



**HAL**  
open science

# Développements analytiques pour la spéciation chimique organique et metaprotéomique des particules et des poussières

Mathieu Galmiche

► **To cite this version:**

Mathieu Galmiche. Développements analytiques pour la spéciation chimique organique et metaprotéomique des particules et des poussières. Chimie analytique. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT: 2022STRAF043 . tel-04121893

**HAL Id: tel-04121893**

**<https://theses.hal.science/tel-04121893v1>**

Submitted on 8 Jun 2023

**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.

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES*

Institut de Chimie et Procédés pour l'Énergie, l'Environnement et la Santé  
(ICPEES) - UMR 7515  
Chimie de la Matière Complexe (CMC) - UMR 7140

**THÈSE** présentée par :

**Mathieu GALMICHE**

soutenue le : 14 octobre 2022

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Chimie analytique

**Développements analytiques pour la  
spéciation chimique organique et  
méta-protéomique des particules et des  
poussières**

**THÈSE dirigée par :**

Pr. Maurice MILLET  
Dr. Yannis FRANCOIS

Professeur des Universités, Université de Strasbourg  
Maître de Conférences, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

Dr. Julie HARDOUIN  
Pr. Eric VILLENAVE

Maître de Conférences, Université de Rouen  
Professeur des Universités, Université de Bordeaux

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

Dr. Philippe SCHAEFFER  
Dr. Emmanuelle BICHON

Directeur de Recherches, CNRS, Université de Strasbourg  
Ingénieure de Recherche, LABERCA, Oniris

---

**INVITÉS :**

Dr. Olivier DELHOMME  
Mme. Lauriane KUHN

Maître de Conférences, Université de Lorraine  
Ingénieure d'Étude, CNRS



*A ma famille*

*« Il faut faire de la vie un rêve, et faire d'un rêve une réalité »*

Pierre Curie

*« On aime ce qui nous a émerveillé, et on protège ce que l'on aime »*

Jacques-Yves Cousteau



## Remerciements

Je n'ai pas eu une seconde d'hésitation au moment de débiter ces remerciements. Comment ne pas commencer par mes directeurs de thèse : Pr. Maurice Millet et Dr. Yannis François.

Ils sont à l'origine de mon projet de thèse, un projet qu'ils avaient mis sur pied ensemble pour concrétiser leur affinité réciproque par un travail de recherche. Avec un tel point de départ, l'humain ne pouvait être qu'au centre des trois années passées ensemble. Ils ont su me mettre à l'aise d'entrée, et nous avons bâti une vraie relation de confiance tous les trois, sachant nous jouer des petits défauts, mais surtout des grandes qualités de chacun d'entre nous. Je pourrais leur réserver trois pages d'anecdotes personnelles et de beaux souvenirs, mais je préfère les garder pour des retrouvailles heureuses. Alors je vais simplement les remercier de tout cœur pour la qualité de leur encadrement, pour tout ce qu'ils m'ont apporté scientifiquement, pour l'autonomie qu'ils ont su m'offrir, et pour m'avoir permis de m'épanouir autant au cours de ces trois années de thèse si importantes pour moi.

Pour compléter le tableau de mon équipe d'encadrement, il faut aussi ajouter Dr. Olivier Delhomme, troisième larron de toutes les réunions de pilotage de ma thèse, un co-encadrant dans la même veine que mes co-directeurs, toujours prêt à associer la bonne humeur au travail. Merci Olivier d'avoir placé les relations humaines au cœur de notre collaboration et de la vie du laboratoire.

Je souhaiterais désormais remercier sincèrement tous ceux qui ont accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail de doctorat en faisant partie du jury : les rapporteurs, Dr. Julie Hardouin et Pr. Eric Villenave, l'examinatrice, Dr. Emmanuelle Bichon, le membre invité, Lauriane Kuhn, et enfin le président du jury, Dr. Philippe Schaeffer. Cela aura été un honneur de voir mes travaux considérés par votre expertise, merci.

Pour mener à bien cette thèse, j'ai aussi pu m'appuyer sur d'autres chercheurs de mes laboratoires d'accueil. Par la présente, je tiens à remercier Dr. Emmanuelle Leize-Wagner, directrice du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et des Systèmes (LSMIS), qui en sait tant sur les joies la spectrométrie de masse et qui m'a tant apporté au cours de nos discussions, en réunion ou au détour d'un couloir, afin d'ouvrir des perspectives de recherches et de questionnements, et de m'aiguiller selon sa riche expérience. Merci aussi d'avoir encouragé nos opportunités de voyages pour les congrès nationaux et internationaux, en particulier l'ASMS 2021. Ce fût un plaisir d'évoluer dans ton laboratoire, Emmanuelle.

Merci également à tous les autres membres permanents du LSMIS que j'ai pu côtoyer au cours des trois dernières années. Remerciement particulier pour Dr. Noëlle Potier, toujours bienveillante, très attentive à mes présentations en réunion de labo et dont les questions m'auront toujours fait avancer.

Parmi l'équipe de Physico-Chimie de l'Atmosphère de l'ICPEES, je remercie également le directeur de l'équipe, Dr. Stéphane Le Calvé.

Au quotidien, certain(e)s ont joué un rôle fondamental dans la progression de mes travaux et dans le plaisir que j'y ai pris : mes collègues doctorant(e)s de l'ICPEES et du LSMIS. En premier lieu, j'ai deux binômes de thèse à remercier. Celles qui ont démarré et achevé leur thèse (presque) en même temps que moi.

A l'ICPEES, Anaïs Rodrigues, binôme de bureau, de pause-café, de beaucoup de choses en fait. Ta joie de vivre, ta spontanéité et ta simplicité ont égayé la vie du labo ces dernières années. Comme dirait Maurice, « Quand t'es pas là, on s'en rend compte, et quand tu reviens, on sait tout de suite que t'es revenue ». Félicitations pour ta thèse et merci pour toutes nos discussions, pour ta contribution à notre article sur la pseudo-MRM, et pour tous ces beaux moments partagés, en particulier à Paris et à Copenhague.

Au LSMIS, Clarisse Gosset-Erard, binôme estampillé « ECPM ». Nous nous connaissions déjà mais nous nous sommes redécouverts depuis. J'ai énormément apprécié ta gentillesse, ton humilité et ton désir permanent d'aider les autres. Tu m'as montré, appris et expliqué énormément de choses, tu as toujours répondu à mes questions avec la patience qui te caractérise. Tu peux être fière de tout ce que tu as accompli pendant ta thèse. Enfin, comment ne pas souligner le superbe séjour que nous avons passé aux Etats-Unis ! Des souvenirs pour la vie ! Merci Clarisse.

J'ai également eu la chance de passer du temps avec des doctorants devenus docteurs depuis qui ont eu la générosité m'apprendre beaucoup de choses au début de ma thèse. Je pense particulièrement au trio de docteurs du LSMIS, Jérémie Giorgetti, Antony Lechner et Christophe Giorgiutti, qui m'ont parfaitement formé à l'analyse de biomolécules et à des méthodes analytiques telles que la CE-MS que j'ai réellement découvert au laboratoire, et qui ont laissé leur empreinte avec la traditionnelle pizza du vendredi.

Un remerciement particulier également à Dr. Supansa Chimjarn, mieux connue sous le surnom de Méry dans l'équipe de Physico-Chimie de l'Atmosphère de l'ICPEES, qui était notre thésarde « ultime », celle qui avait touché à toutes les machines du labo et qui pouvait aider n'importe qui à propos de n'importe quoi.

Dans cette même équipe, comment ne pas souligner l'indispensable Dr. Alexandre Sonnette, bricoleur et informaticien de l'extrême à ses heures perdues, toujours prêt à rendre service à un doctorant en galère avec une machine capricieuse. Ton expertise m'aura sauvé la mise dans bien des situations, mon cher Alex, et toujours avec le sourire.

J'en viens à présent aux autres jeunes chercheurs avec qui j'ai partagé ma thèse, en premier lieu Tessa Reinert, mon excellente voisine de bureau au LSMIS à qui je souhaite tout le meilleur pour sa thèse, dont je ne doute pas une seconde de l'accomplissement. Du côté de l'ICPEES, je mentionnerai Dani Khoury et Cheikh Tidiane Dione, ainsi que Anaïs Becker, Joana Vaz Ramos, Audrey Grandjean, Coralie Kustner et Tuyen Tran Thi.

Puis vient le tour des stagiaires, ces collègues rafraîchissant la vie au laboratoire pendant quelques mois de l'année. En premier lieu je tiens à remercier Eden Esslinger, dont le stage de Master 2 aura été un grand moment de ma thèse avec la mise en route d'un beau projet autour des fullerènes. Ensuite, Vincent Duflot, pour sa bonne volonté et le coup de main qu'il m'a apporté lors de son stage de Master 1. Enfin, merci à tous les stagiaires dont j'ai eu le plaisir de croiser la route à l'ICPEES et au LSMIS : Florian, Geoffrey, Kathya, Clémence, Maëlys, Emilie, Aurore, Leila, Louis, Oumayma, Aline, Alia, Emilie, Orélia, Matéo et Zülal.

Et puis, pour ce qui est de l'ambiance du laboratoire, une pensée chaleureuse également pour Stéphanie Coutin, qu'on pourrait qualifier de « membre honoraire » du LSMIS après tous les repas de midi que nous avons partagé dans la joie et la bonne humeur !

J'ai également une pensée particulière pour deux membres de l'ICPEES qui ont contribué à mes travaux de manière significative : Michel Wolf et Christophe Sutter. Les talents de concepteur, de mécanicien et de réparateur d'objets en tout genre du premier lui ont valu le surnom de « Magic » Michel, joliment et justement trouvé par Maurice. Le second s'est distingué par ses compétences d'électronicien et a passé du temps à réparer des cartes électroniques ou autres sondes défectueuses pour nous. Merci à vous deux qui savez transformer les galères en bateaux de croisière.

Ces remerciements sont aussi l'opportunité de m'adresser aux nombreux scientifiques avec qui j'ai pu travailler hors du laboratoire lors de cette thèse riche en collaborations.

Dans ce cadre-là, je commencerai par remercier l'équipe de Biogéochimie moléculaire de Dr. Pierre Adam, Dr. Philippe Schaeffer et Estelle Motsch, des partenaires cruciaux sur les projets de la pseudo-MRM en GC-MS/MS et sur celui des fullerènes en LC-MS/MS. Merci beaucoup pour votre accueil chaleureux lorsque je travaillais dans votre laboratoire, merci de m'avoir accordé autant de confiance et d'avoir pris le temps de faire progresser mes travaux par nos discussions et par vos interventions.

Ma deuxième collaboration majeure a eu lieu avec la plateforme de protéomique de l'IBMC à Strasbourg. Ici, je souhaite tout particulièrement remercier Lauriane Kuhn, ressource inépuisable de connaissances et de pédagogie dans le domaine de la protéomique. Avant de m'attaquer au volet métabolomique de ma thèse il y a quelques mois, ce sujet était loin d'être ma spécialité. Je suis donc infiniment reconnaissant à Lauriane de m'avoir tant appris en protéomique, d'avoir pris le temps de me former, de contribuer à nos réunions d'avancement de projet, et de répondre à mes (nombreuses) questions.

Merci également à Philippe Hammann, Johana Chicher et tous les autres collaborateurs de la plateforme, vous qui avez toujours fait preuve de bienveillance et de gentillesse lors de mes passages dans votre laboratoire.

J'ai aussi pu compter sur des conseillers riches en connaissances techniques et en compétences de troubleshooting analytiques. Merci à Patricia Lecomte et Cyrille Lamboley de



Restek pour s'être penchés sur mes questions de chromatographie. Merci également à Cyprien Ridacker de Thermo, ange gardien du laboratoire de Physico-Chimie de l'Atmosphère.

Merci aux collaborateurs d'Atmo Grand Est pour leur soutien à différentes étapes de nos projets, notamment à Audrey Chevalier pour le prêt des préleveurs, à Nicolas Lenjoint pour son aide sur l'ASE, et à Clémence Aubert pour les données de pollution atmosphérique.

Merci enfin à Louise, Natan, Vasiliki et Spiros qui ont bien voulu nous aider dans nos recherches en nous ouvrant la porte de leur logement et en tolérant nos prélèvements.

J'en viens maintenant à mon expérience d'enseignement à la Faculté de Chimie de Strasbourg. Encadrement de TP, évaluation d'oraux, animation de TD en présentiel et en distanciel, création d'un QCM pour l'évaluation de la distance, etc ... cette expérience a été très enrichissante et très importante dans mon parcours de doctorant. Au cours de celle-ci, j'ai pu compter sur mes deux directeurs de thèse qui étaient également responsables des UE où j'enseignais, ainsi que sur une collègue de TD avec qui j'ai beaucoup travaillé, Dr. Marie Ruch, et d'autres collègues qui ont pris la relève ensuite : Dr. Laurent Raibaut, Dr. Nicolas Javahiraly et Dr. Chloé Laure.

Surtout, je tiens ici à remercier chaleureusement mon acolyte de TP, Thomas Weissenberger, préparateur des TP de Chimie Analytique à la Fac. Ta bienveillance et ta bonne humeur ont égayé mes journées de TP, et tu es encore maintenant un membre actif à part entière de l'équipe de « Chimie Footbalytique » avec Anaïs, Maurice, Olivier et Yannis, une équipe de choc avec qui j'ai adoré jouer à MPG et MPP, surtout quand je vous battais ...

Merci enfin à tous les étudiants qui m'ont donné l'envie d'enseigner encore à l'avenir.

Ces trois dernières années ont aussi été marquées par les conférences scientifiques auxquelles j'ai pu assister. J'en profite donc pour remercier tous ceux que j'ai pu rencontrer lors de ces congrès et avec qui j'ai pu échanger. En particulier, j'adresse un petit mot à l'équipe des « gilets oranges » et à celle des jeunes « Genevois » avec qui j'ai partagé d'excellents moments lors de « SEP 21 », ainsi qu'à Thierry Guermonprez. Merci également à l'équipe de Twistaroma pour l'organisation des journées de l'AFSEP Grand-Est. Merci enfin à Alexandra, Sabnam et Teresa pour les joyeux moments vécus à Copenhague.

Lors de ma thèse, j'ai également eu l'opportunité de siéger au conseil interne de l'Ecole Doctorale des Sciences Chimiques en tant que représentant des doctorants. Ici, je remercie tous les autres représentants des doctorants, et particulièrement trois d'entre eux, avec qui j'ai le plus travaillé au cours de mon mandat : Merveille Eguida, Anaïs Loison et Axel Meyer. Merci également à tous les membres permanents de ce conseil de l'EDSC qui nous ont toujours bien accueilli, en particulier Pr. Petra Hellwig et Nathalie Kostmann.

Une des expériences les plus enrichissantes de ces trois dernières années fut ma participation au concours « Ma Thèse en 180 secondes ». J'ai eu l'honneur de pouvoir participer

à la finale régionale « Alsace » de ce concours, un moment inoubliable pour moi. Alors je remercie celles qui ont contribué à ma prestation, les formatrices du Jardin des Sciences, Amandine Duluard, Vanessa Flament et Elise Helfer. Christophe Muller, metteur en scène, fut également un soutien majeur dans cet accomplissement, grâce à ses conseils si précieux pour l'expression orale et théâtrale. Évidemment, un immense merci à tous mes camarades de promotion MT180 Alsace 2022 avec qui nous avons partagé de belles journées et surtout le plaisir de se lancer dans cette belle aventure. Alexandra, Charlotte, Frank, Thibault et tous les autres, félicitations pour vos prestations et au plaisir de se retrouver à l'avenir.

Une thèse, ça n'est pas que trois ans de travail mais aussi tout un parcours en amont. Ce qui m'a amené vers ce doctorat, c'est en partie ma formation d'ingénieur en Sciences Analytiques à l'ECPM. C'est pourquoi je souhaite ici remercier mes enseignants de l'ECPM, en premier lieu ceux de la filière Sciences Analytiques, pour la qualité de leurs enseignements. J'ai une pensée particulière pour Pr. Laurence Sabatier et Dr. Jérémy Brandel qui m'ont éclairé dans mon parcours.

Puis, comme transition entre mes années d'étudiant à l'ECPM et ma thèse de doctorat, j'ai eu la chance d'effectuer mon stage M2 au Laboratoire d'Hydrologie de Nancy de l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). Mon projet de recherche lors de ce stage a été très enrichissant et fondateur pour la suite de ma carrière. Je voudrais donc remercier tous ceux qui m'ont épaulé et qui m'ont tant apporté, scientifiquement et humainement, pendant la période que j'ai passée à Nancy : Dr. Xavier Dauchy, Christophe Rosin, Christelle Pallez, Adeline Colin, Marie-Christelle Clavos, Dr. Laure Pasquini, Virginie Boiteux, Cristina Bach ainsi que tous les autres collègues dont je garde d'excellents souvenirs.

Je pense que la réussite d'une thèse passe également par un équilibre avec une vie personnelle épanouie. Alors dans les paragraphes qui suivent, je vais remercier tous ceux qui ont contribué à ma réussite en dehors de mes heures de travail, parfois sans le savoir.

Une partie de mon temps libre a été dédiée au football et à l'Association Sportive de Strasbourg (ASS). J'y ai passé trois merveilleuses années en tant que licencié et je tiens à remercier tous mes entraîneurs, en particulier Bernard, Fabio, Mohamed, Thierry et Riyad pour tout ce qu'ils m'ont apporté, mais aussi tous mes coéquipiers avec qui nous avons vécu de très belles choses, sur le terrain avec deux montées consécutives, ainsi qu'en dehors grâce à la belle ambiance de groupe qui nous animait.

Je souhaite désormais remercier mes amis qui comptent énormément dans ma vie et qui ont donc eux aussi contribué à cette thèse à leur manière.

Il y a d'abord le magnifique groupe de l'ECPM, avec Yanis, mon acolyte masculin indispensable pour survivre aux soirées et week-ends au milieu des filles : Anaëlle, Apolline,

Axelle, Charlotte, Claire et Hermine. Merci beaucoup pour votre soutien et pour les moments de bonheur que vous m'avez apportés.

Ensuite, je pense à l'éternelle équipe de « CPI Basket » et à nos week-ends en Bourgogne ces derniers étés. Cédric, Guillaume, Hugo, Loïc, Pierre-André et Yanis (encore lui) : Merci pour tout, et bien plus encore ...

