



**HAL**  
open science

# Approches et outils pour l'évaluation de l'Exposome : du dosage de contaminants vers le screening non ciblé pour la caractérisation des expositions humaines environnementales

Aurélie Cortejade

► **To cite this version:**

Aurélie Cortejade. Approches et outils pour l'évaluation de l'Exposome : du dosage de contaminants vers le screening non ciblé pour la caractérisation des expositions humaines environnementales. Chimie analytique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10219 . tel-01281417

**HAL Id: tel-01281417**

**<https://theses.hal.science/tel-01281417>**

Submitted on 2 Mar 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

Pour l'obtention

Du **DIPLOME DE DOCTORAT**

(Arrêté du 7 août 2006)

Spécialité : Chimie analytique

Soutenue le

20 novembre 2015

Par

**Aurélié CORTEJADE**

**Approches et outils pour l'évaluation de l'Exposome :  
Du dosage de contaminants vers le screening non ciblé pour la  
caractérisation des expositions humaines environnementales**

Thèse dirigée par le Dr. Emmanuelle VULLIET et le Dr. Cécile CREN-OLIVE

Jury :

Laurent DEBRAUWER  
Augustin SCALBERT  
Gérard HOPFGARTNER  
Cyril JOUSSE  
Estelle PUJOS-GUILLOT  
Didier LEONARD  
Cécile CREN-OLIVE  
Emmanuelle VULLIET

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Président du jury  
Directrice de thèse  
Directrice de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration  
Vice-président du Conseil des Etudes et de la  
Vie Universitaire  
Vice-président du Conseil Scientifique  
Directeur Général des Services

## **M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID  
M. le Professeur Philippe LALLE  
M. le Professeur Germain GILLET  
M. Alain HELLEU

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude  
Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon  
Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et  
Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la  
Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de  
Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de  
l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE



## RESUME en français

Ces travaux mettent en avant le développement de méthodes analytiques afin d'évaluer l'Exposome selon différentes stratégies.

Une méthode multirésidus sélective permettant l'analyse d'additifs plastiques et de leurs produits de dégradation pouvant être relargués par des emballages plastiques dans les boissons et les aliments, et ainsi être ingérés par l'Homme, a tout d'abord été mise au point. Cette méthode consiste en une extraction de type Stir Bar Sorptive Extraction sur des barreaux à base de dérivés de polydiméthylsiloxane des additifs plastiques ciblés, suivie d'une analyse par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôle.

Afin de détecter et quantifier une plus large gamme de contaminants entrant en contact avec l'Homme, une méthode de screening a été développée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution avec un instrument de type QqToF, à partir d'une matrice urinaire. La méthode de screening ciblé, validée selon les recommandations FDA, a permis de quantifier des contaminants appartenant à diverses familles dans l'urine, sans préparation préalable de l'échantillon, à des concentrations de l'ordre du ng/mL. Appliquée à des urines de volontaires, la méthode de screening non ciblé a permis d'émettre de nombreuses hypothèses d'identification de composés après fragmentation MS/MS.

La mise en place de tels outils pour caractériser l'Exposome, associée à des études statistiques et bio-informatiques, contribueront grandement à la compréhension des relations de causalité entre les maladies humaines et les facteurs environnementaux.

---

MOTS-CLES : Exposome, screening, spectrométrie de masse, chromatographie liquide



TITRE en anglais

Approaches and tools for assessing the Exposome: from dosage of contaminants to screening for characterization of human environmental exposure

---

RESUME en anglais

These research works highlight the development of analytical methods, based on mass spectrometry, to assess the Exposome according to different strategies.

A selective multiresidue method for the analysis of plastic additives and their degradation products that may be released by plastic packaging in food and beverages and thus ingested by man was developed. This method consists of a Stir Bar Sorptive Extraction with bars covered by polydimethylsiloxane derivatives, followed by an analysis by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with a triple quadrupole instrument.

To detect and quantify a wide range of contaminants in contact with man in daily routine, a screening method was developed by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry with a quadrupole-time-of-flight instrument from urinary matrix. The targeted screening method validated according to FDA guidelines allows the quantification of contaminants classified according to different families, in urine without sample preparation, at concentrations of the order of  $\text{ng.mL}^{-1}$ . This method was applied to volunteers' urine samples. The non-targeted screening method allows issuing numerous assumptions of compound identification after MS/MS fragmentation.

The implementation of this tool to measure the Exposome associated with statistical studies, contribute greatly to the understanding of the causal relationships between diseases and environmental factors.

---

MOTS-CLES en anglais : Exposome, screening, mass spectrometry, liquid chromatography

---

INTITULE ET ADRESSE DE L'UNITE OU DU LABORATOIRE :

Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne





## Remerciements

Je tiens à remercier Jean-Jacques Lebrun, ancien directeur du Service Central d'Analyse, de m'avoir recrutée, ainsi que les directeurs successifs de l'Institut des Sciences Analytiques, Pierre Toulhoat, Michel Lacroix et Nathalie Schildknech.

Je remercie ensuite le Dr. Laurent Debrauwer et le Dr. Augustin Scalbert, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également le Dr. Estelle Pujos-Guillot, le Pr. Gérard Hopfgartner, le Dr. Cyril Jousse et le Pr. Didier Léonard d'avoir accepté de juger mon travail en tant qu'examineurs.

Cette thèse a été dirigée successivement par le Dr. Cécile Cren-Olivé et le Dr. Emmanuelle Vulliet. Je les remercie de m'avoir accueillie au sein de leur équipe et de m'avoir épaulé tout au long de cette aventure.

Je remercie également Audrey Buleté, ma co-encadrante, qui m'a toujours soutenue, écoutée et guidée. Tes précieux conseils et ta patience m'ont beaucoup apportés.

Je souhaite aussi remercier Agneta Kiss pour toutes les discussions enrichissantes que l'on a pu avoir, autant professionnelles que personnelles. Merci d'avoir partagé tes connaissances et ton expérience de la thèse avec moi. Je n'oublie pas non plus tes cours de roumain devant la LC-2D (Vom continua ?!)

Je continuerai en remerciant Laura Prouteau, mon binôme des barreaux. Sans toi je n'aurais probablement pas pu présenter autant de résultats sur la partie consacrée à l'extraction SBSE.

Je remercie l'ensemble de l'équipe TRACES et plus particulièrement les personnes avec qui j'ai étroitement travaillé et qui ont pris de leur temps pour s'intéresser à mon projet, notamment Aurélie Fildier pour m'avoir accompagnée dans une virée à Champs-sur-Marne !

Je remercie également les différents acteurs de ce travail : Stéphane Hupont, pour avoir réalisé l'outil de calibration des barreaux SBSE, Pedro Marote pour les séances de MEB, Olivier Païssé pour les photos « pro » des barreaux, Patrick Jame pour le prêt de l'appareil pour le conditionnement des barreaux SBSE, Alexandre Verdu qui a permis la

collaboration avec Bruker et Bluestar Silicones pour nous avoir fourni les matières premières de nos barreaux SBSE artisanaux...

Merci à toutes les personnes croisées durant ces trois années, qui ont rendu ce travail plus agréable. Elles se reconnaîtront.

Et le meilleur pour la fin ! Mon aventure n'aurait pas été si « facile » sans mon acolyte, Claire Jabot, avec qui j'ai commencé ce parcours. Tout au long de ces trois années, on aura partagé des galères mais aussi des fous rires, beaucoup de fous rires, parfois (souvent !) en chanson. Nous avons vécu chaque moment de thèse ensemble et ça a été un plaisir de partager mon bureau avec toi.

Je remercie également mes proches sans qui ce manuscrit n'existerait sans doute pas...

## Communications scientifiques

### *Publications dans des journaux à comité de lecture*

Development of an analytical method for the targeted screening and multi-residue quantification of environmental contaminants in urine by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for evaluation of human exposures, A. Cortéjade, A. Kiss, C. Cren, E. Vulliet, A. Buleté, *Talanta* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.038>

Development, optimisation and application of Stir Bar Sorptive Extraction with home-made bar for analysis of environmental contaminants in human urine, A. Cortéjade, L. Prouteau, S. Chatti, C. Cren, E. Vulliet, A. Buleté (en préparation)

### *Communications orales*

Outils et approches pour l'évaluation de l'Exposome : du dosage de contaminants vers le screening non ciblé, A. Cortéjade, A. Kiss, C. Cren, E. Vulliet, **A. Buleté**

Congrès français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique, 15 septembre - 18 septembre 2015, Ajaccio

### *Communications par affiches*

Evaluation de l'Exposome par chromatographie liquide bidimensionnelle comprehensive couplée à la spectrométrie masse haute résolution, **A. Cortéjade**, A. Kiss, S. Chatti, C. Cren-Olivé

Journée Rhône-Alpes des Biomolécules, 7 juin 2013, Villeurbanne

Evaluation of Exposome: multi-residue analysis from urine by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), **A. Cortéjade**, A. Kiss, C. Cren, E. Vulliet, A. Buleté

Society of environmental toxicology and chemistry, 11-15 may 2014, Basel - Switzerland

Evaluation de l'Exposome: Analyse multi-résidus à partir d'urine par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS), **A. Cortéjade**, A. Kiss, A. Buleté, C. Cren-Olivé

Congrès français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique, 30 juin - 2 juillet 2014, Villeurbanne

Evaluation de l'Exposome: développement d'une méthode d'extraction par SBSE d'additifs plastiques dans l'eau et analyse par UHPLC-MS/MS, **A. Cortéjade**, L. Prouteau, C. Pouech, S. Chatti, A. Buleté, C. Cren-Olivé

Congrès français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique, 30 juin - 2 juillet 2014, Villeurbanne

Evaluation de l'Exposome: Screening non ciblé dans l'urine par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution, A. Cortéjade, A. Kiss, C. Cren, E. Vulliet, **A. Buleté**

Congrès français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique, 15 septembre - 18 septembre 2015, Ajaccio

### *Posters spotlight*

Evaluation of the Exposome: Non-targeted screening analysis of environmental contaminants in human urine by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry, **A. Cortéjade**, A. Kiss, C. Cren, E. Vulliet, A. Buleté

Society of environmental toxicology and chemistry, 3-7 may 2015, Barcelona - Spain

## Abréviations

AA : Acide Acétique

AcAm : Acétate d'Ammonium

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AF : Acide Formique

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization

BAB : Barreau d'Agitation Blue

BAW 1 : Barreau d'Agitation White 1

BAW 2 : Barreau d'Agitation White 2

BAWs : Barreaux d'Agitation White 1 et 2

CE : Collision Energy

CF-SBSE : Continuous Flow SBSE

CIRC : Centre International de Recherche contre le Cancer

CIS : Cooled Injection System

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CPL : Chromatographie en Phase Liquide

CV : Coefficient de Variation

DAD : Diode Array Detector

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

DP : Declustering Potential

EIC : Extract Ion Chromatogram

EMA : European Medicines Agency

ESI : Electrospray Ionisation

FDA : Food and Drug Administration

FmAm : Formiate d'Ammonium

FT-ICR : Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance

FWHM : Full Width at Half Maximum (largeur à mi-hauteur)

GC : Gas Chromatography

HILIC : Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HPLC-FLD : High Performance Liquid Chromatography coupled to Fluorescence detection

HPLC-UV : High Performance Liquid Chromatography coupled to Ultraviolet detection

HRMS : High Resolution Mass Spectrometry

HSSE : Headspace Sorptive Extraction  
ICP-MS : Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry  
INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques  
 $K_{o/w}$  : Coefficient de partage octanol/eau  
LC : Liquid Chromatography  
LC-1D : Chromatographie Liquide Unidimensionnelle  
LC-2D : Chromatographie Liquide Bidimensionnelle  
LLE : Liquid-liquid Extraction  
LOD : Limit of Detection  
LOQ : Limit of Quantification  
MEB : Microscope Electronique à Balayage  
MeOH : Méthanol  
MRM : Multiple Reaction Monitoring  
MS : Mass Spectrometry  
MS/MS : Spectrometrie de Masse en tandem  
MTBE : Méthyl tert-butyle éther  
ND : Non Disponible  
oaToF : Orthogonal Acceleration ToF  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PDMS : Polydiméthylsiloxane  
PFP : PentaFluoroPhényle  
PNSE : Plan National Santé-Environnement  
QqQ : Triple Quadripôle  
QqToF : Quadrupôle-Time-of-Flight  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
RP : Reverse Phase  
SBSE : Stir Bar Sorptive Extraction  
SPE : Solid Phase Extraction  
TDU : Thermal Desorption Unit  
TIC : Total Ion Chromatogram  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
ToF : Time-of-Flight  
Tr : Temps de Rétention  
UHPLC : Ultra High Performance Liquid Chromatography  
UV : Ultra-Violet  
WHO : World Health Organization

# Table des matières

RESUME en français	3
TITRE en anglais	5
RESUME en anglais	5
Remerciements	7
Communications scientifiques	9
Abréviations	11
Table des matières	13
Liste des figures	19
Liste des tableaux	23
Liste des équations	27
Introduction générale	29
<b>Chapitre I : L'Exposome</b>	<b>35</b>
I.1. L'impact de l'environnement sur la santé humaine	37
I.2. L'Exposome	39
I.3. Stratégies épidémiologiques	42
I.3.1. Ascendante	42
I.3.2. Descendante	42
I.4. Choix de la matrice biologique	43
I.5. Stratégies analytiques	44
I.5.1. Approche ciblée	44
I.5.2. Approche non ciblée	45
I.6. Techniques analytiques utilisées dans l'étude de l'Exposome	45
I.6.1. La résonance magnétique nucléaire (RMN)	46
I.6.1.1. Principe	46
I.6.1.2. Applications	46
I.6.2. La spectrométrie de masse couplée à des techniques séparatives	47
I.6.2.1. Critères d'identification des composés selon les normes	47
I.6.2.2. Séparation des composés par chromatographie	48
I.6.2.2.1. Généralités et principe	48
I.6.2.2.2. La chromatographie liquide bidimensionnelle (LC-2D)	50
I.6.2.3. Détection des composés par spectrométrie de masse	50
I.6.2.3.1. Généralités et principe	50
I.6.2.3.2. Sources d'ionisation	51
I.6.2.3.2.1. Source electrospray (ESI)	52
I.6.2.3.3. Analyseurs	53
I.6.2.3.3.1. Analyseur de type triple quadripôle	54



I.6.2.3.3.2.	Analyseur de type temps de vol	55
I.6.2.4.	Applications	57
I.7.	Conclusion	58
	Références bibliographiques	59

## **Chapitre II : Développement d'une méthode d'extraction par SBSE d'additifs plastiques suivie d'une analyse par UHPLC-MS/MS**

II.1.	Introduction et objectifs de l'étude	69
II.2.	Etat de l'art	69
II.2.1.	Choix des composés d'intérêt	69
II.2.2.	Extraction des composés d'intérêt	72
II.2.2.1.	Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)	73
II.2.2.1.1.	Théorie et principe	73
II.2.2.1.2.	Les différents types de SBSE	74
II.2.2.1.3.	Facteurs influençant l'extraction	77
II.2.2.1.4.	Les applications	79
II.2.2.1.5.	Caractérisation structurale des phases d'extraction par MEB	82
II.2.3.	Critères d'identification des composés	82
II.2.4.	Evaluation des performances de la méthode d'extraction	83
II.2.4.1.	Répétabilité	83
II.2.4.2.	Rendements d'extraction	83
II.2.4.3.	Effets de matrice	84
II.3.	Matériels et méthodes	85
II.3.1.	Standards et réactifs	85
II.3.1.1.	Standards analytiques	85
II.3.1.2.	Solvants	86
II.3.1.3.	Barreaux SBSE	86
II.3.2.	Processus d'échantillonnage et préparation d'échantillon	87
II.3.3.	Purification des solvants par distillation	88
II.3.3.1.	Principe	88
II.3.3.2.	Dispositif expérimental	88
II.3.4.	Fabrication des barreaux d'extraction SBSE artisanaux	89
II.3.5.	Extraction des additifs plastiques par des barreaux SBSE artisanaux	91
II.3.6.	Caractérisation structurale des phases d'extraction des barreaux SBSE par MEB	92
II.3.7.	Analyse par UHPLC-MS/MS	93
II.3.8.	Traitement de données	94
II.4.	Résultats et discussion	97
II.4.1.	Etudes préliminaires à l'optimisation de l'extraction	98

II.4.1.1. Choix de la concentration de dopage	98
II.4.1.2. Evaluation de la répétabilité de la méthode analytique	99
II.4.1.2.1. Fabrication des barreaux d'extraction SBSE	99
II.4.1.2.2. Conditionnement des barreaux d'extraction	100
II.4.1.2.3. Dissolution/précipitation	105
II.4.1.2.4. Influence de la plaque d'agitation	108
II.4.2. Caractérisation de la phase d'extraction par MEB	110
II.4.3. Optimisation de l'extraction	112
II.4.3.1. Stratégie d'optimisation	112
II.4.3.2. Paramètres à optimiser	113
II.4.3.3. Optimisation de l'étape de désorption	113
II.4.3.3.1. Choix du solvant de désorption	113
II.4.3.3.2. Détermination du nombre de répétitions de l'étape de désorption	117
II.4.3.3.3. Optimisation du volume de solvant de désorption	122
II.4.3.3.4. Choix de la durée de l'étape de désorption	126
II.4.3.4. Optimisation de la durée de l'étape d'adsorption	130
II.4.4. Application à l'urine	136
II.4.4.1. Efficacité de l'extraction	136
II.4.4.2. Détermination des effets de matrice	140
II.4.5. Evaluation de l'extraction avec des barreaux commerciaux	144
II.5. Conclusion et perspectives	147
Références bibliographiques	149

### **Chapitre III : Développement et validation d'une méthode de screening ciblé dans l'urine par HPLC-HRMS**

III.1. Introduction et objectifs de l'étude	159
III.2. Etat de l'art	159
III.2.1. Choix des composés d'intérêt	159
III.2.1.1. Les pesticides	160
III.2.1.2. Les médicaments vétérinaires	167
III.2.1.3. Les parabènes	169
III.2.1.4. Les tensioactifs	170
III.2.1.5. Les retardateurs de flamme	171
III.2.1.6. Les additifs plastiques	173
III.2.1.7. Les filtres UV	174
III.2.1.8. Les alkylphénols	175
III.2.1.9. Les composés perfluorés	176
III.2.1.10. Les composés non classés	178

III.2.2. Analyse des composés d'intérêt dans les matrices biologiques	180
III.2.2.1. Préparation d'échantillon	180
III.2.2.2. Séparation des composés d'intérêt par chromatographie liquide	180
III.2.2.3. Détection des composés d'intérêt par spectrométrie de masse	187
III.2.2.3.1. Choix du mode d'ionisation préférentiel pour les composés d'intérêt	187
III.2.2.3.2. Comparaison des spectromètres de masse de type QqQ et des spectromètres de masse haute résolution	191
III.2.3. Qualification des performances analytiques et validation des méthodes	191
III.2.3.1. Critères d'identification des composés et spécificité d'une méthode d'analyse	192
III.2.3.2. Précision	192
III.2.3.3. Exactitude (Kruve et al., 2015b)	193
III.2.3.4. Effets de matrice	193
III.2.3.5. Limites de détection et de quantification	194
III.2.3.6. Validation de la linéarité d'une méthode (Kruve et al., 2015b)	195
III.3. Matériels et méthodes	196
III.3.1. Standards et réactifs	196
III.3.1.1. Standards analytiques	196
III.3.1.2. Solvants	196
III.3.2. Processus d'échantillonnage et préparation d'échantillon	197
III.3.2.1. Processus d'échantillonnage	197
III.3.2.2. Préparation d'échantillon	197
III.3.3. Analyse par HPLC-HRMS	198
III.3.4. Traitement de données	200
III.3.5. Validation de méthode	201
III.4. Résultats et discussion	203
III.4.1. Développement analytique	205
III.4.1.1. Optimisation de la détection des composés par spectrométrie de masse	205
III.4.1.1.1. Caractérisation des composés par spectrométrie de masse	205
III.4.1.1.2. Optimisation des conditions de détection	208
III.4.1.1.2.1. Composition des phases mobiles	209
III.4.1.1.2.2. Paramètres de transfert du spectromètre de masse	211
III.4.1.1.3. Optimisation des paramètres de source	212
III.4.1.1.3.1. Stratégie d'optimisation	212
III.4.1.1.3.2. Pression du gaz de nébulisation	213
III.4.1.1.3.3. Débit du gaz de séchage	215
III.4.1.1.3.4. Température du gaz de séchage	217
III.4.1.1.3.5. Voltage du capillaire	219
III.4.1.2. Optimisation des paramètres chromatographiques	221
III.4.1.2.1. Choix des phases mobiles	221

III.4.1.2.2.	Comparaison des phases stationnaires	224
III.4.1.2.3.	Optimisation des gradients	225
III.4.1.2.3.1.	Optimisation du gradient pour le mélange ESI positif	225
III.4.1.2.3.2.	Optimisation du gradient pour le mélange ESI négatif	226
III.4.1.2.4.	Application à l'urine	228
III.4.2.	Détermination des performances analytiques des méthodes	229
III.4.2.1.	Estimations des limites de quantification et du modèle mathématique de la courbe de calibration	229
III.4.2.2.	Validation des méthodes ESI positif et négatif	233
III.4.2.3.	Détermination des limites de détection et de quantification	236
III.4.2.4.	Evaluation des effets de matrice	238
III.4.3.	Etudes d'échantillons réels	241
III.4.3.1.	Application des méthodes développées à des échantillons réels	241
III.4.3.2.	Recherche des métabolites connus et autres contaminants environnementaux	242
III.5.	Conclusions et perspectives	246
	Références bibliographiques	249

## **Chapitre IV : Recherche et identification de contaminants environnementaux**

	dans l'urine par screening non ciblé	267
IV.1.	Introduction et objectifs de l'étude	269
IV.2.	Etat de l'art	269
IV.2.1.	Les méthodes de screening	269
IV.2.1.1.	Définition	269
IV.2.1.2.	Les différentes stratégies	270
IV.2.1.2.1.	Screening semi ciblé	270
IV.2.1.2.2.	Screening non ciblé	271
IV.2.2.	Les outils	271
IV.2.3.	Préparation d'échantillon	271
IV.2.4.	Le traitement des données	273
IV.2.4.1.	Critères d'identification	273
IV.2.4.2.	Interrogation des bases de données	274
IV.3.	Matériels et méthodes	275
IV.3.1.	Solvants	275
IV.3.2.	Processus d'échantillonnage et préparation d'échantillon	275
IV.3.2.1.	Processus d'échantillonnage	275
IV.3.2.2.	Préparation d'échantillon	276
IV.3.3.	Analyse par LC-HRMS	276
IV.3.4.	Traitement de données	279

IV.4. Résultats et discussion	283
IV.4.1. Préparation d'échantillon	283
IV.4.2. Analyse en mode full-scan (MS)	285
IV.4.2.1. Prétraitement des données brutes	285
IV.4.2.1.1. Calibration des spectres de masse	286
IV.4.2.1.2. Détection des pics chromatographiques	286
IV.4.2.2. Traitement des données	287
IV.4.2.2.1. Interrogations des bases de données pour la comparaison des masses exactes	287
IV.4.2.2.2. Corrélation du profil isotopique	288
IV.4.3. Analyse en mode MS/MS	289
IV.4.3.1. Mode HRMRM	289
IV.4.3.2. Mode auto MS/MS	295
IV.4.3.2.1. MicrOTOF Q II	296
IV.4.3.2.2. Impact HD	299
IV.4.3.2.2.1. Base de données TracesBank	299
IV.4.3.2.2.2. Base de données DrugBank	307
IV.4.3.3. Comparaison des résultats obtenus avec le MicrOTOF Q II et l'Impact HD	312
IV.5. Conclusion et perspectives	313
Références bibliographiques	315
Conclusion générale	321
Annexes	327

## Liste des figures

Figure 1 : Organisation des travaux de thèse et du manuscrit	32
Figure I- 1 : Pourcentage de susceptibilité de développer un cancer selon les facteurs génétiques ou environnementaux (Czene et al., 2002)	37
Figure I- 2 : Variabilité de l'Exposome d'un individu en fonction de son âge (Athersuch, 2012)	40
Figure I- 3 : Les différents types de chromatographie liquide (Skoog et al., 2003)	49
Figure I- 4 : Domaines d'application des principales sources d'ionisation selon la polarité et la masse moléculaire (Syage et al., 2008)	52
Figure I- 5 : Principe de la source electrospray (lamondlab, n.d.)	53
Figure I- 6 : Schéma du triple quadripôle 3200 QTrap d'ABSciex (ABSciex, 2005)	54
Figure I- 7 : Schéma du MicrOTOF Q II (Bruker, 2008) et photos de (a) la zone de transfert et de l'hexapôle, et (b) du bloc source	56
Figure II- 1 : Barreau SBSE	73
Figure II- 2 : Adsorption en mode immersion lors d'une extraction SBSE	75
Figure II- 3 : Adsorption en mode « headspace » lors d'une extraction SBSE à partir d'un échantillon liquide	76
Figure II- 4 : Poste de distillation consacré à la distillation des solvants et de l'eau pour cette étude	89
Figure II- 5 : Processus de préparation de la phase d'extraction. Exemple pour la phase d'extraction correspondant aux BAB	90
Figure II- 6 : Processus de démoulage de la phase d'extraction et de la découpe des barreaux d'agitation. Exemple pour la phase d'extraction correspondant aux BAB	91
Figure II- 7 : Microscope Electronique à Balayage utilisé	93
Figure II- 8 : Système UHPLC-MS/MS utilisé	93
Figure II- 9 : Schéma récapitulatif des grandes étapes du développement de la méthode d'extraction SBSE	97
Figure II- 10 : Chromatogramme des additifs plastiques ciblés en mode ESI positif	98
Figure II- 11 : Chromatogramme des additifs plastiques ciblés en mode ESI négatif	99
Figure II- 12 : Excès de phase non polymérisée sous forme d'huile retrouvé dans le solvant de désorption pendant son évaporation	100
Figure II- 13 : Courbes cinétiques moyennes obtenues pendant le conditionnement par agitation magnétique d'après la perte de masse d'un barreau BAB	101
Figure II- 14 : Conditionnement de quatre barreaux BAB par Soxhlet	102
Figure II- 15 : Courbe cinétique moyenne obtenue pendant le conditionnement par Soxhlet à l'acétone distillée d'après la perte de masse d'un barreau BAB	103
Figure II- 16 : Différences d'aspects entre des barreaux BAB conditionnés ou non	103
Figure II- 17 : Protocole de dissolution/précipitation sur la phase huileuse récupérée après évaporation du solvant de désorption	107
Figure II- 18 : Photos de surface de barreaux BAB non conditionné (A), conditionné par agitation magnétique (B) et par Soxhlet (C) au grossissement x 500 au MEB	110
Figure II- 19 : Photos de surface de barreaux BAB (A), BAW 2 (B) et BAW 1 (C) au grossissement x 500 au MEB	111
Figure II- 20 : Photos de surface de barreaux BAB « polymérisés » à 45°C pendant 15h (A), 48h (B) et 110h (C) au grossissement x 100 au MEB	112

Figure II- 21 : Rendements d'extraction en fonction du solvant de désorption pour les BAW 2	116
Figure II- 22 : Influence du nombre de répétitions de l'étape de désorption sur les rendements d'extraction pour trois composés avec les BAB	118
Figure II- 23 : Influence du nombre de répétitions de l'étape de désorption sur les rendements d'extraction pour cinq composés avec les BAW 1	119
Figure II- 24 : Influence du nombre de répétitions de l'étape de désorption sur les rendements d'extraction pour cinq composés avec les BAW 2	120
Figure II- 25 : Rendements d'extraction en fonction du volume de solvant de désorption pour les BAB	123
Figure II- 26 : Rendements d'extraction en fonction du volume de solvant de désorption pour les BAW 1	124
Figure II- 27 : Rendements d'extraction en fonction du volume de solvant de désorption pour les BAW 2	125
Figure II- 28 : Influence de la durée de désorption sur les rendements d'extraction pour quatre composés avec les BAB	127
Figure II- 29 : Influence de la durée de désorption sur les rendements d'extraction pour sept composés avec les BAW 1	128
Figure II- 30 : Influence de la durée de désorption sur les rendements d'extraction pour sept composés avec les BAW 2	129
Figure II- 31 : Influence de la durée d'adsorption sur les rendements d'extraction pour cinq composés avec les BAB	132
Figure II- 32 : Influence de la durée d'adsorption sur les rendements d'extraction pour six composés avec les BAW 1	133
Figure II- 33 : Influence de la durée d'adsorption sur les rendements d'extraction pour six composés avec les BAW 2	134
Figure II- 34 : Rendements d'extraction des composés, avec des réponses répétables, contenus dans un échantillon d'eau dopée en fonction du type de barreaux SBSE utilisé	139
Figure II- 35 : Rendements d'extraction des composés, avec des réponses répétables, contenus dans un échantillon d'urine dopée en fonction du type de barreaux SBSE utilisé	140
Figure II- 36 : Effets de matrice des composés extraits, avec des réponses répétables, dans l'eau et dans l'urine par les barreaux BAB	142
Figure II- 37 : Effets de matrice des composés extraits, avec des réponses répétables, dans l'eau et dans l'urine par les barreaux BAW 1	142
Figure II- 38 : Effets de matrice des composés extraits, avec des réponses répétables, dans l'eau et dans l'urine par les barreaux BAW 2	143
Figure II- 39 : Rendements d'extraction des composés extraits dans l'urine par les barreaux BAB et les barreaux commerciaux	145
Figure II- 40 : Rendements d'extraction des composés extraits dans l'urine par les barreaux BAW 1 et les barreaux commerciaux	145
Figure II- 41 : Rendements d'extraction des composés extraits dans l'urine par les barreaux BAW 2 et les barreaux commerciaux	146
Figure III- 1 : Photographie du système UHPLC Ultimate 3000-MicrOTOF Q II utilisé	199
Figure III- 2 : Schéma récapitulatif du développement, de l'optimisation des méthodes et du processus de validation de méthode	204

Figure III- 3 : Intensités normalisées des substances d'intérêt selon les deux meilleures compositions de phases mobiles en ESI négatif	210
Figure III- 4 : Intensités normalisées de 26 substances d'intérêt sur 36 selon les meilleures compositions de phases mobiles en ESI positif	211
Figure III- 5 : Aires normalisées de 11 substances d'intérêt selon différentes pressions de gaz de nébulisation en ESI positif	214
Figure III- 6 : Aires normalisées de dix substances d'intérêt selon différentes pressions de gaz de nébulisation en ESI négatif	215
Figure III- 7 : Aires normalisées de neuf substances d'intérêt selon différents débits de gaz de séchage en ESI positif	216
Figure III- 8 : Aires normalisées de huit substances d'intérêt selon différents débits de gaz de séchage en ESI négatif	217
Figure III- 9 : Aires normalisées de neuf substances d'intérêt selon différentes températures de gaz de séchage en ESI positif	218
Figure III- 10 : Aires normalisées de huit substances d'intérêt selon différentes températures de gaz de séchage en ESI négatif	219
Figure III- 11 : Aires normalisées de six substances d'intérêt selon différents voltages de capillaire en ESI positif	220
Figure III- 12 : Aires normalisées de huit substances d'intérêt selon différents voltages de capillaire en ESI négatif	220
Figure III- 13 : Aires normalisées de 11 substances d'intérêt selon différents pourcentages d'acide formique dans les phases mobiles en ESI positif	222
Figure III- 14 : Aires normalisées de 18 substances d'intérêt selon deux concentrations de formiate d'ammonium dans les phases mobiles en ESI positif	223
Figure III- 15 : Aires normalisées de neuf substances d'intérêt selon la quantité d'acide acétique dans les phases mobiles en ESI négatif	224
Figure III- 16 : Chromatogramme de l'eau dopée à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec les 57 composés d'intérêt en mode d'ionisation positif	226
Figure III- 17 : Chromatogramme de l'eau dopée à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec les 57 composés d'intérêt en mode d'ionisation négatif	227
Figure III- 18 : Chromatogramme d'un pool d'urines dopées à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec les 57 composés d'intérêt en mode d'ionisation (a) positif et (b) négatif	229
Figure III- 19 : LOQ méthodologiques estimées pour 27 substances d'intérêt	231
Figure III- 20 : (a) Chromatogramme de l'EIC correspondant à la masse 169,01 et (b) spectres de masse de l'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium et de la substance endogène dans le pool d'urines dopées à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$	235
Figure III- 21 : Chromatogrammes de l'ion à 152,0712 Da extrait (a) de la solution standard de paracétamol et (b) de l'échantillon d'urine	245
Figure III- 22 : Spectres de fragmentation de l'ion à 152,07 Da (a) dans la solution standard de paracétamol et (b) dans l'échantillon d'urine à 20 eV	246
Figure IV- 1 : Evolution du nombre de publications scientifiques pour l'utilisation ou le développement de méthodes de screening en spectrométrie de masse (MS) et avec des appareils de haute résolution (HRMS) (Source : Titanescience juillet 2015)	270
Figure IV- 2 : Photographie de la chaîne de chromatographie liquide UHPLC Ultimate 3000 couplée au spectromètre de masse Impact HD	277
Figure IV- 3 : Stratégie de traitement des données acquises avec le MicrOTOF Q II	281



Figure IV- 4 : Stratégie de traitement des données acquises avec l'Impact HD	282
Figure IV- 5 : Chromatogrammes (TIC) obtenus sur le MicrOTOF Q II en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b)	284
Figure IV- 6 : Chromatogrammes (TIC) en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) obtenus sur le MicrOTOF Q II et l'Impact HD	285
Figure IV- 7 : Chromatogramme de la masse 181,0719 Da (a) et spectres de fragmentation à 30 (b) et 20 eV (c) du pic chromatographique à 3,1 min	294
Figure IV- 8 : Spectres de fragmentation de la masse 179,03 Da à 30 (a) et 20 eV (b) du pic chromatographique à 3,8 min	295
Figure IV- 9 : Spectres de fragmentation expérimental (a) et de référence (MassBank) (b) à 30 eV de la masse 319,16 Da correspondant potentiellement au fénoxycarbe	298
Figure IV- 10 : Chromatogramme de la masse 122,0964 Da (a) et spectres de fragmentation à 19 eV (b) du pic chromatographique à 1 min	301
Figure IV- 11 : Spectre de masse théorique de la 2,4-diméthylaniline proposé par MetFrag et la structure de sa molécule native et son unique fragment en commun avec les données expérimentales	301
Figure IV- 12 : Chromatogramme de la masse 205,1595 Da (a) et spectre de fragmentation à 40 eV (b) du pic chromatographique à 18,5 min	303
Figure IV- 13 : Structure du 4-tert-octylphénol et de ses fragments, proposés par MetFrag, en commun avec les données expérimentales	303
Figure IV- 14 : Chromatogramme de la masse 283,2636 Da (a) et spectre de fragmentation à 40 eV (b) du pic chromatographique à 24 min	308
Figure IV- 15 : Structure de l'acide stéarique et de ses fragments, proposés par MetFrag, en commun avec les données expérimentales	308

## Liste des tableaux

Tableau I- 1 : Comparaison des caractéristiques des analyseurs triple quadripôle et temps de vol avec ou sans quadripôle couplé à la chromatographie liquide (De Hoffmann and Stroobant, 2005; Ferrer and Thurman, 2003; Holčapek et al., 2012)	54
Tableau II- 1: Caractéristiques physico-chimiques des additifs plastiques d'intérêt avec leur numéro CAS, leur formule brute, la valeur du logarithme de leur coefficient de partage octanol/eau et leur structure	71
Tableau II- 2 : Application de la SBSE au secteur de la santé sur des échantillons biologiques	80
Tableau II- 3 : Application de la SBSE aux additifs plastiques	81
Tableau II- 4 : Structures des monomères composant les barreaux SBSE artisanaux	87
Tableau II- 5 : Quantités de produits nécessaires à la fabrication de chaque type de barreaux	90
Tableau II- 6 : Paramètres de fabrication et d'extraction fixés (en bleu) et optimaux pour les trois types de barreaux artisanaux	92
Tableau II- 7 : Conditions chromatographiques des méthodes d'analyse	94
Tableau II- 8 : Paramètres UHPLC-MS/MS des additifs plastiques	96
Tableau II- 9 : Coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'évaluation de la répétabilité après utilisation de barreaux BAB conditionnés par agitation magnétique ou par Soxhlet (n = 3)	105
Tableau II- 10 : Coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'évaluation de la répétabilité après extraction SBSE avec des barreaux BAB et une dissolution/précipitation (n = 3)	108
Tableau II- 11 : Coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'évaluation de la répétabilité après extraction SBSE avec une plaque d'agitation neuve (n = 3)	109
Tableau II- 12 : Rendements d'extraction obtenus pour les additifs plastiques ciblés dans l'eau dopée et dans l'urine dopée après extraction avec les barreaux BAB, BAW 1 et BAW 2 (n = 3)	137
Tableau III- 1 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des pesticides et de leurs métabolites sélectionnés (ND : non disponible)	163
Tableau III- 2 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des médicaments vétérinaires sélectionnés (ND : non disponible)	168
Tableau III- 3 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des parabènes et de leur métabolite sélectionnés	170
Tableau III- 4 : Structure et caractéristiques physico-chimiques du tensioactif sélectionné	171
Tableau III- 5 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des retardateurs de flamme et d'un métabolite sélectionnés (ND : non disponible)	173
Tableau III- 6 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des additifs plastiques et d'un métabolite sélectionnés (ND : non disponible)	174
Tableau III- 7 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des filtres UV sélectionnés (ND : non disponible)	175
Tableau III- 8 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des alkylphénols sélectionnés	176
Tableau III- 9 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des composés perfluorés sélectionnés (ND : non disponible)	178
Tableau III- 10 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des composés non classés sélectionnés (ND : non disponible)	179

Tableau III- 11 : Synthèse des méthodes d'analyse des substances sélectionnées en chromatographie liquide, gazeuse ou ionique couplée à la spectrométrie de masse	183
Tableau III- 12 : Synthèse des modes d'ionisation relevés dans la littérature lors de l'utilisation d'une source electrospray	188
Tableau III- 13 : Conditions analytiques des méthodes développées	200
Tableau III- 14 : Composés ciblés et masse exacte de leurs ions caractéristiques	207
Tableau III- 15 : Paramètres de transfert optimaux des méthodes en ESI+ et ESI-	212
Tableau III- 16 : Conditions de détection de la méthode initiale	213
Tableau III- 17 : Gammes de linéarité estimées pour 27 composés	232
Tableau III- 18 : Plan de validation sur trois jours pour chaque composé (gamme de concentration estimée, nombre de points par gamme de calibration et concentration pour les trois niveaux de concentration de dopage de la gamme (bas (C1), moyen (C2), et haut niveau (C3)) au jour 1 (J1), jour 2 (J2) et jour 3 (J3))	233
Tableau III- 19 : Performances et validation des méthodes LC-HRMS pour chaque composé (gamme de concentration, modèle de la courbe de calibration, limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), effets de matrice, coefficient de détermination ( $R^2$ ) pour les trois jours (J1, J2 et J3), précision intermédiaire, répétabilité et exactitude obtenues pour les trois niveaux de concentration de la gamme dynamique (faible (C1), moyenne (C2), et haute concentration (C3))	240
Tableau III- 20 : Composés à rechercher, masse exacte de leurs potentiels ions caractéristiques (en Da) et les références des molécules sélectionnées	243
Tableau IV- 1 : Spécificités de des deux spectromètres de masse utilisés	277
Tableau IV- 2 : Conditions analytiques des méthodes utilisées	278
Tableau IV- 3 : Nombre de masses exactes détectées en fonction du spectromètre de masse utilisé et du type d'échantillon analysé	286
Tableau IV- 4 : Nombre de composés suspectés présents dans l'échantillon avec une tolérance de masse exacte de 3 ppm	288
Tableau IV- 5 : Nombre de composés suspectés présents dans l'échantillon avec une tolérance de masse exacte de 3 ppm et une déviation du profil isotopique inférieure ou égale à 30 msigma	289
Tableau IV- 6 : Nombre de composés suspectés présents dans l'échantillon remplissant les critères de tolérance de masse exacte, de déviation du profil isotopique, d'intensité et de disponibilité des spectres de masse de référence correspondants	290
Tableau IV- 7 : Composés suspectés présents dans l'échantillon d'urine analysé par le MicrOTOF Q II d'après la base de données DrugBank	292
Tableau IV- 8 : Composés suspectés présents dans l'échantillon d'urine analysé par le MicrOTOF Q II d'après la base de données TracesBank	297
Tableau IV- 9 : Composés suspectés présents dans l'échantillon d'urine analysé par l'Impact HD d'après la base de données TracesBank	304
Tableau IV- 10 : Composés suspectés présents dans l'échantillon d'urine analysé par l'Impact HD d'après la recherche dans la base de données DrugBank avec des signaux d'intensité > 106 coups	311
Tableau IV- 11 : Résumé des différents composés suspectés présents dans l'échantillon analysé par l'Impact HD d'après les fragments	312
Tableau A- 1 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAB (n=3)	329

Tableau A- 2 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 1 (n=3)	330
Tableau A- 3 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 2 (n=3)	331
Tableau A- 4 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du nombre de répétition de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAB (n=3)	332
Tableau A- 5 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du nombre de répétition de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 1 (n=3)	333
Tableau A- 6 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du nombre de répétition de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 2 (n=3)	334
Tableau A- 7 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du volume du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAB (n=3)	335
Tableau A- 8 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du volume du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 1 (n=3)	336
Tableau A- 9 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du volume du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 2 (n=3)	337
Tableau A- 10 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAB (n=3)	338
Tableau A- 11 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 1 (n=3)	339
Tableau A- 12 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 2 (n=3)	340
Tableau A- 13 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape d'adsorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAB (n=3)	341
Tableau A- 14 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape d'adsorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 1 (n=3)	342
Tableau A- 15 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape d'adsorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 2 (n=3)	343
Tableau A- 16 : Rendements d'extraction obtenus pour l'évaluation de l'efficacité d'extraction SBSE avec les barreaux artisanaux (BAB, BAW 1, BAW 2) et les barreaux commerciaux dans l'urine (n=3)	344



## Liste des équations

Equation I- 1 : Equation du temps de vol	55
Equation II- 1 : Relation entre le coefficient de partage octanol/eau et le coefficient de partage entre la phase PDMS du barreau SBSE et la matrice aqueuse	74
Equation II- 2 : Equation du taux de récupération d'une extraction SBSE	74
Equation II- 3 : Calcul du coefficient de variation pour l'évaluation de la répétabilité	83
Equation II- 4 : Calcul du rendement d'extraction	83
Equation II- 5 : Calcul du rendement d'extraction (2)	84
Equation II- 6 : Calcul de l'effet de matrice	85
Equation II- 7 : Calcul de l'effet de matrice du barreau d'extraction SBSE	141
Equation II- 8 : Calcul de l'effet de matrice du barreau d'extraction SBSE et de la matrice urinaire	141
Equation III- 1 : Calcul de l'exactitude	193



# **Introduction générale**





L'impact de l'environnement sur la santé humaine est aujourd'hui un fait reconnu, qu'illustrent parfaitement certaines études réalisées notamment dans le domaine de la santé, de l'environnement et de l'épidémiologie.

Dans ce contexte, un nouveau concept nommé Exposome a vu le jour en 2005 et englobe toutes les expositions environnementales au cours de la vie d'un individu (y compris les facteurs liés au mode de vie), dès la période prénatale. Plus précisément, cette nouvelle notion trouve son origine dans la nécessité pour les chercheurs de concevoir, parallèlement à la notion du génome, et forgé sur la même grille conceptuelle, un outil méthodologique pour l'évaluation des expositions environnementales. En particulier, ce concept soulève l'importance de l'évaluation de l'exposition dans l'identification des causes environnementales des maladies chroniques, comme certains cancers par exemple.

Christopher Wild (directeur du Centre International de Recherche sur le Cancer), l'auteur de ce concept, montre qu'il est véritablement urgent de mettre au point des méthodes de mesure de l'exposition environnementale d'un individu donné qui soient aussi précises que les méthodes développées pour le séquençage du génome humain. Apparaissent donc ici de véritables enjeux analytiques, compte tenu de la diversité des substances chimiques potentiellement concernées, de la complexité des matrices environnementales et biologiques, des référentiels qualité appliqués à l'analyse : concept de haut-débit, de développement durable, de respect de l'environnement tout en atteignant des limites de sensibilité les plus basses possibles. Néanmoins, jusqu'à présent, peu d'études ont été réalisées sur ce sujet au sens large, du fait du manque de lignes directrices. En effet, les études de l'Exposome sont le plus souvent adaptées à des cas particuliers dans le domaine de l'environnement ou de la santé, mais pas sur les interactions entre ces deux domaines.

L'étude de l'Exposome nécessite une approche multidisciplinaire. Elle est étroitement liée à la science de l'exposition, l'épidémiologie, la biologie, la chimie analytique, les statistiques et la bio-informatique. Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'étude de l'Exposome correspond à la recherche, l'identification et la quantification de contaminants environnementaux dans des matrices biologiques. Dans le cas de cette étude, un contaminant environnemental correspond à toute molécule toxique ou non, étrangère au corps de l'Homme sain et provenant donc de l'environnement extérieur.

Le concept d'Exposome met en évidence la nécessité de développer des méthodologies analytiques pour l'évaluation des expositions auxquelles l'Homme est confronté. Dans ce contexte, ce travail de thèse porte sur trois stratégies, pour la

caractérisation des expositions humaines environnementales, correspondant aux différents chapitres : l'analyse multirésidus ciblée (chapitre II), le screening ciblé (chapitre III) et le screening non ciblé (chapitre IV) (Figure 1). Ce manuscrit évalue la pertinence et les limites des différentes stratégies employées en termes de développements et applications pour avancer vers une évaluation de l'Exposome.

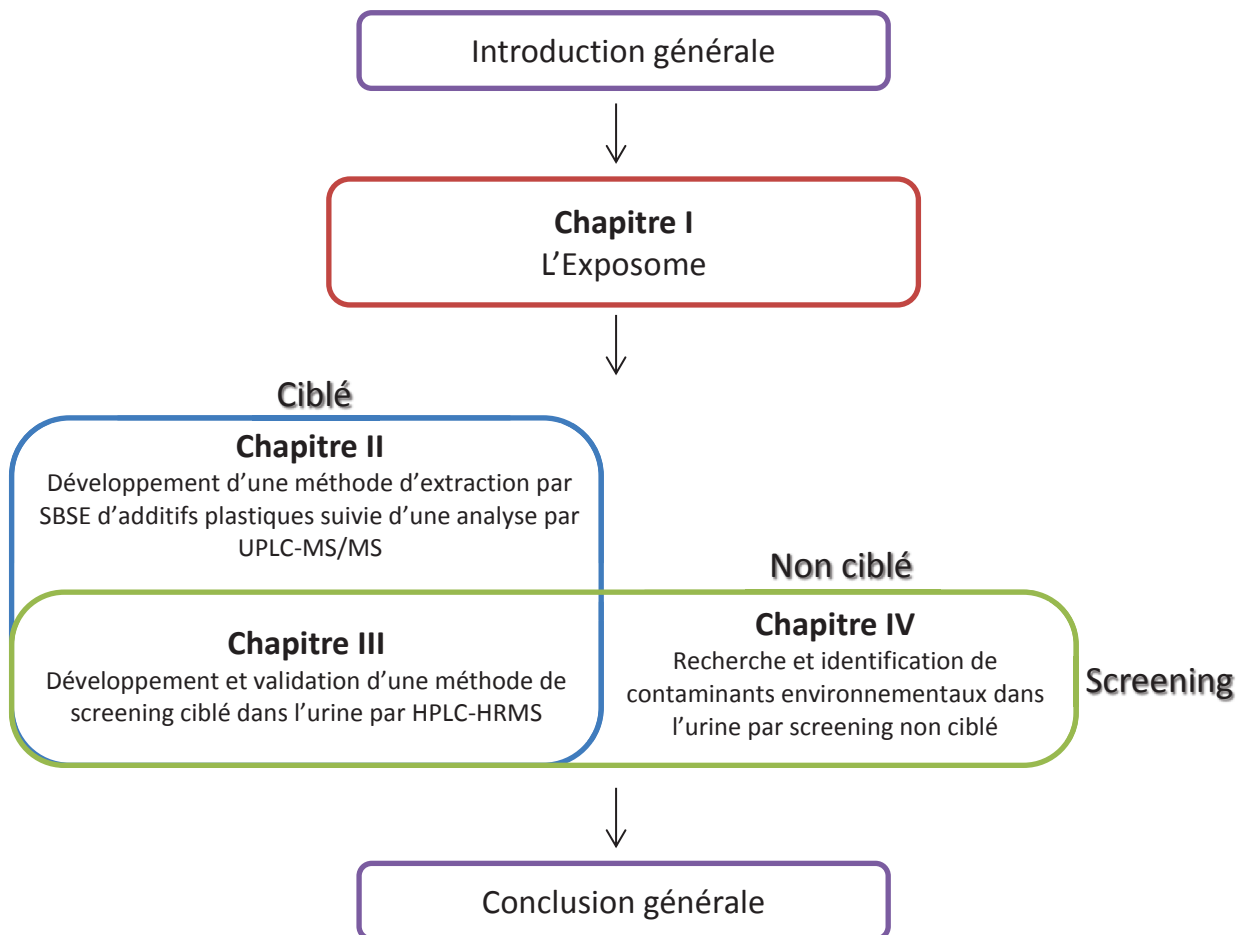


Figure 1 : Organisation des travaux de thèse et du manuscrit

Ce manuscrit présente tout d'abord un état de l'art issu d'une étude bibliographique sur l'Exposome (chapitre I). Nous nous sommes intéressés aux différentes stratégies de l'étude de l'Exposome aux niveaux épidémiologique et analytique, ainsi qu'aux techniques d'analyse déployées pour son évaluation. Nous discutons également des choix effectués dans le cas de notre étude.

Le travail présenté dans le chapitre II correspond à une analyse multirésidus ciblée. Nous présentons le développement d'une méthode d'extraction par SBSE de représentants d'une famille de contaminants environnementaux, les additifs plastiques, suivie d'une analyse par UHPLC-MS/MS. La majeure partie du travail présentée dans ce manuscrit porte sur le développement et la fabrication, dans notre laboratoire, de trois types de barreaux SBSE à

partir de monomères fournis par la société Bluestar Silicones. Nous montrons également l'optimisation des différents paramètres de l'extraction SBSE pour chacun des types de barreaux. Enfin, nous nous intéressons à l'application de ces méthodes à un échantillon d'urine dopé et à une évaluation avec des barreaux SBSE commerciaux, les Twisters<sup>®</sup>.

Le troisième chapitre de ce manuscrit se concentre sur le travail effectué pour l'analyse de 62 contaminants environnementaux ciblés, entrant en contact avec l'Homme dans son quotidien, dans l'urine brute par HPLC-HRMS. Cette partie fait donc référence à la stratégie du screening ciblé. Nous présentons les développements, optimisations et validations des deux méthodes d'analyse utilisées dans cette étude. Enfin, ces méthodes sont appliquées à des échantillons d'urines de volontaires. Ainsi, la détection et la quantification des contaminants ciblés sont effectuées. De plus, à partir des données obtenues, une recherche et une identification des métabolites connus et d'autres contaminants environnementaux est réalisée par un screening qualifié de semi-ciblé.

Le dernier chapitre de ce manuscrit s'intéresse au screening non ciblé de l'urine. Ce dernier est réalisé à partir des méthodes développées dans le chapitre III. Le principal objectif de cette partie est lié au traitement des données générées par la haute résolution en spectrométrie de masse, avec l'établissement d'une stratégie. Afin de visualiser le maximum de composés, les réponses obtenues selon différents protocoles de préparation d'échantillon sont comparées. De plus, deux spectromètres de masse haute résolution de spécificités et performances différentes sont utilisés en collaboration avec Bruker Daltonics<sup>®</sup>, afin de mettre en évidence les limitations liées à l'appareillage.

J'ai choisi d'organiser chaque chapitre sous la forme d'un article scientifique, avec un état de l'art, une partie matériels et méthodes et une partie résultats et discussion, afin que chaque stratégie puisse être abordée et lue indépendamment.



# **Chapitre I : L'Exposome**



### I.1. L'impact de l'environnement sur la santé humaine

L'impact de l'environnement sur la santé humaine est aujourd'hui un fait avéré et visible. Au cours des dernières décennies, les scientifiques ont démontré que de nombreuses maladies chroniques, appelées aussi maladies non transmissibles, étaient liées à notre environnement. Ces maladies ne se transmettent pas d'un individu à un autre et ne sont pas de nature infectieuse. Elles sont induites par des phénomènes tels que le vieillissement, l'urbanisation rapide et la mondialisation des modes de vie défavorables à la santé et, de ce fait, par l'environnement dans lequel nous évoluons (OMS, 2013). La plupart des cancers feraient partie de ces maladies liées à l'environnement.

En effet, dès la fin des années 70, John Higginson, directeur du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), avait estimé que l'environnement, défini comme tout ce qui n'est pas génétique, expliquait 80 % des causes de cancer (Higginson, 1979). Au fil des années, plusieurs études vont également dans ce sens. En effet, d'après une étude américaine publiée en 2000 et menée sur près de 45 000 jumeaux, seul un cancer sur quatre aurait une composante génétique. Ainsi, trois cancers sur quatre seraient dus à notre environnement et à notre mode de vie (Lichtenstein *et al.*, 2000). L'étude menée par Czene *et al.* (Czene *et al.*, 2002) a permis de déterminer la part génétique et, par conséquent, celle environnementale, de différents types de cancers comme l'illustre la Figure I-1. Ainsi, parmi les cancers étudiés, les facteurs environnementaux s'élèveraient à plus de 70 %, excepté pour le cancer de la thyroïde.

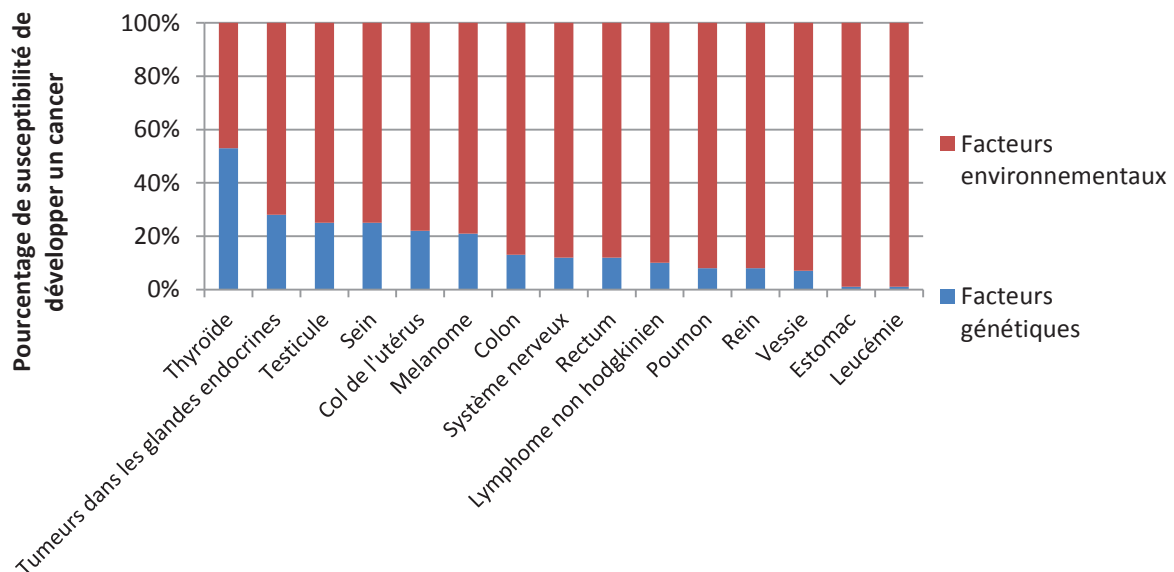


Figure I- 1 : Pourcentage de susceptibilité de développer un cancer selon les facteurs génétiques ou environnementaux (Czene *et al.*, 2002)



Danaei *et al.* (Danaei *et al.*, 2005). ont alors déterminé quels étaient les principaux facteurs environnementaux responsables du développement des cancers selon les différents pays du monde. Il en découle que le tabagisme, la consommation d'alcool, la faible consommation de fruits et légumes, le surpoids et l'obésité mèneraient à une forte probabilité de développer un cancer selon les pays. Ainsi, en 2004, pour la première fois, les cancers sont devenus la première cause de décès en France (Aouba, 2007). Suite aux nombreuses études réalisées sur les relations entre l'environnement et les probabilités de développer un cancer, l'OMS a organisé la « Conférence internationale sur les déterminants environnementaux et professionnels du cancer : interventions pour la prévention primaire », qui s'est tenue en mars 2011. Lors de cette rencontre, il a été reconnu qu' « un pourcentage important de l'ensemble des cancers est dû à des expositions environnementales ou professionnelles » (OMS, 2011). Cependant, le CIRC avait ajouté qu' « il demeure encore beaucoup d'incertitudes quant à la proportion de tous les cancers imputables à ces expositions » (CIRC, 2011). En 2014, les cancers étaient encore en première position du classement des causes de mortalité en France, représentant près de 30 % des décès (Flahault, 2014).

De plus, de nombreuses études démontrant l'impact de notre environnement sur le développement d'autres maladies chroniques ont également été publiées. En effet, une équipe de l'Inserm a démontré que les agriculteurs utilisant des pesticides étaient deux fois plus susceptibles de contracter la maladie de Parkinson (Elbaz *et al.*, 2009). En outre, plusieurs études ont rapporté une association significative entre l'augmentation de la concentration urinaire de bisphénol A et l'incidence élevée de plusieurs maladies chroniques, comme le diabète, les maladies cardiovasculaires, les anomalies des enzymes hépatiques, l'obésité et le syndrome des ovaires polykystiques (Carwile et Michels, 2011; Kandaraki *et al.*, 2011; Lang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Melzer *et al.*, 2010; Takeuchi *et al.*, 2004).

Les maladies chroniques sont les causes les plus fréquentes de décès dans la plupart des pays, à l'exception de certaines régions d'Afrique (Cicolella, 2013). Nous sommes aujourd'hui dans une révolution scientifique en santé publique, rendue nécessaire pour comprendre la relation entre les expositions environnementales et la pandémie de maladies chroniques (Cicolella, 2013). Dans ce contexte, plusieurs organismes ont mis en place des plans d'action pour protéger les populations des expositions environnementales à risque. L'OMS a établi un plan d'action sur une période de 2008 à 2013 pour développer la stratégie mondiale de lutte contre les maladies non transmissibles. La France a, quant à elle, élaboré un plan national santé-environnement (PNSE) pour identifier et concevoir les principales actions à mettre en œuvre entre 2004 et 2008. Les travaux menés dans le cadre du PNSE ont permis de mettre en évidence que l'impact de l'environnement sur la santé, sans engendrer de

maladies chroniques, était aussi très important ; avec, par exemple, le recensement des personnes exposées à des substances toxiques pouvant être liées à des difficultés à concevoir (Ministère de la Santé et de la Protection sociale *et al.*, 2009). Suite à cela, un deuxième (2009-2013) puis un troisième (2015-2019) plan national santé-environnement (Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de la mer *et al.*, 2009; Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie et Ministère des affaires sociales et de la santé, 2014) ont été mis en place, afin de réduire les impacts des facteurs environnementaux sur la santé. Ce troisième PNSE se compose de trois groupes de travail, dont le premier se nomme « Exposome ». Il témoigne de la volonté de réduire les impacts des facteurs environnementaux sur la santé humaine, afin de protéger les populations et lutter contre les inégalités environnementales territoriales de santé (Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie et Ministère des affaires sociales et de la santé, 2014).

L'urgence de comprendre la relation entre les expositions environnementales et la santé est reconnue. Cependant, son étude représente un défi. En effet, les pathologies sont non spécifiques et multifactorielles. De plus, les expositions sont multiples et souvent à faibles doses ; les effets peuvent s'observer à long terme. Il faut faire face aux différences interindividuelles, aux populations qui ne sont pas égales face aux expositions aux diverses pollutions, aux nuisances et aux risques environnementaux. C'est pourquoi de nouveaux outils et approches doivent être développés afin d'évaluer les expositions environnementales auxquelles l'Homme est confronté.

## 1.2. L'Exposome

Le terme « Exposome » a été défini en 2005 par Wild, comme la totalité des expositions auxquelles un individu est soumis durant toute sa vie, de sa naissance à sa mort, incluant les stades prénataux (Wild, 2005). Ces expositions comprennent les expositions exogènes et endogènes comme la pollution de l'air, de l'eau, ou encore l'exposition aux radiations, aux composés toxiques entre autres ; mais aussi le style de vie avec l'alimentation, le stress ou encore le tabagisme.

La définition de Wild a été légèrement modifiée récemment par Miller et Jones comme la mesure cumulative des influences environnementales et des réponses biologiques associées à travers la durée de vie, incluant les expositions environnementales, l'alimentation, le comportement et les processus endogènes (Miller, 2014). Cette dernière définition souligne le fait que les composants de l'Exposome sont des éléments à mesurer au fil du temps, puisque l'Exposome est une entité dynamique évoluant dans le temps et l'espace. En effet, il

existe différents types d'expositions auxquelles nous sommes plus ou moins confrontés selon les périodes de la vie (Athersuch, 2012). La Figure I-2 illustre quelques-unes de ces expositions, notamment l'exposition in-utéro, l'exposition aux médicaments, l'exposition professionnelle, l'exposition saisonnière, ainsi que l'exposition environnementale accumulée. De plus, selon l'endroit où nous vivons, nous serons soumis à des expositions caractéristiques. Par exemple, les individus vivant en milieux agricoles, à proximité de cultures, seront soumis de façon plus proche et directe aux pesticides, contrairement aux individus vivant en zones urbaines. De même, des individus vivant sur des continents différents n'auront pas les mêmes habitudes alimentaires, et ne seront donc pas exposés aux mêmes composés chimiques *via* l'alimentation.

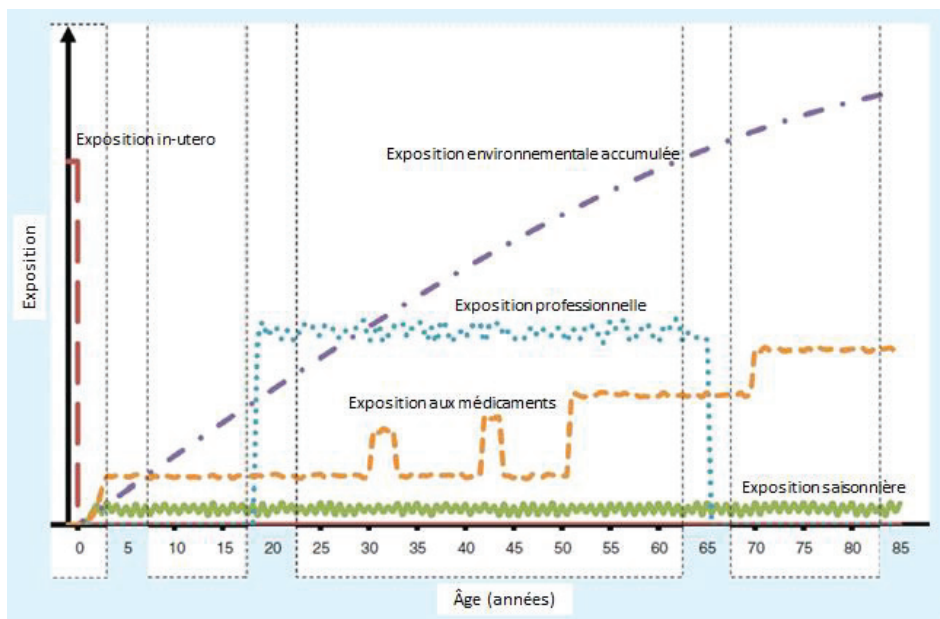


Figure I- 2 : Variabilité de l'Exposome d'un individu en fonction de son âge (Athersuch, 2012)

De plus, Miller et Jones mettent en évidence que l'Exposome est associé à des réponses biologiques, à la façon dont le corps réagit aux diverses expositions externes. La réponse différentielle de l'individu peut être aussi importante que l'exposition elle-même. En effet, par exemple, une exposition environnementale peut causer des dommages au niveau de l'ADN, comme l'expression ou non d'un gène. Les réponses aux mécanismes de réparation de ces dommages peuvent être différentes d'un individu à un autre. Une autre différence entre les deux définitions de Wild et de Miller et Jones est que ces derniers ont pris en compte la notion du comportement au sens large, incluant les comportements auto-initiés comme la pratique d'une activité sportive, et ceux s'exerçant sur nous de façon indélébile tels que les facteurs de stress. Cette définition prend en compte aussi les processus endogènes qui produisent de nombreux sous-produits pouvant influencer l'état de santé. Par exemple, des

réactions biochimiques peuvent générer des radicaux libres pouvant endommager les macromolécules, mais aussi agir sur des molécules de signalisation importantes, comme le TNF (tumor necrosis factor), qui, lorsqu'il est libéré, provoque la mort cellulaire et la destruction tissulaire observées dans certaines maladies chroniques inflammatoires telles que la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde ou le psoriasis en plaques (Abbvicare, 2008; Lodish *et al.*, 2005).

L'Exposome peut aussi être défini comme tous les produits chimiques biologiques actifs d'un individu (Rappaport, 2011), engendrés par l'accumulation de toutes les expositions environnementales à travers toute une vie (Ellis *et al.*, 2012). Ainsi, on distingue trois types d'Exposome complémentaires selon la nature des expositions (Athersuch, 2012) :

- **L'Exposome externe spécifique** mesuré à partir de l'environnement local immédiat comme le mode de vie, l'alimentation, les radiations ou encore la pollution. Il englobe l'ensemble des expositions externes telles que les agents chimiques, les polluants, les produits pharmaceutiques, mais aussi les blessures et les infections contractées au cours de la vie.
- **L'Exposome externe général** comprenant les domaines psychologique, sociétal et économique. Cet Exposome correspond aux expositions non spécifiques comme le statut social, le niveau d'éducation, le climat, le stress psychologique ou encore la localisation.
- **L'Exposome interne** mesuré à partir de l'individu. Il correspond aux expositions internes au niveau du métabolisme, des processus endogènes, de la réponse inflammatoire, du processus de vieillissement, de l'influence de la flore microbienne, entres autres, mais aussi de la présence de métabolites de xénobiotiques. Il s'agit de l'environnement chimique interne propre à chaque individu.

Cependant, l'étude de l'Exposome, également appelée l'exposomique (Centers for Disease Control and Prevention, 2014), est un défi, puisqu'elle présente de nombreuses limitations, notamment pour :

- La compréhension de la vulnérabilité individuelle et de l'impact des mélanges complexes (par exemple la fumée de tabac dans l'air ambiant, la pollution de l'air par des particules) (Paoloni-Giacobino, 2011). De plus, certaines expositions environnementales ne sont pas corrélées directement aux métabolites comme le bruit, la chaleur ou encore les champs électromagnétiques (Peters *et al.*, 2012).
- Le développement d'outils de mesure fiables ainsi qu'un moyen d'enregistrer l'historique complet des expositions, ce qui s'avère être une tâche extrêmement difficile (Paoloni-Giacobino, 2011).

- Le stockage de nombreux échantillons provenant d'importantes cohortes, de quelques centaines à plusieurs milliers d'individus ayant répondu à des questionnaires détaillés, mais aussi des données analytiques obtenues (Paoloni-Giacobino, 2011).
- L'exigence de collaboration croissante entre des épidémiologistes, des biostatisticiens, des experts dans la bio-informatique et des scientifiques experts en environnement, tendant ainsi vers une recherche interdisciplinaire (Wild, 2005).

Néanmoins, la caractérisation de l'Exposome, défini aussi comme l'équivalent du génome au niveau environnemental (Miller, 2014), pourrait transformer notre compréhension de l'impact des facteurs environnementaux sur la santé humaine (Ellis *et al.*, 2012).

### I.3. Stratégies épidémiologiques

Au niveau épidémiologique, soit l'étude des facteurs influant sur la santé des populations, deux stratégies existent pour mesurer l'Exposome : la stratégie ascendante et la stratégie descendante. Ces deux stratégies sont complémentaires pour la compréhension de l'Exposome.

#### I.3.1. Ascendante

La stratégie ascendante ou « bottom-up » correspond à la recherche de contaminants dans des échantillons de sources d'exposition, tels que l'eau, les aliments ou l'air par exemple. Cette stratégie implique l'échantillonnage des sources d'expositions puis l'identification et la quantification de produits chimiques dans ces échantillons. Cette approche a l'avantage de s'attacher directement aux sources d'expositions. Cependant, elle peut manquer des caractéristiques essentielles de l'individu, de son environnement chimique interne, telles que le sexe, le stress et les processus endogènes (Rappaport, 2011).

#### I.3.2. Descendante

La stratégie descendante ou « top-down » correspond à la recherche de contaminants dans des échantillons biologiques tels que le sang, l'urine ou encore la salive. Cette stratégie permet de réaliser de la surveillance biologique ou biosurveillance. L'avantage de cette stratégie est de prendre en compte des caractéristiques essentielles de l'individu, et de rechercher les produits chimiques exogènes et endogènes de l'environnement chimique interne. La stratégie « top-down » permet donc d'évaluer l'Exposome de façon compréhensive.

L'étude est réalisée par prélèvement d'échantillons biologiques de façon ponctuelle, ou de façon répétée au cours de la vie d'un individu, particulièrement pendant les stades critiques de la vie, tels que le développement précoce du fœtus, l'enfance ou la puberté. De plus, la caractérisation de l'Exposome à partir d'importantes cohortes peut permettre l'identification des expositions à risques (Paoloni-Giacobino, 2011; Rappaport, 2011). Par exemple, si l'étude d'une cohorte de personnes vivant à moins de quelques kilomètres d'un secteur agricole démontre la présence de certaines substances absentes sur une cohorte de personnes vivant en ville, il serait possible d'émettre l'hypothèse que la présence de ces substances est le résultat d'une exposition liée au domaine de l'agriculture. En effet, la caractérisation des expositions humaines environnementales par approche descendante permet de développer des méthodes de mesure fiables de biomarqueurs humains, qui décrivent les populations affectées par diverses sources d'expositions, et de comparer ces mesures à différents types de populations suivant leur localisation, leur âge ou leur ethnie, et qui semblent avoir été perturbées par des changements environnementaux (Pleil, 2012). Cependant, ce type de stratégie nécessite une très large banque d'échantillons biologiques qu'il faut stocker et analyser. De plus, l'historique complet des données enregistrées doit être sauvegardé, ce qui s'avère être complexe (Rappaport, n.d.). Une autre difficulté à prendre en compte est de définir ce qu'est un Exposome « normal » (Pleil, 2012).

La stratégie descendante semble être la plus simple à mettre en place afin d'avoir une vision globale de l'Exposome d'un individu et la plus utile pour étudier les interactions santé-environnement (Peters *et al.*, 2012; Rappaport, n.d.). Mes travaux de thèse s'appuient sur cette stratégie. Celle-ci nécessite l'échantillonnage d'échantillons biologiques et le choix de la matrice d'étude s'est arrêté sur l'urine.

#### I.4. Choix de la matrice biologique

L'urine est le liquide biologique composé des déchets de l'organisme sécrété par les reins par filtration du sang. C'est le principal fluide biologique de l'élimination. L'urine est composée de plus de 95 % d'eau, de sodium, d'ammonium, de phosphate de sulfate, d'urée, de créatinine, de protéines de petite taille et de produits liés au processus des reins et du foie, incluant les médicaments et leurs métabolites (Fernández-Peralbo et Luque de Castro, 2012). L'urine est la matrice biologique la plus facile à obtenir, de façon non invasive. Elle est facilement disponible et en grande quantité.

L'étude de l'urine permet d'avoir une vision globale de l'environnement chimique interne de l'individu, puisque cette matrice contient la plupart des métabolites endogènes et

exogènes. De ce fait, l'urine est l'échantillon biologique ayant potentiellement le plus vaste métabolome. Le métabolome correspond à l'ensemble des composés organiques de masse moléculaire faible ( $< 1000$  Da), caractérisés par une grande variabilité des propriétés physico-chimiques et présents dans le système biologique. Ce sont les métabolites (Ceglarek *et al.*, 2009; Roux, 2011). De ce fait, l'urine est le liquide biologique le plus utilisé pour des approches métabolomiques. Le métabolome reflète les événements passés ce qui inclut l'ensemble du métabolisme et les interactions avec l'environnement (Roux, 2011). De ce fait, l'étude du métabolome permet d'avancer vers une caractérisation de l'Exposome.

Du point de vue analytique, l'urine peut être considérée comme l'un des fluides biologiques les moins complexes. En effet, l'urine est composée majoritairement d'eau, ce qui peut permettre de limiter ou même d'éliminer les étapes de préparation d'échantillon avant analyse. Par exemple, l'urine peut être injectée directement en spectrométrie de masse sans préparation d'échantillon.

Cependant, le choix de l'urine pose quelques inconvénients, notamment le fait que cette matrice comprend tous les métabolites de taille variable couvrant une large gamme dynamique du  $\text{nmol.L}^{-1}$  au  $\text{mmol.L}^{-1}$  pour le glucose par exemple (Fernández-Peralbo et Luque de Castro, 2012). De plus, les variabilités interindividuelles sont importantes, notamment suivant le niveau d'hydratation, le volume prélevé, l'état du métabolisme au moment du prélèvement (Pleil, 2012), mais aussi suivant l'âge, le sexe, l'état de santé, le style de vie et l'alimentation (Guy *et al.*, 2008). Ces inconvénients constituent un défi pour l'étude de l'Exposome.

### I.5. Stratégies analytiques

Il existe différents types d'approches au niveau analytique pour caractériser l'Exposome : l'approche ciblée et l'approche non ciblée.

#### I.5.1. Approche ciblée

Dans le cas de notre étude, l'approche ciblée consiste à rechercher une liste définie de contaminants environnementaux connus. Les recherches bibliographiques permettent de déterminer une liste précise des composés d'intérêt à identifier et quantifier dans l'échantillon.

Pour la recherche ciblée, selon la variabilité des propriétés physico-chimiques des composés d'intérêt, des étapes de préparation d'échantillon avant analyse sont souvent entreprises, afin d'améliorer la détection et gagner en sensibilité.

### I.5.2. Approche non ciblée

Pour étudier l'Exposome de façon non ciblée, il faut étudier l'ensemble des contaminants environnementaux et leurs métabolites, produits chimiques biologiques. Cette étude est réalisée à partir de méthodes de screening non ciblé. L'étude consacrée à la recherche et l'identification de métabolites est appelée la métabolomique. Elle se réfère à la mesure de toutes les espèces de faible poids moléculaire (< 1000 Da) présentes dans un système biologique, soit tous les métabolites produits par le processus cellulaire.

Cette approche dite non ciblée porte donc sur l'identification de tous les contaminants environnementaux et les métabolites endogènes et exogènes contenus dans un échantillon, avec, *a priori*, aucune connaissance sur la contenance en contaminants de l'échantillon. Cette approche nécessite de nombreux outils statistiques afin d'interpréter les données riches en informations. Les informations sur les métabolites sont destinées à compléter la compréhension des processus biologiques (Roux, 2011) pour améliorer le diagnostic, le pronostic et le traitement de maladies (Zhang *et al.*, 2012) et à comprendre les interactions entre la santé et l'environnement (Bonvallet *et al.*, 2014). Ainsi, l'ensemble de ces données permet de caractériser les expositions d'un individu au cours de sa vie, afin de déterminer la cause des maladies chroniques, qui ne sont donc pas d'origine génétique (Adler, 2010), et ainsi faire de la surveillance biologique (Rappaport, 2011).

Etant donné que l'approche est centrée sur l'ensemble des produits chimiques biologiques actifs d'un individu et des contaminants environnementaux, avec des caractéristiques physico-chimiques différentes, les éventuelles étapes de préparation d'échantillon doivent être non sélectives afin de conserver le plus possible l'échantillon intact (Fernández-Peralbo et Luque de Castro, 2012).

Mes travaux de thèse s'appuient sur ces deux approches : ciblée (chapitres II et III) et non ciblée (chapitre IV).

## I.6. Techniques analytiques utilisées dans l'étude de l'Exposome

La caractérisation de l'Exposome peut être entreprise en identifiant le maximum de composés chimiques biologiquement actifs, avec une diversité chimique élevée, dans un échantillon. Il est impossible de relever ce défi avec une seule technique analytique. Les deux plates-formes analytiques fournissant des informations structurales complémentaires, notamment pour l'identification de métabolites, sont la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse (Roux, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Les techniques analytiques utilisées



pour l'étude de l'Exposome doivent être sensibles, spécifiques et capables de mesurer tous les analytes, même à l'état de traces (Fernández-Peralbo et Luque de Castro, 2012).

#### I.6.1. La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire permet l'identification et la quantification de nombreux analytes avec l'utilisation de standards internes. Cette technique analytique a l'avantage d'être non-destructive et versatile dans les expériences, comparée à la spectrométrie de masse. De plus, des bibliothèques sont disponibles afin de faciliter l'interprétation des spectres (Theodoridis *et al.*, 2012).

##### I.6.1.1.Principe

La Résonance Magnétique Nucléaire est une technique analytique non invasive permettant notamment de caractériser des molécules chimiques ou biologiques en étudiant le rayonnement électromagnétique absorbé par la matière. Le principe est basé sur les propriétés magnétiques de certains noyaux. Tous les noyaux atomiques possèdent une charge de rotation, identifiée sous le nom de spin nucléaire. Ces noyaux sont comparables à de petits aimants et de ce fait peuvent présenter un moment magnétique nucléaire. Cependant, tous les noyaux n'ont pas des propriétés magnétiques et ne sont donc pas observables en RMN. Les noyaux qui possèdent un nombre de spin non nul et qui sont majoritairement utilisés sont le proton ( $^1\text{H}$ ), le carbone ( $^{13}\text{C}$ ), l'azote ( $^{15}\text{N}$ ) ou encore le phosphore ( $^{31}\text{P}$ ). L'action d'un champ magnétique externe uniforme provoque une perturbation des atomes considérés. Les noyaux génèrent alors un micro-champ magnétique qui est capté et le signal électrique émis est enregistré lors du retour à l'équilibre du système, créant, après traitement mathématique, un signal RMN.

##### I.6.1.2.Applications

Cette technique possède des applications très variées, allant de la RMN à l'état solide pour l'étude des matériaux à la RMN à l'état liquide pour la détermination de structures tridimensionnelles de macromolécules biologiques, en passant par l'étude de métabolites ou de contaminants. Pour l'étude de l'Exposome, la RMN est majoritairement utilisée pour les études métabolomiques notamment dans le domaine biologique, médical et pharmaceutique (Beckonert *et al.*, 2007). Celles-ci s'appuient sur l'analyse de fluides biologiques tels que le sang (Duarte *et al.*, 2014), la salive (Santone *et al.*, 2014), l'urine (Wang *et al.*, 2013), le plasma (Jupin *et al.*, 2014), le sérum (Wang *et al.*, 2013), le fluide cérébrospinal (Blasco *et al.*, 2014), mais aussi d'échantillons sous forme solide comme des tissus ou encore des

cellules (Lindon *et al.*, 2009). De plus, la RMN peut aussi être couplée avec la chromatographie liquide dans le cas de matrices complexes telles que l'urine (Gavaghan *et al.*, 2001). Cependant, si des analyses sensibles (inférieures à environ 150 ng.mL<sup>-1</sup> (Tiainen *et al.*, 2014)) doivent être réalisées, la spectrométrie de masse sera préférée à la RMN.

#### I.6.2. La spectrométrie de masse couplée à des techniques séparatives

La spectrométrie de masse (en anglais mass spectrometry, « MS ») couplée à des techniques séparatives offre une meilleure combinaison en termes de sensibilité et de sélectivité que la RMN (Bedair et Sumner, 2008; Roux, 2011). Ce type de technique analytique s'applique autant à l'approche ciblée qu'à l'approche non ciblée, notamment avec le couplage à la chromatographie liquide. En effet, les principaux avantages de son utilisation sont la possibilité de réaliser des analyses quantitatives, sur une large gamme dynamique de composés (masse molaire, polarité, ionisation, volatilité, structure chimique) (Forcisi *et al.*, 2013), contenus dans des fluides biologiques extrêmement complexes au niveau du contenu moléculaire (Lu *et al.*, 2008). Ces avantages sont non négligeables pour le développement de méthodes analytiques, afin de tendre vers une évaluation de l'Exposome. De plus, selon le type d'analyseur utilisé en spectrométrie de masse, il est possible d'identifier des composés selon différents critères comme la mesure de la masse exacte, du profil isotopique et de fragments (Forcisi *et al.*, 2013).

##### I.6.2.1. Critères d'identification des composés selon les normes

Selon la technique analytique employée, les critères d'identification recommandés seront plus ou moins nombreux et différents.

Selon les normes européennes, dans le cas d'une analyse par HPLC-MS, l'identification des composés se fait sur un minimum de trois points d'identification (Commission of the European Communities, 2002). Lors de l'utilisation d'un spectromètre de masse à temps de vol (ToF), par exemple, ces trois points seront le temps de rétention, la masse exacte et le profil du massif isotopique. Les tolérances appliquées pour ces critères dépendent des performances du spectromètre de masse ToF utilisé.

Dans le cas d'une analyse par HPLC-MS/MS, l'identification et la quantification des composés se fait sur un minimum de trois ou quatre points d'identification (Commission of the European Communities, 2002). Lors de l'utilisation d'un triple quadripôle (QqQ) en mode MRM, quatre points d'identification sont obtenus, à savoir, le temps de rétention, la première transition engendrée par le composé, la deuxième transition, et le rapport des aires de ces deux transitions. La tolérance pour le temps de rétention est de 2,5 % par rapport au temps de

rétenion du composé dans un standard et le rapport des aires des deux transitions suivies en mode MRM ne doit pas varier de plus de 20 % par rapport à celui calculé dans les standards (Commission of the European Communities, 2002). Cependant, plus il y a de critères d'identification validés, plus la probabilité que l'identification soit juste est élevée. Lors de l'utilisation d'un QqToF, les points d'identification sont les mêmes qu'avec un ToF. Les fragments obtenus constituent le quatrième point d'identification.

#### I.6.2.2. Séparation des composés par chromatographie

##### I.6.2.2.1. Généralités et principe

La chromatographie est une méthode analytique permettant la séparation de composés chimiques dans des matrices simples ou complexes. Cette technique analytique est basée sur l'interaction tri-phasique entre le composé d'intérêt, une phase solide dite stationnaire et une phase mobile. La phase stationnaire est une phase solide placée le plus souvent dans une colonne et la phase mobile est une phase liquide ou gazeuse qui se déplace à travers la phase stationnaire en entraînant avec elle les analytes. La séparation des composés contenus dans un échantillon est induite par les différentes vitesses avec lesquelles les solutés sont entraînés par la phase mobile à travers la phase stationnaire.

Le type de chromatographie mis en œuvre est défini par la nature de la phase mobile utilisée. La plupart du temps les spectromètres de masse sont couplés à deux types de chromatographies : la chromatographie en phase liquide (« CPL », ou en anglais liquid chromatography, « LC ») utilisant une phase mobile liquide et la chromatographie en phase gazeuse (« CPG » ou en anglais gas chromatography, « GC ») utilisant une phase mobile gazeuse. Selon la nature des composés, ils peuvent être analysés par CPL et/ou CPG. Néanmoins, même si la chromatographie en phase gazeuse est parfois employée pour l'analyse de certains composés d'intérêt, cette méthode n'est pas adaptée à l'analyse de molécules peu volatiles et/ou sensibles à la température. De plus, elle peut nécessiter une étape de préparation supplémentaire d'échantillon, comme la dérivation.

La chromatographie liquide est la technique de séparation la plus utilisée en raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications (Skoog *et al.*, 2003). En effet, il existe 5 types de chromatographie liquide à utiliser pour séparer des composés de natures différentes. Le choix de la chromatographie liquide est guidé par deux propriétés du composé, sa masse molaire et sa polarité comme indiqué sur la Figure I-3.

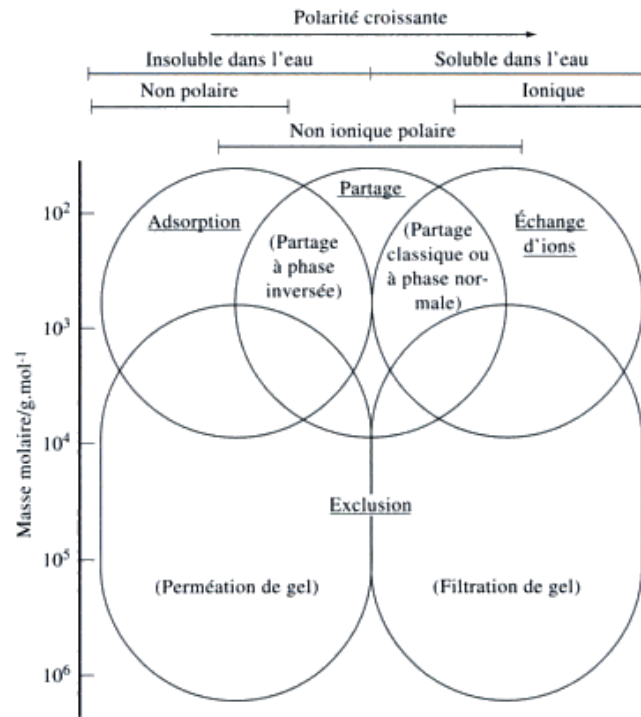


Figure I- 3 : Les différents types de chromatographie liquide (Skoog *et al.*, 2003)

La séparation est toujours basée sur les affinités des molécules pour chacune des phases du système : la phase stationnaire et la phase mobile. Deux effets antagonistes peuvent alors avoir lieu : un effet d'entraînement exercé par la phase mobile appelé élution, et un effet de rétention exercé par la phase stationnaire. Ainsi, une fois le type de chromatographie liquide choisi, la séparation effective des différentes espèces se fait en changeant soit les propriétés de la phase stationnaire, soit celles de la phase mobile conduisant par exemple à une modification du pourcentage de solvant organique au cours du temps, par application d'un gradient, afin d'éluer la totalité des composés.

L'étude de l'Exposome sous-entend l'identification et la quantification d'une très large gamme de composés d'intérêt. De ce fait, la CPL est la technique de séparation préférentielle. Seul ce type de chromatographie sera abordé dans ce manuscrit.

L'utilisation de la chromatographie liquide nécessite le choix de la phase stationnaire sur laquelle les composés vont être retenus puis séparés. Les phases stationnaires les plus couramment utilisées sont les phases dites inverses (en anglais reverse phase, « RP »), qui sont caractérisées par le greffage sur la silice de chaînes carbonées. Cette dernière permet la rétention des composés majoritairement apolaires à moyennement polaires. Cependant, afin de séparer et donc de détecter de façon optimale le maximum de composés présents dans l'échantillon, une injection complémentaire est nécessaire afin d'analyser les composés polaires. Pour ce faire, une phase stationnaire de type HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid

Chromatography) sera préférée. Un greffage hydrophile, parfois une couche d'eau stagnante, est établi dans la phase stationnaire. Cependant, il existe une alternative à l'analyse d'un échantillon par deux injections différentes ; il s'agit de la chromatographie liquide bidimensionnelle.

#### I.6.2.2.2. La chromatographie liquide bidimensionnelle (LC-2D)

La LC-2D, ou chromatographie liquide bidimensionnelle, est une technique analytique basée sur le couplage de deux systèmes de séparation en phase liquide indépendants. La LC-2D comprend donc deux colonnes chromatographiques, deux pompes, une vanne à l'interface entre les deux dimensions et un passeur d'échantillon. Lors d'une analyse, le chromatogramme de la première dimension est découpé en différentes fractions, qui sont transférées une par une à un second système de séparation chromatographique, sur la deuxième dimension. La LC-2D peut être appliquée selon deux méthodes différentes, suivant l'approche souhaitée : la méthode « Heartcutting », ou LC-LC, appliquée à l'analyse ciblée de quelques composés connus, qui permet de transférer seulement les fractions sélectionnées de la première à la deuxième dimension; et la méthode « Compréhensive », ou LCxLC appliquée à l'analyse non ciblée, qui consiste à transférer l'ensemble des fractions sortant de la première à la deuxième dimension.

L'intérêt de l'utilisation de la LC-2D réside dans le fait que les mécanismes de rétention des deux dimensions soient différents. La LC-2D est principalement utilisée pour résoudre les problèmes de séparations complexes. Elle permet d'améliorer la résolution et la sensibilité ou de diminuer les effets de matrice. L'avantage le plus important de la LC-2D par rapport à la chromatographie liquide unidimensionnelle ou LC-1D est l'augmentation du pouvoir de résolution, ce qui est particulièrement important avec des échantillons complexes, d'où un intérêt tout particulier pour la caractérisation de l'Exposome. Cependant, cette technique nécessite un développement et une optimisation de la méthode analytique plus longs.

#### I.6.2.3. Détection des composés par spectrométrie de masse

##### I.6.2.3.1. Généralités et principe

La spectrométrie de masse est une technique qui repose sur la mesure du rapport masse sur charge ( $m/z$ ) et de l'abondance des ions, correspondants aux molécules présentes dans l'échantillon. Un spectre de masse de la molécule  $m/z$  en fonction de l'intensité peut alors être obtenu.

Un spectromètre de masse comprend différents éléments :

- **une source d'ionisation** qui va permettre de produire les ions à partir de la substance à analyser.
- **un analyseur** qui a pour rôle de séparer les ions produits en fonction de leur rapport masse sur charge ; et éventuellement les fragmenter par collision et analyser les fragments dans un second analyseur pour les spectromètres de masse hybrides.
- **un détecteur** qui détecte les ions sortants du dernier analyseur et détermine leur masse et leur quantité.
- **un système de traitement des données** par informatique, de façon à obtenir un spectre de masse, représentant les intensités des ions en fonction de leur rapport masse sur charge.

#### I.6.2.3.2. Sources d'ionisation

La source d'ionisation est le dispositif qui permet d'ioniser les substances à analyser dans le spectromètre de masse. Il existe différents types de source d'ionisation. Lorsque la spectrométrie de masse est couplée à un système de chromatographie en phase liquide, deux sources d'ionisation sont principalement utilisées : l'electrospray (en anglais Electrospray Ionisation, ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) ou. Elles sont complémentaires. L'utilisation de ces deux sources d'ionisation permet une analyse plus élargie d'un échantillon. En effet, la source APCI a permis de révéler certains métabolites supplémentaires, qui présentent un potentiel d'ionisation plus élevé dans ce mode par comparaison à la source ESI (Theodoridis *et al.*, 2012). Durant ma thèse, j'ai travaillé seulement avec la source ESI, qui est la source d'ionisation permettant l'analyse de la plus large gamme de composés au niveau de la polarité mais aussi de la masse moléculaire (Forcisi *et al.*, 2013) comme l'illustre la Figure I-4. Je ne présenterai dans ce manuscrit que la source ESI.

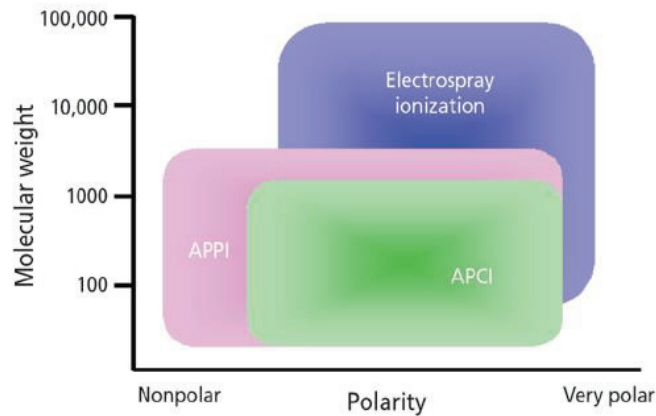


Figure I- 4 : Domaines d'application des principales sources d'ionisation selon la polarité et la masse moléculaire (Syage *et al.*, 2008)

#### I.6.2.3.2.1. Source electrospray (ESI)

La source d'ionisation la plus couramment utilisée est la source electrospray. Elle a été décrite pour la première fois en 1984 par Fenn (Yamashita et Fenn, 1984). L'electrospray présente de nombreux avantages comme sa facilité de couplage à un système de chromatographie liquide, son fonctionnement à basse température et à pression atmosphérique, sa mesure précise de la masse moléculaire (0,01 %) soit  $\pm 1$  Da sur une masse de 10 000 Da. De plus, elle permet d'ioniser des composés de larges masses moléculaires tels que des polymères ou des biomolécules, et d'ioniser des molécules polaires. Elle ne nécessite que peu d'énergie interne communiquée aux ions, ce qui permet d'éviter la dégradation et la rupture des liaisons covalentes.

Bien que le mécanisme et le rendement d'ionisation (estimé à 10 %) (Wilm et Mann, 1994) de l'electrospray ne soient pas encore parfaitement connus, les grandes étapes du processus peuvent être facilement décrites. Celles-ci sont illustrées dans la Figure I-5. Un échantillon sous forme liquide est introduit dans un capillaire soumis à une forte tension (plusieurs kilovolts) positive ou négative selon le mode d'ionisation sélectionné. L'intense champ électrique appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nébulisat dirigé à l'aide de gaz chauffé. Celui-ci est constitué d'un nuage de gouttelettes chargées positivement ou négativement selon le mode d'ionisation appliqué. Ces dernières vont traverser un gradient de champ électrique et de pression en direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Lors de cette traversée, les gouttelettes vont voir leur taille diminuer mais aussi leur densité de charge augmenter jusqu'à une valeur critique dite de Rayleigh. De plus, un gaz inerte, généralement de l'azote, est appliqué afin d'aider à l'évaporation du

solvant. Les gouttelettes subissent alors une succession d'explosions de type coulombiennes entraînant la libération d'ions chargés. Les ions formés sont dirigés à travers différents orifices jusqu'à atteindre l'analyseur.

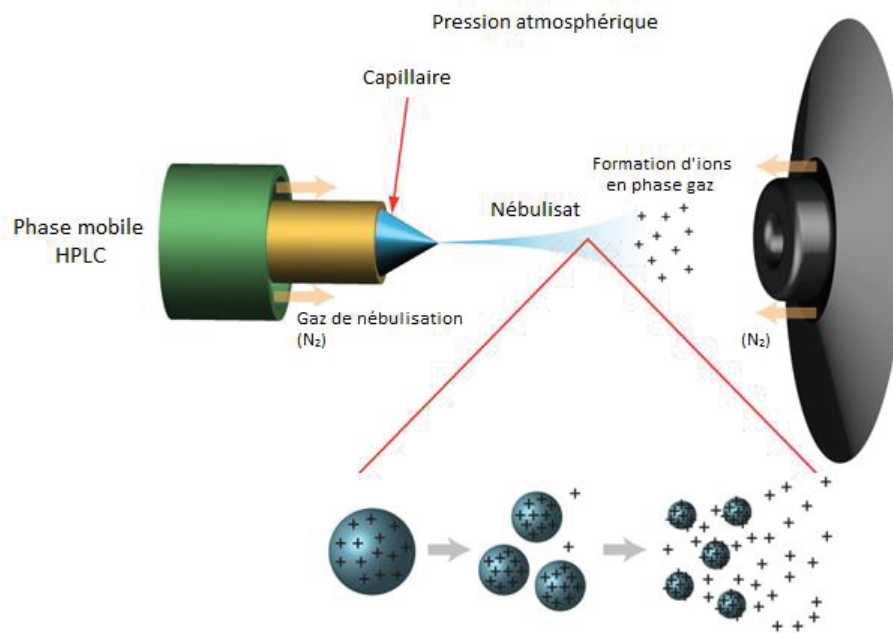


Figure I- 5 : Principe de la source electrospray (Lamondlab, n.d.)

#### I.6.2.3.3. Analyseurs

Après avoir produit les ions, il faut les séparer d'après leur rapport masse sur charge, qu'il faudra simultanément déterminer. De la même façon que pour les sources d'ionisation, il existe une grande variété d'analyseurs. Durant ma thèse, j'ai pu travailler sur deux d'entre eux, un analyseur de type quadripôle et un analyseur de type temps de vol. Ils permettent une complémentarité de l'analyse d'après leurs caractéristiques présentées dans le Tableau I-1. En effet, un analyseur triple quadripôle sera plus spécifique donc plus sensible selon le mode d'acquisition sélectionné. Il sera plutôt dédié à des analyses quantitatives et donc des approches ciblées. L'analyseur à temps de vol constitue la famille des spectromètres de masse haute résolution puisqu'il permet d'obtenir une résolution élevée et des mesures de masses monoisotopiques très précises. Il sera utilisé préférentiellement pour des analyses qualitatives et donc des approches non ciblées, plus globales comme des screening. Cependant, une étude menée sur la comparaison d'un triple quadripôle et d'un temps de vol pour la quantification des peptides a démontré que le spectromètre de masse à temps de vol était aussi spécifique, reproductible et robuste qu'un triple quadripôle, malgré que ce dernier ait été quatre fois plus sensible (Dillen *et al.*, 2012).



Tableau I- 1 : Comparaison des caractéristiques des analyseurs triple quadripôle et temps de vol avec ou sans quadripôle couplé à la chromatographie liquide (De Hoffmann et Stroobant, 2005; Ferrer et Thurman, 2003; Holčápek *et al.*, 2012)

Types d'analyseurs	Sensibilité en mode full-scan	Sélectivité	Précision en masse	Résolution
Triple quadripôle (QqQ)	moyenne	haute	faible (0,01%)	Faible ( $\Delta m/z = 1$ )
Temps de vol (ToF)	haute	faible	haute (0,001%)	Haute ( $\Delta m/z = 0,05$ )
Quadripôle-Temps de vol (QqToF)	moyenne	haute	haute (0,001%)	Haute ( $\Delta m/z = 0,05$ )

Seuls ces deux types d'analyseurs seront présentés dans ce manuscrit.

#### I.6.2.3.3.1. Analyseur de type triple quadripôle

Il s'agit du type d'analyseur le plus couramment utilisé pour l'identification et la quantification de molécules de faible masse moléculaire dans de nombreuses matrices. En effet, ce type d'analyseur permet d'obtenir de bonnes sensibilité et sélectivité sur une large gamme dynamique. Lors de mes travaux, j'ai utilisé un 3200 QTrap d'ABSciex, qui est un spectromètre de masse hybride. En effet, il s'agit d'un triple quadripôle, dont le dernier quadripôle possède la particularité de pouvoir être utilisé en mode trappe ionique. Un schéma de l'appareil est illustré Figure I-6.

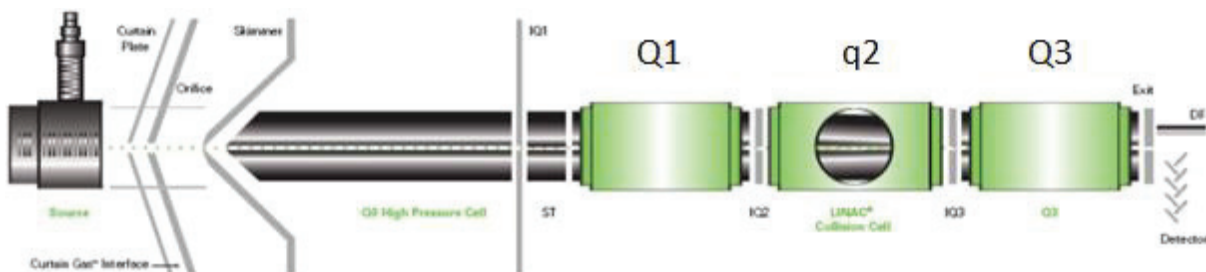


Figure I- 6 : Schéma du triple quadripôle 3200 QTrap d'ABSciex (ABSciex, 2005)

Ce type d'appareil peut être utilisé avec différents modes selon l'objectif de l'analyse. En effet, il peut être utilisé comme un simple quadripôle dans le but de déterminer les rapports  $m/z$  des ions des composés d'intérêt. Ce mode n'utilise que le premier ou le troisième quadripôle et ne permet pas d'obtenir une grande précision de masse. Il peut aussi être utilisé en tandem ou MS/MS. Durant ma thèse, j'ai utilisé la MS/MS en mode « multiple reaction monitoring » ou MRM.

Le principe de la MRM se compose de trois étapes. Tout d'abord, les ions formés dans la source arrivent dans le premier quadripôle, Q1. Ces ions sont appelés ions parents ou ions précurseurs. Les ions parents, correspondant aux molécules d'intérêt, sont sélectionnés dans

ce premier quadripôle. Ensuite, les ions parents sélectionnés sont fragmentés dans le deuxième quadripôle, q2, par application d'une énergie dite de collision. Ce quadripôle constitue la cellule de collision. Puis, le troisième quadripôle, Q3, va sélectionner un ion correspondant à chaque ion parent fragmenté, appelé ion fils. Chaque couple ion parent de rapport  $(m/z)_1$  et ion fils de rapport  $(m''/z)_2$  est appelé transition MRM. L'utilisation d'un QqQ en mode d'acquisition MRM est le mode préférentiel pour la quantification de traces de contaminants dû à sa grande sensibilité. En effet, cette dernière est la conséquence d'une importante spécificité et sélectivité acquises en mode MRM.

#### I.6.2.3.3.2. Analyseur de type temps de vol

L'analyse de l'Exposome par approche non ciblée nécessite l'utilisation d'un spectromètre de masse haute résolution (en anglais High Resolution Mass Spectrometry, « HRMS »). Dans notre cas, nous avons utilisé un spectromètre de masse de type temps de vol. Le principe de l'analyseur de type temps de vol ou Time-of-Flight (ToF) a été décrit pour la première fois par Stephens en 1946 (Wolff et Stephens, 1953). Il est basé sur la discrimination des ions en fonction de leur vitesse lorsqu'ils se déplacent dans le tube de vol, qui est une zone libre de champ. L'intervalle de temps nécessaire aux ions pour atteindre le détecteur au travers du tube de vol est appelé temps de vol. D'après l'Equation I-1 (Chernushevich *et al.*, 2001), le temps de vol ( $t$ ) est proportionnel à la racine carrée du rapport  $m/z$ . De plus, le temps de vol est dépendant de la longueur du tube de vol ( $d$ ) et de la tension d'accélération appliquée à l'entrée de ce dernier ( $U$ ).

$$t = \frac{d}{\sqrt{2U}} \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Equation I- 1 : Equation du temps de vol

Lors de mes travaux, j'ai utilisé un spectromètre de masse de type temps de vol hybride MicrOTOF Q II (Bruker Daltonics) composé des éléments de transfert, d'un analyseur quadripolaire et d'une cellule de collision suivi d'un analyseur à temps de vol (ToF) à accélération orthogonale (en anglais Orthogonal Acceleration ToF, « oaToF »). La Figure I-7 illustre les grandes composantes de l'appareil.

