les métabolites ou produits de transformation d'un composé parent connu. Par exemple, l'élucidation structurale a pu être employée pour identifier les produits de transformation du pesticide chlordécone (Chevallier et al., 2019) ainsi que ceux de différents composés présents dans les eaux résiduaires (Merel et al., 2017).

Pour renforcer la confiance en l'identification par élucidation structurale, celle-ci peut être croisée avec la prédiction de temps de rétention. En effet, en connaissant la structure d'une molécule et les propriétés de la colonne de chromatographie, des modèles de prédiction permettent d'estimer, avec une plus ou moins grande précision, le *t_r* correspondant (Bride et al., 2021).

Empreinte et analyse de clusters

Une troisième stratégie d'interprétation consiste à étudier l'empreinte chimique d'un échantillon sans identifier/nommer les molécules. Cette approche permet visuellement de comparer d'une manière globale la composition de plusieurs échantillons. Par exemple, les features détectés peuvent être listés verticalement et leur abondance (intensité) associée à un code couleur. En juxtaposant les échantillons et en observant la variation de la couleur, on peut alors apprécier la variation d'abondance des features entre les échantillons. Ce type de représentation des features appelé « heatmap » peut également être associé à une analyse de cluster permettant de regrouper et de visualiser les features ayant des profils d'évolution similaires entre les différents échantillons. Par exemple, cette combinaison d'analyse d'empreintes par heatmap et analyse de cluster permet d'évaluer la dégradation des contaminants lors du traitement des eaux usées en mettant en évidence les composés facilement dégradés, ceux plus récalcitrants et également les produits de transformation associés (Merel et al., 2015). Cette même technique peut également être appliquée afin de visualiser les contaminants provenant de différentes sources de contamination telles que le ruissellement des eaux pluviales, les rejets de station d'épuration ou tout simplement la matière organique dissoute propre au cours d'eau (Beckers et al., 2020). Selon l'objectif à atteindre, d'autres traitements statistiques plus ou moins

élaborés peuvent également être appliqués comme une analyse en composante principale (ACP), une ANOVA ou un T-test par exemple.

Autres méthodes d'identifications

D'autres stratégies permettent d'identifier des molécules. L'utilisation de la masse de Kendrick donne l'opportunité d'identifier des homologues (Merel et al., 2017). Ce sont des molécules presque similaires, qui se différencient par un ou plusieurs groupements chimiques en plus ou en moins. C'est utile pour les longues molécules en chaîne comme les polymères. Le principe est le même que pour les adduits et les isotopes. Il suffit de trouver les décalages en m/z correspondant au groupe chimique que l'on cible.

A noter que les différentes stratégies d'identification peuvent être combinées pour une même série d'échantillons. Et, selon la méthode utilisée, les filtres, les paramétrages du peak picking et des groupements sont différents.

Points clés sur le traitement des données HRMS

- Le traitement des données HRMS et les « workflows » associés ne dépendent pas de la matrice étudiée (sédiment, biote, eau, air...) mais de la question qui motive l'analyse non-ciblée.
- Le traitement des données HRMS peut être effectué sur des logiciels développés par les fournisseurs d'instruments de mesure, ou sur des logiciels libres après une étape permettant de convertir les données dans un format approprié.
- La première étape de traitement consiste à extraire les signaux mesurés pour chaque échantillon analysé (« peak picking »), puis à regrouper les signaux appartenant à un même composé (isotopes, différents adduits...) puis à déterminer la présence ou l'absence de ces composés dans chaque échantillon (alignement avec tolérance sur la masse et le temps de rétention).
- Une étude statistique des composés détectés peut alors être effectuée afin de les filtrer et de les prioriser ou de comparer les échantillons entre eux, selon la question de recherche posée initialement.
- Les contrôles qualité (dopage de composés deutérés notamment) permettent alors de valider la validité et la robustesse des workflows et du traitement statistique.
- Selon divers outils et stratégies à mettre en œuvre, le traitement des données permet de mettre en évidence de nouveaux composés et de les identifier par élucidation structurale.
- La méthode la plus fréquemment utilisée pour le traitement des données HRMS reste cependant l'analyse suspectée consistant à identifier des composés potentiellement présents dans l'échantillon mais sans étalon analytique, sur la base de la comparaison du signal acquis avec des bases de données contenant la signature spécifique de polluants (rapport m/z , massif isotopique, fragmentation en MS^2 , et éventuellement temps de rétention chromatographique).
- Le traitement des données HRMS et le niveau d'exigence souhaité est variable selon les laboratoires.