Merci aussi à l'équipe des « 5Z », Alex, Arthur, Marek, Quentin et Ziyed pour les sacrées tranches de rigolade à chaque fois qu'on se retrouve. Mention spéciale à Marek, mon déménageur de l'extrême, ainsi qu'à Maëlle.

Merci à Eloïse et Clément, les « voisins du dessus », pour toutes nos bonnes bouffes et nos belles soirées.

Enfin, je remercie tous mes autres amis, ceux du lycée (Gauthier, Maxime, Vincent), de CPI (Line, Anouk), ou de l'ECPM (Kim, Lazare, Barbara, Quentin, Nina, Loïc, Thomas, Mathilde). Chacun d'entre vous aura compté, à un moment donné, au travers de nos revoyures, nos bavardages ou nos fous rires.

Passé les loisirs et les amis, je veux désormais remercier un des piliers les plus importants de ma vie : ma famille.

J'en profite d'abord pour remercier ma « deuxième famille » qui m'a si bien accueilli. Pascale, Christophe, Raphaël et Héloïse, merci pour votre bienveillance et pour toutes vos gentilles attentions.

Cette thèse est dédiée à tous les membres de ma famille qui me soutiennent et m'encouragent depuis des années, depuis bien avant le début de ma thèse. À mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines, frère, sœur et neveux que j'ai toujours plaisir à retrouver.

Elle est particulièrement dédiée à deux personnes que je chéris profondément : Marie-Rose et Pierre, mes grands-parents. À vous qui m'avez tant appris, qui m'avez donné tant d'amour, j'espère que la fierté dans vos yeux brillera toujours.

Et puis cette thèse est surtout dédiée à Michèle et Damien, mes parents. C'est vous qui m'avez permis de pouvoir devenir « docteur ». J'ai toujours pu compter sur vous, de ma plus tendre enfance jusqu'à toutes ces années d'études supérieures durant lesquelles vous m'avez toujours encouragé. Si j'atteins aujourd'hui cet accomplissement, vous y êtes pour beaucoup. Merci.

Puisqu'on dit qu'il faut garder le meilleur pour la fin, il est désormais temps pour moi d'enfin remercier Marie-Anaïs, celle qui partage ma vie depuis quatre ans maintenant.

*« Parce qu'on s'est tant rapprochés que nos souvenirs se ressemblent.*

*Parce que quand la vie n'est pas simple, c'est tellement mieux d'être ensemble. »*

Merci pour tes encouragements, pour ton soutien si précieux au quotidien et pour tous les moments exceptionnels que nous avons partagés ces dernières années. Je n'aurais pas pu accomplir tout ça sans ton épaule, ton rire, ton cœur, sans tout ce que tu as fait pour moi.



## Table des matières

<i>Remerciements</i> .....	4
<i>Table des matières</i> .....	11
<i>Table des figures</i> .....	13
<i>Liste des abréviations</i> .....	17
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>19</b>
<i>Références</i> .....	24
<b>PREMIÈRE PARTIE : DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODE POUR L'ANALYSE DE COMPOSÉS AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS LES PARTICULES ET LES POUSSIÈRES PAR GC-MS/MS</b> .....	<b>28</b>
<b>CHAPITRE 1 : ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DE COMPOSÉS AROMATIQUES POLYCYCLIQUES POLAIRES ET APOLAIRES DANS LES AÉROSOLS, LES POUSSIÈRES ET LES SUIES : ÉCHANTILLONNAGE ET PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON</b> .....	<b>30</b>
1.1. <i>Introduction</i> .....	30
1.2. <i>Sampling</i> .....	33
1.3. <i>Extraction</i> .....	36
1.4. <i>Conclusion</i> .....	47
1.5. <i>References</i> .....	48
<b>CHAPITRE 2 : ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DE COMPOSÉS AROMATIQUES POLYCYCLIQUES POLAIRES ET APOLAIRES DANS LES AÉROSOLS, LES POUSSIÈRES ET LES SUIES : ANALYSE INSTRUMENTALE ET OCCURRENCE</b> .	<b>54</b>
2.1. <i>Introduction</i> .....	54
2.2. <i>Separation: Chromatography</i> .....	55
2.3. <i>Detection</i> .....	67
2.4. <i>Occurrence</i> .....	75
2.5. <i>Conclusion</i> .....	83
2.6. <i>References</i> .....	85
<b>CHAPITRE 3 : DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE INSTRUMENTALE POUR L'ANALYSE DE COMPOSÉS AROMATIQUES POLYCYCLIQUES PAR GC-MS/MS</b> .....	<b>90</b>
3.1. <i>Démarche expérimentale de développement de la méthode GC-MS/MS</i> .....	90
3.2. <i>Introduction</i> .....	95
3.3. <i>Materials and Methods</i> .....	98
3.4. <i>Results and Discussion</i> .....	100
3.5. <i>Conclusion</i> .....	110
3.6. <i>References</i> .....	111
<b>CHAPITRE 4 : ANALYSE SIMULTANÉE DE 79 COMPOSÉS AROMATIQUES POLYCYCLIQUES PAR GC-MS/MS</b> .....	<b>112</b>
4.1. <i>Introduction</i> .....	113
4.2. <i>Materials and Methods</i> .....	114
4.3. <i>Results and Discussion</i> .....	117
4.4. <i>Conclusion</i> .....	142
4.5. <i>References</i> .....	143
<b>CHAPITRE 5 : APPLICATION ENVIRONNEMENTALE : ÉTUDE DE LA PRÉSENCE DES CAP DANS LES PARTICULES ET LES POUSSIÈRES DE LOGEMENTS URBAINS</b> .....	<b>146</b>
5.1. <i>Description des échantillons environnementaux</i> .....	146

5.2.	<i>Concentrations mesurées dans les logements urbains étudiés</i> .....	149
5.3.	<i>Remarques générales sur les concentrations de CAP observées</i> .....	165
5.4.	<i>Recherche des sources d'émission de CAP par l'étude de ratios diagnostics</i> .....	171
5.5.	<i>Conclusion</i> .....	174
5.6.	<i>Références</i> .....	175
<b>CHAPITRE 6 :</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>177</b>
<b>DEUXIÈME PARTIE : DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODE POUR L'ANALYSE DE FULLERÈNES</b>		
<b>DANS LES PARTICULES ET LES POUSSIÈRES PAR LC-MS/MS..... 181</b>		
<b>CHAPITRE 1 :</b>	<b>ÉTAT DE L'ART : LES FULLERÈNES DANS L'ENVIRONNEMENT ET LEUR ANALYSE</b> .....	<b>182</b>
	<i>Références</i> .....	187
<b>CHAPITRE 2 :</b>	<b>DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODE POUR L'ANALYSE DES FULLERÈNES C<sub>60</sub> ET C<sub>70</sub> ET LEURS DÉRIVÉS</b>	
	<b>FONCTIONNALISÉS DANS LES PM, LES POUSSIÈRES ET LES SUIES, PAR LC-MS/MS</b> .....	<b>189</b>
2.1.	<i>Introduction</i> .....	189
2.2.	<i>Material and methods</i> .....	191
2.3.	<i>Results and Discussion</i> .....	194
2.4.	<i>Conclusion</i> .....	220
2.5.	<i>References</i> .....	221
<b>CHAPITRE 3 :</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>223</b>
<b>TROISIÈME PARTIE : MISE EN PLACE D'UNE APPROCHE MÉTAPROTÉOMIQUE POUR LA</b>		
<b>CARACTÉRISATION DE LA FRACTION BIOLOGIQUE DES PARTICULES ET DES POUSSIÈRES. 225</b>		
<b>CHAPITRE 1 :</b>	<b>ÉTAT DE L'ART : LA MÉTAPROTÉOMIQUE ET SON INTÉRÊT POUR LES AÉROSOLS ET LES POUSSIÈRES</b>	
	.....	226
1.1.	<i>La fraction biologique des aérosols et des poussières : composition et impacts</i>	
	<i>sanitaires</i> .....	226
1.2.	<i>Les méthodes de caractérisation de la fraction biologique des aérosols et des</i>	
	<i>poussières</i> .....	228
1.3.	<i>La métaprotéomique</i> .....	231
1.4.	<i>La métaprotéomique pour caractériser les bioaérosols et les poussières : Pertinence</i>	
	<i>et développements analytiques nécessaires</i> .....	232
1.5.	<i>Références</i> .....	236
<b>CHAPITRE 2 :</b>	<b>DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE D'ANALYSE MÉTAPROTÉOMIQUE</b> .....	<b>239</b>
2.1.	<i>Protocole d'évaluation de l'extraction des protéines dans les bioaérosols</i> .....	239
2.2.	<i>Optimisation des conditions d'extraction des protéines dans les bioaérosols</i> .....	243
2.3.	<i>Etude du protocole d'analyse protéomique bottom-up</i> .....	251
2.4.	<i>Application des conditions d'extraction optimisées et du protocole d'analyse</i>	
	<i>protéomique bottom-up à un mélange standard de protéines</i> .....	260
2.5.	<i>Références</i> .....	269
<b>CHAPITRE 3 :</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>270</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES ..... 272</b>		
<b>ANNEXES ..... 278</b>		
	<i>Liste des publications</i> .....	279
	<i>Liste des communications</i> .....	280

## Table des figures

### Première Partie

Figure 1.1 : Chemical structures of various 3-ring PACs: a) Anthracene (PAH); b) 9,10-Anthraquinone (OPAH); c) 9-Nitroanthracene (NPAH); d) Acridine (AZA); e) Naphtho[2,3-b]thiophene (PASH). _____	32
Figure 1.2 : Mean extracted values (ng per subsample) of selected PAHs and NPAHs with different extraction methods: MAE, PLE and UAE (written as AG). _____	42
Figure 2.1 : Comparison of separation of 20 azaarenes obtained with: a) a GC-MS method, and b) a LC-FLD method. _____	60
Figure 2.2 : Range of data reported in abstracts dealing with PAH levels where units of $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$ are used. _____	78
Figure 3.1 : Instrument GC-MS/MS Varian CP3800 - 320MS _____	91
Figure 3.2 : Programmes de température G1, G2 et G3 utilisés pour la séparation des CAP en GC _____	92
Figure 3.3 : Chromatogramme du m/z 252 correspondant à la séparation par GC des isomères B(b)FLT, B(k)FLT et B(j)FLT : a) avec la méthode G2, b) avec la méthode G3 _____	93
Figure 3.4 : Molecular structures of the Polycyclic Aromatic Compounds studied in this communication. _____	97
Figure 3.5 : For each PAC studied, peak areas of the three main MS/MS transitions relative to the highest peak area obtained for a given compound, depending on the collision energy applied. _____	101
Figure 3.6 : Peak areas of the three main MS/MS transitions relative to the highest peak area obtained for a) benzonaphtho(2,1-d)thiophene and b) anthraquinone. _____	103
Figure 3.7 : Pseudo-MRM (178 $\rightarrow$ 178, grey trace) and MRM (178 $\rightarrow$ 152, orange trace) chromatograms of phenanthrene ( $t_R = 16.5$ min) and anthracene ( $t_R = 16.7$ min) in Diesel Particulate Matter SRM 2975. _____	106
Figure 3.8 : Pseudo-MRM (135 $\rightarrow$ 135, grey trace) and MRM (135 $\rightarrow$ 108, orange trace) chromatograms of benzothiazole ( $t_R = 7.4$ min) in Diesel Particulate Matter SRM 2975. _____	108
Figure 3.9 : Pseudo-MRM (252 $\rightarrow$ 252, grey trace) and MRM (252 $\rightarrow$ 250, orange trace) chromatograms of benzo(e)pyrene ( $t_R = 36.3$ min) and benzo(a)pyrene ( $t_R = 36.6$ min) in Diesel Particulate Matter SRM 2975. _____	108
Figure 4.1 : Total Ion Chromatogram of the 79 targeted Polycyclic Aromatic Compounds and 7 internal standards of this study ( $t_R$ from 6 to 50 minutes), with a focus on the most critical pairs of isomers. _____	121
Figure 4.2 : For eight different PACs (2 PAHs, 2 AZAs, 2 PASHs, 2 OPAHs and 2 NPAHs), peak areas of the three main MS/MS transitions relative to the highest peak area obtained for a given compound. _____	122
Figure 4.3 : Pressurized Liquid Extraction yields with eight different solvent or solvent mixtures, for 15 PACs (4 PAHs, 3 OPAHs, 3 NPAHs, 3 AZAs and 2 PASHs), relative to the highest yield obtained for each compound. _____	124
Figure 4.4 : Examples of calibration curves obtained by internal standardization for one PAC per group. _____	125
Figure 4.5 : Method recoveries measured for: a) PAHs, b) OPAHs, c) NPAHs, d) AZAs, e) PASHs _____	126
Figure 4.6 : Diagnostic ratios of individual PAHs to assess the main emission sources of the $\text{PM}_{10}$ samples from this work. _____	141
Figure 5.1 : Localisation du site de prélèvement d'échantillons urbains (T = ligne de tramway ; R = axe routier) _____	147
Figure 5.2 : Dispositifs de prélèvement des échantillons environnementaux : a) Membrane Kudzu Science® adaptée sur l'embout d'un aspirateur domestique b) Préleveur actif bas-volume Microvol et GFF après prélèvement de $\text{PM}_{10}$ _____	148
Figure 5.3 : Répartition des CAP entre les différents groupes et concentrations totales mesurées dans les $\text{PM}_{10}$ intérieures et extérieures des logements a) 2R ; b) 2T ; c) 5T _____	161

Figure 5.4 : Comparaison des concentrations de CAP mesurées dans les PM <sub>10</sub> extérieures (a et b), les PM <sub>10</sub> intérieures (c et d) et les poussières (e et f) des logements 2R, 2T et 5T	164
Figure 5.5 : Comparaison des concentrations de CAP des logements 2R, 2T et 5T de cette étude avec des concentrations retrouvées dans des articles de la littérature datés de 2010 à 2022	167
Figure 5.6 : Graphiques de corrélation de ratios diagnostics d'identification des sources de CAP pour les échantillons de poussière des logements 2R, 2T et 5T de février 2021	172

## Deuxième Partie

Figure 1.1 : Formule chimique des cinq fullerènes étudiés dans ces travaux : a) C <sub>60</sub> , b) C <sub>70</sub> , c) C <sub>61-PCBM</sub> , d) C <sub>71-PCBM</sub> , e) NMFP	182
Figure 2.1 : Mass Spectrum obtained by direct infusion of C <sub>60</sub> fullerene with a) negative ESI, b) negative APCI, c) positive APCI, d) negative APPI, e) positive APPI	195
Figure 2.2 : Mass Spectrum obtained by direct infusion of C <sub>61-PCBM</sub> fullerene with a) negative ESI, b) negative APCI, c) positive APCI, d) negative APPI, e) positive APPI	196
Figure 2.3 : Mass Spectrum obtained by direct infusion of C <sub>70</sub> fullerene with a) negative ESI, b) negative APCI, c) positive APCI, d) negative APPI, e) positive APPI	197
Figure 2.4 : Mass Spectrum obtained by direct infusion of C <sub>71-PCBM</sub> fullerene with a) negative ESI, b) negative APCI, c) positive APCI, d) negative APPI, e) positive APPI	198
Figure 2.5 : Mass Spectrum obtained by direct infusion of NMFP with a) negative ESI, b) negative APCI, c) positive APCI, d) negative APPI, e) positive APPI	199
Figure 2.6 : LC-APCI-MS Total Ion Chromatogram (pseudo-MRM) of a C <sub>60</sub> , C <sub>70</sub> , C <sub>61-PCBM</sub> , C <sub>71-PCBM</sub> and NMFP mixture at 1 mg L <sup>-1</sup> obtained in negative versus positive mode.	201
Figure 2.7 : LC-APPI-MS Total Ion Chromatogram (pseudo-MRM) of a C <sub>60</sub> , C <sub>70</sub> , C <sub>61-PCBM</sub> , C <sub>71-PCBM</sub> and NMFP mixture at 1 mg L <sup>-1</sup> obtained in negative versus positive mode.	202
Figure 2.8 : MS/MS breakdown curve obtained by negative electrospray (ESI -) direct infusion and Collision-Induced Dissociation (CID) from 5 to 80 V of a) C <sub>60</sub> and b) C <sub>61-PCBM</sub> on a Triple Quadrupole instrument	204
Figure 2.9 : MS/MS fragmentation Mass Spectrum of C <sub>60</sub> (parent ion: m/z = 720) with a) negative APCI and CE = 1.5, b) positive APCI and CE = 1.5, c) negative APPI and CE = 1.5, d) positive APPI and CE = 1.5	205
Figure 2.10 : MS/MS fragmentation Mass Spectrum of C <sub>61-PCBM</sub> (parent ion: m/z = 910) with a) negative APCI and CE = 1.4, b) positive APCI and CE = 0.9, c) negative APPI and CE = 1.2, d) positive APPI and CE = 0.8	205
Figure 2.11 : LC-ESI(-)-MS Single Ion Monitoring Chromatogram of a C <sub>60</sub> , C <sub>70</sub> , C <sub>61-PCBM</sub> , C <sub>71-PCBM</sub> and NMFP mixture obtained a) on the biphenyl column and b) on the C <sub>18</sub> column	207
Figure 2.12 : LC-APPI-MS/MS Total Ion Chromatogram (pseudo-MRM) of a C <sub>60</sub> , C <sub>70</sub> , C <sub>61-PCBM</sub> , C <sub>71-PCBM</sub> and NMFP mixture obtained using a C <sub>18</sub> column eluting with a toluene/acetonitrile gradient.	208
Figure 2.13 : LC-APPI-MS Total Ion Chromatogram (pseudo-MRM) of a C <sub>60</sub> , C <sub>70</sub> , C <sub>61-PCBM</sub> , C <sub>71-PCBM</sub> and NMFP mixture obtained using a C <sub>18</sub> column eluting with a toluene/methanol gradient.	209
Figure 2.14 : Recovery (in %) of the five fullerenes spiked at five different levels on GFFs using Pressurized Liquid Extraction	213
Figure 2.15 : Precision profiles of eight calibration curves for C <sub>60</sub> , C <sub>70</sub> , C <sub>61-PCBM</sub> , C <sub>71-PCBM</sub> and NMFP.	215