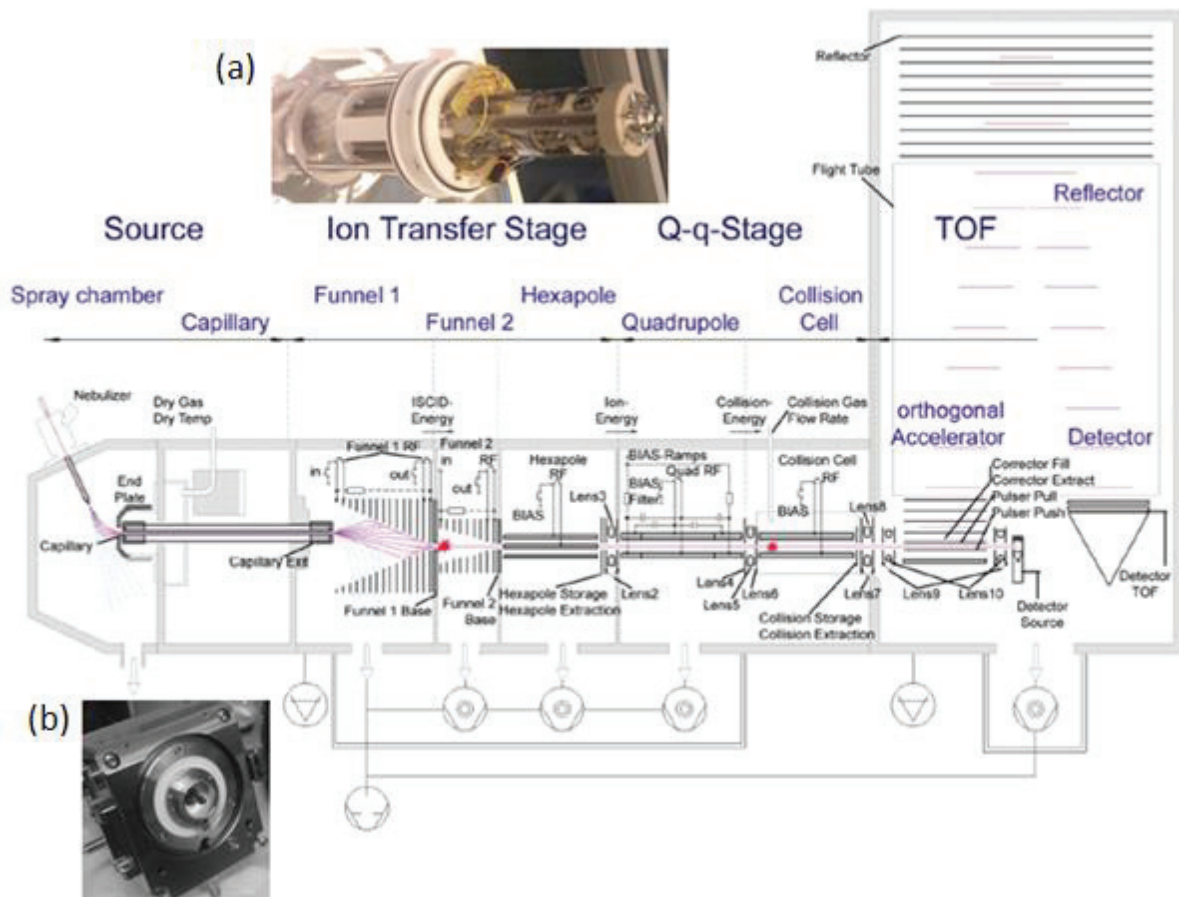


Figure I- 7 : Schéma du MicroTOF Q II (Bruker, 2008) et photos de (a) la zone de transfert et de l'hexapôle, et (b) du bloc source

- **Les éléments de transfert** : Lorsque les ions sont formés dans la source d'ionisation electrospray, ils vont être acheminés vers le premier quadripôle en passant par la zone de transfert. L'objectif de cette zone est de séparer les ions analytes du gaz de séchage et du solvant et de transférer ces ions, avec des pertes minimales, vers le premier quadripôle. Dans un premier temps, les ions passent au travers de guides d'ions en forme d'entonnoir, appelés funnels. La tension appliquée sur ces funnels génère un potentiel qui limite le faisceau d'ions à l'intérieur. Ensuite, les ions passent à travers un hexapôle qui transporte et focalise les ions à l'aide d'une tension, en direction du premier quadripôle.

- **L'analyseur quadripolaire et la cellule de collision** : Selon le mode d'acquisition employé, le premier quadripôle agit comme un filtre en sélectionnant un ion ou comme un élément de transmission d'ions classique. Ensuite, les ions sont dirigés vers la cellule de collision qui permet de les fragmenter grâce à une énergie de collision définie.

- **L'analyseur à temps de vol** : Cette partie de l'appareil est constituée elle-même de 3 parties : la zone d'accélération orthogonale, le réflectron et le détecteur.

\* La zone d'accélération orthogonale, appelé pusher, dévie les ions et les transfère à l'aide d'électrodes, afin que tous les ions aient la même énergie cinétique initiale. Ainsi, la séparation des ions est basée uniquement sur leur masse moléculaire et leur charge.

\* La principale tâche d'un réflectron est de normaliser les éventuelles différences d'énergies cinétiques initiales et donc d'améliorer la résolution. Des ions de même masse, mais d'énergies cinétiques inégales vont pénétrer dans le champ du réflectron à des profondeurs différentes, ce qui compense leur énergie de départ variable.

\* Le principal objectif du détecteur est de convertir un signal d'ions en un signal électrique. Il est constitué de micro-canaux fonctionnant comme des multiplicateurs d'électrons.

Les spectromètres de masse à temps de vol permettent des applications nécessitant une résolution élevée et la mesure de masse isotopique très précise. A partir d'une masse exacte, il sera possible de remonter à la composition élémentaire du composé correspondant, ce qui est utile pour l'identification structurale d'une molécule. En effet, la résolution du MicrOTOF Q II peut atteindre 7 000 sur un ion de  $m/z$  égale à 200 Da. Plus un ion aura une  $m/z$  importante, plus la résolution sera élevée. En effet, celle-ci est déterminée par le rapport de la  $m/z$  sur la différence de  $m/z$ , considérée comme la largeur à mi-hauteur du pic. Quant à la précision en masse, elle est de 0,001 % avec un ToF avec réflectron, soit 5 ppm ou 1 mDa avec un ion de  $m/z$  égale à 200 Da. De plus, notre appareillage permet d'acquérir les données en mode MS ou MS/MS. En effet, la présence de deux quadripôles, dont une cellule de collision permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant en mode MS/MS.

#### I.6.2.4. Applications

Des systèmes utilisant la chromatographie liquide couplée à des spectromètres de masse de type triple quadripôle sont utilisés préférentiellement pour des analyses ciblées avec le développement de méthodes multirésidus et la quantification de composés connus notamment pour la caractérisation des expositions humaines environnementales. De nombreuses études ont démontré la contamination des organismes vivants au travers des matrices biologiques comme les abeilles (Kasiotis *et al.*, 2014), l'urine (Yu *et al.*, 2014), le sang (Luzardo *et al.*, 2015), le sérum (Vela-Soria *et al.*, 2014), les tissus placentaires (Jiménez-Díaz *et al.*, 2013) ou encore le méconium (Berton *et al.*, 2014), mais aussi des

matrices environnementales comme l'eau (Lazartigues *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2014), les sols et les sédiments (Lazartigues *et al.*, 2011; Salvia *et al.*, 2012).

Plus récemment, avec l'essor de nouvelles approches dites non ciblées, de type screening, appliquées à la métabolomique, de nouveaux types de spectromètres de masse, dits haute résolution, ont été conçus et ont connu un fort engouement auprès des chercheurs. En effet, la chromatographie liquide couplée à un Orbitrap (Rajski *et al.*, 2014; Roca *et al.*, 2014) ou encore le FT-ICR (Hasegawa *et al.*, 2007) sont utilisés dans le cas de l'étude de l'Exposome par approche non ciblée ; de même que les spectromètres de masse à temps de vol, qui sont largement employés pour l'analyse de diverses matrices, notamment les matrices biologiques telles que l'urine (Domínguez-Romero *et al.*, 2015; Fardet *et al.*, 2008), le plasma (Chen *et al.*, 2014), le sérum (McMahen *et al.*, 2015), le sang (Birkler *et al.*, 2012) et les matrices environnementales comme sources d'exposition telles que l'eau (Masiá *et al.*, 2013) ou encore certains aliments (Sivaperumal *et al.*, 2015).

### I.7. Conclusion

Cette étude a permis de synthétiser les informations relatives à l'étude de l'Exposome, notamment pour les différentes approches, stratégies et outils analytiques dans le but de caractériser les expositions humaines environnementales. Dans le cadre de ma thèse, une stratégie descendante a été choisie, afin d'avoir une vision globale de l'Exposome de chaque individu. Pour ce faire, l'échantillon biologique sélectionné est l'urine humaine pour ses nombreux avantages au niveau du prélèvement et au niveau analytique. L'Exposome sera étudié par approche ciblée (chapitres II et III), mais aussi par approche non ciblée (chapitre IV) et ce par chromatographie liquide couplée avec différents types de spectromètres de masse.

## **Références bibliographiques**



- Abbviecare, 2008. Qu'est-ce que le TNF $\alpha$  ? [WWW Document]. [www.abbviecare.fr](http://www.abbviecare.fr). URL [http://www.abbviecare.fr/patient\\_contenu.asp?contenu\\_rub=Envisager+un+traitement+par+anti-TNF%26alpha%3B&contenu\\_ssrub=Pour+en+savoir+plus&contenu\\_titre=Qu%92est-ce+que+le+TNF%26alpha%3B+%3F&specialite=gastro&icone=micirhumato](http://www.abbviecare.fr/patient_contenu.asp?contenu_rub=Envisager+un+traitement+par+anti-TNF%26alpha%3B&contenu_ssrub=Pour+en+savoir+plus&contenu_titre=Qu%92est-ce+que+le+TNF%26alpha%3B+%3F&specialite=gastro&icone=micirhumato)
- ABSciex, 2005. Service présentation API 3200.
- Adler, T., 2010. The Exposome: A Powerful Approach for Evaluating Environmental Exposures and Their Influences on Human Disease.
- Aouba, A., 2007. Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution, bulletin épidémiologique hebdomadaire. *Bull. Épidémiologique Hebd.* 308–314.
- Athersuch, T.J., 2012. The role of metabolomics in characterizing the human exposome. *Bioanalysis* 4, 2207–2212. doi:10.4155/bio.12.211
- Beckonert, O., Keun, H.C., Ebbels, T.M.D., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protoc.* 2, 2692–2703. doi:10.1038/nprot.2007.376
- Bedair, M., Sumner, L.W., 2008. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *TrAC Trends Anal. Chem., Metabolomics* 27, 238–250. doi:10.1016/j.trac.2008.01.006
- Berton, T., Mayhoub, F., Chardon, K., Duca, R.-C., Lestremay, F., Bach, V., Tack, K., 2014. Development of an analytical strategy based on LC–MS/MS for the measurement of different classes of pesticides and their metabolites in meconium: Application and characterisation of foetal exposure in France. *Environ. Res.* 132, 311–320. doi:10.1016/j.envres.2014.03.034
- Birkler, R.I.D., Telving, R., Ingemann-Hansen, O., Charles, A.V., Johannsen, M., Andreasen, M.F., 2012. Screening analysis for medicinal drugs and drugs of abuse in whole blood using ultra-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UPLC–TOF-MS)—Toxicological findings in cases of alleged sexual assault. *Forensic Sci. Int.* 222, 154–161. doi:10.1016/j.forsciint.2012.05.019
- Blasco, H., Nadal-Desbarats, L., Pradat, P.-F., Gordon, P.H., Antar, C., Veyrat-Durebex, C., Moreau, C., Devos, D., Mavel, S., Emond, P., Andres, C.R., Corcia, P., 2014. Untargeted <sup>1</sup>H-NMR metabolomics in CSF: Toward a diagnostic biomarker for motor neuron disease. *Neurology* 82, 1167–1174. doi:10.1212/WNL.0000000000000274
- Bonvallet, N., Tremblay-Franco, M., Chevrier, C., Canlet, C., Debrauwer, L., Cravedi, J.-P., Cordier, S., 2014. Potential input from metabolomics for exploring and understanding the links between environment and health. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 17, 21–44. doi:10.1080/10937404.2013.860318
- Bruker, 2008. micrOTOFcontrol User Manual.
- Carwile, J.L., Michels, K.B., 2011. Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003–2006. *Environ. Res.* 111, 825–830. doi:10.1016/j.envres.2011.05.014
- Ceglarek, U., Leichtle, A., Brügel, M., Kortz, L., Brauer, R., Bresler, K., Thiery, J., Fiedler, G.M., 2009. Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics. *Mol. Cell. Endocrinol.* 301, 266–271. doi:10.1016/j.mce.2008.10.013
- Centers for Disease Control and Prevention, 2014. Exposome and Exposomics [WWW Document]. URL <http://www.cdc.gov/niosh/topics/exposome/> (accessed 9.8.15).
- Chen, Z.-W., Tong, L., Li, S.-M., Li, D.-X., Zhang, Y., Zhou, S.-P., Zhu, Y.-H., Sun, H., 2014. Identification of metabolites of Radix Paeoniae Alba extract in rat bile, plasma and urine by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Pharm. Anal.* 4, 14–25. doi:10.1016/j.jpha.2013.06.004
- Chernushevich, I.V., Loboda, A.V., Thomson, B.A., 2001. An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 36, 849–865. doi:10.1002/jms.207



- Cicoella, A., 2013. *Toxique Planète: Le scandale invisible des maladies chroniques*. Seuil.
- CIRC, 2011. *Déclaration des Asturies*.
- Commission of the European Communities, 2002. Commission decision of 12 august 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- Czene, K., Lichtenstein, P., Hemminki, K., 2002. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish family-cancer database. *Int. J. Cancer* 99, 260–266. doi:10.1002/ijc.10332
- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A.D., Murray, C.J.L., Ezzati, M., Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers), 2005. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 366, 1784–1793. doi:10.1016/S0140-6736(05)67725-2
- De Hoffmann, E., Stroobant, V., 2005. *Spectrométrie de masse*. Sciences Sup.
- Dillen, L., Cools, W., Vereyken, L., Lorreyne, W., Huybrechts, T., de Vries, R., Ghobarah, H., Cuyckens, F., 2012. Comparison of triple quadrupole and high-resolution TOF-MS for quantification of peptides. *Bioanalysis* 4, 565–579. doi:10.4155/bio.12.3
- Domínguez-Romero, J.C., García-Reyes, J.F., Lara-Ortega, F.J., Molina-Díaz, A., 2015. Screening and confirmation capabilities of liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of 200 multiclass sport drugs in urine. *Talanta* 134, 74–88. doi:10.1016/j.talanta.2014.10.050
- Duarte, I.F., Diaz, S.O., Gil, A.M., 2014. Review: NMR metabolomics of human blood and urine in disease research. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 93, 17–26. doi:10.1016/j.jpba.2013.09.025
- Elbaz, A., Clavel, J., Rathouz, P.J., Moisan, F., Galanaud, J.-P., Delemotte, B., Alperovitch, A., Tzourio, C., 2009. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 66, 494–504. doi:10.1002/ana.21717
- Ellis, J.K., Athersuch, T.J., Thomas, L.D.K., Teichert, F., Pérez-Trujillo, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., Singh, R., Järup, L., Bundy, J.G., Keun, H.C., 2012. Metabolic profiling detects early effects of environmental and lifestyle exposure to cadmium in a human population. *BMC Med.* 10, 61–71. doi:10.1186/1741-7015-10-61
- Fardet, A., Llorach, R., Martin, J.-F., Besson, C., Lyan, B., Pujos-Guillot, E., Scalbert, A., 2008. A Liquid Chromatography–Quadrupole Time-of-Flight (LC–QTOF)-based Metabolomic Approach Reveals New Metabolic Effects of Catechin in Rats Fed High-Fat Diets. *J. Proteome Res.* 7, 2388–2398. doi:10.1021/pr800034h
- Fernández-Peralbo, M.A., Luque de Castro, M.D., 2012. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 41, 75–85. doi:10.1016/j.trac.2012.08.011
- Ferrer, I., Thurman, E.M., 2003. Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. *TrAC Trends Anal. Chem.* 22, 750–756. doi:10.1016/S0165-9936(03)01013-6
- Flahault, A., 2014. De quoi meurt-on aujourd'hui : les dix premières causes de décès en France comparées à il y a 100 ans. [www.atlantico.fr](http://www.atlantico.fr).
- Forcisi, S., Moritz, F., Kanawati, B., Tziotis, D., Lehmann, R., Schmitt-Kopplin, P., 2013. Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J. Chromatogr. A* 1292, 51–65. doi:10.1016/j.chroma.2013.04.017
- Gavaghan, C.L., Nicholson, J.K., Connor, S.C., Wilson, I.D., Wright, B., Holmes, E., 2001. Directly coupled high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopic with chemometric studies on metabolic variation in Sprague--Dawley rats. *Anal. Biochem.* 291, 245–252.

- Guy, P.A., Tavazzi, I., Bruce, S.J., Ramadan, Z., Kochhar, S., 2008. Global metabolic profiling analysis on human urine by UPLC–TOFMS: Issues and method validation in nutritional metabolomics. *J. Chromatogr. B, Hyphenated Techniques for Global Metabolite Profiling* 871, 253–260. doi:10.1016/j.jchromb.2008.04.034
- Hasegawa, M., Takenaka, S., Kuwamura, M., Yamate, J., Tsuyama, S., 2007. Urinary metabolic fingerprinting for amiodarone-induced phospholipidosis in rats using FT-ICR MS. *Exp. Toxicol. Pathol.* 59, 115–120. doi:10.1016/j.etp.2007.04.001
- Higginson, J., 1979. Cancer and environment: Higginson speaks out. *Science* 205, 1363–1364. doi: 10.1126/science.472753
- Holčapek, M., Jirásko, R., Lísá, M., 2012. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr. A, Mass Spectrometry: Innovation and Application. Part VII* 1259, 3–15. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.072
- Jiménez-Díaz, I., Molina-Molina, J.M., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, O., Navalón, A., Real, M., Sáenz, J.M., Fernández, M.F., Olea, N., 2013. Simultaneous determination of the UV-filters benzyl salicylate, phenyl salicylate, octyl salicylate, homosalate, 3-(4-methylbenzylidene) camphor and 3-benzylidene camphor in human placental tissue by LC–MS/MS. Assessment of their in vitro endocrine activity. *J. Chromatogr. B* 936, 80–87. doi:10.1016/j.jchromb.2013.08.006
- Jupin, M., Michiels, P. j., Girard, F. c., Spraul, M., Wijmenga, S. s., 2014. NMR metabolomics profiling of blood plasma mimics shows that medium- and long-chain fatty acids differently release metabolites from human serum albumin. *J. Magn. Reson.* 239, 34–43. doi:10.1016/j.jmr.2013.11.019
- Kandaraki, E., Chatzigeorgiou, A., Livadas, S., Palioura, E., Economou, F., Koutsilieris, M., Palimeri, S., Panidis, D., Diamanti-Kandarakis, E., 2011. Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 480–484. doi:10.1210/jc.2010-1658
- Kasiotis, K.M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P., Machera, K., 2014. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Sci. Total Environ.* 485–486, 633–642. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.042
- Lamondlab, n.d. electrospray ionisation [WWW Document]. lamondlab. URL [www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php](http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php)
- Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B., Melzer, D., 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 300, 1303–1310. doi:10.1001/jama.300.11.1303
- Lazartigues, A., Fratta, C., Baudot, R., Wiest, L., Feidt, C., Thomas, M., Cren-Olivé, C., 2011. Multiresidue method for the determination of 13 pesticides in three environmental matrices: water, sediments and fish muscle. *Talanta* 85, 1500–1507. doi:10.1016/j.talanta.2011.06.023
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., Hemminki, K., 2000. Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* 343, 78–85. doi:10.1056/NEJM200007133430201
- Li, D., Zhou, Z., Qing, D., He, Y., Wu, T., Miao, M., Wang, J., Weng, X., Ferber, J.R., Herrinton, L.J., Zhu, Q., Gao, E., Checkoway, H., Yuan, W., 2010. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 25, 519–527. doi:10.1093/humrep/dep381
- Lindon, J.C., Beckonert, O.P., Holmes, E., Nicholson, J.K., 2009. High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy: Application to biomedical studies. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 55, 79–100. doi:10.1016/j.pnmrs.2008.11.004
- Lodish, M.H., Berk, M.A., Matsudaira, P., Darnell, J., 2005. *Biologie moléculaire de la cellule*. De

- Boeck Supérieur.
- Lu, X., Zhao, X., Bai, C., Zhao, C., Lu, G., Xu, G., 2008. LC-MS-based metabonomics analysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 866, 64–76. doi:10.1016/j.jchromb.2007.10.022
- Luzardo, O.P., Almeida-González, M., Ruiz-Suárez, N., Zumbado, M., Henríquez-Hernández, L.A., Meilán, M.J., Camacho, M., Boada, L.D., 2015. Validated analytical methodology for the simultaneous determination of a wide range of pesticides in human blood using GC–MS/MS and LC–ESI/MS/MS and its application in two poisoning cases. *Sci. Justice.* 55, 307-315. doi:10.1016/j.scijus.2015.04.007
- Masiá, A., Ibáñez, M., Blasco, C., Sancho, J.V., Picó, Y., Hernández, F., 2013. Combined use of liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in systematic screening of pesticides and other contaminants in water samples. *Anal. Chim. Acta* 761, 117–127. doi:10.1016/j.aca.2012.11.032
- McMahan, R.L., Strynar, M.J., Dagnino, S., Herr, D.W., Moser, V.C., Garantziotis, S., Andersen, E.M., Freeborn, D.L., McMillan, L., Lindstrom, A.B., 2015. Identification of fipronil metabolites by time-of-flight mass spectrometry for application in a human exposure study. *Environ. Int.* 78, 16–23. doi:10.1016/j.envint.2015.01.016
- Melzer, D., Rice, N.E., Lewis, C., Henley, W.E., Galloway, T.S., 2010. Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PloS One* 5, 8673-8682. doi:10.1371/journal.pone.0008673
- Miller, G.W., 2014. Chapter 1 - The Exposome: Purpose, Definition, and Scope, in: *The Exposome*. Academic Press, San Diego, 1–12.
- Ministère de la Santé et de la Protection sociale, Ministère de l'Écologie et du Développement durable, Ministère de l'Emploi, du Travail et de la Cohésion sociale, Ministère délégué à la Recherche, 2009. Résumé du plan national santé environnement.
- Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de la mer, Ministère de la et des sports santé, Ministère de l'enseignement et de la recherche supérieur, Ministère du travail, des relations sociales, de la famille, de la solidarité et de la ville, 2009. Santé Environnement, 2ème Plan national 2009-2013, Des actions concrètes pour la prévention des risques sanitaires liés à l'environnement.
- Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, Ministère des affaires sociales et de la santé, 2014. Contribution à l'Elaboration du 3ème Plan National Santé Environnement (PNSE3), Rapport des Groupes de Travail et du Comité d'Appui Scientifique chargés de propositions d'action pour le PNSE3.
- OMS, 2013. OMS | Maladies non transmissibles [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/fr/> (accessed 4.29.15).
- OMS, 2011. Déclaration des Asturies.
- Paoloni-Giacobino, A., 2011. Post genomic decade--the epigenome and exposome challenges. *Swiss Med. Wkly.* 141, 13321-13328. doi:10.4414/smw.2011.13321
- Peters, A., Hoek, G., Katsouyanni, K., 2012. Understanding the link between environmental exposures and health: does the exposome promise too much? *J. Epidemiol. Community Health* 66, 103–105. doi:10.1136/jech-2011-200643
- Pleil, J.D., 2012. Categorizing biomarkers of the human exposome and developing metrics for assessing environmental sustainability. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 15, 264–280. doi:10.1080/10937404.2012.672148
- Rajski, L., Gómez-Ramos, M. del M., Fernández-Alba, A.R., 2014. Large pesticide multiresidue screening method by liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry in full scan mode applied to fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A* 1360, 119–127. doi:10.1016/j.chroma.2014.07.061

- Rappaport, S.M., 2011. Implications of the exposome for exposure science. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 21, 5–9. doi:10.1038/jes.2010.50
- Rappaport, S.M., n.d. Exposome workshop (summary and close).
- Roca, M., Leon, N., Pastor, A., Yusà, V., 2014. Comprehensive analytical strategy for biomonitoring of pesticides in urine by liquid chromatography–orbitrap high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1374, 66–76. doi:10.1016/j.chroma.2014.11.010
- Roux, A., 2011. Analyse du métabolome urinaire humain par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution. Paris 6.
- Salvia, M.-V., Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R., Cren-Olivé, C., 2012. Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. *J. Chromatogr. A* 1245, 122–133. doi:10.1016/j.chroma.2012.05.034
- Santone, C., Dinallo, V., Paci, M., D'Ottavio, S., Barbato, G., Bernardini, S., 2014. Saliva metabolomics by NMR for the evaluation of sport performance. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88, 441–446. doi:10.1016/j.jpba.2013.09.021
- Shi, Z., Hu, J., Li, Q., Zhang, S., Liang, Y., Zhang, H., 2014. Graphene based solid phase extraction combined with ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for carbamate pesticides analysis in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 1355, 219–227. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.085
- Sivaperumal, P., Anand, P., Riddhi, L., 2015. Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem.* 168, 356–365. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.072
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 2003. *Principes d'analyse instrumentale*. De Boeck Supérieur.
- Syage, J.A., Short, L.C., Cai, S.-S., 2008. Atmospheric Pressure Photoionization : The Second Source for LC-MS? *LC GC N. Am.* 26, 286–296.
- Takeuchi, T., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Takai, Y., Taketani, Y., 2004. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr. J.* 51, 165–169. doi:10.1507/endocrj.51.165
- Theodoridis, G.A., Gika, H.G., Want, E.J., Wilson, I.D., 2012. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. *Anal. Chim. Acta* 711, 7–16. doi:10.1016/j.aca.2011.09.042
- Tiainen, M., Soininen, P., Laatikainen, R., 2014. Quantitative Quantum Mechanical Spectral Analysis (qQMSA) of 1H NMR spectra of complex mixtures and biofluids. *J. Magn. Reson.* 242, 67–78. doi:10.1016/j.jmr.2014.02.008
- Vela-Soria, F., Ballesteros, O., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, L., Navalón, A., 2014. A new method for the determination of benzophenone-UV filters in human serum samples by dispersive liquid–liquid microextraction with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 121, 97–104. doi:10.1016/j.talanta.2013.12.048
- Wang, H.-P., Liang, Y.-J., Sun, Y.-J., Chen, J.-X., Hou, W.-Y., Long, D.-X., Wu, Y.-J., 2013. 1H NMR-based metabonomic analysis of the serum and urine of rats following subchronic exposure to dichlorvos, deltamethrin, or a combination of these two pesticides. *Chem. Biol. Interact.* 203, 588–596. doi:10.1016/j.cbi.2013.03.017
- Wild, C.P., 2005. Complementing the genome with an “exposome”: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 14, 1847–1850. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0456
- Wilm, M.S., Mann, M., 1994. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 136, 167–180. doi:10.1016/0168-1176(94)04024-9

- Wolff, M.M., Stephens, W.E., 1953. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Rev. Sci. Instrum.* 24, 616–617. doi:10.1063/1.1770801
- Yamashita, M., Fenn, J.B., 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88, 4451–4459. doi:10.1021/j150664a002
- Yu, J., Wang, S., Zhao, G., Wang, B., Ding, L., Zhang, X., Xie, J., Xie, F., 2014. Determination of urinary aromatic amines in smokers and nonsmokers using a MIPs-SPE coupled with LC–MS/MS method. *J. Chromatogr. B* 958, 130–135. doi:10.1016/j.jchromb.2014.03.023
- Zhang, A., Sun, H., Wu, X., Wang, X., 2012. Urine metabolomics. *Clin. Chim. Acta* 414, 65–69. doi:10.1016/j.cca.2012.08.016

**Chapitre II : Développement d'une  
méthode d'extraction par SBSE d'additifs  
plastiques suivie d'une analyse par  
UHPLC-MS/MS**



## II.1. Introduction et objectifs de l'étude

Comme présenté dans le premier chapitre de ce mémoire, certaines maladies peuvent être indubitablement associées aux expositions environnementales auxquelles l'Homme est confronté, et qui représente l'Exposome. L'une des stratégies pour l'étude de ce dernier consiste à développer des méthodes d'analyses sélectives, spécifiques et sensibles.

Parmi les contaminants environnementaux, on compte les additifs plastiques du fait des différentes interactions pouvant se produire entre un contenant et un contenu. La migration des substances présentes initialement dans les emballages vers le contenu correspond à un phénomène inquiétant pour la santé du consommateur et soulève donc de nombreuses interrogations qui s'inscrivent dans la problématique de l'Exposome. A titre d'exemple, le cas du bisphénol A, présent dans de nombreux objets de la vie courante, et notamment dans les biberons, serait responsable d'effets biologiques significatifs (Michałowicz, 2014).

Afin de pouvoir suivre la migration des additifs et de leurs produits de dégradation pouvant être relargués dans les liquides consommables comme l'eau par des emballages plastiques et ainsi être ingérés par l'Homme, nous avons choisi de mettre au point une méthode d'extraction de type Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) à base de dérivés de polydiméthylsiloxane (PDMS) en mode désorption liquide, suivie d'une analyse par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (UHPLC-MS/MS).

Le principal objectif de ce travail est d'optimiser toutes les étapes de préparation d'échantillon : de la fabrication du barreau SBSE à son utilisation, incluant donc les étapes de polymérisation, de mise en forme, de conditionnement et d'optimisation d'extraction (solvant, durée et volume de solvant pour l'étape de désorption, durée d'adsorption...). Nous disposons de différents monomères permettant l'élaboration de trois types de barreaux SBSE artisanaux. Ensuite, cette méthode sera appliquée à un échantillon biologique, l'urine. Enfin, l'efficacité des barreaux artisanaux sera rapprochée de celle des barreaux commerciaux pour les additifs plastiques d'intérêt.

## II.2. Etat de l'art

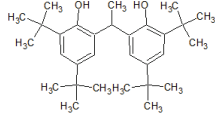
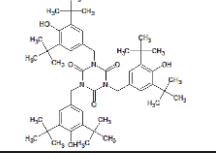
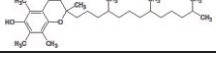
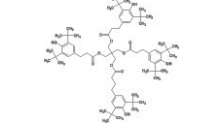
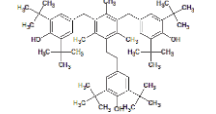
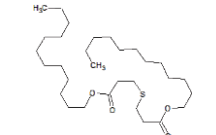
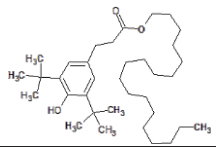
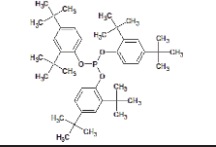
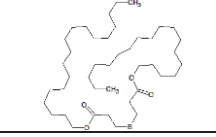
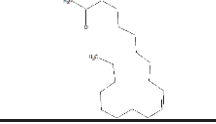
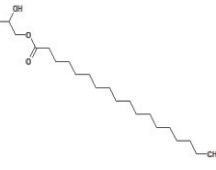
### II.2.1. Choix des composés d'intérêt

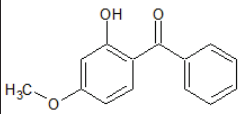
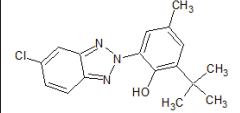
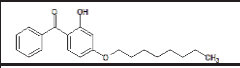
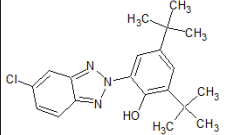
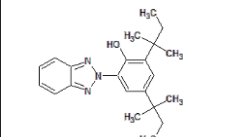
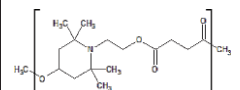
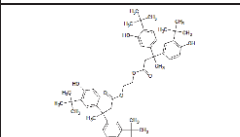
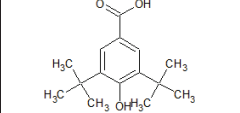
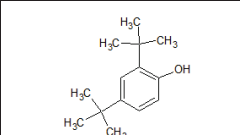
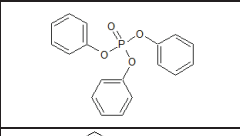
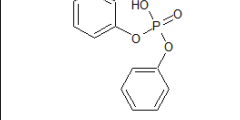
L'Exposome comprend toutes les expositions auxquelles nous sommes soumis, y compris les matières plastiques. Lors de la première ère industrielle, après la seconde guerre



mondiale, l'accessibilité au pétrole a permis l'entrée des matières plastiques dans notre mode de vie. Depuis, les matières plastiques sont présentes partout, dans le domaine de l'agroalimentaire, les produits d'entretien, les secteurs de la santé, l'hygiène et la beauté, l'industrie et le transport. C'est pourquoi les additifs plastiques composent la famille de molécules choisie pour cette étude. Ils ont été choisis lors de travaux réalisés au cours d'une thèse précédente et ont d'ores et déjà été retrouvés et/ou quantifiés dans l'urine humaine (Pouech, 2014). Une méthode UHPLC-MS/MS a également été développée durant ces travaux. Tous les additifs plastiques d'intérêt sont autorisés par la Pharmacopée Européenne. De plus, leur faible polarité est un avantage pour le développement de leur extraction par SBSE. En effet, cette technique permet l'extraction de composés majoritairement apolaires. La liste des composés sélectionnés ainsi que leurs propriétés physico-chimiques sont présentées dans le Tableau II-1.

Tableau II- 1: Caractéristiques physico-chimiques des additifs plastiques d'intérêt avec leur numéro CAS, leur formule brute, la valeur du logarithme de leur coefficient de partage octanol/eau et leur structure

Famille	Analyte	n° CAS	Formule brute	Log $K_{\text{octanol/eau}}$	Structure
Antioxydants	Isonox 129	35958-30-6	$C_{30}H_{46}O_2$	9,9	
	Irganox 3114	27676-62-6	$C_{48}H_{69}N_3O_6$	13,2	
	Vitamine E	10191-41-0	$C_{29}H_{50}O_2$	10,5	
	Irganox 1010	6683-19-8	$C_{73}H_{108}O_{12}$	19,3	
	Irganox 1330	1709-70-2	$C_{54}H_{78}O_3$	18,2	
	Naugard DLTDP	123-28-4	$C_{30}H_{58}O_4S$	10,5	
	Irganox 1076	2082-79-3	$C_{35}H_{62}O_3$	12,5	
	Irgafos 168	31570-04-4	$C_{42}H_{63}O_3P$	15,8	
	Naugard DSTDP	693-36-7	$C_{42}H_{82}O_4S$	15,8	
Agents de démoulage, lubrifiants	Oléamide	301-02-0	$C_{18}H_{35}NO$	6,0	
	Glycérol monostéarate	123-94-4	$C_{21}H_{42}O_4$	6,0	

Famille	Analyte	n° CAS	Formule brute	Log $K_{\text{octanol/eau}}$	Structure
Stabilisants de la lumière	Cyasorb UV 9	131-57-7	$C_{14}H_{12}O_3$	3,6	
	Tinuvin 326	3896-11-05	$C_{17}H_{18}ClN_3O$	5,3	
	Chimassorb 81	1843-05-6	$C_{21}H_{26}O_3$	6,7	
	Tinuvin 327	3864-99-1	$C_{20}H_{24}ClN_3O$	6,5	
	Tinuvin 328	25973-55-1	$C_{22}H_{29}N_3O$	6,8	
Agent de protection contre la lumière	Tinuvin 622	65447-77-0	$C_7H_{15}NO$	5,2	
Stabilisant	Hostanox 03	32509-66-3	$C_{50}H_{66}O_8$	12,6	
Produits de dégradation de l'irganox 1010	Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	1421-49-4	$C_{15}H_{22}O_3$	4,4	
	2,4-ditertbutyl-phénol	96-76-4	$C_{14}H_{22}O$	4,8	
	Triphénylphosphate	115-86-6	$C_{18}H_{15}O_4P$	4,6	
Produit de dégradation de l'irgafos 168	Diphényl phosphate	838-85-7	$C_{12}H_{11}O_4P$	3,1	

## II.2.2. Extraction des composés d'intérêt

La plupart des études réalisées sur les additifs plastiques consistent à extraire ces composés dans des matrices polymères. Plusieurs méthodes d'extraction solide-liquide peuvent être utilisées telles que l'extraction par Soxhlet ou l'extraction par dissolution-

précipitation. Ces méthodes consistent à extraire par une élévation de la température les additifs de la matrice polymère solide par un solvant. Deux études basées sur une extraction solide-liquide avec de l'isopropanol (Ekvall, 2012; Leikvoll, 2011) ont montré que les cathéters utilisés dans le milieu médical pouvaient relarguer des additifs plastiques, ce qui soulève la question de savoir si les additifs plastiques sont présents dans les fluides biologiques, tels que l'urine. Afin de déterminer si l'urine humaine contient de tels additifs, une méthode d'extraction SBSE a été développée au laboratoire. En effet, cette technique est de plus en plus utilisée dans les secteurs de la santé pour ses nombreux avantages, tels que sa facilité d'utilisation, sa possible automatisation et sa grande efficacité. Celle-ci est particulièrement intéressante dans le cas d'étude de matrices biologiques puisqu'elle se compose de peu d'étapes qui permettent de réduire le contact au maximum entre l'opérateur et l'échantillon ainsi que les sources de contamination.

#### II.2.2.1. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)

L'extraction sur phase solide de barreaux d'agitation est une technique d'extraction basée sur le partage des analytes entre la matrice et une phase polymère spécifique, le plus souvent du polydiméthylsiloxane (PDMS), supportée par une enveloppe en verre contenant un barreau aimanté, comme l'illustre la Figure II-1. Ces barreaux d'extraction sont actuellement commercialisés par la société Gerstel sous le nom de Twister<sup>®</sup>. La technique d'extraction par SBSE permet d'extraire des analytes à partir de différents types d'échantillons (liquide, gazeux ou solide). Elle a été introduite par Baltussen en 1999 (Baltussen *et al.*, 1999).

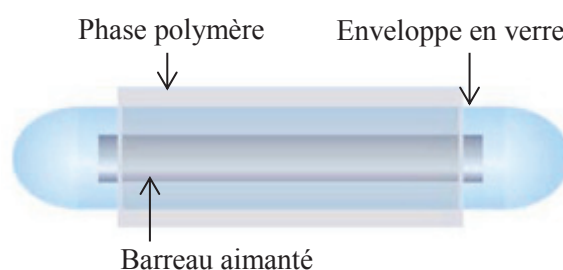


Figure II- 1 : Barreau SBSE

##### II.2.2.1.1. Théorie et principe

Le principe de l'extraction SBSE est basé sur le partage de l'analyte entre deux phases : la phase solide du barreau SBSE et la matrice dans laquelle se trouve le composé initialement. Ce partage est défini par l'affinité de l'analyte pour une phase plutôt qu'une autre.

Dans le cas d'échantillons aqueux, de nombreuses études ont corrélé le coefficient de partage entre le PDMS et l'échantillon ( $K_{\text{PDMS/eau}}$ ) avec le coefficient de partage octanol/eau ( $K_{\text{octanol/eau}}$ ). Ainsi, le coefficient de partage octanol/eau s'avère être un bon indicateur sur la capacité d'extraction d'un analyte donné par la technique SBSE (David *et al.*, 2003). Il est utilisé pour évaluer le caractère lipophile d'une molécule. Ainsi, cet équilibre est défini par l'équation suivante (Equation II-1) :

$$K_{\text{PDMS/eau}} \approx K_{\text{octanol/eau}} = \frac{C_{\text{PDMS}}}{C_{\text{eau}}} = \left( \frac{m_{\text{PDMS}}}{m_{\text{eau}}} \right) \left( \frac{V_{\text{eau}}}{V_{\text{PDMS}}} \right) = \beta \left( \frac{m_{\text{PDMS}}}{m_{\text{eau}}} \right)$$

Equation II- 1 : Relation entre le coefficient de partage octanol/eau et le coefficient de partage entre la phase PDMS du barreau SBSE et la matrice aqueuse

Avec  $C_{\text{PDMS}}$  étant la concentration des analytes dans la phase PDMS du barreau SBSE ;  $C_{\text{eau}}$  la concentration des analytes dans l'eau ;  $m_{\text{PDMS}}$  et  $m_{\text{eau}}$  respectivement la masse des analytes dans la phase PDMS supportée sur le barreau SBSE et dans l'eau ;  $V_{\text{eau}}$  et  $V_{\text{PDMS}}$  respectivement le volume d'eau et le volume de phase PDMS utilisée ; et le rapport de phase  $\beta = V_{\text{eau}} / V_{\text{PDMS}}$ .

Le taux d'analytes extraits par le barreau SBSE ou taux de récupération  $R$  permet de déterminer l'efficacité de l'extraction SBSE. Il correspond au rapport de la quantité extraite d'analytes,  $m_{\text{ps}}$ , sur la quantité initiale d'analytes présents dans la matrice,  $m_{\text{eau}}$ . Ce rapport dépend directement du coefficient de partage  $K_{\text{ps/eau}}$  et du rapport de phase  $\beta$ . Ce taux de récupération est donné par l'Equation II-2 :

$$R = \frac{m_{\text{ps}}}{m_{\text{eau}}} = \frac{K_{\text{ps/eau}}}{K_{\text{ps/eau}} + \beta}$$

Equation II- 2 : Equation du taux de récupération d'une extraction SBSE

D'après cette équation, un important recouvrement d'analyte sur le barreau d'agitation peut être obtenu si un faible volume d'échantillon et un volume élevé de phase solide sont employés afin d'obtenir un faible facteur  $\beta$ .

#### II.2.2.1.2. Les différents types de SBSE

Il existe différents types d'extraction SBSE, suivant le type d'échantillon à analyser (liquide, gazeux, solide), la nature des analytes et le type d'analyse à effectuer après l'extraction (GC, LC).

Une extraction SBSE peut se décomposer en deux étapes distinctes : l'adsorption et la désorption. L'adsorption est l'étape qui va permettre l'extraction des analytes de l'échantillon vers la phase polymère du barreau SBSE. La désorption est l'étape qui va permettre de désorber, d'extraire les analytes de la phase du barreau SBSE grâce à un solvant ou à une élévation de la température.

L'étape d'adsorption est réalisable selon trois modes distincts :

- Mode immersion : le barreau SBSE est directement plongé dans l'échantillon liquide pendant un temps défini et sous agitation magnétique. Les analytes ayant une affinité pour la phase du barreau sont alors adsorbés sur cette dernière. Ce mode est illustré dans la Figure II-2. Il s'agit du mode que nous allons utiliser durant notre étude.

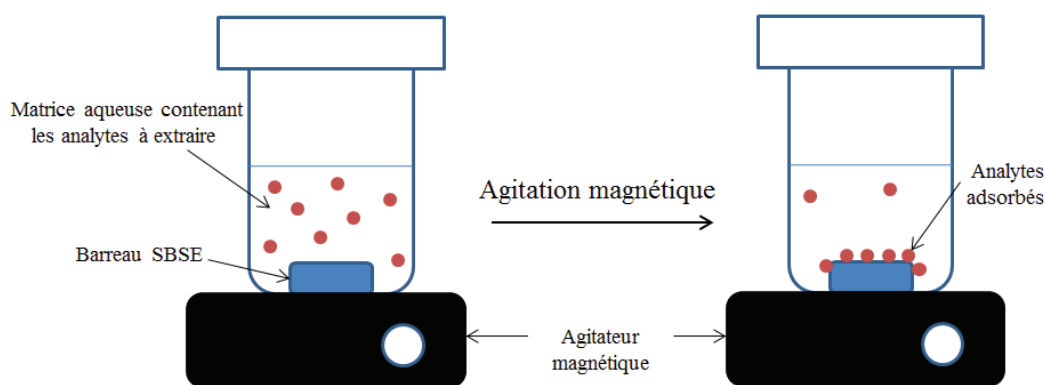


Figure II- 2 : Adsorption en mode immersion lors d'une extraction SBSE

- Mode « headspace » : L'adsorption en mode « headspace » est aussi appelé Headspace Sorptive Extraction (HSSE) (Bicchi *et al.*, 2002; Kanan, 2012; Thalhamer *et al.*, 2011). Il s'agit d'une technique SBSE appliquée à l'extraction de composés volatils d'un échantillon liquide, gazeux ou solide. Le barreau est fixé au bouchon et donc suspendu dans le flacon au-dessus de l'échantillon. Cependant, l'échantillon est agité afin de favoriser le passage des analytes en phase gazeuse. Ce mode est illustré dans la Figure II-3. Dans notre cas, ce mode n'est pas applicable puisque les composés d'intérêt ne sont pas volatils.

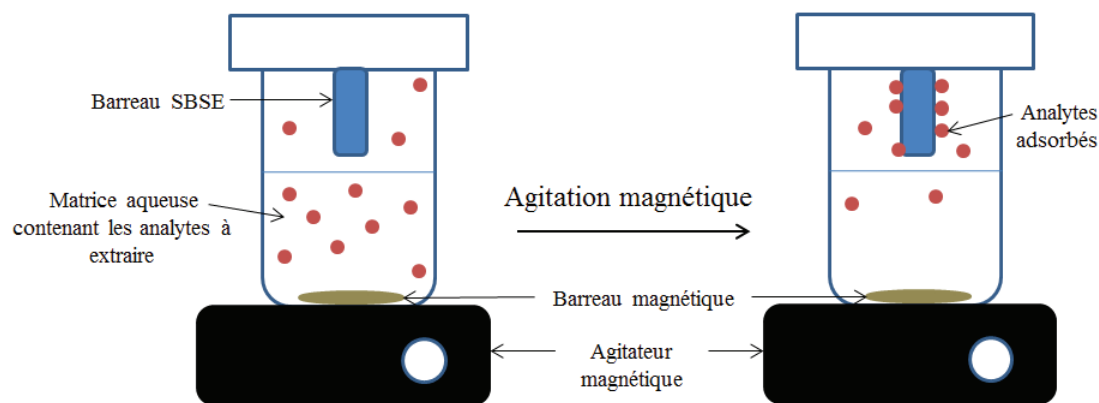


Figure II- 3 : Adsorption en mode « headspace » lors d'une extraction SBSE à partir d'un échantillon liquide

- Mode flux en continu : L'adsorption en mode flux en continu ou en anglais Continuous Flow SBSE (CF-SBSE) permet d'extraire des composés à partir d'un volume d'échantillon aqueux non pas fixe mais renouvelé en continu. Ce mode reflète plus particulièrement l'échantillonnage d'un liquide en mouvement, comme de l'eau de rivière par exemple (Mao *et al.*, 2012). Cependant, la détermination du rendement d'extraction doit tenir compte de certains paramètres tels que le débit d'eau entrant dans la cellule de mesure. Dans notre cas, ce mode n'est pas applicable puisque l'échantillon n'est pas disponible en grande quantité et n'est pas en mouvement.

L'étape de désorption est réalisable selon deux modes distincts :

- Désorption thermique : Comme son nom l'indique, les composés retenus sur la phase polymère sont désorbés par application d'une température élevée (jusqu'à environ 300 °C) et sont ensuite analysés en GC-MS (Cacho *et al.*, 2015; Ruan *et al.*, 2014). Les molécules désorbées de cette façon doivent donc être volatiles et non thermolabiles. La désorption thermique est réalisée à l'aide d'une unité TDU ou « Thermal Desorption Unit » montée en série avec un injecteur à programmation de température appelé CIS ou « Cooled Injection System ». Lorsque les molécules sont désorbées, elles sont condensées avant leur injection dans l'appareil de GC-MS. La majorité des applications de la SBSE utilise ce type de désorption.

- Désorption liquide : La désorption liquide consiste à extraire de la surface du barreau les molécules adsorbées sur le barreau à l'aide d'un solvant ou mélange de solvants. De la même façon que pour l'adsorption par immersion, le barreau est placé dans un solvant pendant une durée définie. Ce type de désorption est le plus souvent utilisé pour les molécules

thermolabiles qui sont ensuite analysées par HPLC-UV (Fan *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015), HPLC-MS/MS (Huang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013) ou HPLC-FLD (Fluorescence detection) (Hu *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2012).

#### II.2.2.1.3. Facteurs influençant l'extraction

De nombreux paramètres interviennent lors des extractions SBSE et influent sur les rendements d'extraction. Certains les affectent plus particulièrement, tels que le temps d'adsorption et la vitesse d'agitation.

Au niveau de l'étape d'adsorption, d'après l'Equation II-1, l'extraction dépend particulièrement du rapport de phase  $\beta$ , qui correspond au ratio volume d'échantillon / volume de phase polymère. Ceci signifie qu'une augmentation du volume de la phase polymère, soit de la taille du barreau, et une diminution du volume de l'échantillon permettent d'obtenir un taux d'extraction plus important (David et Sandra, 2007).

Plusieurs facteurs comme le pH de l'échantillon ou l'addition de sel modifient les analytes ou l'échantillon et ainsi affectent l'équilibre. En effet, d'après C. Yu *et al.* (Yu et Hu, 2009) et N. Ochiai *et al.* (Ochiai *et al.*, 2006), l'ajout de sels dans l'échantillon (jusqu'à 30 %) joue un rôle important selon la nature des composés à extraire. Il favorise l'adsorption des composés polaires mais n'améliore pas celle des composés apolaires.

Le pH est aussi un facteur important en SBSE. En effet, afin d'obtenir une extraction maximale des composés d'intérêt, ces derniers doivent être sous leur forme neutre. Cependant, pour la phase commerciale la plus utilisée, le PDMS, un pH extrême (< 2 ou > 9) entraîne sa dégradation et donc la diminution de sa durée de vie (Prieto *et al.*, 2010).

L'ajout d'un modificateur organique tel que le méthanol ou l'acétonitrile, permet de diminuer la polarité de l'échantillon aqueux et donc l'adsorption des composés les plus apolaires sur les contenants en verre. Le plus utilisé est le méthanol (Prieto *et al.*, 2010).

La température d'adsorption est aussi un facteur influant de l'extraction. Des études ont montré qu'une augmentation de celle-ci pouvait permettre d'atteindre l'équilibre plus rapidement. Cependant, les coefficients de partage des analytes,  $K_{\text{octanol/eau}}$ , et ainsi les rendements d'extraction devenaient inférieurs (Liu *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2010). De plus, certains auteurs affirment que la durée de vie de la phase du barreau peut être considérablement réduite à des températures supérieures à 40 °C. La plupart des études ont montré des augmentations de l'efficacité d'extraction jusqu'à 40-60 °C et une diminution à 70 °C (Prieto *et al.*, 2010).



La vitesse d'agitation est un facteur très souvent étudié car il permet d'accélérer l'extraction et d'augmenter les réponses. Ce phénomène s'explique par le fait que la surface d'échange entre la phase du barreau et l'échantillon est plus importante. Différentes études montrent qu'une augmentation de la vitesse d'agitation jusqu'à 750 tr/min entraîne une augmentation des réponses, puis au-delà une stagnation (Quintana *et al.*, 2007; Yu et Hu, 2009). De plus, des vitesses d'agitation trop élevées peuvent engendrer une détérioration de la phase d'extraction due au contact direct du barreau SBSE avec le fond du flacon, lors d'extraction en mode immersion (Liu *et al.*, 2005). Cependant, d'autres études ont démontré une diminution du signal avec une vitesse d'agitation supérieure à 750 tr/min (Serôdio et Nogueira, 2005), alors que d'autres ont observé de meilleurs résultats avec plus de 1000 tr/min (Guerrero *et al.*, 2006; Portugal *et al.*, 2008).

Le facteur le plus important est la durée de l'étape d'adsorption. Généralement, ce facteur est le dernier à être optimisé. Etant donné que l'extraction repose sur un équilibre, après une durée d'adsorption optimale, l'extraction ne varie plus significativement. A l'équilibre, l'efficacité de l'extraction est maximale. Selon les analyses effectuées, les durées d'adsorption varient de plusieurs minutes jusqu'à quelques heures (Gilart *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015), pouvant aller jusqu'à 24h (Camino-Sánchez *et al.*, 2012). Cependant, certains auteurs choisissent de travailler hors équilibre afin de minimiser le temps d'extraction (Guerrero *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2009).

Au niveau de l'étape de désorption, les facteurs influents sont différents selon la nature de la désorption. Je présenterai ici seulement les facteurs influant la désorption liquide. Les facteurs les plus fréquemment étudiés pour la désorption liquide sont le solvant de désorption, son volume et le temps de désorption.

L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH), l'eau, les tampons aqueux ou des mélanges de ces derniers sont les solvants de désorption les plus souvent utilisés (Camino-Sánchez *et al.*, 2012; Margoum *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2009; Portugal *et al.*, 2008; Queiroz *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2013). Cependant, le choix va dépendre de l'affinité des composés pour ce solvant de désorption, qui devra être plus importante que pour la phase d'extraction du barreau.

Le volume de solvant de désorption doit garantir l'immersion complète du barreau SBSE afin que toute la phase d'extraction soit en contact avec l'échantillon tout en minimisant l'utilisation de solvant. Il peut varier de quelques centaines de microlitres à plusieurs millilitres (Batkowska *et al.*, 2011; Gilart *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015). Pour les volumes de l'ordre du  $\mu\text{L}$ , les étapes de désorption sont souvent réalisées directement dans un

vial (Camino-Sánchez *et al.*, 2012). Il n'y a donc pas d'étape d'évaporation et de concentration. Le solvant de désorption constitue alors également le solvant d'injection.

Les durées de désorption varient entre 15 et 60 min (Camino-Sánchez *et al.*, 2012; Gilart *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013) et plus généralement entre 15 et 30 min (Prieto *et al.*, 2010). Ces durées peuvent être diminuées dans certains cas avec la hausse de la température (jusqu'à environ 50-70 °C) (Queiroz *et al.*, 2008) ou avec l'utilisation de sonications (Portugal *et al.*, 2008; Yu et Hu, 2009).

Enfin, le nombre de répétitions de l'étape de désorption peut être optimisé afin de favoriser la libération de l'ensemble des substances d'intérêt piégées dans la phase polymère du barreau SBSE. Cependant, ce n'est pas un paramètre très souvent étudié (Carpinteiro *et al.*, 2012).

#### II.2.2.1.4. Les applications

La SBSE s'applique à divers domaines tels que l'environnement, l'agroalimentaire, la pharmacie et le biomédical. Cette technique a d'abord été appliquée dans le domaine environnemental. Plusieurs travaux démontrent l'intérêt de la technique SBSE pour l'analyse de certains contaminants tels que les hydrocarbures ou les pesticides dans les eaux (Barco-Bonilla *et al.*, 2011; Pérez-Carrera *et al.*, 2007). Ces mêmes contaminants ont également été analysés dans des matrices alimentaires (Li *et al.*, 2012; Maggi *et al.*, 2008; Zuin *et al.*, 2005). La SBSE a déjà été utilisée pour extraire des additifs plastiques, notamment le bisphénol A dans des eaux de rivière mais aussi dans des fluides biologiques (Kawaguchi *et al.*, 2004). Le Tableau II-2 présente diverses études réalisées sur des fluides biologiques par SBSE avec les analytes, la matrice, le volume de l'échantillon, les dimensions du barreau d'extraction (longueur et épaisseur de la phase d'extraction), le temps d'extraction et le système analytique utilisé.

De plus, cette technique est de plus en plus utilisée pour l'analyse des additifs plastiques dans diverses matrices. Le Tableau II-3 illustre les études réalisées dans le cadre de l'analyse d'additifs plastiques par extraction SBSE.

Tableau II- 2 : Application de la SBSE au secteur de la santé sur des échantillons biologiques

Référence	Analytes	Matrice	Volume d'échantillon (mL)	Dimensions du barreau SBSE (mm)	Durée d'adsorption (min)	Type de désorption	Système analytique
(Kole <i>et al.</i> , 2011)	Diclofénac (médicament humain)	Urine pédiatrique	5	20 x 0,5	120	Liquide	LC-UV
(Unceta <i>et al.</i> , 2010)	Fluoxétine, citalopram et venlafaxine et leurs métabolites (norfluoxétine, desméthyl- et didesméthylcitalopram et o-déméthylvenlafaxine) (médicaments humains)	Urine humaine	1	10 x 0,5	15	Liquide	LC-fluorescence
(Kawaguchi <i>et al.</i> , 2006)	4-nonylphénol glucuronide (métabolite du 4-nonylphénol)	Urine humaine	1	10 x 0,5	90	Thermique	GC-MS
(Kawaguchi <i>et al.</i> , 2008)	Triclosan (agent antimicrobien à large spectre, additif plastique)	Urine humaine	1	10 x 0,5	60	Thermique	GC-MS
(Zhao <i>et al.</i> , 2013)	Hydrocarbures aromatiques polycycliques monohydroxylés	Urine humaine	5	20 x 1,0	180	Liquide	LC-MS
(Fernandes <i>et al.</i> , 2008)	Fluoxétine (médicament humain)	Urine humaine	1	10 x 0,5	30	Liquide	LC-MS
(Stopforth <i>et al.</i> , 2007)	Estrone et 17 $\beta$ -estradiol (hormones)	Urine humaine	1	10 x 0,5	60	Thermique	GC-MS
(Queiroz <i>et al.</i> , 2008)	Phénytoïne, phénobarbital et carbamazépine et son métabolite carbamazépine-10,11-époxyde (médicaments humains)	Plasma humain	1	10 x 0,5	50	Liquide	LC-UV
(Fan <i>et al.</i> , 2013)	Tyroxines (médicament humain)	Urine humaine	10	-	40	Liquide	LC-UV ICP-MS
(Balbão <i>et al.</i> , 2010)	Rifampicine (antibiotique)	Plasma humain	0,2	10 x 0,5	50	Liquide	LC-UV
(Kawaguchi <i>et al.</i> , 2004)	Bisphénol A	Urine humaine Plasma humain Salive humaine	1 0,2 0,5	10 x 0,5	45	Thermique	GC-MS
(Tienpont <i>et al.</i> , 2003)	Composés pharmaceutiques et leurs métabolites	Urine humaine	5	-	60	Thermique	GC-MS

Tableau II- 3 : Application de la SBSE aux additifs plastiques

Références	Analytes	Matrices	Volume d'échantillon (mL)	Dimension du barreau SBSE (mm)	Durée d'adsorption (min)	Type de désorption	Système analytique
(Xu <i>et al.</i> , 2014)	Bisphénol	Eau et échantillons plastiques	15	-	90	Liquide	LC-UV
(Guart <i>et al.</i> , 2014)	Plastifiants	Eaux en bouteille	100	20 x 0,5	840	Thermique	GC-MS
(Pintado-Herrera <i>et al.</i> , 2014)	Filtres UV, bisphénol	Eaux	100	10 x 0,5	300	Thermique	GC-MS
(Cacho <i>et al.</i> , 2013)	Bisphénol	Produits d'hygiène corporelle	10	10 x 0,5	180	Thermique	GC-MS
(Montesdeoca-Esponda <i>et al.</i> , 2013)	Filtres UV	Eaux	25	20 x 0,5	120	Liquide	LC-MS
(Armstrong <i>et al.</i> , 2013)	Antioxydants	Dispositifs médicaux implantables	25	10 x 1,0	120	Thermique	GC-MS
(Cacho <i>et al.</i> , 2012)	Bisphénol	Boissons en canette et liquide de remplissage de légumes en boîtes de conserve	10	10 x 0,5	180	Thermique	GC-MS
(Carpinteiro <i>et al.</i> , 2012)	Stabilisants de la lumière (Tinuvin 326, Tinuvin 327, Tinuvin 328)	Eaux usées	25	10 x 0,5	360	Liquide	GC-MS
(Nguyen <i>et al.</i> , 2011)	Filtres UV	Eau de mer	10	10 x 0,5	180	Liquide	LC-MS
(Iparraguirre <i>et al.</i> , 2011)	Bisphénol	Eaux	100	10 x 0,5	900	Thermique	GC-MS
(Llorca-Pórcel <i>et al.</i> , 2009)	Bisphénol	Sol	100	20 x 0,5	360	Thermique	GC-MS
(Rodil et Moeder, 2008)	Filtres UV	Eaux	20	10 x 0,5	180	Thermique	GC-MS
(Hu <i>et al.</i> , 2007)	Bisphénol	Eaux	5	-	60	Liquide	LC-UV
(Nakamura et Daishima, 2004)	Bisphénol	Eaux de rivière	10	10 x 0,5	60	Thermique	GC-MS

#### II.2.2.1.5. Caractérisation structurale des phases d'extraction par MEB

Les composés extraits par SBSE sont adsorbés en surface du barreau, sur sa phase polymère, ce qui nécessite une phase identique et homogène d'un barreau à un autre, afin d'obtenir des résultats répétables. Etant donné que les barreaux fabriqués dans notre étude sont réalisés de façon artisanale, un contrôle peut être réalisé par microscope électronique à balayage. De plus, la visualisation de la surface des barreaux peut permettre de mettre en évidence l'impact de différents paramètres sur la surface du polymère.

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet de visualiser la topographie de surface d'échantillon en balayant cette surface à l'aide d'une sonde. Un très fin faisceau d'électrons est focalisé sur la surface de l'échantillon et la balaie. Sous l'impact de ce faisceau d'électrons, de diverses interactions électrons-matière résulte l'émission de différents signaux. Ces derniers sont collectés pour former une image de la surface de l'objet à observer.

L'interaction entre les électrons et la matière, la phase du barreau, entraîne des accumulations de charges à la surface de celui-ci. Ces charges sont évacuées vers la masse si l'échantillon est conducteur. Cependant, si l'échantillon est isolant ou pas suffisamment conducteur, l'accumulation de charges va déformer le faisceau d'électrons entraînant une élévation de température à l'endroit où il y a l'irradiation, pouvant endommager les échantillons. Pour remédier à cet inconvénient, l'échantillon est rendu conducteur en le recouvrant d'une fine couche de métal, le plus souvent d'or-palladium. Ainsi, les électrons seront dissipés en surface de l'échantillon. Cette étape essentielle de préparation d'échantillon est appelée la métallisation (Van Meerbeek *et al.*, 2000).

Cette technique de microscopie est souvent employée pour visualiser les structures morphologiques des phases des barreaux SBSE fabriqués de façon artisanale (Hu *et al.*, 2007; Roldán-Pijuán *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2014) et ainsi vérifier la résistance des phases à divers paramètres comme ceux concernant la finalisation de la polymérisation (température et durée) ou le choix du solvant de désorption. En effet, certains solvants vont avoir tendance à endommager de façon non homogène la phase du barreau SBSE (Xu *et al.*, 2014) pouvant ainsi engendrer des rendements d'extraction non répétables d'un barreau à un autre.

#### II.2.3. Critères d'identification des composés

Dans le cas d'une analyse par HPLC-MS/MS, l'identification et la quantification des composés se fait sur un minimum de 3 ou 4 points d'identification selon les normes européennes (Commission of the European Communities, 2002). Lors de l'utilisation d'un appareillage HPLC-MS/MS en mode MRM, 4 points d'identification sont obtenus, à savoir,

le temps de rétention, la première transition engendrée par le composé, la deuxième transition et le rapport des aires de ces deux transitions. Trois points d'identification seront utilisés dans le cas de notre étude.

#### II.2.4. Evaluation des performances de la méthode d'extraction

##### II.2.4.1. Répétabilité

La répétabilité de la méthode est un critère essentiel. Il s'agit de conditions analytiques où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode, sur des individus d'essais identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps. Elle a été déterminée sur une seule concentration, en triplicat d'extraction. Les coefficients de variation (CVs) ont été calculés en fonction de l'écart-type et de la moyenne des aires sous les pics chromatographiques. Pour l'analyse des composés ciblés, la répétabilité est jugée satisfaisante lorsque les CVs calculés sont inférieurs à 30 %. Généralement, des CVs corrects doivent être inférieurs à 20 % (European Commission et Health & Consumer Protection Directorate-General, 2013). Cependant, étant donné qu'un paramètre supplémentaire, la fabrication des barreaux, rentre en compte dans cette étude et impacte la répétabilité, cette limite d'acceptabilité a été augmentée. Les coefficients de variation sont calculés selon l'Equation II-3.

$$CV = \frac{Ecart - type}{Moyenne} \times 100$$

Equation II- 3 : Calcul du coefficient de variation pour l'évaluation de la répétabilité

##### II.2.4.2. Rendements d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au rapport de la quantité extraite d'analytes à la quantité contenue dans la solution initiale. Le rendement d'extraction d'un composé est dépendant des caractéristiques physico-chimiques de ce dernier ainsi que de la nature de l'adsorbant choisi. Il est calculé selon l'Equation II-4. Ce paramètre permet d'évaluer l'efficacité de l'extraction pour chaque substance à extraire.

$$Rendement d'extraction (\%) = \frac{Quantité extraite}{Quantité initiale contenue dans l'échantillon} \times 100$$

Equation II- 4 : Calcul du rendement d'extraction

D'après l'Equation II-4, dans le cas de notre étude, la quantité initiale d'analytes contenue dans l'échantillon a été déterminée en réalisant l'extraction sur un échantillon non dopé par les composés ciblés. Le dopage de ce dernier est réalisé à l'étape suivant l'extraction, soit avant l'évaporation à sec du solvant de désorption. Nous appellerons ce type d'extraction « dopée après ». Ainsi, la quantité extraite d'analytes ciblés a été déterminée en réalisant l'extraction sur un échantillon dopé par les composés ciblés. Ce type d'extraction est qualifiée de « dopée avant ». De cette façon, les extractions « dopées avant » et les « dopées après » ont subi toutes les étapes de la méthode. Nous obtenons alors l'Equation II-5. Les rendements d'extraction ont été calculés en fonction des aires sous les pics chromatographiques avec  $A_{\text{« dopé avant »}}$  correspondant à l'aire de l'échantillon « dopé avant » et  $A_{\text{« dopé après »}}$  correspondant à l'aire de l'échantillon « dopé après ».

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{A_{\text{"dopé avant"}}}{A_{\text{"dopé après"}}} \times 100$$

Equation II- 5 : Calcul du rendement d'extraction (2)

#### II.2.4.3. Effets de matrice

Les effets de matrice correspondent aux interférences du milieu analysé, notamment la matrice, sur le composé ciblé. Ils représentent la perturbation de l'ionisation des composés d'intérêt en spectrométrie de masse. Ces effets de matrice peuvent conduire à de très fortes erreurs par excès ou par défaut si l'on n'en tient pas compte, c'est pourquoi il est important de les évaluer.

Plusieurs méthodes d'évaluation des effets de matrice existent. Le travail de Lissalde *et al.* (Lissalde *et al.*, 2011) s'est porté sur la mesure des effets de matrice en effectuant des calibrations en matrices différentes et en comparant les pentes des droites de régression obtenues à celle mesurée pour une calibration utilisant des standards dilués dans un solvant de grade analytique. D'autres études comme celle d'Asensio-Ramos *et al.* (Asensio-Ramos *et al.*, 2010) ne quantifient pas précisément ces effets de matrice mais indiquent qu'ils modifient l'aire du composé détecté dans l'échantillon dopé en comparaison avec un standard de même concentration préparé dans le solvant d'injection.

Au laboratoire, les effets de matrice sont mesurés par une approche équivalente en comparant des répliqués d'un niveau de concentration dans la matrice et dans le solvant. Ils sont calculés selon l'Equation II-6. Nous prenons les notations suivantes pour l'équation :

$A_{\text{« dopé après »}}$  est l'aire détectée dans la matrice dopée,  $A_{\text{solvant}}$  l'aire mesurée d'un standard à la même concentration dans le solvant de reprise.

$$\text{Effet de matrice} = \left( \frac{A_{\text{« dopé après »}}}{A_{\text{solvant}}} - 1 \right) \times 100$$

Equation II- 6 : Calcul de l'effet de matrice

### II.3. Matériels et méthodes

#### II.3.1. Standards et réactifs

##### II.3.1.1. Standards analytiques

Pour chaque composé, la pureté et le nom usuel sont listés entre parenthèses: 2-hydroxy-4-méthoxybenzophénone (98 %, cyasorb UV 9) ; triphénylphosphate (99 %) ; oléamide (100 %) ; 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophénone (98 %, chimassorb 81) ; 1-stéaroyl-rac-glycérol (> 99 %, glycérol monostéarate) ; 2,2'-éthylidène-bis(4,6-di-tert-butylphénol) (99,9 %, isonox 129) ; 2-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)-4-méthylphénol (98 %, tinuvin 326) ; 2,4-di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)phénol (98 %, tinuvin 327) ; 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4,6-di-tert-pentylphénol (98 % tinuvin 328) ;  $\alpha$ -tocophérol (97,3 %, vitamine E) ; pentaérythritol tétrakis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate) (98 %, irganox 1010) ; 1,3,5-triméthyl-2,4,6-tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)benzène (99 %, irganox 1330) ; didodécyl 3,3'-thiodipropionate (> 97 %, naugard DLTDP) ; octadécyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphényl) propionate (99 %, irganox 1076) ; tris(2,4-di-tert-butylphényl) phosphite (98 %, irgafos 168) ; diphényl phosphate (99 %) ; acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque (98 %) ; 2,4-di-tert-butylphénol (99 %) ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Hostanox 03, irganox 3114, naugard DSTDP et tinuvin 622 ont été fournis par la direction européenne de la qualité du médicament (EDQM-Council of Europe-Strasbourg France).

Les solutions mères individuelles ont été préparées à des concentrations comprises entre 0,1 et 8,0 mg.mL<sup>-1</sup> dans du méthanol distillé, excepté pour celle du tinuvin 622 et celle du naugard DSTDP, qui ont été préparées dans du chloroforme à cause de leur faible solubilité dans le méthanol. Les mélanges de solutions de composés ont été préparés à partir des solutions mères individuelles et dilués dans du méthanol distillé pour obtenir des



concentrations appropriées. L'ensemble des solutions d'additifs plastiques est stocké à +5 °C pendant six mois. Toutes les solutions standards sont stockées dans des flacons en verre.

#### II.3.1.2. Solvants

Le méthanol (MeOH) (qualité LC-MS), l'acétonitrile (ACN) (qualité LC-MS), le chloroforme (qualité UHPLC), l'acétone (qualité HPLC), le dichlorométhane (qualité HPLC), l'heptane (qualité HPLC), l'éthanol (qualité HPLC), l'acide formique (qualité LC-MS), l'acide acétique (qualité LC-MS) et l'acétate d'ammonium (qualité LC-MS) ont été achetés auprès de Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'acide chlorhydrique à 37 % (HCl) a été acheté auprès de VWR PROLABO. L'eau ultra-pure sans perturbateur endocrinien a été obtenue à partir d'un dispositif MilliQ de Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Tous les solvants utilisés dans cette étude (incluant l'extraction SBSE et l'analyse UHPLC) ont été distillés, excepté le chloroforme, l'heptane, l'éthanol et le dichlorométhane.

#### II.3.1.3. Barreaux SBSE

Les produits à base de dérivés de polydiméthylsiloxane utilisés pour le développement des barreaux d'agitation artisanaux ont été fournis par la société Bluestar Silicones. Pour chaque produit, le nom usuel est listé entre parenthèses : RTV 4123 A (A1), RTV 4123 B (B1), RTV 3428 A (A2), RTV 3428 B (B2) et FLD 550 (C). La structure des monomères composant chacun de ces produits est présentée dans le Tableau II-4.

Tableau II- 4 : Structures des monomères composant les barreaux SBSE artisanaux

Produit	Structure
A1	
B1	
A2	
B2	
C	

L'extraction des molécules sélectionnées a été testée avec des barreaux d'agitation commerciaux, appelé Twisters<sup>®</sup>, commercialisés par Gerstel GmbH & Co. (Mülheim an der Ruhr, Germany). Ils mesurent 20 mm de long et sont recouverts de 0,5 mm d'épaisseur de film de polydiméthylsiloxane. Tous les barreaux commerciaux ont été conditionnés pendant 30 min sous flux d'azote à 230 °C avant leur première utilisation et entre chaque extraction.

### II.3.2. Processus d'échantillonnage et préparation d'échantillon

L'urine utilisée pour l'application de l'extraction par SBSE à un échantillon biologique, suivie de l'analyse par UHPLC-MS/MS, a été recueillie à partir d'un volontaire en bonne santé de sexe masculin, âgé de 36 ans. L'urine a été recueillie le matin du jour de l'extraction, mais il ne s'agit pas des premières urines de la journée. L'échantillon est resté à température ambiante jusqu'à l'analyse. L'échantillon d'urine a été prélevé sans conservateur dans des bouteilles en verre propre. Seul le surnageant a été utilisé pour l'analyse.

Le développement analytique a été réalisé sur de l'eau ultra-pure MilliQ sans perturbateur endocrinien distillée et dopée à une concentration pour chacun des composés d'intérêt définie dans des tests préliminaires à l'optimisation de l'extraction.

### II.3.3. Purification des solvants par distillation

Des études précédentes réalisées sur ces composés ont mis en évidence la contamination des solvants et de l'eau MilliQ par ces mêmes substances (Pouech, 2014). De ce fait, afin de pallier à ce problème, une étape de distillation des solvants et de l'eau a été mise en place.

#### II.3.3.1. Principe

La distillation est un procédé de séparation des molécules en mélange sous forme liquide dont les températures d'ébullition sont différentes. Ce procédé est basé sur les changements d'états liquide-vapeur des molécules et utilise donc la différence de volatilité entre les molécules afin de les séparer. La distillation consiste à porter à ébullition le mélange à séparer, à condenser les vapeurs obtenues et à recueillir une fraction légère dite distillat et une fraction lourde appelée résidu. Ainsi, en chauffant le mélange, chaque molécule va être séparée successivement. Les molécules qui ne s'évaporent pas restent concentrées dans le ballon en phase liquide. De par son principe, la distillation est aussi une technique répandue de purification de mélanges. Ce procédé est alors utilisé afin de réduire les contaminations de solvants.

Dans le cadre de cette étude, la distillation a été choisie afin de réduire les contaminations en molécules d'intérêt dans les solvants, mais aussi afin d'obtenir des niveaux de contaminations constants. La distillation est par ailleurs le procédé de purification le plus adapté dans cette étude. En effet, la purification par filtration conduit à des contaminations plus importantes des solvants car les systèmes de filtration contiennent les molécules d'intérêt. De plus, les molécules d'intérêt dans le cadre de cette étude ont des températures d'ébullition supérieures à celles des solvants distillés (température d'ébullition de l'acétone = 56,5 °C, du MeOH = 64 °C, de l'ACN = 82 °C et de l'eau = 100 °C). Dans ce cas, le distillat récupéré sera nettoyé des contaminations par les molécules d'intérêt. Ces dernières seront concentrées dans la fraction lourde.

#### II.3.3.2. Dispositif expérimental

Deux ballons de 2 L sont utilisés, un pour les solvants organiques, et l'autre pour l'eau. Le ballon est rempli aux 2/3 avec de l'eau MilliQ sans perturbateur endocrinien ou avec le solvant organique à distiller, après avoir été rincé trois fois au préalable avec le contenu à distiller. Des pierres ponce sont ajoutées dans le ballon. Le montage réalisé est présenté Figure II-4. L'arrivée d'eau est ouverte pour accéder au système de réfrigération. Les bulles

sont éliminées du système en modifiant le débit de l'eau arrivant. Les puissances de chauffage sont ajustées suivant la nature du liquide à distiller. Dans un premier temps, le chauffage est fort afin d'obtenir une ébullition rapide. Lorsque le liquide bout, le chauffage est baissé afin d'avoir une distillation goutte à goutte dans l'ampoule à décanter. Les trois premières fractions sont récoltées et jetées. Elles permettent de rincer le système. De plus, celles-ci contiennent les impuretés présentes dans les solvants et/ou l'eau et ayant un point d'ébullition plus bas que le liquide à distiller. La troisième fraction sera utilisée pour rincer la bouteille dans laquelle sera récupéré le liquide distillé. Les fractions suivantes sont récupérées dans la bouteille. La distillation est arrêtée quand le ballon ne contient plus qu'une centaine de millilitres. Lorsque de l'eau a été distillée, de l'acétone est distillée afin de sécher le système.

Ainsi, après application de ce protocole de purification aux solvants utilisés, les concentrations des analytes d'intérêt présents dans les blancs d'injection sont estimées entre  $1,3 \text{ ng.mL}^{-1}$  (pour le tinuvin 328) et  $306,7 \text{ ng.mL}^{-1}$  (pour l'irgafos 168).

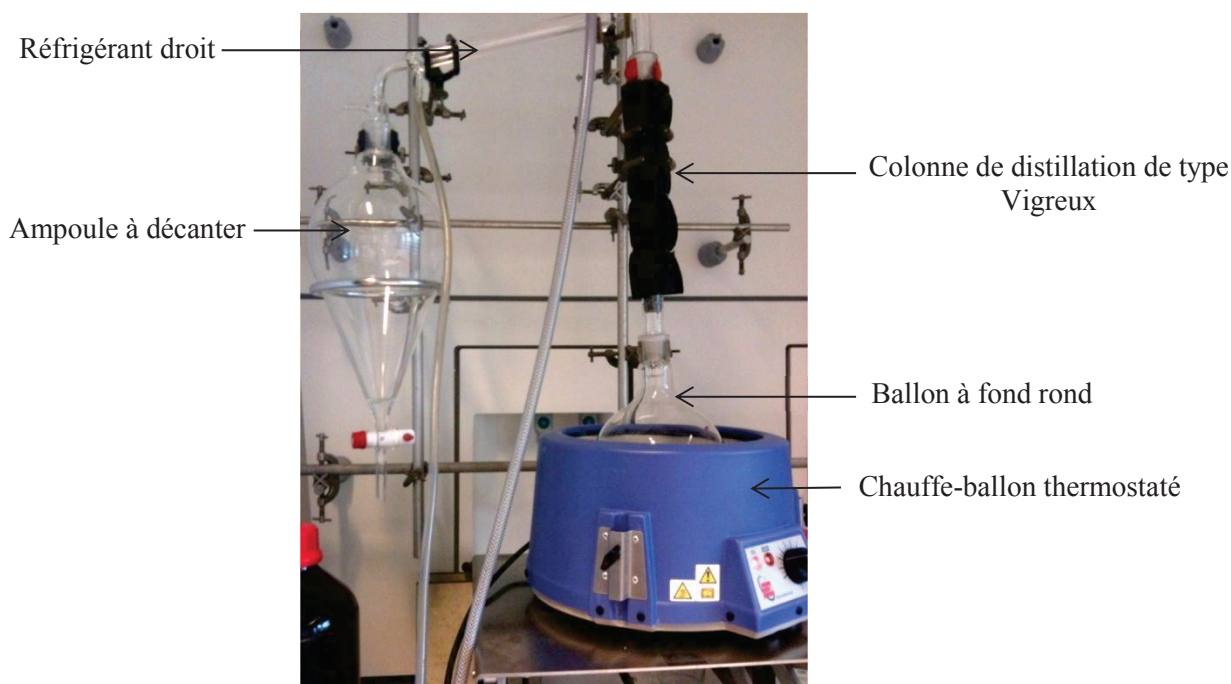


Figure II- 4 : Poste de distillation consacré à la distillation des solvants et de l'eau pour cette étude

#### II.3.4. Fabrication des barreaux d'extraction SBSE artisanaux

Les produits à base de dérivés de polydiméthylsiloxane ont permis de fabriquer trois types de barreaux d'agitation, appelés BAB pour Barreau d'Agitation Blue, BAW 1 pour Barreau d'Agitation White 1 et BAW 2 pour Barreau d'Agitation White 2. Les BAB sont constitués d'un mélange de 3 g de produit A1 et 3 g de produit B1. Les BAWs sont composés

de 10 g de produit A2 et de 1 g de produit B2. La différence entre les BAW 1 et BAW 2 est qu'un troisième constituant intervient dans la fabrication des BAW 2, qui correspond à 2,2 g de produit C. Les quantités de produits utilisées dans notre étude ont été indiquées par Bluestar Silicones. Celles-ci sont répertoriées dans le Tableau II-5 pour chaque type de barreaux.

Tableau II- 5 : Quantités de produits nécessaires à la fabrication de chaque type de barreaux

Barreau	Quantités de produits
BAB	3 g A1 + 3g B1
BAW 1	10 g A2 + 1 g B2
BAW 2	10 g A2 + 1 g B2 + 2,2 g C

Chaque mélange est homogénéisé à l'aide d'une spatule en acier de façon manuelle, puis est injecté dans une pipette Pasteur en verre (7,1 x 150 mm) en utilisant une seringue. Les pipettes Pasteur servent de moule à la phase des barreaux d'agitation, ce qui permettra d'obtenir des barreaux de même épaisseur de phase. Ensuite, les pipettes sont placées dans une étuve à 45 °C pendant 48 h pour les BAB et 1 h pour les BAWs afin d'accélérer la polymérisation. Ces paramètres de polymérisation ont été fixés suite à des travaux précédents que je ne traiterai pas dans ce mémoire. Ces premières étapes de fabrication des barreaux sont illustrées dans la Figure II-5.

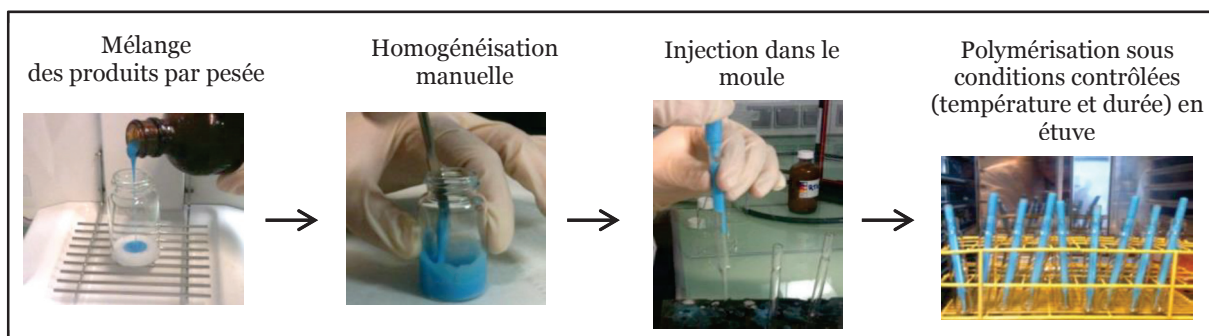


Figure II- 5 : Processus de préparation de la phase d'extraction. Exemple pour la phase d'extraction correspondant aux BAB

Lorsque la polymérisation est terminée, les pipettes Pasteur sont cassées à l'aide d'un coupe-verre afin de libérer les tiges de phases. Chaque tige de phase est ensuite coupée avec un cutter et un outil qui va permettre de calibrer la longueur de chaque barreau d'agitation à 17 mm. Avant d'insérer l'agitateur magnétique, chaque barreau d'agitation est percé avec une aiguille pour permettre le passage de l'agitateur magnétique. Enfin, les barreaux d'agitation sont rincés dans 10 mL d'eau pendant 1 h à 700 tr/min à température ambiante pour éliminer

l'excès de produits non polymérisés, ainsi que les copeaux de verre. Une plaque d'agitation de 15 places a été utilisée durant toutes les étapes d'agitation magnétique. Ces étapes de la fabrication des barreaux sont illustrées dans la Figure II-6. Les paramètres optimaux de fabrication des trois types de barreaux artisanaux sont répertoriés dans le Tableau II-6 (cf. II.3.5)

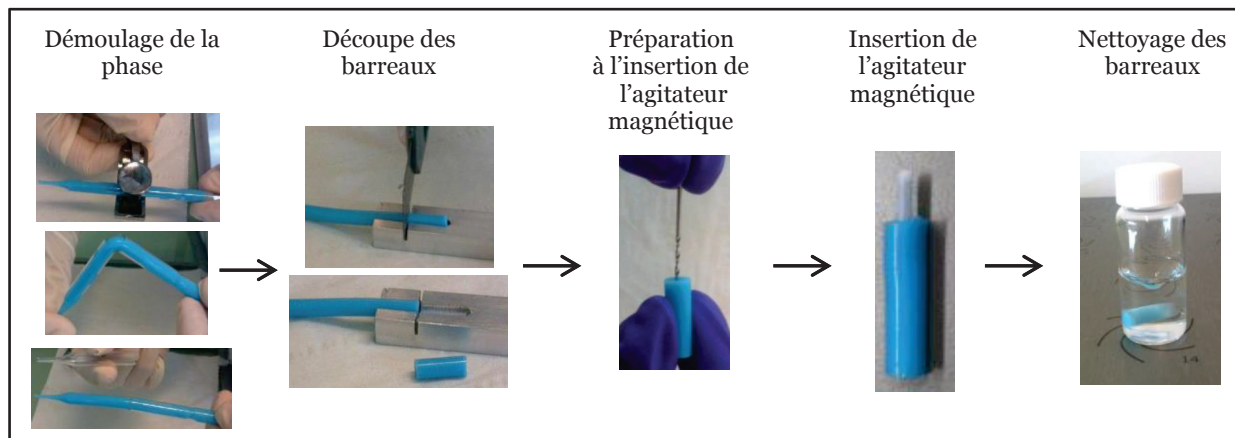


Figure II- 6 : Processus de démoulage de la phase d'extraction et de la découpe des barreaux d'agitation. Exemple pour la phase d'extraction correspondant aux BAB

### II.3.5. Extraction des additifs plastiques par des barreaux SBSE artisanaux

Le volume d'échantillon aqueux choisi est de 3 mL afin d'utiliser le moins possible d'échantillon, tout en immergeant la totalité du barreau d'agitation dans le flacon. Pour le développement et l'optimisation, l'échantillon correspond à de l'eau MilliQ distillée dopée entre 28,2 et 329,2 ng.mL<sup>-1</sup> par addition de 60 µL d'un mélange des composés ciblés entre 1,5 µg.mL<sup>-1</sup> (pour le triphénylphosphate) et 17,5 µg.mL<sup>-1</sup> (pour le diphényl phosphate). Le pH de l'échantillon est ajusté à 2 par ajout de 30 µL d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,5 mol.L<sup>-1</sup>. L'ajustement du pH est nécessaire afin de rendre les composés ionisables sous leur forme neutre pour maximiser les interactions avec la phase polymère du barreau et permettre leur extraction. Les extractions ont été réalisées à température ambiante, puisque la majorité des molécules ciblées se dégradent avec l'augmentation de la température. La vitesse de rotation choisie est de 700 tr/min. Cette vitesse permet l'obtention d'un vortex stable. L'étape d'adsorption de l'extraction dure 45, 60 et 30 min pour les barreaux d'agitation appelés respectivement BAB, BAW 1 et BAW 2. L'étape de désorption de l'extraction est réalisée dans de l'acétonitrile distillé et de l'acétone distillé, respectivement pour les BAB et les BAWs. Le volume de solvant de désorption choisi est de 5, 7 et 3 mL respectivement pour les BAB, BAW 1 et BAW 2. Le nombre de répétitions de l'étape de désorption est de quatre pour les BAB et les BAW 1 tandis qu'elle n'est que de deux pour les BAW 2. L'étape de

désorption dure 5 min pour les BAB et BAW 1 et 10 min pour les BAW 2. Les paramètres optimaux de l'extraction pour les trois types de barreaux artisanaux sont répertoriés dans le Tableau II-6.

Après l'extraction, le solvant de désorption est évaporé à sec sous flux d'azote à température ambiante. Les tubes évaporés sont conservés à 4 °C jusqu'à l'analyse. Les extraits sont reconstitués le jour de l'analyse dans 200 µL de méthanol distillé. Une phase huileuse correspondant à l'excès de produit qui n'a pas été polymérisé est visible. Afin de faciliter le prélèvement de la phase aqueuse uniquement, les extraits sont placés 1 h à 4 °C. Seule la phase liquide sera injectée. Chaque expérience est répétée trois fois.

Tableau II- 6 : Paramètres de fabrication et d'extraction fixés (en bleu) et optimaux pour les trois types de barreaux artisanaux

			BAB	BAW 1	BAW 2
Fabrication		Épaisseur du barreau	6 mm	6 mm	6 mm
		Longueur du barreau	17 mm	17 mm	17 mm
		Température de polymérisation	45 °C	45 °C	45 °C
		Durée de polymérisation	48 h	1 h	1 h
Extraction	Adsorption	Volume d'échantillon	3 mL	3 mL	3 mL
		Durée	45 min	60 min	30 min
		Ajout de sels	-	-	-
	Désorption	Solvant	ACN distillé	Acétone distillé	Acétone distillé
		Volume de solvant	5 mL	7 mL	3 mL
		Durée	5 min	5 min	10 min
		Nombre de répétitions de l'étape	4	4	2
		Température	-	-	-
Ultrasons	-	-	-		

### II.3.6. Caractérisation structurale des phases d'extraction des barreaux SBSE par MEB

La caractérisation structurale des phases d'extraction des barreaux SBSE a été réalisée au Centre Technologique des Microstructures à l'Université Lyon 1 avec un microscope électronique à balayage Hitachi S800 et une tension d'accélération de 15 kV. Une photo du système utilisé est présentée Figure II-7.

Les échantillons ont tout d'abord été fixés sur un plot métallique par un adhésif conducteur, du scotch carbone, puis collés avec un vernis adhésif à base d'argent. Enfin, ils ont été métallisés, par recouvrement avec une fine couche d'or-palladium.



Figure II- 7 : Microscope Electronique à Balayage utilisé

### II.3.7. Analyse par UHPLC-MS/MS

La séparation par chromatographie liquide est réalisée sur un système HP1200 RRLLC (Agilent Technologies<sup>®</sup>) comprenant une pompe binaire, un échantillonneur réfrigéré, un compartiment pour la colonne et un détecteur DAD (diode array detector). Le système de détection, un spectromètre de masse 3200QTrap (ABSciex<sup>®</sup>) de type triple quadripôle, équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI, TurboV, ABSciex<sup>®</sup>), est relié au système chromatographique. Une photo du système utilisé est présentée Figure II-8.



Figure II- 8 : Système UHPLC-MS/MS utilisé

La séparation des composés est réalisée sur une colonne Kinetex C18 (100 x 2,1 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex) précédée d'un préfiltre de 0,5  $\mu\text{m}$  de porosité (Phenomenex). Les phases mobiles utilisées sont de l'eau distillée avec 0,1 mM d'acétate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{COOCH}_3$ ) et 0,01 % d'acide formique (A) pour la phase aqueuse et le méthanol distillé avec 1mM d'acétate d'ammonium (B) pour la phase organique. La température du four est



maintenue à 60 °C. La colonne analytique, le préfiltre, les phases mobiles, ainsi que la température du four sont identiques pour les deux modes d'ionisation. Pour le mode d'ionisation positif, la colonne analytique est tout d'abord conditionnée 10 minutes à 50 % de (B). Ensuite, le gradient suivant est réalisé : de 50 % à 100 % de (B) en 5 minutes et 100 % de (B) pendant 15 minutes. Le débit analytique est de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Pour le mode d'ionisation négatif, la colonne analytique est tout d'abord conditionnée 10 minutes à 20 % de (B). Ensuite, le gradient suivant est réalisé : de 20 % à 100 % de (B) en 5 minutes, et 100 % de (B) pendant 15 minutes. Le débit analytique est de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. Les échantillons sont stockés dans un passeur d'échantillon régulé en température à 5 °C. Le volume d'injection est de 5 µL. Les conditions chromatographiques sont répertoriées dans le Tableau II-7. L'ensemble des paramètres MS/MS sont répertoriés dans le Tableau II-8. Les paramètres MS/MS pour tous les additifs plastiques et les produits de dégradation des additifs plastiques ont été obtenus lors de travaux précédents (Pouech *et al.*, 2014).

Tableau II- 7 : Conditions chromatographiques des méthodes d'analyse

	ESI +	ESI -																
Colonne	Phenomenex Kinetex C18 (100 x 2,1 mm ; 2,6 µm)																	
Préfiltre	Phenomenex de porosité = 0,5 µm																	
Température	60 °C																	
Volume d'injection	5 µL																	
Débit	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	0,5 mL.min <sup>-1</sup>																
Phases mobiles	(A) Eau distillée + 0,1 mM NH <sub>4</sub> COOCH <sub>3</sub> + 0,01 % d'acide formique (B) MeOH distillé à 1mM NH <sub>4</sub> COOCH <sub>3</sub>																	
Gradient	<table border="1"> <caption>Données du gradient ESI+</caption> <thead> <tr> <th>Temps (min)</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>	Temps (min)	% B	0	50	5	100	20	100	<table border="1"> <caption>Données du gradient ESI-</caption> <thead> <tr> <th>Temps (min)</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>	Temps (min)	% B	0	20	5	100	20	100
Temps (min)	% B																	
0	50																	
5	100																	
20	100																	
Temps (min)	% B																	
0	20																	
5	100																	
20	100																	

### II.3.8. Traitement de données

Le traitement de données est réalisé en utilisant le logiciel Applied Biosystems Analyst version 1.5 (ABSciex<sup>®</sup>). Les analyses sont acquises en mode multiple reaction monitoring (MRM). Comme recommandé en Europe et par les directives ICH (Rambla-Alegre *et al.*, 2012), chaque composé ciblé a été caractérisé par trois critères : le temps de rétention (Tr) et deux transitions MRM (T1 et T2). Ces paramètres sont représentés dans le

Tableau II-8, ainsi que les valeurs d'énergies de collision (CE ou collision energy) et les tensions de declustering (DP ou Declustering Potential).

Afin d'évaluer l'efficacité des extractions, trois répétitions ont été réalisées dans le but de déterminer la répétabilité de la méthode, mais aussi les rendements d'extraction moyens.

Tableau II- 8 : Paramètres UHPLC-MS/MS des additifs plastiques

LC : HP1200 RRLLC (Agilent Technologies®) ; MS : 3200QTrap (ABSciex®), source d'ionisation electrospray (ESI, TurboV, ABSciex®) ; Colonne : Kinetex C18 (100 x 2,1 mm ; 2,6 µm) ; Débit : 0,6 mL.min<sup>-1</sup> (ESI+) 0,5 mL.min<sup>-1</sup> (ESI-)

Analyte	Tr (min)	Ion précurseur	T1 (m/z)	T2 (m/z)	T1/T2	DP (T1 / T2) (V)	CE (T1 / T2) (eV)
<i>ESI positif</i>							
Tinuvin 622	0,44	[M+H] <sup>+</sup>	316 > 102	316 > 216	2,2	36 / 36	29 / 25
Cyosorb UV 9	3,39	[M+H] <sup>+</sup>	229 > 151	229 > 105	1,7	46 / 46	25 / 27
Triphénylphosphate	4,09	[M+H] <sup>+</sup>	327 > 152	327 > 215	2	76 / 76	49 / 37
Hostanox 03	5,68	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	813 > 325	813 > 217	1,15	56 / 56	65 / 45
Oléamide	5,84	[M+H] <sup>+</sup>	282 > 83	282 > 97	1	41 / 41	27 / 31
Chimassorb 81	6,16	[M+H] <sup>+</sup>	327 > 137	327 > 215	2,1	51 / 51	39 / 25
Glycérol monostéarate	6,23	[M+H] <sup>+</sup>	359 > 341	359 > 267	1,7	41 / 41	15 / 15
Isonox 129	6,50	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	456 > 233	456 > 177	3,4	21 / 21	21 / 27
Tinuvin 326	6,55	[M+H] <sup>+</sup>	316 > 260	316 > 107	2,1	51 / 51	25 / 37
Irganox 3114	6,82	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	802 > 219	802 > 203	3,3	46 / 46	51 / 107
Tinuvin 327	6,93	[M+H] <sup>+</sup>	358 > 302	358 > 246	4,45	61 / 61	29 / 35
Tinuvin 328	6,94	[M+H] <sup>+</sup>	352 > 282	352 > 212	3,9	71 / 71	27 / 39
Vitamine E	7,01	[M+H-H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	429 > 165	429 > 91	4,1	41 / 41	29 / 95
Irganox 1010	7,75	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1194 > 219	1194 > 163	1,4	96 / 96	101 / 129
Irganox 1330	7,80	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	793 > 219	793 > 203	3,8	61 / 61	45 / 101
Naugard DLTDP	7,95	[M+H] <sup>+</sup>	515 > 143	515 > 329	2,8	71 / 71	25 / 19
Irganox 1076	8,37	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	548 > 107	548 > 149	1,1	66 / 66	63 / 33
Irgafos 168	9,31	[M+H] <sup>+</sup>	648 > 235	648 > 147	1	96 / 96	73 / 63
Naugard DSTDP	12,29	[M+H] <sup>+</sup>	684 > 143	684 > 89	2,5	96 / 96	35 / 57
<i>ESI négatif</i>							
Diphényl phosphate	4,28	[M-H] <sup>-</sup>	249 > 93	249 > 155	14	1	-38/-32
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	6,11	[M-H] <sup>-</sup>	249 > 205	249 > 189	50	1	-34 / 42
2,4-di-tertbutyl-phénol	7,84	[M-H] <sup>-</sup>	205 > 189	-	-	-60	-36

## II.4. Résultats et discussion

Un schéma récapitulatif de l'ensemble des grandes étapes de cette étude est présenté dans la Figure II-9.

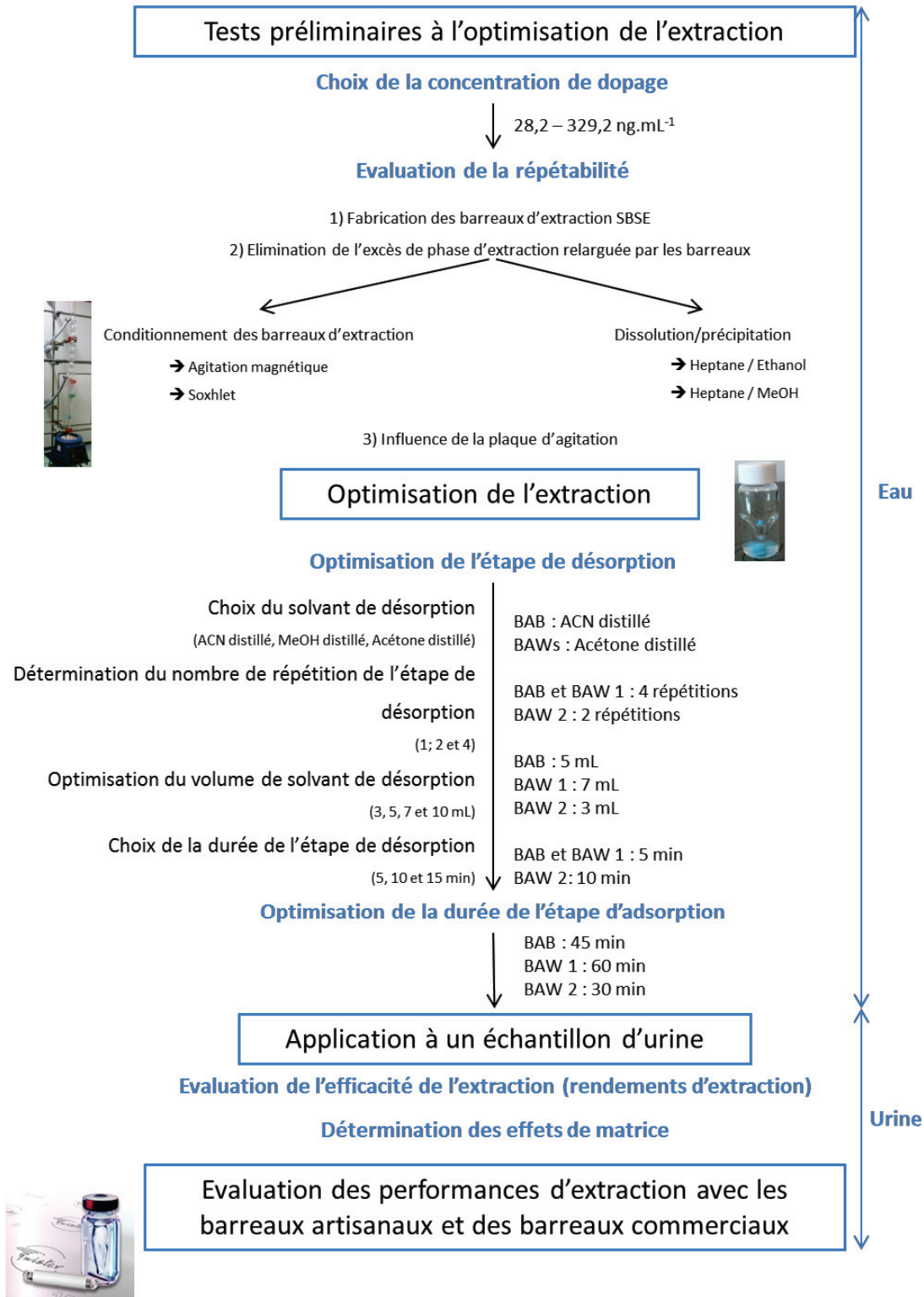


Figure II- 9 : Schéma récapitulatif des grandes étapes du développement de la méthode d'extraction SBSE

## II.4.1. Etudes préliminaires à l'optimisation de l'extraction

### II.4.1.1. Choix de la concentration de dopage

La première étape du développement de l'extraction SBSE est la détermination des concentrations de dopage. Celles-ci ont été choisies afin d'injecter dans l'appareil, après extraction, environ  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de chaque composé. Ces concentrations sont très largement supérieures aux limites de détection instrumentales de chaque composé déterminées lors de travaux de thèse précédents (de  $0,3 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le triphénylphosphate à  $9,5 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour le 2,4-ditertbutyl-phénol) (Pouech *et al.*, 2014). Ainsi, même si les composés ne sont pas extraits au maximum, ils seront nettement visibles pour les tests préliminaires et l'optimisation de l'extraction. Cependant, certains composés sont restés peu visibles en dopant à ces concentrations. Après plusieurs tests d'injection, les concentrations de dopage ont été adaptées pour quelques composés, à savoir, le tinuvin 622, l'oléamide, l'irgafos 168, le naugard DSTDP et le diphenyl phosphate. Ainsi les concentrations des substances ciblées dans la solution de dopage varient entre  $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (pour le triphénylphosphate) et  $17,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (pour le diphenyl phosphate). Les chromatogrammes obtenus après injection d'un mélange des substances à analyser sont présentés dans la Figure II-10 et la Figure II-11.