7. CONCLUSIONS

En conclusion, cette note de synthèse bibliographique met en évidence les points suivants :

- L'application de la GC-HRMS et de la LC-HRMS prend progressivement de l'importance pour l'analyse des contaminants organiques dans les sédiments et les matrices biologiques environnementales ;
- Pour les échantillons de sédiment et biote, l'étape d'extraction est cruciale mais les méthodes appliquées dans la littérature sont généralement développées selon une analyse ciblée ;
- Les extractions sont généralement réalisées par ultrasons ou ASE avec de l'acétonitrile ou du méthanol pour une analyse par LC-HRMS, ou avec du dichlorométhane pour une analyse par GC-HRMS ;
- Une purification des extraits est généralement nécessaire, en particulier pour la matrice biote afin d'éliminer les composés qui interfèrent avec l'analyse comme par exemple les lipides ;
- L'étape de purification, selon la méthode choisie, présente cependant le risque d'éliminer ou de dégrader certaines familles de molécules ;
- Une analyse complète de la composition d'un échantillon demande en réalité plusieurs analyses HRMS afin de couvrir les deux types de séparations chromatographiques et les différents types d'ionisations ;
- Les données HRMS sont larges et complexes et leur traitement doit encore être automatisé ;
- Les étapes de traitement des données HRMS sont multiples et ne sont pas spécifique à la matrice étudiée mais elles doivent être appliquées au cas par cas selon l'objectif de l'étude ;
- Les contrôles qualités existent et s'inspirent de l'analyse ciblée et de la métabolomique mais ils ne sont pas encore validés pour l'analyse non-ciblée d'échantillons environnementaux ;
- La GC-HRMS et la LC-HRMS ont néanmoins déjà permis de mettre en évidence différents contaminants qui n'avaient pas été détectés lors d'une analyse ciblée conventionnelle des matrices sédiment et biote, justifiant ainsi les efforts de développement analytique nécessaire dans ce domaine, en particulier sur l'optimisation des méthode d'extraction et de purification.

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adusumilli, R., Mallick, P., 2017. Data Conversion with ProteoWizard msConvert, in: Comai, L., Katz, J.E., Mallick, P. (Eds.), *Proteomics: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY, pp. 339-368.
- Aminot Y., Munsch C., Pollono C., Cariou R., Preud'homme H., Léon A., Noël C., 2020. Veille sur les nouveaux polluants organiques persistants dans les mollusques marins – Veille-POP. Rapport annexe : analyse non ciblée, 35 pages.
- Backe, W.J., 2021. Suspect and non-target screening of reuse water by large-volume injection liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Chemosphere* 266.
- Beckers, L.M., Brack, W., Dann, J.P., Krauss, M., Müller, E., Schulze, T., 2020. Unraveling longitudinal pollution patterns of organic micropollutants in a river by non-target screening and cluster analysis. *Science of the Total Environment* 727.
- Bride, E., Heinisch, S., Bonnefille, B., Guillemain, C., Margoum, C., 2021. Suspect screening of environmental contaminants by UHPLC-HRMS and transposable Quantitative Structure-Retention Relationship modelling. *Journal of Hazardous Materials* 409.
- Boulard, L., Dierkes, G., Schlüsener, M. P., Wick, A., Koschorreck, J., Ternes, T. A., 2020. Spatial distribution and temporal trends of pharmaceuticals sorbed to suspended particulate matter of German rivers. *Water Research*, 171, 115366. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115366>
- Broadhurst, D., Goodacre, R., Reinke, S. N., Kuligowski, J., Wilson, I. D., Lewis, M. R., Dunn, W. B., 2018. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies, *Metabolomics*, 14, 72. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3>.
- Ccancapa-Cartagena, A., Pico, Y., Ortiz, X., Reiner, E.J., 2019. Suspect, non-target and target screening of emerging pollutants using data independent acquisition: Assessment of a Mediterranean River basin. *Science of The Total Environment* 687, 355-368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.057>
- Chevallier, M.L., Della-Negra, O., Chaussonnerie, S., Barbance, A., Muselet, D., Lagarde, F., Darii, E., Ugarte, E., Lescop, E., Fonknechten, N., Weissenbach, J., Woignier, T., Gallard, J.F., Vuilleumier, S., Imfeld, G., Le Paslier, D., Saaidi, P.L., 2019. Natural Chlordecone Degradation Revealed by Numerous Transformation Products Characterized in Key French West Indies Environmental Compartments. *Environmental Science and Technology* 53, 6133-6143.
- Chiaia-Hernandez, A.C., Günthardt, B.F., Frey, M.P., Hollender, J., 2017. Unravelling contaminants in the anthropocene using statistical analysis of liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry nontarget screening data recorded in lake sediments. *Environmental Science and Technology* 51, 12547-12556.
- Chiaia-Hernández, A. C., Scheringer, M., Müller, A., Stieger, G., Wächter, D., Keller, A., Pintado-Herrera, M. G., Lara-Martin, P. A., Bucheli, T. D., & Hollender, J. 2020. Target and suspect screening analysis reveals persistent emerging organic contaminants in soils and sediments. *Science of The Total Environment*, 740, 140181. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140181>
- Cossaboon, J.M., Hoh, E., Chivers, S.J., Weller, D.W., Danil, K., Maruya, K.A., Dodder, N.G., 2019. Apex marine predators and ocean health: Proactive screening of halogenated organic contaminants reveals ecosystem indicator species. *Chemosphere* 221, 656–664. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.050>
- Di Marcantonio, C., Bertelkamp, C., van Bel, N., Pronk, T.E., Timmers, P.H.A., van der Wielen, P., Brunner, A.M., 2020. Organic micropollutant removal in full-scale rapid sand

filters used for drinking water treatment in The Netherlands and Belgium. *Chemosphere* 260.