### Troisième Partie

<i>Figure 2.1 : Schéma résumé du protocole d'évaluation des rendements d'extraction des protéines sur des filtres en fibre de verre utilisés pour le prélèvement d'aérosols</i>	241
<i>Figure 2.2 : Gamme de couleur obtenue par ajout de protéines dans une solution de réactifs permettant les dosages colorimétriques a) Bradford ; b) BCA</i>	242
<i>Figure 2.3 : Formules chimiques, noms et abréviations des principaux agents utilisés pour l'extraction des protéines en solution</i>	244
<i>Figure 2.4 : Rendements d'extraction (en %) obtenus sur 100 µg de BSA dopés sur des filtres en fibre de verre après 4 heures d'extraction dans 2 mL des tampons d'extraction A, B et C</i>	245
<i>Figure 2.5 : Schéma du gradient d'élution pour la séparation des peptides tryptiques par nanoLC en phase inverse</i>	253
<i>Figure 2.6 : Chromatogramme TIC de trois répliquats d'extraits de BSA dopée sur filtre en fibre de verre, après purification, digestion tryptique et analyse par nanoLC-MS/MS</i>	254
<i>Figure 2.7 : Schéma de fragmentation d'un peptide composé de deux acides aminés</i>	255
<i>Figure 2.8 : Spectre MS/MS du peptide ATEEQLK de la BSA, obtenu par fragmentation de l'ion parent de m/z 818,48</i>	255
<i>Figure 2.9 : Visualisation du recouvrement de séquence de la BSA obtenu lors de l'analyse nanoLC-MS/MS de l'extrait.</i>	259



## Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique  
APOB : Aérosol Primaire d'Origine Biologique  
APPI : Photo-Ionisation à pression atmosphérique  
ARN : Acide ribonucléique  
ASE : Extraction par Solvant Accéléré (= PLE)  
AZA : Azaarène  
BCA : *Bicinchoninic Acid Assay*  
BSA : Albumine de Sérum Bovin  
CAP : Composé Aromatique Polycyclique  
CI : Ionisation Chimique  
CID : Dissociation induite par collision  
COSV : Composé Organique Semi-Volatil  
DDA : Mode d'acquisition « *data-dependent* »  
DTT : Dithiothreitol  
EC : Carbone élémentaire  
EI : Ionisation électronique  
ELISA : immunoabsorption par enzyme liée (*enzyme-linked immunosorbent assay*)  
ESI : Ionisation électrospray  
FA : Acide Formique  
FDR : Taux de faux-positifs  
FISH : Hybridation in situ en fluorescence  
GC : Chromatographie en phase gazeuse  
GFF : Filtre en fibre de verre  
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique  
HRMS : Spectrométrie de Masse à haute résolution  
IAA : Iodoacétamide  
IARC : Agence Internationale de Recherche sur le Cancer  
IT : Trappe Ionique  
LC : Chromatographie en phase liquide  
M : Mole par Litre (mol/L)  
MS : Spectrométrie de Masse  
MS<sup>1</sup> : Première dimension de la Spectrométrie de Masse en tandem  
MS<sup>2</sup> : Deuxième dimension de la Spectrométrie de Masse en tandem  
MS/MS : Spectrométrie de Masse en tandem  
NHAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique nitré (nitro-HAP)  
NIST : Institut national américain des normes et de la technologie  
OC : Carbone organique  
OHAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique oxygéné (oxy-HAP)

OQAI : Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur  
PBS : Tampon phosphate salin  
PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne  
PLE : Extraction par Liquide Pressurisé (= ASE)  
PM : Particules en suspension dans l'air  
PM<sub>2,5</sub> : Particules en suspension dans l'air d'un diamètre inférieur à 2,5 µm  
PM<sub>10</sub> : Particules en suspension dans l'air d'un diamètre inférieur à 10 µm  
Q : Quadripôle  
QQQ : Triple Quadripôle  
SD : Dodécylsulfate de sodium  
SDC : Déoxycholate de sodium  
SDS : Dodécanoate de sodium  
SDS-PAGE : Gel d'électrophorèse monodimensionnel dénaturant  
SHAP : Thiaarène  
SPME : Micro-Extraction sur Phase Solide  
TFA : Acide trifluoroacétique  
TIC : Chromatogramme de courant d'ions total  
TOF : Analyseur à temps de vol  
US EPA : Agence américaine de Protection de l'Environnement

---

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

---

La pollution chimique de l'environnement par les activités humaines a été identifiée comme l'une des neuf « limites planétaires ». Ces limites planétaires servent à déterminer un domaine au sein duquel les activités humaines peuvent s'effectuer de manière durable à l'échelle de la planète, sans altération majeure de l'écosystème. Ce domaine est appelé en anglais « *safe operating space* »<sup>1,2</sup>.

La notion de pollution chimique, renommée « introduction de nouvelles entités chimiques » par Steffen *et al* en 2015 a été définie de la manière suivante : il s'agit de l'ensemble des nouvelles substances, des nouvelles formes de substances existantes, et des formes modifiées de la vie, qui peuvent engendrer des effets biologiques et/ou géophysiques non-désirés<sup>2</sup>. Cela inclut donc tous les composés et les matériaux façonnés et mobilisés par l'Homme pour ses activités, qu'ils aient été naturellement présents sur Terre depuis des millénaires, ou bien créés par l'Homme lui-même<sup>2</sup>. Ceux-ci sont particulièrement sources d'inquiétude lorsqu'ils présentent les caractéristiques suivantes : une persistance dans l'environnement, une mobilité entraînant une large distribution, et des impacts potentiels sur des procédés ou des systèmes vitaux<sup>2</sup>.

Après le changement climatique, l'érosion de la biodiversité, les perturbations globales du cycle de l'azote et du phosphore, et les changements d'utilisation des sols, cette fameuse « introduction de nouvelles entités chimiques » a été, d'après un rapport de 2022, la cinquième limite planétaire franchie sur les neuf existantes<sup>3</sup>. Cela signifie que la production de « nouvelles entités chimiques » qui est en croissance permanente (multipliée par 50 depuis 1950 et vouée à tripler encore entre 2010 et 2050) dépasse largement la capacité de l'humanité à mettre en place des systèmes de suivi adaptés pour évaluer les impacts sanitaires et environnementaux de ces nouvelles entités<sup>3</sup>.

Parmi les environnements affectés par cette problématique de pollution chimique, l'atmosphère est particulièrement concernée. La pollution de l'air est connue pour provoquer de nombreuses maladies, principalement liées aux appareils respiratoires et cardiovasculaires : cancer du poumon, pneumopathie chronique obstructive, infarctus du myocarde, hypertension, arythmies, etc<sup>4</sup> ... Les études majeures les plus récentes estiment l'excès de mortalité causé par la pollution atmosphérique autour de 790 000 décès supplémentaires par an en Europe et entre 6 et 7 millions par an dans le monde<sup>4,5</sup>.

Les activités anthropiques ont considérablement augmenté les niveaux de pollution de l'air depuis la révolution industrielle. Les sources de cette pollution sont largement dominées par les différents procédés de combustion, notamment par celle des combustibles fossiles pour produire de l'énergie, se chauffer ou se déplacer<sup>4,6-8</sup>. Il faut y ajouter une grande diversité d'autres sources, telles que les rejets de l'industrie chimique, les rejets agricoles, les décharges d'ordures, etc<sup>6,9</sup> ... Dans son rapport de 2016, l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a classé des dizaines de substances contribuant à la pollution de l'air en tant que cancérigènes suspects, probables ou certains<sup>9</sup>.

En particulier, dans ce même rapport sur la pollution de l'air, l'IARC a classé la phase particulaire de l'atmosphère comme un carcinogène certain pour l'Homme<sup>9</sup>. D'après Roy M.

Harrison, c'est « de loin, le polluant impactant le plus la santé publique »<sup>10</sup>. Cela est dû à la quantité et à la diversité importante des polluants que cette phase particulaire peut accumuler. En effet, les particules en suspension dans l'air, auxquels on fera par la suite référence sous l'acronyme « PM » pour « Particulate Matter », sont composées de matériaux géologiques issus de la croûte terrestre, d'une fraction inorganique (dominée par les ions sulfate, nitrate et ammonium) et d'une fraction organique qui peut être d'origine biogénique ou anthropique, au sein de laquelle la diversité chimique est encore accrue<sup>6,10-13</sup>.

Cette fraction organique comprend le carbone élémentaire (EC) et le carbone organique (OC) et même si elle n'est pas la plus abondante au sein de la phase particulaire, elle est responsable de la majeure partie de ses effets biologiques néfastes tels que le stress oxydatif<sup>11</sup>. Plus particulièrement, au sein du carbone « organique » sont inclus des myriades de composés semi-volatils, dont l'occurrence qualitative et quantitative est encore trop peu caractérisée au vu de la diversité des molécules, de leurs sources, de leur comportement dans l'atmosphère (stabilité, volatilité, transport longue distance, ...) et de leur toxicité potentielle<sup>6,9,10</sup>. Parmi ces composés, on peut lister les alcanes linéaires, les hopanoïdes, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, mais aussi des composés plus hydrophiles tels que les alcools, les phénols, les acides carboxyliques, les quinones, les saccharides, les acides aminés, etc ...<sup>6,8,13-18</sup>.

Au sein de l'environnement atmosphérique, une autre matrice particulaire est de plus en plus décrite comme une source d'exposition potentielle à un cocktail de polluants : les poussières sédimentées<sup>19,20</sup>. Nous pouvons être confrontés aux poussières par inhalation des particules les plus fines, ingestion ou contact cutané<sup>20-24</sup>. La composition chimique des poussières est influencée à la fois par le transfert de polluants depuis des sources extérieures vers l'intérieur et par les nombreuses sources anthropiques à l'intérieur, parmi lesquelles le chauffage, la cuisine, l'utilisation de matériaux manufacturés, etc<sup>22,23,25</sup> ... Comme pour les PM, on peut relever une immense variété de molécules organiques semi-volatiles et non-volatiles présentes dans les poussières : retardateurs de flamme bromés et phosphorés, substances polyfluoroalkylées, phtalates, hydrocarbures aromatiques polycycliques, pesticides, polyéthylènes glycols, etc<sup>21-23,25-28</sup> ...

Il est donc particulièrement intéressant d'étudier les poussières sédimentées mais aussi les aérosols comme témoins de la pollution de l'air intérieur. En effet, d'après des mesures de l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur (OQAI) créé en 2001, l'air intérieur est plus pollué, quantitativement et qualitativement, qu'en extérieur<sup>29,30</sup>. De plus, la fraction du temps que les individus passent dans les environnements intérieurs est estimée autour de 90%, ce qui renforce la significativité de la pollution de ces environnements<sup>19,22</sup>.

Il est désormais possible d'avoir un bon aperçu la composition qualitative globale des PM et des poussières par une étude bibliographique rassemblant un grand corpus de publications. En revanche, il est très difficile d'obtenir une caractérisation fine, à la fois qualitative et quantitative, d'un seul groupe d'échantillons dans une même étude. En effet, la longue liste de composés rapportée ci-dessus, qui est pourtant loin d'être exhaustive, implique de nombreuses méthodes

analytiques qui seraient nécessaires pour étudier chacune de ces familles de molécules mais qui diffèrent par leurs méthodes d'extraction, de séparation, de détection, ainsi que par leurs limites de quantification par exemple.

Comment obtenir simultanément des informations sur tous les composés organiques présents dans un échantillon de PM ou de poussière et en tirer des conclusions pertinentes sur leurs sources d'émission ? C'est un challenge majeur de la recherche actuelle en analyse environnementale.

Les évolutions technologiques de l'instrumentation en spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) ont fait émerger ces dernières années un domaine particulièrement prometteur : l'analyse non-ciblée par spectrométrie de masse haute-résolution<sup>21,22,25,31-34</sup>. Ce type de méthodes permet, grâce à de riches bases de données de spectres de masse et des traitements de données informatiques adaptés, d'interpréter énormément de spectres de masse à haute résolution générés pour un échantillon environnemental. Ainsi, on peut identifier une grande quantité d'espèces présentes dans cet échantillon, ou encore décrire des tendances de composition élémentaire de la fraction organique, notamment de son état d'oxydation.

Néanmoins, il reste encore des « trous dans la raquette » de l'analyse non-ciblée : Quid des composés qui ne sont pas ionisés par la (ou les) méthode(s) d'ionisation choisie(s) ? Des composés qui se dégradent au cours du protocole analytique ? Des composés qui sont absents des banques de spectres ? Des isomères qui donnent exactement les mêmes spectres de masse, et qui peuvent pourtant avoir des propriétés bien différentes ? Et comment obtenir une information quantitative sur les échantillons étudiés ?

Ainsi, malgré les progrès apportés par l'analyse non-ciblée, la chimie environnementale a toujours besoin de méthodes d'analyse ciblées, qui permettent de quantifier avec précision des molécules cibles grâce à l'utilisation de standards analytiques purs.

Le premier objectif de cette thèse était donc de développer des méthodes d'analyse ciblées pour identifier et quantifier des polluants organiques émergents à l'état de traces dans des poussières déposées et des aérosols, avec un intérêt particulier pour les environnements intérieurs. Les polluants organiques sélectionnés pour cette partie sont les composés aromatiques polycycliques (CAP) et les fullerènes, deux classes de composés principalement issus de procédés de combustion, par des sources domestiques, véhiculaires ou industrielles notamment<sup>35-37</sup>. Ainsi, une méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS) a été développée pour les CAP et une méthode de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) a été développée pour les fullerènes. Toutes deux seront présentées dans ce manuscrit.

Mais, en plus de la pollution chimique des poussières et des aérosols, il est également nécessaire de considérer leur fraction biologique. Les aérosols primaires d'origine biologiques (APOB) sont des composants ubiquistes de la fraction particulaire de l'atmosphère<sup>38</sup>. Ils sont constitués, entre autres, de bactéries, de spores fongiques, de polymères biogéniques, de fragments d'animaux ou de végétaux<sup>39-41</sup>. Ces sources donnent lieu à une grande diversité moléculaire dans la fraction biologique des particules et des poussières : ADN, ARN, protéines,



acides aminés, lipides, saccharides, etc <sup>39-41</sup> ... Comme la fraction chimique, la fraction biologique peut avoir des impacts délétères sur la santé avec notamment des effets infectieux, respiratoires et allergéniques <sup>42,43</sup>. Plus particulièrement, celle des particules les plus fines peut pénétrer jusqu'aux alvéoles pulmonaires et induire des effets néfastes très significatifs <sup>44</sup>.

Jusqu'à présent, les principales méthodes analytiques qui ont été employées pour caractériser les bioaérosols sont :

- la microscopie optique, pertinente pour la caractérisation des grains de pollens et des spores fongiques <sup>39,45,46</sup>,
- la culture cellulaire, pour l'étude des bactéries et des champignons vivants <sup>39</sup>,
- les analyses génomiques <sup>39,47</sup>,
- la quantification des protéines totales par des dosages colorimétriques <sup>48,49</sup>,
- la quantification de protéines cibles individuelles par des immunotests <sup>50,51</sup>,
- l'analyse de traceurs moléculaires tels que les saccharides ou les acides aminés <sup>18,39,52</sup>.

Aucune des méthodes analytiques citées ci-dessus ne permet donc une identification simultanée de toute la fraction protéique d'un échantillon particulière. C'est pourquoi une nouvelle approche a émergé ces dernières années : la métaprotéomique. Elle a été définie pour la première fois en 2004 par Wilmes et Bond comme « la caractérisation globale de l'ensemble des protéines d'un microbiote environnemental à un temps donné » <sup>53</sup>. La métaprotéomique permet donc, par la caractérisation de l'ensemble des protéines d'un échantillon environnemental, une caractérisation fonctionnelle des communautés microbiennes (bactériennes ou fongiques entre autres) présentes à un temps donné dans un environnement donné <sup>54,55</sup>.

Cette approche a déjà été utilisée pour caractériser des protéomes dans l'océan <sup>56</sup>, dans les eaux usées et les boues de station d'épuration <sup>57,58</sup>, dans les sols <sup>59,60</sup>, ou encore dans des échantillons humains tels que des tissus de l'appareil digestif <sup>55</sup>, mais jusqu'à présent, seules deux publications ont rapporté l'application de la métaprotéomique aux aérosols <sup>54,61</sup>. Toutes ces méthodes d'analyse métaprotéomique se basent sur des protocoles de protéomique « bottom-up », et caractérisent donc le protéome de l'échantillon grâce à l'analyse de peptides.

Le dernier volet de ces travaux de doctorat consiste donc en la mise en place d'une méthode de screening métaprotéomique pour application aux aérosols et aux poussières. Dans cette optique, le principal enjeu du développement de méthode était l'identification de conditions d'extraction permettant une récupération quantitative des protéines présentes dans les matrices d'intérêt, et une confirmation de l'efficacité de l'extraction pour une large gamme de protéines, après application de l'ensemble du protocole « bottom-up ».