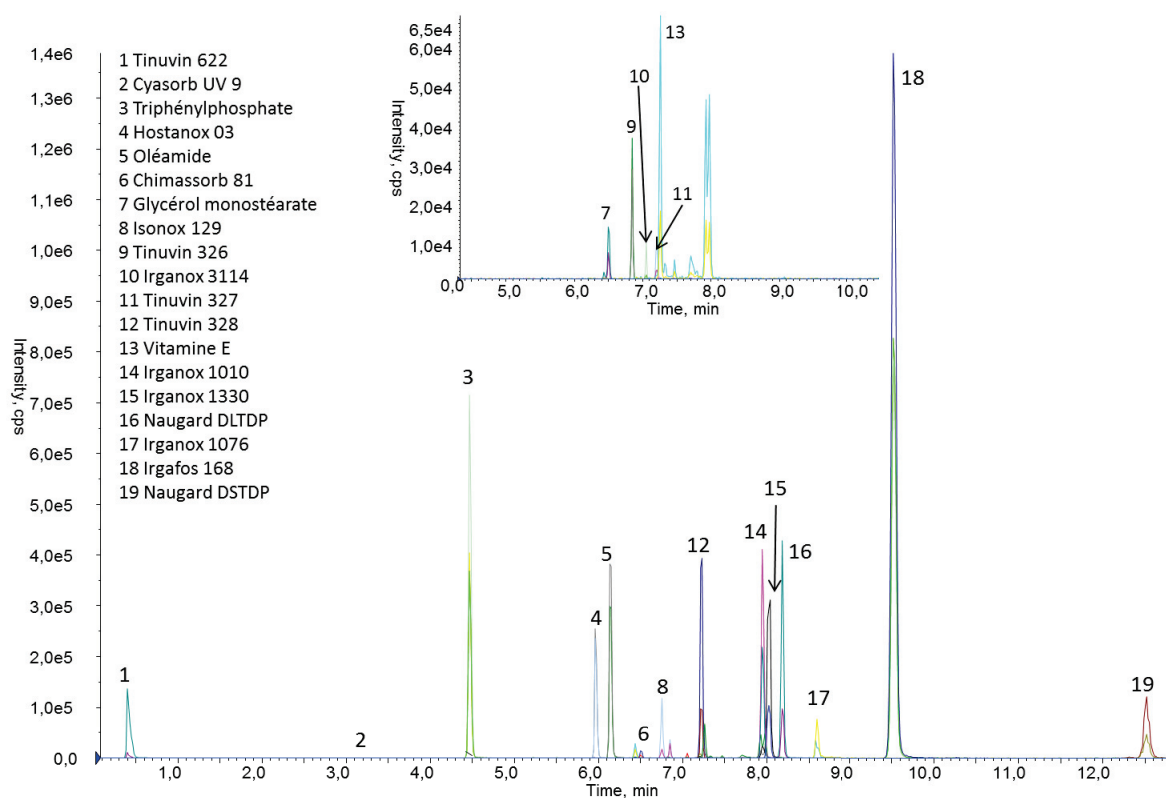


Figure II- 10 : Chromatogramme des additifs plastiques ciblés en mode ESI positif

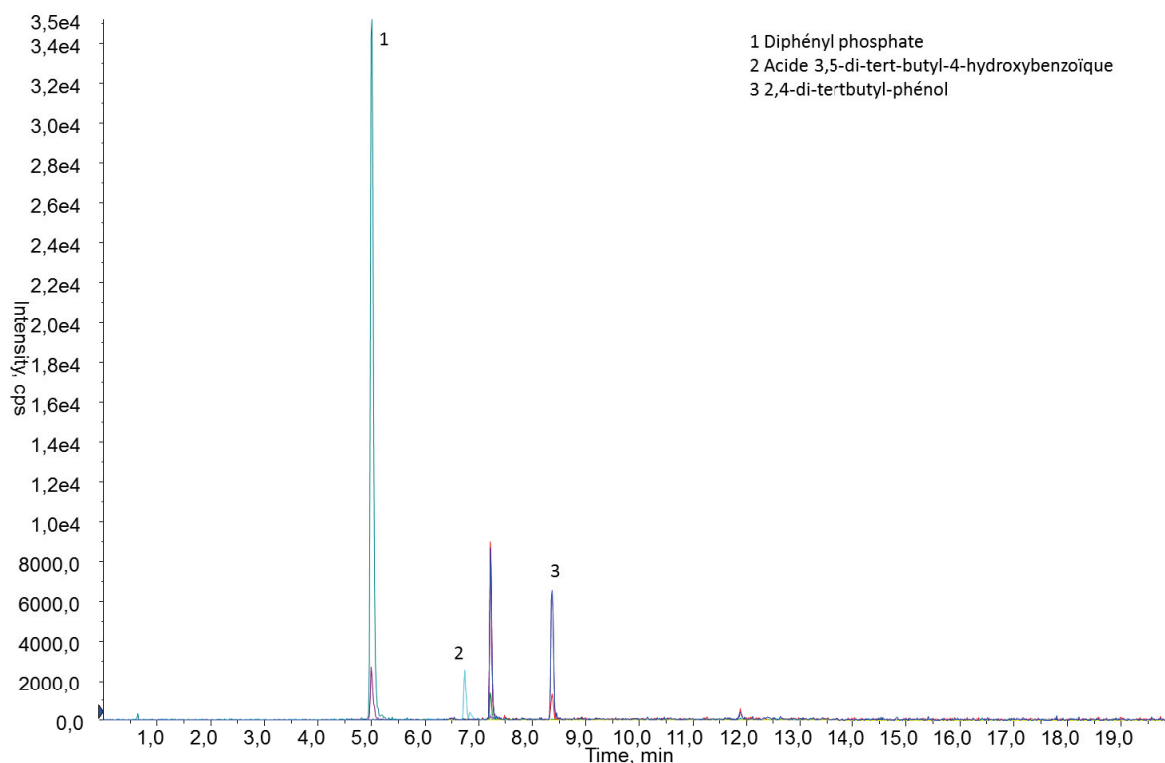


Figure II- 11 : Chromatogramme des additifs plastiques ciblés en mode ESI négatif

#### II.4.1.2. Evaluation de la répétabilité de la méthode analytique

##### II.4.1.2.1. Fabrication des barreaux d'extraction SBSE

Au début de notre étude, après polymérisation, les pipettes Pasteur étaient cassées avec un marteau, ce qui endommageait légèrement la tige de polymère par des microcoupures. De plus, la découpe des barreaux était approximative, à l'aide d'une paire de ciseaux et d'une règle pour la calibration de la longueur de chaque barreau. Des tests ont été réalisés afin d'évaluer la répétabilité de la méthode analytique dans ces conditions. Ces premiers tests ont été réalisés à partir d'un protocole dit « initial ». Cette méthode est constituée d'une étape d'adsorption de 60 min, d'une étape de désorption de 15 min dans 10 mL d'acétone distillé et répétée quatre fois. L'extraction est réalisée sur de l'eau dopée par un mélange des 22 additifs plastiques ciblés aux concentrations déterminées précédemment. Ces tests préliminaires consacrés à l'évaluation de la répétabilité de la méthode analytique ont été réalisés sur les barreaux BAB à partir des aires sous les pics chromatographiques obtenus pour chaque composé. Les premiers résultats de répétabilité obtenus dans ces conditions n'ont pas été concluants. En effet, la majorité des composés n'avait pas de réponses répétables, autant pour les « dopés avant » que pour les « dopés après ». A la suite de ces tests, il s'est avéré

indispensable d'améliorer la répétabilité de cette étape de fabrication avant de continuer vers l'optimisation de l'extraction SBSE. Nous avons donc modifié le protocole de fabrication, en améliorant les étapes qui semblaient le plus impacter l'homogénéité entre les barreaux, notamment la libération des tiges de phase d'extraction des pipettes Pasteur et la découpe des barreaux aux dimensions attendues.

Après optimisation du processus de fabrication, comme décrit dans la partie Matériels et méthodes, des extractions ont été réalisées afin d'évaluer l'impact de la modification de ces étapes sur la répétabilité. Une nouvelle fois les réponses observées ne permettaient pas d'obtenir des coefficients de variation satisfaisants, soit inférieurs ou égaux à 30 %, ce qui signifiait que les améliorations effectuées sur le protocole de fabrication des barreaux n'avaient pas eu d'impact significatif (différence  $\geq 30$  %) sur la répétabilité. Cependant, ce protocole de fabrication plus rigoureux a été conservé pour la suite des expériences.

#### II.4.1.2.2. Conditionnement des barreaux d'extraction

Lors de l'évaporation à sec des solvants de désorption, nous avons constaté que subsistait un liquide au fond du tube, comme illustré dans la Figure II-12. Il s'agit d'une phase huileuse, qui semble être un excès de phase constituant les barreaux dont je ne détaillerai pas la caractérisation. Nous avons alors supposé que les composés extraits pouvaient être piégés dans cette phase, engendrant un possible manque de répétabilité. Par conséquent, l'étape suivante était d'éliminer cet excès de phase non polymérisée en conditionnant les barreaux BAB avant leur utilisation pour l'extraction.

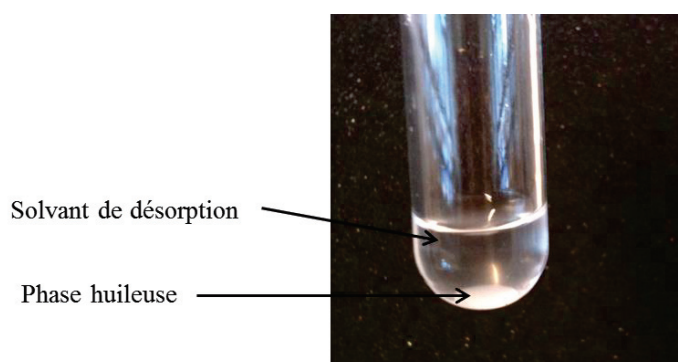


Figure II- 12 : Excès de phase non polymérisée sous forme d'huile retrouvé dans le solvant de désorption pendant son évaporation

Pour cela, deux techniques ont été employées.

La première correspond à un conditionnement par agitation magnétique. Un barreau est placé dans un flacon en présence de 10 mL de solvant ou mélange de solvants sur une

plaque d'agitation à 700 tr/min pendant un temps défini. Cette étape est répétée jusqu'à ce que le barreau ne relargue plus de phase. Pour cela, une étude cinétique de la perte de masse des barreaux est réalisée. Nous considérons que les barreaux ne relarguent plus de phase lorsque leur perte de masse devient nulle. Différents solvants et mélanges de solvants ont été testés pour le conditionnement des barreaux BAB. De ces résultats préliminaires, l'acétone distillée puis le mélange de méthanol distillé et de dichlorométhane (70/30) (v/v) ont permis une perte de masse maximale sur une durée satisfaisante. C'est pourquoi, les tests avec ces solvants ont été poursuivis. Le renouvellement de solvant ainsi que la pesée des barreaux sont effectués toutes les heures pour le premier jour et trois fois par jour pour les jours suivants. Avant chaque pesée, les barreaux sont séchés à l'aide de papier, puis avec de l'air comprimé pendant 1 min. Enfin, ils sont replacés dans un flacon contenant le solvant propre. L'étape est répétée autant de fois que nécessaire. Les résultats de l'étude cinétique sont répertoriés dans la Figure II-13.

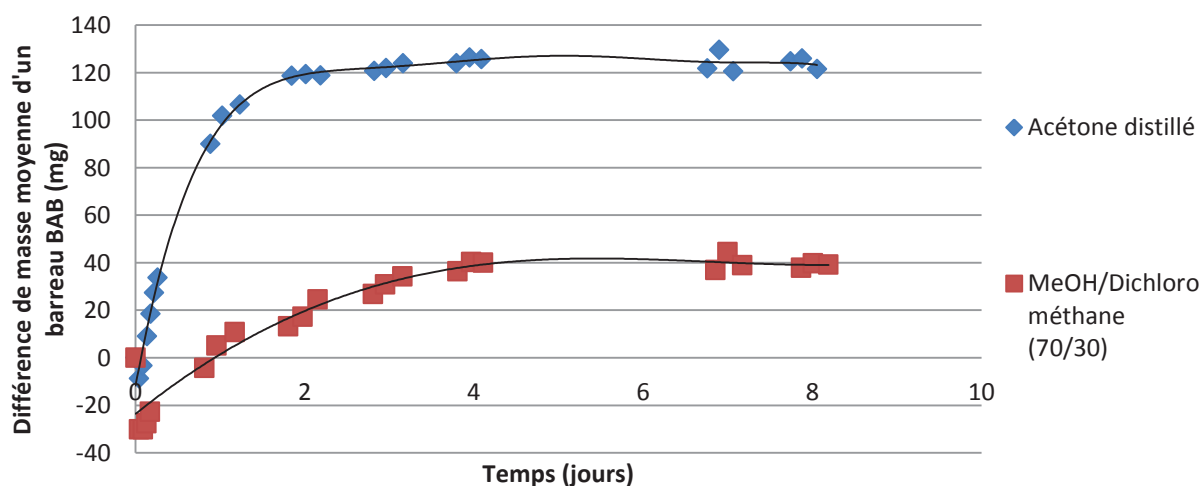


Figure II- 13 : Courbes cinétiques moyennes obtenues pendant le conditionnement par agitation magnétique d'après la perte de masse d'un barreau BAB

Les résultats obtenus montrent que le relargage maximal des barreaux est effectué plus rapidement dans l'acétone distillée, au bout de trois jours, que dans le mélange méthanol distillé/dichlorométhane, au bout de cinq jours. De plus, l'acétone distillée permet une plus grande perte de phase, environ 120 mg. L'acétone distillée est donc le solvant de choix pour le conditionnement des barreaux BAB. Ces résultats expliquent aussi pourquoi autant d'huile était relarguée lors de l'étape de désorption, étant donné que le solvant de désorption utilisé dans la méthode initiale était de l'acétone distillée.



La deuxième technique correspond à un conditionnement par Soxhlet. Quatre barreaux sont placés dans le Soxhlet. Le ballon est rempli à moitié par un solvant ou un mélange de solvants. Puis le montage est réalisé, comme illustré sur la Figure II-14, et le chauffage est mis en place pour toute la journée. Cette étape est répétée sur quatre jours jusqu'à ce que les barreaux ne relarguent plus de phase. De la même façon que pour le conditionnement par agitation magnétique, une étude cinétique de la perte de masse des barreaux est réalisée.

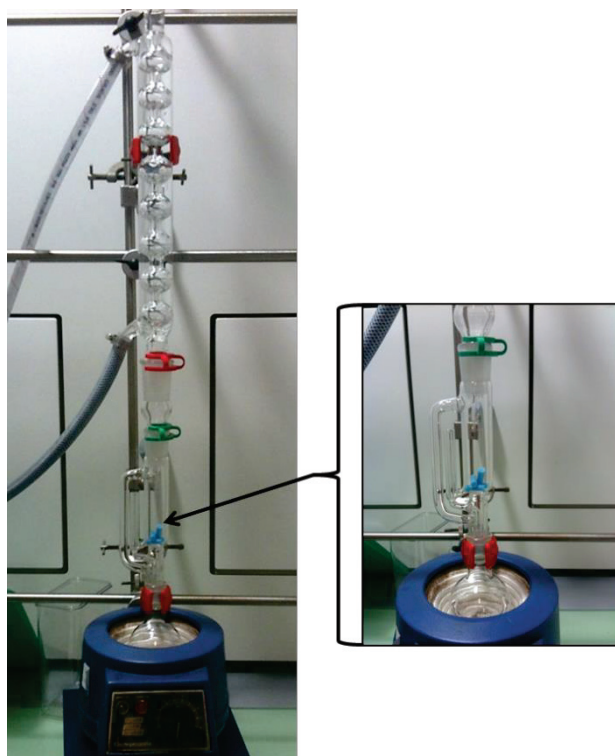


Figure II- 14 : Conditionnement de quatre barreaux BAB par Soxhlet

D'après les résultats observés pour le conditionnement par agitation magnétique, l'acétone distillée a été choisie pour l'étude du conditionnement par Soxhlet. Le renouvellement du solvant ainsi que la pesée des barreaux sont effectués toutes les deux heures environ le premier jour et une fois par jour les jours suivants. Avant chaque pesée, les barreaux sont séchés. L'étape est répétée autant de fois que nécessaire, en remplaçant le solvant utilisé dans le montage Soxhlet par du solvant propre. Les résultats de l'étude cinétique sont répertoriés dans la Figure II-15.

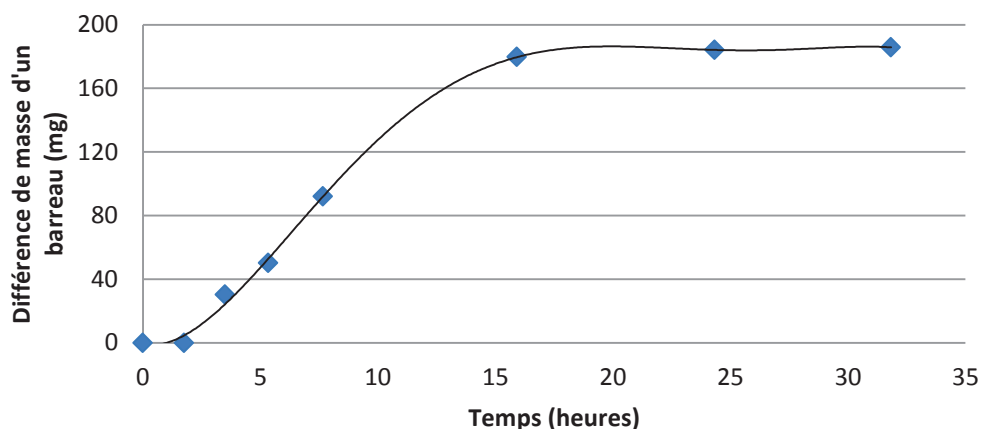


Figure II- 15 : Courbe cinétique moyenne obtenue pendant le conditionnement par Soxhlet à l'acétone distillée d'après la perte de masse d'un barreau BAB

Cette expérience a montré que le relargage maximal des barreaux BAB dans l'acétone distillée par Soxhlet est effectué plus rapidement qu'avec la méthode par agitation magnétique, environ 17 h. De plus, la méthode par Soxhlet entraîne une perte de masse plus importante, environ 180 mg, soit 60 mg de plus que par agitation magnétique.

Suite au conditionnement des barreaux BAB, nous avons noté des différences au niveau de l'aspect physique et de la souplesse des barreaux comme l'illustre la Figure II-16. En effet, nous avons constaté un rétrécissement des barreaux ayant subi le conditionnement, avec un rétrécissement plus important pour le conditionnement par Soxhlet au niveau de l'épaisseur du barreau. De plus, ces barreaux conditionnés se sont durcis de façon significative, notamment pour les barreaux traités par Soxhlet, dû probablement à l'application d'une haute température.

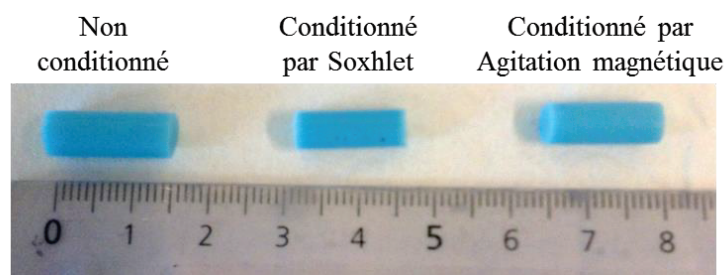


Figure II- 16 : Différences d'aspects entre des barreaux BAB conditionnés ou non

Après avoir conditionné les barreaux, ces derniers ont été utilisés sur une extraction, afin d'évaluer l'impact du conditionnement sur la répétabilité. Les résultats obtenus pour ces tests sont répertoriés dans le Tableau II-9. Après conditionnement par agitation magnétique, seulement sept composés ont des réponses répétables sur les 22 ayant subi l'extraction pour les « dopés avant ». Cependant, pour les « dopés après », la majorité des composés ont

conduit à des réponses répétables. Pour les extractions réalisées avec des barreaux BAB conditionnés par Soxhlet, seulement cinq additifs plastiques ont montré des réponses répétables pour les « dopés avant ». Contrairement à l'agitation magnétique, pour les « dopés après », deux composés présentaient des réponses répétables. Ainsi, les résultats obtenus montrent que les réponses sont, pour très peu de molécules, répétables pour les « dopés avant » comme pour les « dopés après », notamment pour le conditionnement par Soxhlet, ce qui signifie que le conditionnement des barreaux artisanaux n'a pas eu, ou très peu, d'impact sur la répétabilité. De plus, il est possible d'affirmer que le problème ne provient pas uniquement de l'extraction en elle-même si celle-ci est concernée, puisque les réponses des « dopés après » ne sont pas répétables. En outre, étant donné les changements physiques observés, les techniques de conditionnement utilisées ont été sans doute trop agressives pour les barreaux BAB. Par conséquent, le conditionnement des barreaux ne semble pas nécessaire.

Tableau II- 9 : Coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'évaluation de la répétabilité après utilisation de barreaux BAB conditionnés par agitation magnétique ou par Soxhlet (n = 3)

CV < 30 %	BAB			
31 % < CV < 50 %	Agitation magnétique		Soxhlet	
CV > 50 %	CV dopé avant (%)	CV dopé après (%)	CV dopé avant (%)	CV dopé après (%)
Tinuvin 622	0	0	0	0
Cyatorb UV 9	26	24	25	41
Triphénylphosphate	25	22	23	48
Hostanox 03	42	25	49	46
Oléamide	22	20	28	39
Chimassorb 81	46	24	43	47
Glycérol monostéarate	47	18	50	37
Isonox 129	77	25	67	55
Tinuvin 326	45	31	43	45
Irganox 3114	58	32	53	56
Tinuvin 327	55	35	47	42
Tinuvin 328	52	26	49	49
Vitamine E	44	14	36	37
Irganox 1010	40	24	43	48
Irganox 1330	50	22	48	43
Naugard DLTPD	59	22	46	48
Irganox 1076	20	21	31	27
Irgafos 168	5	31	22	28
Naugard DSTDP	118	33	48	202
Diphényl phosphate	37	5	59	35
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	22	4	21	33
2,4-ditertbutyl-phénol	27	10	52	34

En revanche, il est possible d'agir sur le possible piégeage des composés ciblés dans la phase huileuse, non pas avant extraction, mais après. En effet, l'ajout d'une étape de dissolution/précipitation après extraction pourrait permettre de libérer les substances ciblées piégées dans l'excès de phase non polymérisée.

#### II.4.1.2.3. Dissolution/précipitation

Afin d'améliorer les répétabilités d'extraction et de libérer les molécules ciblées piégées dans la phase huileuse après l'extraction, une étape a été ajoutée au protocole. Cette

étape est la dissolution/précipitation, constituée de deux phases, à savoir : une dissolution suivie d'une précipitation, et combinant de ce fait l'utilisation de deux solvants très distincts. La première étape consiste à dissoudre le matériau polymère (la phase huileuse) et par conséquent ses additifs, à chaud et généralement sous agitation magnétique, dans un solvant approprié. La deuxième étape consiste à faire précipiter immédiatement le polymère dans un non-solvant de ce dernier, laissant ainsi les additifs et les oligomères, soit des chaînes de deux à quelques dizaines de monomères, en solution. Etant donné que les additifs plastiques ciblés sont sensibles à la température et que nous avons seulement quelques dizaines de microlitres de phase huileuse, nous réaliserons cette étape à température ambiante, sans agitation magnétique. A chaque type de polymère correspond des solvants et des non-solvants préférentiels. Pour ce qui concerne la phase constituant nos barreaux, à savoir des dérivés de PDMS, les solvants préférentiels pour ce type de réaction sont le chloroforme, l'éther et l'heptane ; tandis que pour les non-solvants, il s'agit du MeOH et de l'éthanol (Bart, 2005). Quant aux volumes de solvant et de non-solvant, ces derniers varient selon les molécules à extraire et selon le type de polymère dans lequel elles sont piégées. En effet, ces volumes peuvent être identiques (Arias *et al.*, 2009; Sternbauer *et al.*, 2013) ; le volume du non-solvant peut être plus important que celui du solvant (Mansouri *et al.*, 1998; Perlstein, 1983) ; ou inversement, le volume du solvant peut être plus important que le volume du non-solvant (Reingruber *et al.*, 2010). Ainsi, ces volumes choisis ont un impact sur la quantité d'analytes récupérée dans l'excès de phase. C'est pourquoi les volumes de solvant et de non-solvant sont à optimiser.

Dans notre cas, nous avons appliqué le protocole représenté sur la Figure II-17. Nous avons choisi un volume de non-solvant dix fois plus important que le volume de solvant. Ces quantités ont été fixées suite à des tests préliminaires, qui ne seront pas détaillés ici. Après précipitation, le surnageant est récupéré afin d'être évaporé. Cependant, avant cela, l'huile restante va subir deux nouvelles étapes de précipitation. De cette façon, le maximum de substances ciblées sera récupéré dans le non-solvant. La totalité du non-solvant est alors évaporé avant de reprendre l'extrait dans 200  $\mu$ L de MeOH distillé.

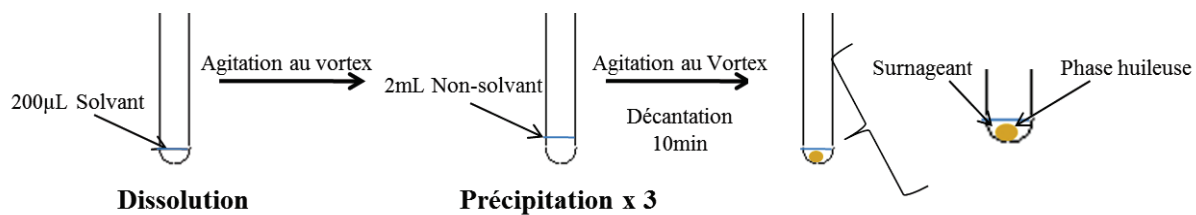


Figure II- 17 : Protocole de dissolution/précipitation sur la phase huileuse récupérée après évaporation du solvant de désorption

Afin d'évaluer l'impact de l'ajout de cette étape sur la répétabilité et de définir le couple de solvant/non-solvant optimal, nous avons testé deux couples de solvant/non-solvant constitués d'heptane/MeOH distillé et d'heptane/éthanol ; l'heptane étant moins toxique que le chloroforme et l'éther. L'heptane et l'éthanol n'ont pas subi de traitement de distillation, puisque des tests n'ont pas montré la présence des composés d'intérêt dans ces solvants. Les résultats obtenus pour les tests de dissolution/précipitation sont répertoriés dans le Tableau II-10. Ils montrent que seulement cinq composés sont répétables avec le couple heptane/MeOH et huit avec le couple heptane/éthanol, ce qui signifie que l'étape de dissolution/précipitation ne semble avoir que peu d'impact sur la répétabilité. Par conséquent, cette étape ne semble pas nécessaire.

Tableau II- 10 : Coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'évaluation de la répétabilité après extraction SBSE avec des barreaux BAB et une dissolution/précipitation (n = 3)

CV < 30 %	BAB			
31 % < CV < 50 %	Heptane /MeOH		Heptane/ Ethanol	
CV > 50 %	CV dopé avant (%)	CV dopé après (%)	CV dopé avant (%)	CV dopé après (%)
Tinuvin 622	105	42	16	16
Cyasorb UV 9	28	14	24	9
Triphénylphosphate	0	2	27	8
Hostanox 03	29	38	18	38
Oléamide	5	2	29	7
Chimassorb 81	1	32	23	24
Glycérol monostéarate	24	73	32	28
Isonox 129	61	41	17	36
Tinuvin 326	64	19	73	56
Irganox 3114	65	75	36	31
Tinuvin 327	50	53	73	51
Tinuvin 328	23	7	72	54
Vitamine E	33	44	80	24
Irganox 1010	71	45	32	37
Irganox 1330	67	39	99	43
Naugard DLTDP	6	14	55	88
Irganox 1076	28	52	27	42
Irgafos 168	30	19	11	37
Naugard DSTDP			66	54
Diphényl phosphate			14	5
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	33	16	5	9
2,4-ditertbutyl-phénol			3	10

#### II.4.1.2.4. Influence de la plaque d'agitation

Afin de pallier aux problèmes de répétabilité de l'extraction SBSE, un autre paramètre intervenant dans cette étape de l'analyse a été étudié. Il s'agit de l'influence de la plaque d'agitation utilisée lors des extractions SBSE. Pour cela, des extractions avec chaque type de barreaux ont été réalisées avec une plaque d'agitation neuve ayant les mêmes caractéristiques que celle utilisée jusqu'à présent. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le Tableau II-11. Ils montrent que les extractions de tous les composés sauf le diphényl phosphate sont répétables avec les barreaux BAW 2. Seulement cinq composés ne sont pas répétables avec

les barreaux BAW 1 et BAB. Par conséquent, il est possible de conclure que les problèmes majeurs de répétabilité que nous avons rencontrés étaient dus à la plaque d'agitation.

Tableau II- 11 : Coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'évaluation de la répétabilité après extraction SBSE avec une plaque d'agitation neuve (n = 3)

CV < 30 %	BAB		BAW 2		BAW 1	
31 % < CV < 50 %	CV dopé avant (%)	CV dopé après (%)	CV dopé avant (%)	CV dopé après (%)	CV dopé avant (%)	CV dopé après (%)
CV > 50 %						
Tinuvin 622	13	50	30	16	5	17
Cyasorb UV 9	2	3	4	2	5	7
Triphénylphosphate	1	5	11	5	8	1
Hostanox 03	18	14	24	16	23	4
Oléamide	9	10	4	7	6	6
Chimassorb 81	4	3	6	2	13	3
Glycérol monostéarate	31	45	27	17	17	15
Isonox 129	42	32	26	17	49	26
Tinuvin 326	9	8	12	30	7	13
Irganox 3114	38	48	22	22	36	17
Tinuvin 327	31	22	11	16	27	2
Tinuvin 328	10	17	5	18	23	3
Vitamine E	16	19	4	10	14	5
Irganox 1010	17	15	16	14	11	15
Irganox 1330	26	16	20	7	35	20
Naugard DLTDP	12	9	25	12	24	8
Irganox 1076	12	21	20	18	17	24
Irgafos 168	19	17	30	5	69	10
Naugard DSTDP	58	41	28	16	49	42
Diphényl phosphate	19	5	80	2	10	0
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	4	5	3	4	8	0
2,4-ditertbutyl-phénol	3	1	25	15	45	5

L'étude de l'impact de la plaque d'agitation présente un inconvénient. En effet, elle nécessite d'en avoir au moins deux et donc, le plus souvent, cela induit l'achat d'une plaque d'agitation supplémentaire. De plus, c'est l'outil le moins souvent étudié lors de l'extraction en raison de son coût onéreux. Il s'agit également d'un outil calibré et donc peu souvent remis en question. Néanmoins, cette étude a permis d'identifier la source du problème de répétabilité.



Cependant, le problème de relargage d'excès de phase huileuse subsiste. Afin de ne pas injecter d'huile dans le système analytique après reprise des extraits, la totalité du contenu du tube (soit les extraits et la phase huileuse) est prélevé et inséré dans l'insert d'un vial. Après environ 1 h à 4 °C, les deux phases sont distinctes. Ainsi, le surnageant est prélevé et inséré dans un vial propre avant injection.

#### II.4.2. Caractérisation de la phase d'extraction par MEB

Comme nous l'avons remarqué pendant le conditionnement des barreaux (II.4.1.2.2.), cette étape a engendré des changements physiques importants au niveau de leur taille et de leur durcissement. Afin de vérifier que quelle que soit la méthode de fabrication employée, les barreaux sont tous identiques au niveau de leur surface et donc au niveau de l'extraction, une analyse microscopique de la surface de divers barreaux a été réalisée. En effet, nous avons pu comparer, à l'aide d'un MEB, les surfaces de barreaux BAB ayant été conditionnés (par agitation magnétique ou par Soxhlet) ou non. La Figure II-18 représente les photos obtenues au grossissement  $\times 500$  dans le cas d'un barreau BAB non conditionné (A), conditionné par agitation magnétique (B) et conditionné par Soxhlet (C). Aucun des trois barreaux ne semble avoir une surface similaire. Pour le barreau non conditionné (A), nous observons des bosses et des creux. Pour le barreau conditionné par agitation magnétique (B), nous observons une quantité très importante de trous recouvrant la totalité de la surface du barreau. Pour le barreau conditionné par Soxhlet (C), nous observons de nombreuses stries et de gros grains. Le conditionnement des barreaux a donc un impact direct sur la surface de ces derniers.

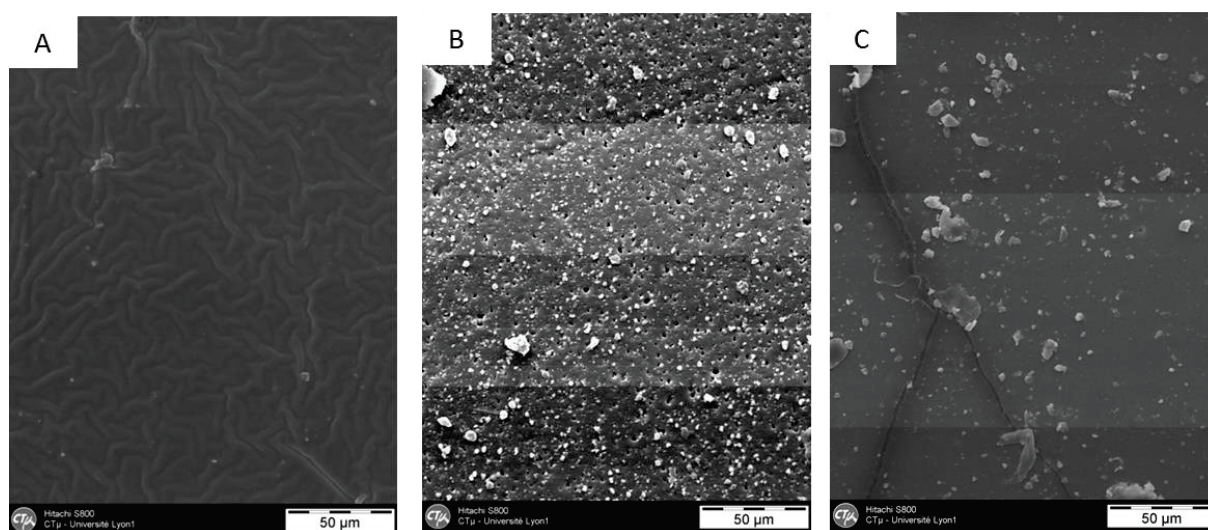


Figure II- 18 : Photos de surface de barreaux BAB non conditionné (A), conditionné par agitation magnétique (B) et par Soxhlet (C) au grossissement  $\times 500$  au MEB

Nous avons pu également comparer les surfaces des différents types de barreaux que nous fabriquons, soit BAB, BAW 1 et BAW 2. La Figure II-19 illustre les résultats observés au grossissement x 500, pour BAB (A), BAW 2 (B) et BAW 1 (C). Ainsi, nous observons les mêmes caractéristiques sur les trois barreaux, à savoir, une surface constituée de vallées et de creux plus ou moins visibles selon les photos. Cependant, nous remarquons une fissure sur la surface du barreau BAW 1 (C), probablement résultante du processus de fabrication, notamment au niveau de l'étape du démoulage des tiges de phases dans les pipettes Pasteur.

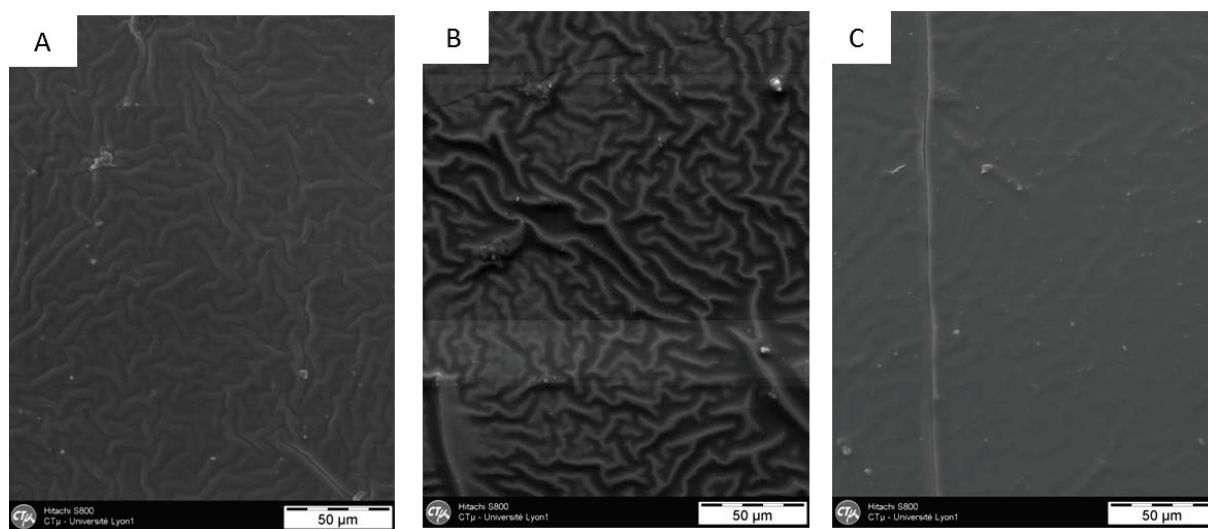


Figure II- 19 : Photos de surface de barreaux BAB (A), BAW 2 (B) et BAW 1 (C) au grossissement x 500 au MEB

Les durées et les températures choisies pour finaliser la polymérisation ont été déterminées lors de tests précédents ma thèse. Ainsi, la température de 45 °C et les durées de 48 h et 1 h, respectivement, pour les barreaux BAB et les BAWs, ont été déterminées comme satisfaisantes. Cependant, nous avons étudié l'influence de cette durée à l'étuve à 45 °C sur la surface des barreaux BAB. La Figure II-20 illustre les résultats de la visualisation des surfaces des barreaux BAB observés au grossissement x 100, pour une durée de 15 h (A), 48 h (B) et 110 h (C) passée à l'étuve à 45 °C. Ainsi, nous observons des différences significatives, notamment au bout de 110 h (C). En effet, au bout de 15 h (A), la surface du barreau présente de nombreuses nervures, vaguelettes et grains. La surface du barreau « polymérisé » pendant 48 h (B) montre une structure fibreuse avec également la présence de grains. En grossissant un peu plus (x 500), nous constatons que la surface de ce barreau est aussi constituée de vaguelettes. Ainsi ces deux barreaux présentent des surfaces similaires. Pour ce qui est de la surface du barreau « polymérisé » pendant 110 h (C), une différence notable est observée. En effet, la surface apparaît plus rugueuse et trouée que pour les autres barreaux. Elle semble

presque endommagée. Ainsi, la durée de polymérisation à une température définie, ici 45 °C, a un impact certain sur la surface des barreaux BAB. Les durées de 15 h (A) et 48 h (B) passées à l'étuve en vue d'une polymérisation complète semblent convenir à une surface homogène et en bon état pour réaliser des extractions répétables. Cependant, comme les tests préliminaires sur les barreaux BAB ont été réalisés sur des barreaux « polymérisés » pendant 48h, cette durée a été conservée pour la suite de l'optimisation de l'extraction.

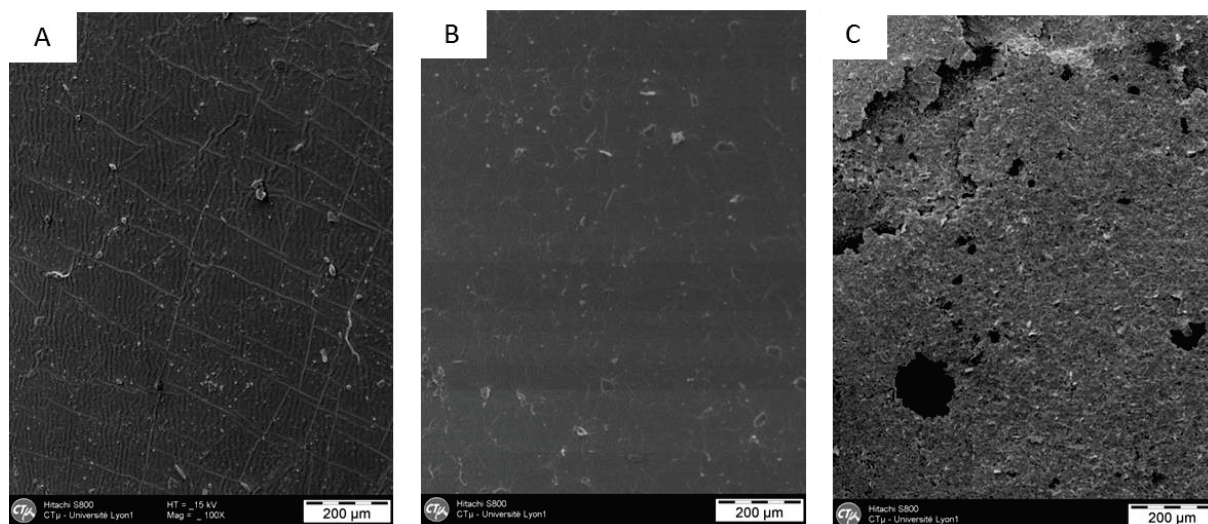


Figure II- 20 : Photos de surface de barreaux BAB « polymérisés » à 45 °C pendant 15 h (A), 48 h (B) et 110 h (C) au grossissement x 100 au MEB

#### II.4.3. Optimisation de l'extraction

Après avoir choisi les concentrations des substances ciblées pour le dopage et déterminé le protocole d'élaboration des barreaux en vue d'une répétabilité satisfaisante, l'optimisation de l'extraction des 22 additifs plastiques sélectionnés dans l'eau distillée pour chaque type de barreaux a pu être réalisée. Cette étape n'est pas exécutée dans l'urine puisque l'optimisation prend en compte plusieurs paramètres testés sur des triplicats d'extraction et nécessite donc une quantité d'échantillon difficilement estimable en début d'optimisation. Afin d'utiliser une matrice identique sur toute la durée de cette étape, l'eau distillée a été choisie, l'eau étant le constituant majoritaire de l'urine (95 %).

##### II.4.3.1. Stratégie d'optimisation

L'optimisation de l'extraction est réalisée sur de l'eau distillée dopée par un mélange des 22 additifs plastiques aux concentrations déterminées lors de tests préliminaires (cf. II.4.1.1). L'optimisation de l'extraction a été réalisée de façon itérative. Une méthode initiale a été fixée comme étant le point de départ au cheminement de l'optimisation. Cette méthode

se constitue d'une étape d'adsorption pendant 60 min, d'une étape de désorption de 15 min dans 10 mL d'acétone distillée et répétée quatre fois. La méthode initiale est identique pour les trois types de barreaux. De plus, l'optimisation des paramètres d'extraction s'est déroulée dans le même ordre pour chaque type de barreaux ; à savoir, le choix du solvant de désorption, le nombre de répétitions de l'étape de désorption, le volume du solvant de désorption, la durée de désorption puis la durée d'adsorption. La détermination de ses paramètres optimaux a été réalisée en évaluant la répétabilité des réponses obtenues et en calculant les rendements d'extraction. En effet, nous avons jugé que la répétabilité correspond au critère le plus important dans le cas de l'utilisation de barreaux artisanaux. Elle a été évaluée en calculant les coefficients de variation des aires sous les pics chromatographiques obtenues pour chaque composé.

#### II.4.3.2. Paramètres à optimiser

L'efficacité d'une extraction SBSE dépend de nombreux paramètres. Dans le cas de notre étude, certaines grandeurs ont été fixées. En l'occurrence, certains paramètres de fabrication des barreaux (dimensions des barreaux, température et durée pour finaliser la polymérisation de la phase) et des paramètres pouvant améliorer l'extraction comme l'ajout de sels et l'utilisation d'ultrasons ont été fixés, suite à des tests qui n'ont pas été réalisés dans le cadre de ma thèse. L'optimisation de ces paramètres n'a pas été jugée nécessaire. Les paramètres fixés sont répertoriés dans le Tableau II-6. Le volume d'échantillon dans lequel le barreau est placé est fixé à 3 mL, de façon à ce que le barreau soit totalement immergé dans un minimum d'échantillon. Le solvant de reprise est fixé selon la méthode analytique utilisée dans ce contexte et développée lors de précédents travaux de thèse (Pouech, 2014). Il s'agit de méthanol distillé. Les molécules d'additifs plastiques étant thermosensibles, l'étape de désorption a été réalisée à température ambiante. Ainsi, les paramètres à optimiser pour l'étape de désorption sont le choix du solvant, son volume, la durée et le nombre de répétitions de cette étape. La durée de l'étape d'adsorption est aussi à optimiser.

#### II.4.3.3. Optimisation de l'étape de désorption

##### II.4.3.3.1. Choix du solvant de désorption

Dans un premier temps, l'optimisation du solvant de désorption a été réalisée. Trois différents solvants ont été testés pour les trois types de barreaux d'extraction, à savoir le MeOH, l'ACN et l'acétone. L'ACN, le MeOH, des mélanges de ces solvants, ou des mélanges de solvant avec de l'eau ou des tampons aqueux sont les solvants de désorption les

plus utilisés (Camino-Sánchez *et al.*, 2012; Margoum *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Cependant, le solvant de désorption choisi devra être compatible avec la nature de la phase polymère du barreau SBSE. De plus, les substances d'intérêt devront avoir une forte affinité pour ce solvant. C'est pourquoi d'après les travaux précédents réalisés sur ces additifs plastiques (Pouech, 2014), nous avons sélectionné ces trois solvants de désorption à tester. Durant l'adsorption, les composés doivent avoir une plus forte affinité pour la phase polymérique du barreau que pour l'échantillon aqueux pour être extraits. Les composés étant apolaires, ils sont extraits avec les phases des barreaux SBSE qui sont, elles-mêmes, apolaires. En revanche, lors de la désorption, les composés doivent avoir plus d'affinité pour le solvant de désorption que pour le polymère recouvrant le barreau SBSE. Ainsi, l'extraction dépend de la polarité de trois entités, qui sont la molécule à extraire, la phase polymérique du barreau SBSE et le solvant de désorption.

Pour les barreaux BAB, les valeurs de coefficients de variations des aires obtenues étaient inférieures ou égales à 30 % pour 16, 12 et 6 composés ciblés, respectivement avec l'ACN, le MeOH et l'acétone. Parmi ces composés extraits avec un coefficient de variation satisfaisant, 12 et cinq d'entre eux étaient extraits majoritairement, respectivement, avec l'ACN et l'acétone. Ainsi, pour les barreaux BAB, le meilleur solvant de désorption était l'ACN pour extraire la majorité des composés ciblés avec un coefficient de variation satisfaisant ( $\leq 30\%$ ). Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 1. Parmi les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des conditions testées, trois (le cyasorb UV 9, le chimassorb 81 et l'irgafos 168) et un (l'oléamide) d'entre eux sont majoritairement extraits du barreau BAB, respectivement, avec l'acétone et l'ACN. D'après les structures moléculaires de ces composés, il semblerait que les composés avec des groupements phényles aient plus d'affinité avec l'acétone, contrairement à l'oléamide avec une longue chaîne alkyle qui a plus d'affinité pour l'ACN. Néanmoins, il s'agit d'une hypothèse puisque les résultats obtenus pour chaque composé ne sont pas significativement différents ( $\geq 20\%$ ) suivant les solvants de désorption, excepté pour l'irgafos 168.

Pour les barreaux BAW 1, la majorité des additifs plastiques a été extraite avec des coefficients de variation inférieurs ou égaux à 30 % pour les trois solvants de désorption. Avec l'acétone, seulement deux substances ciblées (l'hostanox 03 et l'irgafos 168) n'ont pas été extraites avec un coefficient de variation correct, contrairement aux trois et sept composés respectivement avec l'ACN et le MeOH. Par conséquent, le choix du solvant de désorption pour l'extraction avec le barreau BAW 1 s'est porté sur l'acétone. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 2. Parmi les composés ayant des réponses répétables

pour l'ensemble des conditions testées, certains étaient majoritairement extraits du barreau BAW 1 avec l'acétone (le tinuvin 622, l'irganox 1330 et l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque), l'ACN (le triphénylphosphate, le tinuvin 326, le tinuvin 327 et le tinuvin 328) et le MeOH (l'oléamide, le chimassorb 81, l'irganox 1010, le diphenyl phosphate et le 2,4-ditertbutyl-phénol). Contrairement aux résultats avec les barreaux BAB, il n'est pas possible de faire un lien entre les structures des composés d'intérêt et les solvants de désorption. En effet, les solvants de désorption préférentiels pour l'irganox 1010 et l'irganox 1330 ne sont pas les mêmes, alors que la structure des composés est similaire.

Pour les barreaux BAW 2, la majorité des composés ciblés a été extraite avec des coefficients de variation inférieurs ou égaux à 30 % avec les trois solvants de désorption. Avec le MeOH et l'ACN, 17 des 22 substances ciblées ont été extraites avec des valeurs de coefficients de variation satisfaisantes, tandis que l'acétone a permis l'extraction de 13 composés. Cependant, parmi ces résultats, c'est avec l'acétone que les meilleurs rendements d'extraction ont été obtenus pour 11 substances, dont cinq avec une différence significative, comme l'illustre la Figure II-21. Elle représente les rendements d'extraction des composés ayant eu des réponses répétables en fonction des solvants de désorption testés. De ce fait, le choix du solvant de désorption pour l'extraction avec les barreaux BAW 2 s'est porté sur l'acétone. De plus, l'acétone est préférable puisqu'il s'évapore plus rapidement que l'ACN et le MeOH. Ce détail permet un gain de temps considérable au niveau de l'étape d'évaporation du solvant de désorption. De plus, au fur et à mesure de l'avancée de l'optimisation de l'extraction, la répétabilité pourra être améliorée en optimisant les autres paramètres. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 3. Parmi les composés ayant des réponses répétables pour l'ensemble des conditions testées et des rendements significativement différents, quatre (le triphénylphosphate, l'oléamide, l'irganox 1010 et le tinuvin 328) et un (le naugard DSTDP) d'entre eux sont majoritairement extraits du barreau BAW 2, respectivement, avec l'acétone et l'ACN. Tout comme pour les barreaux BAB, les composés avec des groupements phényles sembleraient avoir plus d'affinité avec l'acétone. Cependant, l'oléamide étant constitué d'une longue chaîne alkyle est également extrait majoritairement avec l'acétone. Dans ce cas, l'établissement d'un lien entre les structures des composés d'intérêt et les solvants de désorption n'est pas réalisable.

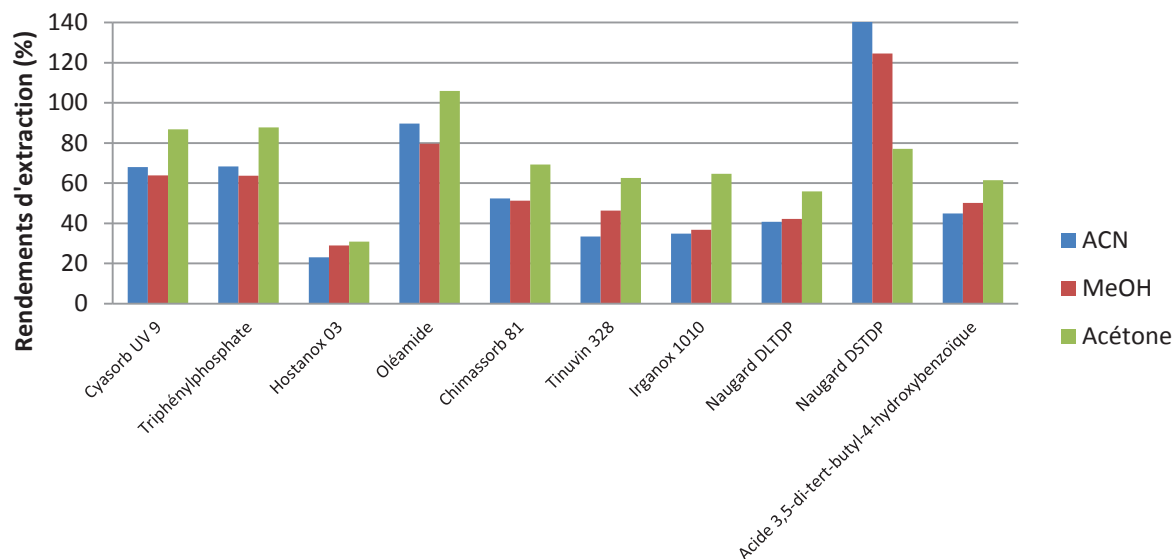


Figure II- 21 : Rendements d'extraction en fonction du solvant de désorption pour les BAW 2

L'acétone a été choisie comme solvant de désorption optimal pour les BAWs au vu des réponses satisfaisantes obtenues, en termes de répétabilité et de rendements d'extraction. De plus, il s'agit du solvant préférentiel pour sa rapidité d'évaporation. Etant donné que les solvants de désorption optimaux des barreaux BAWs sont les mêmes, nous pouvons en déduire que l'ajout du produit C dans la constitution de la phase du barreau BAW 2, ne modifie pas l'impact du solvant de désorption sur les substances d'intérêt. En revanche, pour les barreaux BAB, ce solvant a permis l'obtention de réponses répétables seulement pour environ 1/4 des composés ciblés. Le choix du solvant de désorption optimal s'est donc porté sur l'ACN.

Pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des solvants de désorption testés et les différents types de barreaux, nous pouvons comparer les résultats obtenus. Ainsi, pour chaque barreau, l'oléamide présente un solvant de désorption optimal différent. En effet, avec les barreaux BAB, l'oléamide est extrait de façon optimale avec de l'acétonitrile distillé. Pour l'extraction avec les barreaux BAW 1, le MeOH distillé est le solvant préférentiel, alors qu'avec les barreaux BAW 2, il est majoritairement extrait avec l'acétone distillé. Quant au chimassorb 81, il est majoritairement extrait avec de l'acétone par les barreaux BAB et BAW 2, tandis que le solvant optimal est le MeOH distillé pour l'extraction par les barreaux BAW 1. Cependant, les différences entre les rendements d'extraction obtenus pour chaque condition sont négligeables ( $\leq 20\%$ ).

Par comparaison des rendements d'extraction obtenus, ces deux composés sont majoritairement extraits par les barreaux BAW 1. D'après les structures des monomères

constituant les barreaux artisanaux (Tableau II-4), les BAW 1 semblent être moins polaires que les barreaux BAB, de par le nombre moins élevé de groupements Si-O et Si-H. Cependant, les quantités de monomères dans chaque produit (A1, A2, B1 et B2) ne sont pas connues. Il est donc impossible de savoir si en effet les groupements Si-O et Si-H sont plus nombreux dans le barreau BAB que dans le barreau BAW 1. De plus, de par la structure du chimassorb 81, ce dernier devrait avoir plus d'affinité pour le groupement phényle du produit C. Ainsi, il devrait être majoritairement extrait avec les barreaux BAW 2. Néanmoins, ce n'est pas le cas ici. Quant à l'oléamide, il est difficile de prévoir, d'après sa structure, pour quel type de barreaux il aura le plus d'affinité. En effet, encore une fois, les quantités de monomères dans chaque phase jouent un rôle important dans cette prévision. De plus, il faut prendre en compte les structures tridimensionnelles de chaque composé et chaque polymère.

Ainsi, la comparaison des réponses obtenues pour ces deux composés a permis de mettre en évidence que le choix des solvants de désorption optimaux dépendait des molécules mais aussi des types de barreaux utilisés.

#### II.4.3.3.2. Détermination du nombre de répétitions de l'étape de désorption

Trois nombre de répétitions de l'étape de désorption ont été testés pour les trois types de barreaux d'extraction, à savoir une, deux et quatre étapes de désorption. Le nombre de répétitions de l'étape de désorption n'est pas un paramètre très souvent étudié (Carpinteiro *et al.*, 2012). En effet, en principe, l'extraction est réalisée en deux étapes, l'adsorption puis la désorption. Dans notre cas, nous avons choisi de répéter l'étape de désorption afin de favoriser la libération de l'ensemble des substances d'intérêt piégées dans la phase polymère du barreau SBSE.

Pour les barreaux BAB, les valeurs de coefficients de variation des aires obtenues étaient inférieures ou égales à 30 % pour 14 composés ciblés avec une et quatre répétitions de l'étape de désorption, tandis qu'avec deux répétitions, dix substances ont rempli les critères de répétabilité. Parmi les molécules extraites avec des valeurs de coefficients de variation satisfaisantes, 11 et trois d'entre elles ont été extraites majoritairement, respectivement, avec quatre et une étape(s) de désorption. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 4. Pour les barreaux BAB, le nombre de répétitions de l'étape de désorption optimal choisi était de quatre puisque la majorité des additifs plastiques sélectionnés remplissaient les critères de répétabilité. Parmi les composés extraits de façon répétable, nous pouvons les classer en trois groupes caractérisant trois tendances observées selon les réponses obtenues en fonction du nombre de répétitions de l'étape de désorption. Chacun de ces groupes est illustré



par un composé. En effet, parmi les composés ayant des CVs satisfaisants pour les « dopés avant » et les « dopés après », pour la majorité des composés, nous observons une augmentation du rendement d'extraction avec le nombre de répétitions de l'étape de désorption, comme l'illustre le triphénylphosphate dans la Figure II-22. Au contraire pour l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, ce dernier est extrait majoritairement avec une seule étape de désorption, puis de moins en moins jusqu'à quatre étapes de désorption. Quant au dernier groupe de composés, un maximum de rendements d'extraction est obtenu avec deux étapes de désorption, tel que pour l'oléamide. Cependant, pour ces deux derniers composés et pour l'ensemble des autres substances d'intérêt excepté le triphénylphosphate, les différences en termes de rendements d'extraction ne sont pas significatives. De ce fait, il n'est pas possible de corrélérer ces tendances à ces groupes de composés. Néanmoins, il est possible que les composés avec une structure similaire au triphénylphosphate, comme le diphenyl phosphate, aient la même tendance à être de plus en plus désorbé jusqu'à quatre répétitions de l'étape de désorption. De plus, une hypothèse peut être émise, à savoir que les composés les plus apolaires et ayant une plus forte affinité pour la phase polymère subissent une désorption plus lente et ont besoin de plus d'étapes pour être désorbés de façon optimale. Néanmoins, cette hypothèse ne peut pas être vérifiée puisque le seul composé, ayant des réponses significativement différentes et répétables, quel que soit le nombre de répétitions testé (le triphénylphosphate), est un des composés les plus polaires parmi ceux étudiés et qu'il est de plus en plus désorbé avec l'augmentation du nombre de répétitions de cette étape.

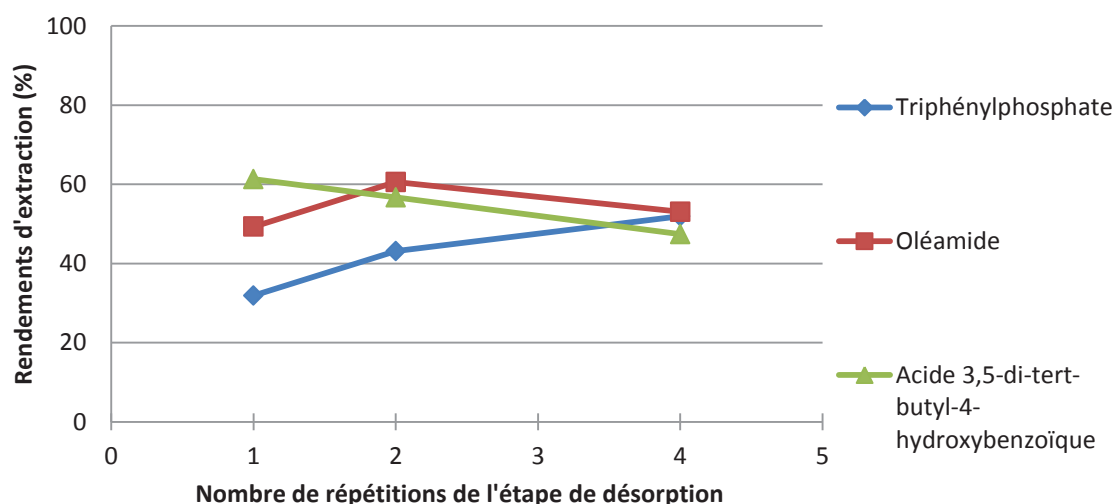


Figure II- 22 : Influence du nombre de répétitions de l'étape de désorption sur les rendements d'extraction pour trois composés avec les BAB

Pour les barreaux BAW 1, les valeurs de coefficients de variation des réponses obtenues étaient satisfaisantes pour 8, 12 et 20 additifs plastiques sélectionnés, respectivement avec une, deux et quatre étapes de désorption. Avec un nombre de répétitions de l'étape de désorption de quatre, 18 des 20 composés ciblés extraits avec des CVs satisfaisants ont obtenu les meilleurs rendements d'extraction, comparés à ceux obtenus avec les autres nombres de répétitions testés. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 5. Par conséquent, le choix du nombre de répétitions de l'étape de désorption pour les barreaux BAW 1 s'est porté sur quatre. Contrairement aux barreaux BAB, avec les BAW 1, nous observons une seule tendance d'après les molécules extraites de manière répétable, à savoir, des rendements d'extractions de plus en plus importants avec l'augmentation du nombre de répétitions de l'étape de désorption, comme illustré dans la Figure II-23 par quelques composés. Cependant pour ces composés excepté le cyasorb UV 9, les rendements d'extraction ne sont pas significativement différents. Dans ce cas, une corrélation entre cette tendance et ces molécules est difficilement réalisable. Toutefois, il est possible d'envisager que les composés avec une structure similaire à ce composé observent la même tendance, à savoir, une augmentation des rendements d'extraction avec l'augmentation du nombre de répétitions de l'étape de désorption. En revanche, cette hypothèse n'est pas vérifiable d'après nos données.

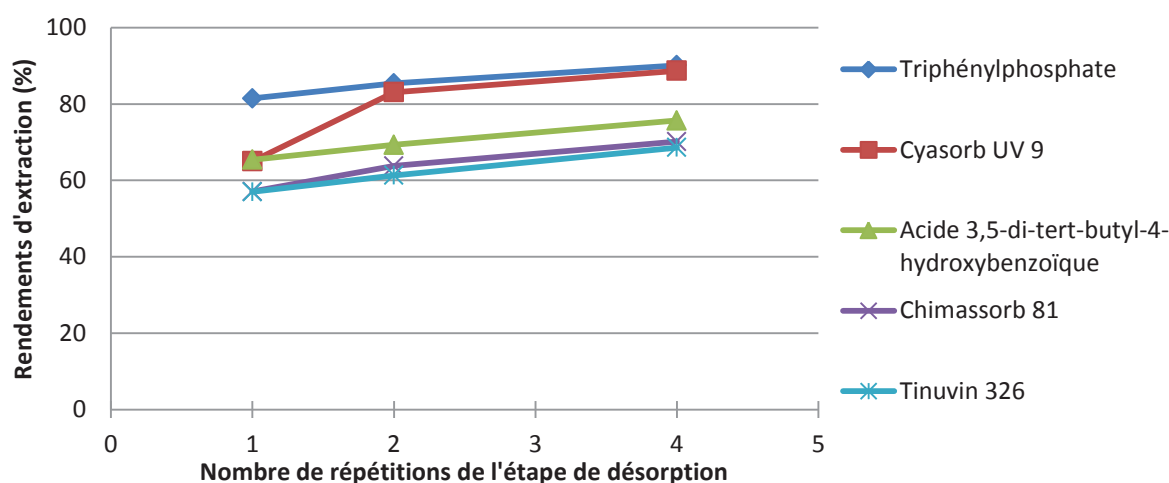


Figure II- 23 : Influence du nombre de répétitions de l'étape de désorption sur les rendements d'extraction pour cinq composés avec les BAW 1

Pour les barreaux BAW 2, la majorité des composés ciblés a été extraite avec des CVs inférieurs ou égaux à 30 % avec les trois nombres de répétitions. Contrairement aux autres barreaux artisanaux, avec un nombre de répétitions de deux, 18 des 22 molécules ciblées ont été extraites avec des CVs satisfaisants. Parmi ces 18 composés ciblés, 15 d'entre eux ont

obtenus les meilleurs rendements d'extraction comparés à ceux obtenus avec les autres nombres de répétitions de l'étape de désorption. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 6. Le choix du nombre de répétitions de l'étape de désorption pour l'extraction des additifs plastiques choisis avec les barreaux BAW 2 était donc de deux. Tout comme les barreaux BAB, nous observons trois tendances d'après les molécules extraites de manière répétable. Ces tendances sont représentées dans la Figure II-24 par quelques composés. Certains composés ont des rendements d'extraction augmentés avec le nombre de répétitions de l'étape de désorption, comme pour le tinuvin 622. Au contraire, le tinuvin 327 semble être de moins en moins bien extrait avec l'augmentation du nombre de répétitions de l'étape de désorption. Cet additif est le seul, parmi les composés ayant eu des réponses répétables, à avoir ce comportement. Quant au dernier groupe de composés, représenté par trois composés (l'irganox 1330, l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque et le cyasorb UV 9) sur la Figure II-24, ils atteignent un maximum de rendements d'extraction avec deux étapes de désorption. Néanmoins, seulement deux composés (l'irganox 1330 et le cyasorb UV 9) ont obtenu des rendements d'extraction significativement différents selon le nombre de répétitions de l'étape de désorption. Dans ce cas, seul l'établissement d'une corrélation entre ces composés et leur tendance est possible. Ces composés sont constitués de groupements phényles et présentent donc le même phénomène. Ainsi, il est possible d'envisager que les composés avec des groupements phényles aient la même tendance que le cyasorb UV 9 et l'irganox 1330, à savoir des rendements d'extraction optimaux avec deux étapes de désorption.

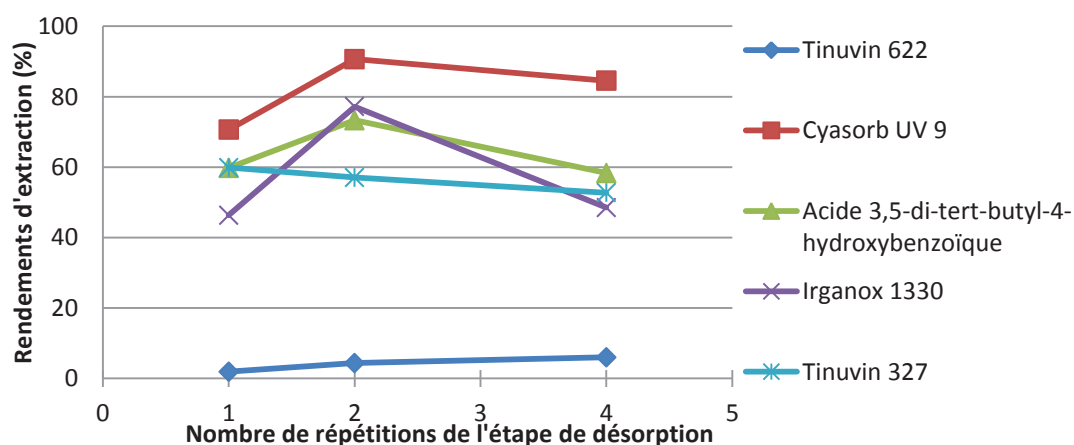


Figure II- 24 : Influence du nombre de répétitions de l'étape de désorption sur les rendements d'extraction pour cinq composés avec les BAW 2

Pour l'optimisation du nombre de répétitions de l'étape de désorption, le choix de ce dernier s'est majoritairement appuyé sur le nombre de molécules ayant eu des réponses

répétables. Pour tous les types de barreaux, les rendements d'extraction n'ont pas eu d'influence sur le choix du paramètre optimal. En effet, très peu de différences significatives ont été observées au niveau des rendements d'extraction. Pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des nombres de répétitions testés et les différents types de barreaux, nous pouvons comparer les tendances observées. Ainsi, pour le triphénylphosphate, nous observons une réponse croissante avec le nombre de répétitions de l'étape de désorption avec les barreaux BAB et BAW 1 ; et un rendement d'extraction maximum avec deux répétitions avec les barreaux BAW 2. En revanche, les réponses de l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque sont différentes pour les trois types de barreaux. En effet, nous observons une diminution des rendements d'extraction avec l'augmentation du nombre de répétitions pour l'extraction avec les barreaux BAB, contrairement aux barreaux BAW 1. Enfin, avec les barreaux BAW 2, une augmentation de la réponse jusqu'à un nombre de répétitions de deux est observée, puis une diminution jusqu'à quatre. Cependant, la majorité des rendements d'extraction obtenus, notamment pour le triphénylphosphate et l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque n'est pas significativement différente selon le nombre de répétitions de l'étape de désorption et le type de barreaux utilisé. Toutefois, ces deux composés présentent la même tendance avec les barreaux BAWs, contrairement aux barreaux BAB. Cette différence selon le barreau utilisé résulte probablement de l'affinité du composé pour le solvant de désorption plutôt que pour la phase polymère du barreau. En effet, l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque est majoritairement extrait par les barreaux BAB avec une désorption. Il est donc rapidement extrait et a une forte affinité pour le solvant de désorption plutôt que pour la phase polymère des barreaux. Quant au triphénylphosphate, la tendance inverse est observée, ce qui signifie que ce composé est extrait plus difficilement des barreaux BAB et son extraction nécessite plus de temps. Ce phénomène ne pourrait pas s'expliquer par la polarité de ces composés, qui est très similaire, mais plutôt par leurs structures tridimensionnelles ou par les différentes interactions aléatoires mises en jeu.

La comparaison des rendements d'extraction calculés permet de démontrer que le triphénylphosphate et l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque sont majoritairement extraits par les barreaux BAWs, avec peu de différence entre les barreaux BAW 1 et BAW 2. Cela signifie que ces composés ont plus d'affinité pour la phase polymère des barreaux BAWs que celle des barreaux BAB. Cette affinité dépend de nombreux paramètres dont la nature de la phase polymère, la polarité des composés mais également leur structure tridimensionnelle. C'est pourquoi, il est complexe de déterminer les raisons d'une extraction plus performante avec un type de barreaux plutôt qu'un autre.

La comparaison des résultats obtenus a permis une nouvelle fois de mettre en évidence que le choix du nombre de répétitions de l'étape de désorption était dépendant des molécules d'intérêt mais également des différentes phases de polymères recouvrant les barreaux, et ce malgré le peu de différences observées entre les réponses.

#### II.4.3.3.3. Optimisation du volume de solvant de désorption

Quatre volumes de solvant de désorption ont été testés pour les trois types de barreaux respectifs, à savoir, 3, 5, 7 et 10 mL. Le volume du solvant de désorption choisi doit garantir l'immersion totale du barreau SBSE, tout comme le volume d'échantillon pour l'adsorption. De ce fait, le plus petit volume testé était 3 mL. Nous avons voulu tester une plus large gamme de volumes que celles utilisées généralement. Cette optimisation a été réalisée sur les solvants de désorption et les nombres de répétitions choisis précédemment.

Pour les barreaux BAB, les valeurs de CVs des aires obtenues étaient inférieures ou égales à 30 % pour 14, 19, 17 et 17 composés ciblés avec respectivement 3, 5, 7 et 10 mL. Parmi les additifs plastiques extraits avec des valeurs de CVs satisfaisantes, quatre, trois, quatre et sept d'entre eux sont majoritairement extraits avec respectivement 3, 5, 7 et 10 mL. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 7. Si nous comparons les rendements d'extraction obtenus pour les molécules ciblées ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des volumes testés, nous observons sur la Figure II-25 qu'il n'y a aucune différence significative. Par conséquent, le choix du volume de solvant de désorption était de 5 mL, car il permet d'extraire la majorité des composés de façon répétable. De plus, l'ACN est un solvant long à évaporer. Le volume optimal déterminé étant relativement faible, sa durée d'évaporation sera donc acceptable. Cependant, les rendements d'extraction ne varient pas significativement d'une condition à l'autre. Cela ne permet pas de corrélérer les résultats obtenus en fonction de la polarité des composés ou de leur structure tridimensionnelle.

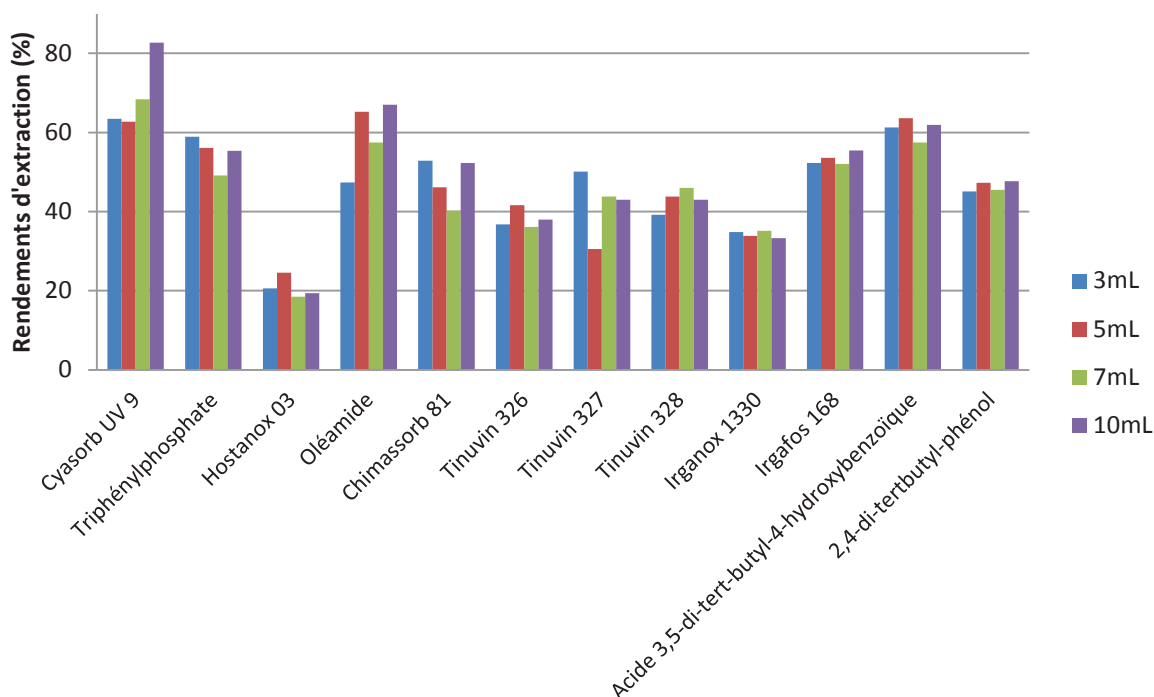


Figure II- 25 : Rendements d'extraction en fonction du volume de solvant de désorption pour les BAB

Pour les barreaux BAW 1, les valeurs de CVs étaient inférieures ou égales à 30 % pour cinq, 13, 15 et 10 substances ciblées avec respectivement 3, 5, 7 et 10 mL. Parmi les composés extraits de façon répétable, sept, six et quatre d'entre eux sont majoritairement extraits avec respectivement 5, 7 et 10 mL. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 8. Cependant, les rendements d'extraction ne varient pas significativement, comme l'illustre la Figure II-26. Celle-ci représente les rendements d'extraction en fonction des volumes de solvant de désorption pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des volumes testés. Par conséquent, le choix du volume de solvant de désorption s'est porté sur 7 mL. En effet, il s'agit du volume qui permet d'obtenir le maximum de composés avec des réponses répétables. Etant donné que le solvant optimal est de l'acétone, il n'y aura pas de problème quant à la rapidité d'évaporation de celui-ci.

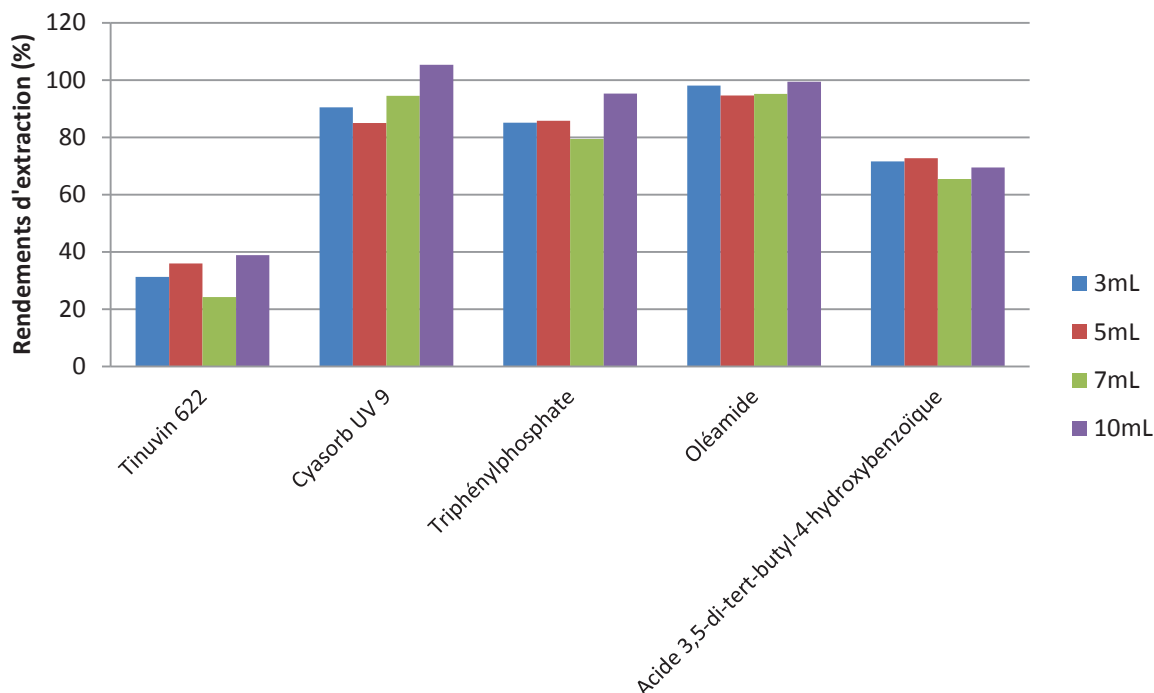


Figure II- 26 : Rendements d'extraction en fonction du volume de solvant de désorption pour les BAW 1

Pour les barreaux BAW 2, les valeurs de CVs étaient satisfaisantes pour 17, 15, 11 et 14 substances ciblées avec respectivement 3, 5, 7 et 10 mL. Parmi les composés extraits de façon répétable, huit, six, trois et trois d'entre eux sont majoritairement extraits avec respectivement 3, 5, 7 et 10 mL. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 9. Par conséquent, le choix du volume de solvant de désorption s'est porté sur 3 mL. En effet, il s'agit du volume qui permet d'obtenir le maximum de composés avec des réponses répétables et les meilleurs rendements d'extraction. Cependant, les rendements d'extraction ne varient pas significativement sauf pour le 2,4-di-tertbutyl-phénol et la vitamine E, comme l'illustre la Figure II-27. Celle-ci représente les rendements d'extraction en fonction des volumes de solvant de désorption pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des volumes. La vitamine E semble être extraite avec des rendements d'extraction plus importants avec des volumes de solvant de désorption de 3 et 5 mL ; tandis que pour le 2,4-di-tertbutyl-phénol, le volume de solvant de désorption optimal est 7 mL.

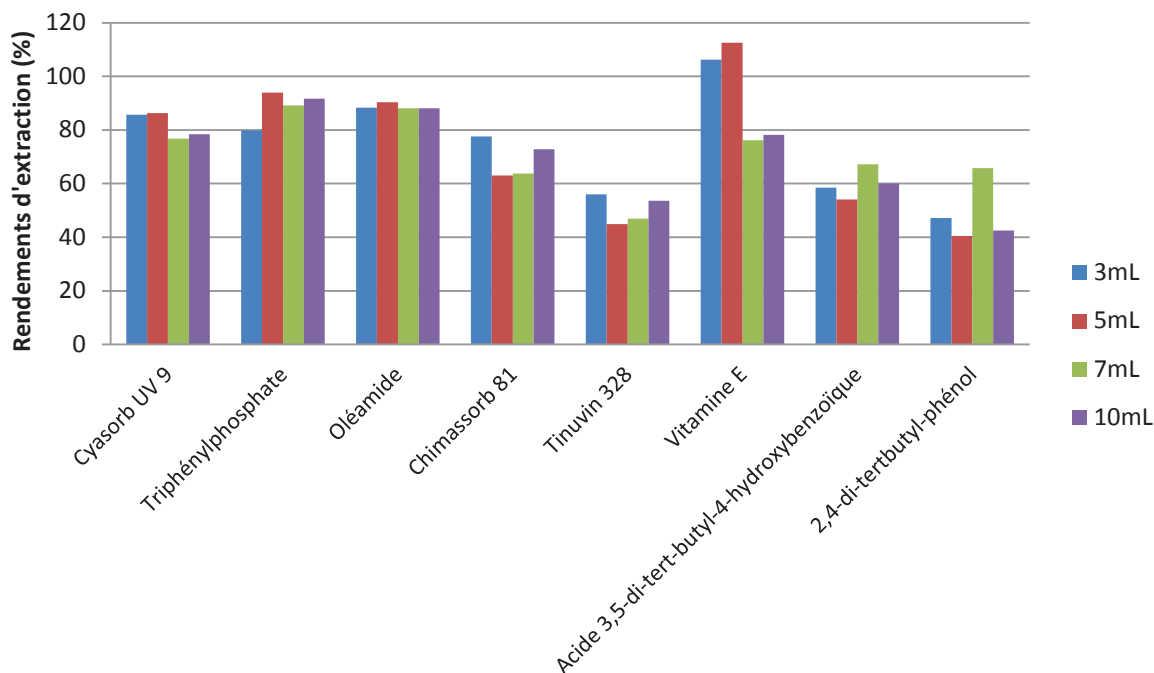


Figure II- 27 : Rendements d'extraction en fonction du volume de solvant de désorption pour les BAW 2

Pour l'optimisation du volume de solvant de désorption, le choix de ce dernier s'est majoritairement appuyé sur le nombre de molécules ayant eu des réponses répétables. Pour tous les types de barreaux, les rendements d'extraction n'ont pas eu d'influence sur le choix du paramètre optimal. En effet, très peu de différences significatives ont été observées au niveau des rendements d'extraction. Pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des volumes de solvant de désorption testés et les différents types de barreaux, nous pouvons comparer les résultats obtenus. Seuls quatre composés ont rempli ces conditions. Ainsi, pour le triphénylphosphate, nous observons trois volumes de solvant de désorption optimaux différents. En effet, pour extraire de façon optimale ce composé, il faut 3 mL de solvant avec les barreaux BAB, 10 mL avec les barreaux BAW 1 et 5 mL avec les barreaux BAW 2. De plus, pour l'oléamide, le cyasorb UV 9 et l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, nous avons constaté que les volumes de solvant de désorption optimaux étaient identiques pour les barreaux BAB et BAW 1, contrairement aux barreaux BAW 2. De ce fait, nous pouvons en déduire que l'ajout du produit C dans la constitution des barreaux BAWs a un impact sur le choix du volume de solvant de désorption pour certains composés. Cependant, l'ensemble des rendements d'extraction obtenus n'est pas significativement différent selon les volumes de solvant de désorption testés.



En comparant les rendements d'extraction avec les volumes optimaux de ces quatre composés pour chaque type de barreaux, il n'y a pas de différence significative entre les barreaux BAWs. L'oléamide, le triphénylphosphate et le cyasorb UV 9 sont majoritairement extraits par les barreaux BAWs. Ces composés ont des  $\log K_{o/w}$  proches (compris entre 4 et 6). Cependant, dans leur structure, ils sont très différents. En effet, le cyasorb UV 9 et le triphénylphosphate sont constitués de groupements phényles tandis que l'oléamide est constitué d'une longue chaîne alkyle. Quant à l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, ses rendements d'extraction optimaux sont presque identiques d'un type de barreaux à un autre. Pourtant, ce composé a une polarité similaire à celle des autres composés cités précédemment et est constitué d'un groupement phényle. En revanche, au niveau de la structure tridimensionnelle, ce dernier composé semblerait être nettement plus encombré, limitant ainsi les interactions. L'affinité d'un composé pour une phase polymère dépend donc de nombreux paramètres, ce qui signifie qu'elle est généralement difficile à prédire ou à expliquer.

#### II.4.3.3.4. Choix de la durée de l'étape de désorption

La durée est le dernier paramètre à optimiser pour l'étape de désorption. Trois durées ont été testées : 5, 10 et 15 min. Pour la plupart des extractions réalisées avec des désorptions liquides, la durée de l'étape de désorption varie entre 15 et 60 min (Camino-Sánchez *et al.*, 2012; Gilart *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013) bien que parfois cette durée soit diminuée afin de minimiser les temps d'analyse. Dans notre étude, nous avons choisi de limiter cette durée à 15 min. De plus, cette étape est répétée au moins deux fois pour chaque type de barreaux, ce qui permet en contrepartie d'améliorer les performances d'extraction. Ce paramètre a été optimisé avec un solvant, un nombre de répétitions et un volume de solvant pour l'étape de désorption optimaux pour chaque type de barreaux artisanaux, au cours de l'étape de désorption.

Pour les barreaux BAB, les valeurs de CVs étaient inférieures ou égales à 30 % pour 12, 10 et 11 substances ciblées avec, respectivement, 5, 10 et 15 min. Parmi les composés extraits avec des CVs satisfaisants, trois, cinq et sept d'entre eux étaient extraits majoritairement en, respectivement, 5, 10 et 15 min. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 10. Par conséquent, le choix de la durée de l'étape de désorption s'est porté sur 5 min. En effet, il s'agit de la durée qui permet d'obtenir le maximum de composés avec des réponses répétables. Parmi ces molécules, seules trois obtiennent des rendements maxima en 5 min de désorption d'après les conditions testées. Cependant, les rendements d'extraction ne sont pas significativement différents selon les durées de désorption, hormis

pour le triphénylphosphate. La Figure II-28 représente les rendements d'extraction en fonction des durées de désorption pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des durées testées. Comme pour l'optimisation du nombre de répétitions de l'étape de désorption, nous distinguons trois tendances selon les additifs plastiques. Le tinuvin 326 et le triphénylphosphate sont de plus en plus extraits avec l'augmentation de la durée de désorption. En ce qui concerne l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, son rendement d'extraction semble rester stable avant d'augmenter entre 10 et 15 min. Quant à l'oléamide, il est de plus en plus extrait jusqu'à 10 min, puis son rendement reste stable. Cependant, comme les rendements d'extraction ne sont pas significativement différents, excepté pour le triphénylphosphate, il n'est pas judicieux d'essayer de corrélérer les durées de désorption optimales aux différents composés.

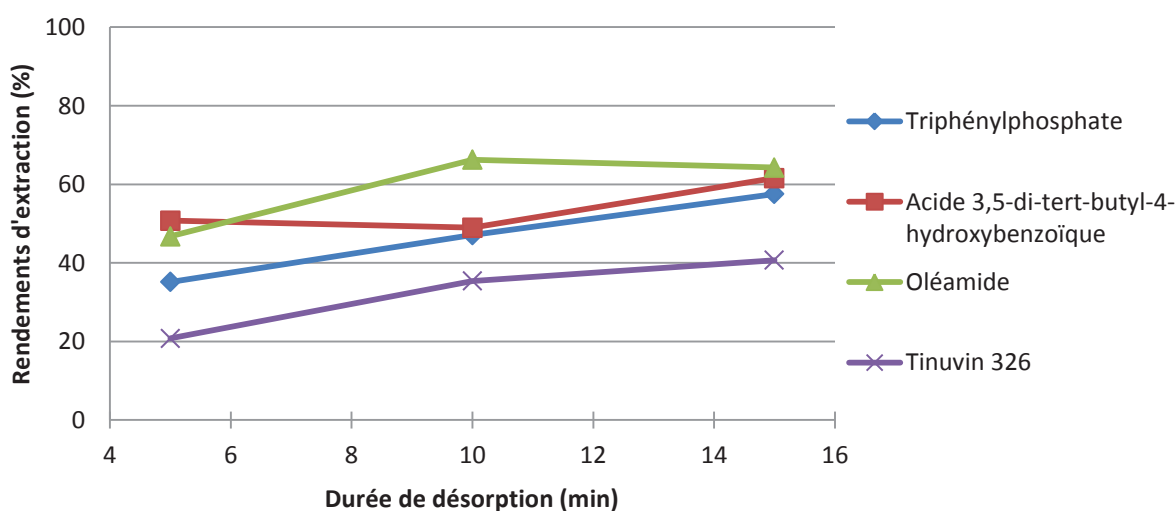


Figure II- 28 : Influence de la durée de désorption sur les rendements d'extraction pour quatre composés avec les BAB

Pour les barreaux BAW 1, les valeurs de CVs étaient satisfaisantes pour 13, 10 et neuf additifs plastiques ciblés avec, respectivement, 5, 10 et 15 min. Parmi les composés extraits avec des CVs inférieurs ou égaux à 30 %, huit et six d'entre eux étaient extraits majoritairement en, respectivement, 5 et 15 min. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 11. Par conséquent, le choix de la durée de l'étape de désorption s'est porté sur 5 min. En effet, il s'agit de la durée qui permet d'obtenir le maximum de composés avec des réponses répétables. Parmi ces molécules, huit d'entre elles obtiennent des rendements maxima en 5 min de désorption d'après les conditions testées. Cependant, les rendements d'extraction ne sont pas significativement différents selon les durées de désorption, excepté pour le cyasorb UV 9 et le naugard DSTDP. La Figure II-29 représente les rendements

d'extraction en fonction des durées de désorption pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des durées testées. Nous distinguons trois tendances selon les additifs plastiques. Le tinuvin 622 possède un rendement d'extraction stable quelle que soit la durée de désorption testée. En ce qui concerne le cyasorb UV 9, son rendement d'extraction semble rester stable avant d'augmenter de manière significative entre 10 et 15 min. La dernière tendance observée est celle concernant le plus de composés : dans un premier temps, les rendements d'extraction diminuent jusqu'à 10 min puis augmentent jusqu'à 15 min. En revanche, les différences de rendements d'extraction des molécules sont faibles, hormis pour le cyasorb UV 9 et le naugard DSTDP. Il serait intéressant d'essayer de corrélérer les durées de désorption optimales aux différents composés à partir du cyasorb UV 9 et du naugard DSTDP, puisque ces derniers présentent la même durée de désorption optimale. Néanmoins, ces composés ont des polarités relativement extrêmes et des structures très différentes. En effet, le cyasorb UV 9 est constitué de groupements phényles alors que le naugard DSTDP est constitué d'une longue chaîne alkyle. De ce fait, il est donc difficile d'établir un lien entre la tendance observée et la polarité de ces composés ou leur structure.

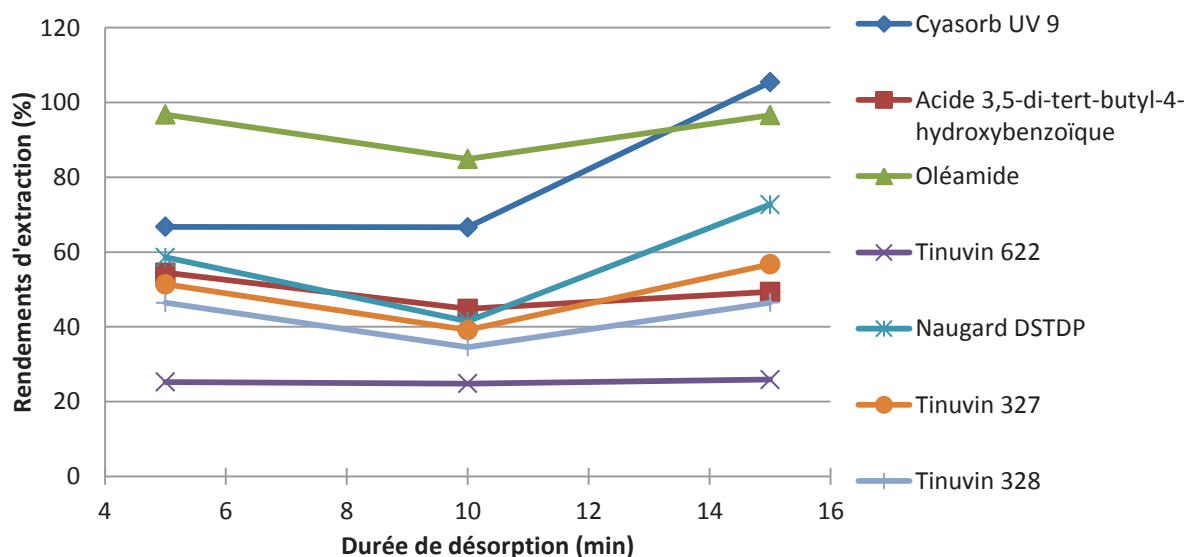


Figure II- 29 : Influence de la durée de désorption sur les rendements d'extraction pour sept composés avec les BAW 1

Pour les barreaux BAW 2, les valeurs de CVs étaient satisfaisantes pour 11, 13 et 11 additifs plastiques ciblés avec, respectivement, 5, 10 et 15 min. Parmi les composés extraits avec des CVs inférieurs ou égaux à 30 %, neuf, trois et trois d'entre eux étaient extraits majoritairement en, respectivement, 5, 10 et 15 min. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 12. Par conséquent, le choix de la durée de l'étape de désorption s'est porté sur 10 min. En effet, il s'agit de la durée qui permet d'obtenir le maximum de composés

avec des réponses répétables. Parmi ces molécules, seules trois d'entre elles obtiennent des rendements maxima en 10 min de désorption d'après les conditions testées. Cependant, les rendements d'extraction ne sont pas significativement différents selon les durées de désorption, sauf pour l'irganox 1010, comme l'illustre la Figure II-30. Celle-ci représente les rendements d'extraction en fonction des durées de désorption pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des durées. Nous distinguons une tendance majoritaire sur ces substances. Elles sont extraites au maximum, d'après les conditions testées, sur une durée de désorption de 5 min, puis de moins en moins jusqu'à 15 min. En revanche, pour un composé, l'oléamide, les rendements d'extraction semblent être constants selon les différentes durées testées. En revanche, comme les rendements d'extraction des molécules ne sont pas significativement différents, excepté pour l'irganox 1010, il n'est pas judicieux d'essayer de corréler les durées de désorption optimales aux différents composés. Une hypothèse peut être émise, à savoir que les composés les plus apolaires et ayant une plus forte affinité pour la phase polymère que pour le solvant de désorption subissent une désorption plus lente et ont besoin de plus de temps pour être désorbés de façon optimale. Néanmoins, cette hypothèse ne peut pas être vérifiée puisque le seul composé ayant des réponses répétables (l'irganox 1010 ;  $\log K_{\text{octanol/eau}} = 19,3$ ) est le composé le plus apolaire parmi ceux étudiés et qu'il est de moins en moins désorbé avec l'augmentation de la durée de cette étape. Ainsi, il aurait plus d'affinité pour le solvant de désorption que pour la phase d'extraction. D'autres essais doivent compléter cette supposition afin de la confirmer.

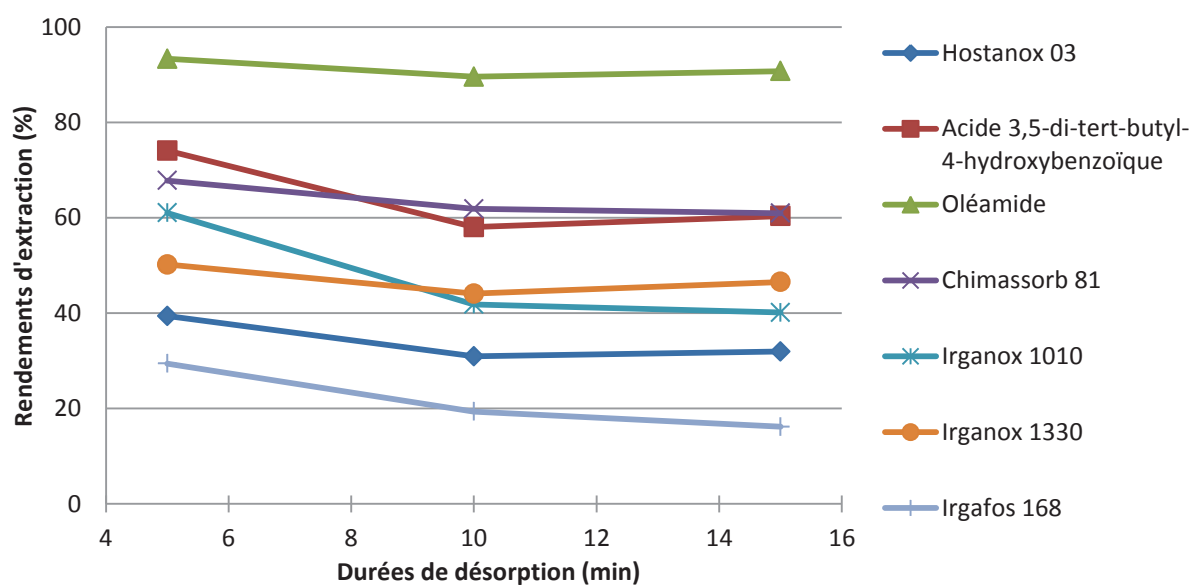


Figure II- 30 : Influence de la durée de désorption sur les rendements d'extraction pour sept composés avec les BAW 2

Pour l'optimisation de la durée de désorption, le choix de cette dernière s'est majoritairement appuyé sur le nombre de molécules ayant eu des réponses répétables. Pour tous les types de barreaux, les rendements d'extraction n'ont pas eu d'influence sur le choix du paramètre optimal. En effet, très peu de différences significatives ont été observées au niveau des rendements d'extraction. Pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des durées testées et les différents types de barreaux, nous pouvons comparer les tendances observées. Ainsi, l'oléamide ne présente pas le même comportement suivant le barreau utilisé. En effet, avec le barreau BAB, le composé a tendance à être de plus en plus extrait avec l'augmentation de la durée de désorption jusqu'à atteindre un seuil. En revanche, avec le barreau BAW 1 et le barreau BAW 2, son extraction semble stable quelle que soit la durée de désorption. Pour l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, la tendance observée est différente pour chaque barreau. En effet, avec le barreau BAB, le rendement d'extraction est stable, puis augmente en continu. Avec le barreau BAW 1, les réponses sont stables. Enfin, avec le barreau BAW 2, le rendement d'extraction diminue puis se stabilise. Pour ces composés, les tendances observées sont différentes selon le type de barreaux utilisé, probablement en raison de la polarité des composés, de leur structure tridimensionnelle ou encore du type d'interactions entre les composés et la phase polymère des barreaux.

Par comparaison des rendements d'extraction optimaux obtenus pour chaque type de barreaux, il n'y a pas de différence significative pour l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque. Quant à l'oléamide, les rendements sont similaires pour les BAWs alors qu'avec les BAB ils sont inférieurs. Ainsi, ce composé a plus d'affinité pour les phases polymères des BAWs. Dans ce cas, les BAWs sembleraient avoir plus d'affinité avec les composés les plus apolaires. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque n'a pas autant d'affinité pour les barreaux BAWs en raison d'un possible encombrement de sa structure qui engendrerait moins de liaisons.

La comparaison de ces résultats a permis de démontrer que de nombreux paramètres renaient en compte dans l'extraction et que la durée de désorption dépendait des molécules d'intérêt mais également des différentes phases de polymères recouvrant les types de barreaux ce qui complexifie l'établissement de corrélations.

#### II.4.3.4. Optimisation de la durée de l'étape d'adsorption

Le dernier paramètre à optimiser pour l'extraction est la durée d'adsorption, puisqu'il s'agit du paramètre, *a priori*, le plus influant. En effet, étant donné que l'extraction repose sur un équilibre, après une durée d'adsorption optimale, l'extraction ne varie plus

significativement. Il s'agit du paramètre le plus étudié dans la littérature. Cependant, il peut être étudié à différentes étapes de l'optimisation. Généralement, ce facteur est le dernier à être optimisé (Bratkowska *et al.*, 2011; Gilart *et al.*, 2013). Selon les analyses effectuées, les durées d'adsorption varient de plusieurs minutes jusqu'à quelques heures (Gilart *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015), pouvant aller jusqu'à 24h (Camino-Sánchez *et al.*, 2012). Afin de minimiser, le temps d'analyse, nous avons choisi de tester des durées inférieures à 1 h : 15, 30, 45 et 60 min. Ce paramètre a été optimisé avec des conditions de désorption optimales pour chaque type de barreaux artisanaux.

Pour les barreaux BAB, les valeurs de CVs étaient inférieures ou égales à 30 % pour six, neuf, 12 et neuf substances ciblées avec, respectivement, 15, 30, 45 et 60 min. Parmi les composés extraits avec des CVs satisfaisants, un, trois, quatre et six d'entre eux étaient extraits majoritairement au bout de, respectivement, 15, 30, 45 et 60 min. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 13. Par conséquent, le choix de la durée de l'étape d'adsorption s'est porté sur 45 min. En effet, il s'agit de la durée qui permet d'obtenir le maximum de composés avec des réponses répétables. Parmi ces molécules, seules quatre d'entre elles obtiennent des rendements maxima. Cependant, les rendements d'extraction ne sont pas significativement différents selon les durées de désorption, comme l'illustre la Figure II-31. Celle-ci représente les rendements d'extraction en fonction des durées d'adsorption pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des durées. Nous distinguons trois tendances selon les substances. En effet, trois composés (le chimassorb 81, le tinuvin 326 et le tinuvin 328) obtiennent des rendements d'extraction de plus en plus importants, d'après les conditions testées avec l'augmentation de la durée d'adsorption ; contrairement au triphénylphosphate qui présente la tendance inverse. Quant à l'oléamide, les rendements d'extraction de ce dernier semble être constants quelle que soit la durée d'adsorption testée.

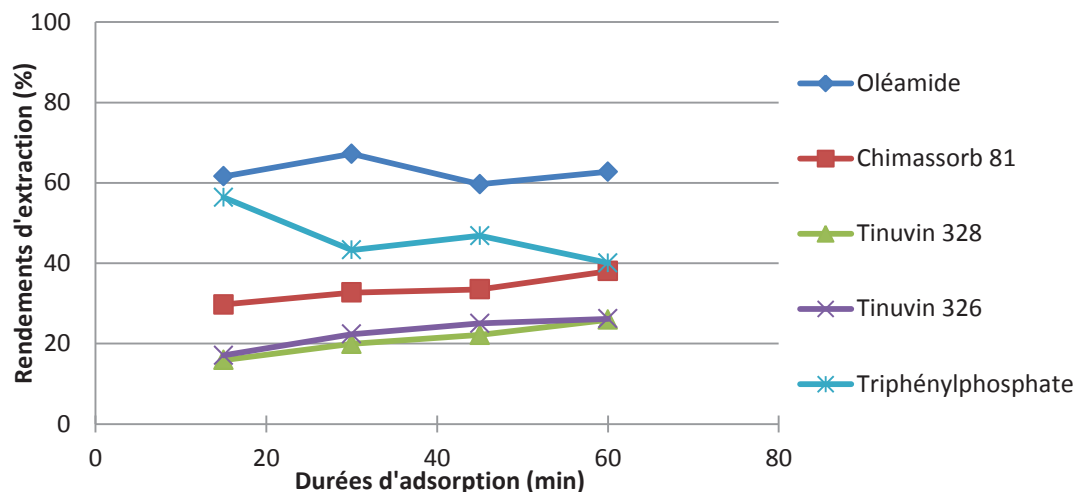


Figure II- 31 : Influence de la durée d'adsorption sur les rendements d'extraction pour cinq composés avec les BAB

Pour les barreaux BAW 1, les valeurs de CVs étaient inférieures ou égales à 30 % pour 14, 14, 16 et 19 substances ciblées avec, respectivement, 15, 30, 45 et 60 min. Parmi les composés extraits avec des CVs satisfaisants, un, quatre, deux et 11 d'entre eux étaient extraits majoritairement au bout de, respectivement, 15, 30, 45 et 60 min. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 14. Par conséquent, le choix de la durée de l'étape d'adsorption s'est porté sur 60 min. En effet, il s'agit de la durée qui permet d'obtenir le maximum de composés avec des réponses répétables. De plus, la majorité des composés, ayant eu des réponses répétables, obtiennent des rendements d'extraction maxima au bout de 60 min d'adsorption. Parmi ces molécules, seulement trois obtiennent des rendements d'extraction significativement différents suivant la durée d'adsorption. Il s'agit de la vitamine E, le cyasorb UV 9 et le naugard DLTDP. La Figure II-32 illustre les rendements d'extraction obtenus en fonction des durées d'adsorption pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des durées. Nous distinguons cinq tendances selon les substances. En effet, pour la majorité des composés représentés sur la Figure II-32 par le 2,4-di-terbutyl-phénol et l'oléamide, leurs rendements d'extraction ne semblent pas être influencés par la durée d'adsorption testée. Nous observons que deux composés (le naugard DLTDP et l'irganox 1330) sont extraits de plus en plus avec l'augmentation de la durée d'adsorption. Le cyasorb UV 9 présente des réponses très variables. En effet, dans un premier temps, son rendement d'extraction augmente jusqu'à 30 min puis diminue jusqu'à 45 min avant d'augmenter une nouvelle fois jusqu'à 60 min, atteignant ainsi le rendement maximal dans les conditions testées. Le naugard DLTDP a un rendement d'extraction maximal dans les conditions testées au bout de 30 min, avant de diminuer continuellement jusqu'à 60 min.