- Dubocq, F., Bæringsdóttir, B.B., Wang, T., Kärrman, A., 2022. Comparison of extraction and clean-up methods for comprehensive screening of organic micropollutants in fish using gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Chemosphere* 286, 131743. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131743>
- Dudzik, D., Barbas-Bernardos, C., García, A., & Barbas, C., 2018. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 149-173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.044>
- Dulio, V., Koschorreck, J., van Bavel, B., van den Brink, P., Hollender, J., Munthe, J., Schlabach, M., Aalizadeh, R., Agerstrand, M., Ahrens, L., Allan, I., Alygizakis, N., Barcelo', D., Bohlin-Nizzetto, P., Boutroup, S., Brack, W., Bressy, A., Christensen, J.H., Cirka, L., Covaci, A., Derksen, A., Deviller, G., Dingemans, M.M.L., Engwall, M., Fatta-Kassinos, D., Gago-Ferrero, P., Hernández, F., Herzke, D., Hilscherová, K., Hollert, H., Junghans, M., Kasprzyk-Hordern, B., Keiter, S., Kools, S.A.E., Krueve, A., Lambropoulou, D., Lamoree, M., Leonards, P., Lopez, B., López de Alda, M., Lundy, L., Makovinská, J., Marigómez, I., Martin, J.W., McHugh, B., Miège, C., O'Toole, S., Perkola, N., Polesello, S., Posthuma, L., Rodriguez-Mozaz, S., Roessink, I., Rostkowski, P., Ruedel, H., Samanipour, S., Schulze, T., Schymanski, E.L., Sengl, M., Tarábek, P., Ten Hulscher, D., Thomaidis, N., Togola, A., Valsecchi, S., van Leeuwen, S., von der Ohe, P., Vorkamp, K., Vrana, B., Slobodnik, J., 2020. The NORMAN Association and the European Partnership for Chemicals Risk Assessment (PARC): let's cooperate! *Environmental Sciences Europe* 32, 100.
- Dürig, W., Tröger, R., Andersson, P.L., Rybacka, A., Fischer, S., Wiberg, K., Ahrens, L., 2019. Development of a suspect screening prioritization tool for organic compounds in water and biota. *Chemosphere* 222, 904-912.
- Dürig, W., Kintzi, A., Golovko, O., Wiberg, K., Ahrens, L., 2020. New extraction method prior to screening of organic micropollutants in various biota matrices using liquid chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Talanta* 219, 121294. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121294>
- Escher BI et al, 2020. Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science* 367, 388–392, DOI: 10.1126/science.aay6636
- Fernando, S., Renaguli, A., Milligan, M.S., Pagano, J.J., Hopke, P.K., Holsen, T.M., Crimmins, B.S., 2018. Comprehensive Analysis of the Great Lakes Top Predator Fish for Novel Halogenated Organic Contaminants by GCxGC-HR-ToF Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 52, 2909–2917. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05999>
- Goto, A., Tue, N.M., Isobe, T., Takahashi, S., Tanabe, S., Kunisue, T., 2020. Nontarget and Target Screening of Organohalogen Compounds in Mussels and Sediment from Hiroshima Bay, Japan: Occurrence of Novel Bioaccumulative Substances. *Environ. Sci. Technol.* 54, 5480–5488. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06998>
- Grébert, L., 2020. Développement d'une méthode d'analyse non-ciblée par chromatographie couplée à un spectromètre de masse haute résolution (HRMS) pour l'étude de la contamination de sédiments et matières en suspension. Rapport INRAE de stage de Master de l'Université de Limoges.
- Guo, J., Huan, T., 2020. Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, and Data-Independent Acquisition Modes in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics. *Anal. Chem.* 92, 8072–8080. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05135>
- Heffernan, A.L., Gómez-Ramos, M.M., Gaus, C., Vijayarathay, S., Bell, I., Hof, C., Mueller, J.F., Gómez-Ramos, M.J., 2017. Non-targeted, high-resolution mass spectrometry strategy for simultaneous monitoring of xenobiotics and endogenous compounds in green sea turtles on the Great Barrier Reef. *Science of the Total Environment* 599-600, 1251-1262.