## Références

- (1) Rockström, J.; Steffen, W.; Noone, K.; Persson, Å.; Chapin, F. S. I.; Lambin, E.; Lenton, T. M.; Scheffer, M.; Folke, C.; Schellnhuber, H. J.; Nykvist, B.; de Wit, C. A.; Hughes, T.; van der Leeuw, S.; Rodhe, H.; Sörlin, S.; Snyder, P. K.; Costanza, R.; Svedin, U.; Falkenmark, M.; Karlberg, L.; Corell, R. W.; Fabry, V. J.; Hansen, J.; Walker, B.; Liverman, D.; Richardson, K.; Crutzen, P.; Foley, J. *Ecol. Soc.* **2009**, *14* (2), art32.
- (2) Steffen, W.; Richardson, K.; Rockström, J.; Cornell, S. E.; Fetzer, I.; Bennett, E. M.; Biggs, R.; Carpenter, S. R.; de Vries, W.; de Wit, C. A.; Folke, C.; Gerten, D.; Heinke, J.; Mace, G. M.; Persson, L. M.; Ramanathan, V.; Reyers, B.; Sörlin, S. *Science* **2015**, *347* (6223), 1259855.
- (3) Persson, L.; Carney Almroth, B. M.; Collins, C. D.; Cornell, S.; de Wit, C. A.; Diamond, M. L.; Fantke, P.; Hassellöv, M.; MacLeod, M.; Ryberg, M. W.; Søggaard Jørgensen, P.; Villarrubia-Gómez, P.; Wang, Z.; Hauschild, M. Z. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, acs.est.1c04158.
- (4) Landrigan, P. J.; Fuller, R.; Acosta, N. J. R.; Adeyi, O.; Arnold, R.; Basu, N. (Nil); Baldé, A. B.; Bertollini, R.; Bose-O'Reilly, S.; Boufford, J. I.; Breyse, P. N.; Chiles, T.; Mahidol, C.; Coll-Seck, A. M.; Cropper, M. L.; Fobil, J.; Fuster, V.; Greenstone, M.; Haines, A.; Hanrahan, D.; Hunter, D.; Khare, M.; Krupnick, A.; Lanphear, B.; Lohani, B.; Martin, K.; Mathiasen, K. V.; McTeer, M. A.; Murray, C. J. L.; Ndahimananjara, J. D.; Perera, F.; Potočnik, J.; Preker, A. S.; Ramesh, J.; Rockström, J.; Salinas, C.; Samson, L. D.; Sandilya, K.; Sly, P. D.; Smith, K. R.; Steiner, A.; Stewart, R. B.; Suk, W. A.; van Schayck, O. C. P.; Yadama, G. N.; Yumkella, K.; Zhong, M. *The Lancet* **2018**, *391* (10119), 462–512.
- (5) Lelieveld, J.; Klingmüller, K.; Pozzer, A.; Pöschl, U.; Fnais, M.; Daiber, A.; Münzel, T. *Eur. Heart J.* **2019**, *40* (20), 1590–1596.
- (6) Schauer, J. J.; Rogge, W. F.; Hildemann, L. M.; Mazurek, M.; Cass, G. R.; Simoneit, B. R. T. *Atmos. Environ.* **1996**, *30* (22), 3837–3855.
- (7) Gentner, D. R.; Isaacman, G.; Worton, D. R.; Chan, A. W. H.; Dallmann, T. R.; Davis, L.; Liu, S.; Day, D. A.; Russell, L. M.; Wilson, K. R.; Weber, R.; Guha, A.; Harley, R. A.; Goldstein, A. H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (45), 18318–18323.
- (8) Cass, G. R. *TrAC Trends Anal. Chem.* **1998**, *17* (6), 356–366.
- (9) IARC. *Outdoor Air Pollution*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2016; Vol. 109.
- (10) Harrison, R. M. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2020**, *378* (2183), 20190319.
- (11) Daellenbach, K. R.; Uzu, G.; Jiang, J.; Cassagnes, L.-E.; Leni, Z.; Vlachou, A.; Stefanelli, G.; Canonaco, F.; Weber, S.; Segers, A.; Kuenen, J. J. P.; Schaap, M.; Favez, O.; Albinet, A.; Aksoyoglu, S.; Dommen, J.; Baltensperger, U.; Geiser, M.; El Haddad, I.; Jaffrezo, J.-L.; Prévôt, A. S. H. *Nature* **2020**, *587* (7834), 414–419.
- (12) Simoneit, B. R. T. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **1999**, *6* (3), 159–169.
- (13) Rogge, W. F.; Mazurek, M. A.; Hildemann, L. M.; Cass, G. R.; Simoneit, B. R. T. *Atmospheric Environ. Part Gen. Top.* **1993**, *27* (8), 1309–1330.
- (14) Noblet, C.; Besombes, J.-L.; Lemire, M.; Pin, M.; Jaffrezo, J.-L.; Favez, O.; Aujay-Plouzeau, R.; Dermigny, A.; Karoski, N.; Van Elslande, D.; Dubois, P.; Collet, S.; Lestremieu, F.; Albinet, A. *Sci. Total Environ.* **2021**, *798*, 149367.
- (15) Robinson, A. L.; Subramanian, R.; Donahue, N. M.; Bernardo-Bricker, A.; Rogge, W. F. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (24), 7803–7810.
- (16) Robinson, A. L.; Subramanian, R.; Donahue, N. M.; Bernardo-Bricker, A.; Rogge, W. F. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (24), 7811–7819.
- (17) Robinson, A. L.; Subramanian, R.; Donahue, N. M.; Bernardo-Bricker, A.; Rogge, W. F. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (24), 7820–7827.
- (18) Schneider, J.; Freutel, F.; Zorn, S. R.; Chen, Q.; Farmer, D. K.; Jimenez, J. L.; Martin, S. T.; Artaxo, P.; Wiedensohler, A.; Borrmann, S. *Atmospheric Chem. Phys.* **2011**, *11* (22), 11415–11429.
- (19) Maertens, R. M.; Bailey, J.; White, P. A. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2004**, *567* (2–3), 401–425.
- (20) ANSES. Exposition aux poussières sédimentées dans les environnements intérieurs; Rapport d'expertise collective 2017-SA-0192; 2019.

- (21) Moschet, C.; Anumol, T.; Lew, B. M.; Bennett, D. H.; Young, T. M. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52* (5), 2878–2887.
- (22) Dubocq, F.; Kärrman, A.; Gustavsson, J.; Wang, T. *Environ. Pollut.* **2021**, *276*, 116701.
- (23) Dong, T.; Zhang, Y.; Jia, S.; Shang, H.; Fang, W.; Chen, D.; Fang, M. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53* (12), 7045–7054.
- (24) Mitro, S. D.; Dodson, R. E.; Singla, V.; Adamkiewicz, G.; Elmi, A. F.; Tilly, M. K.; Zota, A. R. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50* (19), 10661–10672.
- (25) Rostkowski, P.; Haglund, P.; Aalizadeh, R.; Alygizakis, N.; Thomaidis, N.; Arandes, J. B.; Nizzetto, P. B.; Booij, P.; Budzinski, H.; Brunswick, P.; Covaci, A.; Gallampois, C.; Grosse, S.; Hindle, R.; Ipolyi, I.; Jobst, K.; Kaserzon, S. L.; Leonards, P.; Lestremau, F.; Letzel, T.; Magnér, J.; Matsukami, H.; Moschet, C.; Oswald, P.; Plassmann, M.; Slobodnik, J.; Yang, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411* (10), 1957–1977.
- (26) de Boer, J.; Ballesteros-Gómez, A.; Leslie, H. A.; Brandsma, S. H.; Leonards, P. E. G. *Chemosphere* **2016**, *150*, 461–464.
- (27) Weschler, C. J.; Nazaroff, W. W. *Atmos. Environ.* **2010**, *44* (30), 3609–3620.
- (28) Vishnu Sreejith, M.; Aradhana, K. S.; Varsha, M.; Cyrus, M. K.; Aravindakumar, C. T.; Aravind, U. K. *Sci. Total Environ.* **2021**, *783*, 147066.
- (29) Blandin, M.-C. Risques et dangers pour la santé humaine de substances chimiques d'usage courant : éthers de glycol et polluants de l'air intérieur. Évaluation de l'expertise publique et des choix opérés. Tome I : Conclusions du rapporteur; 2008.
- (30) Blandin, M.-C. Risques et dangers pour la santé humaine de substances chimiques d'usage courant : éthers de glycol et polluants de l'air intérieur. Évaluation de l'expertise publique et des choix opérés. Tome II : Comptes rendus des auditions; 2008.
- (31) Olanrewaju, C. A.; Ramirez, C. E.; Fernandez-Lima, F. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (15), 6080–6087.
- (32) Steimer, S. S.; Patton, D. J.; Vu, T. V.; Panagi, M.; Monks, P. S.; Harrison, R. M.; Fleming, Z. L.; Shi, Z.; Kalberer, M. *Atmospheric Chem. Phys.* **2020**, *20* (21), 13303–13318.
- (33) Al-Naiema, I. M.; Hettiyadura, A. P. S.; Wallace, H. W.; Sanchez, N. P.; Madler, C. J.; Cevik, B. K.; Bui, A. A. T.; Kettler, J.; Griffin, R. J.; Stone, E. A. *Atmospheric Chem. Phys.* **2018**, *18* (21), 15601–15622.
- (34) Xie, Q.; Su, S.; Chen, S.; Xu, Y.; Cao, D.; Chen, J.; Ren, L.; Yue, S.; Zhao, W.; Sun, Y.; Wang, Z.; Tong, H.; Su, H.; Cheng, Y.; Kawamura, K.; Jiang, G.; Liu, C.-Q.; Fu, P. *Atmospheric Chem. Phys.* **2020**, *20* (11), 6803–6820.
- (35) Apicella, B.; Russo, C.; Carpentieri, A.; Tregrossi, A.; Ciajolo, A. *Fuel* **2022**, *309*, 122356.
- (36) Benn, T.; Herckes, P.; Westerhoff, P. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Elsevier, 2012; Vol. 59, pp 291–303.
- (37) Mitra, S.; Ray, B. *Atmos. Environ.* **1995**, *29* (22), 3345–3356.
- (38) Carslaw, K. S.; Boucher, O.; Spracklen, D. V.; Mann, G. W.; Rae, J. G. L.; Woodward, S.; Kulmala, M. *Atmospheric Chem. Phys.* **2010**, *10* (4), 1701–1737.
- (39) Després, V. R.; Huffman, J. A.; Burrows, S. M.; Hoose, C.; Safatov, A. S.; Buryak, G.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Elbert, W.; Andreae, M. O.; Pöschl, U.; Jaenicke, R. *Tellus B Chem. Phys. Meteorol.* **2012**, *64* (1), 15598.
- (40) Pomés, A.; Chapman, M. D.; Wünschmann, S. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2016**, *16* (6), 43.
- (41) Šantl-Temkiv, T.; Sikoparija, B.; Maki, T.; Carotenuto, F.; Amato, P.; Yao, M.; Morris, C. E.; Schnell, R.; Jaenicke, R.; Pöhlker, C.; DeMott, P. J.; Hill, T. C. J.; Huffman, J. A. *Aerosol Sci. Technol.* **2020**, *54* (5), 520–546.
- (42) Reinmuth-Selzle, K.; Kampf, C. J.; Lucas, K.; Lang-Yona, N.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Shiraiwa, M.; Lakey, P. S. J.; Lai, S.; Liu, F.; Kunert, A. T.; Ziegler, K.; Shen, F.; Sgarbanti, R.; Weber, B.; Bellinghausen, I.; Saloga, J.; Weller, M. G.; Duschl, A.; Schuppan, D.; Pöschl, U. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (8), 4119–4141.
- (43) Singh, A. B. *Glob. J. Immunol. Allerg. Dis.* **2014**, *2* (1), 19–28.
- (44) Guarnieri, M.; Balmes, J. R. *The Lancet* **2014**, *383* (9928), 1581–1592.

- (45) Prass, M.; Andreae, M. O.; de Araùjo, A. C.; Artaxo, P.; Ditas, F.; Elbert, W.; Förster, J.-D.; Franco, M. A.; Hrabce de Angelis, I.; Kesselmeier, J.; Klimach, T.; Kremper, L. A.; Thines, E.; Walter, D.; Weber, J.; Weber, B.; Fuchs, B. M.; Pöschl, U.; Pöhlker, C. *Biogeosciences* **2021**, *18* (17), 4873–4887.
- (46) Hamzé, M. Vers une meilleure connaissance de l'exposition aux grains de pollens allergisants et de leur altération par la pollution de l'air; Université de Lille, 2022.
- (47) Frohlich-Nowoisky, J.; Pickersgill, D. A.; Despres, V. R.; Poschl, U. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (31), 12814–12819.
- (48) Miguel, A. G.; Cass, G. R.; Glovsky, M. M.; Weiss, J. *Env. Sci Technol* **1999**, *33* (23), 4159–4168.
- (49) Staton, S. J. R.; Woodward, A.; Castillo, J. A.; Swing, K.; Hayes, M. A. *Ecol. Indic.* **2015**, *48*, 389–395.
- (50) Buters, J. T. M.; Thibaudon, M.; Smith, M.; Kennedy, R.; Rantio-Lehtimäki, A.; Albertini, R.; Reese, G.; Weber, B.; Galan, C.; Brandao, R.; Antunes, C. M.; Jäger, S.; Berger, U.; Celenk, S.; Grewling, L.; Jackowiak, B.; Sauliene, I.; Weichenmeier, I.; Pusch, G.; Sarioglu, H.; Ueffing, M.; Behrendt, H.; Prank, M.; Sofiev, M.; Cecchi, L. *Atmos. Environ.* **2012**, *55*, 496–505.
- (51) Dallongeville, A.; Le Cann, P.; Zmirou-Navier, D.; Chevrier, C.; Costet, N.; Annesi-Maesano, I.; Blanchard, O. *Sci. Total Environ.* **2015**, *536*, 964–972.
- (52) Samaké, A.; Jaffrezo, J.-L.; Favez, O.; Weber, S.; Jacob, V.; Albinet, A.; Riffault, V.; Perdrix, E.; Waked, A.; Golly, B.; Salameh, D.; Chevrier, F.; Oliveira, D. M.; Bonnaire, N.; Besombes, J.-L.; Martins, J. M. F.; Conil, S.; Guillaud, G.; Mesbah, B.; Rocq, B.; Robic, P.-Y.; Hulin, A.; Le Meur, S.; Descheemaeker, M.; Chretien, E.; Marchand, N.; Uzu, G. *Atmospheric Chem. Phys.* **2019**, *19* (5), 3357–3374.
- (53) Wilmes, P.; Bond, P. L. *Environ. Microbiol.* **2004**, *6* (9), 911–920.
- (54) Piovesana, S.; Capriotti, A. L.; Foglia, P.; Montone, C. M.; La Barbera, G.; Zenezini Chiozzi, R.; Laganà, A.; Cavaliere, C. *Proteomics* **2019**, *19* (23), 1900152.
- (55) Van Den Bossche, T.; Kunath, B. J.; Schallert, K.; Schäpe, S. S.; Abraham, P. E.; Armengaud, J.; Arntzen, M. Ø.; Bassignani, A.; Benndorf, D.; Fuchs, S.; Giannone, R. J.; Griffin, T. J.; Hagen, L. H.; Halder, R.; Henry, C.; Hettich, R. L.; Heyer, R.; Jagtap, P.; Jehmlich, N.; Jensen, M.; Juste, C.; Kleiner, M.; Langella, O.; Lehmann, T.; Leith, E.; May, P.; Mesuere, B.; Miotello, G.; Peters, S. L.; Pible, O.; Queiros, P. T.; Reichl, U.; Renard, B. Y.; Schiebenhoefer, H.; Sczyrba, A.; Tanca, A.; Trappe, K.; Trezzi, J.-P.; Uzzau, S.; Verschaffelt, P.; von Bergen, M.; Wilmes, P.; Wolf, M.; Martens, L.; Muth, T. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 7305.
- (56) Saito, M. A.; Bertrand, E. M.; Duffy, M. E.; Gaylord, D. A.; Held, N. A.; Hervey, W. J.; Hettich, R. L.; Jagtap, P. D.; Janech, M. G.; Kinkade, D. B.; Leary, D. H.; McIlvin, M. R.; Moore, E. K.; Morris, R. M.; Neely, B. A.; Nunn, B. L.; Saunders, J. K.; Shepherd, A. I.; Symmonds, N. I.; Walsh, D. A. *J. Proteome Res.* **2019**, *18* (4), 1461–1476.
- (57) Püttker, S.; Kohrs, F.; Benndorf, D.; Heyer, R.; Rapp, E.; Reichl, U. *Proteomics* **2015**, *15* (20), 3596–3601.
- (58) Li, S.; Hu, S.; Shi, S.; Ren, L.; Yan, W.; Zhao, H. *RSC Adv.* **2019**, *9* (40), 22841–22852.
- (59) Benndorf, D.; Balcke, G. U.; Harms, H.; von Bergen, M. *ISME J.* **2007**, *1* (3), 224–234.
- (60) Bona, E.; Massa, N.; Novello, G.; Boatti, L.; Cesaro, P.; Todeschini, V.; Magnelli, V.; Manfredi, M.; Marengo, E.; Mignone, F.; Berta, G.; Lingua, G.; Gamalero, E. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *95*.
- (61) Liu, F.; Lai, S.; Reinmuth-Selzle, K.; Scheel, J. F.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Després, V. R.; Hoffmann, T.; Pöschl, U.; Kampf, C. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (23), 6337–6348.



---

## **PREMIÈRE PARTIE :**

# **DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODE POUR L'ANALYSE DE COMPOSÉS AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS LES PARTICULES ET LES POUSSIÈRES PAR GC-MS/MS**

---

Parmi les composés organiques semi-volatils (COSV) qui peuvent se trouver dans les particules et les poussières, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des molécules connues pour leur occurrence fréquente (généralement issue de phénomènes de combustion) et pour leur importance toxicologique pour l'Homme.

Les études environnementales de cette famille ont longtemps été restreintes à une liste de 16 HAP établie par l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (US EPA) dans les années 70. Depuis, des données ont émergé pour d'autres composés. Celles-ci encouragent la communauté scientifique à élargir le spectre de la recherche sur les dangers environnementaux et sanitaires liés aux HAP, et donc à inclure dans les études d'autres Composés Aromatiques Polycycliques (CAP), y compris des dérivés polaires ou hétérocycliques, avec une gamme de masse moléculaire la plus large possible.

Cet objectif soulève de nombreux enjeux analytiques. En effet, pour l'atteindre, il faut être capable de mettre en place des méthodes analytiques qui soient sensibles et robustes pour des composés qui peuvent différer grandement par leur polarité et leur volatilité notamment. Ainsi, toutes les étapes du protocole analytique, de l'échantillonnage à la détection, sont à prendre en compte et à optimiser.

L'état de l'art des méthodes analytiques présentées dans la littérature pour l'analyse de cinq groupes de CAP dans les matrices particulaires atmosphériques a été résumé dans un manuscrit en anglais accepté en 2020 et publié en 2021 dans le journal à comité de lecture *Trends in Analytical Chemistry*. Les groupes de CAP étudiés dans cette revue bibliographique sont les suivants : les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les HAP oxygénés (OHAP), les HAP nitrés (NHAP), les Azaarènes (AZA) et les Thiaarènes (SHAP).

La revue a été divisée en deux parties :

- La première se concentre sur les méthodes d'échantillonnage des particules et des poussières ainsi que sur l'extraction des CAP dans ces échantillons.