Quant au tinuvin 328, comme au tinuvin 326, nous observons une diminution de leur réponse jusqu'à 30 min, puis une augmentation jusqu'à 60 min. Néanmoins, les différences de rendements d'extraction des molécules sont négligeables, excepté pour la vitamine E, le cyasorb UV 9 et le naugard DLTDP. Une hypothèse peut être émise pour corrélérer les durées d'adsorption optimales aux différents composés. Celle-ci se résume au fait que les composés les plus apolaires et ayant une plus forte affinité pour la phase polymère que pour l'eau subissent une adsorption plus rapide et aient besoin de moins de temps pour être adsorbés de façon optimale. Cette hypothèse n'est pas vérifiée. En effet, le naugard DLTDP et la vitamine E qui ont des polarités similaires devraient avoir la même durée d'adsorption optimale, mais ce n'est pas le cas. Il est possible que la vitamine E et le naugard DLTDP aient des structures encombrées rendant les interactions avec la phase polymère plus difficile et donc plus longue à s'établir. En revanche, le cyasorb UV 9 étant plus polaire que les deux autres composés, il est adsorbé de façon optimale au bout de 60 min, ce qui corrobore l'hypothèse proposée précédemment pour ce composé.

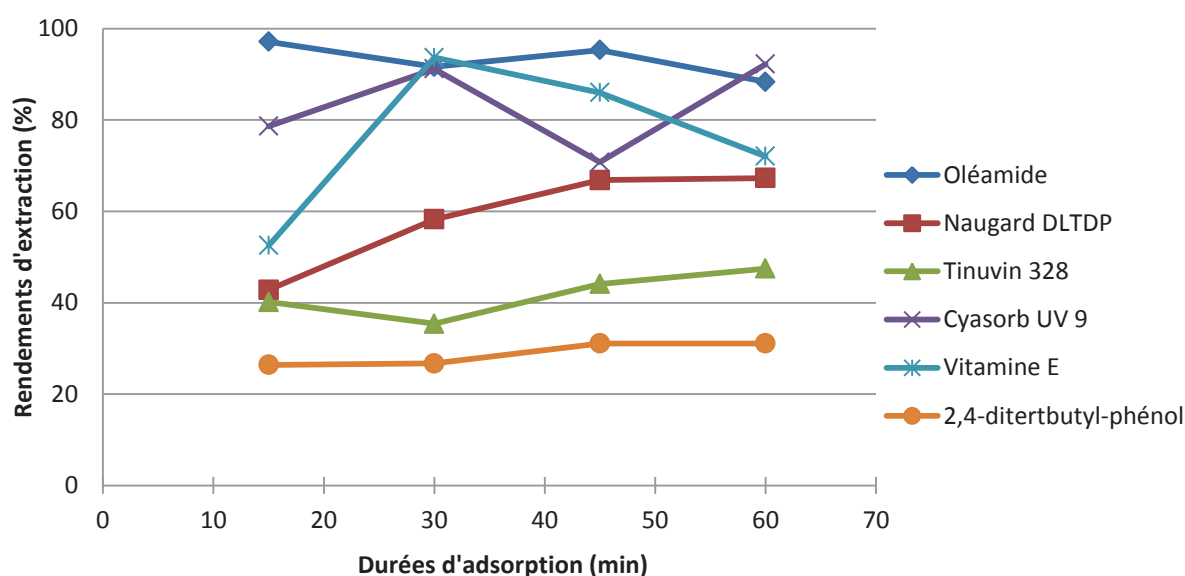


Figure II- 32 : Influence de la durée d'adsorption sur les rendements d'extraction pour six composés avec les BAW 1

Pour les barreaux BAW 2, les valeurs de CVs étaient inférieures ou égales à 30 % pour huit, 16, 12 et 10 substances ciblées avec, respectivement, 15, 30, 45 et 60 min. Parmi les composés extraits avec des CVs satisfaisants, six, huit et quatre d'entre eux étaient extraits majoritairement au bout de, respectivement, 30, 45 et 60 min. Les résultats sont répertoriés en annexe dans le Tableau A- 15. Par conséquent, le choix de la durée de l'étape d'adsorption s'est porté sur 30 min. En effet, il s'agit de la durée qui permet d'obtenir le maximum de



composés avec des réponses répétables. Parmi ces molécules, l'une d'entre elles montre un rendement d'extraction significativement différent suivant la durée d'adsorption. Il s'agit du chimassorb 81. La Figure II-33 illustre les rendements d'extraction obtenus en fonction des durées d'adsorption pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des durées. Parmi ces composés, chacun présente une tendance différente. En effet, le triphénylphosphate fournit des réponses constantes sur l'ensemble des durées testées. Le cyasorb UV 9 présente une augmentation de son rendement d'extraction jusqu'à 30 min, puis une diminution jusqu'à 60 min. Nous observons le phénomène inverse pour l'oléamide, à savoir une diminution de son rendement d'extraction jusqu'à 30 min, puis une augmentation jusqu'à 60 min. Cependant, l'irganox 1010, le chimassorb 81 et le 2,4-di-tertbutyl-phénol présentent des tendances similaires, à savoir, des rendements d'extraction croissants jusqu'à 45 min, avant de diminuer jusqu'à 60 min. Néanmoins, comme les rendements d'extraction des molécules ne sont pas significativement différents, excepté pour le chimassorb 81, il est difficile d'établir une corrélation entre les durées d'adsorption optimales et la nature des composés. Toutefois, comme pour les barreaux BAB, une hypothèse peut être émise en rapport avec la polarité. En effet, il est possible que les composés les plus apolaires aient besoin de peu de temps pour être adsorbés de façon optimale. Ainsi, les composés étant plus polaires que le chimassorb 81 auraient une durée d'adsorption optimale, d'après les conditions testées, supérieure à celle de ce composé ; et inversement les composés plus apolaires que le chimassorb 81 auraient une durée d'adsorption optimale, d'après les conditions testées, inférieure à celle de ce dernier. Cependant, il est également possible que d'autres paramètres puissent expliquer ces tendances comme les structures tridimensionnelles des composés ou encore la répétabilité des interactions entre les molécules d'intérêt et la phase polymère.

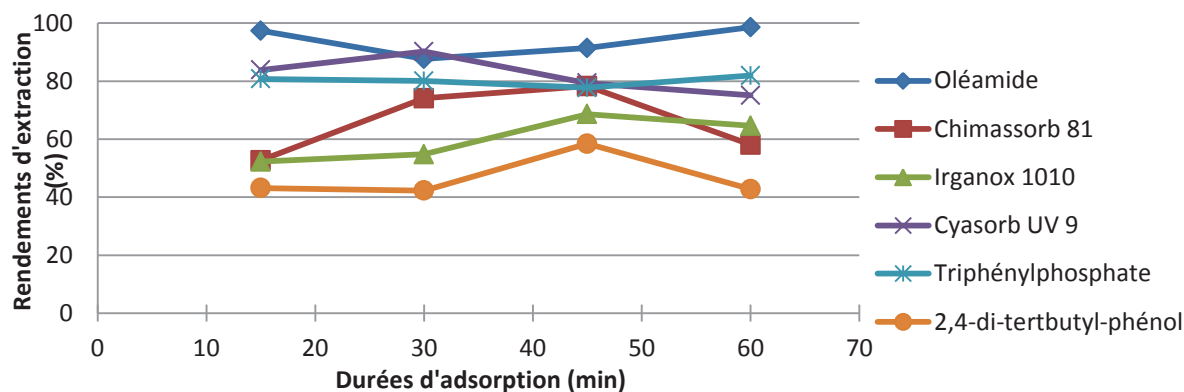


Figure II- 33 : Influence de la durée d'adsorption sur les rendements d'extraction pour six composés avec les BAW 2

Pour l'optimisation de la durée d'adsorption, le choix de cette dernière s'est majoritairement appuyé sur le nombre de molécules ayant eu des réponses répétables. Pour tous les types de barreaux, les rendements d'extraction n'ont pas eu d'influence sur le choix du paramètre optimal. En effet, très peu de différences significatives ont été observées au niveau des rendements d'extraction. Pour les composés ayant eu des réponses répétables pour l'ensemble des durées testées et les différents types de barreaux, nous pouvons comparer les tendances observées. Ainsi, le triphénylphosphate présente le même comportement d'un type de barreaux à un autre : ce composé a tendance à être extrait de façon plus ou moins stable suivant la durée d'adsorption. En effet, les rendements d'extraction ne sont pas significativement différents en fonction des durées d'adsorption selon un type de barreaux défini. Le même phénomène est observé pour l'oléamide. Pour le chimassorb 81, les réponses sont stables avec les barreaux BAB et BAW 1. En revanche avec les barreaux BAW 2, les meilleurs rendements sont obtenus au bout de 30 et 45 min d'adsorption. De plus, les différences de ces derniers ne sont pas négligeables.

Arrivant au terme de l'optimisation, nous pouvons comparer les rendements d'extraction en fonction des types de barreaux dans les conditions optimales d'extraction. Ainsi, le triphénylphosphate et l'oléamide obtiennent des rendements d'extraction très similaires avec les barreaux BAWs (le triphénylphosphate  $\approx$  80 % ; l'oléamide  $\approx$  90 %), tandis qu'ils sont nettement inférieurs avec les barreaux BAB (le triphénylphosphate = 47 % ; l'oléamide = 60 %). Pour le chimassorb 81, les rendements d'extraction sont très différents d'un type de barreaux à l'autre (BAB = 34 % ; BAW 1 = 55 % ; BAW 2 = 78 %). Ainsi, l'affinité de ces composés avec les différents barreaux est plus ou moins forte. Le triphénylphosphate et l'oléamide ont des polarités proches et leurs rendements d'extraction obtenus par les différents barreaux reflètent les mêmes tendances. En effet, ils sont mieux extraits par les barreaux BAWs. Le même phénomène est visible pour le chimassorb 81 qui est extrait majoritairement par les barreaux BAWs, puis moins extrait par les barreaux BAB. Ainsi, la même tendance devrait être observée pour les composés avec des  $\log K_{o/w}$  compris entre 4,6 (triphénylphosphate) et 6,7 (chimassorb 81), comme le 2,4-ditertbutyl-phénol, l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque, le tinuvin 622, le tinuvin 327, le tinuvin 328, le tinuvin 326 et le glycérol monostéarate. Cette plus forte affinité des composés pour les barreaux BAWs pourrait s'expliquer par les structures des monomères constituant les barreaux artisanaux (Tableau II-4). En effet, il semblerait que les barreaux BAB soient le type de barreaux le plus polaire de par leur nombre de groupements Si-O et Si-H dans les monomères de départ. Cependant, les quantités de monomères dans chaque produit ne sont

pas connues, ce qui signifie également que le nombre réel de groupements Si-O et Si-H dans chaque polymère n'est pas estimable. Cette affinité pourrait aussi s'expliquer par les structures tridimensionnelles des composés et l'étude des interactions entre ces derniers et les phases polymères.

Ainsi, la comparaison des réponses obtenues pour ces additifs plastiques a permis de mettre en évidence que les barreaux fabriqués extrayaient différemment les substances ciblées. Les composés d'intérêt présents dans un échantillon d'eau sont majoritairement extraits par les barreaux BAW 2.

#### II.4.4. Application à l'urine

##### II.4.4.1. Efficacité de l'extraction

Après avoir optimisé l'extraction des substances ciblées dans l'eau avec chaque type de barreaux fabriqué au laboratoire, nous avons pu appliquer ces extractions à un échantillon d'urine dopée. L'objectif était de démontrer que nos barreaux permettaient d'extraire des additifs plastiques dans une matrice biologique aqueuse, telle que l'urine. L'échantillon d'urine utilisé a été dopé de la même façon que pour l'optimisation de l'extraction dans l'eau. Afin de comparer l'efficacité de l'extraction avec nos barreaux dans l'urine, le protocole a été appliqué simultanément à l'eau. Les extractions ont été réalisées en triplicat dans chaque échantillon de façon à pouvoir évaluer la répétabilité. Le Tableau II-12 représente les rendements d'extraction déterminés pour chaque molécule dans l'eau et dans l'urine avec les trois types de barreaux SBSE.

Tableau II- 12 : Rendements d'extraction obtenus pour les additifs plastiques ciblés dans l'eau dopée et dans l'urine dopée après extraction avec les barreaux BAB, BAW 1 et BAW 2 (n = 3)

CV < 30 %	Rendements d'extraction (%)					
31 % < CV < 50 %	BAB		BAW 1		BAW 2	
CV > 50 %	Eau	Urine	Eau	Urine	Eau	Urine
Tinuvin 622	0,2	1,0	20,4	38,1	10,3	10,0
Cyasorb UV 9	48,2	52,7	78,1	69,0	88,6	71,9
Triphénylphosphate	40,6	44,5	80,1	83,1	90,4	81,7
Hostanox 03	10,6	2,9	54,1	7,5	33,0	9,6
Oléamide	52,6	50,4	86,1	80,7	102,5	79,3
Chimassorb 81	22,5	17,7	54,2	22,1	61,3	21,9
Glycérol monostéarate						
Isonox 129						
Tinuvin 326	21,4	19,2	55,5	21,3	64,0	30,8
Irganox 3114						
Tinuvin 327	21,4	10,3	44,6	10,5	50,5	11,6
Tinuvin 328	20,5	9,1	40,3	8,4	53,8	12,8
Vitamine E	37,2	25,9	111,3	29,3	65,2	57,3
Irganox 1010	17,7	19,4	56,9	23,0	77,1	13,1
Irganox 1330	32,0	25,8	56,1	12,7	54,0	14,1
Naugard DLTD	40,4	32,5	49,2	89,8	49,8	38,9
Irganox 1076						
Irgafos 168	14,4	8,3	32,8	4,2	1,4	0,5
Naugard DSTDP	156,8	205,7	65,3	10,2	104,2	52,4
Diphényl phosphate	0,6	0,7	1,0	1,9	0,5	1,7
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	44,2	12,7	54,4	17,1	67,4	13,3
2,4-di-tertbutyl-phénol	65,4	52,0	76,5	58,7	82,1	38,2

Pour les barreaux BAB, nous constatons que pour la totalité des composés ayant obtenu des réponses répétables, il n'y a pas de différence significative des rendements d'extraction sur l'eau et sur l'urine, excepté pour l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque. En effet, ce composé est extrait à plus de 40 % dans l'eau contre seulement environ 10 % dans l'urine. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il y a une compétition au niveau de l'extraction entre l'analyte et un ou des interférent(s) de l'urine.

Pour les barreaux BAW 1, nous constatons que pour la totalité des composés ayant obtenu des réponses répétables, soit pour 11 composés, il y a une différence significative des

rendements d'extraction calculés à partir des échantillons d'eau et d'urine dopées, sauf pour le triphénylphosphate. En effet, pour la majorité de ces composés, nous notons un rendement d'extraction plus important sur l'eau. Le triphénylphosphate a, quant à lui, un rendement d'extraction dans l'urine légèrement plus élevé que dans l'eau. L'hypothèse d'une compétition au niveau de l'extraction entre ces 11 analytes et des interférents de l'urine peut alors être émise.

Pour les barreaux BAW 2, nous constatons que pour la totalité des composés ayant obtenu des réponses répétables, soit pour huit composés, il y a une différence significative entre les rendements d'extraction obtenus à partir des échantillons d'eau et d'urine dopées, sauf pour trois composés (la vitamine E, le triphénylphosphate, et le cyasorb UV 9). Pour l'ensemble de ces composés, nous notons un rendement d'extraction plus important sur l'eau. De ce fait, l'hypothèse d'une compétition au niveau de l'extraction entre ces huit analytes et des interférents de l'urine peut alors être émise. Sur ces huit composés, six d'entre eux ont eu le même comportement avec l'extraction à partir des BAW 1.

D'après ces résultats, nous pouvons comparer l'efficacité d'extraction de chaque barreau sur les molécules ayant obtenu des réponses répétables dans l'eau et dans l'urine avec les trois types de barreaux. La Figure II-34 représente ces données après extraction dans un échantillon d'eau dopée sous forme de diagramme. Ainsi, nous observons que les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus avec les barreaux BAWs, excepté pour l'irganox 1330. Cependant, il n'y a pas de différence significative des rendements obtenus après extraction de l'ensemble des composés par les barreaux BAW 1 et les barreaux BAW 2. Ainsi, nous en concluons qu'il y a une plus forte affinité entre la phase d'extraction des barreaux BAWs et les analytes. Les structures des monomères constituant les barreaux artisanaux (Tableau II-4) peuvent expliquer cette affinité. En effet, il semblerait que les barreaux BAB soient plus polaires que les barreaux BAWs de par leur nombre de groupements Si-O et Si-H. Néanmoins, le nombre de ces groupements dans chaque produit n'est pas connu. Il semblerait donc que l'additif C, constituant les barreaux BAW 2, n'ait que très peu d'impact sur l'extraction des composés d'intérêt.

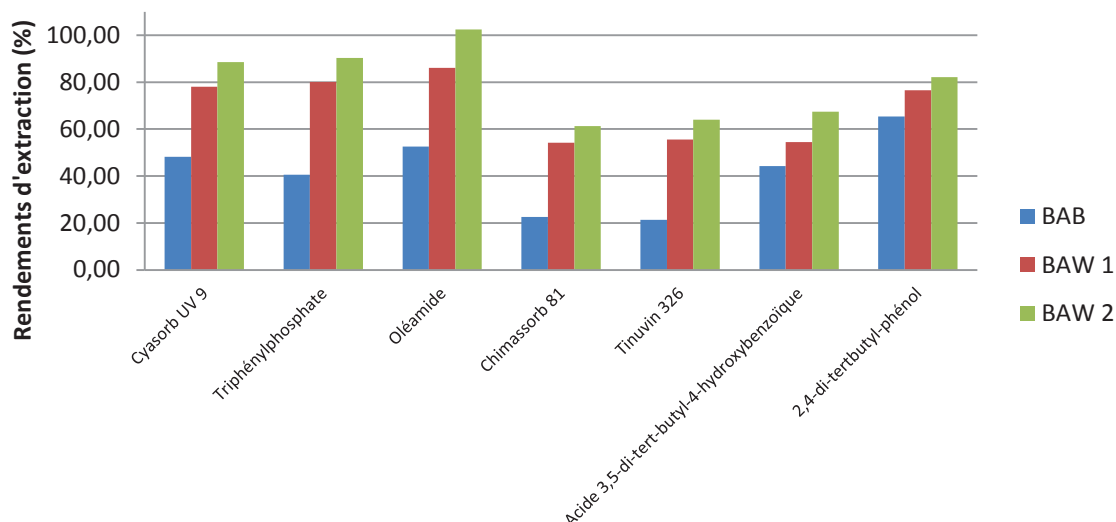


Figure II- 34 : Rendements d'extraction des composés, avec des réponses répétables, contenus dans un échantillon d'eau dopée en fonction du type de barreaux SBSE utilisé

De la même façon, la Figure II-35 représente les rendements d'extraction des molécules ayant obtenu des réponses répétables après extraction dans un échantillon d'urine dopée. Nous remarquons une nouvelle fois que les rendements d'extraction entre les BAWs sont similaires, sauf pour le 2,4-di-tertbutyl-phénol. Comme pour l'échantillon d'eau dopée, nous observons que les barreaux BAWs permettent d'extraire les composés d'intérêt de façon plus performante que les barreaux BAB. Cependant, ce phénomène est moins net, notamment pour le chimassorb 81, le tinuvin 326, l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque et le 2,4-di-tertbutyl-phénol. Ainsi, comme dit précédemment, il est probable que les barreaux BAWs soient plus apolaires que les barreaux BAB, ce qui expliquerait les meilleurs rendements d'extraction obtenus pour la majorité des composés.

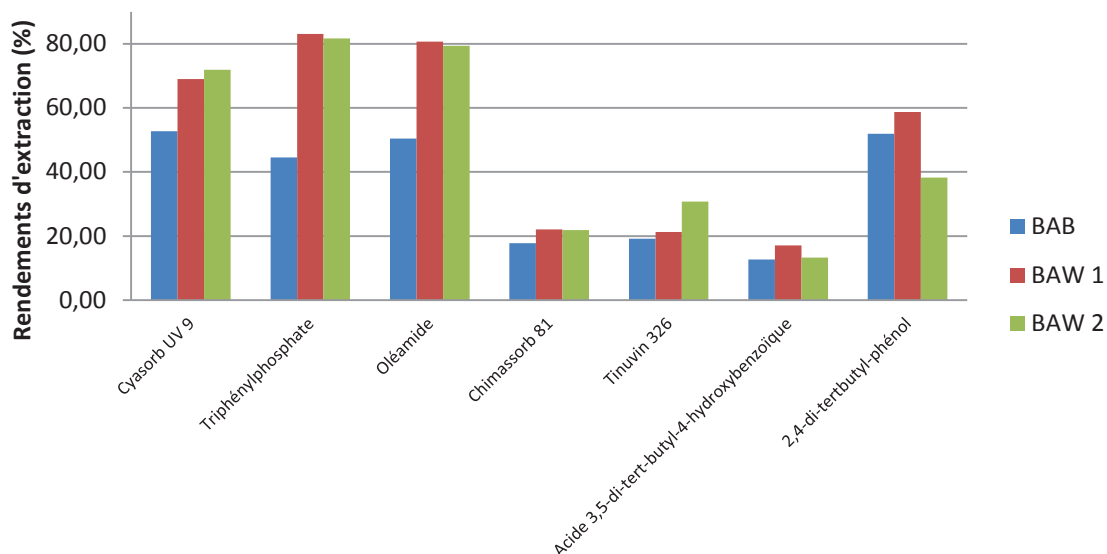


Figure II- 35 : Rendements d'extraction des composés, avec des réponses répétables, contenus dans un échantillon d'urine dopée en fonction du type de barreaux SBSE utilisé

Ainsi, suite à l'optimisation des extractions d'additifs plastiques dans l'eau et l'urine à partir de trois types de barreaux artisanaux SBSE, la comparaison des rendements d'extraction obtenus a permis de définir quel type de barreaux permettait d'extraire majoritairement les composés. Il s'agit des barreaux BAWs qui permettent l'obtention de rendements d'extraction relativement identiques.

#### II.4.4.2. Détermination des effets de matrice

Les différences de rendements d'extraction observées entre l'extraction dans l'eau et celle dans l'urine sont probablement dues à des interactions entre les analytes et des interférents de l'urine.

L'urine étant une matrice complexe, des effets de matrice sont également probablement présents. C'est pourquoi, ces derniers ont été évalués. En effet, les effets de matrice sont un phénomène ayant pour conséquence l'augmentation ou l'inhibition du signal en spectrométrie de masse, engendrés le plus fréquemment par l'échantillon à analyser. Cependant, étant donné que les barreaux artisanaux relarguent un excès de phase, à savoir des dérivés de polydiméthylsiloxane, nous pouvons considérer qu'ils peuvent apporter également un effet de matrice. Nous distinguons alors deux effets de matrice, celui de l'urine et celui engendré par le barreau. L'effet de matrice de l'urine seule n'est pas évaluable avec cette méthode, mais nous avons pu évaluer l'effet de matrice global du barreau et de l'urine, ainsi que l'effet de matrice du barreau seul. Le calcul de l'effet de matrice engendré par le barreau est présenté dans l'Equation II-7. Celui-ci est déterminé par le rapport de la réponse obtenue

après injection d'un échantillon d'eau « dopée après » extrait sur la réponse obtenue par un standard. Le standard correspond à la solution de dopage évaporée dans le solvant optimal de désorption. Le standard n'a donc pas subi l'extraction et n'a pas été en contact avec le barreau d'extraction. Le calcul de l'effet de matrice engendré par le barreau ainsi que par la matrice est présenté dans l'Equation II-8. Celui-ci est déterminé par le rapport de la réponse obtenue après injection d'un échantillon d'urine « dopée après » extrait sur la réponse obtenue par un standard. Les calculs d'effets de matrice sont donc indépendants de l'efficacité de l'extraction. Afin d'obtenir un effet de matrice moyen, nous avons calculé trois effets de matrice suivant les triplicats réalisés pour les extractions des échantillons « dopés après » et les standards, et ce sur une seule concentration, la concentration utilisée pour l'ensemble du développement et de l'optimisation.

$$Effet\ de\ matrice_{Barreau} = \left( \left( \frac{Réponse\ "dopée\ après"\ eau}{Réponse\ standard} \right) - 1 \right) \times 100$$

Equation II- 7 : Calcul de l'effet de matrice du barreau d'extraction SBSE

$$Effet\ de\ matrice_{Barreau+urine} = \left( \left( \frac{Réponse\ "dopée\ après"\ urine}{Réponse\ standard} \right) - 1 \right) \times 100$$

Equation II- 8 : Calcul de l'effet de matrice du barreau d'extraction SBSE et de la matrice urinaire

Les effets de matrice concernant l'extraction avec les barreaux BAB sont présentés dans la Figure II-36. Seuls les composés ayant obtenu des réponses répétables sont exploités. Les effets de matrice s'étendent de -67 % (irganox 1330) à 224 % (tinuvin 326) pour l'effet du barreau seul, et de -75 % (irganox 1330) à 230 % (tinuvin 326) pour l'effet du barreau et de la matrice urinaire. Nous constatons que quatre molécules ont subi un effet de matrice négatif que ce soit par l'effet du barreau seul ou par l'effet global du barreau et de l'urine. Cinq autres composés présentent un effet de matrice positif du barreau seul et du barreau et de l'urine. Pour le cyasorb UV 9, nous constatons pour les deux effets de matrice évalués des phénomènes opposés, à savoir un effet de matrice du barreau positif et un effet de matrice global du barreau et de l'urine négatif. Les barreaux BAB présentent bien un effet de matrice sur la plupart des composés. De plus, l'évaluation des effets de matrice dus aux barreaux BAB mais aussi à une matrice urinaire a permis de mettre en évidence que les barreaux et l'urine pouvaient engendrer des effets antagonistes.



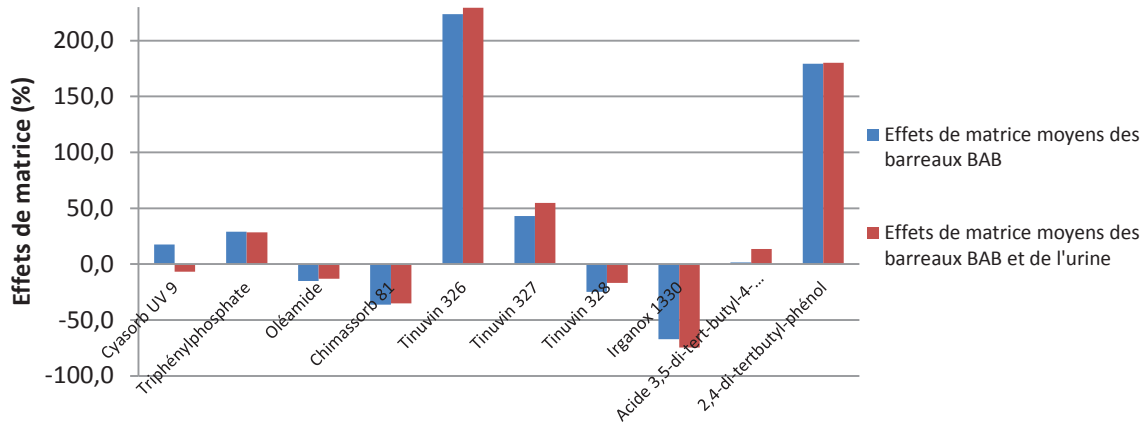


Figure II- 36 : Effets de matrice des composés extraits, avec des réponses répétables, dans l'eau et dans l'urine par les barreaux BAB

Les effets de matrice concernant l'extraction avec les barreaux BAW 1 sont présentés dans la Figure II-37. Seuls les composés ayant obtenu des réponses répétables sont exploités. Les effets de matrice s'étendent de -94 % (irganox 1330) à 164 % (2,4-di-terbutyl-phénol) pour l'effet du barreau seul, et de -94 % (irganox 1330) à 172 % (2,4-di-terbutyl-phénol) pour l'effet du barreau et de la matrice urinaire. Nous constatons que cinq molécules ont subi un effet de matrice négatif que ce soit par l'effet du barreau seul, ou par l'effet global du barreau et de l'urine. Six autres composés présentent un effet de matrice positif du barreau seul et du barreau et de l'urine. Nous constatons des effets de matrice sur les 11 composés ayant obtenu des différences significatives de rendements d'extraction entre l'eau et l'urine.

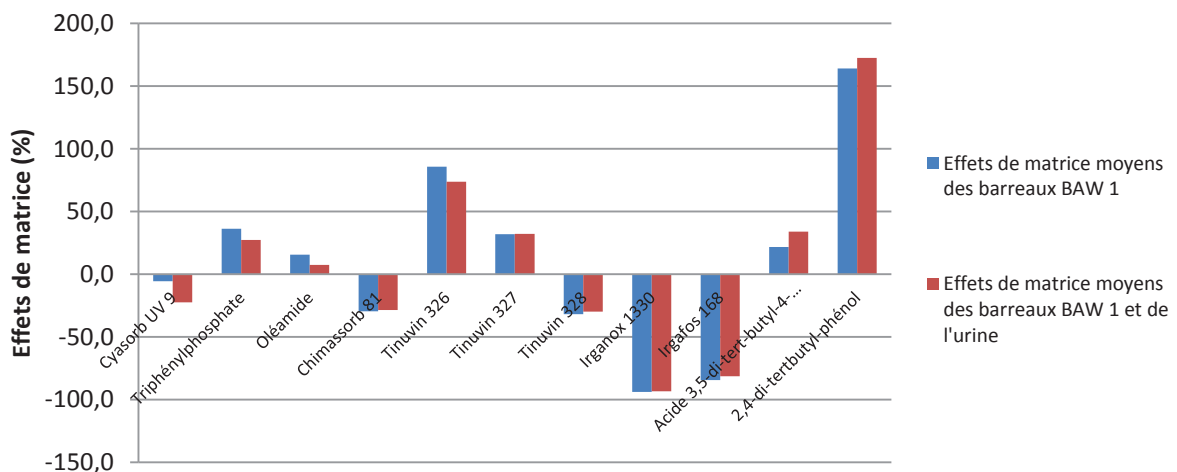


Figure II- 37 : Effets de matrice des composés extraits, avec des réponses répétables, dans l'eau et dans l'urine par les barreaux BAW 1

Les effets de matrice concernant l'extraction avec les barreaux BAW 2 sont présentés dans la Figure II-38. Seuls les composés ayant obtenu des réponses répétables sont exploités pour l'évaluation des effets de matrice. Ces derniers s'étendent de -93 % (vitamine E) à 57 % (2,4-di-tertbutyl-phénol) pour l'effet du barreau seul et de -95 % (vitamine E) à 96 % (2,4-di-tertbutyl-phénol) pour l'effet du barreau et de la matrice urinaire. Nous constatons que cinq molécules ont subi un effet de matrice négatif, que ce soit par l'effet du barreau seul, ou par l'effet global du barreau et de l'urine. Trois autres composés présentent un effet de matrice positif du barreau seul et du barreau et de l'urine. Nous constatons des effets de matrice sur les huit composés ayant des différences significatives de rendements d'extraction entre l'eau et l'urine mais aussi sur les trois autres molécules.

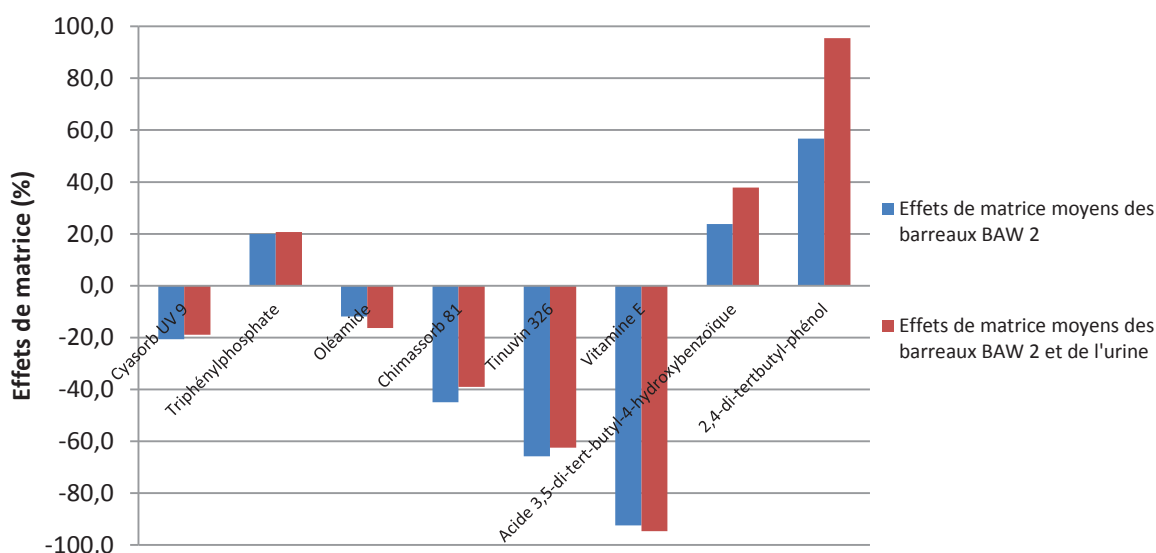


Figure II- 38 : Effets de matrice des composés extraits, avec des réponses répétables, dans l'eau et dans l'urine par les barreaux BAW 2

Ainsi, nous en concluons que les barreaux artisanaux provoquent bien des effets de matrice sur les substances ciblées. De plus, si nous comparons ces effets obtenus pour un composé définis selon les barreaux d'extraction utilisés, ils sont différents pour certains composés. En effet, les effets de matrice de l'oléamide sont positifs avec les barreaux BAW 1 tandis qu'ils sont négatifs avec les barreaux BAB et BAW 2. Encore une fois, nous avons démontré que les trois types de barreaux artisanaux étaient bien différents dans leur efficacité à extraire les composés mais aussi sur les effets de matrice qu'ils pouvaient engendrer.

Les effets de matrice des barreaux SBSE sont connus et reconnus. En effet, ils constituent l'une des principales limites de ce type d'extraction (Camino-Sánchez *et al.*, 2014). Cependant, des solutions existent afin de réduire significativement ces effets. La façon

la plus simple est de diluer l'échantillon. Mais, il est possible aussi d'utiliser des standards internes afin de corriger ces effets de matrice, notamment lors de quantifications. Bien que cette dernière solution soit la plus onéreuse, il s'agit de la plus optimale. Par conséquent, il s'agit d'un point important à améliorer avant de continuer vers une possible quantification et validation de méthode.

#### II.4.5. Evaluation de l'extraction avec des barreaux commerciaux

La dernière étape de cette étude consistait à évaluer l'efficacité des extractions optimisées sur les 22 additifs plastiques sélectionnés dans l'urine à partir de barreaux commerciaux, appelés Twisters<sup>®</sup>. Pour ce faire, nous avons choisi des barreaux SBSE de la société Gerstel ayant des dimensions similaires aux barreaux que nous fabriquons. Les Twisters<sup>®</sup> ont été conditionnés par désorption thermique 30 min sous flux d'azote à 230 °C avant la première utilisation et entre chaque extraction. Ainsi, nous avons comparé les performances d'extraction des barreaux artisanaux et des Twisters<sup>®</sup> dans les conditions optimales d'extraction déterminées pour chaque type de barreaux artisanaux. De ce fait, il faut noter que les conditions d'extraction appliquées aux Twisters<sup>®</sup> ne sont pas, *a priori*, les conditions optimales. Il ne s'agit donc pas d'une réelle comparaison mais d'essais préliminaires afin de vérifier si les barreaux artisanaux ont des performances d'extraction similaires à ce qu'il est possible d'obtenir avec des barreaux commerciaux. Afin d'entreprendre une véritable comparaison, une optimisation de l'extraction sur les 22 additifs plastiques sélectionnés dans l'urine à partir de Twisters<sup>®</sup> devra être réalisée. Les résultats obtenus sont présentés en annexe dans le Tableau A- 16.

Pour les barreaux BAB, nous constatons qu'il y a autant de molécules extraites de façon répétable avec les BAB qu'avec les Twisters<sup>®</sup>. De plus, pour la totalité des composés ayant obtenu des réponses répétables, les rendements d'extraction ne sont pas significativement différents, sauf pour quatre molécules. Ces résultats sont présentés dans la Figure II-39. En effet, l'oléamide et le chimassorb 81 ont des rendements d'extraction significativement plus élevés avec les BAB, tandis que le cyasorb UV 9 et le triphénylphosphate obtiennent des rendements d'extraction significativement plus élevés avec les Twisters<sup>®</sup>.

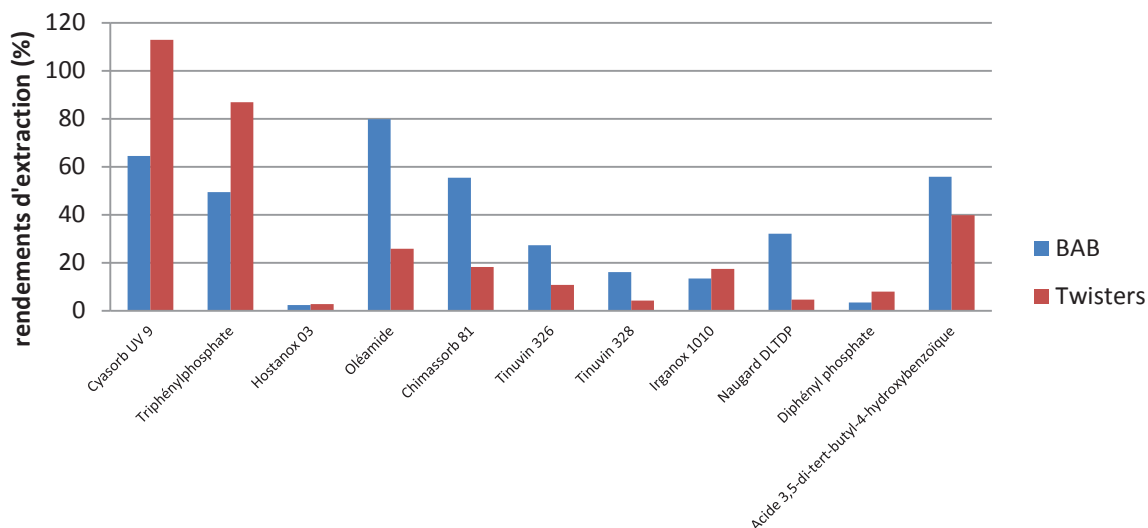


Figure II- 39 : Rendements d'extraction des composés extraits dans l'urine par les barreaux BAB et les barreaux commerciaux

Pour les barreaux BAW 1, nous constatons qu'une plus grande majorité de composés a obtenu des réponses répétables après extraction avec les Twisters®. En effet, 17 substances d'intérêt avaient des réponses répétables avec les Twisters® contre 11 avec les BAW 1. Parmi les composés ayant obtenu des réponses répétables (Figure II-40), les rendements d'extraction n'étaient pas significativement différents, sauf pour quatre molécules. En effet, l'oléamide, le naugard DLDP et l'acide 3,5-di-tert-butyl-4hydroxybenzoïque avaient des rendements d'extraction significativement supérieurs avec les BAW 1. Tandis que l'irganox 1076 avait un rendement d'extraction significativement supérieur avec les barreaux commerciaux.

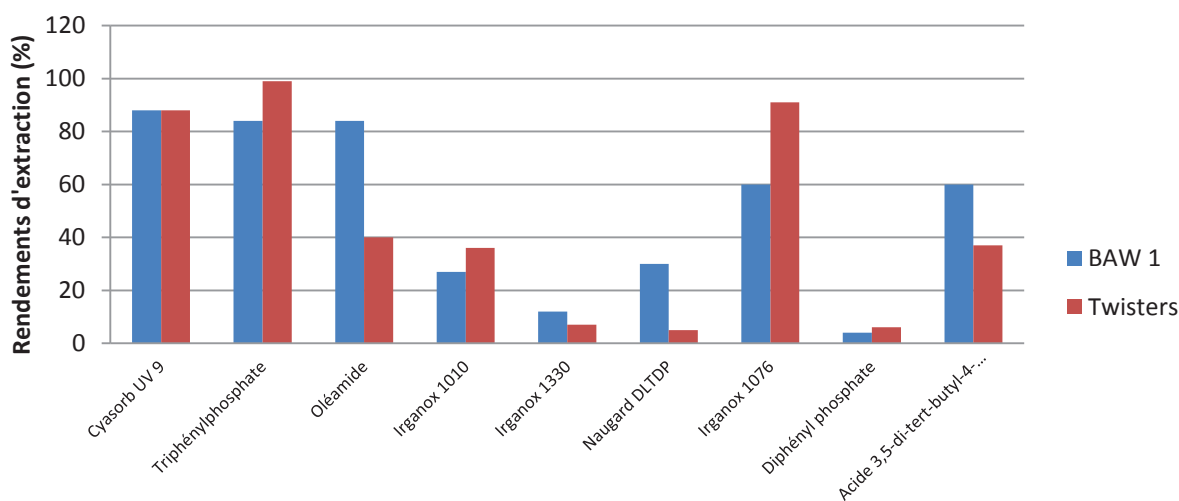


Figure II- 40 : Rendements d'extraction des composés extraits dans l'urine par les barreaux BAW 1 et les barreaux commerciaux

Pour les barreaux BAW 2, 11 et 13 molécules avaient des réponses répétables avec, respectivement, les barreaux artisanaux et les Twisters®. Parmi les composés ayant obtenu des réponses répétables (Figure II-41), les rendements d'extraction n'étaient pas significativement différents, sauf pour deux molécules. En effet, l'oléamide et le chimassorb 81 avaient des rendements d'extraction significativement supérieurs avec les BAW 2.

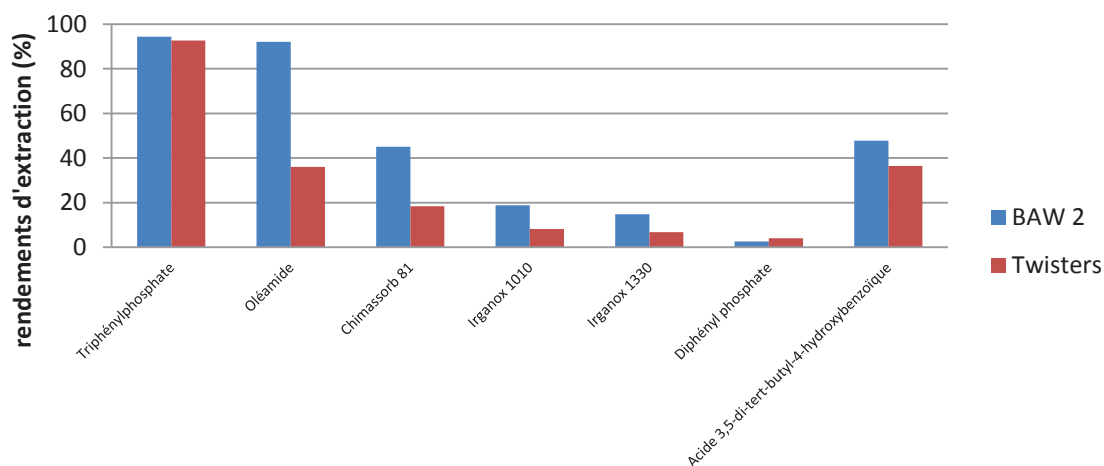


Figure II- 41 : Rendements d'extraction des composés extraits dans l'urine par les barreaux BAW 2 et les barreaux commerciaux

Malgré le fait que les extractions aient été réalisées dans des conditions, *a priori*, non optimales pour les Twisters®, cette évaluation a permis de mettre en évidence que nos barreaux artisanaux permettaient d'obtenir des rendements d'extraction et des valeurs de répétabilité du même ordre de grandeur que des barreaux commerciaux pour l'extraction de ces composés d'intérêt dans l'urine humaine. De plus, les résultats répétables obtenus pour l'oléamide démontrent que l'utilisation des barreaux artisanaux permet l'obtention de rendements d'extraction significativement meilleurs.

Si nous comparons les rendements d'extraction expérimentaux de notre étude, obtenus à l'aide des barreaux artisanaux, avec les données retrouvées dans la littérature, nous remarquons que les réponses obtenues sont bien inférieures à ce qu'il est possible d'obtenir. En effet, Carpinteiro *et al.* (Carpinteiro *et al.*, 2012) ont développé une méthode SBSE à partir de Twisters® pour l'extraction de filtres UV, dont notamment le tinuvin 326, le tinuvin 327 et le tinuvin 328 sur des eaux usées. Ils obtiennent des rendements d'extraction pour ces composés compris entre 25 et 62 % à partir d'eaux usées non traitées, ce qui est supérieur à ce que nous avons pu obtenir dans l'urine avec les barreaux artisanaux (16-27 %). De plus, les coefficients de variation sont également nettement moins satisfaisants avec notre méthode.

## II.5. Conclusion et perspectives

Nous avons développé et optimisé au cours de cette étude trois méthodes d'extraction de type SBSE de 22 additifs plastiques dans l'eau, suivie d'une analyse par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (UHPLC-MS/MS). Ces méthodes d'extraction se composent de toutes les étapes de la fabrication des barreaux de type SBSE jusqu'à leur utilisation. Lors de ce développement, nous avons fait face à de nombreux problèmes de répétabilité. De ce fait, plusieurs paramètres du protocole ont été remis en cause jusqu'à l'identification et la résolution de ces problèmes. En effet, un grand nombre de paramètres intervient lors de l'extraction, ce qui rend également son optimisation longue et complexe. Ayant optimisé chaque extraction sur une liste de 22 composés, des compromis analytiques ont dû être réalisés. Cependant, ces méthodes permettent des rendements d'extraction dans l'eau jusqu'à environ 65 % avec les barreaux BAB, jusqu'à 86 % avec les barreaux BAW 1 et jusqu'à 90 % avec les barreaux BAW 2.

Ensuite, ces méthodes ont été appliquées à des échantillons d'urines dopées avec les substances ciblées. Les rendements d'extraction atteignent 80 % avec les barreaux BAB, 88 % avec les barreaux BAW 1 et jusqu'à plus de 90 % avec les barreaux BAW 2. Ainsi, les additifs plastiques d'intérêt apolaires sont extraits de l'eau et de l'urine majoritairement avec les barreaux BAWs qui, d'après la structure des monomères les composant, sont plus apolaires que les barreaux BAB.

Suite à ces développements, des effets de matrice ont pu être calculés, notamment les effets de matrice engendrés par les barreaux artisanaux et par la matrice urinaire, qui se sont avérés non négligeables. Enfin, une évaluation des extractions avec des barreaux commerciaux a permis de mettre en évidence les similitudes au niveau des performances d'extraction avec nos barreaux artisanaux. Cependant, une optimisation de l'extraction de ces 22 additifs plastiques par les Twisters<sup>®</sup> devra être entreprise afin de réaliser une réelle comparaison des performances d'extraction de ces barreaux artisanaux et commerciaux.

Les méthodes d'extraction SBSE d'additifs plastiques développées dans cette étude ont permis de mettre en évidence leur facilité d'utilisation et leur efficacité. De plus, celles-ci ont l'avantage par rapport aux autres techniques d'extraction de ces composés, comme l'extraction sur phase solide (ou en anglais solid phase extraction, « SPE ») ou l'extraction par Soxhlet, de ne nécessiter que peu d'étapes et donc de réduire le contact au maximum entre l'opérateur et l'échantillon biologique ainsi que les sources de contamination. Les additifs plastiques sélectionnés sont donc extractibles par ces trois nouvelles phases à base de dérivés

de polydiméthylsiloxane par la technique SBSE, avec de meilleurs résultats obtenus pour les barreaux BAWs, sans aucune différence significative entre les BAW 1 et BAW 2.

## **Références bibliographiques**





- Arias, M., Penichet, I., Ysambertt, F., Bauza, R., Zougagh, M., Ríos, Á., 2009. Fast supercritical fluid extraction of low- and high-density polyethylene additives: Comparison with conventional reflux and automatic Soxhlet extraction. *J. Supercrit. Fluids* 50, 22–28. doi:10.1016/j.supflu.2009.04.012
- Armstrong, B.L., Senyurt, A.F., Narayan, V., Wang, X., Alquier, L., Vas, G., 2013. Stir bar sorptive extraction combined with GC–MS/MS for determination of low level leachable components from implantable medical devices. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 74, 162–170. doi:10.1016/j.jpba.2012.10.019
- Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J., Ravelo-Pérez, L.M., Rodríguez-Delgado, M.A., 2010. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 2307–2319. doi:10.1007/s00216-009-3440-2
- Balbão, M.S., Bertucci, C., Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H.C., Malfará, W.R., Dreossi, S.A.C., de Paula Mello, L., Queiroz, M.E.C., 2010. Rifampicin determination in plasma by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 1078–1083. doi:10.1016/j.jpba.2009.11.001
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C., 1999. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *J. Microcolumn Sep.* 11, 737–747. doi:10.1002/(SICI)1520-667X(1999)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4
- Barco-Bonilla, N., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Fernández-Moreno, J.L., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., 2011. Comprehensive analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 693, 62–71. doi:10.1016/j.aca.2011.03.010
- Bart, J.C.J., 2005. *Additives in Polymers: Industrial Analysis and Applications*. John Wiley & Sons.
- Bicchi, C., Iori, C., Rubiolo, P., Sandra, P., 2002. Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE), and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted Arabica coffee and coffee brew. *J. Agric. Food Chem.* 50, 449–459. doi:10.1021/jf010877x
- Bratkowska, D., Marcé, R.M., Cormack, P.A.G., Borrull, F., Fontanals, N., 2011. Development and application of a polar coating for stir bar sorptive extraction of emerging pollutants from environmental water samples. *Anal. Chim. Acta* 706, 135–142. doi:10.1016/j.aca.2011.08.028
- Cacho, J.I., Campillo, N., Viñas, P., Hernández-Córdoba, M., 2015. Determination of synthetic phenolic antioxidants in soft drinks by stir-bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 32, 665–673. doi:10.1080/19440049.2015.1011715
- Cacho, J.I., Campillo, N., Viñas, P., Hernández-Córdoba, M., 2013. Stir bar sorptive extraction with EG-Silicone coating for bisphenols determination in personal care products by GC–MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 78–79, 255–260. doi:10.1016/j.jpba.2013.02.023
- Cacho, J.I., Campillo, N., Viñas, P., Hernández-Córdoba, M., 2012. Stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the determination of bisphenols in canned beverages and filling liquids of canned vegetables. *J. Chromatogr. A* 1247, 146–153. doi:10.1016/j.chroma.2012.05.064
- Camino-Sánchez, F.J., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Santos-Fandila, A., Vilchez, J.L., 2014. Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends. *Talanta* 130, 388–399. doi:10.1016/j.talanta.2014.07.022
- Camino-Sánchez, F.J., Zafra-Gómez, A., Oliver-Rodríguez, B., Ruiz-Naranjo, I., Ruiz-García, J., Vilchez, J.L., 2012. Validation of a method for the determination of tributyltin in seawater by

- stir bar sorptive extraction–liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1263, 14–20. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.018
- Carpinteiro, I., Ramil, M., Rodríguez, I., Nogueira, J.M.F., 2012. Combining stir-bar sorptive extraction and large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of benzotriazole UV stabilizers in wastewater matrices. *J. Sep. Sci.* 35, 459–467. doi:10.1002/jssc.201100448
- Commission of the European Communities, 2002. Commission decision of 12 august 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- David, F., Sandra, P., 2007. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *J. Chromatogr. A, Advances in Sample Preparation Part I* 1152, 54–69. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.032
- David, F., Tienpont, B., Sandra, P., 2003. Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices. *LC-GC N. Am.* 21, 108–118.
- Ekvall, K., 2012. Development of LC-QTOF method for analysis of extracts from urinary catheters.
- European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, 2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANCO/12571/2013.
- Fan, W., Gao, M., He, M., Chen, B., Hu, B., 2015. Cyromazine imprinted polymers for selective stir bar sorptive extraction of melamine in animal feed and milk samples. *The Analyst* 140, 4057–4067. doi:10.1039/c5an00325c
- Fan, W., Mao, X., He, M., Chen, B., Hu, B., 2013. Stir bar sorptive extraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet/inductively coupled plasma mass spectrometry for analysis of thyroxine in urine samples. *J. Chromatogr. A* 1318, 49–57. doi:10.1016/j.chroma.2013.10.022
- Fernandes, C., Van Hoeck, E., Sandra, P., Lanças, F.M., 2008. Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography–mass spectrometry using stir bar sorptive extraction. *Anal. Chim. Acta* 614, 201–207. doi:10.1016/j.aca.2008.03.036
- Gilart, N., Miralles, N., Marcé, R.M., Borrull, F., Fontanals, N., 2013. Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determine pharmaceuticals and personal care products in environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 774, 51–60. doi:10.1016/j.aca.2013.03.010
- Guart, A., Calabuig, I., Lacorte, S., Borrell, A., 2014. Continental bottled water assessment by stir bar sorptive extraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-GC-MS/MS). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 2846–2855. doi:10.1007/s11356-013-2177-9
- Guerrero, E.D., Marín, R.N., Mejías, R.C., Barroso, C.G., 2006. Optimisation of stir bar sorptive extraction applied to the determination of volatile compounds in vinegars. *J. Chromatogr. A* 1104, 47–53. doi:10.1016/j.chroma.2005.12.006
- Huang, X., Chen, L., Yuan, D., 2013. Development of monolith-based stir bar sorptive extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry method for sensitive determination of ten sulfonamides in pork and chicken samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 6885–6889. doi:10.1007/s00216-013-7124-6
- Hu, C., He, M., Chen, B., Hu, B., 2015. Simultaneous determination of polar and apolar compounds in environmental samples by a polyaniline/hydroxyl multi-walled carbon nanotubes composite-coated stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1394, 36–45. doi:10.1016/j.chroma.2015.03.046
- Hu, C., He, M., Chen, B., Zhong, C., Hu, B., 2014. Sorptive extraction using polydimethylsiloxane/metal-organic framework coated stir bars coupled with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycyclic

- aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 1356, 45–53. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.062
- Hu, Y., Zheng, Y., Zhu, F., Li, G., 2007. Sol–gel coated polydimethylsiloxane/ $\beta$ -cyclodextrin as novel stationary phase for stir bar sorptive extraction and its application to analysis of estrogens and bisphenol A. *J. Chromatogr. A* 1148, 16–22. doi:10.1016/j.chroma.2007.02.101
- Iparraquirre, A., Prieto, A., Navarro, P., Olivares, M., Fernández, L.-Á., Zuloaga, O., 2011. Optimisation of stir bar sorptive extraction and in-tube derivatisation–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of several endocrine disruptor compounds in environmental water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 339–352. doi:10.1007/s00216-011-5074-4
- Kanan, R., 2012. Développements méthodologiques pour l'extraction et l'analyse des polluants organiques d'intérêt pour l'environnement marin : application aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Bordeaux 1.
- Kawaguchi, M., Inoue, K., Yoshimura, M., Ito, R., Sakui, N., Okanouchi, N., Nakazawa, H., 2004. Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 805, 41–48. doi:10.1016/j.jchromb.2004.02.005
- Kawaguchi, M., Ito, R., Hayatsu, Y., Nakata, H., Sakui, N., Okanouchi, N., Saito, K., Yokota, H., Izumi, S., Makino, T., Nakazawa, H., 2006. Stir bar sorptive extraction with in situ de-conjugation and thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry for measurement of 4-nonylphenol glucuronide in human urine sample. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40, 82–87. doi:10.1016/j.jpba.2005.05.024
- Kawaguchi, M., Ito, R., Honda, H., Endo, N., Okanouchi, N., Saito, K., Seto, Y., Nakazawa, H., 2008. Determination of urinary triclosan by stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 875, 577–580. doi:10.1016/j.jchromb.2008.10.008
- Kole, P.L., Millership, J., McElnay, J.C., 2011. Determination of diclofenac from paediatric urine samples by stir bar sorptive extraction (SBSE)–HPLC–UV technique. *Talanta* 85, 1948–1958. doi:10.1016/j.talanta.2011.07.016
- Leikvoll, L., 2011. Development of FTIR and HPLC Methods for Analysis of Substances Extracted from Hydrophilic Urinary Catheters [WWW Document]. Chalmers Stud. URL <http://studentarbeten.chalmers.se> (accessed 4.25.15).
- Li, B., Zeng, F., Dong, Q., Cao, Y., Fan, H., Deng, C., 2012. Rapid Determination Method for 12 Pyrethroid Pesticide Residues in Tea by Stir Bar Sorptive Extraction-Thermal Desorption-Gas Chromatography. *Phys. Procedia, International Conference on Solid State Devices and Materials Science*, April 1-2, 2012, Macao 25, 1776–1780. doi:10.1016/j.phpro.2012.03.310
- Lissalde, S., Mazzella, N., Fauvelle, V., Delmas, F., Mazellier, P., Legube, B., 2011. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for thirty-three pesticides in natural water and comparison of performance between classical solid phase extraction and passive sampling approaches. *J. Chromatogr. A* 1218, 1492–1502. doi:10.1016/j.chroma.2011.01.040
- Liu, W., Hu, Y., Zhao, J., Xu, Y., Guan, Y., 2005. Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr. A* 1095, 1–7. doi:10.1016/j.chroma.2005.07.107
- Llorca-Pórcel, J., Martínez-Parreño, M., Martínez-Soriano, E., Valor, I., 2009. Analysis of chlorophenols, bisphenol-A, 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenols in soil by means of ultrasonic solvent extraction and stir bar sorptive extraction with in situ derivatisation. *J. Chromatogr. A* 1216, 5955–5961. doi:10.1016/j.chroma.2009.06.043

- Maggi, L., Carmona, M., Del Campo, C.P., Zalacain, A., de Mendoza, J.H., Mocholí, F.A., Alonso, G.L., 2008. Multi-residue contaminants and pollutants analysis in saffron spice by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1209, 55–60. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.026
- Mansouri, H.E., Yagoubi, N., Ferrier, D., 1998. Extraction of polypropylene additives and their analysis by HPLC. *Chromatographia* 48, 491–496. doi:10.1007/BF02466639
- Mao, X., Hu, B., He, M., Fan, W., 2012. Stir bar sorptive extraction approaches with a home-made portable electric stirrer for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in environmental water. *J. Chromatogr. A* 1260, 16–24. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.062
- Margoum, C., Guillemain, C., Yang, X., Coquery, M., 2013. Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticides in water samples: Method validation and measurement uncertainty. *Talanta* 116, 1–7. doi:10.1016/j.talanta.2013.04.066
- Melo, L.P., Nogueira, A.M., Lanças, F.M., Queiroz, M.E.C., 2009. Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples. *Anal. Chim. Acta* 633, 57–64. doi:10.1016/j.aca.2008.11.042
- Michałowicz, J., 2014. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 738–758. doi:10.1016/j.etap.2014.02.003
- Montesdeoca-Esponda, S., del Toro-Moreno, A., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2013. Development of a sensitive determination method for benzotriazole UV stabilizers in environmental water samples with stir bar sorption extraction and liquid desorption prior to ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 36, 2168–2175. doi:10.1002/jssc.201300191
- Nakamura, S., Daishima, S., 2004. Simultaneous determination of alkylphenols and bisphenol A in river water by stir bar sorptive extraction with in situ acetylation and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1038, 291–294. doi:10.1016/j.chroma.2004.03.040
- Nguyen, K.T.N., Scapolla, C., Di Carro, M., Magi, E., 2011. Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction. *Talanta* 85, 2375–2384. doi:10.1016/j.talanta.2011.07.085
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Kanda, H., Nakamura, S., 2006. Fast screening of pesticide multiresidues in aqueous samples by dual stir bar sorptive extraction-thermal desorption-low thermal mass gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 9th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers 9th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers 1130, 83–90. doi:10.1016/j.chroma.2006.06.032
- Pérez-Carrera, E., León, V.M.L., Parra, A.G., González-Mazo, E., 2007. Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1170, 82–90. doi:10.1016/j.chroma.2007.09.013
- Perlstein, P., 1983. The determination of light stabilisers in plastics by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 149, 21–27. doi:10.1016/S0003-2670(00)83157-8
- Pintado-Herrera, M.G., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A., 2014. Atmospheric pressure gas chromatography–time-of-flight-mass spectrometry (APGC–ToF-MS) for the determination of regulated and emerging contaminants in aqueous samples after stir bar sorptive extraction (SBSE). *Anal. Chim. Acta* 851, 1–13. doi:10.1016/j.aca.2014.05.030

- Portugal, F.C.M., Pinto, M.L., Nogueira, J.M.F., 2008. Optimization of Polyurethane Foams for Enhanced Stir Bar Sorptive Extraction of Triazinic Herbicides in Water Matrices. *Talanta*, 14th International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques 77, 765–773. doi:10.1016/j.talanta.2008.07.026
- Pouech, C., 2014. Développement de méthodologies analytiques pour l'étude de la migration depuis des contenants en matière plastique prévus pour des applications pharmaceutiques vers des solutions aqueuses et des fluides biologiques.
- Pouech, C., Lafay, F., Wiest, L., Baudot, R., Léonard, D., Cren-Olivé, C., 2014. Monitoring the extraction of additives and additive degradation products from polymer packaging into solutions by multi-residue method including solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1493–1507. doi:10.1007/s00216-013-7551-4
- Prieto, A., Basauri, O., Rodil, R., Usobiaga, A., Fernández, L.A., Etxebarria, N., Zuloaga, O., 2010. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *J. Chromatogr. A, Extraction Techniques* 1217, 2642–2666. doi:10.1016/j.chroma.2009.12.051
- Queiroz, R.H.C., Bertucci, C., Malfará, W.R., Dreossi, S.A.C., Chaves, A.R., Valério, D.A.R., Queiroz, M.E.C., 2008. Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal., RDP A 2007 selected papers from the 12th international meeting on recent developments in pharmaceutical analysis* 48, 428–434. doi:10.1016/j.jpba.2008.03.020
- Quintana, J.B., Rodil, R., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2007. Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction–liquid desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A, ExTech 2007 9th International Symposium on Advances in Extraction Technologies ExTech 2007 - 9th International Symposium on Advances in Extraction Technologies* 1174, 27–39. doi:10.1016/j.chroma.2007.07.088
- Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., Carda-Broch, S., 2012. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *J. Chromatogr. A, Selected Papers from the 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques* 1232, 101–109. doi:10.1016/j.chroma.2011.10.050
- Reingruber, E., Himmelsbach, M., Sauer, C., Buchberger, W., 2010. Identification of degradation products of antioxidants in polyolefins by liquid chromatography combined with atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *Polym. Degrad. Stab.* 95, 740–745. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.02.015
- Rodil, R., Moeder, M., 2008. Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1179, 81–88. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.090
- Roldán-Pijuán, M., Lucena, R., Cárdenas, S., Valcárcel, M., Kabir, A., Furton, K.G., 2015. Stir fabric phase sorptive extraction for the determination of triazine herbicides in environmental waters by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1376, 35–45. doi:10.1016/j.chroma.2014.12.027
- Ruan, E.D., Aalhus, J., Juárez, M., 2014. A rapid, sensitive and solvent-less method for determination of malonaldehyde in meat by stir bar sorptive extraction coupled thermal desorption and gas chromatography/mass spectrometry with in situ derivatization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 28, 2723–2728. doi:10.1002/rcm.7058
- Serôdio, P., Nogueira, J.M.F., 2005. Development of a stir-bar-sorptive extraction–liquid desorption–large-volume injection capillary gas chromatographic–mass spectrometric method for

- pyrethroid pesticides in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1141–1151. doi:10.1007/s00216-005-3210-8
- Sternbauer, L., Hintersteiner, I., Buchberger, W., Standler, A., Marosits, E., 2013. Evaluation of a microwave assisted extraction prior to high performance liquid chromatography for the determination of additives in polyolefins. *Polym. Test.* 32, 901–906. doi:10.1016/j.polymertesting.2013.04.012
- Stopforth, A., Burger, B.V., Crouch, A.M., Sandra, P., 2007. The analysis of estrone and 17 $\beta$ -estradiol by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography/mass spectrometry: Application to urine samples after oral administration of conjugated equine estrogens. *J. Chromatogr. B* 856, 156–164. doi:10.1016/j.jchromb.2007.05.025
- Thalhamer, B., Buchberger, W., Waser, M., 2011. Identification of thymol phase I metabolites in human urine by headspace sorptive extraction combined with thermal desorption and gas chromatography mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56, 64–69. doi:10.1016/j.jpba.2011.04.014
- Tienpont, B., David, F., Benijts, T., Sandra, P., 2003. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC–MS for profiling and target component analysis of pharmaceutical drugs in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal., Drug Analysis* 2002 32, 569–579. doi:10.1016/S0731-7085(03)00164-X
- Unceta, N., Ugarte, A., Sánchez, A., Gómez-Caballero, A., Goicolea, M.A., Barrio, R.J., 2010. Development of a stir bar sorptive extraction based HPLC-FLD method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 178–185. doi:10.1016/j.jpba.2009.07.015
- Van Meerbeek, B., Vargas, M., Inoue, S., Yoshida, Y., Perdigão, J., Lambrechts, P., Vanherle, G., 2000. Microscopy investigations. Techniques, results, limitations. *Am. J. Dent.* 13, 3–18.
- Xu, Z., Yang, Z., Liu, Z., 2014. Development of dual-templates molecularly imprinted stir bar sorptive extraction and its application for the analysis of environmental estrogens in water and plastic samples. *J. Chromatogr. A* 1358, 52–59. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.093
- Yu, C., Hu, B., 2009. Sol–gel polydimethylsiloxane/poly(vinylalcohol)-coated stir bar sorptive extraction of organophosphorus pesticides in honey and their determination by large volume injection GC. *J. Sep. Sci.* 32, 147–153. doi:10.1002/jssc.200800486
- Zhao, G., Chen, Y., Wang, S., Yu, J., Wang, X., Xie, F., Liu, H., Xie, J., 2013. Simultaneous determination of 11 monohydroxylated PAHs in human urine by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta* 116, 822–826. doi:10.1016/j.talanta.2013.07.071
- Zuin, V.G., Montero, L., Bauer, C., Popp, P., 2005. Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. *J. Chromatogr. A* 1091, 2–10. doi:10.1016/j.chroma.2005.07.057

**Chapitre III : Développement et  
validation d'une méthode de screening  
ciblé dans l'urine par HPLC-HRMS**





### III.1. Introduction et objectifs de l'étude

Le troisième chapitre de ce manuscrit s'intéressera au développement d'une méthode d'analyse multirésidus par screening ciblé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution avec un instrument de type QqToF. Les composés sélectionnés, dont leur toxicité est avérée ou non, appartiennent à différentes familles chimiques et sont utilisés dans de nombreux objets et produits de la vie courante avec lesquels l'Homme est continuellement en contact.

Le principal défi analytique de l'analyse de composés appartenant à diverses familles de contaminants environnementaux à l'état de traces dans l'urine humaine est de développer des méthodes simples, rapides et robustes et ce malgré l'hétérogénéité de leurs propriétés physico-chimiques.

L'objectif de cette étude est de développer une méthode quantitative afin d'évaluer si les contaminants environnementaux choisis sont présents dans l'urine brute d'individus et à quelle teneur. De cette façon, ces mesures pourraient représenter un indicateur des expositions humaines environnementales. De plus, utilisant un spectromètre de masse haute résolution, la méthode développée pourra également être étendue à du screening non ciblé.

Dans un premier temps, ce chapitre sera consacré au développement analytique et à l'optimisation de la méthode. Dans un second temps, une partie sera dédiée à la détermination des performances analytiques de cette méthode et à sa validation. Enfin, nous nous intéresserons à l'application de cette méthode à des échantillons réels de volontaires, avec la détection et la quantification des contaminants ciblés, mais également la recherche de leurs métabolites et d'autres contaminants à partir des données acquises.

### III.2. Etat de l'art

#### III.2.1. Choix des composés d'intérêt

Les molécules choisies pour l'approche ciblée sont des molécules qualifiées de contaminants environnementaux, qui peuvent entrer en contact avec l'Homme dans son environnement de vie au quotidien, *via* l'alimentation, l'utilisation de produits d'hygiène corporelle ou encore de produits d'entretien par exemple. Les composés sélectionnés sont les suivants :

- 22 pesticides retrouvés régulièrement dans les fruits et légumes :  $\lambda$ -cyhalothrine, diméthoate, carbendazime, linuron, diuron, imazalil, cyprodinil, chlorpyrifos-éthyl,

procymidone, ortho-phénylphénol, méthomyl, diquat, paraquat, éthylène thiourée, ométhoate, acéphate, méthamidophos, clopyralid, glyphosate, acide aminométhylphosphonique, O,O-diéthyl thiophosphate de potassium, 2,4-dichlorophénol ;

- 10 médicaments vétérinaires : florfénicol, tylosine, tilmicosine, danofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, difloxacin, clorsulon, dicyclanil, lévamisole ;
- 6 parabènes : méthylparabène, propylparabène, butylparabène, éthylparabène, isopropylparabène, acide 4-hydroxybenzoïque ;
- 1 tensioactif : dodécylbenzènesulfonate de sodium ;
- 4 retardateurs de flammes : 3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A, 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane, phosphate de tributyle, phosphate de dibutyle ;
- 5 additifs plastiques : bisphénol A, irganox 1076, irganox 1010, glycérol monostéarate, 2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol ;
- 2 filtres UV : cyasorb UV 9, 4-méthylbenzylidène camphre ;
- 2 alkylphénols : 4-tert octylphénol, 4-n-nonylphénol ;
- 5 composés perfluorés : acide perfluorooctanoïque, acide heptafluorobutyrique, acide perfluoropentanoïque, acide 1-decafluorohexanoïque, acide perfluorononanoïque ;
- 5 autres molécules : pyridine, bis(2-ethylhexyl) phosphate, hexaméthylène tétramine, 4-hydroxy acétophénone, 4-méthylimidazole ;

La majorité des molécules sélectionnées correspondent aux molécules mères, et non aux métabolites qui pourraient être retrouvés dans l'urine. Ce choix s'est imposé par le manque de standards de métabolites disponibles. De plus, certains composés comme les parabènes sont le plus souvent retrouvés sous leur forme conjuguée. Afin de les retrouver sous leur forme mère, il faudrait ajouter une étape d'hydrolyse enzymatique au protocole, ce qui n'était pas envisageable dans notre cas. En effet, l'objectif ici était de réaliser un développement analytique sur des échantillons d'urines brutes, afin de garder l'échantillon le plus intact possible et de réduire au maximum la durée d'analyse, de façon à obtenir en une seule injection les données du screening ciblé mais également du non ciblé.

#### III.2.1.1. Les pesticides

Les pesticides, dont le terme vient du latin *cida*, tuer, et de l'anglais *pest*, nuisible, appelés aussi substances phytosanitaires, sont utilisés principalement en agriculture pour lutter contre des organismes nuisibles aux cultures, notamment aux fruits et légumes.

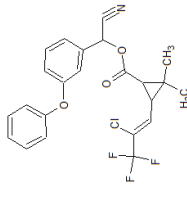
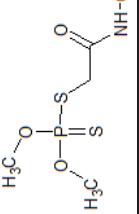
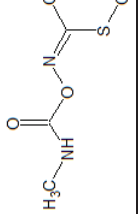
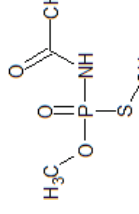
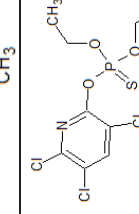
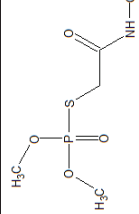
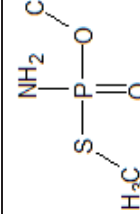
Une liste de 22 pesticides, dont trois métabolites, a été établie pour cette étude. Ces composés sont présentés dans le Tableau III-1 avec leurs familles chimiques, formules brutes et structures chimiques. Ce tableau synthétise également leurs propriétés physico-chimiques (log du coefficient de partage octanol/eau ou  $\log K_{\text{octanol/eau}}$  et pKa) ainsi que la date approximative d'introduction de chaque pesticide sur le marché en France en précisant si son utilisation est encore approuvée (Agriculture & Environment Research Unit, 2015; "DrugBank," 2015, "PubChem," 2015). Les 3 métabolites sélectionnés correspondent à l'acide aminométhylphosphonique, un métabolite du glyphosate ; au 2,4-dichlorophénol, un métabolite commun à plusieurs pesticides (Yoshida et Yoshida, 2012) ; et au O,O-diéthyl thiophosphate de potassium, un métabolite courant des pesticides de la famille des organophosphorés (Prapamontol *et al.*, 2014).

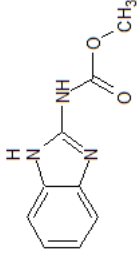
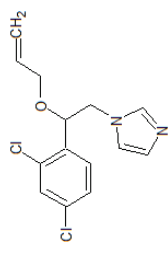
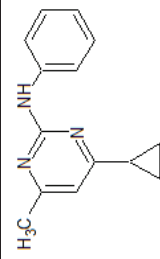
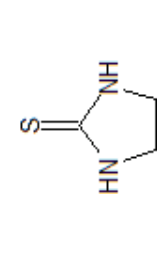
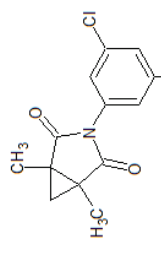
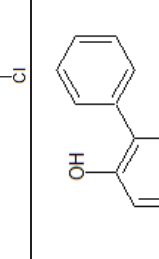
Ces pesticides ont été choisis selon leur occurrence dans l'environnement et d'après des listes de priorisation. En effet, certaines substances phytosanitaires ont été sélectionnées pour leur fréquence d'utilisation élevée en cultures légumières ou en viticulture (le diuron, la  $\lambda$ -cyhalothrine, le méthomyl, le chlorpyrifos-éthyl et la procymidone) (ANSES, 2010a), ou pour leur fréquence de détection dans les fruits et les légumes (le linuron, la  $\lambda$ -cyhalothrine, le méthomyl, le chlorpyrifos-éthyl, la carbendazime, l'imazalil, le cyprodinil, la procymidone et l'ortho-phénylphénol) (ANSES, 2010a) mais aussi dans les autres aliments (le chlorpyrifos-éthyl, la carbendazime et l'imazalil) (ANSES, 2011a). Par exemple, le glyphosate est le premier contaminant de la ressource en eau en France (Cicolella, 2013). De ce fait, l'alimentation est la principale source de contamination par les pesticides (Cicolella, 2013). De plus, certains de ces pesticides ont un impact avéré sur la santé humaine comme la  $\lambda$ -cyhalothrine, la carbendazime et le cyprodinil. En effet, des scientifiques ont mis en évidence un lien entre des pesticides et certains cancers ou des anomalies au niveau du système de reproduction (Milieudéfensie et PAN Europe, 2007). Trois des pesticides sélectionnés (l'imazalil, le diméthoate et le chlorpyrifos-éthyl) sont reconnus comme des substances prioritaires en termes de surveillance des aliments liée à l'exposition de la population (INERIS, 2009). Le diméthoate présenterait même des risques pour certains groupes de consommateurs (ANSES, 2011a). Certaines substances ont également été sélectionnées car elles ont déjà été retrouvées dans différentes matrices biologiques comme le chlorpyrifos-éthyl retrouvé dans le lait maternel (Schlumpf *et al.*, 2010), l'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium dans le liquide amniotique (Koutroulakis *et al.*, 2014), ou encore le 2,4-dichlorophénol, l'éthylène thiourée et le paraquat dans l'urine (Gao *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2014). Le 2,4-dichlorophénol a aussi été retrouvé dans le lait maternel (Hines *et al.*, 2015). D'autres pesticides (le méthamidophos, l'ométhoate, l'acéphate, le

clopyralid, le diquat, le glyphosate et son métabolite, l'acide aminométhylphosphonique) ont été choisis pour leur polarité très élevée, afin d'obtenir une gamme de polarité des contaminants environnementaux très dynamique. D'après le Tableau III-1, l'usage de certains des pesticides sélectionnés n'est plus autorisé en France. Cependant, ils continuent d'être retrouvés dans l'environnement, comme la carbendazime dans les matrices apicoles (Wiest *et al.*, 2011), le méthamidophos dans les mousses de toitures (Baugros *et al.*, 2009) ou encore la procymidone et le diuron dans les eaux de rivières (Pesce *et al.*, 2008). L'Homme est donc toujours exposé à ces substances.

Tableau III- 1 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des pesticides et de leurs métabolites sélectionnés (ND : non disponible)

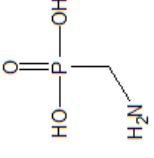
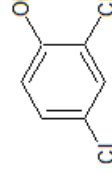
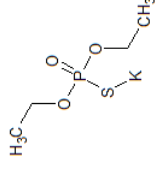
Famille chimique	Molécule	n° CAS	Formule brute	Approuvé en France	Année d'introduction	Log $K_{octano/eau}$	pKa	Structure
Urées	Linuron	330-55-2	$C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$	oui	1965	3,0	ND	
Urées	Diuron	330-54-1	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	non	~1951	2,9	13,5	
Acide picolinique	Clopyralid	1702-17-6	$C_6H_3Cl_2NO_2$	oui	1977	-2,6	2,0	
Acide aminé	Glyphosate	1071-83-6	$C_3H_8NO_3P$	oui	1971	-3,2	2,3	
Ammonium quaternaire	Diquat	6385-62-2	$C_{12}H_{12}N_2$	oui	ND	-4,6	ND	
Ammonium quaternaire	Paraquat	1910-42-5	$C_{12}H_{14}N_2$	non	1962	-4,5	ND	

	Famille chimique	Molécule	n° CAS	Formule brute	Approuvé en France	Année d'introduction	Log $K_{octanol/eau}$	pKa	Structure
Insecticides	Pyréthriinoïde	$\lambda$ -cyhalothrine	91465-08-6	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	oui	1984	5,5	ND	
	Organophosphoré	Diméthoate	60-51-5	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	oui	1951	0,7	ND	
	Carbamate	Méthomyl	16752-77-5	$C_5H_{10}N_2O_2S$	non	1968	0,1	ND	
	Organophosphoré	Acéphate	30560-19-1	$C_4H_{10}NO_3PS$	non	~1970	-0,9	8,4	
	Organophosphoré	Chlorpyrifos-éthyl	2921-88-2	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	oui	1965	4,7	ND	
Insecticides / acaricides	Organophosphoré	Ométhoate	1113-02-6	$C_5H_{12}NO_4PS$	non	~1960	-0,7	ND	
	Organophosphoré	Méthamidophos	10265-92-6	$C_2H_8NO_2PS$	non	~1972	-0,8	ND	

Famille chimique	Molécule	n° CAS	Formule brute	Approuvé en France	Année d'introduction	Log $K_{\text{octanol/eau}}$	pKa	Structure
Carbamate	Carbendazime	10605-21-7	$C_9H_9N_3O_2$	non	1973	1,5	4,2	
Imidazole	Imazalil	35554-44-0	$C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$	oui	1977	2,6	6,5	
Pyrimidine	Cyprodinil	121552-61-2	$C_{14}H_{15}N_3$	oui	1994	4,0	4,4	
Thiouré	Ethylène thiourée	96-45-7	$C_3H_6N_2S$	ND	ND	-0,7	ND	
Dicarboximide	Procymidon	32809-16-8	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	non	1976	3,3	ND	
Phénol	Ortho-phénylphénol	90-43-7	$C_{12}H_{10}O$	non	~1930	3,2	9,4	

Fongicides



Famille chimique	Molécule	n° CAS	Formule brute	Approuvé en France	Année d'introduction	Log $K_{\text{octanol/eau}}$	pKa	Structure
Métabolites	Acide aminométhylphosphonique	1066-51-9	$\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$	-	-	-2,5	ND	
	2,4-dichlorophénol	120-83-2	$\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$	-	-	3,1	7,8	
	O-O-diéthyl thiophosphate de potassium	5871-17-0	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{KO}_3\text{PS}$	-	-	0,7	ND	

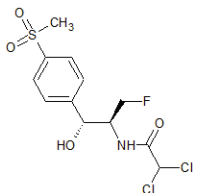
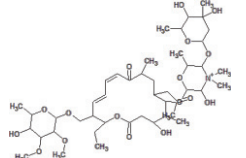
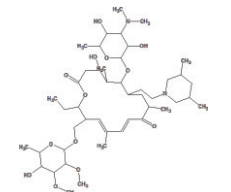
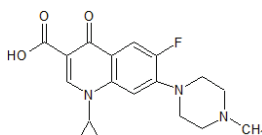
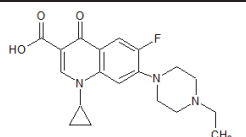
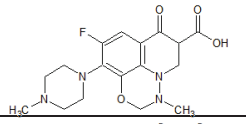
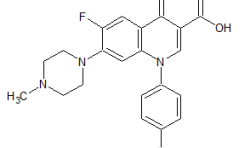
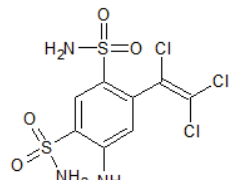
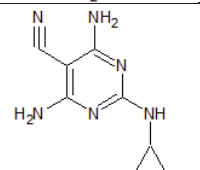
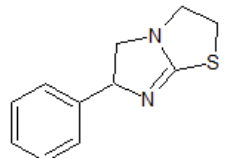
### III.2.1.2. Les médicaments vétérinaires

La France est le premier marché européen de l'industrie du médicament vétérinaire (Chevance *et al.*, 2012). En 2012, le volume total des ventes d'antibiotiques à usage vétérinaire s'est élevé à 782 tonnes en France (Chevance et Moulin, 2013). Ainsi, l'Homme est exposé à ces médicaments vétérinaires *via* son alimentation notamment par la consommation de viande (Luz Gómez-Pérez *et al.*, 2015).

Une liste de 10 médicaments vétérinaires a été sélectionnée pour cette étude. Ces composés sont présentés dans le Tableau III-2 avec leurs formules brutes et structures chimiques ("Chemical Dictionary Online," 2009, "chemicalize.org," 2015, "DrugBank," 2015). Ils se composent de deux groupes : les antibiotiques qui sont des substances chimiques produites par un organisme vivant, et qui, administrées à un organisme, peuvent bloquer la croissance d'autres microorganismes ou même les détruire sans intoxiquer l'hôte ; et les antiparasitaires, qui sont des substances d'origine naturelle ou synthétique capables de détruire différents organismes ayant un développement parasite.

Les médicaments vétérinaires ont été choisis selon leur occurrence dans l'environnement et d'après des listes de priorisation. En effet, certains médicaments vétérinaires (le florfénicol, la tylosine, la tilmicosine, l'enrofloxacin, la marbofloxacin et la difloxacin) ont été sélectionnés pour leur fréquence d'administration élevée, selon chaque famille chimique (Chevance et Moulin, 2009). De plus, la tylosine, le florfénicol, la danofloxacin, le clorsulon, le dicyclanil et le lévamisole sont des substances classées comme molécules prioritaires d'après l'ANSES en 2008 (ANSES, 2011b). Quant à l'enrofloxacin et la danofloxacin, elles font partie des substances environnementales ayant un intérêt en santé publique (INERIS, 2009). Certaines substances ont également été sélectionnées car elles ont déjà été retrouvées dans différentes matrices environnementales comme la tylosine dans l'eau de surface (Chitescu *et al.*, 2015) et le florfénicol dans les sols (Salvia *et al.*, 2012). Les effets de ces composés sur la santé humaine ne sont, à notre connaissance, pas connus. Cependant, ils s'inscrivent parfaitement dans la thématique de l'Exposome du fait de leurs fortes interactions avec l'Homme.

Tableau III- 2 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des médicaments vétérinaires sélectionnés (ND : non disponible)

	Molécule	n° CAS	Formule brute	pKa	Log K <sub>octanol/eau</sub>	Structure
Antibiotiques	Florfenicol	73231-34-2	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> FNO <sub>4</sub> S	10,7	1,5	
	Tylosine	1401-69-0	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub>	7,7	2,3	
	Tilmicosine	108050-54-0	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	8,2	4,2	
	Danofloxacine	112398-08-0	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	6,0	0,7	
	Enrofloxacine	93106-60-6	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	ND	1,2	
	Marbofloxacine	115550-35-1	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	ND	-0,1	
	Difloxacine	98106-17-3	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	ND	2,4	
Antiparasitaires	Clorsulon	60200-06-8	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	ND	0,0	
	Dicyclanil	112636-83-6	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub>	ND	0,6	
	Lévamisole	14769-73-4	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> S	7,0	2,4	

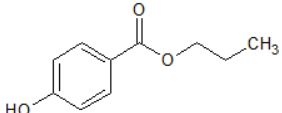
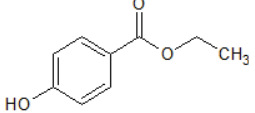
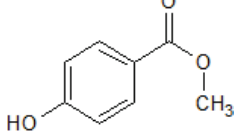
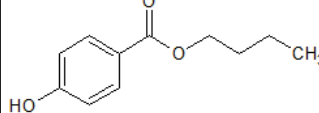
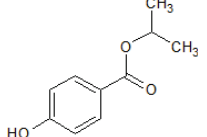
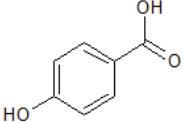
### III.2.1.3. Les parabènes

Les parabènes sont des esters de l'acide para-hydroxybenzoïque. Ils sont très utilisés depuis les années 30 pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques dans les industries cosmétiques, agroalimentaires et pharmaceutiques. L'Homme est, de ce fait, très exposé à ces composés bien que ces dernières années les industriels aient redoublé d'efforts pour les remplacer dans la formulation de leurs produits. En effet, l'utilisation des parabènes est très controversée, puisqu'ils sont suspectés d'être toxiques. En particulier, ils feraient partie de la famille des perturbateurs endocriniens (Routledge *et al.*, 1998). Des études ont montré que ces molécules étaient capables d'établir des liaisons avec les récepteurs aux œstrogènes conduisant à une baisse de la fertilité chez l'Homme et un développement de tumeurs (Gazin, 2009).

Une liste de cinq parabènes et un métabolite ont été sélectionnés pour cette étude. Ces composés sont présentés dans le Tableau III-3 avec leurs formules brutes et structures chimiques, ainsi que leurs propriétés physico-chimiques (“chemicalize.org,” 2015, “PubChem,” 2015).

Ces parabènes ont été choisis selon leur fréquence d'utilisation dans les produits utilisés dans la vie quotidienne, notamment les produits d'hygiène corporelle. De plus, certains parabènes (le propylparabène, l'éthylparabène, le méthylparabène et l'isopropylparabène) font partie des substances environnementales émergentes les plus fréquemment discutées (INERIS, 2009). De nombreuses études ont montré que différents parabènes étaient retrouvés dans des matrices biologiques telles que le propylparabène, l'éthylparabène, le butylparabène et le méthylparabène dans le sang, l'urine, les tissus cancéreux du sein, la salive, le sérum, mais aussi le lait maternel (Hines *et al.*, 2015; Jiménez-Díaz *et al.*, 2011; Moos *et al.*, 2014; Schlumpf *et al.*, 2010). Ces parabènes ont un métabolite en commun. Il s'agit de l'acide 4-hydroxybenzoïque ou acide parahydroxybenzoïque. Ce dernier a également déjà été retrouvé dans des matrices biologiques notamment l'urine humaine (Shirai *et al.*, 2013).

Tableau III- 3 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des parabènes et de leur métabolite sélectionnés

Molécule	n° CAS	Formule brute	pKa	Log $K_{\text{octanol/eau}}$	Structure
Propylparabène	94-13-3	$C_{10}H_{12}O_3$	7,9	2,6	
Ethylparabène	120-47-8	$C_9H_{10}O_3$	8,3	2,0	
Méthylparabène	99-76-3	$C_8H_8O_3$	8,4	1,7	
Butylparabène	94-26-8	$C_{11}H_{14}O_3$	8,5	3,0	
Isopropylparabène	4191-73-5	$C_{10}H_{12}O_3$	8,2	2,5	
Acide 4-hydroxybenzoïque	99-96-7	$C_7H_6O_3$	4,5	1,3	

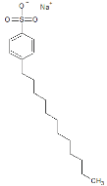
#### III.2.1.4. Les tensioactifs

Les tensioactifs, appelés également agents de surface, ou encore en anglais surfactants, sont des composés amphiphiles, qui peuvent modifier la tension superficielle entre deux surfaces. Ainsi, ils permettent de solubiliser deux phases non miscibles. Il existe différentes familles de tensioactifs selon la nature de l'extrémité hydrophile de la molécule et leur fonction. Le tensioactif sélectionné dans cette étude correspond à un tensioactif anionique. Il s'agit du dodécylbenzènesulfonate de sodium, qui appartient à la sous-famille des détergents. Ce dernier est très largement utilisé dans des produits d'hygiène, notamment dans les nettoyants cosmétiques et les lessives. Ainsi, l'Homme est quotidiennement en contact avec ce composé, malgré le fait que les quantités de dodécylbenzènesulfonate de sodium produites soient difficilement évaluables.

Sa formule brute, sa structure chimique ainsi que ses propriétés physico-chimiques sont présentées dans le Tableau III-4 ("chemicalize.org," 2015, "PubChem," 2015).

Les alkylbenzènesulfonates, tels que le dodécylbenzènesulfonate de sodium, sont des détergents puissants et polluants pour l'environnement. De plus, l'impact de ces composés a déjà été démontré sur des organismes, notamment celui du dodécylbenzènesulfonate de sodium sur des moules. En effet, Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2010) ont démontré l'effet génotoxique de ce composé sur ces êtres vivants. A notre connaissance, le dodécylbenzènesulfonate de sodium n'a jamais été recherché dans des échantillons d'urines humaines. C'est pourquoi, les effets sur celui-ci ne sont pas connus.

Tableau III- 4 : Structure et caractéristiques physico-chimiques du tensioactif sélectionné

Analyte	n° CAS	Formule brute	pKa	Log K <sub>octanol/eau</sub>	Structure
Dodécylbenzènesulfonate de sodium	25 155-30-0	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NaO <sub>3</sub> S	2,6	6,4	

#### III.2.1.5. Les retardateurs de flamme

Les retardateurs de flamme sont des substances chimiques ignifuges incorporées dans les matières plastiques d'appareils électriques, comme les ordinateurs ou les téléviseurs, et de circuits électroniques. Ces composés sont également présents dans des mousses et des matériaux de capitonnage, les intérieurs de voitures et d'avions ainsi que dans certains textiles. Ce sont des polluants organiques persistants auxquels l'Homme peut être exposé, notamment *via* la consommation de denrées alimentaires d'origine animale. En effet, les produits traités avec ces composés, qui sont pour la plupart volatils, les relarguent dans l'environnement et contaminent l'air, le sol et l'eau. Ces contaminants peuvent ensuite entrer dans la chaîne alimentaire (Zacs *et al.*, 2014), où ils sont présents principalement dans les aliments d'origine animale, tels que le poisson, la viande, le lait et les produits dérivés.

Quatre molécules appartenant à cette famille, dont un métabolite, ont été sélectionnées dans le cadre de cette étude. Il s'agit du 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane et du 3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A, les principaux représentants des retardateurs de flamme bromés (Debrauwer *et al.*, 2005) ; et du phosphate de tributyle, un retardateur de flamme organophosphoré et son métabolite, le phosphate de dibutyle. Ces composés sont présentés dans le Tableau III-5 ("chemicalize.org," 2015, "PubChem," 2015).

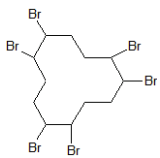
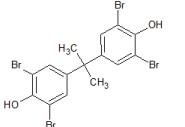
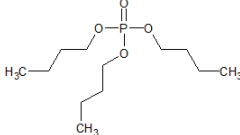
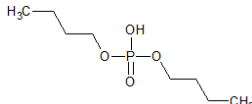
Le 3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A est utilisé dans les cartes de circuits imprimés, et les thermoplastiques, principalement dans les téléviseurs. Quant à l'1,2,5,6,9,10-

hexabromocyclododécane, il est principalement utilisé pour l'isolation thermique dans l'industrie du bâtiment. Ces composés font partie des substances environnementales émergentes ayant un intérêt en santé publique (INERIS, 2009). Le 3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A est inscrit dans la liste OSPAR comme produit chimique devant faire l'objet de mesures prioritaires (INERIS, 2009). L'OSPAR<sup>1</sup> est le mécanisme par lequel 15 gouvernements des côtes et des îles occidentales d'Europe, avec la Communauté Européenne, coopèrent pour protéger l'environnement marin de l'Atlantique du Nord-Est. Le 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane a été classé en 2008 par la Commission Européenne comme composé bioaccumulable et toxique (Zacs *et al.*, 2014), du fait de ses propriétés physico-chimiques (haute persistance, faible solubilité dans l'eau et haut coefficient de partage octanol/eau). De plus, il était le troisième retardateur de flamme bromé le plus produit dans le monde en 2001 (16 700 tonnes) (Haug *et al.*, 2008) et l'un des plus utilisés en Europe (environ 6 000 tonnes par an) (Zacs *et al.*, 2014). En 2011, sa production connue s'est élevée à environ 28 000 tonnes par an dont 13 426 pour l'Europe (Nations Unies, 2011). Il est interdit depuis le 21 août 2015 (Commission Européenne, 2013). Le 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane a déjà été retrouvé dans les aliments notamment dans le poisson, la charcuterie, la viande, les crustacés et les mollusques (ANSES, 2011a). De plus, ces deux substances ont déjà été retrouvées dans des échantillons de sang humains (Kim et Oh, 2014). Quant au phosphate de tributyle, ce dernier a été choisi pour ses volumes de production importants (jusqu'à 4500 tonnes en 2006 (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012)) et sa toxicité avérée. En effet, cette substance est connue pour être cancérogène et foetotoxique, sans compter qu'elle a déjà été retrouvée dans diverses matrices environnementales (Schindler *et al.*, 2009). Son métabolite urinaire majoritaire correspond au phosphate de dibutyle qui a déjà été retrouvé chez l'Homme (Schindler *et al.*, 2009).

---

<sup>1</sup> OSPAR est l'acronyme de "OS " pour Oslo et "PAR" pour Paris, en raison des Conventions originales d'Oslo et de Paris.

Tableau III- 5 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des retardateurs de flamme et d'un métabolite sélectionnés (ND : non disponible)

Analyte	n° CAS	Formule brute	pKa	Log $K_{\text{octanol/eau}}$	Structure
1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane	3194-55-6	$C_{12}H_{18}Br_6$	ND	7,7	
3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A	79-94-7	$C_{15}H_{12}Br_4O_2$	ND	7,2	
Phosphate de tributyle	126-73-8	$C_{12}H_{27}O_4P$	ND	4,1	
Phosphate de dibutyle	107-66-4	$C_8H_{19}O_4P$	0,9	2,4	

### III.2.1.6. Les additifs plastiques

Comme décrit dans le chapitre II 2.1., depuis la seconde guerre mondiale, les matières plastiques sont entrées dans notre mode de vie. Depuis, l'Homme est très exposé aux composés constituant les matières plastiques, qualifiés d'additifs plastiques. En effet, il a été démontré qu'il pouvait y avoir une migration de ces derniers dans le contenu de ces matières plastiques (Pouech, 2014).

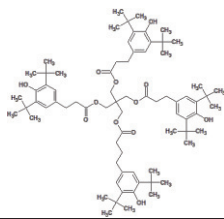
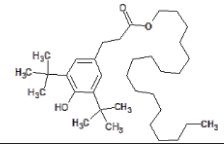
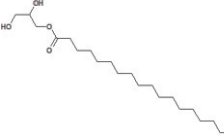
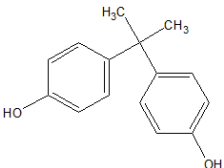
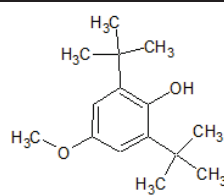
Dans ce contexte, une liste de cinq additifs plastiques, comprenant un métabolite, a été établie pour cette étude. Ces composés sont présentés dans le Tableau III-6 ("chemicalize.org," 2015, "PubChem," 2015).

Une étude a démontré que certains des composés d'intérêt étaient relargués par les matières plastiques dans leur contenu. Il s'agissait notamment de l'irganox 1010 et de son métabolite le 2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol (Pouech, 2014). Quant au bisphénol A, celui-ci fait partie des substances environnementales émergentes les plus fréquemment discutées (INERIS, 2009). De plus, il a déjà été retrouvé dans différentes matrices telles que les aliments (ANSES, 2010b) mais aussi des matrices biologiques comme le lait maternel, l'urine ou encore le sérum (Hines *et al.*, 2015). Ce composé est interdit depuis le 1er janvier 2015 pour tout conditionnement, contenant ou ustensile destiné à entrer en contact direct avec des denrées alimentaires (*LOI n° 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout*



conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A, 2012). L'ensemble des autres additifs plastiques sélectionnés ont également déjà été retrouvés dans l'urine (Pouech, 2014). Ils sont tous autorisés par la Pharmacopée Européenne (Pouech, 2014). Les effets de ces composés sur l'Homme sont peu connus bien que ceux du bisphénol A aient été très médiatisés, notamment pour l'usage de ce produit dans des biberons. De plus, plusieurs études ont mis en relation la concentration urinaire de bisphénol A et l'incidence élevée du diabète (Lang *et al.*, 2008) ou des maladies cardiovasculaires (Melzer *et al.*, 2010).

Tableau III- 6 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des additifs plastiques et d'un métabolite sélectionnés (ND : non disponible)

Analyte	n° CAS	Formule brute	pKa	Log K <sub>octanol/eau</sub>	Structure
Irganox 1010	6683-19-8	C <sub>73</sub> H <sub>108</sub> O <sub>12</sub>	12,0	19,3	
Irganox 1076	2082-79-3	C <sub>35</sub> H <sub>62</sub> O <sub>3</sub>	ND	12,5	
Glycérol monostéarate	123-94-4	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	ND	6,0	
Bisphénol A	80-05-7	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	9,7	3,3	
2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol	489-01-0	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	ND	4,6	

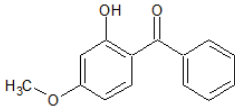
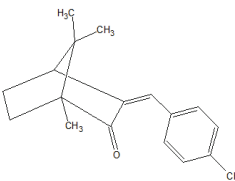
### III.2.1.7. Les filtres UV

Les filtres UV appartiennent à une famille de contaminants environnementaux entrant en contact avec l'Homme *via* les crèmes solaires, mais également l'alimentation. En effet, les emballages alimentaires peuvent être constitués de filtres UV, afin de protéger les denrées alimentaires. Ces composés peuvent alors être transférés sur l'aliment et ainsi être ingérés par l'Homme.

Deux molécules appartenant à cette famille ont été sélectionnées dans le cadre de cette étude. Ces composés sont présentés dans le Tableau III-7 (“chemicalize.org,” 2015, “PubChem,” 2015).

Une étude a démontré que certains filtres UV utilisés dans l'industrie agroalimentaire étaient relargués dans leur contenu. Il s'agissait notamment du cyasorb UV 9 (Pouech, 2014), pour lequel les effets sur l'Homme ne sont pas connus. Quant à la 4-méthylbenzylidène camphre, celle-ci a été retrouvée dans l'environnement, notamment dans des organismes aquatiques (Peng *et al.*, 2015), mais également dans le lait maternel (Schlumpf *et al.*, 2010). En effet, ce composé entre dans 54 % des 68 produits cosmétiques étudiés par Poiger (Poiger *et al.*, 2004). De plus, ce composé pourrait être toxique pour l'Homme par son activité oestrogénique (Schlumpf *et al.*, 2001).

Tableau III- 7 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des filtres UV sélectionnés (ND : non disponible)

Analyte	n° CAS	Formule brute	pKa	Log $K_{\text{octanol/eau}}$	Structure
Cyasorb UV 9	131-57-7	$C_{14}H_{12}O_3$	ND	3,6	
4-méthylbenzylidène camphre	36861-47-9	$C_{18}H_{22}O$	ND	3,4	

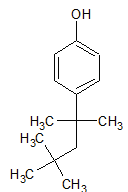
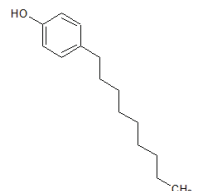
#### III.2.1.8. Les alkylphénols

Les alkylphénols sont principalement des substances chimiques très lipophiles et persistantes, utilisés en tant qu'additifs (détergents, additifs et antioxydants dans les carburants et les lubrifiants) ou comme précurseurs pour la production de retardateurs de flamme et de parfums. Leur production dépasse les 500 000 tonnes annuelle depuis plusieurs années (Ahel *et al.*, 1996). L'une des principales sources d'alkylphénols est la biodégradation des alkylphénols éthoxylés. Ces derniers sont produits principalement en tant qu'adjuvants et détergents dans l'industrie textile et le traitement de surface, comme additifs de désencrage dans l'industrie du papier, mais aussi comme émulsifiants et adjuvants de formulation de pesticides, d'autres produits agricoles et de peintures à l'eau (Becue et Nguyen, 2005). Ainsi, l'Homme est en contact régulier avec cette famille de composés qualifiés de perturbateurs endocriniens.