- Ieda, T., Hashimoto, S., Isobe, T., Kunisue, T., Tanabe, S., 2019. Evaluation of a data-processing method for target and non-target screening using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with high-resolution time-of-flight mass spectrometry for environmental samples. *Talanta* 194, 461-468.
- Lèbre, S., 2020. Stratégie pour la mise en place d'une base de données HRMS en vue de la caractérisation de différentes sources de pollutions organiques anthropiques—Caractérisation par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse haute résolution. Rapport INRAE de stage de Master de l'Université de Poitiers.
- Li, Z., Maier, M. P., & Radke, M., 2014. Screening for pharmaceutical transformation products formed in river sediment by combining ultrahigh performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry with a rapid data-processing method. *Analytica Chimica Acta*, 810, 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.12.012>
- Li, D.X., Gan, L., Bronja, A., Schmitz, O.J., 2015. Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. *Analytica Chimica Acta* 891, 43-61.
- Lübeck, J. S., Alexandrino, G. L., & Christensen, J. H., 2020. GC × GC–HRMS nontarget fingerprinting of organic micropollutants in urban freshwater sediments. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00353-2>
- Massei, R., Byers, H., Beckers, L.-M., Prothmann, J., Brack, W., Schulze, T., & Krauss, M., 2018. A sediment extraction and cleanup method for wide-scope multitarget screening by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(1), 177-188. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0708-9>
- Merel, S., Anumol, T., Park, M., Snyder, S.A., 2015. Application of surrogates, indicators, and high-resolution mass spectrometry to evaluate the efficacy of UV processes for attenuation of emerging contaminants in water. *Journal of Hazardous Materials* 282, 75-85.
- Merel, S., Lege, S., Yanez Heras, J.E., Zwiener, C., 2017. Assessment of N-Oxide Formation during Wastewater Ozonation. *Environmental Science and Technology* 51, 410-417.
- Musatadi, M., González-Gaya, B., Irazola, M., Prieto, A., Etxebarria, N., Olivares, M., Zuloaga, O., 2020. Focused ultrasound-based extraction for target analysis and suspect screening of organic xenobiotics in fish muscle. *Science of The Total Environment* 740, 139894. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139894>
- Nieto-García, A.J., Domínguez, I., Romero-González, R., Arrebola, F.J., Vidal, J.L.M., Frenich, A.G., 2019. Automated determination of xenobiotics (pesticides, PCBs, PAHs, and PBDEs) in sediment samples applying HS-SPME-GC-HRMS. *Journal of AOAC International* 102, 38-45.
- Nishimuta, K., Ueno, D., Takahashi, S., Kuwae, M., Kadokami, K., Miyawaki, T., Matsukami, H., Kuramochi, H., Higuchi, T., Koga, Y., Matsumoto, H., Ryuda, N., Miyamoto, H., Haraguchi, T., & Sakai, S.-I., 2021. Use of comprehensive target analysis for determination of contaminants of emerging concern in a sediment core collected from Beppu Bay, Japan. *Environmental Pollution*, 272, 115587. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115587>
- Pourchet, M., Debrauwer, L., Klanova, J., Price, E. J., Covaci, A., Caballero-Casero, N., Oberacher, H., Lamoree, M., Damont, A., Fenaille, F., Vlaanderen, J., Meijer, J., Krauss, M., Sarigiannis, D., Barouki, R., Le Bizec, B., & Antignac, J.-P., 2020. Suspect and non-targeted screening of chemicals of emerging concern for human biomonitoring, environmental health studies and support to risk assessment: From promises to challenges and harmonisation issues. *Environment International*, 139, 105545. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105545>
- Rebryk, A., Haglund, P., 2020. Non-targeted screening workflows for gas chromatography–high-resolution mass spectrometry analysis and identification of biomagnifying contaminants in biota samples. *Anal Bioanal Chem.* <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03018-4>

- Schulze, B., Jeon, Y., Kaserzon, S., Heffernan, A. L., Dewapriya, P., O'Brien, J., Gomez Ramos, M. J., Ghorbani Gorji, S., Mueller, J. F., Thomas, K. V., & Samanipour, S.; 2020. An assessment of quality assurance/quality control efforts in high-resolution mass spectrometry non-target workflows for analysis of environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 133, 116063. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116063>
- Singh, R.R., Chao, A., Phillips, K.A., Xia, X.R., Shea, D., Sobus, J.R., Schymanski, E.L., Ulrich, E.M., 2020. Expanded coverage of non-targeted LC-HRMS using atmospheric pressure chemical ionization: a case study with ENTACT mixtures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412, 4931-4939.
- Soulier, C., Boiteux, V., Candido, P., Caupos, E., Chachignon, M., Couturier, G., Dauchy, X., Devier, M.-H., Esperanza, M., Fildier, A., Gardia-Parège, C., Guibal, R., Le Roux, J., Leroy, G., Lestremau, F., Lissalde, S., Noyon, N., Piram, A., Vulliet, E., Margoum, C., 2021. La spectrométrie de masse haute résolution pour la recherche de micropolluants organiques dans l'environnement. *Techniques Sciences Méthodes*, 6, 43-54.
- Spaan, K.M., Van Noordenburg, C., Plassmann, M.M., Schultes, L., Shaw, S., Berger, M., Heide-Jørgensen, M.P., Rosing-Asvid, A., Granquist, S.M., Dietz, R., Sonne, C., Rigét, F., Roos, A., Benskin, J.P., 2020. Fluorine Mass Balance and Suspect Screening in Marine Mammals from the Northern Hemisphere. *Environmental Science and Technology* 54, 4046-4058.