- La seconde couvre les méthodes instrumentales utilisées dans la littérature pour l'analyse des CAP, ainsi que les niveaux d'occurrence attendus pour ces molécules dans les environnements atmosphériques étudiés.

Les deux parties de ce manuscrit constitueront les deux premiers chapitres de cette thèse.

## Chapitre 1 :

# Analyse environnementale de Composés Aromatiques Polycycliques polaires et apolaires dans les aérosols, les poussières et les suies : Échantillonnage et préparation d'échantillon

## **Environmental analysis of polar and non-polar Polycyclic Aromatic Compounds in airborne particulate matter, settled dust and soot:**

### **Part I: Sampling and sample preparation**

Mathieu Galmiche, Olivier Delhomme, Yannis-Nicolas François, Maurice Millet

*TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2021**, 134, 116099

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116099>

### **1.1. Introduction**

PAHs have been reported as major hazardous compounds in various environments for decades. From the 1970s, efforts have been made in the United States of America to define a list of priority pollutants, finally resulting in the well-known U.S. EPA's 16 PAH Priority Pollutants list <sup>1</sup>.

The toxicity, carcinogenicity and mutagenicity of PAHs have been assessed and reported by the International Agency for Research on Cancer (IARC) since 1983 with regular updates <sup>2-5</sup>, but due to the high number of compounds which can be classified as PAHs, it can be tough to assess with certainty the human health risks related to various individual PAHs in environmental samples. Indeed, about 500 PAHs have already been detected in ambient air, and PAHs exposure always happens with complex mixtures <sup>5,6</sup>. Therefore, relying only on individual PAHs or on the sum of the 16 EPA PAHs is not sufficient for a reliable evaluation <sup>7</sup>. Methods have been developed to characterize health and environmental risks based on a single reference compound : Benzo[a]Pyrene (B[a]P), the first PAH to have been thoroughly studied in terms of toxicology <sup>6,8,9</sup>. Toxic Equivalency Factor (TEF) and Potency Equivalency Factor (PEF) approaches with respect to B[a]P have been implemented by various authors to summarize the risks related to PAH occurrence in the environment <sup>8,10-12</sup>. However, even with such kinds of approaches, the PAHs-related carcinogenicity of a sample can be underestimated. Indeed, TEFs and PEFs should be handled with care as they are often approximations. Moreover, for too long, many toxic PAHs with potencies comparable to or higher than B[a]P have been neglected <sup>7,12</sup>.

Furthermore, a lot of risk assessment studies are restricted to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the narrow sense of the term. This can be a major shortcut, since there is growing



evidence that polar Polycyclic Aromatic Compounds (PACs) are crucial compounds in terms of toxicity, carcinogenicity and mutagenicity. Indeed, some of them have a more significant toxicology than the non-polar PAHs, because unlike PAHs, they do not require a prior enzymatic activation to exert their toxicity<sup>10,13,14</sup>. Thus, nitrated PAHs for instance have been reported as accounting for over half of the total direct mutagenicity of ambient air<sup>15</sup>. Among polar PACs, nitrated PAHs (NPAHs) and oxygenated PAHs (OPAHs) are the most studied<sup>16–18</sup>.

In addition to NPAHs and OPAHs, other polar PACs are of a growing interest: azaarenes (AZAs), sometimes alternatively referred to as Polycyclic Aromatic Nitrogen Heterocycles (PANHs), and Polycyclic Aromatic Sulfur Heterocycles (PASHs). While AZAs are quite similar to the above-mentioned PAHs, NPAHs and OPAHs in terms of sources and toxicology<sup>10,19,20</sup>, PASHs are particularly typical of petrogenic emissions and have been studied sooner in the evolution of environmental analysis of PACs<sup>21,22</sup>. Both categories have also been studied by the IARC and some of their compounds have been classified as possible or probable carcinogens<sup>23</sup>.

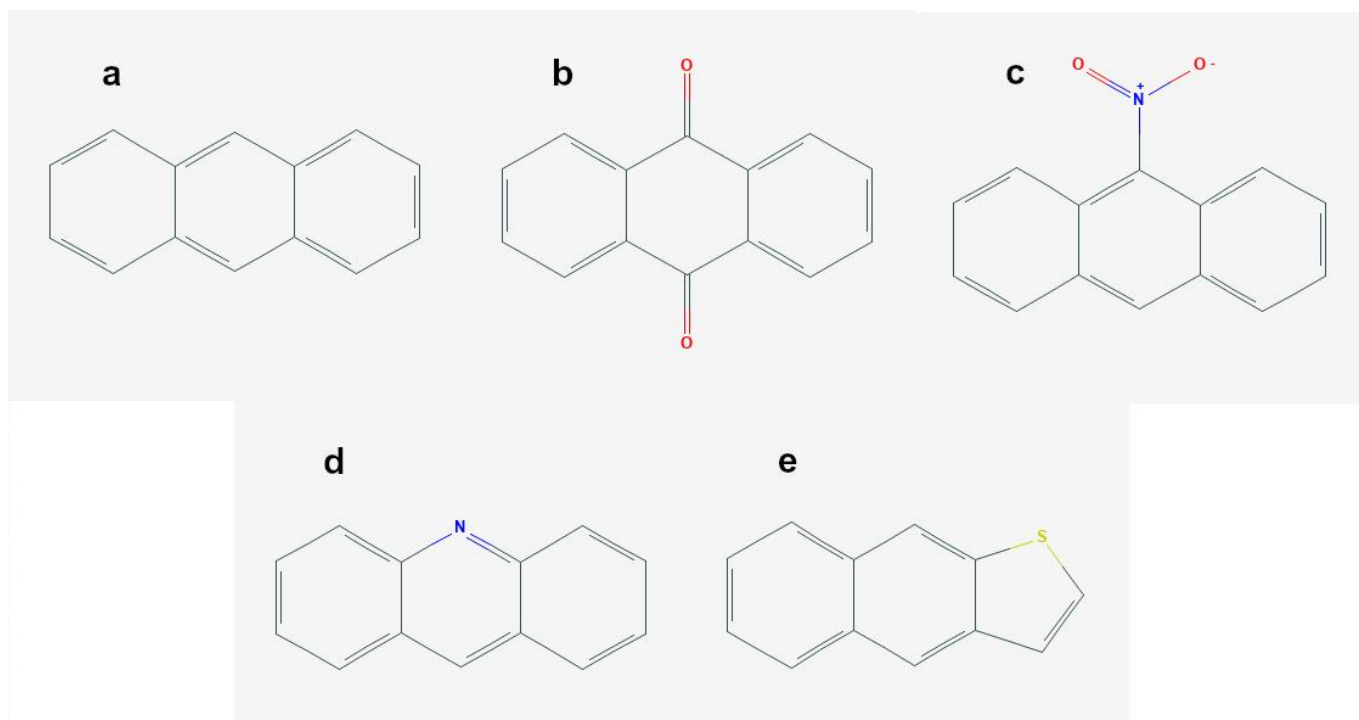
To illustrate chemical differences between these categories of PACs, Figure 1.1 gathers the chemical structures of 3-ring oxygenated, nitrated, nitrogen heterocycle and sulfur heterocycle variants of anthracene.

Airborne particulate matter, dusts and soots have been widely described as major sources of exposure to PAHs for human beings in indoor<sup>24–30</sup> as well as in outdoor environments<sup>30–33</sup>. These matrices also play an important role in the exposure to polar PACs and their content of polar PACs has been growingly reported in recent years<sup>20,31,33–38</sup>.

For PACs occurrence studies, particular focuses have been made on atmospheric particulate matter (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>1</sub>) because of its well-known negative health effects<sup>18,39</sup>. These effects are especially pronounced for the smallest of these particles, because of their higher surface area per unit mass, in addition to their deeper penetration into lungs<sup>40,41</sup>. According to the IARC, “there is sufficient evidence in humans for the carcinogenicity of particulate matter in outdoor air pollution”<sup>42</sup>. PACs account for an important part of this carcinogenicity. Other particulate matters such as settled dusts of indoor environments<sup>24,25,27–29</sup>, “environmental” third-hand smoke (ETS)<sup>43–46</sup>, urban road dust<sup>32,47–49</sup>, particulate exhausts and soots from vehicular emissions<sup>32,50–52</sup>, are also of a great concern because of their ability to host toxic semi-volatile organic compounds (SVOCs) such as PACs.

The purpose of this paper is to review the different options available to analytical scientists willing to implement methods for the determination of polar and non-polar Polycyclic Aromatic Compounds in airborne particulate matter, dust and soot, especially for environmental evaluation of human exposure pathways to these pollutants.

In a first part, we will focus on the sampling methods applicable to airborne particulate matter and settled dust, and on the preparation of such particulate samples for an optimal extraction of the analytes and a good clean-up of the sample.



**Figure 1.1 : Chemical structures of various 3-ring PACs: a) Anthracene (PAH); b) 9,10-Anthraquinone (OPAH); c) 9-Nitroanthracene (NPAH); d) Acridine (AZA); e) Naphtho[2,3-b]thiophene (PASH).**

## 1.2. Sampling

### 1.2.1. Atmospheric particulate matter

In terms of sample collection techniques, only a few possibilities are currently implemented in the different studies about PACs analysis in atmospheric PM.

In the vast majority of cases, PM are collected on quartz-fiber filters (QFF) <sup>20,36,53–60</sup>. The main advantages of QFFs over glass-fiber filters (GFF), which can also be used for this kind of sampling <sup>37,61,62</sup>, are the higher purity of the material, leading to lower blank levels <sup>63</sup>, and its higher thermal stability, enabling the determination of organic and elemental carbon (OC/EC) by calcinating the filter at up to 850°C <sup>36,64,65</sup>, a temperature range at which glass filters would be degraded. Therefore, QFF seem to be a better choice than GFF.

An alternative to siliceous materials is the use of organic filters such as PTFE membrane filters <sup>45,66–68</sup>. Generally speaking, these latter are less employed for organic pollutants analysis because of their higher content in organic compounds, increasing the risk of contamination in comparison to their inorganic counterparts. In the other hand, as a drawback, glass and quartz show a much higher physical fragility than PTFE.

Inorganic filters are generally baked out at very high temperatures ( $\geq 350^{\circ}\text{C}$ ) for 6 to 24 hours for their decontamination prior to sampling <sup>36,37,54–56,58,65</sup>. The poor thermal stability of organic filters disables this treatment, which is why washing with organic solvents is preferable <sup>69</sup>. Such solvent washings are also applicable to inorganic filters <sup>20</sup>. Some authors rather proposed a “mild” conditioning of their PTFE filters at stable temperature (20 to 25°C) and humidity (40 to 50%) for 24 to 48 hours <sup>59,66</sup>. This accounts for the absorption of water vapor <sup>70</sup>.

For PM collection, sampling heads designed for PM<sub>10</sub> or PM<sub>2.5</sub> are generally adapted on active air samplers <sup>36,45,56,59</sup>. To get more accurate information about the PACs size-fractionation in atmospheric PM, it is possible to use devices differentiating various fractions of PM according to their size.

The most used is the cascade impactor <sup>19,34,57,60,66,71–74</sup>. This device is based on the progressive removal of particles of higher aerodynamic diameter, so that particles of various diameters can be separated into multiple (from 4 to 13) fractions, from the sub-0.1µm range to particles larger than 10µm. The theory of the cascade impactor has been described more precisely by Liaud et al. <sup>61</sup>. The only influence of the use of a cascade impactor instead of “classical” sampling heads on the design of the pumping system is that the selected air flow should meet the requirements prescribed by the impactor manufacturer.

However, a technical issue is likely to arise with cascade impactor: too low mass loadings. Indeed, as the sampled particles are split up, sometimes in a dozen of fractions, the quantities collected on each stage can be insufficient for further analysis. In such cases, either the sampling time should be increased, or multiple fractions should be brought together, but then the information on size fractionation is less precise.

Another possibility to study size distribution is the use of a light-scattering particle counter<sup>68,70</sup>. However, as suggested by the term “counter”, it only gives information about the number and mass concentration for each particle channel. It does not enable to collect the PM fractions for further analyses.

All the PM collection systems introduced above rely on active air samplers. These ones can be divided into three categories: high-volume, medium-volume, and low-volume.

A table summarizing various recent works on PACs in airborne particulate matter, with regard to the PM collection system, the active sampler and the main sampling parameters (flow rate, time, total volume) implemented, is presented in the Supplemental Content of this article ([Table S1](#)).

When discussing the sampling of particulate matter, attention needs to be drawn on possible analytical biases. The first one was highlighted by Albinet et al. for NPAHs, which could be degraded at the sampling stage depending on the temperature inside the sampler<sup>75</sup>. This is a parameter to take into account especially for outdoor sampling campaigns where temperature variations can affect a lot more the results than when sampling is performed in indoor environments.

Conversely, the study of Goriaux et al. highlighted the risk of over-estimation of polar PACs such as NPAHs and under-estimation of PAHs due to on-filter degradation reactions of the parent PAHs<sup>76</sup>. Consistently with the results of Schauer et al. and Tsapakis and Stephanou, they identified O<sub>3</sub> and OH radical as major oxidizing agents responsible for the on-filter degradation of PAHs during sampling, even if the role of NO<sub>x</sub> cannot be excluded<sup>77,78</sup>. Ozone levels and sampling time are therefore important parameters to take into account when assessing the risk of sampling artifacts for these compounds.

Similarly, such kinds of reactions can lead to artifact formations of OPAHs. The main solution prescribed to reduce these artifacts is the use of a denuder able to trap or deactivate gas phase oxidants such as ozone. The reduction of the risk of artifact formation of polar PAHs derivatives induced by ozone denuders is a conclusion from the review of Cave et al<sup>79</sup>.

On the other hand, results obtained for more volatile PACs could indicate that they are likely to be formed catalytically at the denuder surface, so that sampling biases can still exist with the use of ozone denuders, as stated by Walgraeve et al. in their review<sup>18</sup>. Moreover, in several of their works, Albinet et al. observed under-estimations of PAHs generally lower than 10% when ozone denuders were not used<sup>80</sup>. Thus, the gain of precision with an ozone denuder seems to be rather minor.

In addition to these artifacts characteristic to PACs, Turpin et al. have reviewed sampling issues related to atmospheric particulate organics, noting risks of volatilization of particulate organics, adsorption of gas phase organics on the filter, and bounce-off of particles, among others<sup>81</sup>.

### 1.2.2. Settled dust

For what regards settled dust, the easiest and most common sampling method is to collect it in classical vacuum cleaner bags <sup>29,82-84</sup>, which can be further fractionated depending on the particles size thanks to sieves <sup>25,48</sup>. Depending on the type of analysis performed afterwards, various other sampling techniques are available, such as simple manual wiping, sweeping or scraping of surfaces <sup>24,85,86</sup> or passive techniques involving dust fall jars or non-electrostatic plates <sup>24</sup>. Active sampling is generally considered as the ideal solution, because it is more time-efficient and offers more control over the sampling procedure.

The most up-to-date and standardized sampling method has been defined by ASTM International and is based on the use of the High Volume Small Surface Sampler (HVS3) <sup>87</sup>. This standardization has had the benefits of reducing the biases between different studies when different sampling devices were used, as well as the biases inside each study due to differences in dust load and carpet type for instance. Some parameters characteristic of each sampling site such as levels of carpet wear and ambient humidity during sampling can still give birth to sampling variations with HVS3 <sup>88</sup>.

However, due to the supplemental cost of the HVS3, household vacuum cleaner methods can be preferred, knowing that studies such as the one of Colt et al. have shown an excellent agreement in detection and good correlation coefficients between analyses of typical household pollutants (PAHs, pesticides, PCBs ...) performed with both HVS3 and household vacuum cleaner as samplers <sup>89</sup>.

Even if most of the examples quoted in this section concern indoor dust sampling, it is interesting to note that such kinds of sampling techniques (household vacuum cleaners for instance) have also been used for urban road dust collection <sup>48,90,91</sup>.

### 1.2.3. Sample storage

After sampling, it is necessary to store the samples in aluminium foil (or equivalent) to protect them from light, which causes degradation of photosensitive PACs <sup>16</sup>. For the same purpose of avoiding analyte degradation, storage of samples before their extraction should take place either in a refrigerator (3 to 7°C) or in a freezer (-10 to -25°C). In the first case, it is considered that filters can be extracted up to 2 months after sample collection, in the latter, this delay can be extended up to 12 months <sup>80</sup>.

### 1.3. Extraction

The most common extraction methods which have been implemented for PACs in particulate matters belong to the group of solid/liquid extractions. They can be listed as follows: Soxhlet extraction, Pressurized Liquid Extraction (PLE) or Accelerated Solvent Extraction (ASE), Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) or sonication, Microwave Assisted Extraction (MAE), and Supercritical Fluid Extraction (SFE).

SFE is an exception to this list. Indeed, after some attempts to implement this technique for PACs in particulate samples in the 90s, some drawbacks have been quickly identified. First and foremost its strong matrix-dependence, precluding a satisfying variability when applied to different kinds of real solid samples, then big differences between various works in terms of ideal parameters and extraction yields, and finally the high expense of the technical investment<sup>92–95</sup>. Despite its well-known advantages such as time-efficiency and a greatly reduced use of organic solvents for instance<sup>94,96,97</sup>, in the last decade, very few works have reported its use for particulate matter, a little more for soil matrices<sup>97,98</sup>.

The following section will give more details about the choice of the solvent and the solid/liquid extraction methods available for the analysis of polar and non-polar PACs in particulate matter matrices. The need of concentration and purification procedures will also be discussed. We will not differentiate atmospheric PM and settled dusts as extraction methods are the same for both kinds of matrices.

On the other hand, we will not discuss thermal desorption methods, which are relevant but less frequent than solvent extraction. These methods, applied to PAHs and derivatives, are the focus of the review of Liu et al.<sup>99</sup>.

We will not discuss miniaturized extraction and micro-extraction techniques either. These are novel and promising for some of them, but to this day they have not been sufficiently implemented to represent an accurate overview of the state of the art. Besides, they have been presented in detail in the review of Manousi and Zachariadis<sup>100</sup>.

#### 1.3.1. Choice of solvent

The solvent selection is one of the most crucial parameters for any extraction method. Its extraction efficiency, its cost, its health and environmental toxicity, and its volatility (for further evaporation, see Section 1.3.6) are the main characteristics to take into account when choosing the ideal solvent for a certain application. These criteria are equally applied when implementing Soxhlet, ASE, UAE or MAE methods.