Deux molécules appartenant à cette famille ont été sélectionnées dans le cadre de cette étude. Il s'agit du 4-tert octylphénol et du 4-n-nonylphénol, qui correspondent aux alkylphénols les plus utilisés. Ces composés sont présentés dans le Tableau III-8 ("chemicalize.org," 2015, "PubChem," 2015).

Environ 60 % des alkylphénols sont retrouvés dans l'environnement (Ahel *et al.*, 1996), notamment dans l'air, l'eau, les sédiments et le sol (Ying *et al.*, 2002). Les alkylphénols sélectionnés sont considérés comme des composés prioritaires d'après la DCE ou directive 2000/60/EC (Commission of the European Communities, 2000). De plus, ces composés ont déjà été retrouvés dans des matrices biologiques telles que le plasma (Kawaguchi *et al.*, 2004) et l'urine (Jing *et al.*, 2011). De nombreuses études ont démontré le potentiel toxicologique des composés constituant cette famille principalement en tant que perturbateur endocrinien chez l'animal mais également chez l'Homme (Becue et Nguyen, 2005).

Tableau III- 8 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des alkylphénols sélectionnés

Analyte	n° CAS	Formule brute	pKa	Log $K_{\text{octanol/eau}}$	Structure
4-tert octylphénol	140-66-9	$C_{14}H_{22}O$	11,9	4,7	
4-n-nonylphénol	104-40-5	$C_{15}H_{24}O$	10,0	5,7	

### III.2.1.9. Les composés perfluorés

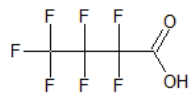
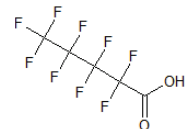

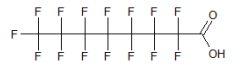

Les composés perfluorés sont une large famille de composés chimiques, utilisés depuis les années 50 dans de nombreuses applications industrielles et produits de consommation courante. En effet, de par leur caractère amphiphile, ils sont utilisés dans les traitements anti-tâches et imperméabilisants (vêtements, tapis, moquettes et meubles), revêtements antiadhésifs (ustensiles de cuisine et papiers dont les emballages alimentaires) et certaines applications spécialisées (cosmétiques, mousses anti-incendie et produits phytosanitaires). A l'heure actuelle, la toxicité de certains de ces composés (l'acide heptafluorobutyrique, l'acide perfluoropentanoïque, l'acide 1-decafluorohexanoïque et l'acide perfluorononanoïque) suscite

des questions. En effet, ces derniers sont suspectés d'avoir des effets de perturbateurs endocriniens (ANSES, 2011a). De plus, certains composés perfluorés comme l'acide perfluorooctanoïque sont persistants dans l'environnement et peuvent s'accumuler chez l'animal et l'Homme. L'acide perfluorooctanoïque est une des substances environnementales émergentes les plus fréquemment discutées (INERIS, 2009). Il est également le produit de dégradation de nombreux autres composés perfluorés dans l'environnement et dans les organismes vivants. Il en résulte une contamination généralisée de l'environnement et par conséquent de la chaîne alimentaire. L'alimentation est une source conséquente d'exposition de l'Homme aux composés perfluorés, notamment *via* les produits de la mer (ANSES, 2011a).

Une liste de cinq composés a été sélectionnée pour cette étude. Ces composés sont présentés dans le Tableau III-9 ("chemicalize.org," 2015, "PubChem," 2015).

Ces composés ont déjà été retrouvés dans différentes matrices environnementales comme l'eau (Joyce Dinglasan-Panlilio *et al.*, 2014; Post *et al.*, 2012), les sols (Llorca *et al.*, 2012) et les boues (Arvaniti *et al.*, 2014), mais aussi des organismes aquatiques tels que les moules et les poissons (Zabaleta *et al.*, 2015), ou des fluides biologiques comme le sérum (Wu *et al.*, 2015) et l'urine (Kim *et al.*, 2014). De plus, l'ensemble des composés perfluorés sélectionnés ont déjà été retrouvés dans divers denrées alimentaires (ANSES, 2011a). Les effets des composés perfluorés sur les organismes sont connus, notamment ceux de l'acide perfluorooctanoïque. La toxicité de ce dernier a été démontrée sur de nombreux animaux. En effet, il serait responsable du développement de tumeurs chez les animaux, mais également de l'inhibition de l'activité de certaines cellules chez l'Homme (Buhrke *et al.*, 2015).

Tableau III- 9 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des composés perfluorés sélectionnés (ND : non disponible)

Analyte	n° CAS	Formule brute	pKa	Log $K_{\text{octanol/eau}}$	Structure
Acide heptafluorobutyrique = Acide perfluorobutyrique	375-22-4	$C_4HF_7O_2$	0,4	2,3	
Acide perfluoropentanoïque	27 06-90-3	$C_5HF_9O_2$	ND	3,0	
Acide 1-decafluorohexanoïque = Acide perfluorohexanoïque	307-24-4	$C_6HF_{11}O_2$	ND	3,7	
Acide perfluorooctanoïque	335-67-1	$C_8HF_{15}O_2$	2,6	5,1	
Acide perfluorononanoïque	375-95-1	$C_9HF_{17}O_2$	-0,2	5,8	

### III.2.1.10. Les composés non classés

Les molécules ne pouvant pas constituer une famille déjà décrite ont été regroupées dans la famille dite « non classée ». Celle-ci se compose de six substances sélectionnées pour leur forte fréquence d'interaction avec l'Homme. En effet, ces dernières entrent dans la composition de nombreux produits de consommation courante. Elles sont présentées dans le Tableau III-10 («chemicalize.org,» 2015, «PubChem,» 2015).

L'hexaméthylène tétramine est un composé utilisé dans divers domaines d'application et plus particulièrement comme agent réticulant, combustible solide utilisé par les campeurs, additif alimentaire en tant que conservateur (E239 autorisé dans l'Union Européenne) (Fuselli *et al.*, 2012), inhibiteur de corrosion dans l'industrie des métaux, conservateur dans l'industrie des peintures et des laques, agent anti-agglomérant dans la production de déodorants et fixatifs pour cheveux et fongicide. Il est également utilisé comme antibiotique. De ce fait, la recherche de ce composé dans l'urine en tant que contaminant environnemental nécessite de savoir si le donneur d'échantillon n'a pas été traité avec ce composé. De par ses nombreuses utilisations, l'hexaméthylène tétramine est produit en grande quantité (30 000 tonnes en 2001 (Federal Institute for Occupational Safety and Health Notification Unit, 2008).

Le 4-hydroxy acétophénone est utilisé dans l'industrie plastique (comme solvant), cosmétique, agroalimentaire et pharmaceutique, mais aussi dans les produits agrochimiques.

Ce composé est majoritairement employé en tant que parfum dans les savons, les aliments, les boissons, le tabac, les détergents et les cosmétiques. Il est également utilisé comme un médicament pour induire le sommeil. Par conséquent, de la même façon que pour l'hexaméthylène tétramine, la recherche de ce composé dans l'urine en tant que contaminant environnemental nécessite de savoir si le donneur d'échantillon n'a pas été traité avec ce composé.

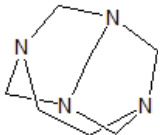
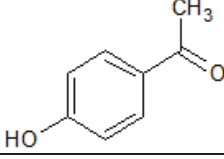
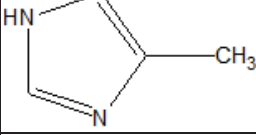
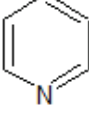
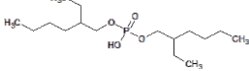
Le 4-méthylimidazole est utilisé comme colorant dans de très nombreux aliments notamment dans les boissons (cola et bière brune).

La pyridine est utilisée comme précurseur dans la fabrication de pesticides (insecticides et herbicides tels que le diquat, le paraquat ou le chlopyriphos-éthyl), de produits pharmaceutiques, d'arômes alimentaires, d'adhésifs, de peintures, d'explosifs et de désinfectants. Elle est également utilisée comme solvant en chimie organique.

Le bis(2-ethylhexyl) phosphate est un métabolite urinaire du tris(2-ethylhexyl)phosphate, un retardateur de flamme et un plastifiant (van Esch, 2000; Yoshida et Yoshida, 2012).

A notre connaissance, ces composés, excepté le bis(2-ethylhexyl) phosphate, n'ont jamais été recherchés dans l'environnement ou dans des matrices biologiques.

Tableau III- 10 : Structure et caractéristiques physico-chimiques des composés non classés sélectionnés (ND : non disponible)

Analyte	n° CAS	Formule brute	pKa	Log $K_{\text{octanol/eau}}$	Structure
Hexaméthylène tétramine	100-97-0	$C_6H_{12}N_4$	ND	0,4	
4-hydroxy acétophénone	99-93-4	$C_8H_8O_2$	8,1	1,2	
4-méthylimidazole	822-36-6	$C_4H_6N_2$	7,5	-0,2	
Pyridine	110-86-1	$C_5H_5N$	5,2	0,8	
Bis(2-ethylhexyl) phosphate	298-07-7	$C_{16}H_{35}O_4P$	1,5	5,8	

### III.2.2. Analyse des composés d'intérêt dans les matrices biologiques

#### III.2.2.1. Préparation d'échantillon

Le choix d'une matrice biologique homogène constituée majoritairement d'eau (95 %) telle que l'urine permet de limiter les étapes de préparation d'échantillon et d'injecter directement l'échantillon dans le système analytique. Différents chercheurs ont montré que l'utilisation d'échantillons d'urines dilués était préférable aux techniques plus sélectives, comme la SPE pour les méthodes de screening (Veuthey *et al.*, 2007; Vonaparti *et al.*, 2008). En effet, celles-ci nécessitent la recherche de composés avec des propriétés physico-chimiques très variées. De plus, cette stratégie générique a déjà été utilisée dans plusieurs études (Badoud *et al.*, 2009; Saleh *et al.*, 2012) permettant un gain de temps et l'analyse d'échantillons de larges cohortes. De plus, le choix de ne pas faire subir d'étape de préparation d'échantillon à l'urine permet également de conserver la totalité des composants de l'échantillon, de le garder intact, ce qui est particulièrement intéressant lors de screening.

#### III.2.2.2. Séparation des composés d'intérêt par chromatographie liquide

La chromatographie liquide, comme décrit dans le chapitre I, est une méthode analytique permettant la séparation de composés chimiques dans des matrices simples ou complexes. Comme son nom l'indique, la phase mobile est liquide. C'est une technique de séparation très utilisée en raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications. La majorité des substances d'intérêt a déjà été analysée grâce à cette technique analytique. Une synthèse bibliographique non exhaustive des conditions analytiques relatées dans la littérature est présentée dans le Tableau III-11. Ce tableau récapitule les caractéristiques de la colonne analytique utilisée (nature et dimensions) et les conditions de séparation employées (phases mobiles, débit et température du four).

Dans la grande majorité des travaux cités, les substances d'intérêt analysées par chromatographie liquide sont séparées sur des colonnes de partage de type phase inverse C18. La phase inverse C18 est particulièrement adaptée à l'analyse des composés neutres présentant un rapport carbone/hétéroatomes élevé, et pour lesquelles la principale différence est l'hydrophobicité. Malgré une gamme de  $\log K_{\text{Octanol/eau}}$  s'étendant de -4,5 (diquat) à 19,3 (irganox 1010), la majorité des composés d'intérêt a déjà été analysée sur ce type de phase. Elle semble donc être adaptée aux contaminants environnementaux de notre étude. Cependant, le défi reste à développer une méthode de screening multirésidus sur des composés avec des propriétés physico-chimiques aussi variées.

Les paramètres des colonnes en chromatographie liquide, employées pour la séparation des substances étudiées dans notre étude, sont très diversifiés. En effet, les granulométries utilisées dans les travaux cités dans le Tableau III-11 varient entre 1,7 et 5  $\mu\text{m}$ , les longueurs des colonnes s'étendent de 50 à 250 mm et les diamètres internes se situent entre 2,0 et 4,6 mm. Le choix de géométrie des colonnes est guidé : (i) par le système de chromatographie liquide utilisé qui est limité en pression, (ii) par le système de détection et (iii) par le nombre de molécules à séparer. Par ailleurs, compte tenu des interactions entre la phase stationnaire de type C18 et les composés d'intérêt, et des géométries de colonnes sélectionnées dans ces travaux, des débits de l'ordre de 0,15 à 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  doivent être employés pour assurer une élution complète et une séparation des composés d'intérêt avec une durée satisfaisante.

Les solvants d'élution les plus utilisés sont le MeOH et l'ACN. Le choix du solvant organique à utiliser pour la séparation est guidé : (i) par le système de détection, (ii) par la contre-pression induite par l'utilisation de tel ou tel solvant et (iii) par le composé. De plus, avec un spectromètre de masse, le choix du solvant organique est guidé par la qualité de l'ionisation des molécules. De ce fait, selon les composés, le solvant optimal varie. Cependant, le méthanol est majoritairement employé car l'ionisation est favorisée avec ce solvant organique qui est un donneur de protons (Duderstadt et Fischer, 2008).

Au vu du grand nombre de composés sélectionnés dans notre étude et de leurs propriétés physico-chimiques très variées, nous nous sommes fixés l'objectif de séparer l'ensemble des composés en un minimum de temps. Nous avons décidé d'utiliser des granulométries relativement faibles (inférieures ou égales à 3,5  $\mu\text{m}$ ), ce qui permettrait de réduire le temps d'analyse sans perdre en efficacité de séparation et en résolution par une augmentation de la vitesse de travail et donc du débit d'analyse (Poole, 2003). Le choix de la longueur de la colonne s'est porté sur 100 mm. En effet, en choisissant des particules de diamètre réduit, une contre-pression importante peut être générée dans le système. Afin de pallier à ce problème, la longueur de la colonne peut être réduite. Cependant, avec plus de 60 composés à analyser, la colonne doit être suffisamment longue pour séparer l'ensemble des molécules. Pour ce qui est du diamètre interne, celui-ci doit être faible, car l'efficacité d'une colonne est inversement proportionnelle à son diamètre.

Finalement, dans l'objectif de développer une méthode multirésidus par HPLC-HRMS permettant de détecter, de quantifier et de séparer les différents contaminants environnementaux sélectionnés, nous nous sommes tournés vers une séparation sur une colonne de type phase inverse de longueur 100 mm, de diamètre interne 2,1 mm avec des particules de diamètre inférieur ou égal à 3,5  $\mu\text{m}$ .



A notre connaissance, certains composés ciblés n'ont jamais été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. En effet, par exemple, l'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium et le bis(2-ethylhexyl) phosphate sont généralement analysés par chromatographie gazeuse. Pour deux composés (le diquat et la paraquat), la chromatographie liquide de type HILIC est majoritairement utilisée en raison de la forte polarité de ces molécules (Whitehead Jr. *et al.*, 2010). Ces dernières peuvent être également analysées par chromatographie ionique (Ishibashi *et al.*, 2012). De plus, cinq composés (le dodécylbenzènesulfonate de sodium, la pyridine, le phosphate de tributyle, l'acide 4-hydroxybenzoïque et la 4-hydroxy acétophénone) ne sont pas répertoriés dans le Tableau III-11. En effet, d'après les recherches bibliographiques, ces derniers ne semblent pas avoir déjà été analysés par des techniques utilisant la chromatographie. L'objectif de cette étude est donc également de mettre au point des méthodes d'analyse pour ces composés pas encore analysés par chromatographie liquide en phase inverse et qui sont moins souvent recherchés.

Tableau III- 11 : Synthèse des méthodes d'analyse des substances sélectionnées en chromatographie liquide, gazeuse ou ionique couplée à la spectrométrie de masse

Référence	Analyte	Matrice	Système analytique	Colonne analytique (dimensions)	Conditions de séparation
(Ferrer <i>et al.</i> , 2011)	Bisphénol A Octylphénol Nonylphénol	Lait en poudre pour nourrissons	LC-MS/MS (QqQ)	Phenomenex Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm ; 5 µm)	(A) Eau + 0,1 % d'ammoniaque (B) MeOH/ACN (90/10 ; v/v) + 0,1 % d'ammoniaque 0,4 mL.min <sup>-1</sup>
(Gago-Ferrero <i>et al.</i> , 2013)	4-méthylbenzylidène camphre	Poissons	LC-MS/MS (QqQ)	Merck Hibar Purospher® STAR® HR R-18 ec. (50 mm x 2,0 mm ; 5 µm)	(A) Eau + 0,15 % d'acide formique (B) ACN + 0,15 % d'acide formique 0,3 mL.min <sup>-1</sup>
(Wiest <i>et al.</i> , 2011)	Carbendazime Méthomyl Imazalil	Miel Abeilles Pollen	LC-MS/MS (QqQ)	Macherey-Nagel Nucleodur Sphinx RP-C18 (50 x 2,0 mm ; 1,8 µm)	(A) Eau + 0,3 mM de formiate d'ammonium (B) MeOH 0,3 mL.min <sup>-1</sup> 40 °C
(Anagnostopoulos et Miliadis, 2013)	Chlorpyrifos-éthyl Cyprodinil Diméthoate Imazalil Ométhoate	Olives Huile d'olives	LC-MS/MS (QqQ)	Varian Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm x 2,1 mm ; 3,5 µm)	(A) Eau + 5 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique + 0,02 % d'ACN (B) MeOH + 5 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique 0,25 mL.min <sup>-1</sup>
(Carneiro <i>et al.</i> , 2013)	Cyprodinil Diméthoate Imazalil Linuron Méthomyl Ométhoate	Banane	LC-MS/MS (QqQ)	Shimadzu XR-ODS II (100 x 2,0 mm ; 2,2 µm)	(A) Eau + 10 mM d'acétate d'ammonium + 0,01 % d'acide formique 60 °C
(Malato <i>et al.</i> , 2011)	Ortho-phénylphénol Diuron Clopyralid	Fruits Légumes	LC-MS (ToF)	Agilent XDB-C18 (50 mm x 4,6 mm ; 1,8 µm)	ESI+ (A) Eau + 0,1 % d'acide formique (B) 95 % ACN/5 % d'eau (v/v) + 0,1 % d'acide formique 0,6 mL.min <sup>-1</sup> ESI- (A) 95 % Eau/5 % d'ACN (v/v) (B) 95 % ACN/5 % d'eau (v/v) 0,6 mL.min <sup>-1</sup>
(Baugros <i>et al.</i> , 2009)	Ethylène thiourée Méthamidophos Diméthoate 4-n-nonylphénol 4-tert octylphénol	Boues Matières en suspension Retombées atmosphériques	LC-MS/MS (QqQ)	Waters Uptispher C18 3HDO (100 x 2,0 mm ; 3 µm)	(A) Eau + 1,5 mM d'acétate d'ammonium (B) MeOH 0,3 mL.min <sup>-1</sup> 45 °C

Référence	Analyte	Matrice	Système analytique	Colonne analytique (dimensions)	Conditions de séparation
(Gorga <i>et al.</i> , 2013)	Méthylparabène	Eaux	LC-MS/MS (QqQ)	Merck Purospher STAR RP-18 (125 × 2,0 mm ; 5 µm)	ESI- (A) Eau (B) MeOH 0,3 mL.min <sup>-1</sup>
	Ethylparabène				
	Propylparabène				
	Bisphénol A				
	Octylphénol				
(Vela-Soria <i>et al.</i> , 2015)	Nonylphénol	Tissus placentaires humains	LC-MS/MS (QqQ)	Waters Acquity UPLC BEH C18 (50 × 2,1 mm ; 1,7 µm)	(A) Eau + 0,1 % d'ammoniaque (B) MeOH + 0,1 % d'ammoniaque 0,25 mL.min <sup>-1</sup> 40 °C
	Méthylparabène				
	Ethylparabène				
	Propylparabène				
	Butylparabène				
(Núñez <i>et al.</i> , 2008)	Bisphénol A	Sols	LC-MS/MS (QqQ)	Phenomenex Luna 5u C8 (150 × 4,6 mm ; 5 µm)	(A) Eau + 5 mM de formiate d'ammonium (B) MeOH + 5 mM de formiate d'ammonium 0,5 mL.min <sup>-1</sup>
	Isopropylparabène				
	Méthylparabène				
	Ethylparabène				
	Propylparabène				
(Bernal <i>et al.</i> , 2010)	Butylparabène	Plasma de rats	LC-FLD-MS (Q)	Phenomenex Synergi MAX-RP 80 (250 × 4,6 mm ; 4 µm)	(A) Eau + 20 mM d'acétate d'ammonium (B) ACN 1 mL.min <sup>-1</sup> 45 °C
	Glyphosate				
	Acide aminométhylphosphonique				
	Danofloxacin				
	Enrofloxacin				
(Geis-Asteggiant <i>et al.</i> , 2012)	Florfenicol	Muscles bovins	LC-MS/MS (QqQ)	Waters Acquity HSS T3 (100 x 2,1 mm ; 1,8 µm)	(A) 95 % Eau/5 % ACN + 0,1 % d'acide formique (B) ACN 0,5 mL.min <sup>-1</sup> 40 °C
	Difloxacin				
	Tilmicosine				
	Tylosine				
	Lévamisole				
(Zhan <i>et al.</i> , 2012)	Clorsulon	Lait	LC-MS/MS (QqQ)	Waters Acquity HSS-T3 (100 × 2,1 mm ; 1,8 µm)	(A) Eau + 0,5 mM d'acétate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique (B) MeOH + 0,1 % d'acide formique 0,4 mL.min <sup>-1</sup> 40 °C
	Dicyclanil				
	Diméthoate				
	Marbofloxacin				
	Enrofloxacin				
Danofloxacin					
Difloxacin					

Référence	Analyte	Matrice	Système analytique	Colonne analytique (dimensions)	Conditions de séparation
(Kmelár <i>et al.</i> , 2011)	Acéphate	Solvants organiques	LC-MS/MS (QqQ)	Agilent Zorbax Eclipse XDB C8 (150 x 4,6 mm ; 5 µm) Agilent Zorbax XDB C8 (100 x 2,1 mm ; 1,8 µm)	(A) Eau + 0,1 % d'acide formique ou 5 mM de formiate d'ammonium ou 5 mM d'acétate d'ammonium (B) ACN 0,6 mL.min <sup>-1</sup> 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 °C
	Carbendazime				
(Camilleri <i>et al.</i> , 2012)	Cyprodinil	Eaux de surface	LC-MS/MS (QqQ)	Phenomenex Kinetex XB-C18 Core Shell (100 × 2,1 mm ; 1,7 µm)	ESI - (A) Eau + 0,1 mM d'acétate d'ammonium (B) ACN 0,5 mL.min <sup>-1</sup> 60 °C
	Diméthoate				
	Diuron				
	Imazalil				
Méthamidophos	Linuron	Eaux de surface	LC-MS/MS (QqQ)	Phenomenex Kinetex XB-C18 Core Shell (100 × 2,1 mm ; 1,7 µm)	ESI - (A) Eau + 0,1 mM d'acétate d'ammonium (B) ACN 0,5 mL.min <sup>-1</sup> 60 °C
	Méthomyl				
Ométhoate	Procymidone	Eaux de surface	LC-MS/MS (QqQ)	Phenomenex Kinetex XB-C18 Core Shell (100 × 2,1 mm ; 1,7 µm)	ESI - (A) Eau + 0,1 mM d'acétate d'ammonium (B) ACN 0,5 mL.min <sup>-1</sup> 60 °C
	2,4-dichlorophénol				
Carbendazime	Diuron	Eaux de surface	LC-MS/MS (QqQ)	Phenomenex Kinetex XB-C18 Core Shell (100 × 2,1 mm ; 1,7 µm)	ESI - (A) Eau + 0,1 mM d'acétate d'ammonium (B) ACN 0,5 mL.min <sup>-1</sup> 60 °C
	4-n-nonylphénol				
4-tert octylphénol	4-méthylbenzylidène camphre	Eaux de surface	LC-MS/MS (QqQ)	Phenomenex Kinetex XB-C18 Core Shell (100 × 2,1 mm ; 1,7 µm)	ESI - (A) Eau + 0,1 mM d'acétate d'ammonium (B) ACN 0,5 mL.min <sup>-1</sup> 60 °C
	Linuron				
(Barón <i>et al.</i> , 2013)	3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A	Sédiments	LC-MS/MS (QqQ)	Waters Symmetry C18 column (150 x 2,1 mm ; 5 µm)	(A) Eau/MeOH (3:1 ; v/v) (B) MeOH 0,25 mL.min <sup>-1</sup>
	1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane				
(Mosch <i>et al.</i> , 2010)	Acide perfluorooctanoïque	Sérum humain Lait maternel humain	LC-MS/MS (QqQ)	Dr. Maisch ReproSil-Pur-ODS-3 (150 × 2,0 mm ; 5 µm)	(A) Eau + 2 mM d'acétate d'ammonium (B) MeOH 0,4 mL.min <sup>-1</sup> 35 °C
	Acide perfluorononanoïque				
(Van den Eede <i>et al.</i> , 2013)	Phosphate de dibutyle	Urine humaine	LC-MS/MS (QqQ)	Phenomenex Synergi Polar-RP (100 × 2,0 mm ; 2,1 µm)	(A) Eau + 10 mM d'acétate d'ammonium (B) MeOH 0,15 mL.min <sup>-1</sup> 35 °C
(Fuselli <i>et al.</i> , 2012)	Hexaméthylène tétramine	Fromage	LC-MS/MS (QqQ)	Agilent Zorbax 300SB-C8 (150 × 4,6 mm ; 5 µm)	(A) Eau + 0,05 % d'acide trifluoroacétique (B) ACN + 0,05 % d'acide trifluoroacétique 0,85 mL.min <sup>-1</sup> 35 °C

Référence	Analyte	Matrice	Système analytique	Colonne analytique (dimensions)	Conditions de séparation
(Schlee <i>et al.</i> , 2013)	4-méthylimidazole	Colorants caramel Cola	LC-MS/MS (QqQ)	Phenomenex Gemini RP 18 (200 × 2,00 mm ; 3 µm)	(A) Eau + 5 mM d'acétate d'ammonium (B) MeOH + 5 mM d'acétate d'ammonium 0,2 mL.min <sup>-1</sup> 35 °C
(Lashgari <i>et al.</i> , 2015)	Acide perfluoropentanoïque Acide perfluorooctanoïque Acide perfluorononanoïque	Eaux	LC-MS/MS (QqQ)	Phenomenex Luna C18 (150 × 4,6 mm ; 5 µm)	(A) Eau + 100 mM d'acétate d'ammonium (B) MeOH 1 mL.min <sup>-1</sup>
(Zabaleta <i>et al.</i> , 2015)	Acide heptafluorobutyrique Acide 1- decafluorohexanoïque Acide perfluorooctanoïque Acide perfluorononanoïque	Moules Poissons	LC-MS/MS (QqQ)	ACE UltraCore 2,5 SuperC18 (50 × 2,1 mm ; 2,5 µm)	(A) 95 % d'eau/5 % de MeOH (v/v) + 2 mM d'acétate d'ammonium + 5 mM 1-méthyl piperidine (B) 95 % de MeOH/5% d'eau (v/v) + 2 mM d'acétate d'ammonium + 5 mM 1-méthyl piperidine 0,3 mL.min <sup>-1</sup> 35 °C
(Kasiotis <i>et al.</i> , 2014)	λ-cyhalothrine Chlorpyrifos-éthyl Cyprodinil Diméthoate Imazalil Linuron	Abeilles Miel Pollen	LC-MS/MS (QqQ)	Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 2,1 mm ; 3,5 µm)	Eau + 5 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique + 0,02 % d'ACN MeOH + 5 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique 0,3 mL.min <sup>-1</sup>
(Prapamontol <i>et al.</i> , 2014)	O, O-diéthyl thiophosphate de potassium	Urine humaine	GC-MS (Q)	Agilent HP-5 (60 m × 0,25 mm ; 0,25 µm)	Helium
(Yoshida <i>et al.</i> , 2012)	Bis (2-éthylhexyl) phosphate	Urine humaine	GC-MS (Q)	J&W Scientific DB-5ms (30 m × 0,25 mm ; 0,25 µm)	Helium
(Aramendia <i>et al.</i> , 2006)	Diquat Paraquat	Huile d'olive	Chromatographie de paires d'ions-MS/MS (QqQ)	Waters Xterra C8 (150 × 2,1 mm ; 3 µm)	(A) Eau + 5 mM d'acide heptafluorobutyrique (B) 75 % d'ACN/25 % de MeOH 0,2 mL.min <sup>-1</sup> 40 °C
(Whitehead Jr. <i>et al.</i> , 2010)	Diquat Paraquat	Urine humaine	LC-MS/MS (QqQ)	Waters Atlantis HILIC (150 × 2,1 mm ; 5,0 µm)	(A) Eau + 250 mM de formiate d'ammonium (B) ACN 0,4 mL.min <sup>-1</sup>

### III.2.2.3. Détection des composés d'intérêt par spectrométrie de masse

De nombreuses méthodes sont décrites dans la littérature pour l'analyse de certaines familles de composés sélectionnées. Majoritairement, la détection est réalisée par spectrométrie de masse, comme décrit dans le Tableau III-11. En effet, cette technique présente de nombreux avantages cités précédemment dans le chapitre I.

#### III.2.2.3.1. Choix du mode d'ionisation préférentiel pour les composés d'intérêt

Comme présenté dans le chapitre I, la source electrospray (ESI) est la source d'ionisation la plus utilisée pour ces nombreux avantages. La majorité des substances d'intérêt ont déjà été analysées par spectrométrie de masse avec une source electrospray. Elles sont détectées sous forme d'adduits. De plus, au vu du grand nombre de molécules à analyser avec des propriétés physico-chimiques très différentes, la source electrospray semble être la plus apte pour l'analyse de l'ensemble de ces dernières. C'est pourquoi elle a été choisie pour cette étude. Cette dernière peut être utilisée en mode d'ionisation positif ou négatif selon la polarité de la différence de potentiel appliquée. Le Tableau III-12 synthétise l'étude bibliographique non exhaustive sur les modes d'ionisation des composés d'intérêt détectés en spectrométrie de masse avec une source ESI.

D'après ce tableau, nous constatons que parmi l'ensemble des composés d'intérêt sélectionnés, 30 molécules sont généralement ionisées en mode positif, 18 en mode négatif et sept dans l'un ou l'autre des modes d'ionisation. Le choix du mode d'ionisation positif ou négatif, pour les molécules qui sont rapportées par la littérature comme pouvant être analysées dans les deux modes d'ionisation, se fera lors de l'infusion des composés d'intérêt. De plus, pour sept molécules, aucune source bibliographique n'a été trouvée concernant l'ionisation de celles-ci par ESI. En effet, l'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium et le bis (2-ethylhexyl) phosphate sont généralement analysés par chromatographie gazeuse, ce qui explique le manque de données bibliographiques pour l'ionisation par ESI (Schenke, 2000). Pour cinq autres composés (le dodécylbenzènesulfonate de sodium, la pyridine, le phosphate de tributyle, l'acide 4-hydroxybenzoïque et la 4-hydroxy acétophénone), il ne semble pas y avoir déjà eu, à notre connaissance, d'analyses par spectrométrie de masse.

Tableau III- 12 : Synthèse des modes d'ionisation relevés dans la littérature lors de l'utilisation d'une source electrospray

Famille	Molécule	ESI Positif	ESI Négatif
	$\lambda$ -cyhalothrine	(Soler <i>et al.</i> , 2004; Wiest <i>et al.</i> , 2011)	
	Diméthoate	(Anagnostopoulos et Miliadis, 2013; Baugros <i>et al.</i> , 2009; Carneiro <i>et al.</i> , 2013; Gray <i>et al.</i> , 2012; Kmellár <i>et al.</i> , 2011; Zhan <i>et al.</i> , 2012)	
	Carbendazime	(Camilleri <i>et al.</i> , 2012; Gray <i>et al.</i> , 2012; Ishibashi <i>et al.</i> , 2012; Kmellár <i>et al.</i> , 2011; Vuković <i>et al.</i> , 2012; Wiest <i>et al.</i> , 2011; Zhan <i>et al.</i> , 2012)	
	Linuron	(Camilleri <i>et al.</i> , 2012; Carneiro <i>et al.</i> , 2013; Gray <i>et al.</i> , 2012; Kmellár <i>et al.</i> , 2011)	
	Diuron	(Camilleri <i>et al.</i> , 2012; Gray <i>et al.</i> , 2012; Kmellár <i>et al.</i> , 2011)	
	Imazalil	(Anagnostopoulos et Miliadis, 2013; Carneiro <i>et al.</i> , 2013; Kmellár <i>et al.</i> , 2011; Wiest <i>et al.</i> , 2011)	
	O,O-diéthyl thiophosphate de potassium		
	Cyprodinil	(Anagnostopoulos et Miliadis, 2013; Carneiro <i>et al.</i> , 2013; Kmellár <i>et al.</i> , 2011)	
	Chlorpyrifos-éthyl	(Anagnostopoulos et Miliadis, 2013)	
	Procymidone	(Kmellár <i>et al.</i> , 2011; Rodríguez <i>et al.</i> , 2002)	
	Ortho-phénylphénol		(Malato <i>et al.</i> , 2011)
	Méthomyl	(Ishibashi <i>et al.</i> , 2012; Kmellár <i>et al.</i> , 2011; Vuković <i>et al.</i> , 2012; Wiest <i>et al.</i> , 2011)	
	Diquat	(Aramendía <i>et al.</i> , 2006; Ishibashi <i>et al.</i> , 2012; Taguchi <i>et al.</i> , 1998; Whitehead Jr. <i>et al.</i> , 2010)	
	Paraquat	(Aramendía <i>et al.</i> , 2006; Taguchi <i>et al.</i> , 1998; Whitehead Jr. <i>et al.</i> , 2010)	
	Ethylène thiourée	(Baugros <i>et al.</i> , 2009)	
	Ométhoate	(Anagnostopoulos et Miliadis, 2013; Carneiro <i>et al.</i> , 2013; Kmellár <i>et al.</i> , 2011)	

Famille	Molécule	ESI Positif	ESI Négatif
Pesticides	Méthamidophos	(Baugros <i>et al.</i> , 2009; Carneiro <i>et al.</i> , 2013; Ishibashi <i>et al.</i> , 2012; Kmellár <i>et al.</i> , 2011; Wiest <i>et al.</i> , 2011)	
	Clopyralid	(Malato <i>et al.</i> , 2011)	(Chen <i>et al.</i> , 2013; Hao <i>et al.</i> , 2011)
	Glyphosate	(Bernal <i>et al.</i> , 2010)	(Chen <i>et al.</i> , 2013; Hao <i>et al.</i> , 2011)
	Acide aminométhylphosphonique	(Bernal <i>et al.</i> , 2010)	(Camilleri <i>et al.</i> , 2012)
	2,4-dichlorophénol		
	Acéphate	(Kmellár <i>et al.</i> , 2011)	
Médicaments vétérinaires	Florfenicol	(Geis-Asteggiane <i>et al.</i> , 2012)	(Salvia <i>et al.</i> , 2012)
	Tylosine	(Aguilera-Luiz <i>et al.</i> , 2012; Geis-Asteggiane <i>et al.</i> , 2012; Salvia <i>et al.</i> , 2012)	
	Tilmicosine	(Aguilera-Luiz <i>et al.</i> , 2012; Geis-Asteggiane <i>et al.</i> , 2012)	
	Danofloxacin	(Aguilera-Luiz <i>et al.</i> , 2012; Geis-Asteggiane <i>et al.</i> , 2012; Lopes <i>et al.</i> , 2012; Zhan <i>et al.</i> , 2012)	
	Enrofloxacin	(Aguilera-Luiz <i>et al.</i> , 2012; Geis-Asteggiane <i>et al.</i> , 2012; Lopes <i>et al.</i> , 2012; Zhan <i>et al.</i> , 2012)	
	Marbofloxacin	(Aguilera-Luiz <i>et al.</i> , 2012; Lopes <i>et al.</i> , 2012; Zhan <i>et al.</i> , 2012)	
	Difloxacin	(Aguilera-Luiz <i>et al.</i> , 2012; Geis-Asteggiane <i>et al.</i> , 2012; Zhan <i>et al.</i> , 2012)	
	Clorsulon		(Geis-Asteggiane <i>et al.</i> , 2012; Whelan <i>et al.</i> , 2010)
	Dicyclanil	(Salvia <i>et al.</i> , 2012; Zhan <i>et al.</i> , 2012)	
	Lévamisole	(Aguilera-Luiz <i>et al.</i> , 2012; Geis-Asteggiane <i>et al.</i> , 2012; Lopes <i>et al.</i> , 2012; Tong <i>et al.</i> , 2011)	
Retardateurs de flamme	3,3',5,5'-tétrabromobiphénol A		(Abb <i>et al.</i> , 2011; Barón <i>et al.</i> , 2013; Salvia <i>et al.</i> , 2012)
	1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane		(Abb <i>et al.</i> , 2011; Barón <i>et al.</i> , 2013)
	Phosphate de tributyle		(Van den Eede <i>et al.</i> , 2013)
Tensioactifs	Phosphate de dibutyle		
	Dodécylbenzènesulfonate de sodium		



Famille	Molécule	ESI Positif	ESI Négatif
Parabènes	Propylparabène		(Gorga <i>et al.</i> , 2013; Khedr, 2013; Lee <i>et al.</i> , 2006; Liao <i>et al.</i> , 2013; Núñez <i>et al.</i> , 2008; Pedrouzo <i>et al.</i> , 2009)
	Ethylparabène		(Gorga <i>et al.</i> , 2013; Lee <i>et al.</i> , 2006; Liao <i>et al.</i> , 2013; Núñez <i>et al.</i> , 2008; Pedrouzo <i>et al.</i> , 2009)
	Méthylparabène		(Gorga <i>et al.</i> , 2013; Lee <i>et al.</i> , 2006; Liao <i>et al.</i> , 2013; Núñez <i>et al.</i> , 2008; Pedrouzo <i>et al.</i> , 2009)
	Butylparabène	(Zhuang <i>et al.</i> , 2008)	(Lee <i>et al.</i> , 2006; Núñez <i>et al.</i> , 2008)
	Isopropylparabène		(Núñez <i>et al.</i> , 2008)
	Acide 4-hydroxybenzoïque		
Additifs plastiques	Irganox 1076	(Himmelsbach <i>et al.</i> , 2009; Pouech <i>et al.</i> , 2014)	(Himmelsbach <i>et al.</i> , 2009)
	Irganox 1010	(Himmelsbach <i>et al.</i> , 2009; Pouech <i>et al.</i> , 2014)	(Himmelsbach <i>et al.</i> , 2009)
	2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol	(Pouech <i>et al.</i> , 2014)	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
Filtres UV	Bisphénol A		(Camilleri <i>et al.</i> , 2012; Khedr, 2013)
	Glycérol monostéarate	(Pouech <i>et al.</i> , 2014)	
	4-méthylbenzylidène camphre	(Barón <i>et al.</i> , 2013; Camilleri <i>et al.</i> , 2012; Gago-Ferrero <i>et al.</i> , 2013)	
Alkylphénols	Cyasorb UV 9	(Pouech <i>et al.</i> , 2014)	
	4-tert octylphénol		(Camilleri <i>et al.</i> , 2012; Liu <i>et al.</i> , 2015)
	4-n-nonylphénol		(Camilleri <i>et al.</i> , 2012)
Composés perfluorés	Acide perfluorooctanoïque		(Lashgari <i>et al.</i> , 2015; Mosch <i>et al.</i> , 2010; Pan <i>et al.</i> , 2008)
	Acide heptafluorobutyrique		(Zabaleta <i>et al.</i> , 2015)
	Acide perfluoropentanoïque		(Lashgari <i>et al.</i> , 2015)
	Acide 1-decafluorohexanoïque		(Zabaleta <i>et al.</i> , 2015)
Non classés	Acide perfluorononanoïque		(Lashgari <i>et al.</i> , 2015; Mosch <i>et al.</i> , 2010; Pan <i>et al.</i> , 2008)
	Pyridine		
	Bis (2-ethylhexyl) phosphate		
	Hexaméthylène tétramine	(Fuselli <i>et al.</i> , 2012)	
	4-hydroxy acétophénone		
	4-méthylimidazole	(Schlee <i>et al.</i> , 2013)	

### III.2.2.3.2. Comparaison des spectromètres de masse de type QqQ et des spectromètres de masse haute résolution

La majorité des substances ciblées est analysée en mode multirésidus par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) en utilisant généralement des triples quadripôle en mode MRM, pour ses nombreux avantages décrits dans le chapitre I. Le Tableau III-11 illustre parfaitement cette tendance. Cependant, de plus en plus de méthodes multirésidus sont développées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS), avec des temps de vol (Peysson et Vulliet, 2013; Sivaperumal *et al.*, 2015), des analyseurs hybrides de type quadripôle-temps de vol (Boix *et al.*, 2014), ou des Orbitrap (Rajski *et al.*, 2014). Plusieurs études utilisent des systèmes LC-ToF pour mesurer des composés dans des échantillons biologiques, particulièrement dans l'urine (Cequier *et al.*, 2014; Saleh *et al.*, 2012). En effet, ces spectromètres de masse permettent le screening de l'ensemble des contaminants ciblés et non ciblés ainsi que la détection de métabolites et de produits de dégradation. En effet, contrairement aux spectromètres de masse de type triple quadripôle en mode MRM, les spectromètres de masse haute résolution ne sont pas limités sur le nombre de composés à détecter. De plus, ces derniers permettent l'analyse d'une gamme de masses plus large, pouvant aller jusqu'à 40 000 Da (Holčapek *et al.*, 2012). Quant aux limites de détection, celles-ci sont généralement plus faibles dans le cas de triple quadripôle en mode MRM. En revanche, les derniers spectromètres de masse haute résolution commercialisés sont de plus en plus sensibles et permettent d'atteindre des limites de détections égales à certains triples quadripôle (Herrero *et al.*, 2014). Néanmoins, les objectifs d'étude sont différents sur ces deux types d'appareils.

### III.2.3. Qualification des performances analytiques et validation des méthodes

Afin de décrire et définir les limites et performances d'une méthode analytique, il est important de la valider selon des processus qu'il convient de définir et de préciser, notamment si les méthodes de validation utilisées ne sont ni standardisées ni normalisées. La validation de la méthode passe par la détermination de plusieurs caractéristiques que nous allons définir : les critères pour identifier et quantifier les composés ; la répétabilité et la précision intermédiaire, critères permettant l'évaluation de la précision ; les effets de matrice et les limites de détection et de quantification.

### III.2.3.1. Critères d'identification des composés et spécificité d'une méthode d'analyse

Selon la technique analytique employée, les normes européennes indiquent les critères d'identification recommandés, ainsi que leur nombre. Ces critères, notamment ceux dans le cas d'une analyse par HPLC-HRMS, sont décrits dans le paragraphe I.6.2.1 du chapitre I (Commission of the European Communities, 2002).

### III.2.3.2. Précision

La précision caractérise le degré de concordance entre les valeurs mesurées obtenues par des mesures répétées sur les objets identiques ou similaires dans des conditions spécifiées (Kruve *et al.*, 2015a). Trois critères peuvent être envisagés pour l'évaluation de la précision d'une méthode : la répétabilité, la précision intermédiaire et la reproductibilité. La différence entre ces critères correspond au nombre de facteurs variant entre chaque analyse.

Il convient tout d'abord de rappeler que pour la détermination de ces critères, il est judicieux de préparer des échantillons indépendants (Araujo, 2009; Kruve *et al.*, 2015b), afin de mesurer une réelle variation de préparation et d'analyse et non juste les variations du module d'injection du système ou du détecteur. Ces dernières valeurs, généralement accessibles dans les spécifications des appareils, ne présentent pas d'intérêt à être mesurées seules.

La répétabilité est mesurée par injection de répliqués d'échantillons de même concentration préparés indépendamment un jour donné par le même manipulateur, analysés sur le même appareil et dans les mêmes conditions analytiques. La répétabilité devrait donner la plus petite variation dans les résultats. Selon le document « guidance for industry bioanalytical method validation » de la Food and Drug Administration (FDA) (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2001), appliqué aux échantillons biologiques, la détermination de la répétabilité se fait sur trois niveaux de concentration par un minimum de cinq mesures.

La précision intermédiaire, correspond à la modification d'un ou plusieurs des paramètres d'étude tels que le manipulateur, le stock de solution standard, le jour ou bien l'appareil d'analyse. Cette notion de précision intermédiaire peut être traduite du document de la Commission Européenne 2002/657/EC (Commission of the European Communities, 2002) comme « reproductibilité au laboratoire » et nécessite la réalisation d'un minimum de six mesures. La FDA regroupe précision intermédiaire et répétabilité et recommande pour ces deux critères le même nombre de mesures sur les mêmes niveaux de concentration. Dans

notre cas, deux paramètres ont été modifiés, à savoir le jour et la solution mère de dopage. Cette dernière a été refaite chaque jour de validation.

Une répétabilité et une précision intermédiaire sont satisfaisantes lorsque les valeurs des coefficients de variation (CVs) des réponses sont inférieures à 20 % pour la concentration basse et inférieures à 15 % pour les autres concentrations.

### III.2.3.3. Exactitude (Kruve *et al.*, 2015b)

L'exactitude d'un résultat de mesure se réfère à l'étroitesse de l'accord entre la valeur mesurée et valeur acceptée soit comme valeur vraie soit comme valeur de référence. La principale différence avec la justesse est que l'exactitude peut être appliquée à un résultat individuel et pas seulement à la moyenne d'un grand nombre de résultats. L'exactitude de la méthode se rapporte à la capacité de la méthode à fournir des résultats précis. En tant que telle, l'exactitude d'une méthode est affectée par des composantes d'erreurs systématiques (biais) ainsi que des composantes d'erreurs aléatoires. L'exactitude est exprimée quantitativement comme l'incertitude de mesure. Un certain nombre d'organismes de réglementation (FDA, EMA) définissent l'exactitude comme le degré d'accord entre la valeur expérimentale, obtenue par des mesures répétées, et la valeur de référence acceptée qui est identique à la définition de la justesse. La FDA recommande la détermination de l'exactitude sur trois niveaux de concentration par un minimum de cinq mesures. La gamme acceptable est comprise entre 85 et 115 % pour les concentrations moyenne et haute, et entre 80 et 120 % pour la concentration basse. L'exactitude est définie par l'équation suivante (Equation III-1) :

$$\text{Exactitude} = 100 - \left( \frac{\text{Concentration calculée}_{\text{moyenne}}}{\text{Concentration exacte}} - \text{Concentration exacte} \right) \times 100$$

Equation III- 1 : Calcul de l'exactitude

### III.2.3.4. Effets de matrice

Les effets de matrice ont été définis dans le paragraphe II.2.4.3 du chapitre II comme les influences du milieu analysé sur la réponse d'un composé. Ils peuvent conduire à d'importantes augmentations ou inhibitions de signal entraînant des erreurs non négligeables, d'où l'importance de les déterminer. Les directives de la FDA recommandent l'évaluation des effets de matrice. Cependant, celles-ci n'expliquent pas comment les déterminer. De ce fait, ce critère a été évalué selon les directives de The European Medicines Agency (EMA) pour la validation des méthodes bioanalytiques, qui détaillent la procédure à suivre (European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011). Ces directives

sont largement utilisées dans le cas de matrices biologiques (Iqbal *et al.*, 2015; Tomšíková *et al.*, 2014). Ainsi, les effets de matrice ont été déterminés en utilisant six lots de matrices de différents donneurs et six blancs d'eau MilliQ dopés à deux concentrations différentes (concentrations basse et haute). Les effets de matrice moyens ont été calculés d'après ceux déterminés à partir des différents lots. Selon ces directives, les effets de matrice doivent être évalués pour chaque analyte et étalon interne. Nous avons choisi de faire une calibration par « matrix-matched » et de ne pas utiliser d'étalons internes. Par conséquent, les effets de matrice ont été calculés seulement pour les substances d'intérêt de la même façon que dans le chapitre II, selon l'Equation II-6.

### III.2.3.5. Limites de détection et de quantification

La limite de détection (ou limit of detection, « LOD ») est définie comme la plus faible concentration à laquelle le composé peut être détecté (Taverniers *et al.*, 2004). Par analogie, la limite de quantification (ou limit of quantification, « LOQ ») est associée à la plus petite concentration qui permet de quantifier avec un certain niveau de précision. D'après la FDA (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2001), la LOQ doit être déterminée avec une exactitude comprise entre 80 et 120 % et des valeurs de coefficient de variation de la répétabilité et de la précision intermédiaire inférieures à 20 %. Dans le domaine de la chimie analytique et de la pratique, plusieurs approches existent afin de déterminer ces valeurs (Kruve *et al.*, 2015a; Vial et Jardy, 1999). La première consiste simplement à évaluer visuellement à partir de quel niveau de concentration l'utilisateur pense pouvoir confirmer la présence ou certifier la concentration, donnant une forte variation des résultats en fonction de l'utilisateur. La deuxième approche correspond à l'une des plus couramment utilisées. Les LOD et les LOQ sont déterminées comme la concentration d'analyte produisant un pic chromatographique avec un rapport signal sur bruit de, respectivement, trois et dix fois le bruit de fond. Néanmoins, lorsque la matrice n'est pas blanche, exempte du composé, une autre approche est préférée. Cette dernière approxime la valeur de dispersion dans le blanc par comparaison entre le bruit de fond moyen au temps de rétention du composé et le signal détecté dans un échantillon très faiblement concentré (Kruve *et al.*, 2015a; Stöckl *et al.*, 2009). Cette approche est particulièrement utilisée lorsqu'un échantillon biologique est analysé. En effet, il est difficile d'obtenir un échantillon biologique exempt de tous contaminants environnementaux, notamment l'urine. Dans notre cas, cette dernière approche sera utilisée dans le cas où le composé d'intérêt est présent dans le pool d'urine. Concernant les composés pour lesquels ce n'est pas le cas, les LOD et les LOQ seront déterminées par évaluation du rapport signal sur bruit.

### III.2.3.6. Validation de la linéarité d'une méthode (Kruve *et al.*, 2015b)

Les processus de validation de méthode recommandent également de valider la linéarité. Ce terme linéarité du signal peut, dans le contexte du couplage LC-MS, avoir deux significations étroitement liées : (1) relation linéaire entre les signaux d'analyte et des concentrations d'analyte dans des échantillons d'étalonnage ; (2) relation linéaire entre les signaux d'analyte et des concentrations d'analyte dans des échantillons contenant des composants de la matrice. Cette dernière signification, appelée aussi « matrix-matched » est de plus en plus utilisée car cette stratégie permet de tenir compte des effets de matrice lors de l'étalonnage. De plus, nous pouvons considérer que si le signal d'analyte dans les échantillons est linéaire alors il sera certainement linéaire dans des solutions d'étalonnage, tandis que l'inverse n'est pas nécessairement vrai.

La linéarité du signal dans un procédé LC-MS est influencée par plusieurs facteurs :

- La source d'ionisation : la quantité d'ions générés par la source d'ionisation est proportionnelle à la concentration en analyte à de faibles concentrations. La source d'ionisation se comporte donc de façon linéaire. Cependant, ce n'est pas le cas à des concentrations plus élevées. En effet, l'excès de charge ou de la surface des gouttelettes devient limitant. De plus, les coélutions peuvent nettement influencer le processus d'ionisation, notamment avec la source ESI.
- Le transfert des ions de la source à l'analyseur : l'efficacité de transmission n'est pas constante. Par conséquent, la quantité d'ions formés dans la source n'est pas proportionnelle à la quantité d'ions arrivant au niveau de l'analyseur.
- L'analyseur : les triple quadripôle fonctionnent en mode continu et affichent une très bonne linéarité. Pour les temps de vol, ces derniers fonctionnent en mode pulsé et la linéarité peut être affectée par la quantité de charges collectées dans l'analyseur.

Il est important de savoir que la linéarité de la courbe d'étalonnage est étroitement liée au modèle d'étalonnage et à la plage analytique choisie. Le terme « linéaire » en mathématiques souvent ne se réfère pas à une relation linéaire, mais plutôt au fait que les modèles statistiques considérés sont linéaires, incluant donc les relations polynomiales.

La majorité des directives de validation de méthode accepte un minimum de six niveaux de concentration, réalisés en duplicat. De plus, l'étalonnage dans la matrice sera préféré. La pratique la plus courante pour déterminer le modèle mathématique de la courbe de calibration est l'utilisation du coefficient de corrélation  $r$  ou du coefficient de détermination  $R^2$ . Bien que  $R^2$  soit inadapté pour valider la linéarité de la courbe d'étalonnage, il est effectivement approprié pour estimer le modèle d'étalonnage linéaire.

### III.3. Matériels et méthodes

#### III.3.1. Standards et réactifs

##### III.3.1.1. Standards analytiques

Diuron, carbendazime, marbofloxacin, difloxacin, phosphate de tributyle, ométhoate, méthamidophos, lévamisole, cyprodinil, bisphénol A, phosphate de dibutyle, bis(2-ethylhexyl) phosphate, acide perfluoropentanoïque, acide 1-decafluorohexanoïque, O,O-diéthyl thiophosphate de potassium, acide perfluorononanoïque, cloruslon, acéphate, butylparabène, propylparabène, méthylparabène, éthylparabène, diméthoate, imazalil, acide perfluorooctanoïque, glyphosate, cyasorb UV 9, 2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol, linuron, danofloxacin, enrofloxacin, dicyclanil, acide heptafluorobutyrique, ortho-phénylphénol, acide 4-hydroxybenzoïque, dodécylbenzènesulfonate de sodium, éthylène thiourée, 4'-hydroxy acétophénone, méthomyl, 4-méthylbenzylidène camphre, cyprodinil, procymidone, diquat, clopyralid, chlorpyrifos-éthyl, paraquat, 3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A, 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane, 2,4-dichlorophénol, 4-tert-octylphénol, 4-nonylphénol, florfenicol, tilmicosine, pyridine, hexaméthylène tétramine, 4-méthylimidazole, irganox 1010, irganox 1076, glycérol monostéarate et tylosine ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). La  $\lambda$ -cyhalothrine provient du Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburg, Germany). L'isopropylparabène a été obtenu par Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). L'acide aminométhylphosphonique a été acheté auprès de Chem Service (Westchester, Etats-Unies).

Les solutions mères individuelles ont été préparées à des concentrations de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans du méthanol (MeOH), de l'acétonitrile (ACN), du N, N-diméthylformamide (DMF) ou de l'eau en fonction des propriétés spécifiques de solubilité du composé. Ces solutions ont été stockées à  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ , à l'exception de celles qui ont été préparées dans de l'eau qui ont été stockées à  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Les mélanges de solutions de composés ont été préparés à partir des solutions mères individuelles et dilués pour obtenir des concentrations appropriées. Toutes les solutions standards sont stockées dans des flacons en verre.

##### III.3.1.2. Solvants

Le MeOH (qualité LC-MS), l'ACN (qualité LC-MS), l'acide formique (qualité LC-MS), l'acide acétique (qualité LC-MS), le formiate d'ammonium (qualité LC-MS) et l'acétate d'ammonium (qualité LC-MS) ont été achetés auprès de Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le DMF a été acheté auprès de BiosolveChimie (Dieuze, France). L'eau

ultra-pure sans perturbateur endocrinien a été obtenue à partir d'un dispositif MilliQ de Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

### III.3.2. Processus d'échantillonnage et préparation d'échantillon

#### III.3.2.1. Processus d'échantillonnage

Différentes campagnes de collecte d'urines humaines ont été réalisées au cours de ma thèse. Pour la validation de méthode, un pool d'urines a été constitué. Pour cela, des échantillons d'urines ont été recueillis à partir de huit volontaires en bonne santé, au même moment, après le déjeuner, pour plus de commodité, autant d'hommes que de femmes, âgés de 22 à 61 ans. La méthode développée a été appliquée à des échantillons réels, les premières urines du matin de 17 individus, dix hommes et sept femmes. En effet, ces urines sont généralement les plus concentrées de la journée (Cornelis *et al.*, 1996). Tous les échantillons recueillis proviennent de collègues de l'Institut des Sciences Analytiques. Après la collecte, chaque échantillon d'urine a été aliquoté et conservé au congélateur à -20 °C jusqu'à l'analyse, pour des raisons de stabilité (Fernández-Peralbo et Luque de Castro, 2012). Les échantillons sont collectés sans conservateur et aliquotés dans des flacons en verre propre à usage unique. Pour tous les échantillons, les étapes de collecte, d'aliquotage et de conservation sont réalisées au même moment afin que l'état de dégradation des composés dans l'urine soit le même dans chaque échantillon. En effet, l'urine est une source riche en nutriments pour les microorganismes, comprenant les bactéries, les levures et les moisissures. De plus, elle contient des enzymes qui peuvent modifier les substances d'intérêt ainsi que les molécules contenues dans celles-ci (Kuenen et Konings, 2010).

#### III.3.2.2. Préparation d'échantillon

Les échantillons d'urines n'ont pas subi d'étape de préparation d'échantillon afin d'éviter la perte d'informations et d'analyser tous les composés ciblés ayant des propriétés physico-chimiques variées. Avant l'analyse, chaque échantillon d'urine a été décongelé à température ambiante. Cependant, après un cycle de congélation et de décongélation, les échantillons d'urines deviennent troubles. En effet, l'urine peut contenir des concentrations importantes de matières en suspension, incluant des calculs, des composants cellulaires ou encore des fragments de protéines précipitées (Fernández-Peralbo et Luque de Castro, 2012). Afin d'injecter l'échantillon le plus clair possible et ne pas obstruer l'injecteur ou la colonne chromatographique, les échantillons d'urines sont laissés à reposer pendant quelques minutes



pour que les protéines et les matières en suspension décantent. Seul le surnageant a été utilisé pour l'analyse.

Chaque échantillon d'urine collecté est différent d'un individu à l'autre en raison de plusieurs facteurs, comme l'âge, le sexe, l'alimentation, le moment de la collecte de l'échantillon et de son volume (Veselkov *et al.*, 2011). Par conséquent, la concentration des composés et des métabolites dans l'urine sont très fortement variables (Warrack *et al.*, 2009). De ce fait, pour la validation de l'analyse multirésidus, les urines ont été poolées afin de s'affranchir des différences entre chaque échantillon d'urine.

Pour la calibration par la méthode « matrix-matched », les aliquots d'urines poolées ont été dopés avec un mélange de standards des substances d'intérêt à la concentration souhaitée, constituant ainsi les points de gamme. Ce dopage cause une dilution de chaque point de gamme avec un facteur de dilution égale à 1,2 pour la validation et la calibration. Afin d'avoir le même facteur de dilution entre les points de gamme et les échantillons réels, ces derniers ont été dilués par ajout d'eau MilliQ. De plus, le facteur de dilution est relativement faible, ce qui permet de limiter la perte d'informations.

Le développement analytique a été réalisé dans de l'eau MilliQ dopée à  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  par l'ajout d'un mélange de solutions de composés ciblés.

### III.3.3. Analyse par HPLC-HRMS

La séparation par chromatographie liquide est réalisée sur un système UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific<sup>®</sup>, MA, USA) series LC comprenant une pompe ternaire, un échantillonneur réfrigéré et un compartiment pour la colonne. La séparation des composés ionisés en mode positif a été réalisée avec une colonne en phase inverse XSelect CSH (2,1 x 100 mm ; 3,5  $\mu\text{m}$ ) de Waters<sup>®</sup> (Mississauga, Canada). Les phases mobiles utilisées sont (A) 0,1 % d'acide formique et 10 mM de formiate d'ammonium dans de l'eau MilliQ et (B) 0,1 % d'acide formique et 10 mM de formiate d'ammonium dans de l'acétonitrile avec le gradient suivant : 2 % (B) pendant 3 min, de 2 % à 100 % (B) en 7 min et 100 % pendant 10 min. La séparation des composés ionisés en mode négatif a été réalisée avec une colonne en phase inverse Kinetex (2,1 x 100 mm ; 2,6  $\mu\text{m}$ ) de Phenomenex<sup>®</sup> (Torrance, USA). Les phases mobiles utilisées sont (A) 0,05 % d'acide acétique dans de l'eau MilliQ et (B) 0,05 % d'acide acétique dans de l'acétonitrile avec le gradient suivant : 5 % (B) pendant 3 min, de 5 % à 32 % (B) en 12 min, de 32 % à 50 % (B) en 14 min et 100 % pendant 5 min. Pour les deux modes d'ionisation, le débit est de  $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$ , le volume d'injection est de 5  $\mu\text{L}$ , et la température du four de la colonne est de 50 °C.

Le système de détection, un spectromètre de masse MicroTOF Q II (Bruker Daltonics® GmbH, Bremen, Germany), un quadripôle et un temps de vol à accélération orthogonale en tandem, équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI, Apollo), est relié au système chromatographique (Figure III-1).

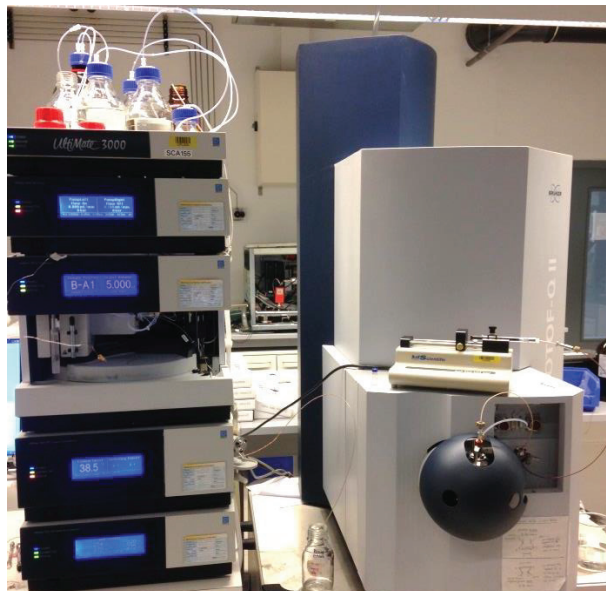
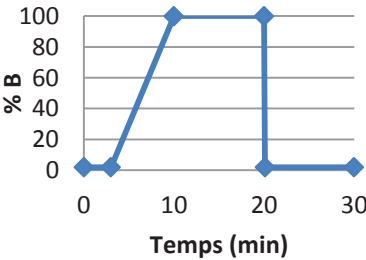
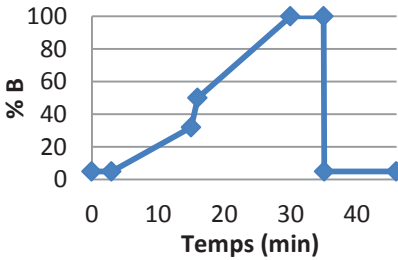


Figure III- 1 : Photographie du système UHPLC Ultimate 3000-MicroTOF Q II utilisé

Le voltage du capillaire est de - 3500 V et + 2500V, respectivement, dans le mode d'ionisation electrospray positif et négatif. Pour les deux modes d'ionisation, la température de la source est de 250 °C, la pression du gaz de nébulisation (N<sub>2</sub>) est de 3 bars et le débit du gaz de séchage (N<sub>2</sub>) est de 12 L.min<sup>-1</sup>. Les données ont été acquises pendant 20 min et pendant 35 min, respectivement, dans le mode d'ionisation positif et négatif de 50 à 1000 Da, en utilisant le logiciel MicroTOF Control (Bruker Daltonics® GmbH). Chaque solution de standard analytique à 1 µg.mL<sup>-1</sup> a été infusée dans le spectromètre de masse à 5 µL.min<sup>-1</sup>. Une calibration externe du spectromètre de masse a été réalisée avant chaque séquence avec du formiate de sodium, constitué de 200 mg de NaOH, 250 mL d'isopropanol et de 1 mL d'acide formique. De plus, la calibration a également été réalisée en mode externe proche sur chaque échantillon, au début de l'analyse, par l'intermédiaire d'un système de valve et d'une seringue avec pompe. Tous les échantillons ont été acquis avec un segment, en début de run dans la méthode, correspondant à la calibration externe proche par du formiate de sodium. Ce segment a été inséré dans la méthode de 0,1 min à 0,5 min. La résolution de masse était de 7 000 (FWHM) (pour un rapport m/z égal à 200 Da). L'ensemble des paramètres des méthodes est répertorié dans le Tableau III-13.

Tableau III- 13 : Conditions analytiques des méthodes développées

		ESI +	ESI -
LC	Colonne	Waters XSelect CSH (2,1 x 100 mm; 3,5 $\mu$ m)	Phenomenex Kinetex (2,1 x 100 mm; 2,6 $\mu$ m)
	Température	50 °C	
	Volume d'injection	5 $\mu$ L	
	Débit	0,5 mL.min <sup>-1</sup>	
	Phases mobiles	(A) Eau MilliQ + 10 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique (B) ACN + 10 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique	(A) Eau MilliQ + 0,05 % d'acide acétique (B) ACN + 0,05 % d'acide acétique
Gradient			
MS	Gamme de masses	50-1000 Da	
	Voltage du capillaire	- 3500 V	+ 2500 V
	Température de la source	250 °C	
	Pression du gaz de nébulisation	3 bars	
	Débit du gaz de séchage	12 L.min <sup>-1</sup>	

### III.3.4. Traitement de données

L'analyse des données a été effectuée en utilisant la version 1.3 du logiciel DataAnalysis (Bruker Daltonics® GmbH), avec l'application QuantAnalysis. Les échantillons ont été analysés en mode full-scan. Après cela, un chromatogramme d'ion extrait à la masse exacte correspondant à la molécule protonée  $[M + H]^+$ , déprotonée  $[M-H]^-$  ou divers adduits, avec une fenêtre de masse de 50 mDa, est obtenu. Si un pic chromatographique est présent au même temps de rétention que le standard, la masse exacte expérimentale est mesurée et comparée à la masse exacte théorique calculée à partir de la formule brute, en utilisant le programme IsotopePattern (Bruker Daltonics® GmbH). En plus de l'utilisation de la masse précise, la déviation du massif isotopique entre le spectre expérimental et le théorique a été utilisée. Cependant, avec un instrument HRMS, habituellement seuls deux critères d'identification sont utilisés. Dans notre étude, l'identification des analytes est basée sur : (i)

la comparaison des temps de rétention de l'analyte et du composé standard ( $\pm 0,1$  min) ; (ii) la différence entre la masse exacte théorique et la masse exacte mesurée de l'analyte ( $\leq 5$  ppm) ; et, quand les réponses le permettent, sur (iii) la différence entre le profil isotopique théorique et l'expérimental ( $\leq 30$  msigma).

La quantification des analytes a été réalisée en utilisant une calibration en mode « matrix-matched », c'est-à-dire dans le pool d'urines, avec une gamme de 18 points de 2,5 ng.mL<sup>-1</sup> (C1) à 250,0 ng.mL<sup>-1</sup> (C18). Ces 18 points de gamme couvrent toutes les concentrations des gammes de calibration de chaque composé. Toutes les injections ont été réalisées en duplicat.

### III.3.5. Validation de méthode

La procédure de validation de l'ensemble de la méthode a été réalisée à partir du pool d'urines dopées de volontaires. Les méthodes analytiques ont été validées selon les directives de la méthode de validation bioanalytique adoptées par la Food and Drug Administration (FDA) (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2001). La procédure de validation inclut la courbe d'étalonnage, la répétabilité, la précision intermédiaire, l'exactitude et les limites de détection et de quantification. La stabilité des composés d'intérêt dans les échantillons d'urines n'a pas été évaluée, puisque la méthode a été développée pour l'analyse d'échantillon d'urine frais ou ayant subi un seul cycle de congélation et de décongélation.

Le meilleur modèle mathématique de la courbe d'étalonnage a été déterminé en évaluant la réponse de chaque composé à partir du pool d'urines dopées sur une gamme de concentration allant de 2,5 à 250,0 ng.mL<sup>-1</sup>. Le modèle a été évalué en duplicat, sur trois jours pour chaque composé.

La répétabilité a été déterminée selon trois concentrations (faible, moyenne et haute) par cinq répétitions pour chaque composé. La concentration haute correspond à celle s'approchant de la plus forte concentration de la courbe de calibration, soit approximativement 225,0 ng.mL<sup>-1</sup> pour l'ensemble des composés. La concentration moyenne correspond à la concentration du milieu de la gamme, soit approximativement 150,0 ng.mL<sup>-1</sup>. Les concentrations faibles testées, correspondant à environ trois fois la LOQ, sont 112,5 ng.mL<sup>-1</sup>, 62,5 ng.mL<sup>-1</sup> et 30,0 ng.mL<sup>-1</sup>, pour le mode d'ionisation positif ; et 62,5 ng.mL<sup>-1</sup>, 20,0 ng.mL<sup>-1</sup> et 5,0 ng.mL<sup>-1</sup> pour le mode d'ionisation négatif. Puisque chaque composé n'a pas eu la même gamme de calibration, les concentrations faibles ont été différentes pour chacun d'eux. Cependant, des molécules ont pu être regroupées afin de limiter le nombre d'injection pour la faible concentration. La précision intermédiaire a été

déterminée selon trois concentrations, les mêmes que pour la répétabilité, sur cinq répétitions pour chaque concentration, sur trois jours. La répétabilité et la précision intermédiaire ont été exprimées en coefficient de variation (CV, %) pour chaque concentration. Celles-ci ont été déterminées à partir des concentrations calculées grâce à l'équation de la courbe de calibration obtenue selon le modèle mathématique optimal.

L'exactitude a été déterminée aux trois mêmes concentrations (faible, moyenne et haute) que pour la répétabilité et la précision intermédiaire sur cinq répétitions pour chaque concentration. Elle est exprimée en pourcentage pour chaque concentration. Tout comme la répétabilité et la précision intermédiaire, elle a été déterminée à partir des concentrations calculées grâce à l'équation de la courbe de calibration obtenue selon le modèle mathématique optimal.

La LOD et la LOQ ont été déterminées comme la concentration d'analyte produisant un pic chromatographique avec un rapport signal sur bruit de, respectivement, trois et dix fois le bruit de fond à partir des chromatogrammes d'ions extraits. Néanmoins, quelques composés étaient déjà présents dans le pool d'urines. Dans ce cas, la détermination de ces limites a donc été réalisée d'après l'écart-type du bruit de fond. Pour ces substances, les LOD et LOQ ont été déterminées de la façon suivante, respectivement : moyenne du bruit de fond d'un blanc + 3 coefficient de variation du blanc et moyenne du bruit de fond d'un blanc + 10 coefficient de variation du blanc (Stöckl *et al.*, 2009). Dans un premier temps, il est nécessaire d'injecter une série d'échantillon de matrice blanche (sans dopage) pour déterminer le coefficient de variation du blanc, ainsi que la moyenne du bruit de fond. Dans un second temps, des échantillons dopés entre 1,0 et 5000,0 ng.mL<sup>-1</sup> ont été injectés. Après cette première estimation des LOD et des LOQ, la gamme de concentration a été réduite, allant de 2,5 à 250,0 ng.mL<sup>-1</sup>. Ainsi, chaque gamme de concentration a été injectée deux fois permettant la détermination des valeurs de LOD et LOQ. La LOQ est déterminée avec une exactitude comprise entre 80 et 120 % et des valeurs de coefficient de variation de la répétabilité et de la précision intermédiaire inférieures à 20 % (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2001).

Les effets de matrice ont été déterminés selon les directives de The European Medicines Agency (EMA) pour la validation des méthodes bioanalytiques (European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011), en utilisant six lots de matrices de différents donneurs et six blancs d'eau MilliQ dopés à deux concentrations différentes (concentration basse et haute), les mêmes concentrations basse et haute que celles choisies pour l'évaluation de la répétabilité, de la précision intermédiaire et de l'exactitude.

#### III.4. Résultats et discussion

Un schéma récapitulatif du développement, de l'optimisation des méthodes et du processus de validation de méthode est présenté dans la Figure III-2.

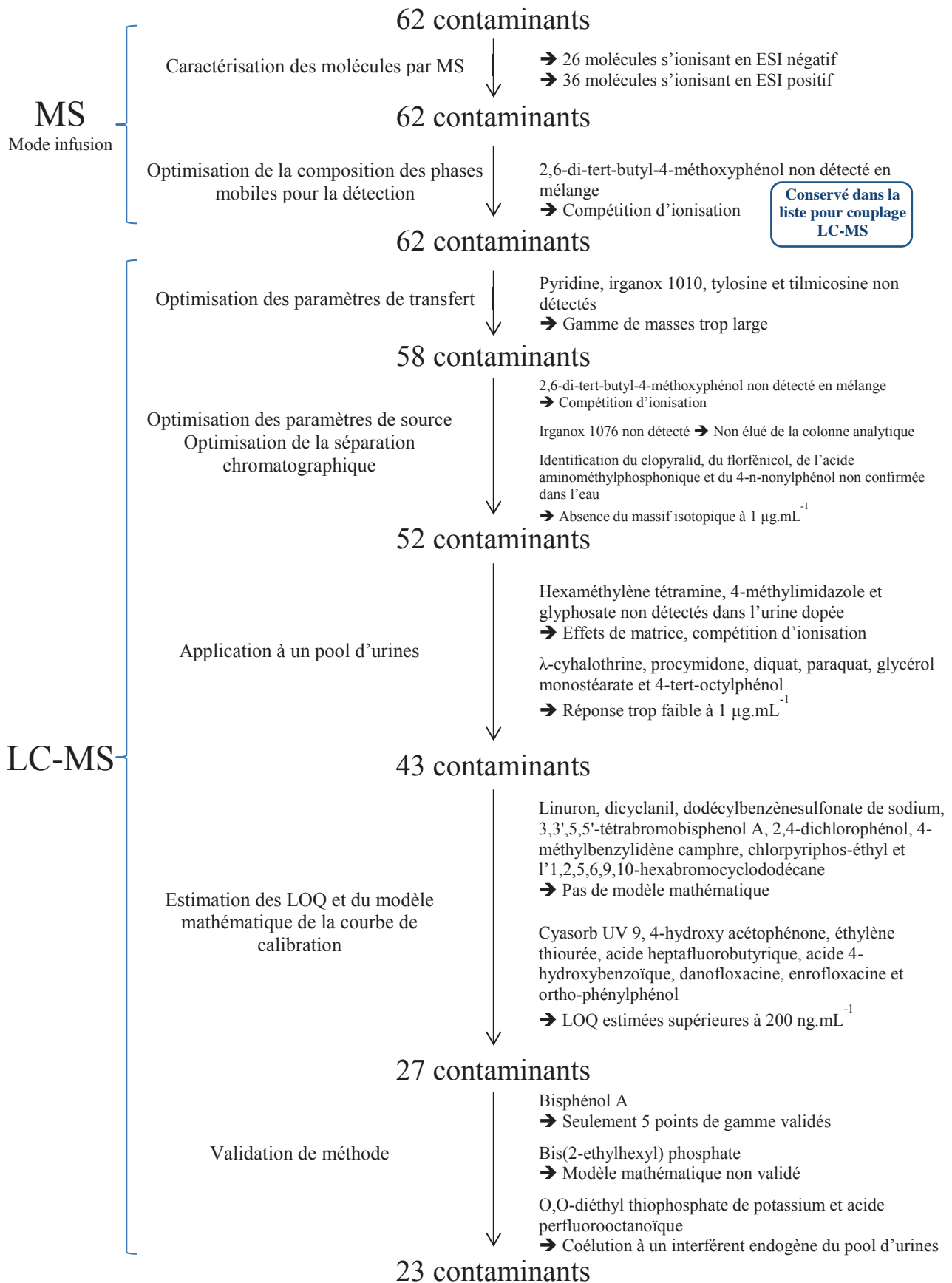


Figure III- 2 : Schéma récapitulatif du développement, de l'optimisation des méthodes et du processus de validation de méthode

### III.4.1. Développement analytique

Le développement analytique s'est déroulé en deux étapes, avec tout d'abord l'optimisation de l'étape de détection des composés ciblés par spectrométrie de masse, puis l'optimisation de l'étape de séparation par chromatographie liquide.

#### III.4.1.1. Optimisation de la détection des composés par spectrométrie de masse

L'optimisation de la détection des composés par spectrométrie de masse se compose de nombreuses sous-étapes, avec tout d'abord la caractérisation des composés, puis l'optimisation des conditions de détection. Celles-ci comprennent la composition des phases mobiles, les paramètres de transfert et ceux de la source d'ionisation.

##### III.4.1.1.1. Caractérisation des composés par spectrométrie de masse

La première étape de l'optimisation de la détection des composés par spectrométrie de masse consiste à infuser les solutions mères de standards analytiques de chaque substance d'intérêt. Ainsi, chaque solution est analysée par introduction directe, afin de caractériser les composés par le spectromètre de masse utilisé, c'est-à-dire déterminer dans quelles conditions les composés sont préférentiellement détectés (mode d'ionisation) et sous quels adduits. De façon à être dans les conditions de détection les plus proches des conditions réelles d'analyse chromatographique, nous introduisons chaque composé dans un mélange eau/solvant organique (50/50 ; v/v) à  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans l'appareil. Dans ce cas, nous avons utilisé du MeOH. Les objectifs de cette première étape étaient de déterminer le mode d'ionisation préférentiel de chaque composé et d'identifier les ions majoritaires correspondant à chaque composé.

En général, les ions majoritaires les plus fréquents sont ceux correspondant aux molécules protonées  $[\text{M}+\text{H}]^+$  et à leurs adduits  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ou  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  pour le mode ESI+, et les molécules déprotonées  $[\text{M}-\text{H}]^-$  pour le mode ESI-. Cependant, certains composés sont caractérisés par des ions plus rares. Par exemple, le diquat et le paraquat sont déterminés ici par les ions  $[\text{M}-\text{H}]^+$  et  $\text{M}^{2+}$ . C. Hao *et al.* (Hao *et al.*, 2013) ont montré que les spectres de masse de ces composés étaient complexes et que ces derniers étaient caractérisés par des ions peu communs, notamment en raison de leur structure dicationique. Nous choisissons comme ions caractéristiques de chaque composé ciblé, les deux ions majoritaires, c'est-à-dire ayant les intensités les plus importantes. Pour certains composés, notamment ceux s'ionisant en mode négatif, seulement un ion majoritaire était visible sur le spectre. Ces derniers sont donc seulement caractérisés par un ion.



D'après les recherches bibliographiques, plusieurs composés ont d'ores et déjà été ionisés dans les deux modes d'ionisation. Cependant, dans notre cas, cette tendance s'est affirmée seulement pour les parabènes. C'est dans le mode d'ionisation négatif que ces derniers ont le mieux répondu. Ainsi, le mode négatif sera le mode d'ionisation utilisé pour les parabènes pour la suite de l'étude.

Certaines molécules ne sont pas ionisables sans modificateur organique. En effet, la pyridine n'a pu être détectée qu'en présence d'acide formique. Il en est de même pour le glycérol monostéarate qui n'a pu être visualisé qu'en présence d'acétate d'ammonium. Les ions observés pour chaque composé dans chaque mode sont répertoriés dans le Tableau III-14. Ainsi, 36 composés s'ionisent en mode electrospray positif et 26 en mode négatif. Ces masses exactes de l'ion adduit  $m/z$  ont permis de suivre les réponses de chaque composé.

Tableau III- 14 : Composés ciblés et masse exacte de leurs ions caractéristiques

Molécule	Adduit majoritaire	m/z (Da)	Adduit majoritaire	m/z (Da)
<i>ESI positif</i>				
Difloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	400,1473	[M+Na] <sup>+</sup>	422,1287
4-hydroxy acétophénone	[M+H] <sup>+</sup>	137,0603	[M+Na] <sup>+</sup>	159,0415
Diméthoate	[M+H] <sup>+</sup>	230,0075	[M+Na] <sup>+</sup>	251,9889
Diuron	[M+H] <sup>+</sup>	233,0248	[M+Na] <sup>+</sup>	255,0062
Florfenicol	[M+Na] <sup>+</sup>	379,9895	[2M+Na] <sup>+</sup>	736,9900
Dicyclanil	[M+H] <sup>+</sup>	191,1045	[M+Na] <sup>+</sup>	213,0859
Méthomyl	[M+H] <sup>+</sup>	163,0541	[M+Na] <sup>+</sup>	185,0354
Enrofloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	360,1723	[M+Na] <sup>+</sup>	382,1536
Danofloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	358,1567	[M+Na] <sup>+</sup>	380,1381
Irganox 1076	[M+H] <sup>+</sup>	531,4770	[M+Na] <sup>+</sup>	553,4590
Procymidone	[M+H] <sup>+</sup>	284,0238	[M+Na] <sup>+</sup>	306,0058
Linuron	[M+H] <sup>+</sup>	249,0198	[M+Na] <sup>+</sup>	271,0012
Marbofloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	363,1469	[M+Na] <sup>+</sup>	385,1283
Cyasorb UV 9	[M+H] <sup>+</sup>	229,0865	[M+Na] <sup>+</sup>	251,0677
Tylosine	[M+H] <sup>+</sup>	916,5263	[M+CH <sub>3</sub> OH+H] <sup>+</sup>	948,5525
Chlorpyrifos-éthyl	[M+H] <sup>+</sup>	349,9336	[M+Na] <sup>+</sup>	371,9155
Phosphate de tributyle	[M+H] <sup>+</sup>	267,1725	[M+Na] <sup>+</sup>	289,1538
2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol	[M+H] <sup>+</sup>	237,1850	[M+Na] <sup>+</sup>	259,1669
Irganox 1010	[M+Na] <sup>+</sup>	1199,7732	[M+K] <sup>+</sup>	1215,7473
4-méthylbenzylidène camphre	[M+H] <sup>+</sup>	255,1742	[M+Na] <sup>+</sup>	277,1563
λ-cyhalothrine	[M+Na] <sup>+</sup>	472,0898	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	467,1343
Carbendazime	[M+H] <sup>+</sup>	192,0773	[M+Na] <sup>+</sup>	214,0587
Cyprodinil	[M+H] <sup>+</sup>	226,1344	[M+Na] <sup>+</sup>	248,1157
Diquat	[M-H] <sup>+</sup>	183,0921	M <sup>2+</sup>	92,0493
Ethylène thiourée	[M+H] <sup>+</sup>	103,0330	[M+Na] <sup>+</sup>	125,0144
Ométhoate	[M+H] <sup>+</sup>	214,0303	[M+Na] <sup>+</sup>	236,0117
Acéphate	[M+H] <sup>+</sup>	184,0197	[M+Na] <sup>+</sup>	206,0001
Méthamidophos	[M+H] <sup>+</sup>	142,0092	[M+Na] <sup>+</sup>	163,9800
Glycérol monostéarate	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	376,3420	[M+H] <sup>+</sup>	359,3156
Paraquat	[M-H] <sup>+</sup>	185,1077		
Imazalil	[M+H] <sup>+</sup>	297,0561		
Hexaméthylène tétramine	[M+H] <sup>+</sup>	141,1135		
Lévamisole	[M+H] <sup>+</sup>	205,0799		
Tilmicosine	[M+H] <sup>+</sup>	869,5732		
4-méthylimidazole	[M+H] <sup>+</sup>	83,0604		
Pyridine	[M+H] <sup>+</sup>	80,0493		

Molécule	Adduit majoritaire	m/z (Da)	Adduit majoritaire	m/z (Da)
	<i>ESI négatif</i>			
Glyphosate	[M-H] <sup>-</sup>	168,0056	[M+Na-H <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	189,9876
Acide aminométhylphosphonique	[M-H] <sup>-</sup>	110,0001	[2M-H] <sup>-</sup>	221,0087
4-tert octylphénol	[M-H] <sup>-</sup>	205,1587	[2M-H] <sup>-</sup>	411,3258
Clorsulon	[M-H] <sup>-</sup>	377,8944	[2M-H] <sup>-</sup>	758,7931
1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane	[M-H] <sup>-</sup>	640,6363	[M+Cl] <sup>-</sup>	676,6129
Acide 4-hydroxybenzoïque	[M-H] <sup>-</sup>	137,0239		
Bis(2-ethylhexyl) phosphate	[M-H] <sup>-</sup>	321,2195		
O-O-diéthyl thiophosphate de potassium	[M-H] <sup>-</sup>	169,0088		
4-n-nonylphénol	[M-H] <sup>-</sup>	219,1743		
2,4-dichlorophénol	[M-H] <sup>-</sup>	160,9554		
3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A	[M-H] <sup>-</sup>	538,7486		
Bisphénol A	[M-H] <sup>-</sup>	227,1072		
Phosphate de dibutyle	[M-H] <sup>-</sup>	209,0943		
Acide heptafluorobutyrique	[M-H] <sup>-</sup>	212,9787		
Acide perfluoropentanoïque	[M-H] <sup>-</sup>	262,9755		
Acide 1-decafluorohexanoïque	[M-H] <sup>-</sup>	312,9723		
Acide perfluorononanoïque	[M-H] <sup>-</sup>	462,9627		
Acide perfluorooctanoïque	[M-H] <sup>-</sup>	412,9659		
Ortho-phénylphénol	[M-H] <sup>-</sup>	169,0653		
Clopyralid	[M-H] <sup>-</sup>	189,9456		
Dodécylbenzènesulfonate de sodium	[M-H] <sup>-</sup>	325,1837		
Isopropylparabène	[M-H] <sup>-</sup>	179,0708		
Butylparabène	[M-H] <sup>-</sup>	193,0865		
Ethylparabène	[M-H] <sup>-</sup>	165,0552		
Propylparabène	[M-H] <sup>-</sup>	179,0708		
Méthylparabène	[M-H] <sup>-</sup>	151,0395		

#### III.4.1.1.2. Optimisation des conditions de détection

Après avoir caractérisé chaque composé d'intérêt par spectrométrie de masse, nous avons optimisé les conditions de détection pour l'ensemble des composés d'intérêt, à savoir la composition des phases mobiles, les paramètres de transfert ainsi que les paramètres de source.

## III.4.1.1.2.1. Composition des phases mobiles

Tout d'abord, la composition des phases mobiles a été optimisée en vue d'une détection maximale de l'ensemble des composés d'intérêt. Pour cela, un mélange des substances d'intérêt a été infusé à  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le spectromètre de masse dans différentes conditions. En effet, tout comme pour la caractérisation des composés, ces derniers ont été infusés dans un mélange eau/solvant organique (50/50 ; v/v). Deux solvants organiques ont été testés, le MeOH et l'ACN. En effet, ils correspondent aux solvants les plus fréquemment utilisés en HPLC en condition de phase inverse. De plus, différents modificateurs organiques ont été ajoutés au mélange afin de tester leur impact sur la réponse de chaque composé. Il s'agit de l'acétate d'ammonium (AcAm), du formiate d'ammonium (FmAm), de l'acide acétique (AA), de l'acide formique (AF), ainsi que les mélanges constitués d'acétate d'ammonium et d'acide acétique (AcAm+AA), et de formiate d'ammonium et d'acide formique (FmAm+AF). De cette manière, sept conditions pour chaque solvant ont été testées. Soit 14 infusions ont été réalisées pour la détermination de la composition des phases mobiles permettant une détection optimale de l'ensemble des substances d'intérêt. Le choix de la composition des phases mobiles optimale s'est porté sur la comparaison des intensités obtenues pour chaque ion caractéristique d'un composé. Pour les composés ayant plusieurs ions caractéristiques, c'est l'ion le plus intense qui a été utilisé. En optimisant une composition de phases mobiles pour 62 contaminants, il est évident que des compromis ont dû être réalisés.

En mode electrospray négatif, deux conditions permettent de visualiser la totalité des 26 substances d'intérêt s'ionisant préférentiellement dans ce mode. Il s'agit du mélange ACN/eau sans modificateur organique et ce même mélange avec de l'acide acétique. De plus, le mélange ACN/eau sans modificateur est la condition, parmi toutes celles testées, qui permet d'obtenir les réponses les plus importantes pour 22 composés sur les 26 présents dans le mélange. La Figure III-3 représente les intensités normalisées de chaque composé selon ces deux meilleures compositions de phases mobiles pour la détection. Celle-ci met en évidence que le mélange ACN/eau sans modificateur organique permet l'obtention de meilleures réponses pour l'ensemble des composés, excepté pour cinq composés (le 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane, le 2,4-dichlorophénol, le méthylparabène, le butylparabène, le propylparabène et l'isopropylparabène).

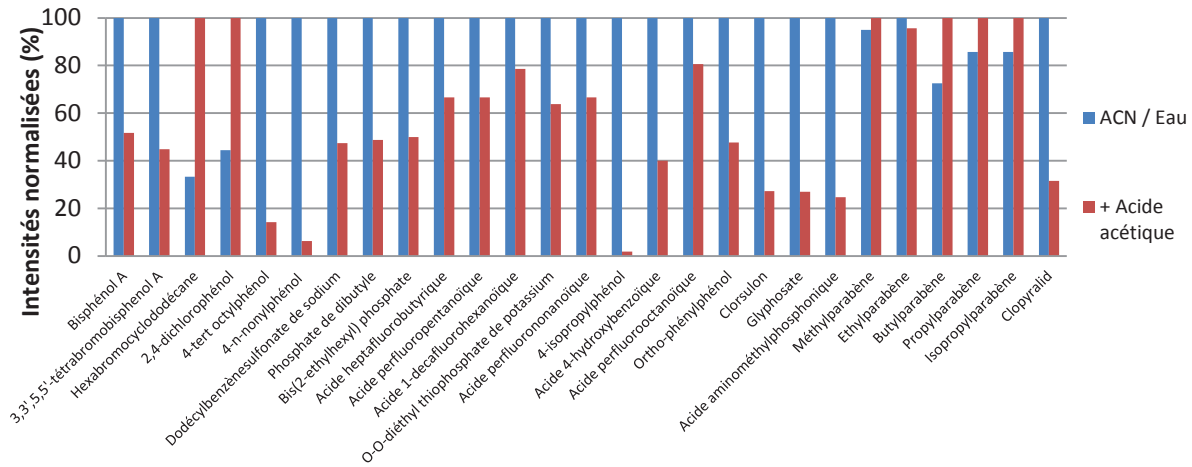


Figure III- 3 : Intensités normalisées des substances d'intérêt selon les deux meilleures compositions de phases mobiles en ESI négatif

En mode electrospray positif, cinq conditions permettent de visualiser la grande majorité des composés, excepté quatre substances (Figure III-4). Il s'agit du mélange MeOH/eau avec de l'AcAm, du FmAm, de l'AcAm et de l'AA, du FmAm et de l'AF, puis du mélange ACN/eau avec du FmAm et de l'AF. Les intensités normalisées de 26 composés, parmi les 36 s'ionisant préférentiellement dans ce mode, selon les meilleures compositions de phases mobiles pour la détection sont représentées dans la Figure III-4. Celle-ci met en évidence que la meilleure composition de phases mobiles est très différente d'un composé à un autre. Cependant, les réponses maximales semblent être le plus souvent obtenues avec le mélange MeOH/eau avec de l'AcAm et de l'AA, et celui avec du FmAm. Néanmoins, le MeOH est plus visqueux que l'ACN et engendre une plus haute pression. Dans ce cas, nous avons préféré utiliser des phases mobiles composées d'ACN comme phase organique. Le choix final de la composition optimale de phases mobiles pour la détection s'est porté sur le mélange ACN/eau avec du FmAm et de l'AF. Un composé, en l'occurrence le 2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol, n'a été détecté dans aucune condition. Il est possible qu'il y ait une interaction entre ce composé et une autre substance d'intérêt contenue dans le mélange, ou une compétition d'ionisation entre cette molécule et d'autres présentes dans le mélange, engendrant une ionisation trop faible pour visualiser cet analyte. Ce phénomène est fréquent lors d'introduction directe de mélanges complexes dans le spectromètre de masse (Kearle et Verkerk, 2009) puisque l'ensemble des composés arrivent en même temps dans la source d'ionisation.

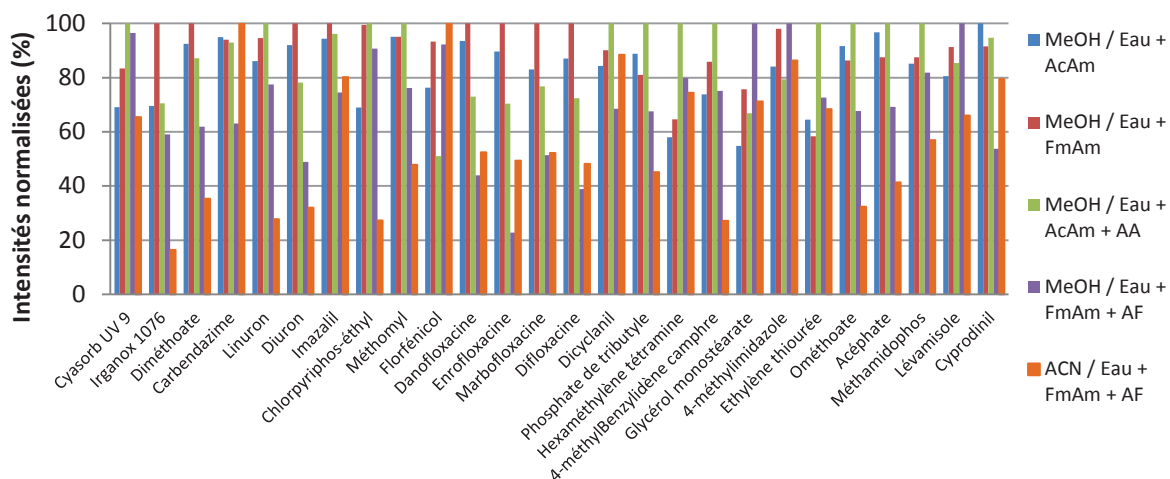


Figure III- 4 : Intensités normalisées de 26 substances d'intérêt sur 36 selon les meilleures compositions de phases mobiles en ESI positif

#### III.4.1.1.2.2. Paramètres de transfert du spectromètre de masse

L'optimisation des paramètres de transfert est la dernière étape avant le couplage HPLC-HRMS. Il s'agit d'une étape importante puisque ce sont les paramètres de transfert qui permettent d'acheminer les ions de façon optimale vers l'analyseur. Ces paramètres sont optimisés lors de l'infusion du mélange des 62 standards analytiques à  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans un mélange ACN/eau. Les tensions sont ajustées afin d'obtenir des intensités optimales pour l'ensemble des ions majoritaires correspondant aux substances d'intérêt. Etant donné que les composés sélectionnés sont variés, notamment au niveau de la masse molaire, des compromis ont dû être faits. Ainsi les valeurs fixées pour les paramètres de transfert pour les méthodes finales sont répertoriées dans le Tableau III-15. Les résultats comprennent les valeurs de voltages optimisées pour les funnels, l'hexapôle et la cellule de collision dans les deux modes d'ionisation. En effet, cette dernière ne constitue pas la partie transfert de l'appareil, cependant elle a pour rôle d'acheminer les ions de façon optimale vers l'analyseur, en plus de son rôle de cellule de fragmentation en mode MS/MS. Ces résultats comprennent également le "TransferTime", défini comme le temps de stockage des ions dans le pusher situé entre la cellule de collision et le ToF, ainsi que le "Prepulstorage" défini comme la durée d'envoi des ions dans le ToF. Les valeurs ayant eu le plus d'impact sur la réponse des ions sont les valeurs de voltages des funnels et de l'hexapôle.

En faisant varier les différents paramètres de transfert, nous nous sommes aperçus que toutes les molécules d'intérêt n'étaient pas détectées, notamment celles ayant des masses aux extrémités de la gamme de masses, soit la pyridine ( $[M+H]^+ = 80,04 \text{ Da}$ ), la tilmicosine ( $[M+H]^+ = 869,57 \text{ Da}$ ), la tylosine ( $[M+H]^+ = 916,52 \text{ Da}$ ) et l'irganox 1010 ( $[M+Na]^+ =$

1199,77 Da). En effet, sur une gamme de masses trop large, le spectromètre de masse ne semble pas pouvoir détecter de façon optimale l'ensemble des ions. Ces quatre composés ont alors été retirés de la liste d'étude.

Tableau III- 15 : Paramètres de transfert optimaux des méthodes en ESI+ et ESI-

		ESI +	ESI-
Transfert	Funnel 1 RF	300 Vpp	200 Vpp
	Funnel 2 RF	200 Vpp	200 Vpp
	Hexapôle RF	50 Vpp	100 Vpp
Cellule de collision (q)	Collision RF	100 Vpp	150 Vpp
	Transfert time	85 $\mu$ s	90 $\mu$ s
	Prepulstorage	1 $\mu$ s	5 $\mu$ s

Deux autres paramètres ont également été optimisés durant cette étape, il s'agit de l'énergie du quadripôle et de la cellule de collision. En effet, ces deux composants du spectromètre de masse utilisé possèdent des énergies non nulles en mode MS simple. L'ajustement des valeurs de ces énergies a montré une augmentation ou une diminution de l'intensité des ions. De ce fait, ces éléments ont permis également l'optimisation du transfert des ions vers l'analyseur. Cependant, nous ne savons pas si ce phénomène est dû au transfert des ions ou à une possible fragmentation à ces énergies. Ainsi, l'énergie du quadripôle était de 3 eV et 5 eV, respectivement dans le mode d'ionisation positif et négatif. Quant à l'énergie de collision, celle-ci était de 3 eV dans les deux modes d'ionisation.

A cette étape de l'optimisation, la liste a été réduite à 58 composés d'intérêt.

#### III.4.1.1.3. Optimisation des paramètres de source

Les derniers paramètres de détection à optimiser sont les paramètres de la source d'ionisation. Cette étape est réalisée en couplage HPLC-MS après avoir optimisé les conditions chromatographiques III.4.1.2. En effet, les paramètres de source peuvent être impactés par le débit de la chromatographie liquide et la composition des phases mobiles. Ces paramètres incluent la pression du gaz de nébulisation, le débit et la température du gaz de séchage et le voltage appliqué sur l'embout du capillaire à l'entrée du système sous vide.

##### III.4.1.1.3.1. Stratégie d'optimisation

L'optimisation des paramètres de source est réalisée sur de l'eau dopée à 1  $\mu$ L.mL<sup>-1</sup> par un mélange des 58 contaminants environnementaux. Des triplicats ont été réalisés afin de vérifier la répétabilité de l'analyse dans les conditions définies. L'optimisation a été réalisée de façon itérative. Une méthode initiale a été fixée comme étant le point de départ au

cheminement de l'optimisation. Cette méthode est une méthode pré-enregistrée dans l'appareil et optimisée sur une large gamme de masses, s'étendant de 50 à 1000 Da pour les deux modes d'ionisation ESI (Tableau III-16). Elle comprend une température de gaz de séchage s'élevant à 200 °C, un débit du gaz de séchage de 12 L.min<sup>-1</sup>, une pression du gaz de nébulisation de 3 bars et un voltage de l'embout du capillaire de - 4500 V pour le mode ESI positif et de + 3500 V pour le mode ESI négatif. Les paramètres de transfert ont, quant à eux, été remplacés par ceux déterminés comme optimaux. Le choix des paramètres de source s'est fait par la comparaison des aires obtenues pour chaque ion caractéristique d'un composé. Pour les composés ayant plusieurs ions caractéristiques, c'est l'ion le plus intense qui a été utilisé pour cette étude.

Tableau III- 16 : Conditions de détection de la méthode initiale

	ESI +	ESI -
Gamme de masses	50-1000 Da	
Voltage du capillaire	- 4500 V	+ 3500 V
Température de la source	200 °C	
Pression du gaz de nébulisation	3 bars	
Débit du gaz de séchage	12 L.min <sup>-1</sup>	

#### III.4.1.1.3.2. Pression du gaz de nébulisation

Trois pressions du gaz de nébulisation ont été testées dans le mode d'ionisation positif et le mode négatif, qui correspondent à 1, 3 et 4 bars.

Dans le mode d'ionisation positif, les réponses obtenues pour la majorité des composés ciblés a augmenté avec la pression du gaz de nébulisation. Ces composés sont représentés par le méthamidophos, le phosphate de tributyle, le diméthoate et le méthomyl sur la Figure III-5. Celle-ci montre les aires normalisées les plus représentatives. Parmi ces composés, aucune différence significative n'a été observée entre les réponses obtenues à 3 et 4 bars, excepté pour le méthomyl. Cependant, pour sept substances d'intérêt (la danofloxacin, la marbofloxacin, le dicyclanil, la 4-méthylbenzylidène camphre, le lévamisole, l'imazalil et la carbendazime), la meilleure réponse a été obtenue avec une pression de 3 bars. Parmi ces derniers, il n'y a pas eu de différence significative entre les réponses suivant les pressions choisies, sauf pour la carbendazime. La pression du gaz de nébulisation entre 3 et 4 bars semble donc avoir un impact sur ce composé qui constitue la famille des carbamates. En considérant les différentes réponses obtenues pour les composés



ciblés en fonction de la pression du gaz de nébulisation dans le mode d'ionisation positif, la valeur choisie a été de 3 bars.

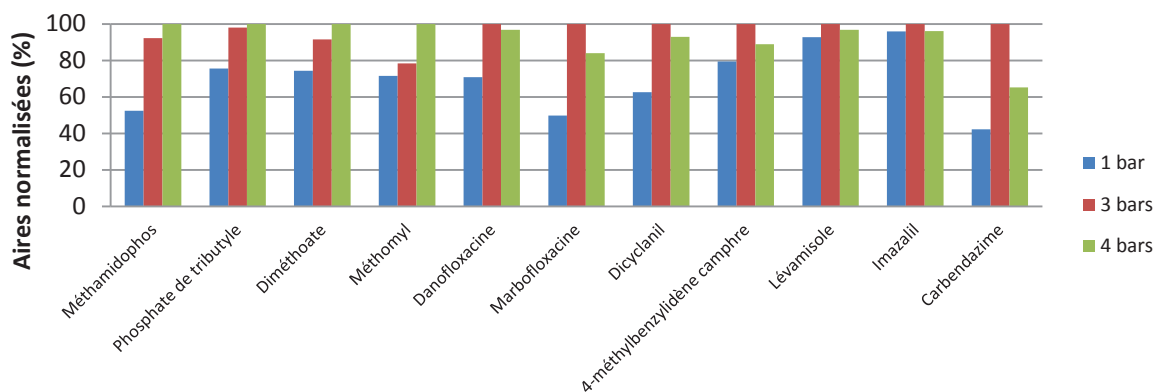


Figure III- 5 : Aires normalisées de 11 substances d'intérêt selon différentes pressions de gaz de nébulisation en ESI positif

Dans le mode d'ionisation négatif, les meilleures réponses ont été obtenues avec une pression de gaz de nébulisation de 3 bars pour la majorité des composés. Les réponses de quelques-uns de ces derniers sont représentées sur la Figure III-6. Il s'agit du phosphate de dibutyle, du bis(2-ethylhexyl) phosphate, de l'acide 1-decafluorohexanoïque, du clorsulon et du propylparabène. La figure montre les aires normalisées les plus représentatives. Cependant, trois composés (le bisphénol A, l'ortho-phénylphénol et le dodécylbenzènesulfonate de sodium) montrent des réponses de moins en moins importantes avec l'augmentation de la pression du gaz de nébulisation. Au contraire, deux autres composés (l'acide 4-hydroxybenzoïque et le 2,4-dichlorophénol) sur l'ensemble des substances d'ionisant en mode négatif, ont eu une réponse de plus en plus importante avec l'augmentation de la pression du gaz de nébulisation. Pour seulement trois composés (le bisphénol A, l'ortho-phénylphénol et le 2,4-dichlorophénol), une différence significative de la réponse obtenue a été observée entre la pression permettant la réponse maximale et 3 bars. Afin de visualiser de façon optimale l'ensemble des composés ciblés, la valeur de pression du gaz de nébulisation choisie a été de 3 bars.