9. ANNEXE : GRILLE DE LECTURE DES PUBLICATIONS COMMENTEES DANS LA PARTIE 3

Matrice	Préparation	Extraction	Purification	Appareillage	Publication
<p>Carotte sédimentaire (3 emplacements du lac Greifensee, Suisse : 1 au niveau le plus profond de lac, 2 à proximité des zones de rejet de 2 stations de traitement des eaux usées)</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Stockage à 4°C * Couches de 3 à 5 cm datées au ²¹⁰Pb et ¹³⁷Cs * Congélation (24h) * Lyophilisation (48h) 	<p>PLE (ASE 350, Dionex) Cellules : inox, 10 mL</p> <p><u>Pour LC-HRMS/MS :</u> * Prise d'essai : 6 g MS (mélangés à 500 mg d'Hydromatrix) * 2 cycles x 5 min (80°C, volume de rinçage 60%, 100 s de purge) * Solvants : acétate d'éthyle/acétone (70:30, v/v) * Ajout de 60 µL d'une solution 98 étalons internes à 2,0 mg/L</p> <p><u>Pour GC-MS/MS :</u> * Prise d'essai : 2 g MS (mélangés à 1,5 g de terre diatomée) * 2 cycles x 5 min (100°C, volume de rinçage 60%, 60 s de purge) * Solvant : Dichlorométhane (DCM)</p>	<p>d-SPE</p> <p><u>Pour LC-HRMS/MS :</u> * 1 g de Florisil au fond de la cellule * Évaporation jusqu'à 1 mL à 45°C (système d'évaporation automatisé) * Évaporation jusqu'à 500 µL sous flux d'azote à 40°C * Filtration à 0,2 µm (PTFE)</p> <p><u>Pour GC-MS/MS :</u> * 1 g d'alumine activée au fond de la cellule * Évaporation à sec (azote) * Redissolution dans 500 µL d'acétate d'éthyle * Filtration à 0,22 µm (PTFE) * Dérivation : 10 µL de MTBSTFA ajoutés au moins 30 minutes avant injection</p>	<p>GC-MS/MS : * Chromatographie : SCION 456-GC (Bruker), colonne BR-5 ms (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm film thickness) * Détection MS/MS : SCION TQ, CP 8400 Autosampler (Bruker) * Injection : 1 µL, splitless mode * Ionisation EI * Mode MRM</p> <p>LC-HRMS/MS : * Détection HRMS : QExactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fischer Scientific) * Ionisation ESI +/- * DDA</p>	<p style="text-align: center;">Chiaia-Hernandez et al., 2020</p>
<p>Carotte sédimentaire (Baie Beppu, Japon)</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Stockage à -20°C * Couches de 1 cm datées au ¹³⁷Cs et ²¹⁰Pb * Séchage sous azote pendant plusieurs jours à température ambiante * Stockage à -20°C 	<p>Prise d'essai : 2,5 g MS</p> <p><u>Pour GC suspecté :</u> * Dopage avec un mélange de traceurs * Ultrasons : Acétone, puis Acétone / DCM (1:1, v/v) * Combinaison des extraits * Ajout d'un mélange d'étalons internes</p> <p><u>Pour LC suspecté :</u> * Dopage avec un mélange de traceurs * Ultrasons : Acétonitrile / EUP (1:1, v/v) * Ajout d'un mélange d'étalons internes</p> <p><u>Pour LC ciblé :</u> * RSE (rapid solvent extractor) : ACE/n-hexane (1:1, v/v) puis toluène * Aliquote dopé avec 6 PFR deutérés</p>	<p><u>Pour GC suspecté :</u> * Rinçage avec NaCl à 3% * Aliquote de la fraction DCM séché avec Na₂SO₄ anhydre + poudre de cuivre réduite (élimination des composés soufrés)</p> <p><u>Pour LC suspecté :</u> * Ajout de NaCl à 30% * Aliquote microconcentré à l'azote * Filtration à 0,2 µm</p> <p><u>Pour LC ciblé :</u> Colonne de verre remplie avec Supelclean™ ENVI-Carb 120/400 -> élution : 25% toluène/acétate d'éthyle, remplacée par MeOH</p>	<p>GC-MS (suspecté) : * Colonne : DB-5MS (Agilent) * Détection HRMS : TQ8040 (Shimadzu) * Ionisation EI + * 2 injections par échantillon : mode SIM/scan (50 à 500 Da) puis MS/MS, (SRM : selected reaction monitoring)</p> <p>LC-MS (suspecté) : * Colonne ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters) * Détection HRMS : LC-QTOF-MS X500R (Sciex) * Ionisation ESI + * Mode MS/MS scan (50 à 1000 Da)</p> <p>LC-MS (ciblé, 16 PFR) : * Colonne ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters) * Détection HRMS : XevoTQ-S micro LC/MS (Waters) * Ionisation ESI * Mode MRM (multiple reaction monitoring)</p>	<p style="text-align: center;">Nishimuta et al., 2021</p>