As a general rule, the most frequently used solvents for PACs extractions from particulates are, in increasing order of polarity: n-hexane, cyclohexane, toluene, dichloromethane, acetone,

acetonitrile, ethanol and methanol. It is worth noting that benzene has also been used in some works<sup>33,50,86</sup>, but because of its huge toxicity, it should be avoided.

It may occur that in some cases, other less common solvents give better extraction recoveries and reproducibility, as highlighted by Lintelmann et al. who selected ethyl acetate for the extraction of OPAHs in particulate matter samples<sup>101</sup>.

If attempts with different pure solvents do not yield satisfying results, they can be used in mixtures as it is often the case, or sequentially, for instance when several PAC categories are targeted<sup>33,37,49,102,103</sup>. In the case of PM extraction, Jonker and Koelmans hypothesized that the combination of an aromatic solvent (such as toluene) with methanol was particularly interesting because it associates the displacement capacity of the solvent which has the highest chemical similarity to PACs and the swelling capacity of methanol which has the lowest molar volume and therefore increases the accessibility to the sample for the second solvent<sup>104</sup>. This hypothesis was later validated by Masala et al.<sup>105</sup>.

In their review, Bandowe and Meusel have reported dichloromethane alone as being a good extraction solvent for NPAHs, dichloromethane / methanol mixtures appropriate for OPAHs, and n-hexane / dichloromethane mixtures more adapted to non-polar PAHs<sup>16</sup>. Nonetheless, it is important to keep in mind that the choice of the “ideal solvent” is not only analyte-dependent, but also matrix-dependent. Anyway, no single solvent can be defined as optimal and comparative studies of solvents should be performed for each application.

### 1.3.2. Soxhlet extraction

Soxhlet is the “historical” system for solid samples solvent extraction. It has marked the beginning of environmental analyses of particulate matters, soils, etc. Therefore, it has been widely used in studies of the 90s<sup>93,106,107</sup>. It has especially been implemented by the National Institute of Standards and Technology (NIST) for the certification of air particulate matter and diesel particulate matter Standard Reference Materials (e.g. SRMs 1648, 1649 and 1650)<sup>108,109</sup>.

As it earned a status of reliable extraction method, Soxhlet has remained the method of choice for a lot of analytical scientists around the world in more recent times<sup>25,32,55,103,110</sup>.

The main drawbacks of Soxhlet are obvious and well-known to all in the environmental field: its time consumption, the high amounts of solvents required and the impossibility of automation. Indeed, Soxhlet extractions are generally from 8 to 48 hours long, in contrast with the other typical extractions whose durations are around 30 minutes.

Even if big technical investments, as would require ASE, MAE or SFE, want to be avoided, the Soxhlet drawbacks tend to orient the selection of the extraction method towards sonication for example<sup>18,32,107</sup>.

Table 1.I regroups the extraction conditions reported by various studies where Soxhlet was used.

**Table 1.I : Typical parameters implemented for solvent extraction with a Soxhlet device**

	<b>Authors</b>	<b>Year</b>	<b>Compounds of interest</b>	<b>Solvent</b>	<b>Volume</b>	<b>Time</b>
<sup>108</sup>	Wise et al.	1996	PAHs	Dichloromethane	n.d.	20 h
<sup>106</sup>	Chen and Preston	1997	AZAs	Dichloromethane	n.d.	Overnight / ~ 18 h
<sup>78</sup>	Tsapakis and Stephanou	2003	PAHs	n-Hexane	n.d.	24 h
<sup>111</sup>	Bamford and Baker	2003	NPAHs	Dichloromethane	n.d.	24 h
<sup>32</sup>	Christensen et al.	2005	PAHs	Dichloromethane	170 mL	18 h
<sup>103</sup>	Lalah and Kaigwara	2005	PAHs + PASHs + NPAHs + AZAs	Toluene / Methanol (4:1)	200 mL	8 h
<sup>110</sup>	Delhomme and Millet	2008	AZAs	n-Hexane / Dichloromethane (1:1)	n.d.	20 h
<sup>112</sup>	Lin et al.	2015	PAHs + NPAHs	n-Hexane / Acetone (1:1)	200 mL	22 h
<sup>55</sup>	Gao et al.	2018	NPAHs + OPAHs	Dichloromethane	150 mL	8 h
<sup>25</sup>	Cao et al.	2019	PAHs	n-Hexane / Acetone (1:1)	20 mL	36 h

\* n.d.: not disclosed

### 1.3.3. Pressurized Liquid Extraction

Starting from the consideration that extractions were favored at higher temperatures, Richter et al. developed the Accelerated Solvent Extraction system around the year 1995 <sup>113</sup>. ASE has become a trademark from the brand Dionex, which is now widely used to characterize Pressurized Liquid Extraction (PLE). It enables to perform solid/liquid extractions based on a principle similar to Soxhlet extractions, but with higher efficiency in terms of time, solvent consumption, and recoveries. The system is designed to flush a solid or semi-solid sample with extracting solvents under high temperatures (50 to 200°C) and high pressures (500 to 3 000 psi, i.e. 35 to 205 bar), during short times (around 10 minutes) <sup>113</sup>.

This PLE system also gives the possibility to automate the sample preparation, so that a lot of samples can be extracted sequentially, something which is not possible with Soxhlet. Works focusing on the analysis of Standard Reference Materials (SRM) have studied the efficiency of PLE in comparison with Soxhlet extraction. The results have shown satisfying extraction yields, similar to those of Soxhlet for a majority of compounds, and even higher for high molecular weight (HMW) PAHs, in a far shorter time <sup>95</sup>.

After the promising early days of PLE, its extraction efficiency for PACs in particulates has been confirmed <sup>105</sup>, which is why the method has been implemented by a lot of labs in the 21<sup>st</sup>



century, and is nowadays the major extraction technique reported in the literature for organic pollutants such as PACs in particulates <sup>36,47,49,58,61,114–116</sup>.

Because of the extreme conditions of PLE, there is a possibility of chemical degradation of the analytes during extraction, as showed the example of Lintelmann et al. who observed degradation of PAH quinones (OPAHs) during their PLE protocol <sup>117</sup>.

Another risk to take into account with PLE is the possibility of losing analytes during the evaporation steps afterwards, especially if high amounts of solvent are used, as sometimes required with PLE (see Section 1.3.6). This analytical bias was reported by Delgado-Saborit et al. who compared various extraction solvents without reaching more than 76% of recovery on the whole extraction procedure, and who finally selected a much simpler method to extract PAHs from their filters, by shaking them in dichloromethane, a strategy that brought higher recoveries <sup>63</sup>.

The main parameters to study in the course of a method development with PLE are the solvent, the temperature, the pressure, the heating time, and the number and duration of static cycles (extraction cycle at constant temperature and pressure).

The optimization of these parameters is crucial, as shown by Masala et al. in their study of the enhancement of PAHs extraction from a SRM of Diesel Particulate Matter <sup>105</sup>. In this work, they chose to apply extreme pressures and temperatures during longer static cycles than in the general rule, and they compared carefully different solvents and different proportions of solvent mixtures, to obtain the most efficient extraction possible.

The PLE parameters reported in studies focusing on PACs in dusts and PM are reviewed in Table 1.II.

**Table 1.II : Typical parameters implemented for solvent extraction with a PLE device**

	<b>Authors</b>	<b>Year</b>	<b>Compounds of interest</b>	<b>Solvent</b>	<b>Temp.</b>	<b>Pressure</b>	<b>Heat time</b>	<b>Static time</b>
95	Schantz et al.	1997	PAHs	- Dichloromethane - Toluene	100°C	138 bar	5 min	3 x 5 min
117	Lintelmann et al.	2005	PAHs + OPAHs	- Toluene / Methanol (1:1) Hexane / Acetone (7:3)	100°C	107 bar	7 min	3 x 5 min
47	Albinet et al.	2006	OPAHs + NPAHs	Dichloromethane	120°C	140 bar	6 min	6 min
118	Di Filippo et al.	2007	PAHs + NPAHs	Dichloromethane / Acetone (4:1)	100°C	110 bar	5 min	4 x 5 min
119	Bandowe and Wilcke	2010	PAHs + OPAHs	1. Dichloromethane 2. Acetone / Dichloromethane / TFA (250:125:1)	120°C	140 bar	6 min	5 min
58	Lintelmann et al.	2010	AZAs	Dichloromethane / Methanol (1:1)	100°C	100 bar	5 min	3 x 5 min
105	Masala et al.	2011	PAHs	Toluene / Methanol (9:1)	200°C	207 bar	9 min	5 x 30 min
116	Nocun and Schantz	2013	OPAHs	Dichloromethane	100°C	100 bar	5 min	4 x 5 min
61	Liaud et al.	2015	PAHs	Acetonitrile	120°C	104 bar	6 min	3 x 5 min
34 120	Alves et al. Vicente et al.	2016	PAHs + OPAHs + NPAHs + AZAs	1. Dichloromethane 2. Acetone / Dichloromethane (2:1)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
115	Madruga et al.	2019	PAHs	Dichloromethane	120°C	140 bar	n.d.	n.d.
49	Gbeddy et al.	2020	PAHs + OPAHs + NPAHs	1. Dichloromethane 2. Dichloromethane / Methanol / Acetone (1:1:1)	120°C	170 bar	6 min	2 x 5 min

\* When several solvents are associated in a cell, the formatting “ / “ designates a mixture of solvents, the list “1. 2. ...” expresses sequential extractions with different solvents, and the list “-“ is used when in a study, various solvents have been tested and compared without a definite choice of a unique ideal solvent.

\* n.d.: not disclosed

#### 1.3.4. Ultrasound Assisted Extraction

Ultrasound Assisted Extraction, frequently called “sonication”, has been widely employed for PACs extraction from particulates, thanks to its low cost, easy implementation in a lot of labs, and time-efficiency. Indeed, the only material requirements are an ultrasound-producing device and adapted vessels.

Even if the interesting possibilities offered by PLE, particularly in terms of automation, have increased its use over Soxhlet and sonication in recent years, sonication remains one of the most frequent extraction methods. With the “classical solvents” cited in Section 1.3.1, quantitative extractions of PACs from particulate matters are achieved in less than an hour, even sometimes in less than 20 minutes<sup>32,101,121–123</sup>. According to several works, the extraction recoveries obtained with UAE are similar to those obtained with Soxhlet extraction, but in a far shorter time<sup>32,107,124</sup>.

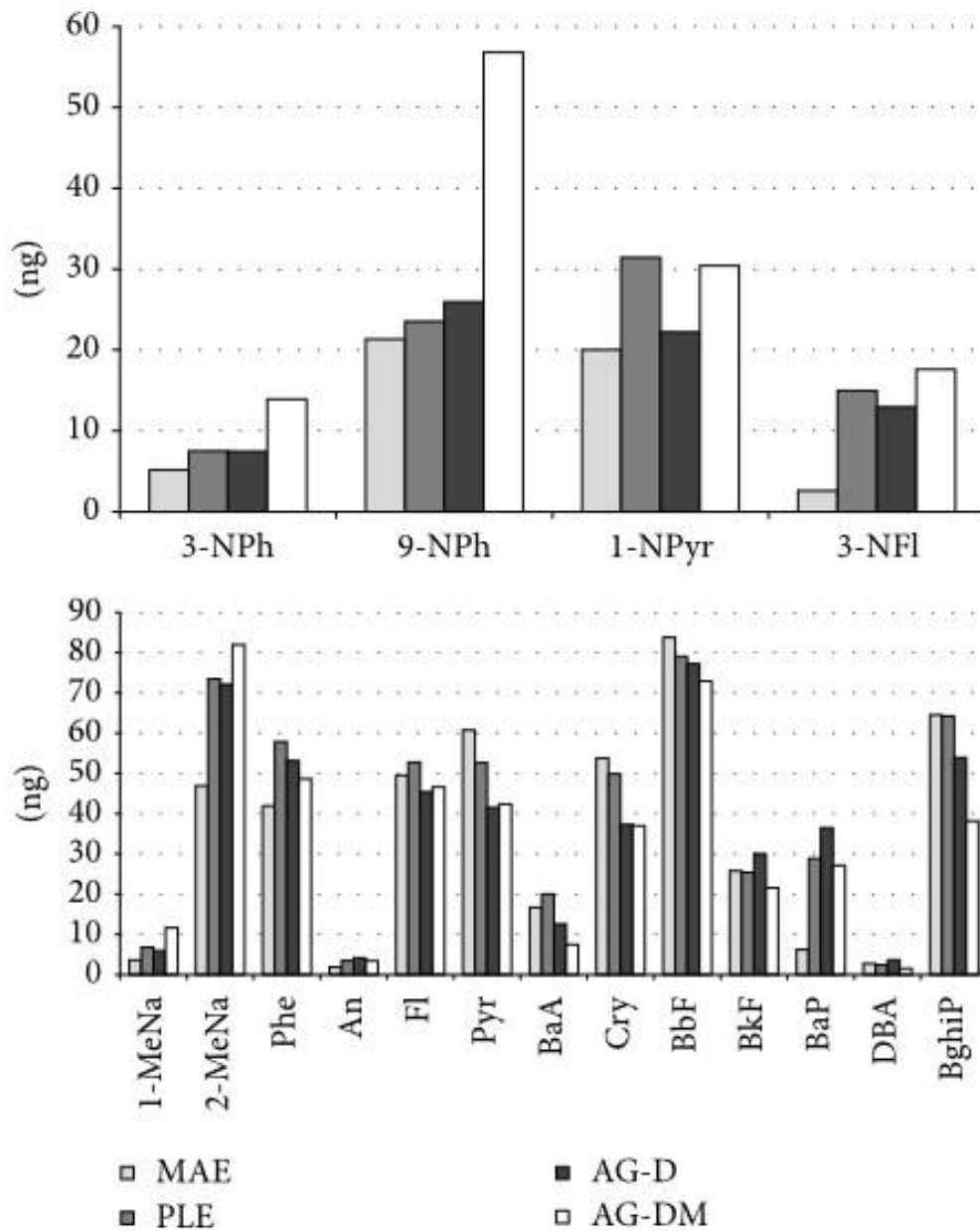
García-Alonso et al. compared multiple extraction techniques for PAHs and NPAHs in PM samples. When keeping the same solvent (dichloromethane), PLE and UAE gave comparable extraction yields. Even if they were slightly favorable to PLE, the authors reported the differences between both extractions as insignificant<sup>121</sup>. These results are presented in Figure 1.2, where the grey bars represent the quantities of analytes extracted by PLE with dichloromethane, and the darkest bars represent the quantities of analytes extracted by UAE with dichloromethane (abbreviated “AG-D”).

Thus, sonication can still be considered as a reliable extraction method for PACs in solid samples.

Nonetheless, it is important to keep in mind that UAE is “less rigorous” than automated methods such as PLE or MAE. Therefore, it can cause higher uncertainties when applied to strongly sorptive matrices such as soots<sup>104</sup>.

Moreover, the sonication completely destroys the particulate matter sampling filters, causing the release of a lot of particles, which need to be removed later by appropriate sample filtration and clean-up.

The parameters reported by studies using UAE as extraction method are regrouped in Table 1.III.



**Figure 1.2 : Mean extracted values (ng per subsample) of selected PAHs and NPAHs with different extraction methods: MAE, PLE and UAE (written as AG).**

*Dichloromethane (D) was the extracting solvent. For UAE, dichloromethane was compared with a dichloromethane / methanol mixture (DM).*

*Reproduced from García-Alonso et al. <sup>121</sup>*

**Table 1.III : Typical parameters implemented for solvent extraction with an UAE device**

	<b>Authors</b>	<b>Year</b>	<b>Compounds of interest</b>	<b>Solvent</b>	<b>Volume</b>	<b>Time</b>
72	Allen et al.	1997	OPAHs	Dichloromethane	n.d.	30 min
77	Schauer et al.	2003	PAHs	Dichloromethane / Methanol / Toluene (1:1:1)	n.d.	30 min
32	Christensen et al.	2005	PAHs	Acetone	n.d.	10 min
101	Lintelmann et al.	2006	OPAHs	Ethyl acetate	20 mL	15 min
125	Delhomme et al.	2008	OPAHs	Dichloromethane	20 mL	20 min
48	Dong and Lee	2009	PAHs	n-Hexane / Dichloromethane (1:1)	30 mL	30 min
126	Kojima et al.	2010	PAHs + OPAHs + NPAHs	Dichloromethane	n.d.	2 x 20 min
68	Wingfors et al.	2011	PAHs + OPAHs	Dichloromethane	5 mL	3 x 10 min
127	Barrado et al.	2012	OPAHs	Methanol	10 mL	30 min
123	Sangiorgi et al.	2013	PAHs	Acetonitrile	2 mL	20 min
60	Wang et al.	2014	PAHs + OPAHs + PASHs	Dichloromethane	n.d.	3 x 10 min
102	Große-Brinkhaus et al.	2017	PAHs	1. Dichloromethane 2. Toluene / Methanol (6:1)	1. 7 mL 2. 3 x 7 mL	4 x 20 min
121	García-Alonso et al.	2017	PAHs + NPAHs	- Dichloromethane - Dichloromethane / Methanol (2:1)	5 mL	15 min
122	Niu et al.	2017	PAHs + OPAHs	Dichloromethane / Methanol (2:1)	n.d.	15 min
128	Ali	2019	PAHs	n-Hexane / Acetone (1:1)	n.d.	2 x 20 min

\* When several solvents are associated in a cell, the formatting “ / “ designates a mixture of solvents, the list “1. 2. ...” expresses sequential extractions with different solvents, and the list “-“ is used when in a study, various solvents have been tested and compared without a definite choice of a unique ideal solvent.

\* n.d.: not disclosed

### 1.3.5. Microwave Assisted Extraction

Only a few works have reported the application of MAE to particulate samples up to now. The developments of this technique are relatively recent, so that in the review of Walgraeve et al. published in 2010, only one research group had published data on microwave extraction of OPAHs<sup>18</sup>.

Nevertheless, in 1998, Colmsjö already reported the use of MAE as a possibility to extract PAHs from solid environmental samples such as soil, with extraction recoveries comparable to those obtained with Soxhlet. He mentioned acetone or acetone/hexane mixtures as ideal extraction solvents for PAHs in soil matrices with this technique<sup>124</sup>.