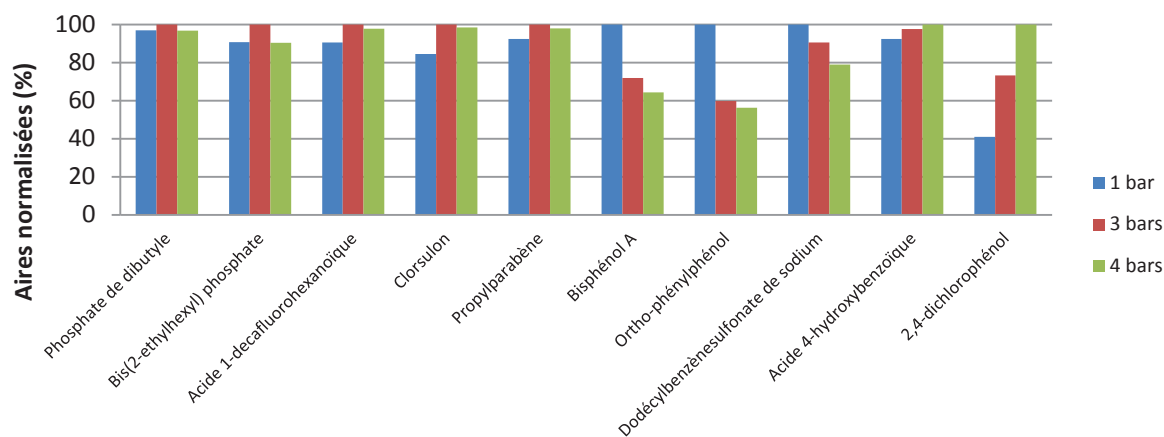


Figure III- 6 : Aires normalisées de dix substances d'intérêt selon différentes pressions de gaz de nébulisation en ESI négatif

#### III.4.1.1.3.3. Débit du gaz de séchage

Afin de maximiser l'ionisation dans la source electrospray, quatre valeurs de débit de gaz de séchage ont été comparées: 3, 5, 8 et 12 L.min<sup>-1</sup>. Ce paramètre a été testé avec une pression de gaz de nébulisation optimale dans chacun des modes d'ionisation.

Dans le mode d'ionisation positif, les meilleures réponses observées pour la majorité des composés ont été obtenues avec un débit de gaz de séchage de 12 L.min<sup>-1</sup>. Les composés ont présenté une réponse de plus en plus importante avec l'augmentation du débit. Les réponses de quelques-unes de ces substances d'intérêt sont représentées sur la Figure III-7. Il s'agit de l'enrofloxacin, de la marbofloxacin, de l'imazalil et de la carbendazime. La figure montre les aires normalisées les plus significatives. Cependant, quatre composés sur l'ensemble des substances s'ionisant en mode positif ont obtenu des aires maximales avec 8 L.min<sup>-1</sup> comme débit de gaz de séchage. De plus, deux autres composés (le linuron et le 4-méthylbenzylidène camphre) n'ont pas eu une réponse maximale avec 12 L.min<sup>-1</sup> mais avec 5 L.min<sup>-1</sup>. Parmi les composés, seuls deux d'entre eux (le linuron et le 4-méthylbenzylidène camphre) ont obtenu une réponse avec une différence significative entre le débit permettant la réponse maximale et 12 L.min<sup>-1</sup>. Afin de visualiser de façon optimale l'ensemble des composés ciblés, la valeur du débit du gaz de séchage choisie a été de 12 L.min<sup>-1</sup>.

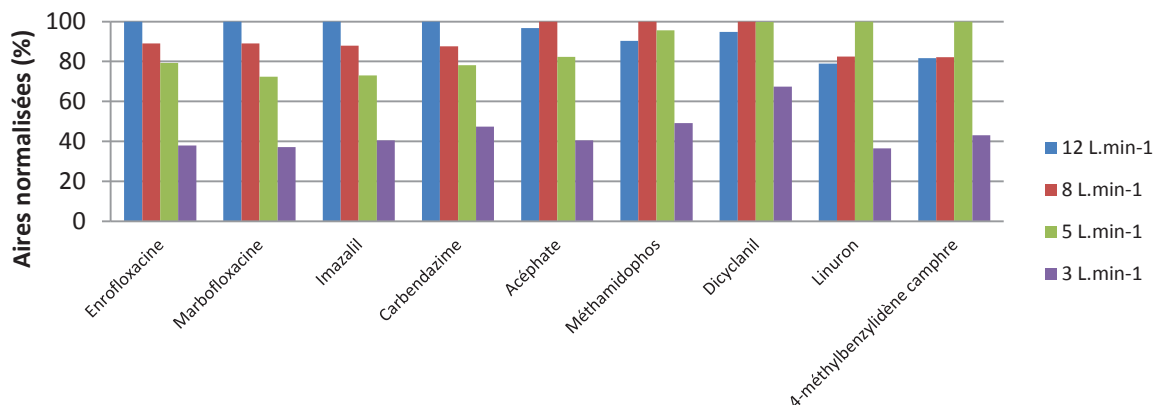


Figure III- 7 : Aires normalisées de neuf substances d'intérêt selon différents débits de gaz de séchage en ESI positif

Dans le mode d'ionisation négatif, comme dans le mode positif, les meilleures réponses observées pour la majorité des composés ont été obtenues avec un débit de gaz de séchage de 12 L.min<sup>-1</sup>. Ces composés ont présenté une réponse de plus en plus importante avec l'augmentation du débit. Les réponses de quelques-unes de ces substances d'intérêt sont représentées sur la Figure III-8. Il s'agit du phosphate de tributyle, de l'acide perfluorooctanoïque et du glyphosate. La figure montre les aires normalisées les plus représentatives. Cependant, six composés sur l'ensemble des substances s'ionisant en mode négatif ont obtenu des aires maximales avec 8 L.min<sup>-1</sup> comme débit de gaz de séchage. L'acide 4-hydroxybenzoïque, le butylparabène, le bisphénol A et le 3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A représentent ces composés. En revanche, parmi ces derniers, seulement deux composés (le bisphénol A et le 3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A) ont obtenu des réponses significativement différentes entre 8 L.min<sup>-1</sup> et 12 L.min<sup>-1</sup>. De ce fait, afin de visualiser de façon optimale la majorité des composés ciblés, la valeur du débit du gaz de séchage choisie a été de 12 L.min<sup>-1</sup>.

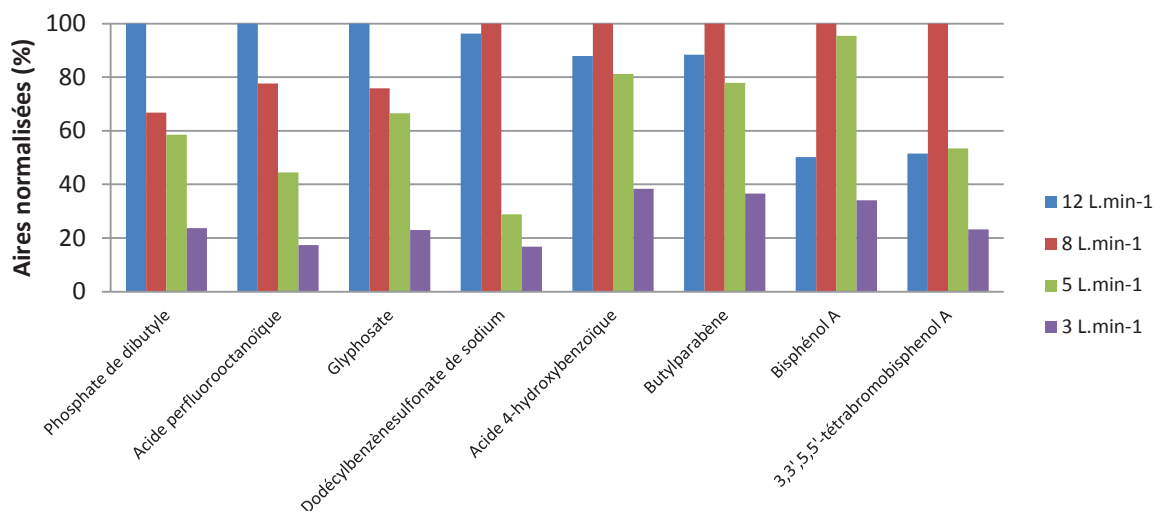


Figure III- 8 : Aires normalisées de huit substances d'intérêt selon différents débits de gaz de séchage en ESI négatif

#### III.4.1.1.3.4. Température du gaz de séchage

Le paramètre de source ayant le plus d'impact sur l'ionisation des composés avec une interface ESI est la température du gaz de séchage (Manisali *et al.*, 2006). Quatre températures ont été testées dans les deux modes d'ionisation, positif et négatif, allant de 200 à 350 °C avec des pas de 50 °C. Ce paramètre a été testé avec une pression de gaz de nébulisation et un débit de gaz de séchage optimaux dans chacun des modes d'ionisation.

Pour le mode d'ionisation positif, l'aire de la majorité des composés a augmenté avec la température. Les réponses de quelques-unes de ces substances d'intérêt (le phosphate de tributyle, la 4-méthylbenzylidène camphre, le lévamisole, la marbofloxacin et le diuron) sont représentées sur la Figure III-9. Cependant, ce phénomène a été observé pour la totalité des composés s'ionisant en mode positif, excepté pour quatre composés (l'acéphate, le méthamidophos, le linuron et l'ométhoate). L'aire de quatre de ces composés a augmenté avec la température de 200 à 250 °C et a diminué de 250 à 350 °C. Il semblerait que ces substances d'intérêt se dégradent avec l'augmentation de la température du gaz de séchage. Pour l'ométhoate, l'aire a augmenté de 200 à 250 °C, puis s'est stabilisée jusqu'à 350 °C. De plus, parmi l'ensemble des composés d'intérêt, les réponses ont été obtenues sans différence significative entre 250 et 300 °C. Un compromis a été nécessaire et la température finale choisie a été de 250 °C. En plus de permettre l'obtention de réponses satisfaisantes pour la totalité des molécules, cette température permet également d'économiser la source d'ionisation.

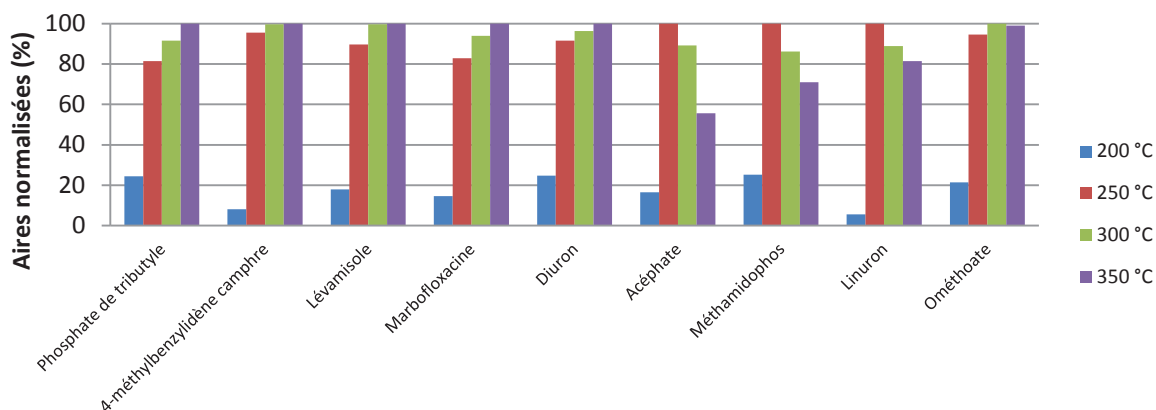


Figure III- 9 : Aires normalisées de neuf substances d'intérêt selon différentes températures de gaz de séchage en ESI positif

Dans le mode d'ionisation négatif, quatre phénomènes ont été observés (Figure III-10). Ainsi, les réponses du bisphénol A et du 2,4-dichlorophénol ont diminué avec l'augmentation de la température. Au contraire, les réponses du butylparabène et du propylparabène ont augmenté avec la température. D'un autre côté, l'acide perfluorononanoïque et l'acide 4-hydroxybenzoïque ont eu une réponse qui augmentait de 200 à 250 °C, puis qui diminuait de 250 °C jusqu'à 350 °C. Enfin, le dodécylbenzènesulfonate de sodium et le phosphate de dibutyle ont eu une réponse qui augmentait jusqu'à 300 °C, puis qui diminuait jusqu'à 350 °C. La Figure III-10 représente les aires normalisées les plus significatives, notamment pour les molécules citées précédemment. Un compromis a dû être trouvé entre la température optimale et la température minimale de décomposition pour chaque composé, puisque l'optimisation de ce paramètre dépend du composé. Parmi tous les composés ciblés, aucune différence significative au niveau de l'aire en fonction de la température du gaz de séchage n'a été observée entre la température optimale et 250 °C. De ce fait, la température choisie s'est portée sur 250 °C.

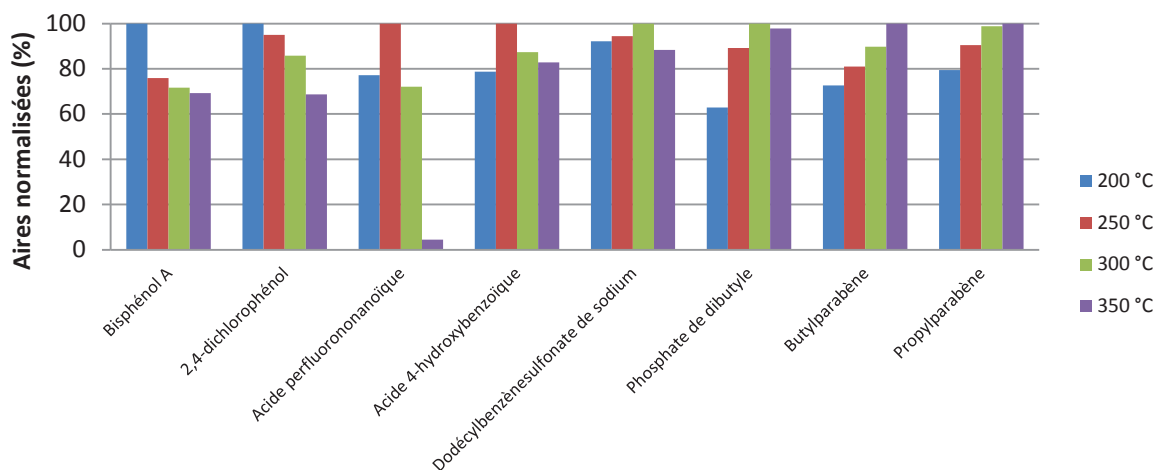


Figure III- 10 : Aires normalisées de huit substances d'intérêt selon différentes températures de gaz de séchage en ESI négatif

#### III.4.1.1.3.5. Voltage du capillaire

Le rôle du voltage appliqué à l'embout du capillaire est crucial dans l'efficacité du transfert des ions, afin d'obtenir la meilleure sensibilité. Différentes valeurs de voltage ont été testées, allant de - 3500 V à - 5500 V pour le mode d'ionisation positif, et de + 2500 V à + 4500 V pour le mode d'ionisation négatif, avec des pas de 1000 V. Ce paramètre a été testé avec une pression de gaz de nébulisation, un débit et une température de gaz de séchage optimaux dans chacun des modes d'ionisation.

Dans le mode d'ionisation positif, les meilleures réponses ont été obtenues majoritairement avec - 5500 V. Cependant, dans ces conditions, la répétabilité n'a pas été satisfaisante (coefficient de variation > 20 %). Un voltage de - 3500 V a permis une répétabilité satisfaisante et un rapport signal sur bruit important. La Figure III-11 représente les aires normalisées les plus significatives. Seules deux molécules (la  $\lambda$ -cyhalothrine et l'acéphate) ont montré des aires avec des différences significatives selon le voltage utilisé. De plus, pour chacun de ces composés, deux phénomènes contraires ont été observés, à savoir une diminution de la réponse avec le voltage pour la  $\lambda$ -cyhalothrine ; et une augmentation de signal avec le voltage pour l'acéphate. En considérant les différentes réponses des composés d'intérêt en fonction du voltage de l'embout du capillaire en mode d'ionisation positif, le meilleur compromis s'est avéré être - 3500 V.

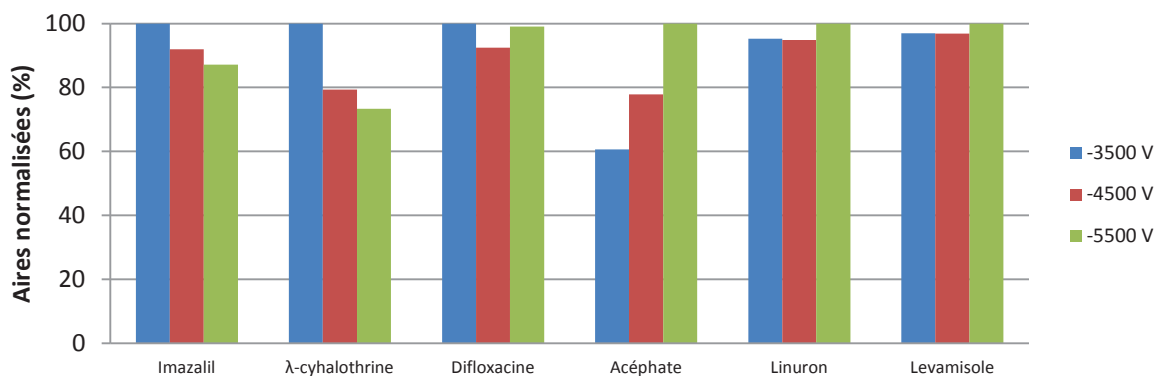


Figure III- 11 : Aires normalisées de six substances d'intérêt selon différents voltages de capillaire en ESI positif

Dans le mode d'ionisation négatif, l'aire de la majorité des composés a diminué graduellement avec l'augmentation du voltage de l'embout du capillaire. La Figure III-12 représente les aires normalisées les plus significatives, et notamment celles du 2,4-dichlorophénol, de l'acide heptafluorobutyrique, du clorsulon et du propylparabène, qui illustrent cette tendance. Cependant, ce modèle ne s'est pas appliqué à quatre substances d'intérêt. Ainsi, l'aire de deux composés (le bisphénol A et l'ortho-phénylphénol) a augmenté graduellement avec le voltage de l'embout du capillaire. Alors que le dodécylbenzènesulfonate de sodium et l'acide 4-hydroxybenzoïque n'ont pas semblé être sensibles à la variation de ce paramètre. En effet, leurs réponses ont été approximativement les mêmes quelle que soit la valeur du voltage. Le meilleur compromis pour détecter le maximum de composés ciblés a été d'utiliser un voltage de + 2500 V.

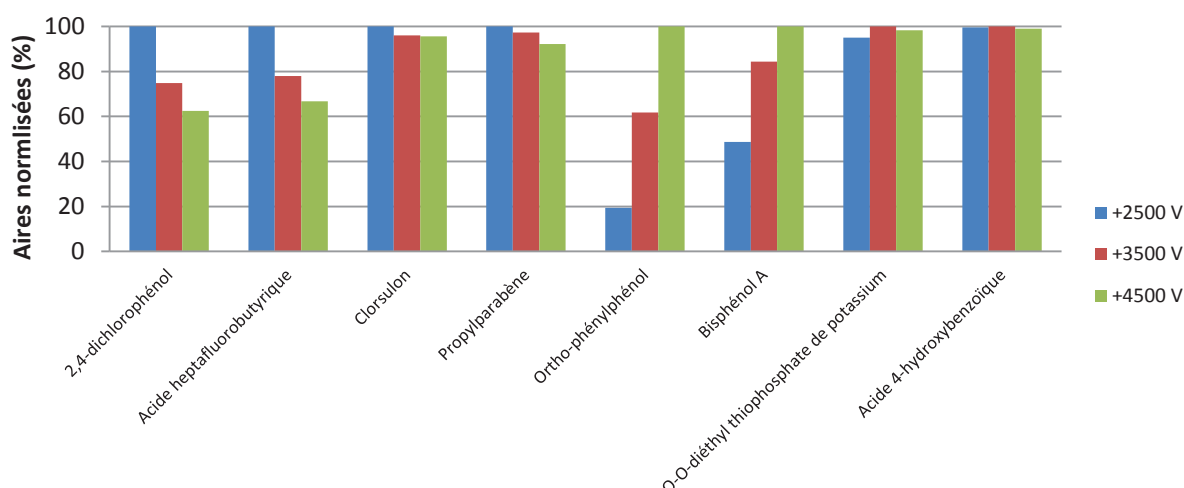


Figure III- 12 : Aires normalisées de huit substances d'intérêt selon différents voltages de capillaire en ESI négatif

Lors de l'optimisation de ces paramètres de source en couplage HPLC-MS, le 2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol n'a toujours pas été détecté. Cependant, les composés sont séparés avant d'être ionisés. Il est donc possible que ce composé soit élué en même temps qu'un autre composé contenu dans l'échantillon, et créant ainsi une compétition d'ionisation. Ce composé a donc été retiré de la liste, qui se compose donc, à ce stade, de 57 contaminants environnementaux.

#### III.4.1.2. Optimisation des paramètres chromatographiques

Après avoir amélioré la détection par spectrométrie de masse en faisant varier différents paramètres, nous avons développé les méthodes chromatographiques, en mode d'ionisation positif et négatif, avec l'optimisation du choix des phases mobiles et des phases stationnaires. Ces étapes vont permettre d'acquérir les données avec des méthodes de détection mais aussi de séparation optimales.

##### III.4.1.2.1. Choix des phases mobiles

Les recherches bibliographiques ont permis d'identifier le type de phase stationnaire couramment utilisé (une phase inverse de type C18) et les dimensions de la colonne à choisir (100 x 2,1 mm ;  $\leq 3,5 \mu\text{m}$ ). Le choix des phases mobiles a été effectué sur une colonne Waters XSelect CSH phase inverse en 100 x 2,1 mm avec des particules de 3,5  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Les modificateurs organiques usuellement utilisés pour la séparation de composés polaires à faiblement hydrophobes en chromatographie en phase inverse sur cette colonne sont le méthanol et l'acétonitrile. Du fait des dimensions de la colonne chromatographique choisie, le débit est fixé à 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. La température du four à colonne est de 50 °C, afin de diminuer la viscosité des phases mobiles, pour ne pas engendrer de trop fortes pressions. Dans un premier temps, les phases mobiles seront constituées d'ACN/eau avec 10 mM de FmAm et 0,1 % d'AF pour le mode positif et d'ACN/eau dans le mode négatif. Ces compositions de phases mobiles correspondent aux compositions optimales de détection déterminées précédemment (III.4.1.1.2.1). Le volume injecté est de 5  $\mu\text{L}$ , les standards et les mélanges étant préparés par dilution dans de l'eau. Pour cette étape du choix de phases mobiles, les gradients étaient les mêmes dans le mode d'ionisation positif et négatif, à savoir de 0 % à 100 % (B) en 15 min et 100 % pendant 10 min. Les colonnes étaient reconditionnées à la fin de chaque analyse pendant 10 min.

Dans le mode d'ionisation positif, la composition des phases mobiles semble être en adéquation avec une détection optimale et une séparation satisfaisante. La poursuite de



l'optimisation s'est portée sur la quantité de FmAm et d'AF. Dans un premier temps, nous avons fixé la quantité de FmAm dans les phases mobiles à 5mM, puis nous avons fait varier la concentration d'AF. Pour comparer les résultats obtenus, nous avons normalisé les aires des pics chromatographiques correspondant à chaque contaminant. Seuls les résultats les plus significatifs sont représentés dans la Figure III-13. Un composé d'intérêt, l'irganox 1076, n'a pas été détecté en présence de 0,05 % d'AF. Cette condition a donc été éliminée des choix de composition de phases mobiles potentiels. Entre les deux autres conditions, seuls deux composés ont obtenu des résultats significativement différents. En effet, le florfenicol et la marbofloxacine ont présenté des réponses supérieures avec 0,1 % d'AF. Par conséquent, ce pourcentage a été choisi pour constituer les phases mobiles.

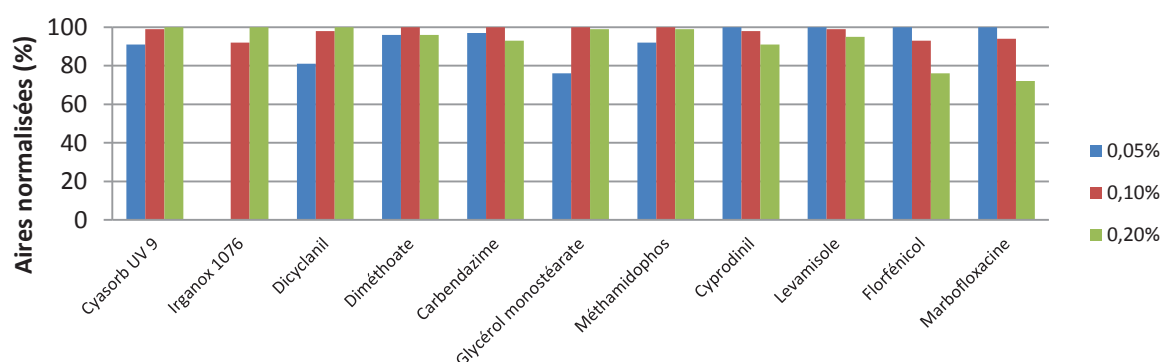


Figure III- 13 : Aires normalisées de 11 substances d'intérêt selon différents pourcentages d'acide formique dans les phases mobiles en ESI positif

Une fois le pourcentage d'AF optimisé, deux concentrations de FmAm dans les phases mobiles ont été testées, 5 et 10 mM. Seuls les résultats les plus significatifs sont représentés dans la Figure III-14. La totalité des substances d'intérêt a obtenu une réponse optimale avec 10 mM de FmAm. Par conséquent, cette concentration a été choisie pour constituer les phases mobiles. Ainsi, les phases mobiles optimales du mode d'ionisation positif sont constituées d'ACN/eau avec 10 mM de FmAm et 0,1 % d'AF dans chacune des phases.

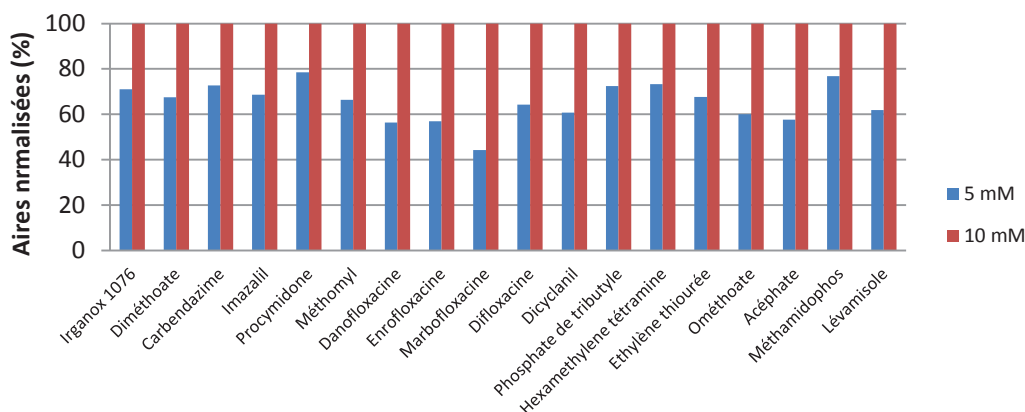


Figure III- 14 : Aires normalisées de 18 substances d'intérêt selon deux concentrations de formiate d'ammonium dans les phases mobiles en ESI positif

Dans le mode d'ionisation négatif, les pics chromatographiques obtenus avec ACN/eau étaient très larges et asymétriques. De ce fait, les phases mobiles permettant de détecter les composés de façon optimale après cette dernière condition testée était l'ACN/eau avec de l'acide acétique. L'ajout de ce modificateur organique dans les phases mobiles a permis de réduire la largeur et l'asymétrie des pics chromatographiques. La quantité d'acide acétique a donc ensuite été optimisée. Trois pourcentages d'acide acétique ont été testés, à savoir 0,2 %, 0,1 % et 0,05 %. La majorité des composés a montré des réponses, en aire, optimales avec 0,05 % d'acide acétique. Celles-ci sont illustrées sur la Figure III-15 pour le bisphénol A, l'acide perfluorooctanoïque, le butylparabène et le propylparabène. Seuls les résultats les plus significatifs sont présentés. Pour seulement deux substances d'intérêt (l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'acide aminométhylphosphonique), une quantité d'acide acétique à 0,1 % a permis d'obtenir une réponse optimale. Une troisième tendance a été observée. Il s'agit d'une augmentation de signal avec l'augmentation de la quantité d'acide acétique dans les phases mobiles. Ce phénomène est représenté par l'ortho-phénylphénol, le dodécylbenzènesulfonate de sodium et le bis(2-ethylhexyl) phosphate. Le meilleur compromis pour obtenir le signal maximum pour la majorité des composés ciblés a été des phases mobiles constituées d'ACN/eau et 0,05 % d'acide acétique.

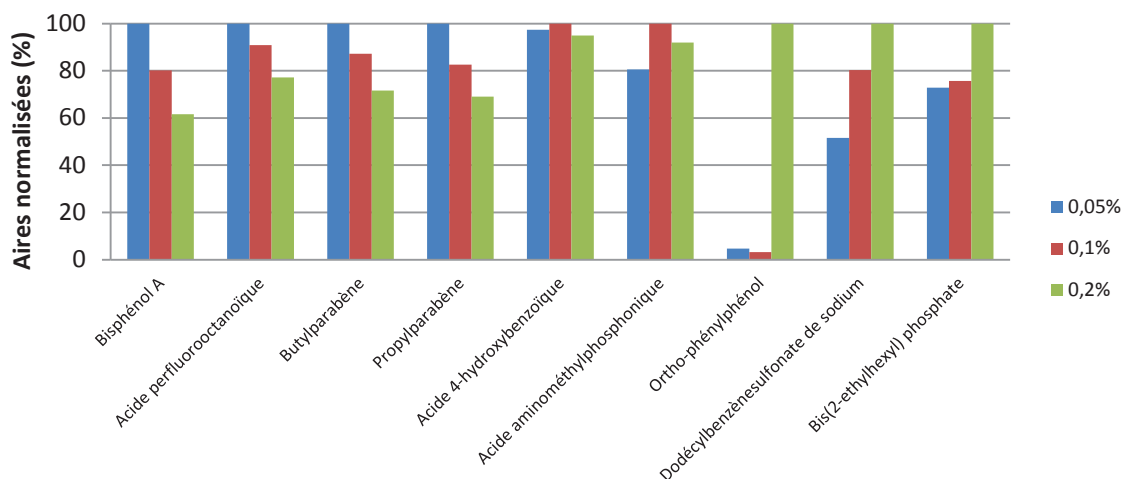


Figure III- 15 : Aires normalisées de neuf substances d'intérêt selon la quantité d'acide acétique dans les phases mobiles en ESI négatif

#### III.4.1.2.2. Comparaison des phases stationnaires

Trois colonnes ont été testées pour optimiser l'élution et la séparation. Les différentes phases stationnaires ont été sélectionnées afin de rester cohérentes avec la chimie des molécules de l'étude : deux phases C18, de technologies et de fournisseurs différents ainsi qu'une phase pentafluorophényle (PFP). Toutes les colonnes ont été choisies avec un diamètre interne de 2,1 mm et une longueur de 100 mm. De cette façon, les nombreux composés peuvent être séparés sur une durée acceptable.

Les deux colonnes C18 testées présentent des caractéristiques techniques différentes, notamment la surface spécifique, le type de particules et la granulométrie ainsi que leur porosité. En effet, la colonne Xselect CSH C18 (Waters) présente une surface spécifique de  $185 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , des pores de  $130 \text{ \AA}$ , des particules complètement poreuses avec un diamètre de  $3,5 \text{ \mu m}$  ; tandis que la colonne Kinetex C18 (Phenomenex) présente une surface spécifique de  $200 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , des pores de  $100 \text{ \AA}$ , des particules à noyau dur avec un diamètre de  $2,6 \text{ \mu m}$ . Cette dernière colonne utilisant des particules à noyaux durs permet d'uniformiser les chemins parcourus par les composés lors de leur séparation, de limiter la diffusion au sein de la colonne et donc d'affiner les pics et d'améliorer la résolution tout en réduisant la contre-pression. La dernière colonne testée avec une phase PFP correspond à une colonne Hypersil Gold PFP (Thermo) avec une surface spécifique de  $220 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , des pores de  $175 \text{ \AA}$ , des particules complètement poreuses avec un diamètre de  $1,9 \text{ \mu m}$ . Cette phase présente un intérêt particulier à l'analyse sélective de composés non halogénés, notamment des composés polaires, mais aussi des composés à noyau aromatique de par la présence de groupements phényles dans la phase stationnaire.

La colonne Hypersil Gold PFP n'a pas permis d'obtenir une séparation optimale des composés, contrairement aux colonnes Kinetex C18 et Xselect CSH C18. En effet, de nombreuses coélutions étaient présentes.

Pour le mode d'ionisation positif, la forme des pics était relativement identique avec ces deux colonnes chromatographiques. Cependant, la colonne Xselect CSH C18 a permis une meilleure séparation des composés, c'est pourquoi cette dernière a été sélectionnée pour la suite du développement analytique.

Pour le mode d'ionisation négatif, la colonne Xselect CSH C18 a permis l'obtention de pics chromatographiques relativement larges et asymétriques. Afin de pallier à ce problème, la colonne Kinetex C18 à noyaux durs a été testée. Comme expliqué précédemment, cette technologie permet d'affiner les pics tout en améliorant leur asymétrie, ce qui s'est vérifié dans le cas de notre étude. La colonne Kinetex C18 a donc été choisie pour le mode d'ionisation négatif.

#### III.4.1.2.3. Optimisation des gradients

L'optimisation des gradients a donc été effectuée sur la colonne Xselect CSH C18 100 x 2,1 mm avec une granulométrie de 3,5  $\mu\text{m}$  pour le mode d'ionisation positif et sur la colonne Kinetex C18 100 x 2,1 mm avec une granulométrie de 2,6  $\mu\text{m}$  pour le mode d'ionisation négatif, en utilisant un mélange de standards dans l'eau à 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Cette étape a été réalisée à partir des gradients initiaux décrits précédemment (III.4.1.2.1) et avec les phases mobiles et les paramètres de détection optimaux.

##### III.4.1.2.3.1. Optimisation du gradient pour le mélange ESI positif

Le gradient initial a permis d'obtenir des composés relativement bien séparés. D'après les résultats obtenus, il s'est avéré possible de réduire la durée du gradient et donc d'augmenter la pente de ce dernier. En effet, l'objectif était d'analyser le maximum de composés en un minimum de temps. Le gradient a alors été modifié comme suit : 2 % (B) pendant 3 min, de 2 % à 100 % (B) en 7 min et 100 % pendant 10 min, suivi d'un reconditionnement pendant 10 min. Ainsi, la pente du gradient était plus rapide de façon à accélérer l'analyse sans engendrer de coélutions. De plus, un palier au début du gradient a été ajouté afin de permettre le transfert de méthode chromatographique d'un système à un autre. Ce palier s'étend sur 3 min et correspond au moins à la durée à laquelle les phases mobiles parcourent le système jusqu'au détecteur. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la Figure III-16. Il correspond à l'ensemble des chromatogrammes d'ions extraits (en anglais extract ion chromatogram, « EIC ») pour chaque composé. L'ensemble des composés est

séparé en 13 min, sauf les composés très polaires dont l'hexaméthylène tétramine et le 4-méthylimidazole sortant très rapidement, dont certains (le diquat et le paraquat) au temps mort. Le cyasorb UV 9 et le cyprodinil sont également totalement coélusés, tout comme la 4'-hydroxy acétophénone et la danofloxacin. Cependant, ces composés étaient également coélusés avec le gradient initial.

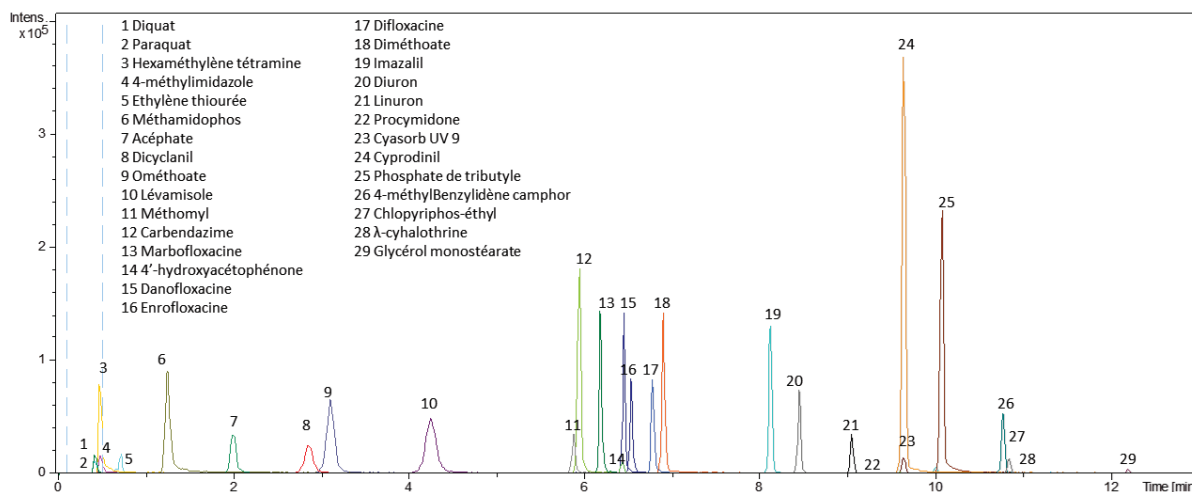


Figure III- 16 : Chromatogramme de l'eau dopée à 1 µg.mL<sup>-1</sup> avec les 57 composés d'intérêt en mode d'ionisation positif

#### III.4.1.2.3.2. Optimisation du gradient pour le mélange ESI négatif

Le gradient initial a engendré de nombreuses coélutions notamment entre 8 et 10 min. Ainsi, cinq composés étaient complètement coélusés. Il s'agissait du bisphénol A, du 2,4-dichlorophénol, de l'ortho-phénylphénol, de l'acide perfluorooctanoïque et l'acide perfluorononanoïque. Afin d'améliorer la séparation de ces composés, la pente du gradient a été ajustée de façon à être plus lente. De cette manière, tous les composés étaient séparés. Cependant, sur une zone du chromatogramme, aucune molécule d'intérêt n'était éluée. C'est pourquoi, afin de gagner du temps une pente intermédiaire très rapide a été ajoutée. De plus, les pentes de part et d'autre de cet intermédiaire ont également été ajustées pour obtenir la séparation la plus optimale possible. Ainsi, le gradient correspond à 5 % (B) pendant 3 min, de 5 % à 32 % (B) en 12 min, de 32 % à 50 % en 1 min, de 50 % à 100 % en 14 min et 100 % pendant 5 min, suivi d'un reconditionnement pendant 6 min. Comme la méthode en mode d'ionisation positif, un palier au début du gradient a été ajouté afin de permettre le transfert de méthode chromatographique d'un système à un autre. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la Figure III-17. Elle correspond à l'ensemble des EIC pour chaque composé. L'ensemble des composés est séparé en moins de 25 min. Les composés très polaires (l'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium et le clopyralid) sortent très rapidement, même pour

certaines (le glyphosate et l'acide aminophosphonique) au temps mort. Ces composés étaient également coélus avec le gradient initial. Deux molécules sont également complètement coélues. Il s'agit du 3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A et bis(2-ethylhexyl) phosphate.

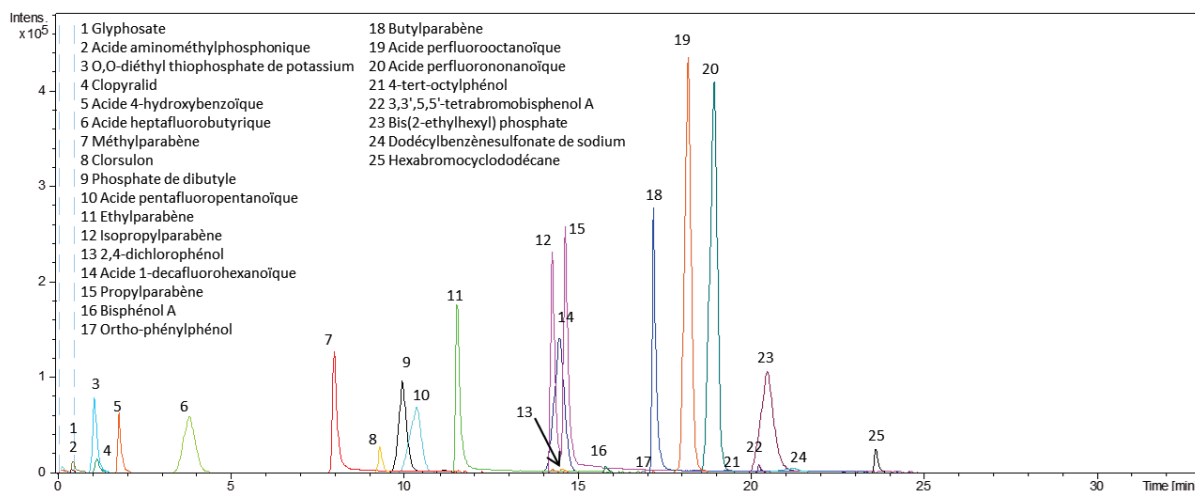


Figure III- 17 : Chromatogramme de l'eau dopée à  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  avec les 57 composés d'intérêt en mode d'ionisation négatif

Parmi les substances d'intérêt s'ionisant en mode négatif, le propylparabène et l'isopropylparabène sont des isomères. De plus, ils sont caractérisés par les mêmes ions grâce au spectromètre de masse. Par conséquent, afin de déterminer quel composé correspond à quel pic chromatographique, chaque composé a été injecté séparément.

Des coélutions subsistent dans les deux méthodes chromatographiques développées. Cependant, dans le cas de notre étude, l'objectif était de développer des méthodes multirésidus par screening ciblé qui permettraient aussi de réaliser un screening non ciblé. C'est pourquoi, l'optimisation des séparations n'a pas été poussée au maximum, afin de garder des gradients les plus classiques possibles, constituant alors des méthodes génériques. De plus, à long terme, l'usage de ces méthodes sera dédié à l'analyse de différentes cohortes, nécessitant des analyses rapides. Des compromis analytiques ont donc dû être réalisés.

Un composé, l'irganox 1076, n'a pas été détecté dans le mélange des 60 composés d'intérêt dans l'eau. Ce phénomène peut s'expliquer par un potentiel effet cocktail du mélange. En effet, des compétitions d'ionisation entre différentes molécules peuvent se produire dans le spectromètre de masse au niveau de la source d'ionisation, limitant ainsi l'ionisation et donc la détection de certains composés d'intérêt. Cependant, ce composé était détecté en mélange lors de l'optimisation de la composition des phases mobiles et des paramètres de transfert pour la détection, mais pas pour l'optimisation des paramètres de source. Ainsi, cette substance d'intérêt n'était plus détectée en couplage HPLC-HRMS. Ce

phénomène peut s'expliquer par le fait que ce composé est très apolaire ( $\log K_{\text{octanol/eau}} = 19,3$ ) et qu'il n'a pas été élué de la colonne chromatographique. Cependant, s'il fallait modifier le gradient de façon à l'élué, il faudrait augmenter la durée d'analyse. Nous choisissons d'éliminer ce composé de la liste plutôt que d'augmenter le temps d'analyse.

Pour quatre composés (le clopyralid, l'acide aminométhylphosphonique, le florfenicol et le 4-n-nonylphénol), l'identification n'a pas pu être confirmée à  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . En effet, les trois points d'identification n'étaient pas présents, notamment le profil du massif isotopique. De plus, le florfenicol et le 4-n-nonylphénol ont obtenu une réponse relativement faible (de l'ordre de  $10^3$  coups) à cette concentration, ce qui laisse penser que nous ne pourrions pas descendre plus en concentration. Ainsi, après optimisation des méthodes d'analyse dans l'eau, la liste des composés d'intérêt a été réduite à 52.

#### III.4.1.2.4. Application à l'urine

Après avoir développé les méthodes chromatographiques et optimiser la détection des composés ciblés à partir d'eau dopée, les méthodes ont été appliquées au pool d'urines dopées. La solution de dopage utilisée est la même que pour l'optimisation des conditions chromatographiques, contenant 57 substances d'intérêt. Comme présenté dans la Figure III-18, certains composés ciblés n'ont pas été détectés dans l'urine. De ce fait, ces molécules ont été retirées de la liste. Il s'agissait de l'hexaméthylène tétramine et de la 4-méthylimidazole pour le mode d'ionisation positif ; de l'acide aminométhylphosphonique et du glyphosate pour le mode d'ionisation négatif. Ce phénomène est probablement engendré par des effets de matrice. En effet, ces composés sont de nature polaire, ils sont donc élués très rapidement de la colonne chromatographique, comme les très nombreux composants de l'urine. Ainsi, il est fort probable que des effets de compétition d'ionisation soient responsables de la suppression de signal de certaines substances d'intérêt. Tout comme dans l'eau dopée, l'irganox 1076 n'a pas été détecté. De plus, l'identification du clopyralid n'a pas pu être confirmée puisque le profil du massif isotopique était absent. Quant au florfenicol et au 4-n-nonylphénol, ils n'ont pas été détectés dans les échantillons d'urines probablement en raison d'effets de matrice. Egalement pour six molécules d'intérêt (la  $\lambda$ -cyhalothrine, la procymidone, le diquat, le paraquat, le glycérol monostéarate et le 4-tert-octylphénol), leur réponse était trop peu intense dans le pool d'urines dopées à  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Par conséquent, elles ont également été retirées de la liste. La liste de composés à quantifier comprend donc 43 substances d'intérêt.

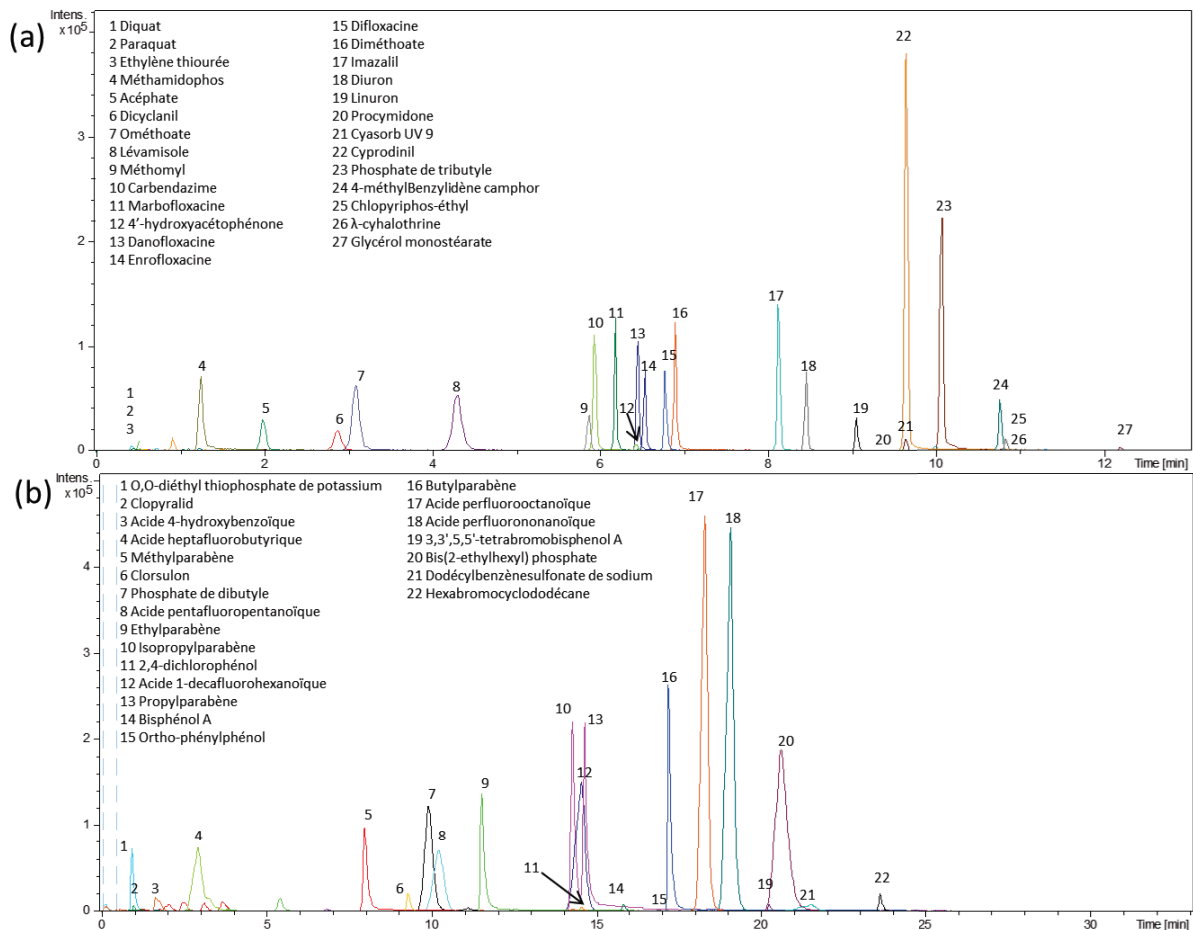


Figure III- 18 : Chromatogramme d'un pool d'urines dopées à  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  avec les 57 composés d'intérêt en mode d'ionisation (a) positif et (b) négatif

### III.4.2. Détermination des performances analytiques des méthodes

Après avoir optimisé les méthodes analytiques, un processus de validation a été appliqué. Celles-ci ont été validées en caractérisant le meilleur modèle mathématique de la courbe d'étalonnage pour chaque jour de validation, J1, J2 et J3, la précision intermédiaire, la répétabilité, l'exactitude et les limites de détection et de quantification. Cette validation de méthode s'est effectuée dans la matrice, avec une calibration selon la méthode « matrix-matched calibration » ; c'est-à-dire en introduisant le mélange de composés d'intérêt à différentes concentrations dans le pool d'urines, le même pool ayant été utilisé pour le développement analytique.

#### III.4.2.1. Estimations des limites de quantification et du modèle mathématique de la courbe de calibration

Avant de commencer le processus de validation de méthode, une estimation des limites de quantification ainsi qu'une estimation du modèle mathématique de la courbe de



calibration de chaque composé sont réalisées. Il s'agit d'une étape préliminaire à la validation de méthode. Pour ce faire, des mélanges de composés ciblés à différentes concentrations dans le pool d'urines ont été injectés en duplicat dans le système analytique en mode d'ionisation positif et négatif. Les points de gamme ont été injectés du moins au plus concentrés. La gamme de calibration était constituée de 15 points allant de  $1,0 \text{ ng.mL}^{-1}$  (C1) à  $5000,0 \text{ ng.mL}^{-1}$  (C15).

Dans un premier temps, les courbes de calibration représentant les aires obtenues en fonction des concentrations injectées, sont tracées afin de visualiser si celles-ci représentent un modèle mathématique caractéristique. Ensuite, les équations de droites ainsi que leur coefficient de détermination sont calculés selon le modèle mathématique choisi. Pour huit composés ciblés, le modèle mathématique n'est pas un modèle classique. Il s'agit du linuron, du dicyclanil, du dodécylbenzènesulfonate de sodium, du 3,3',5,5'-tétrabromobisphénol A, du 2,4-dichlorophénol, de la 4-méthylbenzylidène camphre, du chlorpyrifos-éthyl et de l'1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane. En effet, les points de la gamme d'étalonnage étaient éparés, ne formant pas une droite linéaire ou une courbe quadratique. De ce fait, ces composés ciblés ont été retirés de la liste pour la suite des étapes.

Pour chaque composé, les concentrations les plus basses permettant d'obtenir un rapport signal sur bruit supérieur ou égal à dix, pour l'estimation des LOQ, ont été déterminées. Ces valeurs de LOQ méthodologiques estimées sont répertoriées dans la Figure III-19. Seules les substances d'intérêt avec des LOQ estimées inférieures à  $200 \text{ ng.mL}^{-1}$  sont représentées. En effet, pour huit composés, la LOQ estimée est supérieure à cette limite. Il s'agit du cyasorb UV 9 ( $747 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), du 4-hydroxy acétophénone ( $896 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), de l'éthylène thiourée ( $1345 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), de l'acide heptafluorobutyrique ( $346 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), de l'acide 4-hydroxybenzoïque ( $321 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), de la danofloxacin ( $620 \text{ ng.mL}^{-1}$ ), de l'enrofloxacin ( $677 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) et de l'ortho-phénylphénol ( $2252 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). Nous choisissons de faire subir le protocole de validation de méthode seulement aux composés d'intérêt ayant obtenu des LOQ estimées inférieures à  $200 \text{ ng.mL}^{-1}$  et avec une gamme de concentration correspondant à un modèle mathématique adapté. De plus, à notre connaissance, ces contaminants environnementaux n'ont jamais été retrouvés au-delà de cette concentration dans l'urine humaine. Ainsi, seulement 27 substances d'intérêt ont suivi le processus de validation.

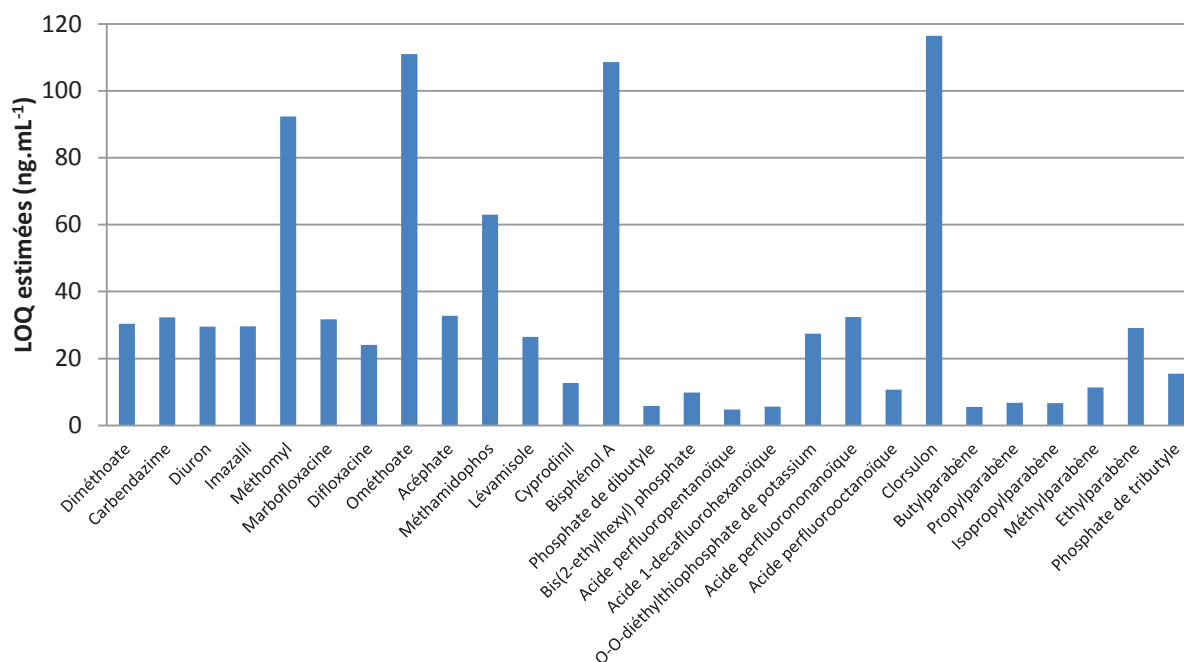


Figure III- 19 : LOQ méthodologiques estimées pour 27 substances d'intérêt

Tout comme les LOQ estimées, les gammes de concentration correspondant à un modèle mathématique adapté varient selon les substances, comme illustré dans le Tableau III-17. De ce fait, la gamme de validation de méthode de ces essais préliminaires a été modifiée. En effet, la concentration haute commune à toutes les gammes de calibration est 250 ng.mL<sup>-1</sup>. Cette dernière correspondra donc à la concentration haute de la gamme de calibration de chaque composé. Afin d'avoir au moins six points dans chaque gamme de calibration, des points ont été ajoutés. Ainsi, la gamme va de 2,5 ng.mL<sup>-1</sup> à 250 ng.mL<sup>-1</sup>. Le plan de validation utilisé est représenté dans le Tableau III-18. La précision et l'exactitude de la concentration haute ont été étudiées le premier jour de validation, afin d'affiner l'estimation des LOQ et de déterminer les gammes de calibration finales. Ainsi, le processus de validation de méthode a pu être appliqué à 27 composés d'intérêt.

Tableau III- 17 : Gammes de linéarité estimées pour 27 composés

Concentration (µg.mL <sup>-1</sup> )	5	4	3	2	1	0,75	0,5	0,25	0,1	0,075	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001
Bisphénol A															
Méthomyl															
Ométhoate															
Clorsulon															
Imazalil															
Carbendazime															
Diuron															
Difloxacine															
Diméthoate															
Acide perfluorononanoïque															
Marbofloxacine															
Lévamisole															
Ethylparabène															
O,O-diéthyl thiophosphate de potassium															
Cyprodinil															
Acide perfluorooctanoïque															
Acéphate															
Méthamidophos															
Méthylparabène															
Acide 1-decafluorohexanoïque															
Bis(2-ethylhexyl) phosphate															
Butylparabène															
Propylparabène															
Isopropylparabène															
Phosphate de dibutyle															
Phosphate de tributyle															
Acide perfluoropentanoïque															

Tableau III- 18 : Plan de validation sur trois jours pour chaque composé (gamme de concentration estimée, nombre de points par gamme de calibration et concentration pour les trois niveaux de concentration de dopage de la gamme (bas (C1), moyen (C2), et haut niveau (C3)) au jour 1 (J1), jour 2 (J2) et jour 3 (J3))

Composé	Gamme de concentration estimée (ng.mL <sup>-1</sup> )	Nombre de points par gamme	Concentration pour la détermination de la précision, l'exactitude et les effets de matrice (ng.mL <sup>-1</sup> )		
			C1	C2	C3
			J3	J2	J1
<i>ESI positif</i>					
Diuron	25,0-250,0	12	30,0	150,0	225,0
Carbendazime	25,0-250,0	11	30,0	150,0	225,0
Diméthoate	25,0-250,0	14	30,0	150,0	225,0
Imazalil	25,0-250,0	12	30,0	150,0	225,0
Marbofloxacin	25,0-250,0	14	30,0	150,0	225,0
Difloxacin	25,0-250,0	12	30,0	150,0	225,0
Phosphate de tributyle	5,0-250,0	14	30,0	150,0	225,0
Ométhoate	30,0-250,0	11	30,0	150,0	225,0
Méthamidophos	10,0-250,0	11	30,0	150,0	225,0
Cyprodinil	10,0-250,0	14	30,0	150,0	225,0
Acéphate	10,0-250,0	8	62,5	150,0	225,0
Lévamisole	25,0-250,0	8	62,5	150,0	225,0
Méthomyl	75,0-250,0	6	112,5	150,0	225,0
<i>ESI négatif</i>					
Acide perfluorononanoïque	5,0-250,0	14	5,0	150,0	225,0
Bis(2-ethylhexyl) phosphate	5,0-250,0	9	5,0	150,0	225,0
Acide 1-decafluorohexanoïque	5,0-250,0	16	5,0	150,0	225,0
Phosphate de dibutyle	5,0-250,0	14	20,0	150,0	225,0
Acide perfluoropentanoïque	5,0-250,0	16	20,0	150,0	225,0
Méthylparabène	10,0-250,0	14	20,0	150,0	225,0
Ethylparabène	20,0-250,0	14	20,0	150,0	225,0
Isopropylparabène	5,0-250,0	16	20,0	150,0	225,0
Propylparabène	5,0-250,0	16	20,0	150,0	225,0
Butylparabène	5,0-250,0	16	20,0	150,0	225,0
Clorsulon	20,0-250,0	14	20,0	150,0	225,0
Acide perfluorooctanoïque	10,0-250,0	16	20,0	150,0	225,0
O,O-diéthyl thiophosphate de potassium	25,0-250,0	9	62,5	150,0	225,0
Bisphénol A	62,5-250,0	9	62,5	150,0	225,0

#### III.4.2.2. Validation des méthodes ESI positif et négatif

Comme la matrice d'étude choisie est une matrice biologique, l'urine, le processus de validation de méthode bioanalytique des directives de la Food and Drug Administration

(FDA) a été utilisé pour valider la méthode. En effet, ces recommandations sont les plus utilisées dans le cas d'échantillons biologiques (Arora *et al.*, 2014; Vitku *et al.*, 2015), et tout particulièrement pour l'urine (Ongay *et al.*, 2014).

Le mélange des composés d'intérêt utilisé pour le dopage a été préparé chaque jour de validation.

Les modèles mathématiques des courbes de calibration ont été étudiés. Une gamme de calibration utilisant plusieurs concentrations, différentes selon les composés, a été injectée en duplicat dans le système analytique chaque jour sur trois jours. Les directives de la FDA recommandent un minimum de six points pour chaque courbe de calibration. Les dilutions du mélange de substances d'intérêt ont été réalisées dans le pool d'urines à partir de solutions mères. Des « blancs d'injection » constitués seulement d'eau MilliQ, ont été introduits dans la gamme de calibration entre chaque échantillon de concentrations différentes. Aucun effet mémoire n'a été constaté d'une injection à l'autre. L'adéquation du modèle choisi a été évaluée en utilisant le coefficient de détermination ( $R^2$ ), l'exactitude, la répétabilité et la précision intermédiaire. Ces dernières ont été évaluées à partir des concentrations calculées grâce à l'équation de la courbe de calibration obtenue selon le modèle mathématique optimal. Les résultats des performances et de la validation des méthodes développées ici sont répertoriés dans le Tableau III-19. Pour six composés (la carbendazime, l'imazalil, la marbofloxacin, l'acéphate, le phosphate de dibutyle et l'éthylparabène), le modèle linéaire a permis d'obtenir les meilleurs critères. En revanche, pour tous les autres composés, c'est le modèle quadratique qui a permis l'obtention des meilleurs critères. Les coefficients de détermination sont supérieurs à 0,99 sur les trois jours pour l'ensemble des composés, excepté six substances. Le méthomyl et l'acéphate ont obtenu des coefficients de détermination compris entre 0,89 et 0,96. Pour l'acide perfluorononanoïque, le clorsulon, la difloxacin et le méthamidophos, leur coefficient de détermination sont supérieurs à 0,98 tout au long du processus de validation. Cependant, il n'a pas été possible de valider le protocole analytique pour quatre composés ciblés (le bisphénol A, le bis(2-éthylhexyl) phosphate, l'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium et l'acide perfluorooctanoïque) dans la gamme de concentration désirée. En effet, le bisphénol A a subi le processus de validation de méthode avec neuf points de gamme. Cependant, seulement cinq points de gamme ont été exploitables pour l'étude du modèle mathématique de la courbe de calibration, ce qui est insuffisant d'après les directives de la FDA. En ce qui concerne le bis(2-éthylhexyl) phosphate, les points de gamme choisis n'ont pas permis de produire un modèle mathématique tel que le modèle linéaire ou le quadratique avec un coefficient de détermination satisfaisant. Pour l'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium, celui-ci est coélué à une substance endogène, de masse

monoisotopique similaire à celle du composé d'intérêt, présente dans le pool d'urines. La Figure III-20 illustre cette coélution. De ce fait, au-delà d'une certaine concentration, l'intégration du pic chromatographique est devenue difficile. Les points de gamme n'ont donc pas permis la formation d'un modèle mathématique linéaire ou quadratique. Cependant, l'identification de ce composé a été confirmée par son temps de rétention, sa masse exacte, mais aussi en comparant les réponses obtenues en fonction des concentrations injectées de son standard analytique dans le pool d'urines. Enfin, l'acide perfluorooctanoïque n'a pas pu être validé en raison d'un interférent endogène présent au même temps de rétention dans le pool d'urines et ayant une excellente réponse avec cette méthode. Par conséquent, les résultats du processus de validation de méthode ont été obtenus pour 23 substances d'intérêt.

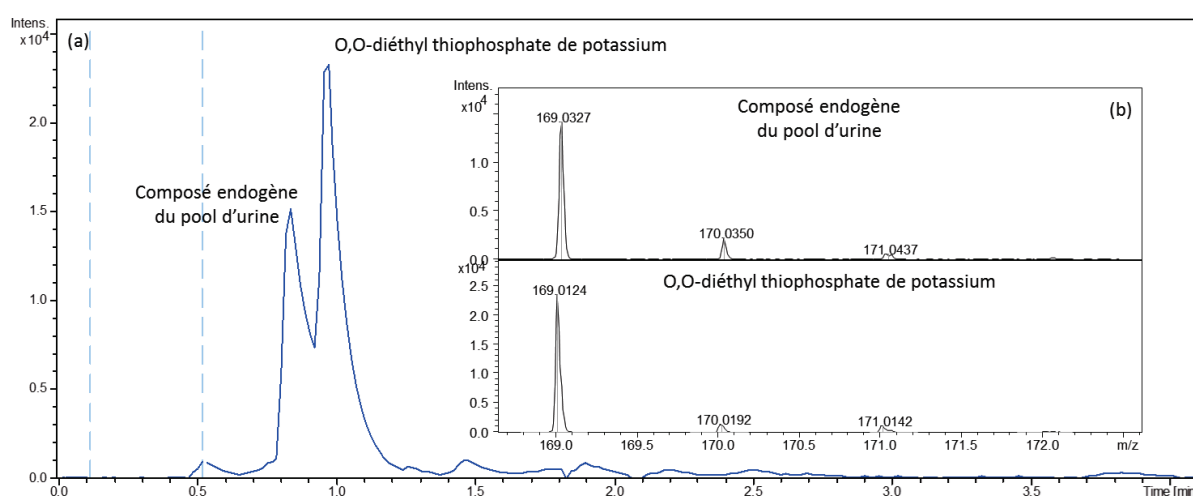


Figure III- 20 : (a) Chromatogramme de l'EIC correspondant à la masse 169,01 et (b) spectres de masse de l'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium et de la substance endogène dans le pool d'urines dopées à 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

La précision intermédiaire et la répétabilité ont été déterminées selon trois niveaux de concentrations. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau III-19. Les valeurs des coefficients de variation (CVs) de la répétabilité ont indiqué une répétabilité satisfaisante pour la majorité des substances d'intérêt, avec des CVs inférieurs à 20 % pour la concentration basse et des CVs inférieurs à 15 % pour les concentrations moyenne et haute. Néanmoins, l'acéphate et le clorsulon ont présenté des valeurs de CVs pour la répétabilité de 28 et 33 % pour respectivement, la concentration moyenne et la concentration haute.

Comme recommandé par la FDA, tous les CVs de la précision intermédiaire ont été tous inférieurs à 15 % pour les concentrations moyenne et haute. En ce qui concerne la concentration basse, les valeurs de CVs pour seulement deux composés ont été légèrement supérieures à 20 %. Celles-ci se sont élevées à 21 et 22 % pour respectivement, le méthamidophos et l'acide perfluoropentanoïque.

L'exactitude a été évaluée sur les trois mêmes concentrations que celles utilisées pour la répétabilité et la précision intermédiaire. La gamme acceptable est comprise entre 85 et 115 % pour les concentrations moyenne et haute, et entre 80 et 120 % pour la concentration basse. La concentration calculée a été déterminée en utilisant l'équation de la courbe de calibration. Pour les concentrations moyenne et haute, la majorité des valeurs d'exactitude s'est située entre 85 et 115 %, excepté pour le diuron, qui a présenté une exactitude de 56 % pour la concentration moyenne, et pour le clorsulon une exactitude de 125 % pour la même concentration. Pour trois autres composés (le méthomyl, l'acéphate et le méthylparabène), les valeurs d'exactitude ont été légèrement en dehors de la gamme acceptable (respectivement, 83, 84 et 83 %). Pour la concentration basse, toutes les valeurs d'exactitude se sont situées entre 80 et 120 %, excepté pour l'acide perfluoropentanoïque avec 34 %.

#### III.4.2.3. Détermination des limites de détection et de quantification

Pour la détermination des LOD et des LOQ, plusieurs stratégies ont été décrites dans la littérature (Vial et Jardy, 1999). Parmi celles-ci, l'une, reposant sur le rapport signal sur bruit, est la plus rapide et par conséquent, la stratégie la plus utilisée. Cependant, cette dernière nécessite un échantillon d'urine exempt de tous les analytes ciblés, aussi qualifiée d'urine blanche, ce qui est rarement possible. En effet, dans notre cas, trois composés étaient déjà présents dans les urines poolées, à savoir, l'acide perfluorooctanoïque, le dodécylbenzènesulfonate de sodium et l'acide 4-hydroxybenzoïque. Dans ce cas, la détermination des LOD et des LOQ a été établie à partir de pool d'urines dopées à la concentration basse et d'urines non dopées par l'analyte d'intérêt. De cette façon, nous avons pu déterminer la concentration permettant d'obtenir un signal supérieur au signal du composé ciblé déjà présent dans le pool d'urines, en comparant les réponses obtenues pour chacun de ces composés dans le pool d'urines dopées et non dopées, comme décrit dans la partie III.3.5. Les LOD et les LOQ ont été déterminées chaque jour de validation et la valeur finale choisie correspond à la plus haute concentration obtenue sur les trois jours.

Aux LOQ, les trois critères d'identification ne sont pas remplis. En effet, la déviation du massif isotopique entre le spectre expérimental et théorique n'a pas pu être utilisée comme un critère d'identification aux niveaux des LOQ, puisque le massif isotopique n'était pas visible avec notre appareil. Dans ce cas, afin de confirmer l'identification, il est possible d'utiliser un second ion caractéristique du composé, ou des fragments spécifiques. Badoud *et al.* (Badoud *et al.*, 2009) ont utilisé ces critères d'identification supplémentaires, quand cela était possible. Cependant, dans notre cas, les ions caractéristiques supplémentaires et les

fragments n'étaient pas visibles à de faibles concentrations. Par conséquent, seuls deux critères ont été utilisés dans ce cas.

D'après les résultats obtenus, les LOD des substances d'intérêt varient de 2,4 à 46,0 ng.mL<sup>-1</sup>. Ces méthodes offrent des LOD en-dessous de 17 ng.mL<sup>-1</sup> pour tous les composés, excepté pour le méthomyl (41,8 ng.mL<sup>-1</sup>) et l'acéphate (46,0 ng.mL<sup>-1</sup>). Quant aux LOQ, elles s'étendent de 4,3 à 113,2 ng.mL<sup>-1</sup>. Les méthodes développées offrent des valeurs de LOQ inférieures à 40 ng.mL<sup>-1</sup> pour tous les composés, excepté pour le méthomyl (113,2 ng.mL<sup>-1</sup>) et l'acéphate (63,9 ng.mL<sup>-1</sup>).

Plusieurs études ont permis de quantifier certains de nos contaminants d'intérêt par LC-MS. Néanmoins, à notre connaissance, les substances sélectionnées dans notre étude n'ont encore jamais été quantifiées dans des échantillons d'urines avec un spectromètre de masse haute résolution. Nous allons donc comparer les résultats obtenus soit sur d'autres matrices soit sur d'autres instruments.

Si nous nous intéressons aux contaminants environnementaux quantifiés par HRMS dans tout type de matrice, l'analyse multirésidus de P. Sivaperumal *et al.* (Sivaperumal *et al.*, 2015) a donné une valeur de LOQ de 10,1 µg.kg<sup>-1</sup> pour le diméthoate dans les fruits et légumes, ce qui est comparable à ce que nous avons obtenu (14,0 ng.mL<sup>-1</sup>). Néanmoins, pour l'acéphate et la carbendazime, les LOQ étaient meilleures pour P. Sivaperumal *et al.*. Cette différence peut s'expliquer par le fait que nous n'avons pas utilisé de préparation d'échantillon, seulement une dilution négligeable de l'urine ; tandis que P. Sivaperumal *et al.* ont extrait et concentré les composés. Comme attendu pour une méthode générique, les LOQ obtenues pour certains autres analytes sont également plus élevées que celles rapportées dans la littérature. Par exemple, pour l'acide perfluoropentanoïque, nous avons obtenu une valeur de LOQ de 4,8 ng.mL<sup>-1</sup>. Cette dernière pourrait être améliorée par ajout d'une étape de purification et de concentration dans le protocole analytique, comme montré dans la littérature (13,3 pg.mL<sup>-1</sup>) (Robles-Molina *et al.*, 2014). En ce qui concerne les composés de la famille des médicaments vétérinaires, plusieurs équipes ont obtenu des valeurs de LOD similaires aux nôtres pour la marbofloxacin et la difloxacin (Hermo *et al.*, 2008; Orтели *et al.*, 2009). A notre connaissance, les parabènes n'ont pas encore été quantifiés par LC-ToF.

Si nous nous intéressons maintenant aux contaminants environnementaux quantifiés dans l'urine mais pas par HRMS, quelques études seulement existent. L'une d'elle relatant l'analyse du diuron dans l'urine humaine était basée sur l'injection d'urine sur un système HPLC-UV-Vis sans étape de préparation d'échantillon au préalable (Pozzebon *et al.*, 2003). Les LOD et LOQ obtenues pour le diuron étaient de, respectivement, 14,0 ng.mL<sup>-1</sup> et 40,0 ng.mL<sup>-1</sup>. La spectrométrie de masse est plus sensible que les détecteurs UV-Vis ; de ce fait,



les résultats que nous avons obtenu étaient meilleurs avec  $4,6 \text{ ng.mL}^{-1}$  et  $27,3 \text{ ng.mL}^{-1}$ , respectivement, pour la LOD et la LOQ. Les valeurs de LOQ que nous avons obtenu pour les pesticides d'intérêt sont similaires aux concentrations de certains pesticides retrouvés dans l'urine ( $7,62 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour 2,4-dichlorophenol,  $10,56 \text{ ng.mL}^{-1}$  pour 2,5-dichlorophenol) (Nadine Fréry *et al.*, 2013). Les études menées par R.K. Moos *et al.* (Moos *et al.*, 2014) et A.G. Asimakopoulos *et al.* (Asimakopoulos *et al.*, 2014) relatant de la détermination des parabènes dans l'urine par LC-MS/MS en mode MRM, ont permis d'obtenir des valeurs de LOQ meilleures que nos résultats, parce que ces équipes ont utilisé des étapes de préparation d'échantillon. En outre, la spectrométrie de masse en mode MRM est plus sensible que la spectrométrie de masse haute résolution, telle que celle que nous avons utilisée. Ce phénomène a aussi été observé pour le phosphate de dibutyle quantifié par N. Van den Eede *et al.* (Van den Eede *et al.*, 2013) par LC-MS/MS en mode MRM avec une étape d'extraction sur phase solide. La valeur de LOQ atteinte était de  $3,4 \text{ ng.mL}^{-1}$  tandis que nous avons obtenu  $12,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ .

#### III.4.2.4. Evaluation des effets de matrice

L'impact de la matrice urinaire sur la méthode en termes d'effets de matrice a été évalué par dopage de l'eau et du pool d'urines avec des quantités connues de composés ciblés à deux concentrations différentes. Les résultats sont résumés dans le Tableau III-19. Des effets de matrice ont été observés pour toutes les substances. Étant donné que le pool d'urines a été analysé sans préparation d'échantillon et dilué légèrement, nous nous attendions à obtenir des effets de matrice significatifs. Pour tous les contaminants ionisés dans le mode ESI négatif, les effets de matrice observés sont négatifs, ce qui indique une inhibition du signal. Dans le mode d'ionisation positif, il y a plus de suppressions de signal significatives que d'augmentations. Une meilleure réponse a été observée pour cinq composés (l'imazalil, la difloxacin, le phosphate de tributyle, le lévamisole et le cyprodinil) et une diminution de la réponse pour six contaminants (le diuron, la carbendazime, le diméthoate, l'ométhoate, le méthamidophos et le méthomyl), pour les deux niveaux de concentration. Les augmentations de signal en ESI en spectrométrie de masse sont rares. Néanmoins, il est possible qu'il y ait des compétitions d'ionisation entre les analytes d'intérêt présentant des réponses augmentées et des composés coélus présents dans l'urine, qui seraient fortement ionisables en ESI. Pour la marbofloxacin et l'acéphate, un phénomène a été mis en évidence: les signaux ont été augmentés aux faibles concentrations avec des effets de matrice de, respectivement, 175% et 35% ; et les signaux ont été diminués aux concentrations élevées avec des effets de matrice de, respectivement, -12% et -44%. C. Jansson *et al.* (Jansson *et al.*, 2004) ont montré que

l'influence de la matrice pouvait être significativement variable selon la concentration, en particulier pour les pesticides. En effet, la composition de l'urine varie selon le donneur. De plus, l'urine contient plus de 3 000 composants (Bouatra *et al.*, 2013) qui peuvent interagir et provoquer des réactions biologiques selon les conditions, ce qui entraîne différents effets de matrice en fonction de l'injection. Malgré l'injection directe du pool d'urines dans le système analytique, nous avons obtenu des effets de matrice pour les quatre parabènes égaux ou supérieurs à ceux observés par d'autres auteurs (Asimakopoulos *et al.*, 2014).

Tableau III- 19 : Performances et validation des méthodes LC-HRMS pour chaque composé (gamme de concentration, modèle de la courbe de calibration, limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), effets de matrice, coefficient de détermination (R<sup>2</sup>) pour les trois jours (J1, J2 et J3), précision intermédiaire, répétabilité et exactitude obtenues pour les trois niveaux de concentration de la gamme dynamique (faible (C1), moyenne (C2), et haute concentration (C3))

Composé	Gamme de concentration (ng.mL <sup>-1</sup> )	Modèle de la courbe de calibration	LOD (ng.mL <sup>-1</sup> )	LOQ (ng.mL <sup>-1</sup> )	Effets de matrice (%)			R <sup>2</sup>			Précision intermédiaire (CV%)			Répétabilité (CV%)			Exactitude (%)		
					C1	C3	J1	J2	J3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	
<i>ESI positif</i>																			
Diuron	27,3-202,1	Quadratique	4,6	27,3	-35	-25	0,995	0,996	0,995	6	4	2	5	5	9	100	56	95	
Carbendazime	30,0-222,4	Linéaire	16,0	30,0	-41	-68	0,994	0,994	0,995	10	6	6	2	3	8	120	101	89	
Diméthoate	14,9-240,6	Quadratique	4,1	14,9	-37	-40	0,996	0,994	0,996	10	3	5	6	3	8	95	101	94	
Imazalil	18,7-208,0	Linéaire	8,1	18,7	55	103	0,997	0,995	0,997	6	1	1	2	4	6	103	99	100	
Marbofloxacin	13,1-213,6	Linéaire	3,6	13,1	175	-12	0,998	0,990	0,996	4	4	4	3	2	9	111	96	98	
Difloxacin	15,9-172,0	Quadratique	3,0	15,9	150	9	0,988	0,994	0,996	13	5	5	9	1	9	100	98	104	
Phosphate de tributyle	21,1-291,0	Quadratique	4,9	21,1	39	77	0,997	0,995	0,999	4	2	2	9	2	5	92	105	99	
Ométhoate	34,7-258,2	Quadratique	10,1	34,7	-10	-23	0,997	0,991	0,997	9	5	2	1	3	5	118	105	98	
Méthamidophos	30,1-221,2	Quadratique	8,5	30,1	-54	-55	0,994	0,988	0,992	21	7	3	7	6	7	120	108	93	
Lévamisole	38,1-178,4	Quadratique	16,1	38,1	17	2	0,995	0,993	0,997	5	2	2	3	3	5	100	103	102	
Cyprodinil	13,7-222,6	Quadratique	3,7	13,7	18	30	0,998	0,998	0,999	4	2	2	2	1	6	101	102	98	
Méthomyl	113,2-216,6	Quadratique	41,8	113,2	-20	-26	0,895	0,956	0,967	7	9	4	15	2	5	101	102	83	
Acéphate	63,9-228,3	Linéaire	46,0	63,9	35	-44	0,968	0,948	0,958	3	7	7	5	10	28	109	84	93	
<i>ESI négatif</i>																			
Phosphate de dibutyle	12,2-199,8	Linéaire	7,8	12,2	-5	-23	0,997	0,999	0,998	5	2	2	11	9	3	92	92	85	
Acide perfluoropentanoïque	6,5-166,2	Quadratique	3,7	6,5	-9	-2	0,998	0,998	0,999	22	14	13	6	4	2	116	100	102	
Acide 1-decafluorohexanoïque	4,3-193,7	Quadratique	2,2	4,3	-8	-4	0,999	0,999	0,999	19	3	2	5	3	1	89	102	101	
Méthylparabène	17,7-198,7	Quadratique	14,4	17,7	-55	-65	0,993	0,998	0,997	19	3	5	7	15	5	90	83	95	
Ethylparabène	11,9-191,6	Linéaire	7,6	11,9	-56	-66	0,994	0,993	0,999	12	4	6	7	10	2	101	112	100	
Isopropylparabène	14,0-228,9	Quadratique	2,6	14,0	-51	-58	0,998	0,999	0,997	7	2	2	12	11	3	101	109	102	
Propylparabène	13,8-225,9	Quadratique	8,8	13,8	-54	-59	0,998	0,999	0,999	4	2	2	9	13	8	99	112	109	
Butylparabène	7,3-188,1	Quadratique	4,2	7,3	-43	-59	0,998	0,999	0,998	6	3	1	9	9	3	100	107	99	
Clorsulon	19,6-270,4	Quadratique	10,5	19,6	-64	-75	0,997	0,989	0,993	11	7	2	16	33	4	106	125	98	
Acide perfluorononanoïque	4,8-213,8	Quadratique	2,4	4,8	-69	-51	0,989	0,986	0,992	9	5	6	4	8	1	34	89	100	

### III.4.3. Etudes d'échantillons réels

#### III.4.3.1. Application des méthodes développées à des échantillons réels

Ces méthodes multirésidus ont été appliquées à 17 échantillons d'urines correspondant aux premières urines du matin, à partir de volontaires du laboratoire. L'objectif était de vérifier l'applicabilité de ces méthodes analytiques et ainsi établir un large screening de la présence des composés d'intérêt dans des échantillons d'urines. Afin de compenser les effets de matrice, la méthode de quantification est basée sur une méthode de calibration dite « matrix-matched », c'est-à-dire que la gamme d'étalonnage est réalisée dans la matrice, en l'occurrence le pool d'urines. Ce pool d'urines utilisé a été dopé à  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  par les 43 composés ciblés.

Sur les 43 composés ciblés, quatre d'entre eux ont été détectés (le phosphate de tributyle, le dodécylbenzènesulfonate de sodium, l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium). La méthode a été validée pour le phosphate de tributyle. Cependant, sa concentration était inférieure à la LOQ. Sur les trois autres composés détectés, le dodécylbenzènesulfonate de sodium et l'acide 4-hydroxybenzoïque n'ont pas subi le processus de validation ; ainsi, ils n'ont pas pu être quantifiés. L'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium n'a également pas pu être quantifié. En effet, ce composé a subi le processus de validation ; en revanche, la méthode n'a pas été validée. Ces substances ciblées ont été détectées et identifiées dans les échantillons d'urines grâce à deux critères, qui sont le temps de rétention et la masse exacte. Des critères d'identification supplémentaires n'étaient pas utilisables dans ce cas, et notamment avec des faibles concentrations. En effet, les profils isotopiques, des adduits supplémentaires et des fragments spécifiques n'étaient pas visibles sur les spectres de masse obtenus.

Le phosphate de tributyle a déjà été détecté chez l'Homme, dans les tissus adipeux (J. S. Stanley, 1986). Selon plusieurs études, l'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium a été retrouvé dans différents échantillons biologiques humains, comme des échantillons fécaux (Schenke, 2000), du liquide amniotique (Koutroulakis *et al.*, 2014), et de l'urine (Aprea *et al.*, 1996). Parmi ces échantillons d'urines, ce métabolite de pesticide a été détecté dans 73 % des donneurs d'urines (Aprea *et al.*, 1996). A notre connaissance, le dodécylbenzènesulfonate de sodium et l'acide 4-hydroxybenzoïque n'ont pas été retrouvés dans des échantillons biologiques humains. Les résultats de nos analyses ont indiqué que deux substances d'intérêt (le phosphate de tributyle et le dodécylbenzènesulfonate de sodium) ont été détectées dans la totalité des échantillons. En effet, ces composés sont utilisés dans l'industrie du papier et du textile, et entrent donc largement en contact avec l'Homme dans son quotidien. Néanmoins,

les analyses ont été réalisées sur seulement 17 échantillons d'urines provenant de donneurs avec des styles de vie relativement similaires. L'application à divers échantillons urinaires a démontré la faisabilité de ces méthodes. Il serait intéressant d'analyser des échantillons provenant de différentes cohortes et ainsi comparer les résultats grâce à des outils statistiques selon différents critères ; par exemple la fréquence de consommation de fruits et légumes avec ou sans leur peau, pour la recherche de pesticides.

#### III.4.3.2. Recherche des métabolites connus et autres contaminants environnementaux

L'utilisation d'un spectromètre de masse haute résolution, tel qu'un temps de vol en mode full-scan, permet d'acquérir les données de toutes les molécules ionisées passant à travers l'analyseur. Les méthodes développées et présentées dans ce chapitre ont ainsi permis de quantifier des molécules d'intérêt, selon un screening ciblé en mode full-scan. Cependant, ces dernières permettent également de recueillir les données d'autres composants présents dans l'échantillon. Dans le cas de notre étude, nous avons étendu la recherche de contaminants environnementaux aux métabolites connus des substances d'intérêt, ainsi qu'à d'autres composés considérés comme contaminants environnementaux et ayant déjà été retrouvés dans des matrices biologiques ou environnementales. Ce type de screening peut être qualifié de semi ciblé. Les composés recherchés sont des additifs plastiques étudiés dans le chapitre II et des médicaments humains très largement retrouvés dans l'environnement. De ce fait, l'Homme peut alors ingérer ces composés inconsciemment. L'objectif était de détecter et d'identifier des contaminants environnementaux ou des métabolites de cette classe de composés dans un échantillon d'urine. Les molécules recherchées sont répertoriées dans le Tableau III-20. Cette liste n'est évidemment pas exhaustive. Seuls les ions  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  et  $[M-H]^-$  ont été recherchés. Ils ont été déterminés grâce au programme IsotopePattern (Bruker Daltonics® GmbH). Cette étude a été réalisée sur un seul échantillon d'urine, un échantillon réel analysé précédemment (III.4.3.1).

Tableau III- 20 : Composés à rechercher, masse exacte de leurs potentiels ions caractéristiques (en Da) et les références des molécules sélectionnées

Molécule	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	Référence
<i>Métabolites connus des composés d'intérêt</i>				
1-(3,4-dichlorophenyl)-3-méthylurea	219,0086	240,9906	216,9930	(Boven <i>et al.</i> , 1990)
3,4-dichlorophenyl urea	204,9930	226,9749	202,9773	(Boven <i>et al.</i> , 1990)
3,4-dichloraniline	161,9872	183,9691	159,9715	(Boven <i>et al.</i> , 1990)
Diméthylthiophosphate	142,9926	164,9746	140,9770	(Duggan <i>et al.</i> , 2003; ilo.org, n.d.)
Diméthyl dithiophosphate	158,9698	180,9517	156,9541	(Duggan <i>et al.</i> , 2003; Feng <i>et al.</i> , 2012)
N-méthylglyphosate	184,0369	206,0189	182,0213	(ehrenstorfer.com, n.d.)
2-amino-benzimidazole	134,0713	156,0532	132,0556	(Bonnard <i>et al.</i> , 2009)
3,5-dichloraniline	161,9872	183,9691	159,9715	(ehrenstorfer.com, n.d.)
Méthomyl-oxime	106,0321	128,0141	104,0165	(ehrenstorfer.com, n.d.)
Méthomyl-sulfone	195,0434	217,0253	193,0278	(ehrenstorfer.com, n.d.)
Méthomyl-sulfoxide	179,0485	201,0304	177,0328	(ehrenstorfer.com, n.d.)
Alpha-(2,4-dichlorophényl)-1H-imidazole-1-éthanol	257,0243	279,0062	255,0086	(Yoshioka <i>et al.</i> , 2004)
Phényl-hydroquinone	187,0754	209,0573	185,0597	(Nakagawa, 1996)
Sarafloxacin	386,1311	408,1130	384,1154	(Anadón <i>et al.</i> , 2011)
1-(2-mercaptoéthyl)-4-phényl-2-imidazolidinone	223,0900	245,0719	221,0743	(Lavrijsen <i>et al.</i> , 1993)
4-phényl-2-imidazolidinone	163,0866	185,0685	161,0709	(Lavrijsen <i>et al.</i> , 1993)
Bisphénol A-glucuronide	405,1544	427,1363	403,1387	(Falcý <i>et al.</i> , 2013; Harthé <i>et al.</i> , 2012)
3,5-dichloroaniline	161,9872	183,9691	159,9715	(ehrenstorfer.com, n.d.)
Diquat monopyridone	215,1179	237,0998	213,1022	(Fuke <i>et al.</i> , 2002)
Diquat-dipyridone	215,0815	237,0634	213,0659	(Fuke <i>et al.</i> , 2002)
Paraquat monopyridone Iodide	329,0145	350,9965	326,9989	(Fuke <i>et al.</i> , 1993)
Tylosin C	902,5108	924,4927	900,4951	(The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1991)
Tylosine D	918,5421	940,5240	916,5264	(Lewicki, n.d.; Montesissa <i>et al.</i> , 1999)
Dibutyl hydrogène phosphate	211,1094	233,0913	209,0937	(Suzuki <i>et al.</i> , 1984)
Butyl dihydrogène phosphate	155,0468	177,0287	153,0311	(Suzuki <i>et al.</i> , 1984)
Butyl bis(3-hydroxybutyl) phosphate	299,1618	321,1437	297,1462	(Suzuki <i>et al.</i> , 1984)

Molécule	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	Référence
<i>Contaminants environnementaux</i>				
Triphénylphosphate*	327,0781	349,0600	325,0624	(Pouech, 2014)
Oléamide*	282,2791	304,2611	280,2635	(Pouech, 2014)
Chimassorb 81*	327,1955	349,1774	325,1798	(Pouech, 2014)
Isonox 129*	439,3571	461,3390	437,3414	(Pouech, 2014)
Tinuvin 326*	316,1211	338,1031	314,1055	(Pouech, 2014)
Tinuvin 327*	358,1681	380,1500	356,1524	(Pouech, 2014)
Tinuvin 328*	352,2383	374,2203	350,2227	(Pouech, 2014)
Vitamine E*	431,3884	453,3703	429,3727	(Pouech, 2014)
Naugard DLTDP*	515,4129	537,3948	513,3972	(Pouech, 2014)
Irganox 1076*	531,4772	553,4591	529,4615	(Pouech, 2014)
Diphényl phosphate*	251,0468	273,0287	249,0311	(Pouech, 2014)
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque*	251,1642	273,1461	249,1485	(Pouech, 2014)
2,4-di-tertbutyl-phénol*	207,1743	229,1653	205,1587	(Pouech, 2014)
Paracétamol	152,0712	174,0531	150,0555	(Capdeville et Budzinski, 2011; Masiá <i>et al.</i> , 2014)
Carbamazepine	237,1028	259,0847	235,0871	(Chitescu <i>et al.</i> , 2015; Masiá <i>et al.</i> , 2014)
Sulphamethoxazole	254,0599	276,0419	252,0443	(Chitescu <i>et al.</i> , 2015)
Kétoprofène	255,1021	277,0841	253,0865	(Capdeville et Budzinski, 2011; Chitescu <i>et al.</i> , 2015)
Aténolol	267,1709	289,1528	265,1552	(Capdeville et Budzinski, 2011)
Diclofenac	296,0245	320,0221	294,0089	(Capdeville et Budzinski, 2011; Chitescu <i>et al.</i> , 2015)
Ibuprofène	207,1385	229,1204	205,1229	(Capdeville et Budzinski, 2011)

\*molécules étudiées dans le chapitre II

Chaque masse caractéristique d'un de ces composés a été extraite du chromatogramme. Aucun pic chromatographique n'était visible, excepté pour l'ion à 152,0712 Da, correspondant à l'ion [M+H]<sup>+</sup> du paracétamol. D'après la fonction « Smart Formula Manually » du logiciel DataAnalysis, le pic chromatographique observé correspondrait au paracétamol avec une erreur en masse de 4,7 ppm et une différence du profil du massif isotopique de 2,3 msigma ; ce qui est largement satisfaisant pour une hypothèse d'identification de composé, puisque l'erreur en masse est inférieure à 5 ppm et la différence du profil du massif isotopique inférieure à 30 msigma. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que ce pic chromatographique correspond bien au paracétamol et que l'échantillon d'urine contient bien ce composé.

Le standard analytique du paracétamol étant disponible au laboratoire, nous avons injecté la solution de standard dans l'eau, afin d'avancer vers une confirmation d'identification du composé. L'échantillon d'urine a également été réinjecté afin d'obtenir les données dans les mêmes conditions. En effet, l'analyse du standard analytique dans les

mêmes conditions que l'analyse de l'échantillon, en mode full-scan, permet l'obtention d'un critère d'identification supplémentaire ; il s'agit du temps de rétention. D'après la Figure III-21, représentant les chromatogrammes obtenus pour l'ion à 152,0712 Da dans (a) la solution de standard et dans (b) l'échantillon d'urine, le temps de rétention du paracétamol à partir de la solution standard correspondrait à celui de la molécule suspectée être le paracétamol dans l'échantillon d'urine. Ce dernier critère permet de corroborer l'hypothèse émise précédemment.

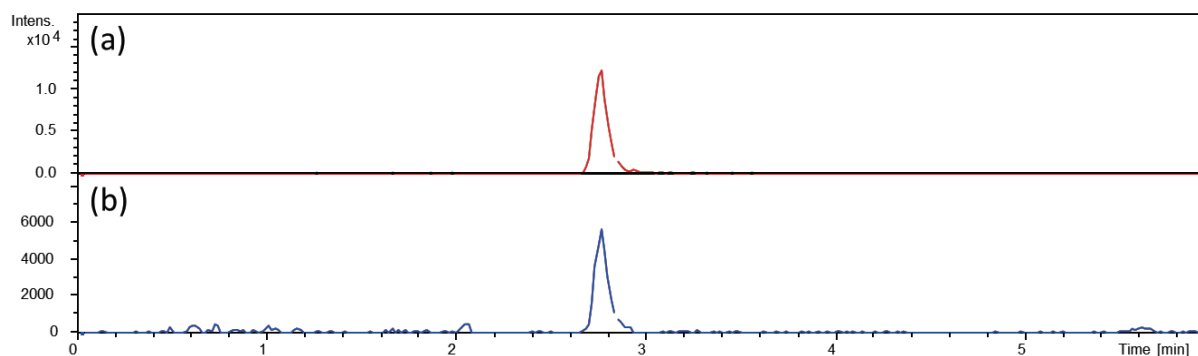


Figure III- 21 : Chromatogrammes de l'ion à 152,0712 Da extrait (a) de la solution standard de paracétamol et (b) de l'échantillon d'urine

Cependant, ce n'est pas suffisant pour confirmer l'identification d'un composé. En revanche, plus il y a de critères validés, plus la probabilité que l'identification soit juste est élevée. De ce fait, d'autres critères ont été vérifiés. Il s'agit des fragments de l'ion correspondant à 152,0712 Da. Pour ce faire, la solution de standard et l'échantillon d'urine ont été injectés en mode MS/MS. L'ion correspondant à 152,0712 Da a été fragmenté à deux énergies de collision 15 et 20 eV. La Figure III-22 représente les spectres de fragmentation de l'ion à 152,0712 Da dans (a) la solution de standard dans l'eau et dans (b) l'échantillon à 20 eV. D'après cette dernière, la fragmentation de cet ion à 20 eV a permis l'obtention de trois fragments communs dans la solution de standard et l'échantillon d'urine, dont les plus visibles sont les ions à 110,0555 Da, 134,0598 Da et 93,0266 Da. A 15 eV, les fragments sont moins nombreux mais identiques de la solution de standard analytique à l'échantillon d'urine. Ces critères supplémentaires ont permis de nous conforter dans l'idée que le composé détecté était bien le paracétamol. Cependant, d'après le donneur, ce dernier a confirmé ne pas avoir consommé de médicaments au cours des derniers mois, notamment du paracétamol. Ce composé a donc pu contaminer une denrée alimentaire, ou bien de l'eau, ce qui expliquerait la présence de cette substance dans l'urine de cet individu.



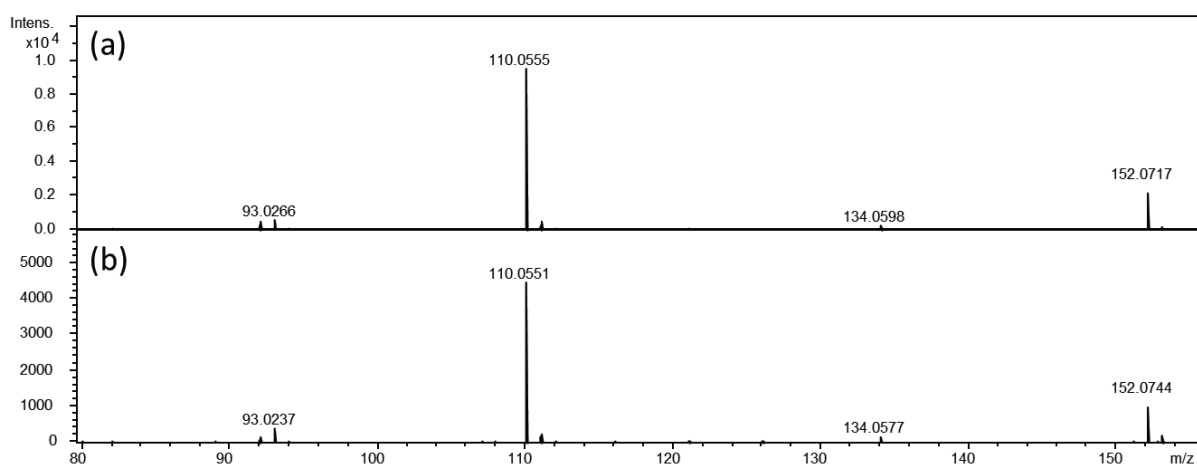


Figure III- 22 : Spectres de fragmentation de l'ion à 152,07 Da (a) dans la solution standard de paracétamol et (b) dans l'échantillon d'urine à 20 eV

Cet exemple permet de démontrer la difficulté d'évaluer l'Exposome. En effet, il est possible d'identifier et de quantifier des molécules considérées comme des contaminants environnementaux dans les matrices biologiques telles que l'urine. Cependant, il est plus difficile d'identifier la source d'exposition de laquelle provient le composé, notamment si l'exposition se fait de façon inconsciente sur l'Homme.

### III.5. Conclusions et perspectives

Deux méthodes, une en mode d'ionisation positif et l'autre en mode négatif, ont été développées pour la détection de 43 contaminants environnementaux appartenant à diverses familles chimiques, incluant la quantification de 23 composés à des niveaux de concentration faibles ( $\text{ng.mL}^{-1}$ ) dans des échantillons d'urines humaines sans préparation d'échantillon préalable. Ces méthodes ont été appliquées à 17 échantillons des premières urines du matin. Quatre contaminants (le phosphate de tributyle, le dodécylbenzènesulfonate de sodium, l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'O,O-diéthyl thiophosphate de potassium) ont été détectés dans ces échantillons. Cependant, les échantillons ont été obtenus de donneurs avec des styles de vie très similaires. Il serait intéressant de tester ces méthodes sur d'autres cohortes d'individus.

Ces méthodes permettent la détection et la quantification de contaminants environnementaux ciblés mais elles peuvent être également utilisées simultanément pour le screening non ciblé. En effet, comme ces méthodes ont été développées sur des échantillons d'urines brutes et sur un spectromètre de masse temps de vol, il est possible de réaliser des approches plus compréhensives de type screening non ciblé.

Un screening semi ciblé qui correspond à la recherche de métabolites des substances d'intérêt et d'autres composés prédéfinis et considérés comme contaminants environnementaux a été réalisé sur les données acquises sur un échantillon réel. Ce screening a permis d'identifier un médicament humain (le paracétamol), non ingéré volontairement, dans l'urine d'un donneur.

Les résultats obtenus ont permis de démontrer que des contaminants environnementaux sont bien présents dans l'urine humaine. Ces méthodes sont donc des outils pour avancer vers une évaluation de l'Exposome de chaque individu. Cependant, il faudrait élargir nos recherches à plus de composés, notamment par le screening non ciblé, en comparant les données acquises aux données répertoriées dans les bases de données et en descendant en concentration.