Matrice	Préparation	Extraction	Purification	Appareillage	Publication
<p>MES</p> <ul style="list-style-type: none"> * 4 points de prélèvements sur le Rhône (sur une longueur de 700 km) * 1 point de prélèvement sur la rivière Saar (Allemagne) 	<ul style="list-style-type: none"> * 1 prélèvement par mois ☑ congélation à l'azote liquide * Au bout d'1 an : mélange des échantillons de chaque mois pour former un échantillon annuel « moyen » * Lyophilisation Homogénéisation * Stockage dans de l'azote liquide à < -150°C 	<p>Plusieurs méthodes / paramètres testés</p> <p><u>Méthode sélectionnée :</u> PLE (ASE 350, Thermo Fisher Scientific)</p> <ul style="list-style-type: none"> * Prise d'essai : 0,5 g MS * Cellules : inox, 10 mL * MES mélangées avec sable de quartz * 60 µL d'une solution d'étalons internes (0,1 mg/L dans MeOH) ajoutée dans la cellule, solvant évaporé avant extraction * 3 cycles x 15 min, 100°C, 100 bar, temps de chauffage 6 min : 1 cycle MeOH/Milli-Q (1/1, v/v, 20 s purge, 0% volume de rinçage) 2 cycles MeOH/2% AcF (1/1, v/v, 120 s purge, 150% volume de rinçage) 	<ul style="list-style-type: none"> * Extrait complété à 30 mL avec MeOH/Eau Milli-Q (1:1, v/v) * Aliquote de 10 mL évaporé au Turbovap (azote) * Redissolution dans 100 µL d'eau Milli-Q * Ajout de 900 µL d'acétonitrile (précipitation des impuretés) * Centrifugation : 10 min, 6000 rpm <p><u>Pour RPLC (phase inverse) :</u> 100 µL du surnageant récupéré et dilué dans 900 µL d'eau Milli-Q</p> <p><u>Pour chromatographie HILIC :</u> 200 µL du surnageant récupéré et dilué dans 800 µL Acétonitrile/Milli-Q (90:10, v/v)</p>	<p>RPLC</p> <p>Colonne : Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm, Agilent), 25°C</p> <p>Injection : 80 µL</p> <p>Solvants : (A) 0,1% acide acétique, (B) ACN [Gradient 0 – 100 - 0% (B)]</p> <p>HILIC</p> <p>Colonne : Zwitterionic HILIC Nucleodur (3 x 250 mm, 3 µm, Macherey-Nagel), 25°C</p> <p>Volume d'injection : 70 µL</p> <p>Solvants : (A) 10 mM formiate d'ammonium + 0,1% AcF (B) 10 mM formiate d'ammonium + ACN/Milli-Q (90:10, v/v) [Gradient 100 – 75 - 100% (B)]</p> <p>MS</p> <p>Triple Quad (API 6500 QTrap, SCIEX)</p> <p>ESI +/- Mode MRM</p>	Boulard et al., 2020
<p>Carottes sédimentaires (canal et lac Utterslev Mose, Danemark)</p>	<ul style="list-style-type: none"> * Carotte de 0 à 30 cm * 5 prélèvements mélangés pour former un échantillon moyen, processus opéré dans plusieurs zones * Elimination de l'eau de surface, mélange, réduction de masse (entre 5:1 et 2:1) jusqu'à environ 200 g * Stockage à 4°C 	<p>PLE (ASE 200, Dionex)</p> <ul style="list-style-type: none"> * Cellules : inox, 33 mL 2 filtres cellulose au fond * 7,5 g masse humide + 22,5 g de sable d'Ottawa traité thermiquement ☑ mélange et broyage * Cellule complétée avec du sable d'Ottawa, filtre cellulose au-dessus * 2 fractions x 2 cycles : 1500 psi, chauffage 2 min, extraction 10 min, rinçage 70%, purge 60 s) <u>Polaire</u> : 50°C, MeOH/H2O (1:1, v/v) <u>Apolaire</u> : 110 °C, DCM/Acétone (3:1, v/v) * Mélange des 2 extraits de chaque fraction * Extraits dopés (200 µL, 6 traceurs deutérés à 8 µg/mL) 	<ul style="list-style-type: none"> * Excès de Na2SO4, 1 min vortex, 20 min de réaction ☑ eau résiduelle éliminée * Surnageant mis en vial * Stockage à -20°C 	<p>GC x GC HRMS (fraction non-polaire)</p> <p>Agilent 7890B modifié pour GC x GC</p> <ul style="list-style-type: none"> * 1ère colonne : ZB-5 (Phenomenex, 60 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm) Four : 3,5 min à 60°C, hausse 7,5 °C / min, 15 min à 310°C * 2ème colonne : ZB-50 (Phenomenex, 1,5 m, 0.18 mm i.d., 0.18 µm) Four : + 10°C que le four 1 * Ionisation : EI * QTOF : 7200 Accurate Mass * Résolution 13500 * Injection : 1,0 µL, splitless mode, 300°C * Acquisition : m/z 20-700 Da, 25 scans/s * Gaz porteur : Hélium, 1,5 mL/min 	Lübeck et al., 2020