Recently, more and more groups studying polar and non-polar PACs in particulates have utilized MAE<sup>37,45,59,121,127,129</sup>. Similarly to PFE, this technique enables the heating of an organic solvent above its boiling point to enhance the extraction, thanks to specially adapted vessels placed in a microwave oven. The microwave extraction can be performed under constant magnetic agitation to ensure homogeneous mixing and uniform temperature<sup>59</sup>.

In their study, García-Alonso also compared MAE with UAE and PLE. The results obtained proved to be very heterogeneous. Indeed, as shown in Figure 1.2, whereas MAE gave the highest extraction recoveries for pyrene and benzo[b]fluoranthene, it was totally ineffective for benzo[a]pyrene and 3-nitrofluoranthene<sup>121</sup>. Barrado et al. reported higher extraction yields of PAHs in dichloromethane with the use of a microwave device than with ultrasound or Soxhlet extractors<sup>127</sup>.

Previously published MAE conditions are presented in Table 1.IV.

**Table 1.IV : Typical parameters implemented for solvent extraction with a MAE device**

	<b>Authors</b>	<b>Year</b>	<b>Compounds of interest</b>	<b>Solvent</b>	<b>Volume</b>	<b>Temp.</b>	<b>Power</b>	<b>Time</b>
<sup>32</sup>	Christensen et al.	2005	PAHs	Acetone / Cyclohexane (1:1)	35 mL	120 °C	n.d.	20 min
<sup>45</sup>	Slezakova et al.	2014	PAHs	Acetonitrile	30 mL	110 °C	n.d.	20 min
<sup>59</sup>	Tutino et al.	2016	PAHs + NPAHs	Acetone / n-Hexane (1:1)	10 mL	110 °C	200 W	25 min
<sup>121</sup>	García-Alonso et al.	2017	PAHs + NPAHs	Dichloromethane	15 mL	120 °C	900 W	40 min
<sup>37</sup>	Du et al.	2018	OPAHS + NPAHs	Acetone / n-Hexane (1:1)	25 mL	110 °C	1 200 W	2 x 10 min

\* n.d.: not disclosed

### 1.3.6. Extract concentration and purification

Atmospheric particulate matter, dusts and soots are generally very complex matrices. Therefore, a sample clean-up is required before the instrumental analysis. Moreover, when solvent extraction is performed, the extract is often obtained in a relatively large volume (see Sections 1.3.2 to 1.3.5), which should be reduced to optimize the detection limits of the analytical method.

Generally, immediately after the extraction, it can be preferable to filter the extract through syringe filters with Nylon or PTFE membranes (0.45  $\mu\text{m}$  or less) to get rid of the residual particles <sup>32,45,68,116,123</sup>.

In some cases, authors also want to ensure the removal of residual water in their extracts, especially to facilitate the solvent removal afterwards. For this purpose, filtration through sodium sulfate can be considered <sup>119</sup>.

Then, a major step is the solvent removal. In a lot of works, it is performed by rotary evaporation <sup>19,45,78,86,110,117,119</sup>. This evaporation should take place at a low temperature ( $\leq 40^\circ\text{C}$ ) under low pressures in order to avoid analyte degradation. Other techniques have been implemented for solvent removal, in particular the circulation of a nitrogen stream over the extract to shift the liquid/vapor equilibrium towards vaporization of the solvent <sup>47,68,102,114,126,128,130</sup>. This solution has the advantage of being easily automatable and applicable to lots of extracts similarly thanks to specially designed devices.

Before the evaporation, it can be interesting to add small quantities of a less volatile solvent which will act as a “keeper”, so that the sample doesn’t reach complete dryness when its solvent is evaporated, and that the more volatile analytes are not evaporated with the solvent. Toluene, dimethylformamide (DMF) and dimethylsulfoxide (DMSO) are good examples of keepers <sup>32,34,36,117,130</sup>.

If the kinds of instruments used for solvent removal cited above are not available, it is conceivable to let the solvent evaporate under a lab extractor hood. This process takes a longer time but has the benefit of reducing the risks of analyte losses under such mild conditions, even if light-sensitivity of the compounds should be taken into account. This evaporation procedure is naturally more appropriate if volatile solvents such as dichloromethane, hexane, acetone or methanol are used, in decent quantities.

Finally, the extract should be cleaned up before the analysis to get rid of as many interferences as possible, and to preserve the instrumentation used for the analysis (injector, chromatographic column, mass spectrometer, etc.).

For the particular case of PLE, it is possible to perform “in-cell” clean-up similarly to the extraction. To this purpose, Bandowe et al. used a bulk sorbent containing a modified form of diatomaceous earth to fill in the void in the extraction cells <sup>36</sup>. Gbeddy et al. compared five different materials composed of either activated or deactivated silica gel, pure or mixed with alumina at various proportions, placed on top of the outlet filter. Besides these clean-up materials, they filled

the cells with diatomaceous earth and anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to remove potential excess of water <sup>49</sup>. Such clean-up methods enable to get rid of additional off-line purification steps.

In the vast majority of cases, the clean-up step is done by Solid Phase Extraction (SPE). The main SPE supports used are silica and alumina <sup>32,47,57,60,68,126</sup>. Aminopropylsilyl columns have also been proposed for SPE purification of extracts from particulates <sup>108,131,132</sup>. The choice of the SPE cartridge can have a major influence on the recovery of this purification step, therefore it can be beneficial to compare several commercially available stationary phases <sup>133</sup>. Further details on SPE conditions can be found in the supplemental content of this article ([Table S2](#)).

SPE experiments in the course of the analytical procedure can also offer the possibility of isolating different fractions of PACs depending on their polarity. Such fractionation steps are useful for assessment of various classes of PACs in the same sample, but using different analytical instruments to enhance the sensitivity for each fraction <sup>52,120</sup>.

Apart from SPE, some authors have reported the use of different clean-up methods, more labor-intensive, such as glass column chromatography <sup>25,55,77,119,129</sup> and high performance liquid chromatography (HPLC) <sup>72,114,131</sup>. Sauvain et al. have even described a clean-up procedure composed of successive purification steps through SPE, semi-preparative normal phase liquid chromatography, open column chromatography, liquid-liquid partition and back extraction for diesel particulate, a particularly complex matrix <sup>52</sup>.

We would like to highlight that these alternatives are generally found in older works and that nowadays, SPE is by far the most used purification technique.

However, we do not report SPE as a mandatory step for PACs determination. Indeed, important losses of compounds can be expected for PACs with classical SPE phases, especially when the goal is to analyse polar and non-polar simultaneously. Besides, many studies regarding PACs analysis are based on analytical methods without any purification step and still match quality criteria.

After the purification of the extract, important volumes are once more obtained, they can be concentrated as described above.



## 1.4. Conclusion

The objective of this first part of our review was to discuss the collection, extraction and purification of particulate samples for the determination of their PAC content.

It is important to note that even before the instrumental analysis of the extract, which will be the topic of the second part of this article, major analytical errors can be made.

The sampling step is crucial. One wants to collect a sufficient amount of sample, which should still be representative of a relatively short period of time if daily or hourly variations are studied, and representative of a relevant sampling place, i.e. not affected by airstream artifacts for instance.

Besides the possible contaminations due to the sampling filter which can easily be avoided, the major issue related to PM sampling is the risk of on-filter reactions causing artificial variations of PACs concentrations such as degradation of PAHs into their oxygenated or nitrated derivatives. To avoid such reactions, the use of ozone denuders has been reported, but gains associated to it can be considered as marginal.

The risk of such biases during the sampling is far lower in the case of settled dust which is less exposed to daylight and atmospheric oxidative conditions. Still, for settled dust as well as for PM, samples need to be completely protected from light and heat between their collection and their extraction, to avoid degradation of PACs.

The most common extraction techniques for PACs in particulates are solvent extractions. Among those, Soxhlet can be considered as obsolete because it is time-consuming, solvent-consuming and offers a poorer reproducibility compared to the others. Issues of reproducibility also arise with UAE. We would rather advise for the use of PLE and MAE, but their high expense should be taken into account.

In future years, as a result of technical evolutions, economic and environmental constraints, we expect non-solvent extraction methods to be increasingly implemented for this application. In this category, thermal desorption (TD) and Solid Phase Micro Extraction (SPME) are the most developed, but other novel sorptive micro-extraction techniques are promising. It is necessary that an extensive assessment of their advantages and drawbacks over solvent extractions be performed, including a comparison of a high amount of methods developed by various labs in various conditions. Depending on these results, they could be applied in routine analysis laboratories, but not before several years. To illustrate this delay between research stage and routine applications of extraction techniques, we can notice that Soxhlet is still applied in some of these quality control labs nowadays.

## **Appendix**

Supplementary Material of this article can be found in the online version, at : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993620303289>.

## 1.5. References

- (1) Keith, L. H. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2015**, 35 (2–4), 147–160.
- (2) IARC. *Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Lyon, 2014; Vol. 105.
- (3) IARC. *Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Lyon, 2010; Vol. 92.
- (4) IARC. *Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Lyon, 1989; Vol. 46.
- (5) IARC. *Polynuclear Aromatic Compounds*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Lyon, 1983; Vol. 32.
- (6) Dybing, E.; Schwarze, P. E.; Nafstad, P.; Victorin, K.; Penning, T. M. In *Air Pollution and Cancer*; IARC Scientific Publication; 2010; pp 75–94.
- (7) Andersson, J. T.; Achten, C. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2015**, 35 (2–4), 330–354.
- (8) Nisbet, I. C. T.; LaGoy, P. K. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1992**, 16 (3), 290–300.
- (9) U.S. Environmental Protection Agency. *Health Effects Assessment for Benzo(a)Pyrene*; 1984.
- (10) Collins, J. F.; Brown, J. P.; Alexeeff, G. V.; Salmon, A. G. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1998**, 28 (1), 45–54.
- (11) Delistraty, D. *Toxicol. Environ. Chem.* **1997**, 64 (1–4), 81–108.
- (12) Pufulete, M.; Battershill, J.; Boobis, A.; Fielder, R. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2004**, 40 (1), 54–66.
- (13) Durant, J. L.; Busby, W. F.; Lafleur, A. L.; Penman, B. W.; Crespi, C. L. *Mutat. Res. Toxicol.* **1996**, 371 (3–4), 123–157.
- (14) Misaki, K.; Takamura-Enya, T.; Ogawa, H.; Takamori, K.; Yanagida, M. *Mutagenesis* **2016**, 31 (2), 205–213.
- (15) Schauer, C.; Niessner, R.; Pöschl, U. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378 (3), 725–736.
- (16) Bandowe, B. A. M.; Meusel, H. *Sci. Total Environ.* **2017**, 581–582, 237–257.
- (17) Lammel, G. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2015**, 35 (2–4), 316–329.
- (18) Walgraeve, C.; Demeestere, K.; Dewulf, J.; Zimmermann, R.; Van Langenhove, H. *Atmos. Environ.* **2010**, 44 (15), 1831–1846.
- (19) Chen, H.-Y.; Preston, M. R. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32 (5), 577–583.
- (20) Delhomme, O.; Millet, M. *Atmos. Environ.* **2012**, 47, 541–545.
- (21) Lee, M. L.; Novotny, M.; Bartle, K. D. *Anal. Chem.* **1976**, 48 (11), 1566–1572.
- (22) Mössner, S. G.; Wise, S. A. *Anal. Chem.* **1999**, 71 (1), 58–69.
- (23) IARC. *Bitumens and Bitumen Emissions, and Some N- and S-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Lyon, 2013; Vol. 103.
- (24) Maertens, R. M.; Bailey, J.; White, P. A. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2004**, 567 (2–3), 401–425.
- (25) Cao, Z.; Wang, M.; Chen, Q.; Zhu, C.; Jie, J.; Li, X.; Dong, X.; Miao, Z.; Shen, M.; Bu, Q. *Sci. Total Environ.* **2019**, 653, 423–430.
- (26) Choi, H.; Perera, F.; Pac, A.; Wang, L.; Flak, E.; Mroz, E.; Jacek, R.; Chai-Onn, T.; Jedrychowski, W.; Masters, E.; Camann, D.; Spengler, J. *Environ. Health Perspect.* **2008**, 116 (11), 1509–1518.
- (27) Deziel, N. C.; Rull, R. P.; Colt, J. S.; Reynolds, P.; Whitehead, T. P.; Gunier, R. B.; Month, S. R.; Taggart, D. R.; Buffler, P.; Ward, M. H.; Metayer, C. *Environ. Res.* **2014**, 133, 388–395.
- (28) Fromme, H.; Lahrz, T.; Piloty, M.; Gebhardt, H.; Oddoy, A.; Ruden, H. *Sci. Total Environ.* **2004**, 326 (1–3), 143–149.
- (29) Whitehead, T. P.; Metayer, C.; Petreas, M.; Does, M.; Buffler, P. A.; Rappaport, S. M. *Environ. Health Perspect.* **2013**, 121 (5), 543–550.
- (30) Oliveira, M.; Slezakova, K.; Delerue-Matos, C.; Pereira, M. C.; Morais, S. *Environ. Int.* **2019**, 124, 180–204.

- (31) Alves, C. A.; Vicente, A. M.; Custódio, D.; Cerqueira, M.; Nunes, T.; Pio, C.; Lucarelli, F.; Calzolai, G.; Nava, S.; Diapouli, E.; Eleftheriadis, K.; Querol, X.; Musa Bandowe, B. A. *Sci. Total Environ.* **2017**, *595*, 494–504.
- (32) Christensen, A.; Östman, C.; Westerholm, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381* (6), 1206–1216.
- (33) Tang, N.; Hattori, T.; Taga, R.; Igarashi, K.; Yang, X.; Tamura, K.; Kakimoto, H.; Mishukov, V. F.; Toriba, A.; Kizu, R.; Hayakawa, K. *Atmos. Environ.* **2005**, *39* (32), 5817–5826.
- (34) Alves, C. A.; Vicente, A. M. P.; Gomes, J.; Nunes, T.; Duarte, M.; Bandowe, B. A. M. *Atmospheric Res.* **2016**, *180*, 128–137.
- (35) Bandowe, B. A. M.; Meusel, H.; Huang, R.; Hoffmann, T.; Cao, J.; Ho, K. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23* (16), 16025–16036.
- (36) Bandowe, B. A. M.; Meusel, H.; Huang, R.; Ho, K.; Cao, J.; Hoffmann, T.; Wilcke, W. *Sci. Total Environ.* **2014**, *473–474*, 77–87.
- (37) Du, W.; Chen, Y.; Shen, G.; Wang, W.; Zhuo, S.; Huang, Y.; Pan, X.; Tao, S. *Atmos. Environ.* **2018**, *187*, 210–217.
- (38) Tomaz, S.; Shahpoury, P.; Jaffrezo, J.-L.; Lammel, G.; Perraudin, E.; Villenave, E.; Albinet, A. *Sci. Total Environ.* **2016**, *565*, 1071–1083.
- (39) Salonen, R. O.; Hälinen, A. I.; Pennanen, A. S.; Hirvonen, M.-R.; Sillanpää, M.; Hillamo, R.; Shi, T.; Borm, P.; Sandell, E.; Koskentalo, T.; Aarnio, P. *Scand. J. Work. Environ. Health* **2004**, *30*, 80–90.
- (40) Fireman Klein, E.; Adir, Y.; Krencel, A.; Peri, R.; Vasserman, B.; Fireman, E.; Kessel, A. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2019**, *Volume 14*, 557–564.
- (41) Schins, R. P. F.; Lightbody, J. H.; Borm, P. J. A.; Shi, T.; Donaldson, K.; Stone, V. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, *195* (1), 1–11.
- (42) IARC. *Outdoor Air Pollution*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Lyon, 2016; Vol. 109.
- (43) Hoh, E.; Hunt, R. N.; Quintana, P. J. E.; Zakarian, J. M.; Chatfield, D. A.; Wittry, B. C.; Rodriguez, E.; Matt, G. E. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (7), 4174–4183.
- (44) IARC. *Tobacco Smoke and Involuntary Smoking*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Lyon, 2004; Vol. 83.
- (45) Slezakova, K.; Castro, D.; Delerue-Matos, C.; Morais, S.; Pereira, M. do C. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *21* (6), 4492–4501.
- (46) U.S. Department of Health and Human Services. *Monograph 13: Risks Associated with Smoking Cigarettes with Low Machine-Measured Yields of Tar and Nicotine*; 2001.
- (47) Albinet, A.; Leoz-Garziandia, E.; Budzinski, H.; Villenave, E. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1121* (1), 106–113.
- (48) Dong, T. T. T.; Lee, B.-K. *Chemosphere* **2009**, *74* (9), 1245–1253.
- (49) Gbeddy, G.; Egodawatta, P.; Goonetilleke, A.; Ayoko, G.; Chen, L. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *383*, 121–154.
- (50) Pham, C. T.; Kameda, T.; Toriba, A.; Hayakawa, K. *Environ. Pollut.* **2013**, *183*, 175–183.
- (51) Sadiktsis, I.; Koegler, J. H.; Benham, T.; Bergvall, C.; Westerholm, R. *Fuel* **2014**, *115*, 573–580.
- (52) Sauvain, J.-J.; Vu-Duc, T.; Huynh, C.-K. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *371* (7), 966–974.
- (53) Albinet, A.; Nalin, F.; Tomaz, S.; Beaumont, J.; Lestremau, F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (13), 3131–3148.
- (54) El-Mubarak, A. H.; Rushdi, A. I.; Al-Mutlaq, K. F.; Bazeyad, A. Y.; Simonich, S. L. M.; Simoneit, B. R. T. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *21* (1), 558–567.
- (55) Gao, Y.; Yang, L.; Chen, J.; Li, Y.; Jiang, P.; Zhang, J.; Yu, H.; Wang, W. *Sci. Total Environ.* **2018**, *622–623*, 1400–1407.
- (56) Keyte, I. J.; Albinet, A.; Harrison, R. M. *Sci. Total Environ.* **2016**, *566–567*, 1131–1142.
- (57) Kitanovski, Z.; Shahpoury, P.; Samara, C.; Voliotis, A.; Lammel, G. *Atmospheric Chem. Phys.* **2020**, *20* (4), 2471–2487.
- (58) Lintelmann, J.; França, M. H.; Hübner, E.; Matuschek, G. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (10), 1636–1646.