## **Références bibliographiques**



- Abb, M., Stahl, B., Lorenz, W., 2011. Analysis of brominated flame retardants in house dust. *Chemosphere* 85, 1657–1663. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.06.022
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012. Toxicological profile for phosphate ester flame retardants.
- Agriculture & Environment Research Unit, 2015. PPDB: Pesticide Properties DataBase [WWW Document]. www.herts.ac.uk/aeru. URL <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>
- Aguilera-Luiz, M.M., Martínez Vidal, J.L., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., 2012. Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.*, 6th International Conference on Water in Food 132, 2171–2180. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.042
- Ahel, M., Schaffner, C., Giger, W., 1996. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Res.* 30, 37–46. doi:10.1016/0043-1354(95)00123-3
- Anadón, A., Suárez, F.H., Martínez, M.A., Castellano, V., Martínez, M., Ares, I., Ramos, E., Gamboa, F., Martínez-Larrañaga, M.R., 2011. Plasma disposition and tissue depletion of difloxacin and its metabolite sarafloxacin in the food producing animals, chickens for fattening. *Food Chem. Toxicol.* 49, 441–449. doi:10.1016/j.fct.2010.11.021
- Anagnostopoulos, C., Miliadis, G.E., 2013. Development and validation of an easy multiresidue method for the determination of multiclass pesticide residues using GC–MS/MS and LC–MS/MS in olive oil and olives. *Talanta* 112, 1–10. doi:10.1016/j.talanta.2013.03.051
- ANSES, 2011a. Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) Tome 1, Contaminants inorganiques, minéraux, polluants organiques persistants, mycotoxines.
- ANSES, 2011b. Campagne nationale d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine.
- ANSES, 2010a. Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France, Synthèse et recommandations du comité d'orientation et de prospective scientifique de l'observatoire des résidus de pesticides (ORP).
- ANSES, 2010b. Avis de de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'exposition de la population française au bisphénol A et aux teneurs maximales en bisphénol A dans les aliments.
- Apra, C., Sciarra, G., Orsi, D., Boccalon, P., Sartorelli, P., Sartorelli, E., 1996. Urinary excretion of alkylphosphates in the general population (Italy). *Sci. Total Environ.* 177, 37–41. doi:10.1016/0048-9697(95)04857-X
- Aramendía, M.A., Borau, V., Lafont, F., Marinas, A., Marinas, J.M., Moreno, J.M., Porras, J.M., Urbano, F.J., 2006. Determination of diquat and paraquat in olive oil by ion-pair liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (MRM). *Food Chem.* 97, 181–188. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.005
- Araujo, P., 2009. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J. Chromatogr. B, method validation, comparison and transfer* 877, 2224–2234. doi:10.1016/j.jchromb.2008.09.030

- Arora, B., Narayanasamy, A., Nirmal, J., Halder, N., Patnaik, S., Ravi, A.K., Velpandian, T., 2014. Development and validation of a LC–MS/MS method for homocysteine thiolactone in plasma and evaluation of its stability in plasma samples. *J. Chromatogr. B* 944, 49–54. doi:10.1016/j.jchromb.2013.11.011
- Arvaniti, O.S., Andersen, H.R., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., 2014. Sorption of Perfluorinated Compounds onto different types of sewage sludge and assessment of its importance during wastewater treatment. *Chemosphere* 111, 405–411. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.03.087
- Asimakopoulos, A.G., Wang, L., Thomaidis, N.S., Kannan, K., 2014. A multi-class bioanalytical methodology for the determination of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters, benzophenone-type ultraviolet filters, triclosan, and triclocarban in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1324, 141–148. doi:10.1016/j.chroma.2013.11.031
- Badoud, F., Grata, E., Perrenoud, L., Avois, L., Saugy, M., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., 2009. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry: I. Screening analysis. *J. Chromatogr. A* 1216, 4423–4433. doi:10.1016/j.chroma.2009.03.033
- Barón, E., Gago-Ferrero, P., Gorga, M., Rudolph, I., Mendoza, G., Zapata, A.M., Díaz-Cruz, S., Barra, R., Ocampo-Duque, W., Páez, M., Darbra, R.M., Eljarrat, E., Barceló, D., 2013. Occurrence of hydrophobic organic pollutants (BFRs and UV-filters) in sediments from South America. *Chemosphere* 92, 309–316. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.032
- Baugros, J.-B., Cren-Olivé, C., Giroud, B., Gauthier, J.-Y., Lantéri, P., Grenier-Loustalot, M.-F., 2009. Optimisation of pressurised liquid extraction by experimental design for quantification of pesticides and alkyl phenols in sludge, suspended materials and atmospheric fallout by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 4941–4949. doi:10.1016/j.chroma.2009.04.056
- Becue, A., Nguyen, R., 2005. Etude de l'analyse des Alkylphénols.
- Bernal, J., Bernal, J.L., Martín, M.T., Nozal, M.J., Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., 2010. Development and validation of a liquid chromatography–fluorescence–mass spectrometry method to measure glyphosate and aminomethylphosphonic acid in rat plasma. *J. Chromatogr. B* 878, 3290–3296. doi:10.1016/j.jchromb.2010.10.013
- Boix, C., Ibáñez, M., Sancho, J.V., León, N., Yusá, V., Hernández, F., 2014. Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. *Food Chem.* 160, 313–320. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.086
- Bonnard, N., Jargot, D., Falcy, M., Fastier, A., Oudar, S., Rambourg, M.O., 2009. Fiche toxicologique 214 de la carbendazime.
- Bouatra, S., Aziat, F., Mandal, R., Guo, A.C., Wilson, M.R., Knox, C., Bjorndahl, T.C., Krishnamurthy, R., Saleem, F., Liu, P., Dame, Z.T., Poelzer, J., Huynh, J., Yallou, F.S., Psychogios, N., Dong, E., Bogumil, R., Roehring, C., Wishart, D.S., 2013. The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE* 8, e73076. doi:10.1371/journal.pone.0073076
- Boven, M.V., Laruelle, L., Daenens, P., 1990. HPLC Analysis of Diuron and Metabolites in Blood and Urine. *J. Anal. Toxicol.* 14, 231–234. doi:10.1093/jat/14.4.231

- Buhrke, T., Krüger, E., Pevny, S., Rößler, M., Bitter, K., Lampen, A., 2015. Perfluorooctanoic acid (PFOA) affects distinct molecular signalling pathways in human primary hepatocytes. *Toxicology* 333, 53–62. doi:10.1016/j.tox.2015.04.004
- Camilleri, J., Morin, N., Miège, C., Coquery, M., Cren-Olivé, C., 2012. Determination of the uptake and release rates of multifamilies of endocrine disruptor compounds on the polar C18 Chemcatcher. Three potential performance reference compounds to monitor polar pollutants in surface water by integrative sampling. *J. Chromatogr. A* 1237, 37–45. doi:10.1016/j.chroma.2012.03.025
- Capdeville, M.J., Budzinski, H., 2011. Trace-level analysis of organic contaminants in drinking waters and groundwaters. *TrAC Trends Anal. Chem.* 30, 586–606. doi:10.1016/j.trac.2010.12.006
- Carneiro, R.P., Oliveira, F.A.S., Madureira, F.D., Silva, G., de Souza, W.R., Lopes, R.P., 2013. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis. *Food Control* 33, 413–423. doi:10.1016/j.foodcont.2013.02.027
- Cequier, E., Marcé, R.M., Becher, G., Thomsen, C., 2014. A high-throughput method for determination of metabolites of organophosphate flame retardants in urine by ultra performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 845, 98–104. doi:10.1016/j.aca.2014.06.026
- Chemical Dictionary Online [WWW Document], 2009. URL <http://www.chemicaldictionary.org/>
- Chemicalize.org [WWW Document], 2015. URL <http://www.chemicalize.org/>
- Chen, M.-X., Cao, Z.-Y., Jiang, Y., Zhu, Z.-W., 2013. Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1272, 90–99. doi:10.1016/j.chroma.2012.11.069
- Chevance, A., Moulin, G., 2013. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2012.
- Chevance, A., Moulin, G., 2009. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2008.
- Chevance, A., Moulin, G., Chauvin, C., Gay, E., 2012. La consommation des antibiotiques à usage vétérinaire en France entre 1999 et 2010. *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment.* 53, 3–6.
- Chitescu, C.L., Kaklamanos, G., Nicolau, A.I., Stolker, A.A.M. (Linda), 2015. High sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals and antifungals in surface water using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube river basin on the Romanian territory. *Sci. Total Environ.* 532, 501–511. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.010
- Cicolella, A., 2013. *Toxique Planète: Le scandale invisible des maladies chroniques*. Seuil.
- Commission Européenne, 2013. Proposition de décision du conseil relative à la position à adopter, au nom de l'Union européenne, lors de la sixième conférence des parties à la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants concernant la proposition de modification des annexes A et B.



- Commission of the European Communities, 2002. Commission decision of 12 august 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- Commission of the European Communities, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of 23 october 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.
- Cornelis, R., Heinzow, B., Herber, R.F.M., Molin Christensen, J., Poulsen, O.M., Sabbioni, E., Templeton, D.M., Thomassen, Y., Vahter, M., Vesterberg, O., 1996. Sample Collection Guidelines for Trace Elements in Blood and Urine. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 10, 103–127. doi:10.1016/S0946-672X(96)80018-6
- Debrauwer, L., Riu, A., Jouahri, M., Rathahao, E., Jouanin, I., Antignac, J.-P., Cariou, R., Le Bizec, B., Zalko, D., 2005. Probing new approaches using atmospheric pressure photo ionization for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 21st Montreux Symposium on Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Supercritical Fluid Chromatography-Mass Spectrometry, Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry 21st Montreux Symposium on Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Supercritical Fluid Chromatography-Mass Spectrometry, Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry 1082, 98–109. doi:10.1016/j.chroma.2005.04.060
- DrugBank [WWW Document], 2015. URL <http://www.drugbank.ca/>
- Duderstadt, R.E., Fischer, S.M., 2008. Effect of organic mobile phase composition on signal responses for selected polyalkene additive compounds by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1193, 70–78. doi:10.1016/j.chroma.2008.03.086
- Duggan, A., Charnley, G., Chen, W., Chukwudebe, A., Hawk, R., Krieger, R.I., Ross, J., Yarborough, C., 2003. Di-alkyl phosphate biomonitoring data: assessing cumulative exposure to organophosphate pesticides. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37, 382–395. doi:10.1016/S0273-2300(03)00031-X
- Ehrenstorfer.com, n.d. pestmet [WWW Document].  
URL <http://www.ehrenstorfer.com/pestmet.html> (accessed 4.9.14).
- European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011. Guideline on Bioanalytical Method Validation.
- Falcy, M., Jargot, D., La Rocca, B., Miraval, S., Pillière, F., Robert, S., Simonnard, A., 2013. Fiche toxicologique 279 du bisphénol A.
- Federal Institute for Occupational Safety and Health Notification Unit, 2008. Methenamine : Summary risk assessment report.
- Feng, Z., Sun, X., Yang, J., Hao, D., Du, L., Wang, H., Xu, W., Zhao, X., Sun, C., 2012. Metabonomics analysis of urine and plasma from rats given long-term and low-dose dimethoate by ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Chem. Biol. Interact.* 199, 143–153. doi:10.1016/j.cbi.2012.07.004
- Fernández-Peralbo, M.A., Luque de Castro, M.D., 2012. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 41, 75–85. doi:10.1016/j.trac.2012.08.011
- Ferrer, E., Santoni, E., Vittori, S., Font, G., Mañes, J., Sagratini, G., 2011. Simultaneous determination of bisphenol A, octylphenol, and nonylphenol by pressurised liquid

- extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry in powdered milk and infant formulas. *Food Chem.* 126, 360–367. doi:10.1016/j.foodchem.2010.10.098
- Fréry, N., Guldner, L., Saoudi, A., Garnier, R., Zeghnoun, A., Bidondo, M.L., 2013. Exposition de la population française aux substances chimiques de l'environnement. Tome 2 - Polychlorobiphényles (PCB-NDL) et pesticides.
- Fuke, C., Ameno, K., Ameno, S., Kiri, T., Shinohara, T., Ijiri, I., 1993. In vitro studies of the metabolism of paraquat and diquat using rat liver homogenates--isolation and identification of the metabolites of paraquat and diquat. *Nihon Hōigaku Zasshi Jpn. J. Leg. Med.* 47, 33–45.
- Fuke, C., Arao, T., Morinaga, Y., Takaesu, H., Ameno, K., Miyazaki, T., 2002. Analysis of paraquat, diquat and two diquat metabolites in biological materials by high-performance liquid chromatography. *Leg. Med.* 4, 156–163. doi:10.1016/S1344-6223(02)00011-1
- Fuselli, F., Guarino, C., La Mantia, A., Longo, L., Faberi, A., Marianella, R.M., 2012. Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 906, 9–18. doi:10.1016/j.jchromb.2012.07.035
- Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2013. Multi-residue method for trace level determination of UV filters in fish based on pressurized liquid extraction and liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1286, 93–101. doi:10.1016/j.chroma.2013.02.056
- Gao, L., Liu, J., Wang, C., Liu, G., Niu, X., Shu, C., Zhu, J., 2014. Fast determination of paraquat in plasma and urine samples by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 944, 136–140. doi:10.1016/j.jchromb.2013.10.028
- Gazin, V., 2009. Sécurité d'utilisation des parabens dans les médicaments : point d'étape. *Vigilances* 2.
- Geis-Asteggiate, L., Lehotay, S.J., Lightfield, A.R., Dutko, T., Ng, C., Bluhm, L., 2012. Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1258, 43–54. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.020
- Gorga, M., Petrovic, M., Barceló, D., 2013. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1295, 57–66. doi:10.1016/j.chroma.2013.04.028
- Gray, M.J., Jahani, S., Low, G.K.-C., 2012. Effect of methanol quality on the ionisation of herbicides, insecticides and fungicides using gradient elution liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1219, 83–92. doi:10.1016/j.chroma.2011.10.087
- Hao, C., Morse, D., Morra, F., Zhao, X., Yang, P., Nunn, B., 2011. Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column. *J. Chromatogr. A* 1218, 5638–5643. doi:10.1016/j.chroma.2011.06.070
- Hao, C., Zhao, X., Morse, D., Yang, P., Taguchi, V., Morra, F., 2013. Optimized liquid chromatography tandem mass spectrometry approach for the determination of diquat

- and paraquat herbicides. *J. Chromatogr. A* 1304, 169–176. doi:10.1016/j.chroma.2013.07.033
- Harthé, C., Rinaldi, S., Achaintre, D., de Ravel, M.R., Mappus, E., Pugeat, M., Déchaud, H., 2012. Bisphenol A-glucuronide measurement in urine samples. *Talanta* 100, 410–413. doi:10.1016/j.talanta.2012.07.099
- Haug, L.S., Thomsen, C., Liane, V.H., Becher, G., 2008. Comparison of GC and LC determinations of hexabromocyclododecane in biological samples – Results from two interlaboratory comparison studies. *Chemosphere* 71, 1087–1092. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.10.044
- Hermo, M.P., Barrón, D., Barbosa, J., 2008. Determination of multiresidue quinolones regulated by the European Union in pig liver samples: High-resolution time-of-flight mass spectrometry versus tandem mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A* 1201, 1–14. doi:10.1016/j.chroma.2008.05.090
- Herrero, P., Cortés-Francisco, N., Borrull, F., Caixach, J., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2014. Comparison of triple quadrupole mass spectrometry and Orbitrap high-resolution mass spectrometry in ultrahigh performance liquid chromatography for the determination of veterinary drugs in sewage: benefits and drawbacks. *J. Mass Spectrom.* 49, 585–596. doi:10.1002/jms.3377
- Himmelsbach, M., Buchberger, W., Reingruber, E., 2009. Determination of polymer additives by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. A comparison of atmospheric pressure photoionization (APPI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI), and electrospray ionization (ESI). *Polym. Degrad. Stab.* 94, 1213–1219. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2009.04.021
- Hines, E.P., Mendola, P., von Ehrenstein, O.S., Ye, X., Calafat, A.M., Fenton, S.E., 2015. Concentrations of environmental phenols and parabens in milk, urine and serum of lactating North Carolina women. *Reprod. Toxicol., Environmental Impact on Breast Development and Disease* 54, 120–128. doi:10.1016/j.reprotox.2014.11.006
- Holčapek, M., Jirásko, R., Lisa, M., 2012. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr. A, Mass Spectrometry: Innovation and Application. Part VII* 1259, 3–15. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.072
- ilo.org, n.d. Les pesticides [WWW Document]. URL [http://www.ilo.org/safework\\_bookshelf/french?content&nd=857170302](http://www.ilo.org/safework_bookshelf/french?content&nd=857170302) (accessed 4.9.14).
- INERIS, 2009. Hiérarchisation des substances : Identification des listes existantes de substances prioritaires.
- Iqbal, M., Ezzeldin, E., Al-Rashood, K.A., Asiri, Y.A., Rezk, N.L., 2015. Rapid determination of canagliflozin in rat plasma by UHPLC–MS/MS using negative ionization mode to avoid adduct-ions formation. *Talanta* 132, 29–36. doi:10.1016/j.talanta.2014.08.041
- Ishibashi, M., Ando, T., Sakai, M., Matsubara, A., Uchikata, T., Fukusaki, E., Bamba, T., 2012. High-throughput simultaneous analysis of pesticides by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1266, 143–148. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.067
- Jansson, C., Pihlström, T., Österdahl, B.-G., Markides, K.E., 2004. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid

- chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1023, 93–104. doi:10.1016/j.chroma.2003.10.019
- Jiménez-Díaz, I., Vela-Soria, F., Zafra-Gómez, A., Navalón, A., Ballesteros, O., Navea, N., Fernández, M.F., Olea, N., Vilchez, J.L., 2011. A new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of parabens in human placental tissue samples. *Talanta* 84, 702–709. doi:10.1016/j.talanta.2011.01.075
- Jing, X., Bing, S., XiaoYan, W., XiaoJie, S., YongNing, W., 2011. A Study on Bisphenol A, Nonylphenol, and Octylphenol in Human Urine amples Detected by SPE-UPLC-MS. *Biomed. Environ. Sci.* 24, 40–46. doi:10.3967/0895-3988.2011.01.005
- John S. Stanley, 1986. Broad scan analysis of human adipose tissue: Volume III - Semi-volatile organic compounds.
- Jones, K., Patel, K., Cocker, J., Bevan, R., Levy, L., 2010. Determination of ethylenethiourea in urine by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation–mass spectrometry for monitoring background levels in the general population. *J. Chromatogr. B, biological monitoring and analytical toxicology in occupational and environmental medicine* 878, 2563–2566. doi:10.1016/j.jchromb.2009.10.028
- Joyce Dinglasan-Panlilio, M., Prakash, S.S., Baker, J.E., 2014. Perfluorinated compounds in the surface waters of Puget Sound, Washington and Clayoquot and Barkley Sounds, British Columbia. *Mar. Pollut. Bull.* 78, 173–180. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.10.046
- Kasiotis, K.M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P., Machera, K., 2014. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Sci. Total Environ.* 485–486, 633–642. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.042
- Kawaguchi, M., Inoue, K., Sakui, N., Ito, R., Izumi, S., Makino, T., Okanouchi, N., Nakazawa, H., 2004. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples. *J. Chromatogr. B* 799, 119–125. doi:10.1016/j.jchromb.2003.10.021
- Kebarle, P., Verkerk, U.H., 2009. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.* 28, 898–917. doi:10.1002/mas.20247
- Khedr, A., 2013. Optimized extraction method for LC–MS determination of bisphenol A, melamine and di(2-ethylhexyl) phthalate in selected soft drinks, syringes, and milk powder. *J. Chromatogr. B* 930, 98–103. doi:10.1016/j.jchromb.2013.04.040
- Kim, D.-H., Lee, M.-Y., Oh, J.-E., 2014. Perfluorinated compounds in serum and urine samples from children aged 5–13 years in South Korea. *Environ. Pollut.* 192, 171–178. doi:10.1016/j.envpol.2014.05.024
- Kim, U.-J., Oh, J.-E., 2014. Tetrabromobisphenol A and hexabromocyclododecane flame retardants in infant–mother paired serum samples, and their relationships with thyroid hormones and environmental factors. *Environ. Pollut.* 184, 193–200. doi:10.1016/j.envpol.2013.08.034
- Kmellár, B., Pareja, L., Ferrer, C., Fodor, P., Fernández-Alba, A.R., 2011. Study of the effects of operational parameters on multiresidue pesticide analysis by LC–MS/MS. *Talanta* 84, 262–273. doi:10.1016/j.talanta.2010.12.006

- Koutroulakis, D., Sifakis, S., Tzatzarakis, M.N., Alegakis, A.K., Theodoropoulou, E., Kavvalakis, M.P., Kappou, D., Tsatsakis, A.M., 2014. Dialkyl phosphates in amniotic fluid as a biomarker of fetal exposure to organophosphates in Crete, Greece; association with fetal growth. *Reprod. Toxicol.* 46, 98–105. doi:10.1016/j.reprotox.2014.03.010
- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M.-L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., Leito, I., 2015a. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Anal. Chim. Acta* 870, 29–44. doi:10.1016/j.aca.2015.02.017
- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M.-L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., Leito, I., 2015b. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Anal. Chim. Acta* 870, 8–28. doi:10.1016/j.aca.2015.02.016
- Kuenen, J.G., Konings, W.N., 2010. The importance of cooling of urine samples for doping analysis. *Accreditation Qual. Assur.* 15, 133–136. doi:10.1007/s00769-009-0601-0
- Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B., Melzer, D., 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 300, 1303–1310. doi:10.1001/jama.300.11.1303
- Lashgari, M., Basheer, C., Kee Lee, H., 2015. Application of surfactant-templated ordered mesoporous material as sorbent in micro-solid phase extraction followed by liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry for determination of perfluorinated carboxylic acids in aqueous media. *Talanta* 141, 200–206. doi:10.1016/j.talanta.2015.03.049
- Lavrijsen, K., Van Leemput, L., Heykants, J., 1993. The in vitro metabolism of levamisole in hepatocytes of dogs, pigs, sheep, cattle and humans.
- Lee, M.-R., Lin, C.-Y., Li, Z.-G., Tsai, T.-F., 2006. Simultaneous analysis of antioxidants and preservatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques Part II 1120, 244–251. doi:10.1016/j.chroma.2006.01.075
- Lewicki, J., n.d. TYLOSIN: A review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods.
- Liao, C., Chen, L., Kannan, K., 2013. Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure. *Environ. Int.* 57–58, 68–74. doi:10.1016/j.envint.2013.04.001
- Liu, B., Yu, Z., Song, X., Yang, F., 2010. Effects of sodium dodecylbenzene sulfonate and sodium dodecyl sulfate on the *Mytilus galloprovincialis* biomarker system. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 835–841. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.12.011
- Liu, R., Ruan, T., Song, S., Lin, Y., Jiang, G., 2015. Determination of synthetic phenolic antioxidants and relative metabolites in sewage treatment plant and recipient river by high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1381, 13–21. doi:10.1016/j.chroma.2014.11.042
- Llorca, M., Farré, M., Tavano, M.S., Alonso, B., Koremblit, G., Barceló, D., 2012. Fate of a broad spectrum of perfluorinated compounds in soils and biota from Tierra del Fuego and Antarctica. *Environ. Pollut.* 163, 158–166. doi:10.1016/j.envpol.2011.10.027

- LOI n° 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A, 2012. , 2012-1442.
- Lopes, R.P., Reyes, R.C., Romero-González, R., Vidal, J.L.M., Frenich, A.G., 2012. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 895–896, 39–47. doi:10.1016/j.jchromb.2012.03.011
- Luz Gómez-Pérez, M., Romero-González, R., José Luis Martínez, V., Garrido Frenich, A., 2015. Analysis of pesticide and veterinary drug residues in baby food by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Talanta* 131, 1–7. doi:10.1016/j.talanta.2014.07.066
- Malato, O., Lozano, A., Mezcuca, M., Agüera, A., Fernandez-Alba, A.R., 2011. Benefits and pitfalls of the application of screening methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A, Advanced Food Analysis* 1218, 7615–7626. doi:10.1016/j.chroma.2011.06.110
- Manisali, I., Chen, D.D.Y., Schneider, B.B., 2006. Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future. *TrAC Trends Anal. Chem.* 25, 243–256. doi:10.1016/j.trac.2005.07.007
- Masiá, A., Campo, J., Blasco, C., Picó, Y., 2014. Ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry to identify contaminants in water: An insight on environmental forensics. *J. Chromatogr. A* 1345, 86–97. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.017
- Melzer, D., Rice, N.E., Lewis, C., Henley, W.E., Galloway, T.S., 2010. Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 5, 8673–8682. doi:10.1371/journal.pone.0008673
- Milieudefensie, PAN Europe, 2007. Hazardous Pesticides in the European Parliament; Eight Fruit Samples, 28 Toxic Pesticides, Four Legal Violations.
- Montesissa, C., De Liguoro, M., Santi, A., Capolongo, F., Biancotto, G., 1999. Tylosin depletion in edible tissues of turkeys. *Food Addit Contam* 16, 405–410. doi:10.1080/026520399283795
- Moos, R.K., Angerer, J., Wittsiepe, J., Wilhelm, M., Brüning, T., Koch, H.M., 2014. Rapid determination of nine parabens and seven other environmental phenols in urine samples of German children and adults. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217, 845–853. doi:10.1016/j.ijheh.2014.06.003
- Mosch, C., Kiranoglu, M., Fromme, H., Völkel, W., 2010. Simultaneous quantitation of perfluoroalkyl acids in human serum and breast milk using on-line sample preparation by HPLC column switching coupled to ESI-MS/MS. *J. Chromatogr. B, biological monitoring and analytical toxicology in occupational and environmental medicine* 878, 2652–2658. doi:10.1016/j.jchromb.2010.01.015
- Nakagawa, Y., 1996. Induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in CHO-K1 cells exposed to phenyl-hydroquinone, a metabolite of ortho-phenylphenol. *Cancer Lett* 101, 227–232.
- Nations Unies, 2011. Évaluation de la gestion des risques concernant l'hexabromocyclododécane.
- Núñez, L., Tadeo, J.L., García-Valcárcel, A.I., Turiel, E., 2008. Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid

- chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1214, 178–182. doi:10.1016/j.chroma.2008.10.105
- Ongay, S., Hendriks, G., Hermans, J., van den Berge, M., Hacken, N.H.T. ten, van de Merbel, N.C., Bischoff, R., 2014. Quantification of free and total desmosine and isodesmosine in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry: A comparison of the surrogate-analyte and the surrogate-matrix approach for quantitation. *J. Chromatogr. A* 1326, 13–19. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.035
- Ortelli, D., Cognard, E., Jan, P., Edler, P., 2009. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B, method validation, comparison and transfer* 877, 2363–2374. doi:10.1016/j.jchromb.2009.03.006
- Pan, Y.-Y., Shi, Y.-L., Cai, Y.-Q., 2008. Determination of Perfluorinated Compounds in Human Blood Samples by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Chin. J. Anal. Chem.* 36, 1321–1326. doi:10.1016/S1872-2040(08)60072-9
- Pedrouzo, M., Borrull, F., Marcé, R.M., Pocurull, E., 2009. Ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determining the presence of eleven personal care products in surface and wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1216, 6994–7000. doi:10.1016/j.chroma.2009.08.039
- Peng, X., Jin, J., Wang, C., Ou, W., Tang, C., 2015. Multi-target determination of organic ultraviolet absorbents in organism tissues by ultrasonic assisted extraction and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1384, 97–106. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.051
- Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C., Bohatier, J., 2008. Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. *Aquat. Toxicol.* 86, 352–360. doi:10.1016/j.aquatox.2007.11.016
- Peysson, W., Vulliet, E., 2013. Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography–time-of-flight-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1290, 46–61. doi:10.1016/j.chroma.2013.03.057
- Poiger, T., Buser, H.-R., Balmer, M.E., Bergqvist, P.-A., Müller, M.D., 2004. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere* 55, 951–963. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.01.012
- Poole, C.F., 2003. Chapter 1 - General Concepts in Column Chromatography, in: Poole, C.F. (Ed.), *The Essence of Chromatography*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 1–78.
- Post, G.B., Cohn, P.D., Cooper, K.R., 2012. Perfluorooctanoic acid (PFOA), an emerging drinking water contaminant: A critical review of recent literature. *Environ. Res.* 116, 93–117. doi:10.1016/j.envres.2012.03.007
- Pouech, C., 2014. Développement de méthodologies analytiques pour l'étude de la migration depuis des contenants en matière plastique prévus pour des applications pharmaceutiques vers des solutions aqueuses et des fluides biologiques.
- Pouech, C., Lafay, F., Wiest, L., Baudot, R., Léonard, D., Cren-Olivé, C., 2014. Monitoring the extraction of additives and additive degradation products from polymer packaging into solutions by multi-residue method including solid phase extraction and ultra-high

- performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1493–1507. doi:10.1007/s00216-013-7551-4
- Pozzebon, J.M., Queiroz, S.C.N., Melo, L.F.C., A. Kapur, M., Jardim, I.C.S.F., 2003. Application of new high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction materials to the analysis of pesticides in human urine. *J. Chromatogr. A*, 26th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques 987, 381–387. doi:10.1016/S0021-9673(02)01434-6
- Prapamontol, T., Sutan, K., Laoyang, S., Hongsibsong, S., Lee, G., Yano, Y., Hunter, R.E., Ryan, P.B., Barr, D.B., Panuwet, P., 2014. Cross validation of gas chromatography-flame photometric detection and gas chromatography–mass spectrometry methods for measuring dialkylphosphate metabolites of organophosphate pesticides in human urine. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217, 554–566. doi:10.1016/j.ijheh.2013.10.005
- PubChem [WWW Document], 2015. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Rajski, Ł., Gómez-Ramos, M. del M., Fernández-Alba, A.R., 2014. Large pesticide multiresidue screening method by liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry in full scan mode applied to fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A* 1360, 119–127. doi:10.1016/j.chroma.2014.07.061
- Robles-Molina, J., Lara-Ortega, F.J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., 2014. Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1350, 30–43. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.003
- Rodríguez, R., Picó, Y., Font, G., Mañes, J., 2002. Analysis of thiabendazole and procymidone in fruits and vegetables by capillary electrophoresis–electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 25th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques 949, 359–366. doi:10.1016/S0021-9673(01)01395-4
- Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P., 1998. Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, 12–19. doi:10.1006/taap.1998.8544
- Saleh, A., Stephanson, N.N., Granelli, I., Villén, T., Beck, O., 2012. Evaluation of a direct high-capacity target screening approach for urine drug testing using liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 909, 6–13. doi:10.1016/j.jchromb.2012.10.006
- Salvia, M.-V., Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R., Cren-Olivé, C., 2012. Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. *J. Chromatogr. A* 1245, 122–133. doi:10.1016/j.chroma.2012.05.034
- Schenke, D., 2000. Analytical method for the determination of O,O-diethyl phosphate and O,O-diethyl thiophosphate in faecal samples. *Chemosphere* 41, 1313–1320. doi:10.1016/S0045-6535(00)00020-5
- Schindler, B.K., Förster, K., Angerer, J., 2009. Quantification of two urinary metabolites of organophosphorus flame retardants by solid-phase extraction and gas



- chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1167–1171. doi:10.1007/s00216-009-3064-6
- Schlee, C., Markova, M., Schrank, J., Laplagne, F., Schneider, R., Lachenmeier, D.W., 2013. Determination of 2-methylimidazole, 4-methylimidazole and 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole in caramel colours and cola using LC/MS/MS. *J. Chromatogr. B, Trends and Applications of Fast Liquid Chromatography in Bioanalysis* 927, 223–226. doi:10.1016/j.jchromb.2012.10.021
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W., 2001. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Perspect.* 109, 239–244.
- Schlumpf, M., Kypke, K., Wittassek, M., Angerer, J., Mascher, H., Mascher, D., Vökt, C., Birchler, M., Lichtensteiger, W., 2010. Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: Correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere* 81, 1171–1183. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.079
- Shirai, S., Suzuki, Y., Yoshinaga, J., Shiraiishi, H., Mizumoto, Y., 2013. Urinary excretion of parabens in pregnant Japanese women. *Reprod. Toxicol.* 35, 96–101. doi:10.1016/j.reprotox.2012.07.004
- Sivaperumal, P., Anand, P., Riddhi, L., 2015. Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem.* 168, 356–365. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.072
- Soler, C., Mañes, J., Picó, Y., 2004. Liquid chromatography–electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits. *J. Chromatogr. A* 1048, 41–49. doi:10.1016/j.chroma.2004.07.023
- Stöckl, D., D'Hondt, H., Thienpont, L.M., 2009. Method validation across the disciplines—Critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. *J. Chromatogr. B, method validation, comparison and transfer* 877, 2180–2190. doi:10.1016/j.jchromb.2008.12.056
- Suzuki, T., Sasaki, K., Takeda, M., Uchiyama, M., 1984. Metabolism of tributyl phosphate in male rats. *J. Agric. Food Chem.* 32, 603–610. doi:10.1021/jf00123a046
- Taguchi, V.Y., Jenkins, S.W.D., Crozier, P.W., Wang, D.T., 1998. Determination of diquat and paraquat in water by liquid chromatography-(electrospray ionization) mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9, 830–839. doi:10.1016/S1044-0305(98)00043-9
- Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E., 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends Anal. Chem.* 23, 535–552. doi:10.1016/j.trac.2004.04.001
- The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1991. Tylosin In: Residues of Some Veterinary Drugs in Animals and Foods.
- Tomšíková, H., Solich, P., Nováková, L., 2014. Sample preparation and UHPLC-FD analysis of pteridines in human urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 95, 265–272. doi:10.1016/j.jpba.2014.03.012
- Tong, L., Ding, L., Li, Y., Wang, Z., Wang, J., Liu, Y., Yang, L., Wen, A., 2011. A sensitive LC–MS/MS method for determination of levamisole in human plasma: Application to

- pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B* 879, 299–303. doi:10.1016/j.jchromb.2010.11.015
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2001. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation.
- Van den Eede, N., Neels, H., Jorens, P.G., Covaci, A., 2013. Analysis of organophosphate flame retardant diester metabolites in human urine by liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1303, 48–53. doi:10.1016/j.chroma.2013.06.042
- Van Esch, G.J., 2000. Environmental health criteria for flame retardants: tris(2-butoxyethyl) phosphate, tris (-ethylhexyl) phosphate, tetrakis-(hydroxymethyl) phosphonium salts.
- Vela-Soria, F., Ballesteros, O., Camino-Sánchez, F.J., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, L., Navalón, A., 2015. Matrix solid phase dispersion for the extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human placental tissue prior to UHPLC-MS/MS analysis. *Microchem. J.* 118, 32–39. doi:10.1016/j.microc.2014.07.018
- Veselkov, K.A., Vingara, L.K., Masson, P., Robinette, S.L., Want, E., Li, J.V., Barton, R.H., Boursier-Neyret, C., Walther, B., Ebbels, T.M., Pelczer, I., Holmes, E., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., 2011. Optimized Preprocessing of Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Urinary Metabolic Profiles for Improved Information Recovery. *Anal. Chem.* 83, 5864–5872. doi:10.1021/ac201065j
- Veuthey, J.-L., Guilleme, D., Rudaz, S., Marchi, I., Nguyen, D., Saugy, M., Mateus-Avois, L., 2007. Fast analysis of doping agents by Ultra Performance Liquid Chromatography. *GIT Lab. J.* 5, 14–15.
- Vial, J., Jarly, A., 1999. Experimental Comparison of the Different Approaches To Estimate LOD and LOQ of an HPLC Method. *Anal. Chem.* 71, 2672–2677. doi:10.1021/ac981179n
- Vitku, J., Chlupacova, T., Sosvorova, L., Hampl, R., Hill, M., Heracek, J., Bicikova, M., Starka, L., 2015. Development and validation of LC–MS/MS method for quantification of bisphenol A and estrogens in human plasma and seminal fluid. *Talanta* 140, 62–67. doi:10.1016/j.talanta.2015.03.013
- Vonaparti, A., Lyris, E., Panderi, I., Koupparis, M., Georgakopoulos, C., 2008. Direct injection LC/ESI-MS horse urine analysis for the quantification and identification of threshold substances for doping control. I. Determination of hydrocortisone. *J. Mass Spectrom.* 43, 1255–1264. doi:10.1002/jms.1401
- Vuković, G., Shtereva, D., Bursić, V., Mladenova, R., Lazić, S., 2012. Application of GC–MSD and LC–MS/MS for the determination of priority pesticides in baby foods in Serbian market. *LWT - Food Sci. Technol., Euro-Mediterranean Symposium on Fruit and Vegetable Processing* 49, 312–319. doi:10.1016/j.lwt.2012.07.021
- Warrack, B.M., Hnatyshyn, S., Ott, K.-H., Reily, M.D., Sanders, M., Zhang, H., Drexler, D.M., 2009. Normalization strategies for metabonomic analysis of urine samples. *J. Chromatogr. B* 877, 547–552. doi:10.1016/j.jchromb.2009.01.007
- Wei, Y., Zhu, J., Nguyen, A., 2014. Urinary concentrations of dichlorophenol pesticides and obesity among adult participants in the U.S. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2005-2008. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217, 294–299. doi:10.1016/j.ijheh.2013.07.003

- Whelan, M., Kinsella, B., Furey, A., Moloney, M., Cantwell, H., Lehotay, S.J., Danaher, M., 2010. Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *J. Chromatogr. A* 1217, 4612–4622. doi:10.1016/j.chroma.2010.05.007
- Whitehead Jr., R.D., Montesano, M.A., Jayatilaka, N.K., Buckley, B., Winnik, B., Needham, L.L., Barr, D.B., 2010. Method for measurement of the quaternary amine compounds paraquat and diquat in human urine using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B, biological monitoring and analytical toxicology in occupational and environmental medicine* 878, 2548–2553. doi:10.1016/j.jchromb.2009.09.029
- Wiest, L., Buleté, A., Giroud, B., Fratta, C., Amic, S., Lambert, O., Pouliquen, H., Arnaudguilhem, C., 2011. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1218, 5743–5756. doi:10.1016/j.chroma.2011.06.079
- Wu, X. (May), Bennett, D.H., Calafat, A.M., Kato, K., Strynar, M., Andersen, E., Moran, R.E., Tancredi, D.J., Tolve, N.S., Hertz-Picciotto, I., 2015. Serum concentrations of perfluorinated compounds (PFC) among selected populations of children and Adults in California. *Environ. Res.* 136, 264–273. doi:10.1016/j.envres.2014.09.026
- Ying, G.-G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environ. Int.* 28, 215–226. doi:10.1016/S0160-4120(02)00017-X
- Yoshida, T., Yoshida, J., 2012. Simultaneous analytical method for urinary metabolites of organophosphorus compounds and moth repellents in general population. *J. Chromatogr. B* 880, 66–73. doi:10.1016/j.jchromb.2011.11.018
- Yoshioka, N., Akiyama, Y., Teranishi, K., 2004. Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *J. Chromatogr. A* 1022, 145–150. doi:10.1016/j.chroma.2003.09.021
- Zabaleta, I., Bizkarguenaga, E., Prieto, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Fernández, L.A., Zuloaga, O., 2015. Simultaneous determination of perfluorinated compounds and their potential precursors in mussel tissue and fish muscle tissue and liver samples by liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1387, 13–23. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.089
- Zacs, D., Rjabova, J., Bartkevics, V., 2014. New perspectives on diastereoselective determination of hexabromocyclododecane traces in fish by ultra high performance liquid chromatography–high resolution orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1330, 30–39. doi:10.1016/j.chroma.2014.01.023
- Zhan, J., Yu, X., Zhong, Y., Zhang, Z., Cui, X., Peng, J., Feng, R., Liu, X., Zhu, Y., 2012. Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 906, 48–57. doi:10.1016/j.jchromb.2012.08.018
- Zhuang, X.M., Yuan, M., Zhang, Z.W., Wang, X.Y., Zhang, Z.Q., Ruan, J.X., 2008. Determination of 4-dimethylaminophenol concentrations in dog blood using LC–

ESI/MS/MS combined with precolumn derivatization. *J. Chromatogr. B* 876, 76–82.  
doi:10.1016/j.jchromb.2008.10.025



# **Chapitre IV : Recherche et identification de contaminants environnementaux dans l'urine par screening non ciblé**



#### IV.1. Introduction et objectifs de l'étude

Le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit s'intéressera à la recherche et à l'identification de contaminants environnementaux dans l'urine par screening non ciblé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution avec un instrument QqToF.

Le principal objectif de cette étude est de réaliser un screening non ciblé de l'urine sur deux systèmes analytiques différents, le système utilisé dans le chapitre III qui est le MicroTOF Q II et un système comprenant un spectromètre de masse plus récent et plus performant, l'Impact HD, et cela avec les méthodes développées dans le chapitre III. Une stratégie pour identifier des contaminants environnementaux et leurs métabolites dans l'urine à partir de diverses bases de données sera également développée par annotation des signaux à des contaminants environnementaux ou à leurs métabolites. De plus, les résultats obtenus permettront de mettre en évidence et discuter des limitations des outils utilisés.

Dans un premier temps, ce chapitre sera consacré à la stratégie analytique choisie pour cette étude. Dans un second temps, une partie sera dédiée au choix du protocole de préparation d'échantillon. Enfin, nous nous intéresserons au prétraitement des données, puis à leur traitement avec l'utilisation de diverses bases de données pour la recherche et l'identification de contaminants environnementaux dans l'urine.

#### IV.2. Etat de l'art

##### IV.2.1. Les méthodes de screening

###### IV.2.1.1. Définition

Les méthodes de screening correspondent à des méthodes de détection rapides qui permettent le suivi d'un nombre important de composés notamment dans des matrices environnementales, alimentaires et biologiques complexes telles que les effluents de stations d'épuration (Mesfioui *et al.*, 2012), les sédiments (Bu *et al.*, 2015), les boues (Celano *et al.*, 2014), les eaux de surface (Yan *et al.*, 2015), les fruits et légumes (López *et al.*, 2014; Spínola *et al.*, 2015), l'urine (Mazzarino *et al.*, 2015; Plassmann *et al.*, 2015), le sang (Odoardi *et al.*, 2015), les cheveux (Strano-Rossi *et al.*, 2014), les excréments (Tao *et al.*, 2015) ou encore la salive (Katakura *et al.*, 2015). Ces méthodes sont utilisées pour identifier des substances, contaminants environnementaux et divers métabolites présents dans l'échantillon analysé. Dans un premier temps, les méthodes de screening ont été appliquées à la métabolomique, la



science qui étudie l'ensemble des métabolites. Puis, elles ont été de plus en plus utilisées pour d'autres problématiques, notamment dans les domaines de recherche clinique pour les contrôles de dopage (Jiménez Girón *et al.*, 2012; Musenga et Cowan, 2013) ou les diagnostics de maladies (la Marca, 2014). Les méthodes de screening ont connu un fort engouement de la communauté scientifique notamment en spectrométrie de masse, comme illustré dans la Figure IV-1. En effet, au début des années 2000, les principales études étaient centrées sur le développement de méthodes de quantification de composés ciblés. Mais peu à peu, ces méthodes ont montré leurs limitations au niveau de la non-exhaustivité des résultats obtenus. Ainsi, les méthodes de screening se sont de plus en plus développées avec l'arrivée sur le marché des spectromètres de masse haute résolution, permettant l'acquisition de données en mode ciblé pour la quantification de molécules connues et en mode non ciblé pour la recherche et l'identification de composés connus ou inconnus, comme avec le QqToF.

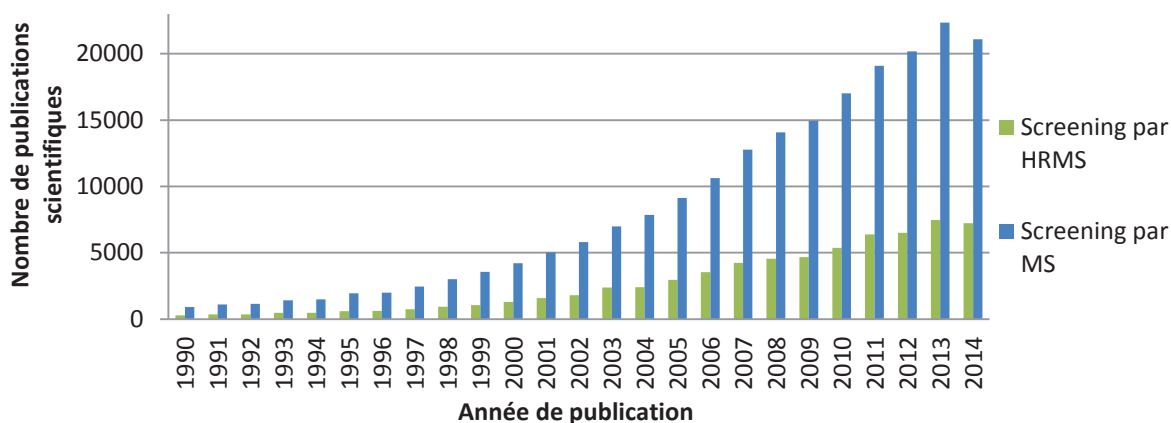


Figure IV- 1 : Evolution du nombre de publications scientifiques pour l'utilisation ou le développement de méthodes de screening en spectrométrie de masse (MS) et avec des appareils de haute résolution (HRMS) (Source : Titanescience juillet 2015)

#### IV.2.1.2. Les différentes stratégies

##### IV.2.1.2.1. Screening semi ciblé

Nous considérons que les méthodes de screening semi ciblé correspondent à la recherche de composés à partir d'une liste définie au préalable. Un screening semi ciblé a été réalisé dans le paragraphe III.4.3.2. du chapitre III, à partir d'une quarantaine de contaminants environnementaux dont des métabolites. Ce qui différencie le screening ciblé du semi ciblé est que ce dernier ne nécessite pas les standards analytiques des composés recherchés dans un premier temps, puisque l'objectif est de détecter le maximum de composés pour les identifier et si possible les quantifier par la suite.

#### IV.2.1.2.2. Screening non ciblé

Les méthodes de screening non ciblé correspondent à la recherche de composés non définis au préalable, qui sont connus ou inconnus. Cependant, certaines familles chimiques de molécules peuvent être recherchées comme les organophosphorés (Celano *et al.*, 2014). En effet, la recherche d'une classe de composés définie permet d'établir une stratégie de traitement des données plus sélective.

#### IV.2.2. Les outils

En spectrométrie de masse, les méthodes de screening sont de plus en plus développées sur des spectromètres de masse haute résolution, comme illustré sur la Figure IV-1, notamment des ToF, mais aussi des QqToF qui ont la spécificité de mesurer la masse exacte et d'offrir la possibilité d'enregistrer de manière quasi simultanée des spectres MS et MS/MS (Broecker *et al.*, 2012; Kioussi *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2015). Selon les spécificités de l'appareil utilisé, les résultats des composés potentiellement annotés voire identifiés peuvent être différents, notamment du fait des différences de précision de la mesure de la masse exacte et de la sensibilité. D'autres spectromètres de masse haute résolution sont également très utilisés pour les méthodes de screening comme l'Orbitrap (Heuett *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015) et le FT-ICR (Chen *et al.*, 2014; Hasegawa *et al.*, 2007). En revanche, ce dernier reste toutefois beaucoup moins utilisé en raison de son coût.

#### IV.2.3. Préparation d'échantillon

Les méthodes par approche non ciblée sous-entendent que les caractéristiques physico-chimiques des composés présents dans l'échantillon (contaminants environnementaux ou métabolites) ne sont pas connues. De plus, celles-ci englobent un large éventail variable. Par conséquent, le principal objectif des méthodes de screening non ciblé est de garder autant que possible l'échantillon intact, afin d'éviter les pertes (Fernández-Peralbo et Luque de Castro, 2012). La méthode de préparation d'échantillon idéale pour une analyse non ciblée d'un échantillon biologique devrait donc être non sélective, simple, rapide avec un nombre minimal d'étapes et reproductible (Fernández-Peralbo et Luque de Castro, 2012). Cependant, dans le cas de nombreux types d'échantillons (tissus, organes, sang...), les étapes de préparation d'échantillon sont inévitables du fait de leur nature. Pour ce qui est de l'urine, celle-ci peut être directement injectée dans le système analytique. Néanmoins, les composés sont plus ou moins dilués dans l'échantillon, ce qui peut engendrer des problèmes de

sensibilité selon le système analytique utilisé. De plus, l'étape de préparation d'échantillon peut s'avérer intéressante afin de minimiser les suppressions d'ions (Bonfiglio *et al.*, 1999).

La SPE, qui est devenue l'une des techniques de préparation d'échantillon les plus utilisées pour l'analyse de fluides biologiques dans le domaine de la métabolomique, et donc par screening, peut être utilisée avec différents supports, phase normale, inverse ou échanges d'ions (David *et al.*, 2014; H. Wu *et al.*, 2015; Y. Wu *et al.*, 2015). De plus, cette technique peut permettre de concentrer l'échantillon, ce qui, dans certains cas, pourrait résoudre les problèmes de sensibilité.

Une autre technique, l'extraction liquide-liquide (ou liquid-liquid extraction, « LLE »), peut également être utilisée dans ce genre d'analyse. Celle-ci est de plus en plus employée dans le domaine de la métabolomique avec des solvants tels que le méthyl tert-butyle éther permettant l'extraction des composés polaires, notamment des métabolites (Yin et Xu, 2014). Ainsi, cette technique d'extraction peut être plus sélective que d'autres techniques, comme la SPE avec un support permettant l'extraction de composés aux propriétés physico-chimiques larges.

L'équipe de R. Gonzalez-Dominguez *et al.* (González-Domínguez *et al.*, 2014) a comparé les techniques de préparation d'échantillon sur de l'urine dans le cas d'une approche métabolomique. Leur comparaison était basée sur une inspection visuelle des profils métabolomiques obtenus pour chaque protocole de traitement d'échantillon, les tendances observées par les statistiques multivariées et l'intensité d'un certain nombre de métabolites, identifiés et représentatifs des empreintes digitales métabolomiques. Il en ressort que le protocole constitué d'une dilution d'un facteur dix de l'échantillon d'urine et celui avec la SPE avec un support en mode mixte permet l'obtention des meilleurs résultats pour l'établissement d'empreintes métabolomiques globales et le traitement par analyse statistique. D'autre part, l'extraction liquide-liquide avec des solvants organiques et les SPE en phase normale et phase inverse sont plus sélectives, ce qui dans le cas de la métabolomique n'est pas préférable. L'équipe de Dominguez-Romero *et al.* (Domínguez-Romero *et al.*, 2014) a, quant à elle, comparé sept protocoles de préparation d'échantillon d'urine dans le cadre d'une approche par screening ciblé de 189 composés. Leur comparaison était basée sur les rendements d'extraction et les coefficients de variation. Les résultats obtenus après les SPE avec différents types de support et la LLE avec du méthyl tert-butyle éther permettent de conclure que la SPE avec un support hydrophile-lipophile est la meilleure technique de préparation d'échantillon.

Cependant, le meilleur protocole de préparation d'échantillon est différent selon les problématiques. Ainsi, quel que soit le domaine d'étude, des tests préliminaires doivent être réalisés afin de déterminer quel type de préparation d'échantillon est préférable pour remplir les objectifs.

#### IV.2.4. Le traitement des données

##### IV.2.4.1. Critères d'identification

Il n'existe pas de recommandations quant aux critères d'identification de composés, dont les métabolites, dans le cas de screening. En revanche, Sumner *et al.* (Sumner *et al.*, 2007) ont proposé quatre niveaux différents d'identification selon les informations fournies pour la caractérisation de composés au sein d'un comité la Metabolomics Standards Initiative. L'identification par niveaux relève du domaine de la métabolomique. Néanmoins, elle peut s'appliquer à tous les composés recherchés par screening. Ces niveaux sont décrits ci-après :

- (I) Composés identifiés : l'analyse du standard analytique dans les conditions expérimentales identiques est nécessaire. Au moins deux critères indépendants doivent être identiques entre le composé suspecté et le standard analytique, par exemple, le temps de rétention et le spectre de masse ou la masse exacte et le spectre MS/MS.
- (II) Composés annotés putatifs : en l'absence de standard analytique de référence, sur la base des propriétés physico-chimiques et/ou de la similitude spectrale avec les bibliothèques spectrales.
- (III) Classes de composés caractérisées putatives : l'identification basée sur les propriétés physico-chimiques caractéristiques d'une classe de composés chimiques, ou par similitude spectrale à des composés connus d'une classe chimique.
- (IV) Composés inconnus : bien que non identifiés ou non classés, ces composés peuvent encore être différenciés des composés ayant un spectre de référence sur la base de données spectrales. Par conséquent, les spectres de ces composés inconnus sont de qualité et représentatifs d'un composé.

Selon les techniques analytiques utilisées, les critères d'identification sont différents. En effet, Fu *et al.* (Fu *et al.*, 2016) ont identifié 35 composés dans les feuilles de mandarine par HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> en utilisant le temps de rétention, les valeurs à la longueur d'onde maximale en UV, l'ion parent et les fragments. M.M. Plassmann *et al.* (Plassmann *et al.*, 2015) ont, quant à eux, utilisé la masse exacte, le profil isotopique et les fragments pour l'identification de composés dans l'urine par HPLC-HRMS. De plus, pour confirmer l'identification, des standards analytiques ont été utilisés. Celano *et al.* (Celano *et al.*, 2014)

ont également utilisé ces critères pour identifier des composés organophosphorés dans les boues. Ainsi, dans chaque étude, les critères d'identification sont à définir. Sumner *et al.* (Sumner *et al.*, 2014) ont mis en place un système de calcul du score d'identification selon les divers critères choisis et leur niveau de confiance attribué.

#### IV.2.4.2. Interrogation des bases de données

Le travail d'identification des composés repose essentiellement sur l'interrogation de bases de données. En effet, les données expérimentales acquises sont comparées aux données répertoriées dans des bases de données. Ainsi, le premier objectif de l'interrogation des bases de données est l'annotation des signaux MS. Il en existe de nombreuses, dont les bases de données spectrales. Ces dernières regroupent les spectres MS voire MS/MS des composés les constituant comme MassBank ("MassBank," 2015) qui regroupe près de 41 000 spectres. De plus, pour un même composé, différents spectres obtenus avec différents types de spectromètres de masse sont disponibles. Il existe également des bases de données qui ne contiennent pas forcément les spectres de référence de chaque composé. Celles-ci comprennent les bases de données spécifiques comme Human Metabolome Database (HMDB) ("HMDB," 2015) qui comportent près de 42 000 métabolites humains, ou DrugBank ("DrugBank," 2015) qui est constitué de plus de 7 700 médicaments ; et les bases de données plus généralistes comme The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) ("KEGG," 2015) qui regroupe l'ensemble de bases de données relatives aux génomes, aux voies métaboliques et aux composés biochimiques. Ces dernières peuvent être exploitées pour la comparaison des masses exactes expérimentales aux masses exactes des composés répertoriés dans ces bases de données. Cependant, pour la comparaison des fragments expérimentaux aux fragments des composés présents dans les bases de données, des plate-formes informatiques peuvent être utilisées. MetFrag ("MetFrag," 2015) correspond à une de ces plate-formes. Tout d'abord, MetFrag recherche les composés présents dans différentes bases de données (Kegg, PubChem ("PubChem," 2015) et ChemSpider ("ChemSpider," 2015)) ayant la même masse exacte (déterminée à partir de la valeur m/z détectée). Ensuite, il réalise une fragmentation *in silico* de ces composés sélectionnés et fait correspondre les fragments obtenus aux fragments expérimentaux. Ainsi, selon le degré de corrélation obtenu, un score est attribué à chaque composé de même masse exacte. Ce score est calculé en fonction des masses exactes et des intensités des ions fragments et des énergies de dissociation nécessaires à la rupture des liaisons de la molécule native. De plus, MetFrag tient compte des remaniements structuraux pendant la fragmentation MS/MS, à savoir les pertes de neutres (Wolf *et al.*, 2010). Les logiciels les plus récents de traitement de données

Chapitre IV : Recherche et identification de contaminants environnementaux dans l'urine par screening non ciblé de Bruker Daltonics permettent l'utilisation de cette plate-forme directement à partir du spectre de fragmentation expérimental.

Les bases de données connaissent un véritable essor, notamment MassBank qui a vu son nombre de visiteurs doublé en deux ans passant de 50 000 à plus de 100 000 entre 2010 et 2012. De plus, celles-ci sont de plus en plus enrichies avec l'engouement des scientifiques pour les méthodes de screening. En revanche, un tri est nécessaire pour la plupart de ces bases de données. En effet, DrugBank, pourtant au départ spécifique aux médicaments, ne contient plus seulement ces derniers mais d'autres composés. Le succès de l'identification d'un composé dépend donc en partie de la richesse et la qualité de ces bases de données. De ce fait, de plus en plus de chercheurs ont recours à la création de leur propre base de données interne, ce qui nécessite beaucoup de temps.

### IV.3. Matériels et méthodes

#### IV.3.1. Solvants

L'acétonitrile (ACN) (qualité LC-MS), le méthanol (MeOH) (qualité LC-MS), l'acétate d'éthyle (EA) (qualité HPLC), le méthyl tert-butyle éther (MTBE) (qualité HPLC), l'acide formique (qualité LC-MS), l'acide acétique (qualité LC-MS), l'acétate d'ammonium (qualité LC-MS) et le formiate d'ammonium (qualité LC-MS) ont été achetés auprès de Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

L'eau ultra-pure sans perturbateur endocrinien a été obtenue à partir d'un dispositif MilliQ de Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

#### IV.3.2. Processus d'échantillonnage et préparation d'échantillon

##### IV.3.2.1. Processus d'échantillonnage

L'urine utilisée a été recueillie sur toute une matinée incluant les premières urines de la journée dans des bouteilles en verre propre sans conservateurs, à partir d'un volontaire en bonne santé de sexe masculin, âgé de 36 ans.

L'échantillon a été conservé au congélateur à -20 °C jusqu'à la préparation d'échantillon ou l'analyse, comme recommandé pour des raisons de stabilité (Fernández-Peralbo et Luque de Castro, 2012). Avant la préparation d'échantillons, l'urine a été décongelée à température ambiante. Seul le surnageant a été utilisé pour le traitement et l'analyse.

#### IV.3.2.2. Préparation d'échantillon

Dans cette étude, l'urine a subi différentes préparations d'échantillon : une SPE, une LLE à l'acétate d'éthyle, une LLE au MTBE ou aucun traitement avant injection.

La SPE a été réalisée sur des cartouches Oasis<sup>®</sup> HLB (150 mg, 6 mL) de Waters<sup>®</sup>. Elles sont conditionnées avec 4 mL de MeOH et 4 mL d'eau MilliQ. Puis, 100 mL d'urine sont chargés sur les cartouches. Les cartouches sont rincées avec 4 mL d'eau puis éluées avec 4 mL de MeOH. Le solvant d'éluion est évaporé à sec sous flux d'azote à température ambiante, puis les extraits sont reconstitués dans 500  $\mu$ L d'eau MilliQ. Le facteur de concentration de l'urine est de 200.

La LLE à l'acétate d'éthyle a été réalisée en mélangeant 4 mL d'urine avec 16 mL d'acétate d'éthyle dans un tube à centrifuger. La LLE au MTBE est réalisée avec 8 mL d'urine et 20 mL de MTBE. L'extraction consiste à agiter vigoureusement au vortex le tube pendant 3 min. La majorité de la phase organique est recueillie et évaporée à sec sous flux d'azote à température ambiante, soit 10 mL d'acétate d'éthyle et 16 mL de MTBE. L'ensemble de la phase organique n'est pas prélevée afin de ne pas entraîner de phase aqueuse. Les extraits sont reconstitués dans 500  $\mu$ L d'eau MilliQ, permettant une concentration des composés extraits de l'urine d'un facteur 8 et d'un facteur 16, respectivement, pour l'extraction à l'acétate d'éthyle et celle au MTBE.

L'urine a également été analysée sans avoir subi de processus de préparation d'échantillon afin d'éviter la perte d'informations. Dans ce cas, afin d'injecter l'échantillon le plus limpide possible et ne pas obstruer l'injecteur ou la colonne chromatographique, l'échantillon d'urine est laissé reposer pendant quelques minutes pour que les protéines et les matières en suspension décantent. Seul le surnageant a été utilisé pour l'analyse.

#### IV.3.3. Analyse par LC-HRMS

Deux systèmes analytiques ont été utilisés dans cette étude. Le premier système correspond au même que dans le chapitre III, à savoir une chromatographie liquide UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific<sup>®</sup>, MA, USA) series LC comprenant une pompe ternaire, un échantillonneur réfrigéré et un compartiment pour la colonne ; couplée à un spectromètre de masse MicrOTOF Q II (Bruker Daltonics<sup>®</sup> GmbH, Bremen, Germany), constitué d'un quadripôle et un temps de vol à accélération orthogonale en tandem, équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI, Apollo).

Le deuxième système analytique utilisé correspond à une chromatographie liquide UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific<sup>®</sup>, MA, USA) series LC tout comme le premier

Chapitre IV : Recherche et identification de contaminants environnementaux dans l'urine par screening non ciblé système ; couplée à un spectromètre de masse Impact HD (Bruker Daltonics® GmbH, Bremen, Germany), constitué d'un quadripôle et un temps de vol à accélération orthogonale en tandem, équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI, Apollo). Il est situé au laboratoire d'application Bruker à Champs-sur-Marne. La Figure IV-2 illustre une photo de ce système.

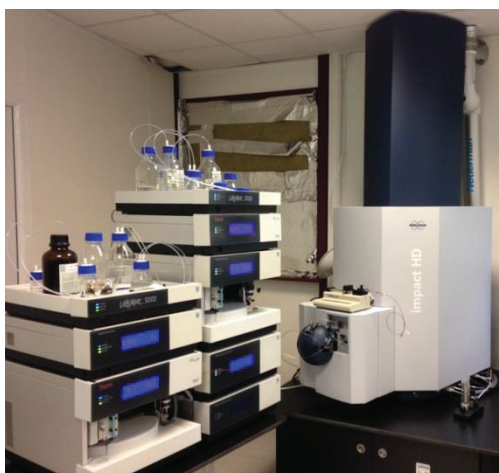


Figure IV- 2 : Photographie de la chaîne de chromatographie liquide UHPLC Ultimate 3000 couplée au spectromètre de masse Impact HD

Les spécificités des deux spectromètres de masse utilisés sont présentées dans le Tableau IV-1. L'impact HD est plus performant en termes de résolution et précision. De plus, bien que la sensibilité soit composé-dépendant, celle-ci est 1 000 fois plus importante sur l'Impact HD que sur le MicrOTOF Q II.

Tableau IV- 1 : Spécificités de des deux spectromètres de masse utilisés

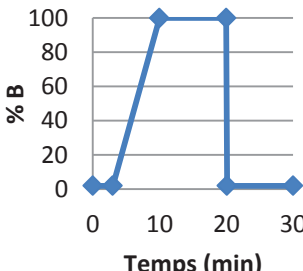
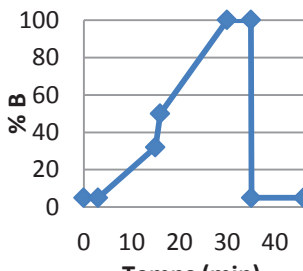
	MicrOTOF Q II	Impact HD
Gamme de masse	50 - 20 000	50 - 40 000
Résolution	17 500 (922 Da)	40 000 (922 Da)
Précision	< 5 ppm (calibration interne) < 3 ppm (calibration externe)	< 0,8 ppm pour masse > 500 Da (calibration interne) < 2 mDa pour masse < 500 Da (calibration externe) < 2 ppm pour masse > 500 Da (calibration externe)

Les méthodes chromatographiques utilisées sont les mêmes que lors du développement et la validation d'une méthode d'analyse multirésidus dans les urines par HPLC-HRMS (chapitre III). Lors de l'utilisation du MicrOTOF Q II, une fréquence d'acquisition de 1 Hz a été employée tandis qu'avec l'Impact HD, cette dernière était de 2 Hz. Les méthodes de détection pour le MicrOTOF Q II sont identiques à celles optimisées dans le



chapitre III. Comme pour le MicrOTOF Q II, la gamme de masses va de 50 à 1000 Da avec l'Impact HD. Dans le mode d'ionisation electrospray positif, le voltage du capillaire est de -1500 V. Dans le mode d'ionisation electrospray négatif, le voltage du capillaire est de +1800 V. Pour les deux modes d'ionisation, la température de la source est de 200 °C, la pression du gaz de nébulisation (N<sub>2</sub>) est de 3 bars, et le débit du gaz de séchage (N<sub>2</sub>) est de 9 L.min<sup>-1</sup>. L'ensemble des conditions analytiques sont répertoriées dans le Tableau IV-2.

Tableau IV- 2 : Conditions analytiques des méthodes utilisées

		ESI +		ESI -	
Séparation	Colonne	Waters XSelect CSH (2,1 x 100 mm ; 3,5 µm)		Phenomenex Kinetex (2,1 x 100 mm ; 2,6 µm)	
	Température	50 °C			
	Volume d'injection	5 µL			
	Débit	0,5 mL.min <sup>-1</sup>			
	Phases mobiles	(A) Eau MilliQ + 10 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique (B) ACN + 10 mM de formiate d'ammonium + 0,1 % d'acide formique		(A) Eau MilliQ + 0,05 % d'acide acétique (B) ACN + 0,05 % d'acide acétique	
Gradient					
Détection	Spectromètre de masse	MicrOTOF Q II	Impact HD	MicrOTOF Q II	Impact HD
	Gamme de masses	50-1000 Da			
	Voltage du capillaire	-3500 V	-1500 V	+2500 V	+1800 V
	Température de la source	250 °C	200 °C	250 °C	200 °C
	Pression du gaz de nébulisation	3 bars			
	Débit du gaz de séchage	12 L.min <sup>-1</sup>	9 L.min <sup>-1</sup>	12 L.min <sup>-1</sup>	9 L.min <sup>-1</sup>
	Fréquence d'acquisition	1 Hz	2 Hz	1 Hz	2 Hz

Dans le cas de l'utilisation du spectromètre de masse MicrOTOF Q II, des méthodes MS/MS ont été réalisées selon deux modes distincts : le mode auto MS/MS et le mode HRMRM. Le mode auto MS/MS a été utilisé pour la fragmentation des trois ions les plus intenses détectés tous les trois spectres générés à 30 eV pour le MicrOTOF Q II et à des

énergies de collision comprises entre 20 et 70 eV pour l'Impact HD. L'énergie de collision appliquée est définie selon la masse de l'ion à fragmenter et son état de charge. Cette méthode de fragmentation est une méthode générique de fragmentation en mode auto MS/MS pour l'Impact HD. Le chiffre de trois ions a été sélectionné afin d'augmenter les chances de fragmenter l'ion d'intérêt. Le seuil d'intensité pour déclencher la fragmentation a été fixé à 2000 coups. Le mode HRMRM permet la fragmentation de l'ion défini avec une fenêtre d'isolation de 8 Da, à une énergie de collision de 20 eV et 30 eV. Dans le cas de l'utilisation du spectromètre de masse Impact HD, les méthodes de fragmentation MS/MS ont été réalisées seulement selon le mode HRMRM.

Une calibration externe du spectromètre de masse était réalisée avant chaque séquence avec du formiate de sodium, constitué de 200 mg de NaOH, 250 mL d'isopropanol et de 1 mL d'acide formique pour le système utilisant le MicrOTOF Q II ; et un mélange d'acétate et de formiate d'ammonium, d'acide acétique (75 µL) et formique (25 µL) dans un mélange eau/isopropanol (50/50 ; v/v) pour le système utilisant l'Impact HD. De plus, la calibration a également été réalisée en mode externe proche sur chaque échantillon, au début de l'analyse, par l'intermédiaire d'un système de valve et d'une seringue avec pompe dans le cas du MicrOTOF Q II et d'une pompe de la chaîne chromatographique dans le cas de l'Impact HD. Tous les échantillons ont été acquis avec un segment inséré dans la méthode de 0,1 min à 0,5 min dans la méthode correspondant à la calibration externe proche. La résolution de masse est de 7 000 (FWHM) avec le MicrOTOF Q II (pour un rapport m/z égal à 230 Da) et de 14 000 (FWHM) avec l'Impact HD.

#### IV.3.4. Traitement de données

Le traitement des données acquises avec le spectromètre de masse MicrOTOF Q II a été effectué en utilisant la version 1.3 du logiciel DataAnalysis (Bruker Daltonics® GmbH), tandis que celles acquises avec l'Impact HD ont été traitées avec la version 4.2 du logiciel.

Dans un premier temps, les échantillons ont été analysés en mode full-scan. Les données acquises ont d'abord subi un prétraitement comprenant une calibration des spectres et une détection des pics chromatographiques réalisée grâce à l'algorithme Find Molecular Features du logiciel DataAnalysis. Ensuite, les masses exactes expérimentales ont été comparées aux données répertoriées dans une base de données définie, DrugBank ou TracesBank, qui correspond à une base de données propre à l'équipe. Cette dernière contient plus de 600 contaminants environnementaux. Cette comparaison a été réalisée grâce à une interface Web appelée « MetaboTrack » développée dans le cadre d'un partenariat avec la société Persistent Systems. MetaboTrack compare les masses exactes expérimentales

obtenues aux masses exactes des adduits  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  et  $[M+NH_4]^+$  pour le mode d'ionisation positif et  $[M-H]^-$  pour le mode d'ionisation négatif des composés répertoriés dans la base de données sélectionnée. A partir de cette étape, une liste de composés suspectés présents dans l'échantillon est établie. En plus de l'utilisation de la masse exacte, la déviation du profil isotopique entre le spectre expérimental et le spectre théorique du composé suspecté a été utilisée. Cette étape est réalisée de façon manuelle pour chaque composé suspecté à l'aide de la fonction Smart Formula (Bruker Daltonics® GmbH).

Dans un second temps, les échantillons sont analysés en mode MS/MS afin d'obtenir des spectres de fragmentation. Les spectres de fragmentation expérimentaux correspondant potentiellement aux composés suspectés présents dans l'échantillon sont comparés aux spectres de fragmentation de ces composés référencés dans les bases de données. Selon le spectromètre de masse utilisé, la stratégie de traitement des données à partir de cette étape varie en raison des différents outils utilisables avec la version du logiciel DataAnalysis. De plus, différents modes de fragmentation ont été utilisés, ce qui influe également sur la manière de traiter ces données MS/MS. Ces stratégies sont décrites pour le MicrOTOF Q II et l'Impact HD, respectivement dans les Figure IV-3 et Figure IV-4. Ainsi, les spectres de fragmentation acquis avec le MicrOTOF Q II sont comparés de façon manuelle à ceux répertoriés dans MassBank. Quant à ceux acquis avec l'Impact HD, ils sont comparés de façon semi-automatique aux fragments déterminés *in silico* par la plate-forme MetFrag à partir des composés répertoriés dans les bases de données Kegg, ChemSpider et PubChem.

Ainsi dans notre étude, l'identification des analytes est basée sur : (i) la différence entre la masse exacte théorique du composé suspecté et la masse exacte mesurée ( $< 3$  ppm) ; (ii) la différence entre le profil isotopique théorique et l'expérimental ( $\leq 30$  msigma) ; et sur (iii) la comparaison des spectres de fragmentation expérimentaux et ceux référencés dans les bases de données, quand les réponses et les bases de données le permettent.

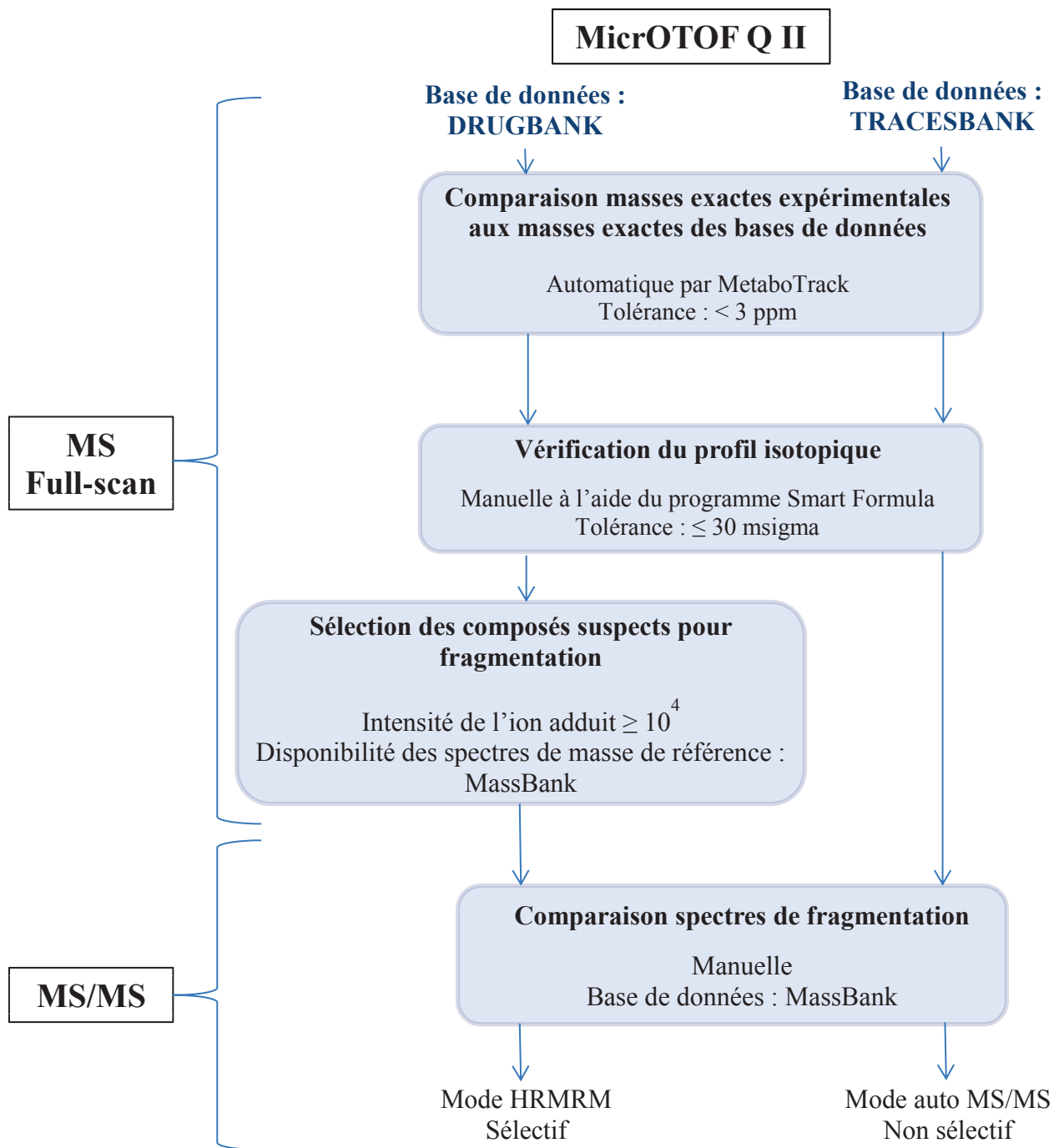


Figure IV- 3 : Stratégie de traitement des données acquises avec le MicrOTOF Q II

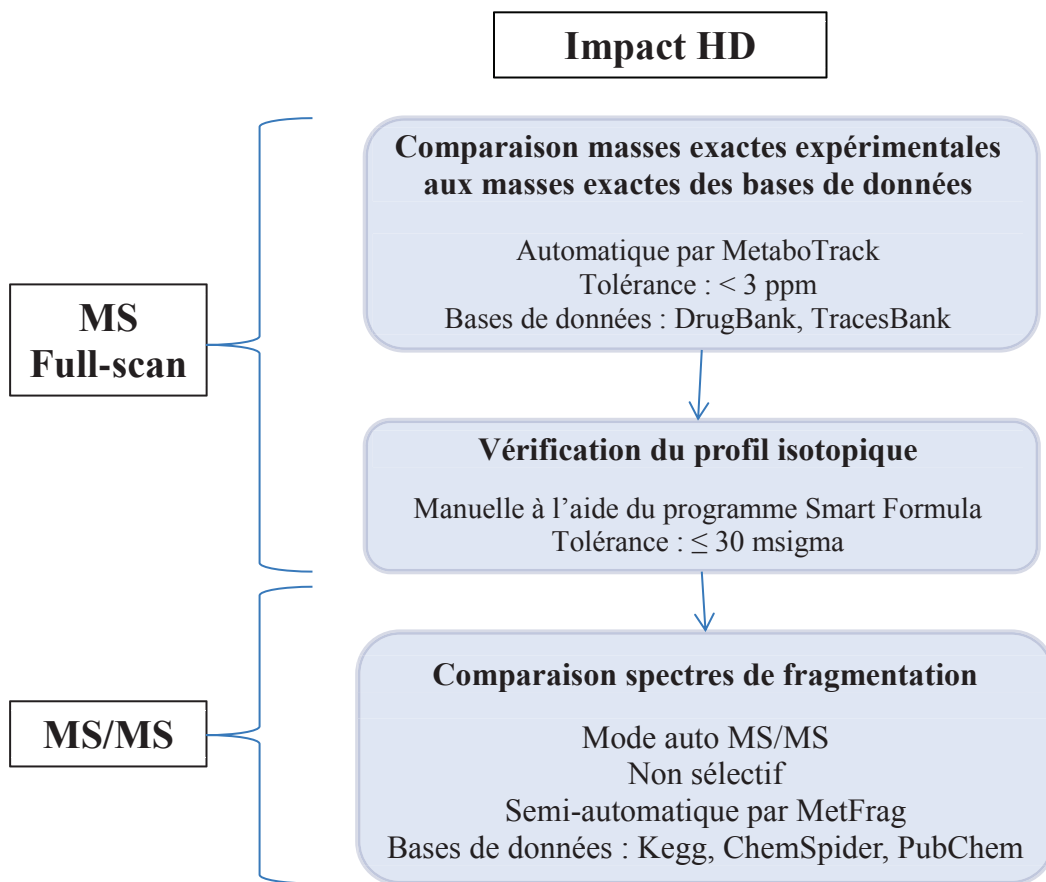


Figure IV- 4 : Stratégie de traitement des données acquises avec l'Impact HD

#### IV.4. Résultats et discussion

##### IV.4.1. Préparation d'échantillon

Afin d'obtenir le maximum de masses exactes détectées et donc le maximum de composés identifiables sur une analyse, différents protocoles de préparation d'échantillon ont été appliqués à l'échantillon d'urine. Tout d'abord, une SPE avec un support hydrophile-lipophile en phase inverse a été réalisé sur l'échantillon afin de conserver au maximum l'ensemble des composés contenus dans l'urine et les concentrer. Une méthode plus sélective a également été testée. Il s'agit de l'extraction liquide-liquide avec du méthyl tert-butyle éther (MTBE) et de l'acétate d'éthyle (EA). Un échantillon d'urine brute a également été injecté.

L'échantillon d'urine brute et les extraits récupérés ont ensuite été injectés sur le MicroTOF Q II pour comparer les réponses obtenues. Ces dernières sont présentées sous forme de TIC (Total Ion Chromatogram) dans la Figure IV-5. Ainsi, il est clairement visible que l'urine concentrée 200 fois par SPE permet de détecter plus d'ions par rapport aux autres protocoles d'échantillon testés. C'est donc le protocole de préparation d'échantillon qui a été choisi pour le screening non ciblé de l'urine sur le MicroTOF Q II.

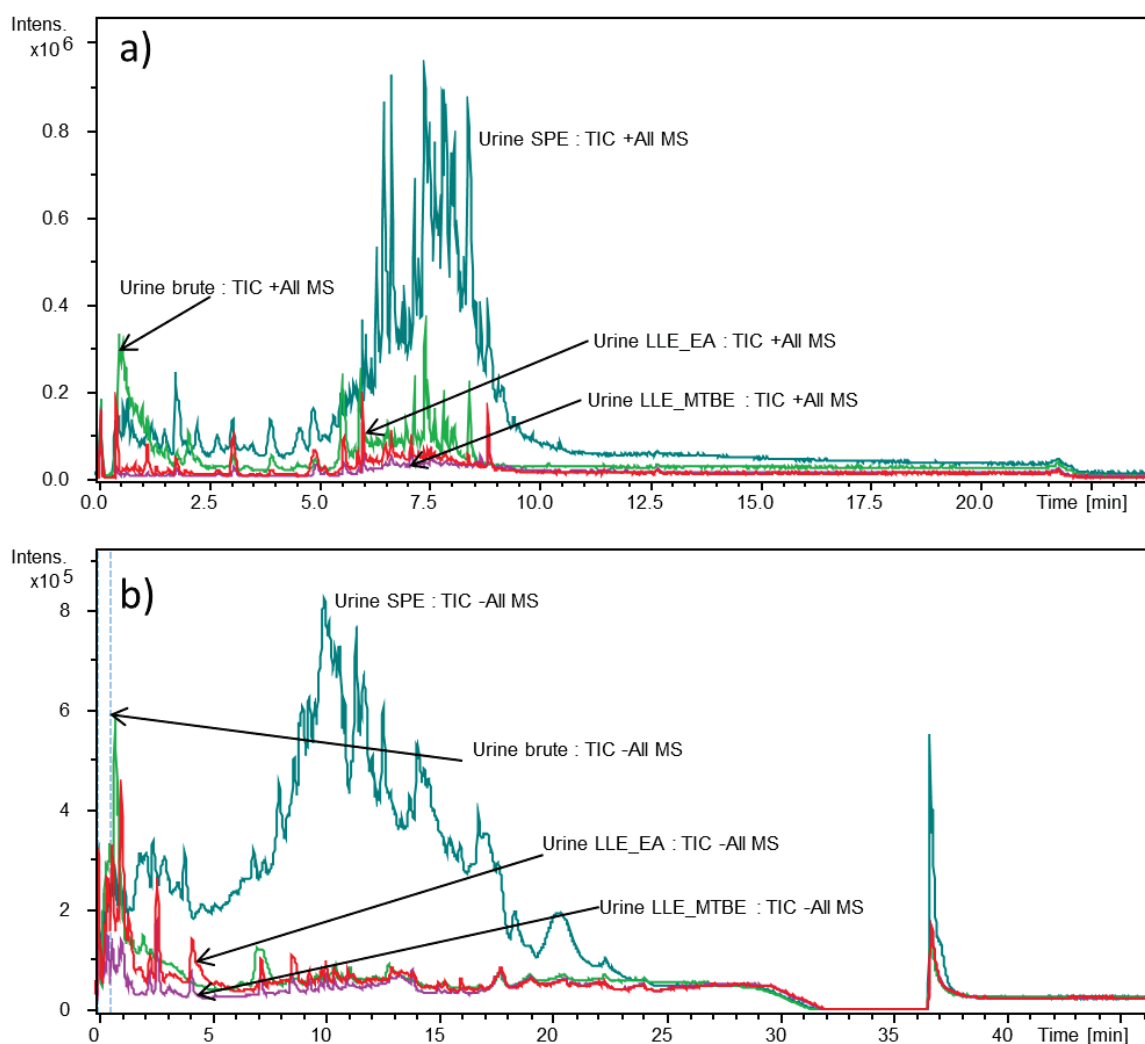


Figure IV- 5 : Chromatogrammes (TIC) obtenus sur le MicroTOF Q II en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b)

En ce qui concerne les analyses réalisées sur l'Impact HD, dans un premier temps l'urine brute a été injectée. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la Figure IV-6. Ce dernier montre des intensités très importantes, de l'ordre de  $5 \cdot 10^6$  coups en mode d'ionisation positif et de  $4 \cdot 10^6$  coups en mode négatif, ce qui est largement supérieur aux données acquises sur le MicroTOF Q II. Par conséquent, le screening sera réalisé sur l'échantillon d'urine brute. De plus, afin de ne pas saturer le signal et encrasser la source du spectromètre de masse, l'échantillon concentré ne sera pas utilisé sur cet appareil.

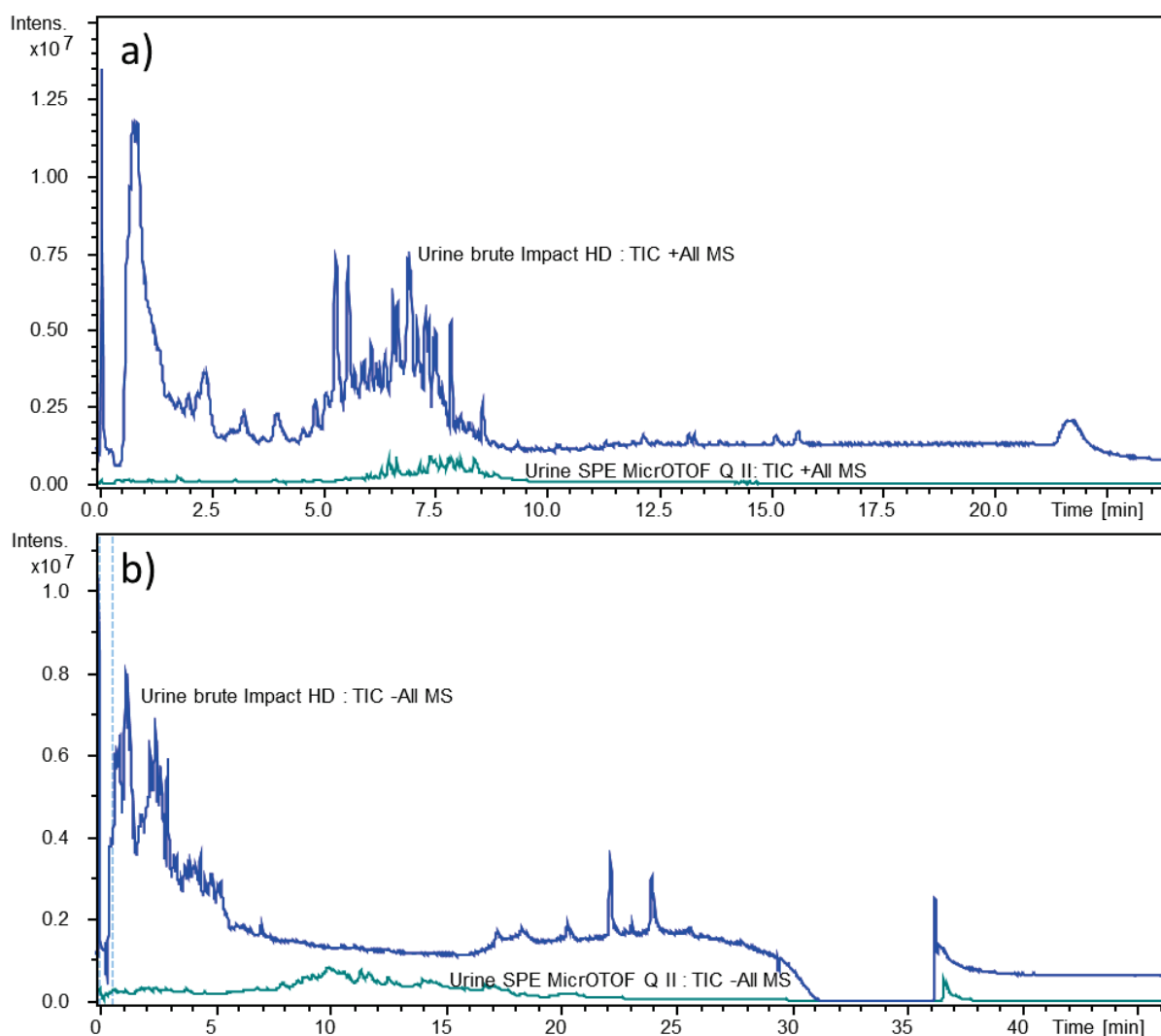


Figure IV- 6 : Chromatogrammes (TIC) en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) obtenus sur le MicroTOF Q II et l'Impact HD

#### IV.4.2. Analyse en mode full-scan (MS)

##### IV.4.2.1. Prétraitement des données brutes

Le prétraitement des données brutes a pour objectif de préparer les données à la recherche de composés et à leur identification. Il fait intervenir différents algorithmes donnant accès à plusieurs paramètres comme la résolution, l'intensité, l'aire, le rapport signal sur bruit ou encore la largeur du pic chromatographique. Le logiciel DataAnalysis a été utilisé pour le prétraitement des données, notamment pour la calibration des spectres de masse et la détection des pics chromatographiques.



## IV.4.2.1.1. Calibration des spectres de masse

La calibration des spectres est la première étape de transformation des données brutes. Elle a pour objectif de corriger les déviations survenues pendant la prise de mesure. La fréquence de calibration dépend de la technique utilisée, mais également de la stabilité de l'environnement de travail et notamment des changements de température qui engendrent la dilatation du tube de vol et affectent la partie électronique du spectromètre de masse. L'efficacité de la calibration dépend de la gamme de masses, du nombre de valeurs de référence et de la courbe de calibration choisie. Loin d'être anodine, cette première étape impacte fortement l'interrogation des bases de données de par la précision de la mesure de masse.

## IV.4.2.1.2. Détection des pics chromatographiques

La détection des pics chromatographiques est réalisée grâce à l'algorithme « Find Molecular Features ». La première étape de cet algorithme est la transformation des profils  $m/z$  en mode centroïde. Ensuite, l'algorithme détecte les pics  $m/z$  en utilisant des paramètres définis. La troisième étape est la création de traces chromatographiques pour chaque pic  $m/z$  détecté. Enfin, la quatrième étape est la détection des pics chromatographiques.

Selon le spectromètre de masse utilisé et le type d'échantillon d'urine analysé, le nombre de masses exactes détectées varie considérablement. Le Tableau IV-3 présente ces résultats. Ainsi, malgré le fait que l'échantillon d'urine analysé sur le MicrOTOF Q II soit 200 fois plus concentré que celui injecté sur l'Impact HD, ce dernier système permet la détection d'un nombre nettement plus important de masses exactes.

Tableau IV- 3 : Nombre de masses exactes détectées en fonction du spectromètre de masse utilisé et du type d'échantillon analysé

ESI	+		-	
	MicrOTOF Q II	Impact HD	MicrOTOF Q II	Impact HD
Spectromètre de masse	x 200 (SPE)	Brute	x 200 (SPE)	Brute
Nombre de masses exactes détectées	561	4621	1060	3614

#### IV.4.2.2. Traitement des données

##### IV.4.2.2.1. Interrogations des bases de données pour la comparaison des masses exactes

La première étape du traitement des données est la comparaison des masses exactes expérimentales aux masses exactes des ions adduits des composés répertoriés dans la base de données choisie. Le programme MetaboTrack développé en partenariat avec la société Persistent Systems permet de réaliser cette comparaison de façon presque instantanée. En effet, après avoir chargé le fichier de la base de données constitué des composés et leur masse exacte et le fichier de données expérimentales constitué de toutes les masses détectées, le programme détermine les masses des potentiels ions adduits des composés présents dans la base de données, puis les compare aux masses exactes expérimentales. Ainsi, le programme génère en quelques secondes un fichier de résultats comportant la liste des composés suspectés être présents dans l'échantillon en s'appuyant sur un critère d'identification, à savoir la masse exacte. Dans le cas de notre étude, la tolérance de la masse exacte choisie est de 3 ppm.

Selon la richesse des bases de données utilisées, les composés suspectés présents dans l'échantillon d'urine seront plus ou moins nombreux. En effet, deux bases de données ont été utilisées. Il s'agit de DrugBank, une base de données accessible en ligne à toute la communauté scientifique, comportant plus de 7 000 composés et TracesBank, une base de données propre à l'équipe comportant près de 600 contaminants environnementaux fréquemment retrouvés dans diverses matrices. Ainsi, comme présenté dans le Tableau IV-4, il y a plus de composés qui répondent au critère de la tolérance de masse exacte avec DrugBank, puisqu'il s'agit de la base de données la plus fournie. Il faut également prendre en compte le fait que les masses correspondant à ces composés, suspectés être présents dans l'échantillon, peuvent aussi correspondre à des fragments d'autres molécules.

Tableau IV- 4 : Nombre de composés suspectés présents dans l'échantillon avec une tolérance de masse exacte de 3 ppm

Base de données	ESI	Spectromètre de masse	Echantillon d'urine	Nombre de composés suspects ( $\Delta m/z < 3$ ppm)
TracesBank	+	MicrOTOF Q II	x 200 (SPE)	12
		Impact HD	Brute	96
	-	MicrOTOF Q II	x 200 (SPE)	4
		Impact HD	Brute	47
DrugBank	+	MicrOTOF Q II	x 200 (SPE)	234
		Impact HD	Brute	1950
	-	MicrOTOF Q II	x 200 (SPE)	128
		Impact HD	Brute	829

#### IV.4.2.2.2. Corrélation du profil isotopique

Pour chacune des masses exactes correspondant potentiellement à un composé suspecté, un deuxième critère d'identification est vérifié. Il s'agit de la similitude du profil isotopique expérimental à celui de la substance suspectée. La pertinence du profil isotopique a été vérifiée manuellement et individuellement à l'aide de la fonction Smart Formula (Bruker Daltonics®). Si la déviation du profil isotopique est inférieure ou égale à 30 msigma, le critère est rempli et la vérification des critères suivants peut être entreprise. En revanche, si la déviation du profil isotopique est supérieure à la limite fixée, le composé suspecté est éliminé de la liste.

D'après l'interrogation de la base de données DrugBank, pour les données acquises avec le spectromètre de masse Impact HD, de très nombreux composés semblent être présents dans l'échantillon d'urine (1950 en ESI+ et 829 en ESI-) (Tableau IV-4). La vérification des profils isotopiques étant très longue, seuls les profils isotopiques des composés avec des ions adduits répondant à plus de  $10^6$  coups en intensité ont été vérifiés. De ce fait, parmi les ions à  $10^6$  coups en intensité, 17 et neuf correspondraient à des composés présents dans la base de données DrugBank d'après le critère de la masse exacte, respectivement, en mode d'ionisation positif et négatif. Seuls les profils isotopiques de ces composés ont donc été vérifiés. Ainsi, le nombre de composés suspectés présents dans l'échantillon d'après le critère de la masse exacte et du profil isotopique sont présentés dans le Tableau IV-5.

Tableau IV- 5 : Nombre de composés suspectés présents dans l'échantillon avec une tolérance de masse exacte de 3 ppm et une déviation du profil isotopique inférieure ou égale à 30 msigma

Base de données	ESI	Spectromètre de masse	Echantillon d'urine	Nombre de composés suspects	
				Critère : $\Delta m/z < 3$ ppm	Critères : $\Delta m/z < 3$ ppm ; Déviation profil isotopique $\leq 30$ msigma
TracesBank	+	MicrOTOF Q II	x 200 (SPE)	12	6
		Impact HD	Brute	96	29
	-	MicrOTOF Q II	x 200 (SPE)	4	1
		Impact HD	Brute	47	13
DrugBank	+	MicrOTOF Q II	x 200 (SPE)	234	113
		Impact HD	Brute	17*	10
	-	MicrOTOF Q II	x 200 (SPE)	128	35
		Impact HD	Brute	9*	7

\* Nombre de composés suspectés présents dans l'échantillon d'après le critère de la différence de masse exacte avec des ions adduits répondant à plus de  $10^6$  coups en intensité

#### IV.4.3. Analyse en mode MS/MS

Les analyses en mode MS/MS permettent l'obtention des derniers critères d'identification, à savoir, les fragments des composés suspectés être présents dans l'échantillon. Cette étape de fragmentation peut être réalisée selon deux modes : le mode auto MS/MS et le mode HRMRM. Ces modes de fragmentation vont conditionner la méthode d'analyse mais également le traitement des données.

##### IV.4.3.1. Mode HRMRM

Comme expliqué dans le paragraphe I.6.2.3.3.1. du chapitre I, le mode MRM ou HRMRM (avec des spectromètres de masse haute résolution) permet de fragmenter un ion parent défini en différents ions fils, appelés aussi fragments. Cette méthode de fragmentation est donc sélective. Le développement des méthodes de fragmentation en mode HRMRM nécessite donc de connaître quels ions parents correspondant à des composés suspectés être présents dans l'échantillon sont à fragmenter. Par conséquent, les données acquises en mode full-scan doivent être traitées avant d'analyser les échantillons en mode MS/MS. Ce mode n'a été utilisé qu'avec le MicrOTOF Q II après interrogation de la base de données DrugBank.

La fragmentation d'un composé nécessite que l'ion correspondant à ce dernier ait une intensité suffisante pour obtenir des fragments visibles sur le spectre. Ainsi, en mode

HRMRM, seuls les ions parents correspondant à des composés suspects avec une intensité supérieure à  $10^4$  coups ont été fragmentés. De plus, la comparaison des spectres de fragmentation expérimentaux aux spectres référencés dans les bases de données a été réalisée manuellement pour chaque composé. En effet, la version du logiciel DataAnalysis compatible avec le MicrOTOF Q II ne permet pas d'utiliser la plate-forme MetFrag. De ce fait, la base de données de spectres de fragmentation utilisée est MassBank. Ainsi, seuls les ions correspondant aux composés suspects ayant un spectre de fragmentation de référence en basse ou haute résolution sur MassBank ont été fragmentés.

Comme présenté dans le Tableau IV-6, le nombre de composés suspectés remplissant les différents critères est de dix et quatre, respectivement en mode d'ionisation positif et négatif. Le nombre de composés suspects a donc considérablement diminué. Cependant, pour les composés dont les spectres de référence n'étant pas disponibles sur MassBank, cela ne signifie pas qu'ils sont absents de l'échantillon. Cela soulève le problème de la richesse des bases de données.

Tableau IV- 6 : Nombre de composés suspectés présents dans l'échantillon remplissant les critères de tolérance de masse exacte, de déviation du profil isotopique, d'intensité et de disponibilité des spectres de masse de référence correspondants

Base de données	Echantillon d'urine	ESI	Nombre de composés suspects		
			Critère : $\Delta m/z < 3$ ppm	Critères : $\Delta m/z < 3$ ppm Déviation profil isotopique $\leq 30$ msigma	Critères : $\Delta m/z < 3$ ppm Déviation profil isotopique $\leq 30$ msigma Intensité $\geq 10^4$ coups Disponibilité des spectres de fragmentation (MassBank)
DrugBank	x 200 (SPE)	+	234	113	10
		-	128	35	4

La liste des composés suspectés présents dans l'échantillon analysé par le MicrOTOF Q II d'après la base de données DrugBank est répertoriée dans le Tableau IV-7. Celui-ci est constitué de la masse exacte expérimentale ( $m/z$  expérimental) correspondant à la masse exacte calculée ( $m/z$  calculé) par MetaboTrack de l'adduit du composé suspect. Ainsi, la différence de ces masses est présentée sous la forme d'« erreur masse », qui est, pour ces composés sélectionnés, inférieure à 3 ppm. De plus, la déviation du profil isotopique est également présentée, inférieure ou égale à 30 msigma. Parmi les composés suspectés être présents dans l'échantillon et remplissant les trois critères d'identification dont celui de la détection des fragments, plusieurs d'entre eux peuvent être détectés sous la même masse. En

effet, certains composés ont la même formule brute et sont détectés sous la forme du même ion adduit comme la théophylline et la théobromine en mode positif dans notre cas ; ou bien des molécules sont détectées sous la forme d'ions adduits différents mais ayant la même masse monoisotopique comme la tolmétine, la 4'-hydroxyflavanone et l'exémestane en mode positif. De ce fait, pour notre étude, il a suffi de fragmenter seulement six ions de masse monoisotopique différente en mode HRMRM pour avancer vers une confirmation d'identification putative des dix composés suspects en mode d'ionisation positif ; et de trois ions pour valider le critère d'identification basé sur les fragments des quatre molécules suspectées pour le mode d'ionisation négatif. La liste des masses à fragmenter est présentée dans le Tableau IV-7 en tant que « m/z expérimental ». Le tableau comprend également les types de spectromètre de masse avec lesquels les spectres de masse utilisés comme références ont été obtenus. En effet, la base de données MassBank répertorie pour un même composé les spectres de masse obtenus avec différents types de spectromètre de masse. Dans le cas d'un nombre de propositions de spectres de masse de référence important dans MassBank, le choix de spectres obtenus avec un appareil du même type que celui utilisé dans notre étude, à savoir un QqToF, a été privilégié. En revanche, si aucun spectre obtenu avec un QqToF n'était disponible, les spectres obtenus avec un FTICR ou un Orbitrap étaient privilégiés par rapport à ceux obtenus avec un système de type quadripôle.

Tableau IV- 7 : Composés suspectés présents dans l'échantillon d'urine analysé par le MicroTOF Q II d'après la base de données DrugBank

m/z expérimental (Da)	Adduit	m/z calculé (Da)	m/z DrugBank (Da)	Erreur masse (ppm)	Composé suspecté	Formule brute	Déviaton profil isotopique (msigma)	Specetres de référence sur Massbank
<i>ESI positif</i>								
181,0719	M+H	180,0646	180,0647	-0,6	Théophylline	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4,6	Oui (QQ)
258,1119	M+H	257,1046	257,1052	-2,2	Théobromine	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	6,3	Oui (QToF)
	M+NH <sub>4</sub>	240,0781	240,0786	-2,4	Tolmétime			
319,1661	M+Na	296,1769	296,1776	-2,5	4'-Hydroxyflavanone	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	6,3	Oui (QToF)
185,1283	M+NH <sub>4</sub>	167,0945	167,0946	-0,9	Exémestane	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	3,5	Oui (ITFT)
					Phényléphrine	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	1,8	Oui (QToF)
166,1226	M+H	165,1153	165,1154	-0,2	Métaraminol	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO	3,0	Oui (QToF)
					Ephédrine			
190,0862	M+H	265,1319	265,1314	1,9	4-Méthoxyamphétamine	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	16,0	Oui (Q)
<i>ESI négatif</i>								
212,0017	M-H	213,009	213,0096	-2,8	3-Sulfooxy-1h-indole	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> S	2,8	Oui (QToF)
179,0354	M-H	180,0427	180,0423	2,3	Acide Acétylsalicylique	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	7,4	Oui (Q)
					Acide 3,4-dihydroxycinnamique = Acide caféique			
201,1132	M-H	202,1205	202,1205	-0,2	Acide sébacique	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	12,6	Oui (QToF)

Parmi l'ensemble de ces masses fragmentées, seules deux (une en mode d'ionisation positif et une en mode négatif) ont pu amener à une validation du critère d'identification portant sur les fragments.

En mode d'ionisation positif, l'extraction de la masse 181,0719 Da parmi l'ensemble des résultats a permis d'obtenir le chromatogramme présenté dans la Figure IV-7 (a). Trois pics chromatographiques correspondent à cette masse, dont deux pics coélus. D'après les spectres de fragmentation obtenus à 20 et 30 eV, le composé détecté à 3 min correspondrait bien à la théobromine, non pas à la théophylline. En effet, les spectres de référence correspondent parfaitement à ceux présentés dans la Figure IV-7 (b et c). L'erreur en masse des fragments est comprise entre 3 et 26 ppm. Afin de confirmer l'identification de ce composé, un critère supplémentaire peut être ajouté en couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse. Il s'agit du temps de rétention. Néanmoins, afin de vérifier ce critère il est nécessaire de disposer du standard analytique de la théobromine. Pour cette substance, tous les outils disponibles au laboratoire pour son identification ont été utilisés. Cette molécule est donc identifiée de niveau (II) dans l'échantillon d'urine. La théobromine est une substance présente naturellement dans le cacao et donc dans de nombreux aliments. De plus, elle a des effets diurétiques, vasodilatateurs, antitussifs et cardiostimulants, la rendant également très utilisée en médecine. Par conséquent, la source d'exposition à ce composé est difficilement identifiable. En effet, il est possible que ce composé ait été retrouvé dans l'urine de ce donneur après une ingestion volontaire d'un produit dont la théobromine est issue ; ou après une ingestion involontaire comme une eau polluée par un médicament contenant cette substance.

Pour ce qui est des deux autres pics chromatographiques coélus autour de 5 min, leurs spectres de fragmentation sont presque identiques à un fragment près. Sans un système de séparation des composés, ces molécules n'auraient sans doute pas pu être discriminées, d'où l'importance de l'utilisation d'un système de séparation chromatographique précédant le spectromètre de masse. Cependant, le critère des fragments n'a pas pu être validé pour ces substances. En effet, leur spectre de fragmentation ne correspond à aucun spectre répertorié dans MassBank.