Matrice	Préparation	Extraction	Purification	Appareillage	Publication
Sédiments (Rivière Holtemme, Allemagne) 3 points de prélèvement	* Homogénéisation * Lyophilisation * Tamisage ≤ 63 µm * Stockage à -20°C	PLE (ASE 200, Dionex) * 50 mg eq COT * 2 cycles de 5 min par solvant, 103,4 bar : EtAc (50:50, v/v) à 100 °C (fraction neutre), AcFA (100:1, v/v) à 80 °C (fraction acide), MeOH / 10 mM tétraborate de sodium dans de l'eau (90:10, v/v) à 80 °C (fraction basique)	<u>Fraction neutre :</u> * Purification en phase normale * 1,5 g silice désactivée, 1 g oxyde d'aluminium * Éluions successives : n-hexane (11 mL), n-hexane-DCM (3:1, 7.5 mL), DCM (15 mL), and MeOH (10 mL) * Moitiés fraction n-hexane-DCM et MeOH mélangées * Évaporation sous flux d'azote à 500 µL * Filtration à 0,45 µm * Stockage à -20°C <u>Fractions acides et basiques :</u> * Évaporation et échange de solvant * Extraits acides évaporés et redissous dans 15 mL MeOH * Mélange avec fraction basique * pH ajusté à 7 * Évaporation jusqu'à 500 µL (azote) * Filtration à 0,45 µm	LC-HRMS <u>Analyse ciblée</u> (développement de méthode) : * Agilent 1200 UPLC Colonne : C18 Kinetex (100 x 3 mm, 2,6 µm, Phenomenex) Injection : 10 µL, 200 µL/min Solvants : (A) 0,1% AcF, (B) MeOH avec 0,1 AcF% * Hybrid linear ion trap–Orbitrap MS (LTQ Orbitrap XL, Thermo Scientific) Ionisation : ESI +/- Acquisition : Mode full scan, 100-1000 Da Résolution : 100000 <u>Analyse suspectée</u> (application aux sédiments) : * Thermo Scientific UltiMate 3000 LC Colonne : Kinetex 2.6 µm EVO C18 (50x2.1 mm) Pré-colonne : C18 EVO (5.x2.1 mm), 40°C Injection : 5 µL Solvants : 0,1% AcF + (A) Eau, (B) MeOH Gradient : A/B (90:10, v/v) à (5:95, v/v) * Quadrupole–Orbitrap MS (QExactive Plus, Thermo Scientific) Ionisation : ESI +/- Acquisitions : - Full scan, 100-1000 Da, résolution : 70000 - DIA MS/MS, fenêtres de 50 Da, résolution 35000	Massei et al., 2018

Matrice	Préparation	Extraction	Purification	Instrumentation	Référence
Bivalves filtreurs, France	<ul style="list-style-type: none"> * Stockage à -20°C * écoquillage * lyophilisation * broyage fin * Stockage à T amb 	Prise d'essai : 1 g ps * Dopage avec un mélange de traceurs ¹³ C ou D * ASE : DCM	* GPC (DCM) * Fractionnement sur silice (5 g, 5% H ₂ O, [F1] DCM/Hex 3:97, [F2] DCM/Hex 20:80, [F3] DCM) * Dopage étalons d'injection	GC-MS : * Chromatographie : Colonne Rxi-5Sil (Restek) * Détection HRMS : timsTOF (Bruker) Ionisation APCI+ Mode MS scan (m/z : 100 à 500) LC-MS : * Chromatographie : Colonne C18 Hypersil Gold (100 mm x 2,1 mm, 1,9 µm) * Détection HRMS : Orbitrap Q-Exactive (Thermo) Ionisation ESI- Mode MS scan (m/z : 120 à 1000)	Rapport Veille POP 2020 (Ifremer)
Brème (poisson entier), Allemagne	<ul style="list-style-type: none"> * Broyage frais * Lyophilisation * Broyage fin * Stockage à -20°C 	Protocole GC-MS : Prise d'essai : 3 g ps * ASE : n-hexane:DCM (2:1) (+ dispersant, Na ₂ SO ₄) Protocole LC-MS : Prise d'essai : 0.5 g ps * extraction solide-liquide ACN 0.1% acide formique (3 mL)	Protocole GC-MS : * Florisil® (5 g, 20 mL n-hexane:DCM 1:1, 20 mL hexane) Protocole LC-MS : * filtration 0.2 µm (cellulose) * précipitation des protéines (-20 °C, 16 h)	Selon participants	NORMAN essai inter-laboratoire 2021
Poissons, crevettes, Espagne	<ul style="list-style-type: none"> * Stockage à -20°C * Dissection muscle * Lyophilisation * Broyage fin * Stockage à -20°C 	Prise d'essai : 0.5 g ps Extraction solide-liquide par ultrasons focalisés : ACN 10 mL	* Précipitation des protéines sur Captiva ND-Lipid (ACN 1% HCOOH)	LC-MS : * Chromatographie : Colonne ACE UltraCore PhenylHexyl (2.1 mm x 100 mm, 2.5 µm) * Détection HRMS : Orbitrap Q-Exactive (Thermo) Ionisation ESI+/- Mode DD-MS ² scan (m/z : 70 à 1050)	(Musatadi et al., 2020)