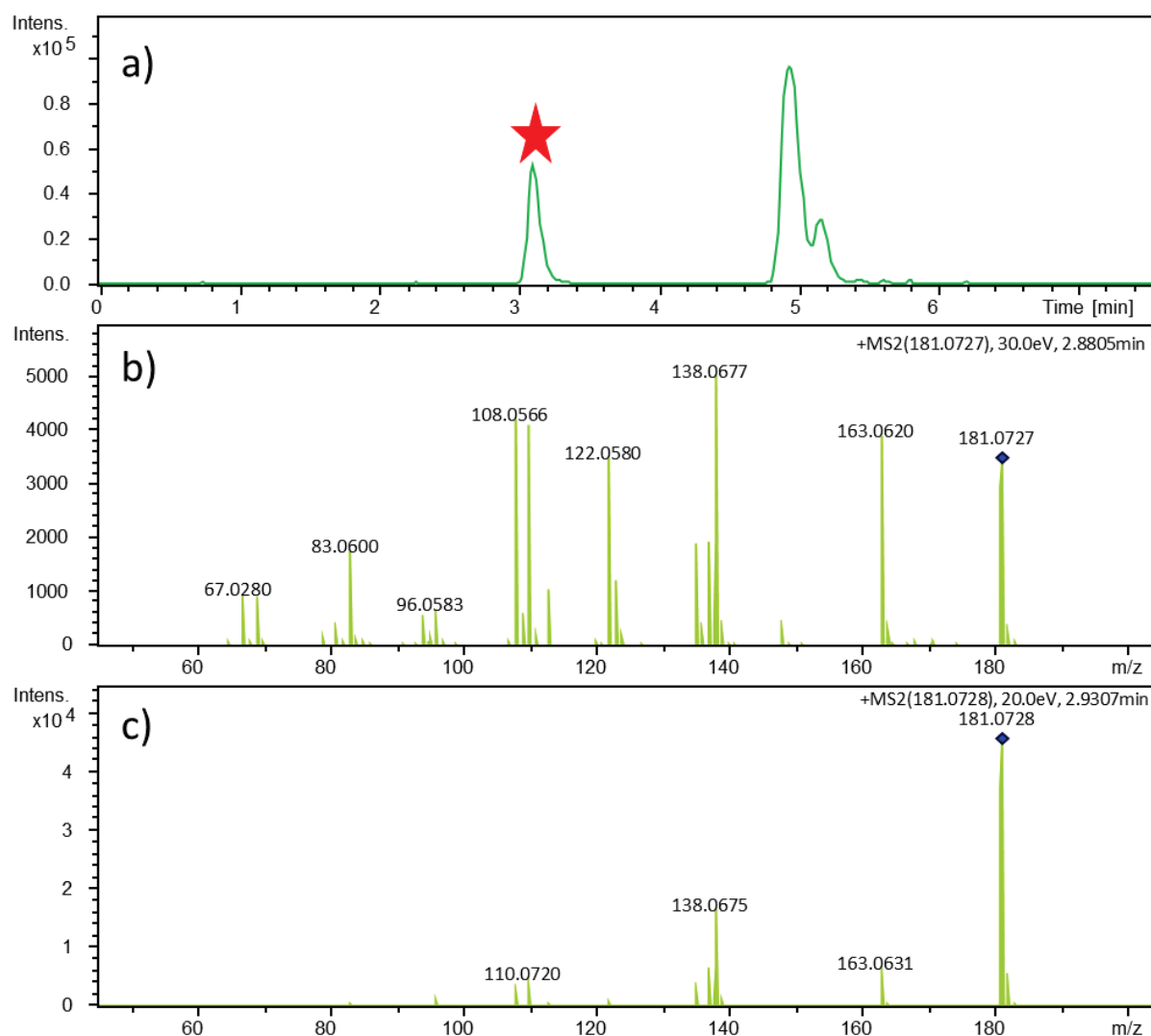


Figure IV- 7 : Chromatogramme de la masse 181,0719 Da (a) et spectres de fragmentation à 30 (b) et 20 eV (c) du pic chromatographique à 3,1 min

En mode d'ionisation négatif, aucune des molécules suspectées présentes dans l'échantillon par DrugBank n'a été identifiée par son spectre de fragmentation. En revanche, en fragmentant la masse 179,0354 Da, les spectres de fragmentation d'un pic chromatographique à 3,8 min ont pu être reliés à un composé, l'acide caféique. Ces spectres sont présentés dans la Figure IV-8. Malgré la faible intensité des ions fragments, quatre sont communs à l'acide caféique. Il s'agit des fragments 135,0499 Da, 107,0522 Da, 134,0404 Da et 117,0470 Da. L'erreur en masse des fragments est comprise entre 5 et 39 ppm. Cette molécule est donc identifiée de niveau (II) dans l'échantillon d'urine. Le donneur de l'échantillon a probablement été exposé à ce composé *via* l'alimentation. En effet, cette molécule est présente naturellement dans de nombreux aliments comme certaines plantes alimentaires (menthe, thym, sauge...), fruits et légumes (endive, pomme de terre, pomme, abricot...) mais aussi dans des boissons telles que le vin rouge mais également celles à base

Chapitre IV : Recherche et identification de contaminants environnementaux dans l'urine par screening non ciblé de café. Mais son utilisation dans l'alimentation est encore plus large puisque l'acide caféique est utilisé pour masquer l'arrière-goût amer des édulcorants artificiels très présents dans les produits alimentaires industriels (Riemer, 1994).

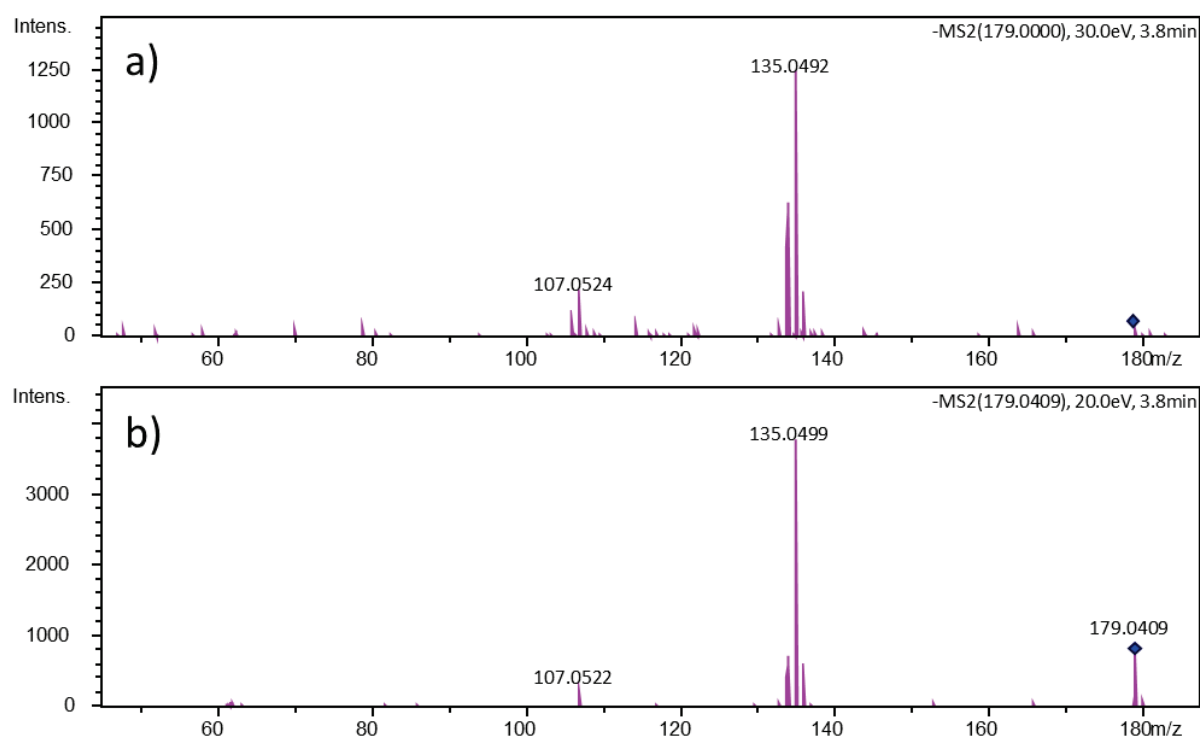


Figure IV- 8 : Spectres de fragmentation de la masse 179,03 Da à 30 (a) et 20 eV (b) du pic chromatographique à 3,8 min

D'après la comparaison des données obtenues avec le MicroTOF Q II et celles référencées dans DrugBank, seulement deux composés ont rempli l'ensemble des critères d'identification de notre stratégie. Ils ont été identifiés de niveau (II). Ces deux molécules ont probablement été retrouvées dans l'urine après ingestion par le volontaire d'un aliment étant constitué naturellement ou non de ces substances.

#### IV.4.3.2. Mode auto MS/MS

Contrairement au mode de fragmentation HRMRM, le mode auto MS/MS n'est pas sélectif. En effet, tous les trois spectres générés, les trois ions les plus intenses détectés par le spectromètre de masse sont fragmentés à 30 eV pour le MicroTOF Q II et avec une énergie de collision comprise entre 20 et 70 eV selon la masse de l'ion à fragmenter et l'état de charge de ce dernier pour l'Impact HD. L'avantage de ce mode de fragmentation est qu'il ne nécessite pas de traiter les données acquises en mode full-scan au préalable. En revanche,

l'inconvénient majeur est que si l'ion d'intérêt n'est pas compris parmi les trois les plus intenses détectés, il ne sera pas fragmenté.

#### IV.4.3.2.1. MicrOTOF Q II

Ainsi, pour la comparaison des données expérimentales obtenues avec le MicrOTOF Q II, notamment les masses exactes, avec celles de la base de données TracesBank, seul le mode auto MS/MS a été utilisé pour les méthodes de fragmentation. Comme les données obtenues par fragmentation en mode HRMRM, la comparaison des spectres de masse expérimentaux et ceux référencés dans la base de données MassBank a été réalisée manuellement.

Sur les sept composés suspects (six en mode d'ionisation positif et un en mode négatif) remplissant les critères de la masse exacte et du profil isotopique (Tableau IV-5), cinq des ions parents leur correspondant n'ont pas été fragmentés avec les méthodes utilisées en mode MS/MS. En effet, les ions d'intérêt ne faisaient pas partie des trois ions les plus intenses sélectionnés pour la fragmentation. Ces résultats sont présentés dans le Tableau IV-8. Par conséquent, ces composés n'ont pu être identifiés dans l'échantillon qu'avec deux critères d'identification, qui sont la masse exacte et le profil isotopique. Néanmoins, ces deux critères ne sont pas suffisants pour identifier un composé. En effet, comme dit précédemment, deux composés ayant la même formule brute et étant détectés sous la forme du même ion adduit auront la même masse exacte et le même profil isotopique. C'est pourquoi afin d'avancer vers une identification de ces composés, une fragmentation en mode HRMRM des masses correspondant à ces composés devra être réalisée. De plus, si les spectres de masse de ces composés ne sont pas référencés dans MassBank, les standards analytiques de ces composés devront également être analysés en mode MS/MS afin d'obtenir des spectres de masse de référence.

Tableau IV- 8 : Composés suspectés présents dans l'échantillon d'urine analysé par le MicroTOF Q II d'après la base de données TracesBank

m/z expérimental (Da)	Adduit	m/z calculé (Da)	m/z TracesBank (Da)	Erreur masse (ppm)	Composé suspecté	Formule brute	Déviaton profil isotopique (msigma)	Fragmentation
<i>ESI positif</i>								
188,1069	M+NH <sub>4</sub>	170,0731	170,0732	-0,5	Ortho-phénylphénol	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O	17,0	Oui
195,0878	M+H	194,0805	194,0804	0,8	Caféine	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	6,0	Non
239,1176	M+H	238,1103	238,1106	-1,2	10,11 dihydroxy carba	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	10,0	Non
298,0972	M+NH <sub>4</sub>	280,0634	280,0630	1,3	Sulfameter / sulfaméthoxydiazine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	4,0	Non
319,1661	M+NH <sub>4</sub>	301,1323	301,1314	2,9	Fénoxycarbe	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	1,0	Oui
356,2441	M+NH <sub>4</sub>	338,2103	338,2093	2,8	Piperonylbutoxide	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	9,8	Non
<i>ESI négatif</i>								
265,0613	M-H	266,0686	266,0691	-2,1	11 keto oxcarbamazépine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	23,6	Non

Quant aux deux autres composés identifiés potentiellement comme le fénoxycarbe et l'ortho-phénylphénol, ce dernier n'a pas de spectre de référence sur MassBank. Par conséquent, il est impossible d'avancer vers la confirmation de l'identification de ce composé par la comparaison des spectres de fragmentation sans standard analytique. Pour le fénoxycarbe, les spectres de fragmentation répertoriés sur MassBank correspondent seulement à ceux de l'adduit  $[M+H]^+$  du composé. Alors que dans notre cas, c'est l'adduit  $[M+NH_4]^+$  qui est détecté. Néanmoins, les spectres peuvent être tout de même comparés. Les spectres de fragmentation expérimentaux et de référence sont présentés dans la Figure IV-9. Il n'y a aucun fragment commun d'après les données. Par conséquent, le spectre de fragmentation expérimental ne correspond pas à celui du fénoxycarbe. Afin d'identifier le composé auquel appartient ce spectre de fragmentation, les masses des fragments majoritaires et de l'ion parent sont recherchées dans MassBank. Néanmoins, aucun composé de la base de données ne semble correspondre à ces masses.

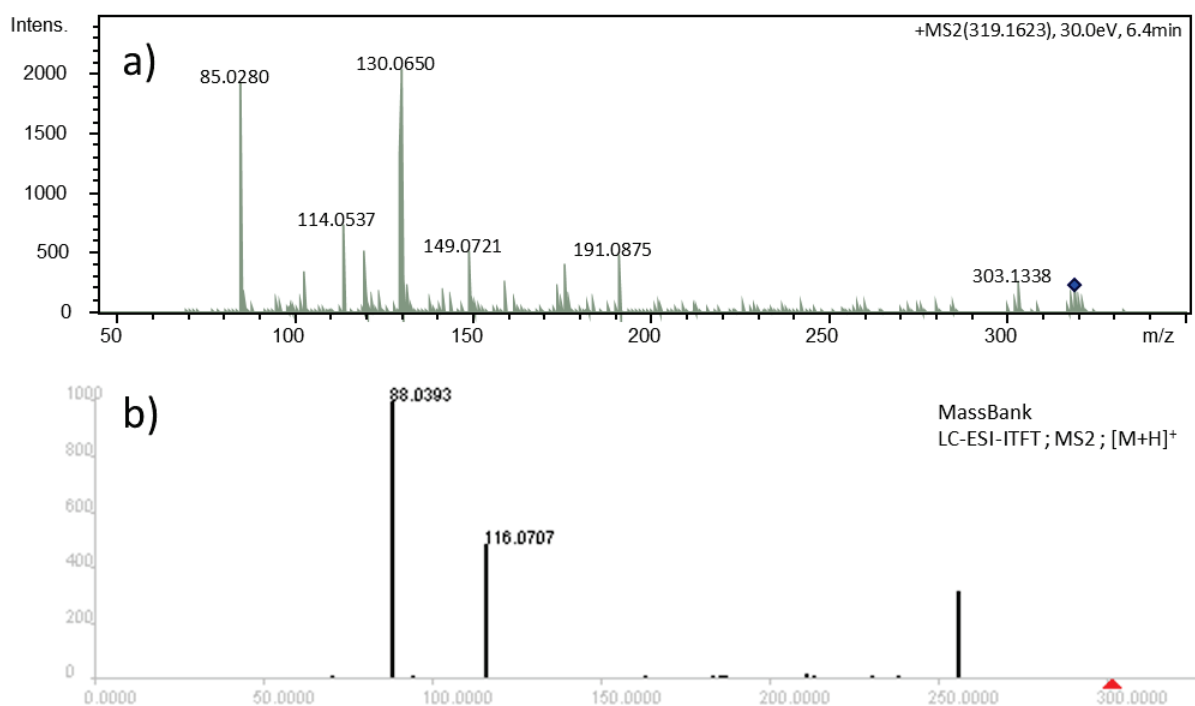


Figure IV- 9 : Spectres de fragmentation expérimental (a) et de référence (MassBank) (b) à 30 eV de la masse 319,16 Da correspondant potentiellement au fénoxycarbe

Ainsi, le MicrOTOF Q II n'a pas permis d'identifier des contaminants environnementaux dans l'échantillon d'urine d'après la base de données TracesBank.

#### IV.4.3.2.2. Impact HD

Le traitement des données est effectué différemment par rapport à celui réalisé sur les données acquises avec le MicrOTOF Q II. Pour l'Impact HD, le logiciel possède une fonction appelée « SmartFormula3D » qui permet l'utilisation d'une plate-forme de comparaison des fragments obtenus expérimentalement aux fragments déterminés *in silico* des composés ayant la même masse exacte répertoriés dans trois bases de données, qui sont Kegg, PubChem et ChemSpider. Dans ce cas, le traitement des données acquises par l'Impact HD est réalisé de façon semi-automatique avec cette plate-forme nommée MetFrag.

##### IV.4.3.2.2.1. Base de données TracesBank

Les résultats de la comparaison des données expérimentales à celles contenues dans la base de données TracesBank sont présentés dans le Tableau IV-9. Parmi les 42 substances suspectes (29 en mode d'ionisation positif et 13 en mode négatif) remplissant les critères de masse exacte et de profil isotopique, plusieurs d'entre elles sont détectées sous la même masse comme le propylparabène et l'isopropylparabène pour le mode d'ionisation positif ; ou le 2,4-ditertbutyl-phénol, le 3,5-di-tert-butylphénol, le 2,6-di-tert-butylphénol et le 4-tert-octylphénol, ainsi que le gemfibrozil et l'acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque pour le mode d'ionisation négatif. En effet, ces composés ont la même formule brute et peuvent donc être détectés sous la forme du même ion adduit, comme supposé ici. D'autres masses correspondant à des molécules potentiellement présentes dans l'échantillon sont détectées sous plusieurs pics chromatographiques comme la diosgénine et le carbofurane dans le mode d'ionisation positif et l'OP1EO dans la mode d'ionisation négatif. Ce phénomène est également observé pour l'acétaminophène dans les deux modes d'ionisation. De plus, un composé (le naugard DLTPD) est potentiellement détecté à partir de deux masses différentes correspondant à deux adduits et sous le même pic chromatographique.

Sur les 42 composés, 17 et quatre des ions parent leur correspondant, respectivement en mode d'ionisation positif et négatif ont été fragmentés avec les méthodes utilisées. Dans le cas des ions non fragmentés, ces derniers n'ont pas subi le processus de fragmentation puisqu'ils n'ont pas fait partie des trois ions les plus intenses détectés au même moment. Par conséquent, une deuxième injection en mode HRMRM serait nécessaire pour les fragmenter de façon plus sûre.

Dans le cas d'une fragmentation accomplie de l'ion défini en mode auto MS/MS, deux scénarios sont possibles : soit le spectre de fragmentation obtenu est de qualité et représentatif d'un composé et le critère est validé ; soit le spectre de fragmentation n'est pas de qualité et

représentatif d'un composé et dans ce cas le critère n'est pas validé. Un spectre de fragmentation de qualité signifie que les fragments de l'ion parent soient d'une intensité supérieure aux autres ions qui ne correspondent pas à la molécule d'intérêt. En effet, si ce n'est pas le cas le programme « SmartFormulla3D » ne pourra pas déterminer parmi tous les ions détectés sur le spectre lesquels correspondent à la fragmentation de l'ion parent d'intérêt. La comparaison aux bases de données sera impossible. Il est donc essentiel de fragmenter un ion parent d'une intensité suffisante pour obtenir des fragments avec une intensité satisfaisante.

Dans le mode d'ionisation positif, la masse 122,0964 Da correspondant potentiellement à la 2,4-diméthylaniline a été fragmentée. Le chromatogramme et le spectre de fragmentation sont présentés dans la Figure IV-10. L'ensemble des fragments et l'ion parent ont été comparés aux différentes données présentes dans les trois bases de données utilisées par MetFrag. Celles-ci ont toutes donné le score maximum de corrélation, soit 1. Ainsi, le troisième critère d'identification semble être validé pour ce composé. Cette molécule est donc identifiée de niveau (II) dans l'échantillon d'urine. Cependant, d'après la Figure IV-11, un seul fragment a été identifié comme appartenant à la 2,4-diméthylaniline. Il correspond à la masse 107,0730 Da avec une précision en masse de 14 ppm. Cette dernière correspond à un métabolite de pesticide, l'amitrazé. Ce composé a déjà été retrouvé dans des échantillons biologiques notamment le sang (Yusa *et al.*, 2015). Le volontaire a probablement été exposé à ce pesticide *via* les aliments. En effet, comme discuté dans le paragraphe III.2.1.1. du chapitre III, l'Homme est exposé aux pesticides notamment par les fruits et légumes.

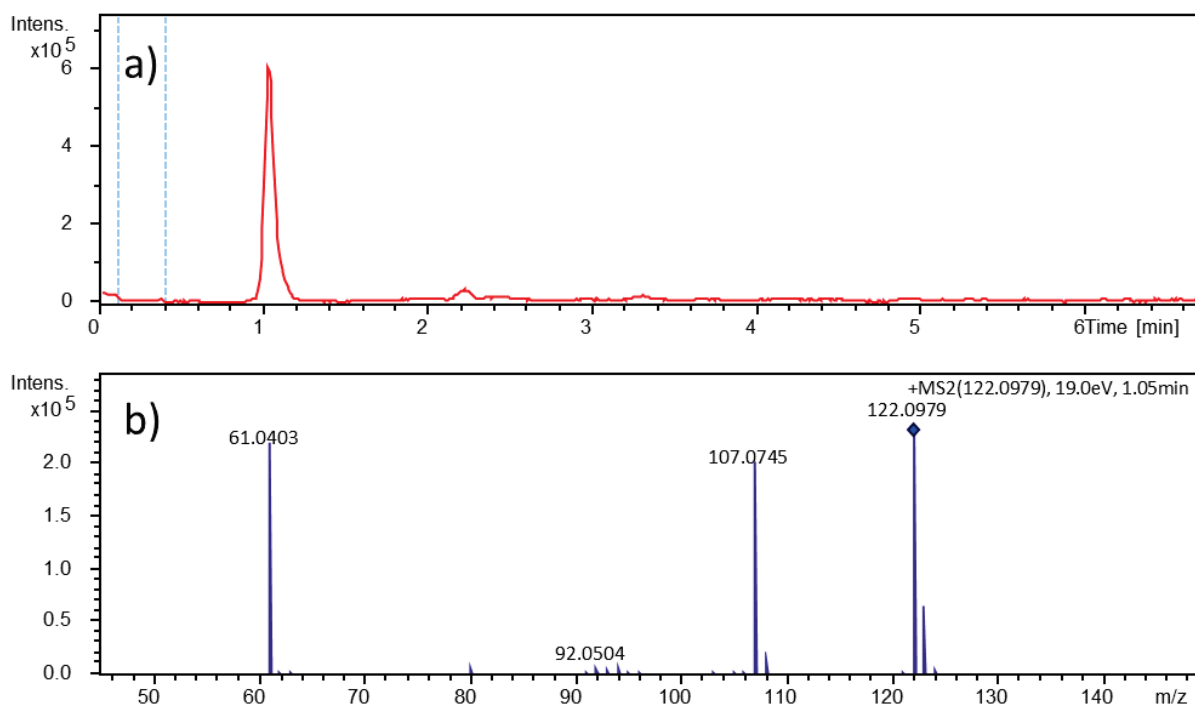


Figure IV- 10 : Chromatogramme de la masse 122,0964 Da (a) et spectres de fragmentation à 19 eV (b) du pic chromatographique à 1 min

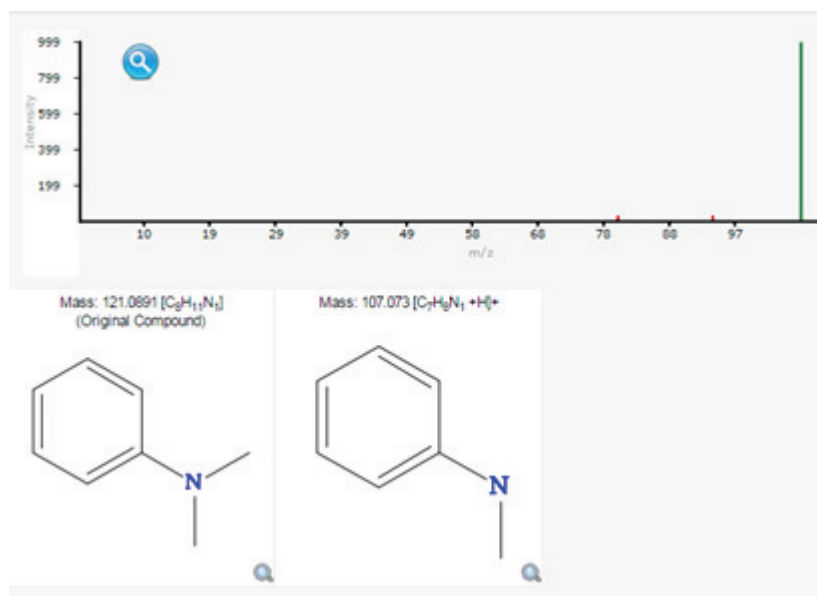


Figure IV- 11 : Spectre de masse théorique de la 2,4-diméthylaniline proposé par MetFrag et la structure de sa molécule native et son unique fragment en commun avec les données expérimentales

Pour ce qui est des autres composés suspects dont les ions parents ont été fragmentés, le critère des fragments obtenus n'a pas été rempli. En effet, soit les spectres de fragmentation obtenus n'étaient pas de qualité, soit les composés suspectés n'étaient pas référencés sur



Kegg, ChemSpider et PubChem. Ainsi, ces composés ne peuvent pas être identifiés comme potentiellement présents dans l'échantillon à partir de ces données et/ou avec cette stratégie.

Dans le mode d'ionisation négatif, le critère des fragments n'a pas été rempli pour l'ensemble des composés suspects dont la masse de l'ion caractéristique a été fragmenté, sauf pour la masse 205,1595 Da. Cette dernière correspondrait potentiellement d'après la base de données TracesBank au 2,4-ditertbutyl-phénol, 3,5-di-tert-butylphénol, 2,6-di-tert-butylphénol ou 4-tert-octylphénol. Le chromatogramme et le spectre de fragmentation sont présentés dans la Figure IV-12. La comparaison du spectre de fragmentation expérimental aux fragments de l'ensemble des composés de masse exacte 205,1595 Da répertoriés dans les bases de données déterminés par MetFrag a permis de valider ce critère d'identification pour le 4-tert-octylphénol avec un score de corrélation maximum avec la base de données Kegg et PubChem, et un score de 0,921 avec ChemSpider. D'après la Figure IV-13, trois fragments de faible masse ont été identifiés comme appartenant au 4-tert-octylphénol. Ils correspondent aux masses 69,0335 Da, 57,0335 Da et 55,0178 Da avec des précisions en masse comprises entre 21 et 35 ppm. PubChem a également corrélié le spectre expérimental au 3,5-di-tert-butylphénol avec un score de 0,737. De plus, le 4-tert-octylphénol était un des contaminants choisis pour le screening ciblé dans le chapitre III. Ainsi, le temps de rétention de ce composé est de 19,5 min sur le MicrOTOF Q II. Le temps de rétention sur l'Impact HD est proche. La différence de 1 min observée entre ces temps de rétention est probablement due au volume de délai des systèmes analytiques. Il est donc fort probable que ce composé soit le 4-tert-octylphénol. Cette molécule est donc identifiée de niveau (II) dans l'échantillon d'urine. Comme expliqué dans le paragraphe III.2.1.8. du chapitre III, ce composé est utilisé dans de nombreux objets de la vie courante. Il est donc d'autant plus difficile d'émettre des hypothèses quant à la source d'exposition de ce composé.

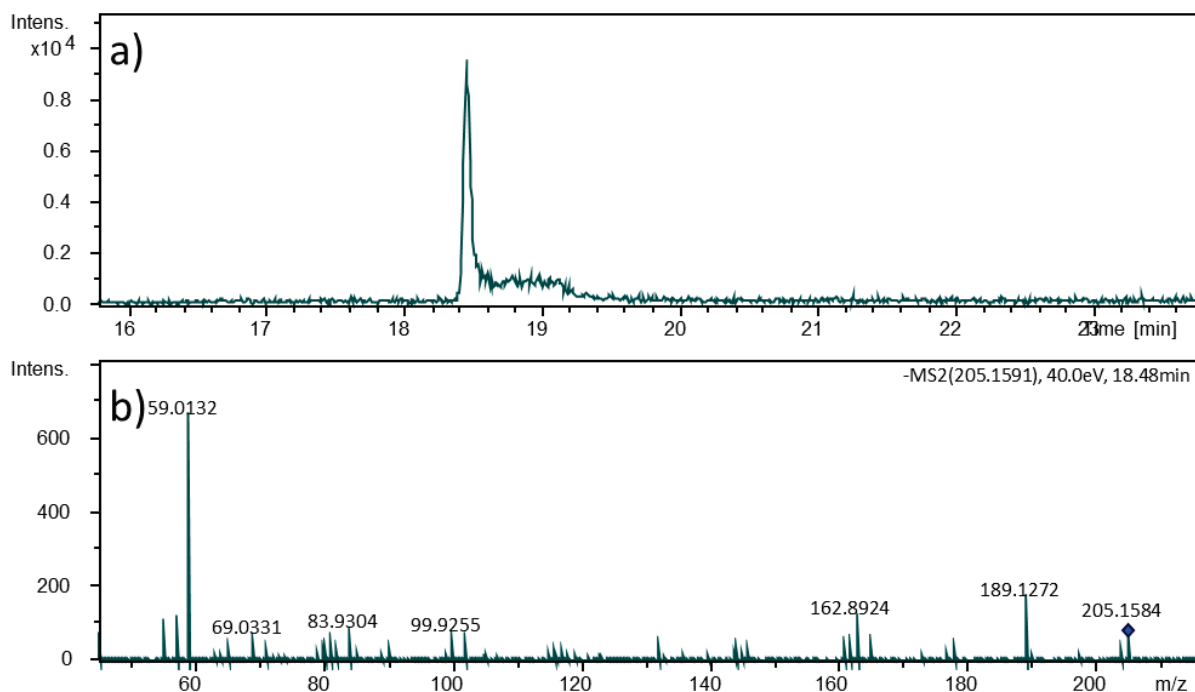


Figure IV- 12 : Chromatogramme de la masse 205,1595 Da (a) et spectre de fragmentation à 40 eV (b) du pic chromatographique à 18,5 min

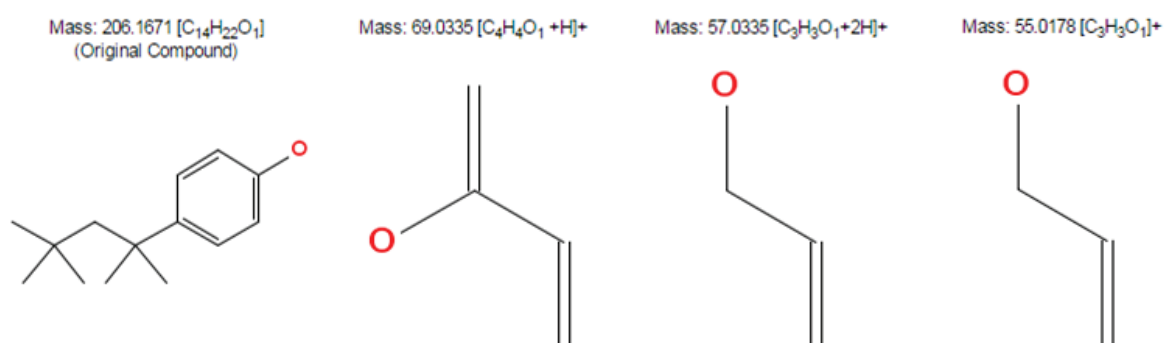


Figure IV- 13 : Structure du 4-tert-octylphénol et de ses fragments, proposés par MetFrag, en commun avec les données expérimentales

D'après la comparaison des masses des ions détectés avec l'Impact HD et celles référencées dans la base de données TracesBank, seulement un composé a rempli l'ensemble des critères d'identification de notre stratégie. Il s'agit de la 2,4-diméthylaniline qui a probablement été retrouvée dans l'urine après ingestion par le volontaire d'un aliment contaminé par la molécule mère de ce composé, un pesticide. De plus, le 4-tert-octylphénol a rempli les critères et a été identifié par les bases de données Kegg et PubChem. La source d'exposition de ce dernier composé est, quant à elle, difficile à identifier du fait que ce composé est employé dans de nombreux objets de la vie courante. Ces molécules ont donc été identifiées de niveau (II) dans l'échantillon d'urine.

Tableau IV- 9 : Composés suspectés présents dans l'échantillon d'urine analysé par l'Impact HD d'après la base de données TracesBank

m/z expérimental (Da)	Adduit	m/z calculé (Da)	m/z TracesBank (Da)	Erreur masse (ppm)	Composé suspecté	Formule brute	Déviaton profil isotopique (msigma)	Tr (min)	Fragmentation
<i>ESI positif</i>									
80,0494	M+H	79,0421	79,0422	-0,9	Pyridine	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	9,7	0,90	Non
122,0964	M+H	121,0891	121,0891	-0,2	2,4-diméthylaniline (amitrazé I)	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N	29,6	1,04	Oui
134,0599	M+H	133,0526	133,0528	-1,1	Diclofenac impurity E	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO	2,8	5,84	Non
152,0703	M+H	151,0630		-2,0	Acétaminophène	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	9,6	2,98	Non
152,0704	M+H	151,0631	151,0633	-1,4			5,1	5,34	Non
169,0970	M+NH <sub>4</sub>	151,0632		-1,0			5,4	2,26	Non
181,0855	M+H	180,0782	180,0786	-2,3	Isopropylparabène	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	9,9	3,30	Oui
					Propylparabène				
184,0968	M+NH <sub>4</sub>	166,0630	166,0630	-0,1	Ethylparabène	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	14,7	6,05	Non
195,0873	M+H	194,0800	194,0804	-1,8	Caféine	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	3,4	5,62	Non
195,1010	M+H	194,0937	194,0943	-2,9	Butylparabène	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	15,8	8,91	Non
226,0898	M+H	225,0825	225,0824	0,8	Méthiocarbe	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> S	21,7	4,96	Oui
239,1180	M+H	238,1107	238,1106	0,5	10,11 dihydroxy carba	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	25,9	5,89	Non
239,1388	M+NH <sub>4</sub>	221,1050	221,1052	-1,0	Carbofurane	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	16,8	5,76	Non
239,1392	M+NH <sub>4</sub>	221,1054		0,8			19,4	6,43	Non
251,0467	M+H	250,0394	250,0395	-0,3	Diphényl phosphate	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> P	6,4	10,55	Oui
268,1542	M+H	267,1469	267,1471	-0,5	Diethofencarbe	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	2,7	8,25	Oui
272,2008	M+NH <sub>4</sub>	254,1670	254,1671	-0,3	4-méthylbenzylidène camphre	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O	20,4	9,40	Oui
282,2792	M+H	281,2719	281,2719	0,2	Oléamide	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	6,0	10,94	Non

m/z expérimental (Da)	Adduit	m/z calculé (Da)	m/z TracesBank (Da)	Erreur masse (ppm)	Composé suspecté	Formule brute	Déviaton profil isotopique (msigma)	Tr (min)	Fragmentation
<i>ESI positif</i>									
285,1808	M+NH <sub>4</sub>	267,1470	267,1471	-0,3	Diéthofencarbe	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	1,5	7,16	Oui
288,1952	M+NH <sub>4</sub>	270,1614	270,1620	-2,2	Estrone	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	17,6	5,06	Oui
294,0905	M+NH <sub>4</sub>	276,0567	276,0569	-0,7	Sulfabenzamide	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	25,0	5,93	Non
296,2220	M+NH <sub>4</sub>	278,1882	278,1882	-0,1	OPIEO	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	26,4	9,32	Oui
302,1751	M+H	301,1678	301,1678	0,1	Dihydrocodéine	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	21,3	2,62	Oui
319,1654	M+NH <sub>4</sub>	301,1316	301,1314	0,6	Fénoxycarbe	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	23,0	5,96	Oui
327,0780	M+H	326,0707	326,0708	-0,2	Triphénylphosphate	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	15,8	9,44	Oui
356,2428	M+NH <sub>4</sub>	338,2090	338,2093	-1,0	Piperonylbutoxide	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	11,6	7,33	Oui
376,3424	M+NH <sub>4</sub>	358,3086	358,3083	0,7	Glycérol monostéarate	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	21,5	11,60	Oui
432,3468	M+NH <sub>4</sub>	414,3130		-1,0			5,9	6,92	Oui
432,3469	M+NH <sub>4</sub>	414,3131	414,3134	-0,8	Diosgénine	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub>	16,4	6,55	Non
432,3471	M+NH <sub>4</sub>	414,3133		-0,3			6,2	6,44	Non
497,2382	M+NH <sub>4</sub>	479,2044	479,2056	-2,6	Nicardipine	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	18,6	6,89	Non
515,4134	M+H	514,4061		1,1			16,1		Oui
532,4400	M+NH <sub>4</sub>	514,4062	514,4056	1,2	Naugard DLTDP	C <sub>30</sub> H <sub>58</sub> O <sub>4</sub> S	10,0	15,62	Oui
700,6285	M+NH <sub>4</sub>	682,5947	682,5934	1,9	Naugard DSTDP	C <sub>42</sub> H <sub>82</sub> O <sub>4</sub> S	8,3	21,13	Non

m/z expérimental (Da)	Adduit	m/z calculé (Da)	m/z TracesBank (Da)	Erreur masse (ppm)	Composé suspecté	Formule brute	Déviaton profil isotopique (msigma)	Tr (min)	Fragmentation
<i>ESI négatif</i>									
132,0456	M-H	133,0529	133,0528	0,8	Diclofenac impurity E	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO	4,3	1,33	Non
137,0245	M-H	138,0318	138,0317	0,6	Acide 4-hydroxybenzoïque	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	13,3	1,26	Non
150,0561	M-H	151,0634	151,0633	0,3	Acétaminophène	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	9,4	0,97	Non
150,0562	M-H	151,0635		1,0					
150,0563	M-H	151,0636		1,6					
150,0564	M-H	151,0637		2,3					
205,1233	M-H	206,1306	206,1307	-0,5	Ibuprofène	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	27,6	3,90	Non
205,1595	M-H	206,1668	206,1671	-1,4	2,4-ditertbutyl-phénol	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	12,7	18,47	Oui
					3,5-di-tert-butylphénol				
					2,6-di-tert-butylphénol				
235,1697	M-H	236,177	236,1770	-0,1	2,6-di-tert-butyl-4-méthoxyphénol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	9,8	18,16	Non
249,1492	M-H	250,1565	250,1569	-1,7	Gemfibrozil	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	14,0	9,23	Oui
					Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque				
277,1804	M-H	278,1877	278,1882	-1,9	OP1EO	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	6,2	12,54	Oui
277,1807	M-H	278,1880		-0,8				17,87	Oui
403,2483	M-H	404,2556	404,2563	-1,7	Mévinoline (= Lovastatine)	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	26,5	4,95	Non

## IV.4.3.2.2.2. Base de données DrugBank

Les résultats de la comparaison des données expérimentales à celles contenues dans la base de données DrugBank sont répertoriés dans le Tableau IV-10. Comme précédemment, parmi les 17 molécules suspectées (dix en mode d'ionisation positif et sept en mode négatif) remplissant les critères de masse exacte et de profil isotopique, deux duos de molécules (acide 4-acétamidobenzoïque et (3S)-3-hydroxy-1-méthyl-2,3-dihydro-1H-indole-5,6-dione ; métipranolol et nadolol) en mode d'ionisation positif et deux duos (p-hydroxybenzaldéhyde et acide benzoïque ; acide 4-acétamidobenzoïque et (3S)-3-hydroxy-1-méthyl-2,3-dihydro-1H-indole-5,6-dione) en mode négatif ont la même formule brute et sont détectés sous la forme du même ion adduit. Ainsi, ces derniers composés sont caractérisés par la même masse exacte et le même profil isotopique. Deux autres duos de composés en mode d'ionisation positif sont détectés selon la même masse qui correspond en revanche à des ions adduits différents (acide 4-{{(cyclohexylamino)carbonyl}amino}butanoïque et orciprenaline ; leucine - carbonyle réduit et cyclohexane).

Sur les 17 composés, seulement un des ions parent leur correspondant en mode d'ionisation positif n'a pas été fragmenté avec les méthodes utilisées. Cet ion n'a pas été fragmenté parce qu'il ne faisait pas partie des trois ions les plus intenses au moment où il a été détecté. Pour obtenir le spectre de fragmentation de cet ion, une deuxième injection en mode HRMRM serait nécessaire.

Dans le mode d'ionisation négatif, l'ion de masse 283,2636 Da correspondant potentiellement à l'acide stéarique a été fragmenté. Le chromatogramme et le spectre de fragmentation sont présentés dans la Figure IV-14. L'ensemble des fragments expérimentaux et l'ion parent ont été comparés aux fragments calculés par MetFrag des composés de masse exacte 283,2636 Da et référencés sur les trois bases de données. Celles-ci ont toutes donné le score maximum de corrélation, soit 1. Ainsi, le troisième critère d'identification semble être validé pour ce composé. D'après la Figure IV-15, cinq fragments de faible masse ont été identifiés comme appartenant à l'acide stéarique. Ils correspondent aux masses 97,0648 Da, 69,0335 Da, 59,0128 Da, 57,0335 Da et 44,9971 Da avec des précisions en masse comprises entre 8 et 33 ppm. Cette molécule est donc identifiée de niveau (II) dans l'échantillon d'urine. L'acide stéarique est utilisé dans divers produits. En effet, il agit comme liant, pigment ou agent de polymérisation dans l'industrie du caoutchouc. C'est également un composé important dans la fabrication du vernis puisqu'il joue un rôle de catalyseur en accélérant son séchage. De plus, il est employé dans les savons, les bougies en cire, les crayons de couleur

gras et dans les aliments en tant qu'additif alimentaire. Les sources d'exposition à ce composé sont donc très nombreuses.

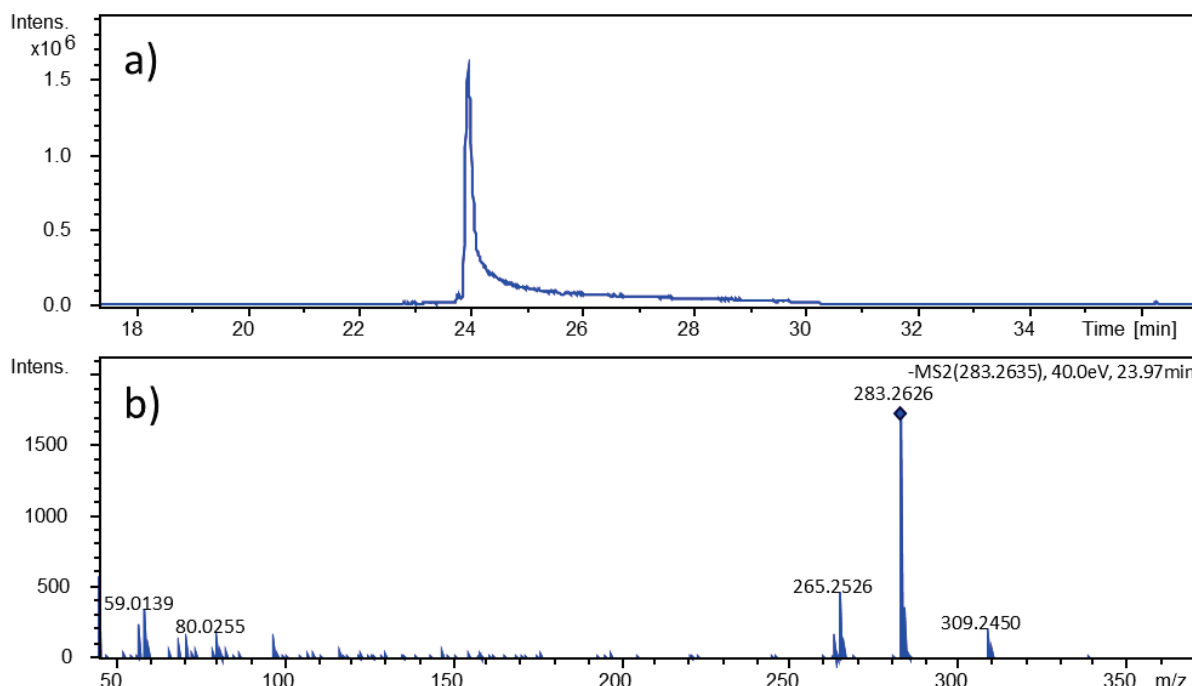


Figure IV- 14 : Chromatogramme de la masse 283,2636 Da (a) et spectre de fragmentation à 40 eV (b) du pic chromatographique à 24 min

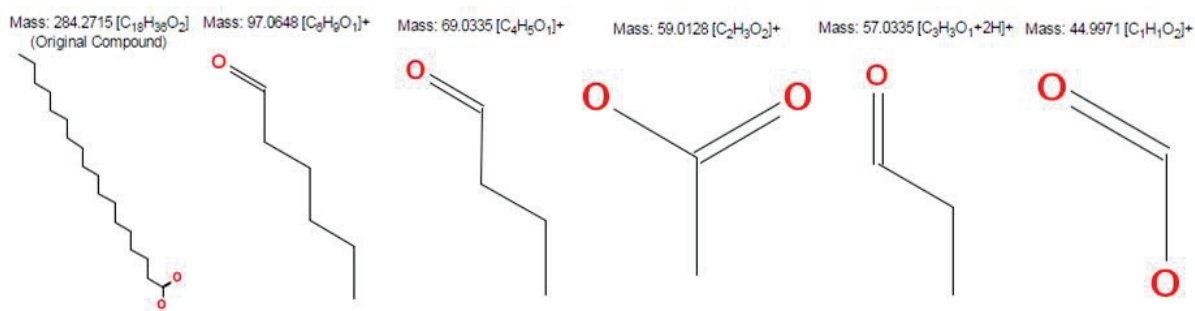


Figure IV- 15 : Structure de l'acide stéarique et de ses fragments, proposés par MetFrag, en commun avec les données expérimentales

Pour ce qui est des autres composés suspects dont leurs ions caractéristiques ont été fragmentés, leur identification n'a pas abouti. Parmi ces composés, les spectres de fragmentation de dix d'entre eux (acide 4-acétamidobenzoïque, (3S)-3-hydroxy-1-méthyl-2,3-dihydro-1H-indole-5,6-dione, orciprenaline, acide benzoïque, 4-hydroxycoumarine, acide 4-acétamidobenzoïque, (3S)-3-hydroxy-1-méthyl-2,3-dihydro-1H-indole-5,6-dione, 3-sulfoxy-1h-indole, acide palmitique et P-hydroxybenzaldéhyde) n'ont pas été identifiés comme étant caractéristiques des molécules suspectes.

Cependant, pour deux autres masses fragmentées en mode d'ionisation positif (102,1277 Da correspondant potentiellement à la leucine - carbonyle réduit ou le cyclohexane ; et 314,2326 Da correspondant potentiellement au (3R,4S,5S,7R,9E,11R,12R)-12-éthyl-4-hydroxy-3,5,7,11-tétraméthylloxacyclododec-9-ène-2,8-dione), aucune des bases de données n'a établi un lien entre le spectre de fragmentation expérimental de cette masse et les composés suspects. En effet, les bases de données ont corrélé ces spectres de fragmentation expérimentaux à d'autres composés. Par conséquent, ces résultats peuvent s'expliquer de deux façons, soit les spectres de fragmentation expérimentaux correspondent mieux à d'autres composés d'après MetFrag, soit le composé suspect n'est pas répertorié dans les trois bases de données.

Ainsi, la masse 314,2326 Da fragmentée a donné lieu à trois propositions différentes d'identification de composés selon MetFrag. Kegg propose dix composés dont un score maximal pour le 10-déoxyméthynolide. Plus de 300 composés correspondraient au spectre de fragmentation expérimental d'après ChemSpider, avec un score maximal pour l'acide 4-méthylène-5-oxo-2-undecyl tétrahydro-3-furane carboxylique. Quant à PubChem, plus de 550 composés pourraient obtenir un spectre de fragmentation similaire, avec un score maximal pour le 2-(2-méthylprop-2-énoxy)éthyle undec-10-énoate. L'ensemble de ces composés correspondent à des médicaments qui sont identifiés de niveau (II) dans l'échantillon d'urine. Le spectre de fragmentation de la masse 102,1277 Da a donné lieu à l'identification de la triéthylamine (score = 1) d'après Kegg et ChemSpider. PubChem identifie ce même composé avec un score légèrement inférieur (score = 0,978). Il est donc fort probable que ce composé soit celui correspondant à cette masse dans l'échantillon. Ainsi, cette molécule est identifiée de niveau (II) dans l'échantillon d'urine. Néanmoins, pour confirmer cette identification tous les doutes doivent être levés et d'autres critères doivent être vérifiés comme le temps de rétention avec un standard analytique de référence. La triéthylamine est un composé utilisé comme catalyseur, inhibiteur de corrosion et agent de durcissement dans différentes industries telles que celle de la chimie ou encore du caoutchouc (US EPA, 2013).

Une dernière masse fragmentée (310,2014 Da) a permis de corréler le spectre de fragmentation expérimental au composé suspect référencé dans la base de données Kegg. Il s'agit du métipranolol. Cependant, les autres bases de données n'ont pas identifié ce composé. ChemSpider a identifié l'éthyl 3-méthoxy-O-(3-méthylbutyl)tyrosinate et PubChem l'octyl 2-amino-3-(3,4-dihydroxyphényl)propanoate avec un score de corrélation maximal. Ces molécules sont utilisées en tant que médicaments et sont donc identifiées de niveau (II) dans l'échantillon d'urine. Cette différence de résultat peut s'expliquer par le fait que ces différentes bases de données ne sont pas constituées des mêmes composés. Ainsi, il est



possible que ChemSpider et PubChem ne contiennent pas le métipranolol, d'où son absence des possibilités d'identification par MetFrag avec ces bases de données.

D'après la comparaison des masses obtenues avec l'Impact HD et celles référencées dans la base de données DrugBank, seulement un composé a rempli l'ensemble des critères d'identification de notre stratégie avec les trois bases de données. Il s'agit de l'acide stéarique. Sa source d'exposition est, quant à elle, difficile à déterminer du fait que ce composé est employé dans de nombreux objets de la vie courante. De plus, un composé non suspecté d'après la comparaison avec DrugBank remplit l'ensemble des critères d'identification avec les bases de données Kegg et ChemSpider. Il s'agit de la triéthylamine qui est également utilisée dans divers produits auxquels l'Homme est confronté régulièrement. Le métipranolol suspecté présent dans l'échantillon d'urine d'après DrugBank, remplit également tous les critères d'identification avec la base de données Kegg. Cinq autres composés non suspectés ont rempli tous les critères d'identification avec une seule base de données. Il s'agit de l'éthyl 3-méthoxy-O-(3-méthylbutyl)tyrosinate, l'octyl 2-amino-3-(3,4-dihydroxyphényl)propanoate, le 10-déoxyméthynolide, l'acide 4-méthylène-5-oxo-2-undecyl tetrahydro-3-furane carboxylique et le 2-(2-méthylprop-2-enoyloxy)éthyl undec-10-enoate. Ces composés correspondent à des médicaments. Cependant, le donneur d'échantillon a déclaré ne pas avoir consommé de médicaments au cours des trois derniers mois avant la collecte. Il est donc probable que le volontaire ait été exposé à une source contaminée par ces composés comme l'eau ou les aliments. Ainsi, huit composés sont suspectés être présents dans l'urine avec les trois critères d'identification vérifiés. Ces derniers sont identifiés de niveau (II) dans l'échantillon d'urine.

Tableau IV- 10 : Composés suspectés présents dans l'échantillon d'urine analysé par l'Impact HD d'après la recherche dans la base de données DrugBank avec des signaux d'intensité > 10<sup>6</sup> coups

m/z expérimental (Da)	Adduit	m/z calculé (Da)	m/z DrugBank (Da)	Erreur masse (ppm)	Composé suspecté	Formule brute	Déviaton profil isotopique (mσigma)	Fragmentation
<i>ESI positif</i>								
102,1277	M+H	101,1204	101,1204	-0,3	Leucine - carbonyle réduit	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N	1,7	Oui
	M+NH <sub>4</sub>	84,0939	84,0939	-0,3	Cyclohexane	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>		
180,0651	M+H	179,0578	179,0582	-2,3	Acide 4-acétamidobenzoïque (3S)-3-hydroxy-1-méthyl-2,3-dihydro-1H-indole-5,6-dione	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	3,4	Oui
	M+NH <sub>4</sub>	162,0313	162,0317	-2,6	4-hydroxycoumarine	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		
229,1548	M+H	228,1475	228,1474	0,6	Acide 4-{{(cyclohexylamino)carbonyl}amino}butanoïque	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8,2	Non
	M+NH <sub>4</sub>	211,1210	211,1208	0,6	Orciprénaline	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	6,5	
310,2014	M+H	309,1941	309,1940	0,4	Métipranolol	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>	22,0	Oui
					Nadolol			
314,2326	M+NH <sub>4</sub>	296,1988	296,1988	0,1	(3R,4S,5S,7R,9E,11R,12R)-12-éthyl-4-hydroxy-3,5,7,11-tétraméthylloxacyclodéc-9-ène-2,8-dione	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	14,7	Oui
<i>ESI négatif</i>								
121,0297	M-H	122,0370	122,0368	1,6	P-hydroxybenzaldéhyde	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	11,1	Oui
					Acide benzoïque			
178,0509	M-H	179,0582	179,0582	-0,4	Acide 4-acétamidobenzoïque	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	1,3	Oui
					(3S)-3-hydroxy-1-méthyl-2,3-dihydro-1H-indole-5,6-dione			
212,0023	M-H	213,0096	213,0096	0,0	3-Sulfooxy-1h-indole	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> S	6,9	Oui
255,2326	M-H	256,2399	256,2402	-1,4	Acide palmitique	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	3,5	Oui
283,2636	M-H	284,2709	284,2715	-2,3	Acide stéarique	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	3,6	Oui

#### IV.4.3.3. Comparaison des résultats obtenus avec le MicrOTOF Q II et l'Impact HD

Les résultats obtenus pour les composés suspectés présents dans l'échantillon d'urine sont différents d'un spectromètre de masse à l'autre. En effet, le MicrOTOF Q II a permis de détecter deux composés avec les trois critères d'identification, qui sont la théobromine et l'acide caféique. En revanche, l'Impact HD n'a pas permis de détecter ces mêmes composés mais dix autres avec les trois critères d'identification remplis sur au moins une base de données de comparaison des fragments. Ces composés sont listés dans le Tableau IV-11.

Tableau IV- 11 : Résumé des différents composés suspectés présents dans l'échantillon analysé par l'Impact HD d'après les fragments

Bases de données pour comparaison spectre de fragmentation	Impact HD		
	Kegg	ChemSpider	PubChem
DrugBank (Base de données pour comparaison masse exacte)			
Triéthylamine	x	x	x* Score = 0,978
Métipranolol	x		
Ethyl 3-méthoxy-O-(3-méthylbutyl)tyrosinate		x	
Octyl 2-amino-3-(3,4-dihydroxyphényl)propanoate			x
10-déoxyméthynolide	x		
Acide 4-méthylène-5-oxo-2-undecyl tétrahydro-3-furane carboxylique		x	
2-(2-méthylprop-2-enoyloxy)éthyl undec-10-enoate			x
Acide stéarique	x	x	x
TracesBank (Base de données pour comparaison masse exacte)			
4-tert-octylphénol	x	x* Score = 0,921	x
2,4-diméthylaniline	x	x	x

Pour X score = 1

Les différences notables de résultats peuvent s'expliquer de différentes façons. Tout d'abord, l'échantillon injecté sur les différents spectromètres de masse provient du même donneur. Il a été prélevé au même moment. Cependant, l'échantillon analysé par le MicrOTOF Q II correspond à de l'urine concentrée 200 fois par SPE, celle-ci a donc subi une étape de préparation d'échantillon. En effet, comme présenté dans le paragraphe IV.4.1, afin de visualiser le plus de molécules sur le MicrOTOF Q II, il est nécessaire de concentrer

l'échantillon au maximum. En revanche, l'échantillon analysé sur l'Impact HD n'a subi aucun processus de préparation d'échantillon. Ainsi, l'échantillon d'urine concentrée a pu engendrer des effets de matrice différents de celui qui a été analysé sans préparation d'échantillon préalable. De plus, les procédures d'analyse, notamment les étapes de préparation d'échantillon, sont différentes avec ces deux systèmes puisque leurs performances analytiques sont également différentes. Ainsi, la deuxième explication aux différences de résultats est liée à l'appareillage. L'Impact HD est plus performant que le MicrOTOF Q II en termes de résolution, sensibilité et précision. En effet, il correspond à un spectromètre de masse haute résolution de génération plus récente que le MicrOTOF Q II. De plus, le traitement de ses données est réalisé avec un logiciel comprenant de nouvelles fonctions simplifiant le traitement des données pour l'identification de composés inconnus, notamment « SmartFormulla3D ». Cette dernière permet la consultation de trois bases de données *via* MetFrag de façon semi-automatique, ce qui engendre un gain de temps considérable. Néanmoins, ces bases de données sont prédéfinies par la plate-forme, ce qui amène à la dernière explication. Celle-ci implique les différentes bases de données utilisées pour la vérification du critère des fragments. En effet, MassBank a été utilisé pour les données acquises avec le MicrOTOF Q II et Kegg, ChemSpider et PubChem pour celles acquises avec l'Impact HD. En effet, les bases de données ne contiennent pas les mêmes composés et ne sont pas complètes, d'où les variantes au niveau des résultats.

#### IV.5. Conclusion et perspectives

Un screening non ciblé de l'urine sur deux systèmes analytiques avec des spectromètres de masse de spécificités analytiques différentes, le spectromètre de masse utilisé dans le chapitre III, le MicrOTOF Q II, et l'Impact HD, a été réalisé avec les méthodes développées dans le chapitre III. Une stratégie analytique a été choisie pour le traitement des données acquises avec chacun des deux systèmes. De plus, le protocole de traitement d'échantillon permettant de visualiser le maximum d'information a également été déterminé.

La stratégie de traitement des données développée dans ce chapitre a permis d'identifier 12 composés de niveau (II). En effet, les trois critères d'identification, à savoir, la masse exacte, le profil isotopique et les similitudes spectrales avec les bases de données ont été validés pour ces composés. Ces derniers correspondent à des médicaments, des composés présents naturellement ou non dans les aliments, un métabolite de pesticide et des molécules très utilisées dans divers domaines et en contact régulier avec l'Homme. Si la présence de ces médicaments est confirmée par des analyses supplémentaires, ils ont été ingérés de façon

involontaire par le donneur, qui a déclaré ne pas avoir consommé ces substances au cours des derniers mois. Cependant, afin de confirmer la présence et donc l'identification de ces molécules dans l'urine, les standards analytiques leur correspondant sont nécessaires, de même qu'une étude structurale complémentaire, comme le fractionnement suivi d'une analyse par RMN.

Cette étude a également permis de mettre en évidence les différences de résultats obtenus selon les spécificités du spectromètre de masse et selon les bases de données utilisées pour la vérification des similitudes spectrales. En effet, ces dernières manquent d'uniformité et doivent être complétées. De plus, la disponibilité de logiciels de traitement de données, afin de vérifier la masse exacte et le profil isotopique de façon automatique pour tous les spectromètres de masse, permettrait un gain de temps considérable. Enfin, la mise en place de normes pour le choix des critères d'identification et la tolérance d'acceptation des mesures est un réel besoin.

## **Références bibliographiques**



- Bonfiglio, R., King, R.C., Olah, T.V., Merkle, K., 1999. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* 13, 1175–1185. doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19990630)13:12<1175::AID-RCM639>3.0.CO;2-0
- Broecker, S., Herre, S., Pragst, F., 2012. General unknown screening in hair by liquid chromatography–hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC–QTOF-MS). *Forensic Sci. Int., Proceedings of the Society of Hair Testing (SoHT) annual meeting in Chamonix (21-26 March 2011)*. 218, 68–81. doi:10.1016/j.forsciint.2011.10.004
- Bu, Q., Luo, Q., Wang, D., Rao, K., Wang, Z., Yu, G., 2015. Screening for over 1000 organic micropollutants in surface water and sediments in the Liaohe River watershed. *Chemosphere* 138, 519–525. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.07.013
- Celano, R., Rodríguez, I., Cela, R., Rastrelli, L., Piccinelli, A.L., 2014. Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry quantification and screening of organophosphate compounds in sludge. *Talanta* 118, 312–320. doi:10.1016/j.talanta.2013.10.024
- ChemSpider [WWW Document], 2015. URL <http://www.chemspider.com/>
- Chen, J., Ge, Z.-Z., Zhu, W., Xu, Z., Li, C.-M., 2014. Screening of key antioxidant compounds of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract by combining online fishing/knockout, activity evaluation, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, and high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry methods. *J. Agric. Food Chem.* 62, 9744–9750. doi:10.1021/jf502995z
- David, A., Abdul-Sada, A., Lange, A., Tyler, C.R., Hill, E.M., 2014. A new approach for plasma (xeno)metabolomics based on solid-phase extraction and nanoflow liquid chromatography–nanoelectrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1365, 72–85. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.001
- Domínguez-Romero, J.C., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., 2014. Comparative evaluation of seven different sample treatment approaches for large-scale multiclass sport drug testing in urine by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1361, 34–42. doi:10.1016/j.chroma.2014.07.090
- DrugBank [WWW Document], 2015. URL <http://www.drugbank.ca/>
- Fernández-Peralbo, M.A., Luque de Castro, M.D., 2012. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 41, 75–85. doi:10.1016/j.trac.2012.08.011
- Fu, Q., Zhang, C., Lin, Z., Sun, H., Liang, Y., Jiang, H., Song, Z., Wang, H., Chen, S., 2016. Rapid screening and identification of compounds with DNA-binding activity from *Folium Citri Reticulatae* using on-line HPLC–DAD–MSn coupled with a post column fluorescence detection system. *Food Chem.* 192, 250–259. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.009
- González-Domínguez, R., Castilla-Quintero, R., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., 2014. Development of a metabolomic approach based on urine samples and direct infusion mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 465, 20–27. doi:10.1016/j.ab.2014.07.016
- Hasegawa, M., Takenaka, S., Kuwamura, M., Yamate, J., Tsuyama, S., 2007. Urinary metabolic fingerprinting for amiodarone-induced phospholipidosis in rats using FT-ICR MS. *Exp. Toxicol. Pathol.* 59, 115–120. doi:10.1016/j.etp.2007.04.001
- Heuett, N.V., Batchu, S.R., Gardinali, P.R., 2015. Understanding the magnitude of emergent contaminant releases through target screening and metabolite identification using high resolution mass spectrometry: Illicit drugs in raw sewage influents. *J. Hazard. Mater., Advances in Analysis, Treatment Technologies, and Environmental Fate of Emerging Contaminants* 282, 41–50. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.08.009
- HMDB [WWW Document], 2015. URL <http://www.hmdb.ca/>



- Jia, W., Chu, X., Chang, J., Zhang, F., 2015. High-throughput screening of vitamins and natural antioxidants in nutraceuticals from green tea extracts by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1406, 337–341. doi:10.1016/j.chroma.2015.06.050
- Jiménez Girón, A., Deventer, K., Roels, K., Van Eenoo, P., 2012. Development and validation of an open screening method for diuretics, stimulants and selected compounds in human urine by UHPLC–HRMS for doping control. *Anal. Chim. Acta* 721, 137–146. doi:10.1016/j.aca.2012.02.002
- Katakura, A., Yamamoto, N., Sakuma, T., Sugahara, K., Onda, T., Noguchi, S., Shibahara, T., 2015. A screening test for oral cancer using saliva samples: Proteomic analysis of biomarkers in whole saliva. *J. Oral Maxillofac. Surg. Med. Pathol.* 27, 1–5. doi:10.1016/j.ajoms.2013.05.013
- KEGG [WWW Document], 2015. URL <http://www.genome.jp/kegg/>
- Kioussi, M.K., Lyris, E.M., Angelis, Y.S., Tsviou, M., Koupparis, M.A., Georgakopoulos, C.G., 2013. A generic screening methodology for horse doping control by LC–TOF-MS, GC–HRMS and GC–MS. *J. Chromatogr. B* 941, 69–80. doi:10.1016/j.jchromb.2013.10.008
- Lai, F.Y., Erratico, C., Kinyua, J., Mueller, J.F., Covaci, A., van Nuijs, A.L.N., 2015. Liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for screening in vitro drug metabolites in humans: investigation on seven phenethylamine-based designer drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 114, 355–375. doi:10.1016/j.jpba.2015.06.016
- la Marca, G., 2014. Mass spectrometry in clinical chemistry: the case of newborn screening. *J. Pharm. Biomed. Anal., JPBA Reviews* 2014 101, 174–182. doi:10.1016/j.jpba.2014.03.047
- López, M.G., Fussell, R.J., Stead, S.L., Roberts, D., McCullagh, M., Rao, R., 2014. Evaluation and validation of an accurate mass screening method for the analysis of pesticides in fruits and vegetables using liquid chromatography–quadrupole-time of flight–mass spectrometry with automated detection. *J. Chromatogr. A* 1373, 40–50. doi:10.1016/j.chroma.2014.10.099
- MassBank [WWW Document], 2015. URL <http://www.massbank.jp/en/about.html> (accessed 8.21.15).
- Mazzarino, M., Cesarei, L., de la Torre, X., Fiacco, I., Robach, P., Botrè, F., 2015. A multi-targeted liquid chromatography–mass spectrometry screening procedure for the detection in human urine of drugs non prohibited in sport commonly used by the athletes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, 47–60. doi:10.1016/j.jpba.2015.08.007
- Mesfioui, R., Love, N.G., Bronk, D.A., Mulholland, M.R., Hatcher, P.G., 2012. Reactivity and chemical characterization of effluent organic nitrogen from wastewater treatment plants determined by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Water Res.* 46, 622–634. doi:10.1016/j.watres.2011.11.022
- MetFrag [WWW Document], 2015. URL <http://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/>
- Musenga, A., Cowan, D.A., 2013. Use of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for fast screening in high throughput doping control. *J. Chromatogr. A* 1288, 82–95. doi:10.1016/j.chroma.2013.03.006
- Odoardi, S., Fisichella, M., Romolo, F.S., Strano-Rossi, S., 2015. High-throughput screening for new psychoactive substances (NPS) in whole blood by DLLME extraction and UHPLC–MS/MS analysis. *J. Chromatogr. B* 1000, 57–68. doi:10.1016/j.jchromb.2015.07.007
- Plassmann, M.M., Brack, W., Krauss, M., 2015. Extending analysis of environmental pollutants in human urine towards screening for suspected compounds. *J. Chromatogr. A* 1394, 18–25. doi:10.1016/j.chroma.2015.03.040
- PubChem [WWW Document], 2015. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Riemer, J.A., 1994. United States Patent: 5336513 - Bitterness inhibitors. 5336513.
- Shi, F., Guo, C., Gong, L., Li, J., Dong, P., Zhang, J., Cui, P., Jiang, S., Zhao, Y., Zeng, S., 2014. Application of a high resolution benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the rapid screening, confirmation and quantification of illegal adulterated phosphodiesterase-5

- inhibitors in herbal medicines and dietary supplements. *J. Chromatogr. A* 1344, 91–98. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.030
- Spínola, V., Pinto, J., Castilho, P.C., 2015. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food Chem.* 173, 14–30. doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.163
- Strano-Rossi, S., Odoardi, S., Fisichella, M., Anzillotti, L., Gottardo, R., Tagliaro, F., 2014. Screening for new psychoactive substances in hair by ultrahigh performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1372, 145–156. doi:10.1016/j.chroma.2014.10.106
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reily, M.D., Thaden, J.J., Viant, M.R., 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc.* 3, 211–221. doi:10.1007/s11306-007-0082-2
- Sumner, L.W., Lei, Z., Nikolau, B.J., Saito, K., Roessner, U., Trengove, R., 2014. Proposed quantitative and alphanumeric metabolite identification metrics. *Metabolomics* 10, 1047–1049. doi:10.1007/s11306-014-0739-6
- Tao, J., Zhao, M., Wang, D., Yang, C., Chen, G., Zhao, X., Pu, X., Jiang, S., 2015. UPLC-Q-TOF/MS-based screening and identification of two major bioactive components and their metabolites in normal and CKD rat plasma, urine and feces after oral administration of *Rehmannia glutinosa* Libosch extract. *J. Chromatogr. B* 1001, 98–106. doi:10.1016/j.jchromb.2015.07.035
- US EPA, 2013. Triethylamine | Technology Transfer Network Air Toxics Web site | US EPA [WWW Document]. URL <http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/tri-lami.html> (accessed 8.18.15).
- Wolf, S., Schmidt, S., Müller-Hannemann, M., Neumann, S., 2010. In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. *BMC Bioinformatics* 11, 148–160. doi:10.1186/1471-2105-11-148
- Wu, H., Li, X., Yan, X., An, L., Luo, K., Shao, M., Jiang, Y., Xie, R., Feng, F., 2015. An untargeted metabolomics-driven approach based on LC-TOF/MS and LC-MS/MS for the screening of xenobiotics and metabolites of Zhi-Zi-Da-Huang decoction in rat plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 115, 315–322. doi:10.1016/j.jpba.2015.07.026
- Wu, Y., Bi, Y., Bingga, G., Li, X., Zhang, S., Li, J., Li, H., Ding, S., Xia, X., 2015. Metabolomic analysis of swine urine treated with  $\beta$ 2-agonists by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1400, 74–81. doi:10.1016/j.chroma.2015.04.050
- Yan, Z., Wang, W., Zhou, J., Yi, X., Zhang, J., Wang, X., Liu, Z., 2015. Screening of high phytotoxicity priority pollutants and their ecological risk assessment in China's surface waters. *Chemosphere* 128, 28–35. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.01.015
- Yin, P., Xu, G., 2014. Current state-of-the-art of nontargeted metabolomics based on liquid chromatography–mass spectrometry with special emphasis in clinical applications. *J. Chromatogr. A* 1374, 1–13. doi:10.1016/j.chroma.2014.11.050
- Yusa, V., Millet, M., Coscolla, C., Pardo, O., Roca, M., 2015. Occurrence of biomarkers of pesticide exposure in non-invasive human specimens. *Chemosphere* 139, 91–108. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.05.082
- Zhang, L., Luo, X., Niu, Z., Ye, X., Tang, Z., Yao, P., 2015. Rapid screening and identification of multi-class substances of very high concern in textiles using liquid chromatography-hybrid linear ion trap orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1386, 22–30. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.077



# **Conclusion générale**



Le principal objectif de cette étude était de développer des méthodes analytiques, basées sur la spectrométrie de masse, dans le cadre de l'évaluation de l'Exposome. Pour ce faire, trois stratégies ont été explorées et comparées, à savoir, l'analyse multirésidus ciblée, le screening ciblé et le screening non ciblé.

Dans un premier temps, les recherches bibliographiques ont permis de mettre en évidence les outils et les stratégies nécessaires à l'évaluation de l'Exposome, ainsi que le manque, à l'heure actuelle, de lignes directrices à ce sujet. C'est à partir de cet état de l'art que les stratégies épidémiologiques et analytiques ont été choisies pour notre étude.

Le travail portant sur l'analyse multirésidus ciblée a permis de mettre au point des méthodes d'extraction de type SBSE d'une famille de contaminants environnementaux, les additifs plastiques, suivie d'une analyse par UHPLC-MS/MS. Différents monomères ont permis l'élaboration de trois types de phases d'extraction SBSE. Toutes les étapes de fabrication des barreaux et d'extraction ont été optimisées. Ces méthodes ont permis l'obtention de rendements d'extraction jusqu'à 90 % dans l'eau et l'urine avec les barreaux les plus performants, les BAWs. De plus, une première évaluation des extractions avec des barreaux commerciaux a mis en évidence les similitudes au niveau des performances d'extraction avec nos barreaux artisanaux, permettant d'envisager un élargissement de la gamme de substances potentiellement extractibles par cette technique.

La seconde approche envisagée était le screening de l'urine humaine par HPLC-HRMS. Les travaux menés étaient axés sur le screening ciblé d'une soixantaine de contaminants environnementaux, appartenant à diverses familles chimiques, dans l'urine brute par injection directe. Par conséquent, nous avons développé, optimisé et validé deux méthodes d'analyse pour la détection de ces composés d'intérêt et la quantification de 23 d'entre eux à des niveaux de concentration de l'ordre du  $\text{ng.mL}^{-1}$ . L'application de ces méthodes à des échantillons d'urines de volontaires a permis de mettre en évidence que des contaminants environnementaux étaient bien présents dans l'urine humaine. En parallèle, un screening semi ciblé a permis d'identifier le paracétamol comme contaminant environnemental dans l'échantillon d'urine d'un volontaire. L'application de ces méthodes à des échantillons de différentes cohortes permettra de corrélérer les résultats à divers paramètres comme le lieu géographique d'habitation, l'âge ou encore le type d'alimentation.

Finalement des travaux relatifs au screening non ciblé de l'urine humaine par HPLC-HRMS ont été menés avec deux spectromètres de masse hybrides de performances

analytiques différentes (en collaboration avec Bruker Daltonics®). Les résultats obtenus ont permis d'identifier 12 molécules de niveau (II) dans l'échantillon et de mettre en évidence les limitations de cette stratégie, en particulier le manque de normes et de directives, notamment en termes du choix des critères d'identification et de leur seuil de tolérance. De plus, dans notre cas, l'identification des composés s'est appuyée sur les bases de données spectrales, qui nécessitent d'être complétées et uniformisées. Le développement de logiciels de traitement automatique des données permettrait également une avancée dans cette étape longue et fastidieuse au regard de l'analyste. La comparaison des résultats obtenus avec les deux spectromètres de masse a aussi permis de montrer que les performances de l'appareillage pouvaient être un paramètre limitant dans l'identification de composés.

Ainsi, nous avons mis en évidence les avantages et les inconvénients de chacune des stratégies analytiques développées dans ces travaux. Chacune d'elle est à employer pour des objectifs différents. Cependant, elles sont complémentaires pour l'évaluation de l'Exposome. En effet, l'analyse multirésidus ciblée permet la quantification de composés présents à l'état de traces dans des matrices complexes, avec une préparation d'échantillon spécifique à la famille de composés. Les méthodes développées dans cette thèse et basées sur le screening utilisant un système HPLC-HRMS montrent l'intérêt d'un tel système pour réaliser simultanément un screening ciblé et non ciblé de l'urine par injection directe. En effet, nous avons pu détecter les contaminants environnementaux d'intérêt et quantifier certains d'entre eux. En parallèle, ces méthodes ont permis d'identifier un composé considéré comme un contaminant environnemental dans l'urine d'un des volontaires par screening semi ciblé ; et plusieurs composés d'après les bases de données spectrales par screening non ciblé. Pour le screening non ciblé, des limitations liées au niveau de l'appareillage ont été mises en évidence, nous contraignant à ajouter une étape de préparation d'échantillon afin de concentrer l'urine.

Les trois stratégies analytiques développées et discutées dans ce manuscrit permettent d'avancer vers une évaluation des expositions humaines environnementales. Cependant, l'étude de l'Exposome nécessite une approche multidisciplinaire. En effet, l'exposomique est étroitement liée à la science de l'exposition, l'épidémiologie, la biologie, la chimie analytique, les statistiques et la bio-informatique. De plus, de nombreux défis subsistent comme l'élaboration de bases de données complètes et uniformisées, des directives générales pour la stratégie et le déroulement de l'évaluation de l'Exposome d'un individu et des normes pour l'identification de composés. Dans cette thèse, les deux stratégies analytiques (ciblée et non ciblée) nécessaires à l'étude de l'Exposome ont été explorées. Au niveau épidémiologique,

seule la stratégie « top-down » a été étudiée. Afin de réaliser une évaluation globale de l'Exposome, la stratégie « bottom-up » doit également être utilisée dans le but d'identifier les sources d'exposition, de contamination, auxquelles l'Homme est confronté au quotidien, et lesquelles peuvent avoir de graves conséquences. Ainsi, de cette façon, les expositions jugées dangereuses par les épidémiologistes pourront être limitées tout en réalisant de la surveillance biologique. Cette stratégie comporte des défis, notamment par l'échantillonnage des nombreuses sources d'expositions auxquelles nous sommes soumis. La caractérisation des expositions humaines environnementales, par l'évaluation de l'Exposome, est donc difficile à établir et de nombreuses études pourraient voir le jour en vue de répondre à cette problématique actuelle et future. En effet, cette dernière possède un enjeu sociétal souligné par les objectifs du troisième plan national santé-environnement, le plan cancer 2014-2019 et les projets consacrés à l'étude de l'Exposome comme the human Exposome project.





# **Annexes**



Annexe : Résultats de l'optimisation de l'extraction SBSE avec des barreaux artisanaux et de l'application à un échantillon d'urine

Tous les rendements d'extraction avec des valeurs de CV pour les extractions « dopés avant » et les extractions « dopés après » inférieures ou égales à 30 % sont surlignés en vert ; comprises entre 31 et 50 % en orange ; supérieures à 50 % en blanc.

Tableau A- 1 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAB (n=3)

CV < 30 %	BAB					
31 % < CV < 50 %	Acétone distillé		ACN distillé		MeOH distillé	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	1,2	100	0,7	87	1,1	87
Cyasorb UV 9	83,1	10	64,6	5	66,8	18
Triphénylphosphate	78,8	14	57,6	27	2025,7	86
Hostanox 03	20,3	48	8,7	29	5,5	15
Oléamide	68,0	6	80,5	14	76,5	8
Chimassorb 81	34,2	29	29,4	14	29,6	27
Glycérol monostéarate	60,0	69	49,1	48	189,3	49
Isonox 129	15,0	108	30,5	26	14,3	6
Tinuvin 326	31,4	70	31,1	12	26,5	4
Irganox 3114	25,1	73	13,2	74	226,9	68
Tinuvin 327	24,2	36	26,4	21	17,0	20
Tinuvin 328	23,5	31	25,7	24	17,0	5
Vitamine E	41,3	14	74,4	20	32,0	18
Irganox 1010	17,9	85	27,3	13	190,0	9
Irganox 1330	15,4	83	18,1	10	10,5	34
Naugard DLTDP	21,2	54	20,8	22	16,5	12
Irganox 1076	109,1	54	73,4	62	61,4	11
Irgafos 168	72,3	21	36,6	28	14,6	23
Naugard DSTDP	30,0	77	105,7	32	26,9	29
Diphényl phosphate	0,6	34	0,7	10	4,3	42
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	74,0	38	57,6	16	14,5	32
2,4-di-tertbutyl-phénol	22,6	57	24,9	23	14,9	24

Tableau A- 2 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 1 (n=3)

CV < 30 %	BAW 1					
31 % < CV < 50 %	ACN distillé		MeOH distillé		Acétone distillé	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	26,8	23	15,0	22	28,9	10
Cyasorb UV 9						
Triphénylphosphate	88,7	6	81,2	32	86,6	4
Hostanox 03	43,7	27	48,2	46	51,9	45
Oléamide	101,2	4	117,0	11	100,3	8
Chimassorb 81	88,2	4	94,6	5	82,5	21
Glycérol monostéarate	85,6	38	111,4	12	117,9	20
Isonox 129	36,8	32	49,4	26	44,3	18
Tinuvin 326	71,8	5	59,0	17	79,3	5
Irganox 3114	42,7	11	77,0	31	62,6	17
Tinuvin 327	49,5	6	53,3	14	59,3	11
Tinuvin 328	57,5	7	52,9	18	58,4	22
Vitamine E	89,9	7	89,4	34	86,9	21
Irganox 1010	76,4	5	76,5	23	66,6	9
Irganox 1330	44,8	8	49,5	27	58,3	15
Naugard DLTDP	48,0	11	55,6	41	56,3	18
Irganox 1076	67,4	21	83,1	14	78,3	22
Irgafos 168	25,6	7	35,2	17	16,4	34
Naugard DSTDP	81,2	38	128,0	18	73,0	17
Diphényl phosphate	1,8	26	3,3	25	2,2	7
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	111,2	6	105,2	11	95,5	2
2,4-ditertbutyl-phénol	45,6	18	58,0	6	37,7	12

Tableau A- 3 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 2 (n=3)

CV < 30 %	BAW 2					
31 % < CV < 50 %	Acétone distillé		MeOH distillé		ACN distillé	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	2,0	47	6,5	42	2,9	16
Cyasorb UV 9	86,9	1	63,9	3	68,1	3
Triphénylphosphate	87,8	2	63,7	4	68,3	8
Hostanox 03	31,0	24	28,9	29	23,1	27
Oléamide	106,0	14	79,7	11	89,6	8
Chimassorb 81	69,4	18	51,3	9	52,3	19
Glycérol monostéarate	156,4	94	73,8	66	121,3	42
Isonox 129	56,0	69	49,6	27	30,4	20
Tinuvin 326	70,9	26	57,9	8	52,6	7
Irganox 3114	49,0	47	45,0	40	32,8	13
Tinuvin 327	61,3	15	48,7	12	36,4	38
Tinuvin 328	62,5	14	46,3	23	33,4	33
Vitamine E	71,8	17	74,2	20	124,3	9
Irganox 1010	64,7	20	36,8	14	34,9	22
Irganox 1330	51,5	27	38,3	30	30,7	43
Naugard DLTPD	55,9	13	42,3	21	40,8	20
Irganox 1076	96,7	22	78,1	28	61,4	37
Irgafos 168	30,3	115	25,5	35	20,4	28
Naugard DSTDP	77,1	20	124,6	13	142,3	7
Diphényl phosphate	0,9	44	2,8	24	1,0	8
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	61,5	10	50,2	5	45,0	11
2,4-di-tertbutyl-phénol	60,0	37	47,5	21	40,5	33

Tableau A- 4 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du nombre de répétition de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAB (n=3)

CV < 30 %	BAB					
31 % < CV < 50 %	1 désorption		2 désorptions		4 désorptions	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	8,6	8	28,4	45	24,9	3
Cyasorb UV 9						
Triphénylphosphate	31,9	9	43,1	6	51,9	2
Hostanox 03	17,6	7	16,4	17	23,6	11
Oléamide	49,3	9	60,6	6	53,1	2
Chimassorb 81	33,5	13	54,2	29	51,2	33
Glycérol monostéarate						
Isonox 129						
Tinuvin 326	33,6	16	35,1	35	46,9	24
Irganox 3114						
Tinuvin 327	35,3	52	23,9	99	26,1	8
Tinuvin 328	33,5	14	33,8	29	44,2	6
Vitamine E	115,7	34	33,4	45	118,1	28
Irganox 1010	10,6	23	18,8	17	25,8	17
Irganox 1330	27,3	17	28,5	13	40,2	30
Naugard DLTDTP	44,0	25	44,2	38	48,2	20
Irganox 1076	122,3	43	103,3	56	161,6	67
Irgafos 168	46,3	13	47,2	31	51,6	13
Naugard DSTDP	78,9	24	88,5	13	96,5	28
Diphényl phosphate	1,5	20	1,2	12	1,7	26
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	61,3	10	56,7	17	47,4	16
2,4-di-tertbutyl-phénol	37,8	5	31,4	33	32,8	29

Tableau A- 5 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du nombre de répétition de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 1 (n=3)

CV < 30 %	BAW 1					
31 % < CV < 50 %	1 désorption		2 désorptions		4 désorptions	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	2,2	55	2,4	32	2,6	27
Cyasorb UV 9	65,0	1	83,1	1	88,7	4
Triphénylphosphate	81,5	2	85,4	5	90,1	8
Hostanox 03	13,4	80	21,0	40	28,4	15
Oléamide	100,0	3	89,6	10	104,0	11
Chimassorb 81	57,1	26	63,8	14	70,2	13
Glycérol monostéarate	109,0	9	107,5	33	153,2	59
Isonox 129	36,4	85	49,3	36	58,7	10
Tinuvin 326	57,0	14	61,3	15	68,6	2
Irganox 3114	40,8	47	90,4	50	44,0	18
Tinuvin 327	35,9	50	51,0	23	64,3	8
Tinuvin 328	32,0	59	49,6	21	58,6	13
Vitamine E	71,4	14	105,0	62	77,2	14
Irganox 1010	34,8	52	54,6	18	62,3	6
Irganox 1330	28,7	67	47,6	21	53,2	6
Naugard DLTDTP	37,5	59	67,1	58	59,4	21
Irganox 1076	96,9	38	73,3	5	105,7	14
Irgafos 168	13,4	104	13,4	106	14,2	22
Naugard DSTDP	134,9	54	176,2	39	188,1	8
Diphényl phosphate	0,4	42	0,6	45	0,9	9
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	65,4	15	69,3	11	75,7	9
2,4-di-tertbutyl-phénol	31,8	60	48,0	17	55,8	12



Tableau A- 6 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du nombre de répétition de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 2 (n=3)

CV < 30 %	BAW 2					
31 % < CV < 50 %	1 désorption		2 désorptions		4 désorptions	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	1,9	14	4,3	19	6,0	14
Cyasorb UV 9	70,6	8	90,7	2	84,5	5
Triphénylphosphate	86,4	9	92,3	5	82,9	2
Hostanox 03	39,0	31	42,6	12	25,8	24
Oléamide	101,7	1	103,6	3	94,5	4
Chimassorb 81	65,1	19	72,2	5	68,4	20
Glycérol monostéarate	117,9	18	211,5	68	102,0	78
Isonox 129	71,4	59	99,9	26	53,8	36
Tinuvin 326	75,9	32	64,3	14	67,6	35
Irganox 3114	56,8	24	60,2	39	74,7	76
Tinuvin 327	59,9	16	57,0	19	52,7	23
Tinuvin 328	55,4	43	59,5	5	63,5	34
Vitamine E	163,6	16	98,4	9	81,1	76
Irganox 1010	67,1	32	90,9	14	65,4	29
Irganox 1330	46,3	21	77,2	26	48,5	28
Naugard DLTDP	55,1	17	63,0	17	72,6	68
Irganox 1076	107,8	53	70,1	17	100,7	25
Irgafos 168	18,4	123	16,7	39	14,3	87
Naugard DSTDP	116,5	24	46,4	14	50,3	57
Diphényl phosphate	0,6	28	0,5	28	0,8	11
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	59,8	13	73,3	7	58,3	11
2,4-di-tertbutyl-phénol	49,0	35	67,0	19	52,4	28

Tableau A- 7 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du volume du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAB (n=3)

CV < 30 %	BAB							
31 % < CV < 50 %	10 mL		7 mL		5 mL		3 mL	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	27,4	18	24,5	11	19,1	28	24,0	43
Cyasorb UV 9	82,7	5	68,4	12	62,8	10	63,4	17
Triphényl phosphate	55,4	7	49,1	9	56,1	5	58,9	2
Hostanox 03	19,4	21	18,5	18	24,6	15	20,6	26
Oléamide	67,0	11	57,5	9	65,3	22	47,4	9
Chimassorb 81	52,3	9	40,2	3	46,1	10	52,9	29
Glycérol monostéarate	58,2	41	81,7	36	78,0	39	103,5	57
Isonox 129	51,3	15	30,3	24	38,0	9	82,9	66
Tinuvin 326	38,0	9	36,1	20	41,6	6	36,8	2
Irganox 3114								
Tinuvin 327	43,0	29	43,8	6	30,6	19	50,1	21
Tinuvin 328	43,0	25	46,0	2	43,8	20	39,2	29
Vitamine E	68,9	77	96,5	37	142,5	27	113,1	21
Irganox 1010	56,7	71	30,1	25	18,8	25	24,3	17
Irganox 1330	33,3	13	35,2	9	33,9	21	34,8	19
Naugard DLTPD	43,9	15	64,5	12	63,6	36	67,9	35
Irganox 1076	78,9	48	66,1	11	64,9	8	59,6	21
Irgafos 168	55,4	18	52,0	9	53,6	12	52,3	17
Naugard DSTDP	73,2	16	78,8	9	153,4	26	116,5	36
Diphényl phosphate	1,5	10	1,2	25	1,3	21	1,7	39
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	61,9	4	57,5	23	63,6	2	61,3	1
2,4-di-tertbutyl-phénol	47,7	16	45,5	10	47,3	19	45,1	21

Tableau A- 8 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du volume du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 1 (n=3)

CV < 30 %	BAW 1							
31 % < CV < 50 %	10 mL		7 mL		5 mL		3 mL	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	38,9	4	24,3	24	36,0	14	31,3	11
Cyatorb UV 9	105,4	11	94,5	8	85,0	10	90,5	16
Triphényl phosphate	95,2	10	79,5	14	85,8	8	85,1	5
Hostanox 03	54,2	32	51,6	34	61,6	7	38,8	50
Oléamide	99,4	3	95,2	5	94,6	4	98,1	4
Chimassorb 81	80,2	14	70,9	15	85,4	11	80,4	35
Glycérol monostéarate	72,2	7	118,1	16	95,3	13	161,8	21
Isonox 129	10,3	87	31,5	66	227,5	49	131,0	35
Tinuvin 326	83,0	9	67,8	15	78,4	15	63,3	61
Irganox 3114								
Tinuvin 327	47,6	14	69,5	19	64,4	27	47,7	66
Tinuvin 328	54,5	19	58,9	19	69,8	21	44,2	38
Vitamine E	76,2	13	115,5	11	93,3	8	93,4	36
Irganox 1010	78,1	31	81,7	17	252,9	37	70,6	30
Irganox 1330	66,2	47	49,7	26	188,7	15	52,4	31
Naugard DLTDP	66,9	24	81,9	22	68,4	17	130,0	32
Irganox 1076	68,2	50	38,0	20	167,7	58	35,7	31
Irgafos 168	40,0	10	23,1	44	33,2	30	21,0	71
Naugard DSTDP	79,8	24	76,9	24	85,2	38	92,3	43
Diphényl phosphate	0,9	46	1,0	37	1,0	44	0,9	46
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	69,5	7	65,5	11	72,7	5	71,6	8
2,4-ditertbutyl-phénol	22,2	17	48,2	34	62,3	19	43,6	54

Tableau A- 9 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation du volume du solvant de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 2 (n=3)

CV < 30 %	BAW 2							
31 % < CV < 50 %	10 mL		7 mL		5 mL		3 mL	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	15,4	24	14,4	33	16,1	19	26,4	9
Cyatorb UV 9	78,4	12	76,7	6	86,3	6	85,7	7
Triphényl phosphate	91,7	7	89,2	21	93,9	13	79,8	4
Hostanox 03	36,5	14	34,6	37	28,2	30	39,1	24
Oléamide	88,1	9	88,1	3	90,3	9	88,3	1
Chimassorb 81	72,8	29	63,7	10	63,0	5	77,6	16
Glycérol monostéarate	66,6	9	158,1	38	78,5	16	81,0	19
Isonox 129	51,1	48	26,8	23	33,7	20	56,1	10
Tinuvin 326	73,8	26	59,7	14	71,3	34	43,4	47
Irganox 3114								
Tinuvin 327	76,7	47	70,0	69	48,8	33	92,5	20
Tinuvin 328	53,6	27	47,0	11	44,9	15	56,0	19
Vitamine E	78,1	28	76,2	28	112,6	16	106,2	3
Irganox 1010	69,7	13	84,7	35	64,1	7	49,4	22
Irganox 1330	48,3	52	59,1	20	45,2	2	43,5	11
Naugard DLTPD	72,2	22	47,0	32	57,3	23	54,7	20
Irganox 1076	75,0	67	116,7	35	72,2	35		
Irgafos 168	28,7	78	28,0	26	19,0	10	23,9	16
Naugard DSTDP	46,8	56	39,8	31	38,6	10	52,3	20
Diphényl phosphate	1,0	12	0,9	55	1,0	16	1,4	11
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	60,1	18	67,2	6	54,1	7	58,5	4
2,4-di-tertbutyl-phénol	42,5	15	65,7	12	40,5	18	47,1	18

Tableau A- 10 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAB (n=3)

CV < 30 %	BAB					
31 % < CV < 50 %	15 min		10 min		5 min	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	48,7	44	67,3	36	51,1	24
Cyasorb UV 9						
Triphénylphosphate	57,5	12	47,1	2	35,2	18
Hostanox 03	17,4	34	15,5	21	15,1	20
Oléamide	64,3	11	66,3	14	46,7	9
Chimassorb 81	39,6	5	46,5	33	37,1	17
Glycérol monostéarate						
Isonox 129						
Tinuvin 326	40,7	6	35,4	21	20,8	12
Irganox 3114						
Tinuvin 327	24,6	33	27,0	27	34,3	21
Tinuvin 328	28,5	10	35,7	34	26,1	15
Vitamine E	56,7	24	110,5	6	82,4	18
Irganox 1010	20,3	48	14,6	36	16,3	35
Irganox 1330	22,2	20	27,3	19	25,3	49
Naugard DLTPD	31,2	28	42,7	28	38,4	47
Irganox 1076	50,7	42	74,7	36	71,3	61
Irgafos 168	46,4	21	40,1	34	48,5	51
Naugard DSTDP	71,9	15	98,7	18	97,1	33
Diphényl phosphate	2,4	33	1,9	34	1,6	26
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	61,6	8	49,0	7	50,7	11
2,4-di-tertbutyl-phénol	36,7	9	35,0	22	29,2	14

Tableau A- 11 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 1 (n=3)

CV < 30 %	BAW 1					
31 % < CV < 50 %	15 min		10 min		5 min	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	25,9	1	24,8	27	25,2	6
Cyasorb UV 9	105,4	21	66,6	14	66,8	13
Triphénylphosphate	92,6	9	89,9	9	88,5	31
Hostanox 03	41,0	50	34,9	31	48,6	38
Oléamide	96,6	13	84,9	5	96,8	3
Chimassorb 81	127,1	90	50,7	26	63,8	4
Glycérol monostéarate	119,3	56	89,6	38	111,2	14
Isonox 129						
Tinuvin 326	40,9	36	63,0	13	59,7	19
Irganox 3114						
Tinuvin 327	56,7	11	39,2	5	51,4	25
Tinuvin 328	46,5	30	34,6	25	46,4	23
Vitamine E	52,3	20	55,6	7	84,7	24
Irganox 1010	54,5	36	52,2	15	77,6	15
Irganox 1330	28,9	62	31,8	45	43,5	22
Naugard DLTDP	93,4	38	95,4	39	57,9	13
Irganox 1076						
Irgafos 168	8,2	33	6,4	49	7,5	71
Naugard DSTDP	72,7	23	41,5	17	58,6	28
Diphényl phosphate	0,8	55	0,6	58	0,8	37
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	49,3	6	44,8	11	54,5	12
2,4-ditertbutyl-phénol	25,7	66	19,0	19	31,2	19

Tableau A- 12 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape de désorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 2 (n=3)

CV < 30 %	BAW 2					
31 % < CV < 50 %	15 min		10 min		5 min	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	13,3	34	20,3	23	14,1	14
Cyasorb UV 9						
Triphénylphosphate	75,2	10	70,6	34	71,8	3
Hostanox 03	32,0	6	30,9	27	39,4	27
Oléamide	90,8	6	89,6	9	93,4	2
Chimassorb 81	61,0	9	61,9	8	67,8	8
Glycérol monostéarate						
Isonox 129						
Tinuvin 326	56,4	29	45,1	6	73,8	30
Irganox 3114						
Tinuvin 327						
Tinuvin 328	32,2	14	34,6	25	43,4	10
Vitamine E	72,5	49	72,9	27	101,4	17
Irganox 1010	40,1	20	41,9	7	61,0	5
Irganox 1330	46,5	6	44,1	10	50,2	28
Naugard DLTPD	43,5	20	75,7	33	64,0	30
Irganox 1076	133,3	40	229,4	69	77,6	50
Irgafos 168	16,2	23	19,4	8	29,4	10
Naugard DSTDP	37,7	18	35,6	33	62,0	11
Diphényl phosphate	1,1	43	1,6	18	1,6	18
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	60,4	11	58,1	6	74,1	14
2,4-di-tertbutyl-phénol	45,0	29	30,3	16	45,4	44

Tableau A- 13 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape d'adsorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAB (n=3)

CV < 30 %	BAB							
31 % < CV < 50 %	60 min		45 min		30 min		15 min	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	34,8	44	34,0	33	49,3	14	42,1	50
Cyosorb UV 9								
Triphényl phosphate	40,1	8	46,8	2	43,3	9	56,4	3
Hostanox 03	11,6	39	10,9	10	7,5	33	4,2	47
Oléamide	62,8	6	59,6	13	67,2	2	61,6	2
Chimassorb 81	38,0	26	33,5	11	32,7	7	29,7	4
Glycérol monostéarate								
Isonox 129								
Tinuvin 326	26,2	5	25,0	15	22,4	23	17,1	19
Irganox 3114								
Tinuvin 327	32,5	30	28,2	16	21,9	20	16,5	47
Tinuvin 328	26,0	22	22,2	2	19,9	25	15,9	15
Vitamine E	50,6	33	71,6	68	18,7	49	61,0	39
Irganox 1010	14,2	30	11,2	43	57,6	25	0,9	173
Irganox 1330	19,4	40	16,6	9	23,2	34	1,9	113
Naugard DLTPD	53,6	44	26,7	9	65,9	35	18,1	23
Irganox 1076								
Irgafos 168	37,5	28	24,3	5	79,4	11	2,1	103
Naugard DSTDP	119,0	32	76,9	35	114,7	23	74,8	3
Diphényl phosphate	1,2	34	1,2	19	1,2	8	1,0	23
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	33,7	15	34,7	17	52,2	11	22,3	70
2,4-di-tertbutyl-phénol								



Tableau A- 14 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape d'adsorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 1 (n=3)

CV < 30 %	BAW 1							
31 % < CV < 50 %	60 min		45 min		30 min		15 min	
CV > 50 %	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	38,4	11	36,4	19	39,8	27	30,1	12
Cyatorb UV 9	92,2	9	70,8	22	91,2	9	78,6	8
Triphényl phosphate	83,7	5	90,2	6	87,9	2	89,5	6
Hostanox 03	50,4	18	50,7	37	44,0	2	35,5	32
Oléamide	88,4	9	95,3	3	91,6	5	97,2	22
Chimassorb 81	55,4	13	64,3	21	65,2	17	52,6	21
Glycérol monostéarate	139,5	30	84,9	27	109,8	17	57,9	11
Isonox 129	32,3	9	38,5	14	34,6	6	29,4	132
Tinuvin 326	65,1	17	57,5	20	46,5	4	55,8	25
Irganox 3114								
Tinuvin 327	53,3	26	50,9	33	38,8	34	45,5	33
Tinuvin 328	47,5	23	44,1	25	35,4	26	40,2	27
Vitamine E	72,1	13	86,0	16	93,7	18	52,5	18
Irganox 1010	83,9	25	57,2	10	54,8	27	52,4	22
Irganox 1330	58,1	18	49,7	25	40,7	1	39,2	24
Naugard DLTDP	67,3	7	66,9	28	58,3	18	42,8	26
Irganox 1076	109,2	20	106,3	31	84,5	49	69,5	6
Irgafos 168	27,5	83	12,8	86	13,0	65	17,5	81
Naugard DSTDP	67,0	23	54,5	32	52,4	31	45,9	18
Diphényl phosphate	1,2	20	1,1	27	1,2	8	1,3	31
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	58,8	9	58,7	15	61,1	5	54,9	16
2,4-ditertbutyl-phénol	31,1	11	31,1	19	26,7	23	26,4	16

Tableau A- 15 : Rendements d'extraction et coefficients de variations (CVs) obtenus pour l'optimisation de la durée de l'étape d'adsorption pour l'extraction SBSE avec les barreaux BAW 2 (n=3)

CV < 30 %	BAW 2							
31 % < CV < 50 %	60 min		45 min		30 min		15 min	
CV > 50%	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)	rendement d'extraction (%)	CV dopé avant (%)
Tinuvin 622	56,4	11	44,8	57	44,0	3	38,9	6
Cyatorb UV 9	75,1	12	79,3	6	90,2	15	83,9	12
Triphényl phosphate	81,9	8	77,8	11	80,1	7	80,8	5
Hostanox 03	35,3	52	37,7	46	29,6	35	22,8	40
Oléamide	98,6	3	91,4	4	87,7	8	97,4	11
Chimassorb 81	58,1	9	78,3	16	74,1	8	52,7	22
Glycérol monostéarate	98,7	25	73,7	21	108,8	15	78,1	57
Isonox 129	59,5	75	68,9	49	34,5	12	54,4	7
Tinuvin 326	36,3	54	57,9	62	61,8	3	95,2	10
Irganox 3114								
Tinuvin 327								
Tinuvin 328	44,2	25	61,6	10	49,7	11	40,9	40
Vitamine E	73,4	40	80,0	32	78,9	28	85,9	48
Irganox 1010	64,6	11	68,6	7	54,8	5	52,3	20
Irganox 1330	53,8	35	58,8	20	40,4	17	50,0	25
Naugard DLTPD	55,2	45	92,5	22	79,8	53	70,5	18
Irganox 1076	40,4	67	71,8	20	73,5	24	76,5	1
Irgafos 168	12,5	107	67,3	38	50,7	25	43,5	48
Naugard DSTDP	26,5	23	126,9	69	81,3	67	70,4	63
Diphényl phosphate	1,3	39	1,4	18	1,1	16	1,0	41
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	60,2	12	62,0	9	55,1	25	54,9	41
2,4-di-tertbutyl-phénol	42,8	13	58,4	6	42,3	30	43,2	19

Tableau A- 16 : Rendements d'extraction obtenus pour l'évaluation de l'efficacité d'extraction SBSE avec les barreaux artisanaux (BAB, BAW 1, BAW 2) et les barreaux commerciaux dans l'urine (n=3)

CV < 30 %	Protocole BAB		Protocole BAW 1		Protocole BAW 2	
31 % < CV < 50 %	BAB	Commerciaux	BAW 1	Commerciaux	BAW 2	Commerciaux
CV > 50 %	BAB	Commerciaux	BAW 1	Commerciaux	BAW 2	Commerciaux
Tinuvin 622	4	1	4	0	2	1
Cyasarb UV 9	65	113	88	88	107	90
Triphénylphosphate	49	87	84	99	94	93
Hostanox 03	2	3	6	3	12	3
Oléamide	80	26	84	40	92	36
Chimassorb 81	55	18	40	40	45	18
Glycérol monostéarate	63	556	64	151	90	21
Isonox 129	12	7	7	6	24	5
Tinuvin 326	27	11	39	24	27	11
Irganox 3114	23	14	36	8	44	20
Tinuvin 327	23	7	15	11	24	7
Tinuvin 328	16	4	9	7	21	5
Vitamine E	17	6	24	8	122	6
Irganox 1010	13	18	27	36	19	8
Irganox 1330	10	6	12	7	15	7
Naugard DLTDP	32	5	30	5	16	5
Irganox 1076	59	56	60	91	77	65
Irgafos 168	13	4	5	93	4	5
Naugard DSTDP	202	102	12	30	17	15
Diphényl phosphate	3	8	4	6	3	4
Acide 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoïque	56	40	60	37	48	36
2,4-di-tertbutyl-phénol	9	3	-54	7	-85	4