Matrice	Préparation	Extraction	Purification	Instrumentation	Référence
Truite, Grands Lacs, USA	* Broyage frais	Prise d'essai : 10 g pf + 15 g de desséchant * Dopage phénanthrène d10 * ASE : DCM	* GPC (DCM) * SPE PSA (6mL acétone/hexane 1:1)	GC-MS : * Chromatographie (GCxGC) : Colonnes SLB-IL60 x Rtx-200 (Supelco/Restek) * Détection HRMS : TOF Pegasus 4D GCxGC-HRT (LECO) Ionisation EI+ Mode MS scan	(Fernando et al., 2018)
Omble chevalier, Suède	* Dissection muscle * Broyage frais	Prise d'essai : 0.5 g pf * Ultrasons : hexane/DCM 1:1	* Silice (5 g, 10% H ₂ O, 5 mL hexane, 15 mL hexane/DCM (3:1), 30 mL DCM)	GC-MS : * Chromatographie : Colonne DB5-MS (Agilent) * Détection HRMS : Orbitrap Q-Exactive (Thermo) Ionisation EI+ Mode MS scan (m/z : 66.7 à 1000)	(Dubocq et al., 2022)
Dauphins, otarie, phoque, Californie, USA	* Dissection lard * Broyage frais * Stockage -20 °C	Prise d'essai : 20 g pf + desséchant * ASE : DCM * Dopage BDE 77 + ¹³ C ₁₂ -PCB 169	* GPC (acétate d'éthyle/acétone 1:1) (chaque échantillon 2 fois) * Dopage étalons d'injection	GC-MS : * Chromatographie (GCxGC) : Colonnes Rtx5Sil-MS x Rtx-17Sil-MS (Restek) * Détection HRMS : TOF Pegasus 4D GCxGC (LECO) Ionisation EI+ Mode MS scan	(Cossaboon et al., 2019)
Réseau trophique de la mer Baltique (de la moule au phoque), Suède	* Dissection (muscle, foie, lard) * Stockage -20 °C * Broyage frais	Prise d'essai : 5-50 g pf + desséchant (4:1; m/m) * Extraction solide/liquide sur colonne : 200 mL n-hexane:acétone (1:2.5, v/v), puis 150 mL n-hexane:diethyl ether (9:1, v/v)	* GPC (DCM/hexane (1:1), Phenogel puis 2 PLgel en série) * Florisil® (8 g, 1.2% H ₂ O, 38 mL hexane, 34 mL 15% DCM in n-hexane; 50% DCM in n-hexane, 54 mL; 8% methanol in DCM, 80 mL) * Dopage étalons d'injection	GC-MS : * Chromatographie : Colonne DB-5MS (Agilent) * Détection HRMS : Agilent 7250 QTOF-MS Ionisation EI+ Mode MS scan (m/z : 48 à 450)	(Rebryk and Haglund, 2020)
Moules (et sédiment), baie d'Hiroshima, Japon	* écoquillage * lyophilisation * broyage fin	Prise d'essai : 5 g ps * Extraction automatisée sur <i>High speed solvent extractor</i> au toluène et n-hexane:acétone (1:1 v/v) * Dopage aux PCB, PBDE et MeO-PBDE ¹³ C ₁₂	* GPC * Silice (4 g, 80 mL 5% DCM in n-hexane; 100 mL 25% DCM in n-hexane)	GC-MS : * Chromatographie (GCxGC) : Colonnes BPX5 x BPX50 (SGE) * Détection HRMS : JMS-T100GCV, high-resolution ToFMS (JEOL) Ionisation EI+ Mode MS scan (m/z : 150 à 750)	(Goto et al., 2020)

Matrice	Préparation	Extraction	Purification	Instrumentation	Référence
Perche commune, Suède	* broyage	Prise d'essai : 0.5 g pf * extraction solide-liquide ACN 0.1% acide formique (1 mL)	* filtration 0.2 µm (cellulose) * précipitation des protéines (-20 °C, 16 h)	LC-MS : * Chromatographie : Colonne HSS T3-C18 et BEH C18 (Waters) * Détection HRMS : Xevo G2-S (Waters) Ionisation ESI+/- Mode MS ² DIA (m/z : 100 à 1200)	(Dürig et al., 2020)