- (59) Tutino, M.; Di Gilio, A.; Laricchiuta, A.; Assennato, G.; de Gennaro, G. *Chemosphere* **2016**, *161*, 463–469.
- (60) Wang, Q.; Kobayashi, K.; Zhou, M.; Lu, S.; Dong, S.; Nakajima, D.; Sekiguchi, K.; Terasaki, M. *WIT Transactions on Ecology and The Environment*; WIT Press: Opatija, Croatia, 2014; Vol. 183, pp 131–143.
- (61) Liaud, C.; Millet, M.; Le Calvé, S. *Talanta* **2015**, *131*, 386–394.
- (62) Masala, S.; Lim, H.; Bergvall, C.; Johansson, C.; Westerholm, R. *Atmos. Environ.* **2016**, *140*, 370–380.
- (63) Delgado-Saborit, J. M.; Aquilina, N.; Baker, S.; Harrad, S.; Meddings, C.; Harrison, R. M. *Anal. Methods* **2010**, *2* (3), 231.
- (64) Hu, D.; Bian, Q.; Li, T. W. Y.; Lau, A. K. H.; Yu, J. Z. *J. Geophys. Res.* **2008**, *113* (D22), D22206.
- (65) Ma, Y.; Cheng, Y.; Qiu, X.; Lin, Y.; Cao, J.; Hu, D. *Environ. Pollut.* **2016**, *219*, 742–749.
- (66) Di Filippo, P.; Riccardi, C.; Pomata, D.; Buiarelli, F. *Atmos. Environ.* **2010**, *44* (23), 2742–2749.
- (67) Kim, H.-H.; Lee, G.-W.; Yang, J.-Y.; Jeon, J.-M.; Lee, W.-S.; Lim, J.-Y.; Lee, H.-S.; Gwak, Y.-K.; Shin, D.-C.; Lim, Y.-W. *Asian J. Atmospheric Environ.* **2014**, *8* (1), 35–47.
- (68) Wingfors, H.; Hägglund, L.; Magnusson, R. *Atmos. Environ.* **2011**, *45* (26), 4360–4369.
- (69) Morosini, M.; Ballschmiter, K. In *Quality Assurance For Environmental Analysis*; Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry; Elsevier, 1995; pp 526–536.
- (70) Vallero, D. A. In *Air Pollution Calculations - Quantifying Pollutant Formation, Transport, Transformation, Fate and Risks*; Elsevier, 2019; pp 263–333.
- (71) Albinet, A.; Leoz-Garziandia, E.; Budzinski, H.; Villenave, E.; Jaffrezo, J.-L. *Atmos. Environ.* **2008**, *42*, 43–54.
- (72) Allen, J. O.; Dookeran, N. M.; Taghizadeh, K.; Lafleur, A. L.; Smith, K. A.; Sarofim, A. F. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31* (7), 2064–2070.
- (73) Ringuet, J.; Leoz-Garziandia, E.; Budzinski, H.; Villenave, E.; Albinet, A. *Atmospheric Chem. Phys.* **2012**, *12* (18), 8877–8887.
- (74) Shen, G.; Wang, W.; Yang, Y.; Zhu, C.; Min, Y.; Xue, M.; Ding, J.; Li, W.; Wang, B.; Shen, H.; Wang, R.; Wang, X.; Tao, S. *Atmos. Environ.* **2010**, *44* (39), 5237–5243.
- (75) Albinet, A.; Leoz-Garziandia, E.; Budzinski, H.; Villenave, E. *Atmos. Environ.* **2007**, *41* (23), 4988–4994.
- (76) Goriaux, M.; Jourdain, B.; Temime, B.; Besombes, J.-L.; Marchand, N.; Albinet, A.; Leoz-Garziandia, E.; Wortham, H. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (20), 6398–6404.
- (77) Schauer, C.; Niessner, R.; Pöschl, U. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37* (13), 2861–2868.
- (78) Tsapakis, M.; Stephanou, E. G. *Atmos. Environ.* **2003**, *37* (35), 4935–4944.
- (79) Cave, M. R.; Wragg, J.; Beriro, D. J.; Vane, C.; Thomas, R.; Riding, M.; Taylor, C. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *360*, 373–390.
- (80) Albinet, A.; Leoz-Garziandia, E.; Alsac, N. *Guide méthodologique pour la surveillance des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans l'air ambiant et dans les dépôts*; LCSQA; 2015.
- (81) Turpin, B. J.; Saxena, P.; Andrews, E. *Atmos. Environ.* **2000**, *34* (18), 2983–3013.
- (82) Kadi, M. W.; Ali, N.; Albar, H. M. S. A. *Sci. Total Environ.* **2018**, *627*, 134–140.
- (83) Wei, W.; Mandin, C.; Blanchard, O.; Mercier, F.; Pelletier, M.; Le Bot, B.; Glorennec, P.; Ramalho, O. *Sci. Total Environ.* **2019**, *650*, 2742–2750.
- (84) Barro, R.; Regueiro, J.; Llompert, M.; Garcia-Jares, C. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (3), 540–566.
- (85) Anh, H. Q.; Tue, N. M.; Tuyen, L. H.; Minh, T. B.; Viet, P. H.; Takahashi, S. *Sci. Total Environ.* **2019**, *672*, 468–478.
- (86) Oda, J.; Nomura, S.; Yasuhara, A.; Shibamoto, T. *Atmos. Environ.* **2001**, *35* (28), 4819–4827.
- (87) ASTM. *Practice for Collection of Settled Dust Samples Using Wipe Sampling Methods for Subsequent Lead Determination*; ASTM International, 2002; pp 499–505.
- (88) Svendsen, E.; Thorne, P.; O'Shaughnessy, P.; Zimmerman, D.; Reynolds, S. *J. Occup. Environ. Hyg.* **2006**, *3* (6), 334–341.

- (89) Colt, J. S.; Gunier, R. B.; Metayer, C.; Nishioka, M. G.; Bell, E. M.; Reynolds, P.; Buffler, P. A.; Ward, M. H. *Environ. Health* **2008**, *7* (1), 6.
- (90) Gbeddy, G.; Jayarathne, A.; Goonetilleke, A.; Ayoko, G. A.; Egodawatta, P. *Sci. Total Environ.* **2018**, *640–641*, 1432–1437.
- (91) Koh, B.; Kim, E.-A. *Environ. Pollut.* **2019**, *255*, 113156.
- (92) Zielinska, B.; Samy, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386* (4), 883–890.
- (93) Heemken, O. P.; Theobald, N.; Wenclawiak, B. W. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (11), 2171–2180.
- (94) Hawthorne, S. B.; Miller, D. J.; Burford, M. D.; Langenfeld, J. J.; Eckert-Tilotta, S.; Louie, P. K. *J. Chromatogr. A* **1993**, *642* (1–2), 301–317.
- (95) Schantz, M. M.; Nichols, J. J.; Wise, S. A. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (20), 4210–4219.
- (96) Castells, P.; Santos, F. J.; Galceran, M. T. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1010* (2), 141–151.
- (97) Han, Y.; Ren, L.; Xu, K.; Yang, F.; Li, Y.; Cheng, T.; Kang, X.; Xu, C.; Shi, Q. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1395*, 1–6.
- (98) Wicker, A. P.; Carlton, D. D.; Tanaka, K.; Nishimura, M.; Chen, V.; Ogura, T.; Hedgepeth, W.; Schug, K. A. *J. Chromatogr. B* **2018**, *1086*, 82–88.
- (99) Liu, H.; Ma, S.; Zhang, X.; Yu, Y. *Environ. Pollut.* **2019**, *254*, 113018.
- (100) Manousi, N.; Zachariadis, G. A. *Molecules* **2020**, *25* (9), 2182.
- (101) Lintelmann, J.; Fischer, K.; Matuschek, G. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1133* (1–2), 241–247.
- (102) Große Brinkhaus, S.; Thiäner, J. B.; Achten, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (11), 2801–2812.
- (103) Lalah, J. O.; Kaigwara, P. N. *Toxicol. Environ. Chem.* **2005**, *87* (4), 463–479.
- (104) Jonker, M. T. O.; Koelmans, A. A. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36* (19), 4107–4113.
- (105) Masala, S.; Ahmed, T.; Bergvall, C.; Westerholm, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401* (10), 3305–3315.
- (106) Chen, H.-Y.; Preston, M. R. *Environ. Pollut.* **1997**, *97* (1–2), 169–174.
- (107) Marvin, C. H.; Allan, L.; McCarry, B. E.; Bryant, D. W. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1992**, *49* (4), 221–230.
- (108) Wise, S. A.; Schantz, M. M.; Hays, M. J.; Koster, B. J.; Sharpless, K. E.; Sander, L. C.; Benner, B. A.; Schiller, S. B. *Polycycl. Aromat. Compd.* **1996**, *9* (1–4), 209–216.
- (109) Wise, S. A.; Hilpert, L. R.; Byrd, G. D.; May, W. E. *Polycycl. Aromat. Compd.* **1990**, *1* (1–2), 81–98.
- (110) Delhomme, O.; Millet, M. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2008**, *28* (4–5), 518–532.
- (111) Bamford, H. A.; Baker, J. E. *Atmos. Environ.* **2003**, *37* (15), 2077–2091.
- (112) Lin, Y.; Ma, Y.; Qiu, X.; Li, R.; Fang, Y.; Wang, J.; Zhu, Y.; Hu, D. *J. Geophys. Res. Atmospheres* **2015**, *120* (14), 7219–7228.
- (113) Richter, B. E.; Jones, B. A.; Ezzell, J. L.; Porter, N. L.; Avdalovic, N.; Pohl, C. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (6), 1033–1039.
- (114) Bezabeh, D. Z.; Bamford, H. A.; Schantz, M. M.; Wise, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375* (3), 381–388.
- (115) Madruga, D. G.; Ubeda, R. M.; Terroba, J. M.; dos Santos, S. G.; García-Camero, J. P. *Indoor Air* **2019**, *29* (5), 817–827.
- (116) Nocun, M. S.; Schantz, M. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (16), 5583–5593.
- (117) Lintelmann, J.; Fischer, K.; Karg, E.; Schröppel, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381* (2), 508–519.
- (118) Di Filippo, P.; Riccardi, C.; Gariazzo, C.; Incoronato, F.; Pomata, D.; Spicaglia, S.; Cecinato, A. *J. Environ. Monit.* **2007**, *9* (3), 275.
- (119) Bandowe, B. A. M.; Wilcke, W. *J. Environ. Qual.* **2010**, *39* (4), 1349–1358.
- (120) Vicente, E. D.; Vicente, A. M.; Musa Bandowe, B. A.; Alves, C. A. *Air Qual. Atmosphere Health* **2016**, *9* (6), 653–668.
- (121) García-Alonso, S.; Pérez-Pastor, R. M.; Archilla-Prat, V.; Sanz-Rivera, D.; Rojas-García, E.; Aragón-Urrangoetxea, G.; Rodríguez-Maroto, J. J. *J. Chem.* **2017**, *2017*, 1–12.
- (122) Niu, X.; Ho, S. S. H.; Ho, K. F.; Huang, Y.; Sun, J.; Wang, Q.; Zhou, Y.; Zhao, Z.; Cao, J. *Environ. Pollut.* **2017**, *231*, 1075–1084.

- (123) Sangiorgi, G.; Ferrero, L.; Ferrini, B. S.; Lo Porto, C.; Perrone, M. G.; Zangrando, R.; Gambaro, A.; Lazzati, Z.; Bolzacchini, E. *Atmos. Environ.* **2013**, *65*, 205–214.
- (124) Colmsjö, A. In *PAHs and Related Compounds*; Neilson, A. H., Ed.; Hutzinger, O., Series Ed.; The Handbook of Environmental Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1998; Vol. 3 / 3I, pp 55–76.
- (125) Delhomme, O.; Millet, M.; Herckes, P. *Talanta* **2008**, *74* (4), 703–710.
- (126) Kojima, Y.; Inazu, K.; Hisamatsu, Y.; Okochi, H.; Baba, T.; Nagoya, T. *Atmos. Environ.* **2010**, *44* (24), 2873–2880.
- (127) Barrado, A. I.; García, S.; Barrado, E.; Pérez, R. M. *Atmos. Environ.* **2012**, *49*, 224–232.
- (128) Ali, N. *Sci. Total Environ.* **2019**, *696*, 133995.
- (129) Zhuo, S.; Du, W.; Shen, G.; Li, B.; Liu, J.; Cheng, H.; Xing, B.; Tao, S. *Atmos. Environ.* **2017**, *159*, 126–134.
- (130) Zhu, L.; Lu, H.; Chen, S.; Amagai, T. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *162* (2–3), 1165–1170.
- (131) Bamford, H. A.; Bezabeh, D. Z.; Schantz, M. M.; Wise, S. A.; Baker, J. E. *Chemosphere* **2003**, *50* (5), 575–587.
- (132) Cochran, R. E.; Dongari, N.; Jeong, H.; Beránek, J.; Haddadi, S.; Shipp, J.; Kubátová, A. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *740*, 93–103.
- (133) Kishikawa, N.; Morita, S.; Wada, M.; Ohba, Y.; Nakashima, K.; Kuroda, N. *Anal. Sci.* **2004**, *20* (1), 129–132.



## Chapitre 2 :

# Analyse environnementale de Composés Aromatiques Polycycliques polaires et apolaires dans les aérosols, les poussières et les suies : Analyse instrumentale et occurrence

**Environmental analysis of polar and non-polar Polycyclic Aromatic Compounds in airborne particulate matter, settled dust and soot:**

**Part II: Instrumental analysis and occurrence**

Mathieu Galmiche, Olivier Delhomme, Yannis-Nicolas François, Maurice Millet

*TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2021**, 134, 116146

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116146>

### 2.1. Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) mainly occur in the environment due to incomplete combustion processes, either related to natural sources such as wildfires, volcanism, etc. <sup>1-3</sup> or more frequently to anthropogenic sources such as industrial processes, fuel combustion, vehicular transport, tobacco smoking, cooking, etc. <sup>1-6</sup>. PAHs sources can be identified thanks to individual “tracer” PAHs, diagnostic ratios, or thorough statistical studies <sup>6-10</sup>.

PAHs have been reported as major hazardous compounds in various environments for decades. From the 1970s, efforts have been made in the United States of America to define a list of priority pollutants, finally resulting in the well-known U.S. EPA's 16 PAH Priority Pollutants list <sup>11</sup>. However, this list omits some very potent pollutants, either high molecular weight (HMW) non-polar PAHs, alkylated PAHs, or polar Polycyclic Aromatic Compounds (PACs) <sup>12</sup>.

Among those polar PACs, nitrated PAHs (NPAHs) and oxygenated PAHs (OPAHs) are the most studied <sup>13-15</sup>. Their formation can result from reactions between “parent” PAHs and oxidative agents in the environment, especially in indoor and outdoor air, as well as in atmospheric particulate matter (PM), where hydroxyl radical (OH·), ozone (O<sub>3</sub>), and nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>) reactivities play a crucial role <sup>1,2,16,17</sup>. They can also be directly released in the environment by the same kind of combustion processes as those responsible for PAHs occurrence: burning of coal or wood for heating and cooking, industrial processes, vehicular emissions, etc. <sup>1,13-15,18-21</sup>.

Source apportionment of polar PACs has been studied with particular tracers such as 1-nitropyrene, typical of diesel emissions, or 2-nitropyrene and 2-nitrofluoranthene, typical of secondary formation from their parent PAH. Based on this knowledge, some diagnostic ratios have been implemented to characterize the main origins of such PACs in a complex samples, as well



as for PAHs, mainly to characterize primary versus secondary formation of NPAHs<sup>13,20–24</sup>. Another approach to assess the predominance of primary or secondary formation of PAHs derivatives is to study the ratio of the sum of OPAHs or NPAHs to the sum of parent PAHs<sup>19</sup>.

In addition to NPAHs and OPAHs, other polar PACs are of a growing interest: azaarenes (AZAs), sometimes alternatively referred to as Polycyclic Aromatic Nitrogen Heterocycles (PANHs), and Polycyclic Aromatic Sulfur Heterocycles (PASHs). While AZAs are quite similar to the above-mentioned PAHs, NPAHs and OPAHs in terms of sources and toxicology<sup>25–27</sup>, PASHs are particularly typical of petrogenic emissions and have been studied sooner in the evolution of environmental analysis of PACs<sup>28,29</sup>. Both categories have also been studied by the IARC and some of their compounds have been classified as possible or probable carcinogens<sup>30</sup>.

Naturally, all these different compounds of interest lead to analytical complexity if one wants to gather them in a single analytical method.

After having discussed sampling of particulate samples and extraction of PACs from these matrices in the first part of our article, we will here review the state of the art and the perspectives of instrumental analysis of PACs, in terms of separation and detection. Typical concentrations reported in the literature for the different classes of PACs will also be given.

## 2.2. Separation: Chromatography

Nowadays, analytical methods focused on the PAC content of particulate matters rely on a chromatography step whose aim is to separate the individual compounds belonging to the various PAC categories in order to quantify them. This involves many challenges, considering:

- the high complexity of such environmental matrices in terms of chemical composition (interferences can be expected even after sample clean-up)
- the high amount of compounds, including isomers, composing each of the PAC classes mentioned in this article. There is a significant risk of quantifying by mistake several individual compounds together if the chromatography method is not efficient enough.

In this section, we will discuss the application of both gas and liquid chromatography for the determination of polar and non-polar PACs.

### 2.2.1. Gas chromatography (GC)

GC is the most widely used separation technique for the determination of PACs. It is of a particular interest for this family of compounds because of its ability to separate structural isomers thanks to their difference in boiling point, whereas it can be tough to resolve them based on their chemical affinity with a stationary phase of liquid chromatography (LC), which is frequently identical for structural isomers.

The application of GC for PACs determination has been developed for decades. With the technical developments of gas chromatography, protocols have evolved towards almost standardized methods.

At least, some highlights and common points between the vast majority of GC methods for PACs can be noted: the use of polysiloxane capillary columns, the use of an inert carrier gas, usually helium, at flow rates from 1.0 to 1.5 mL·min<sup>-1</sup>, and temperature programs ranging from 40 to 100°C at the beginning of the run and from 270 to 325°C at the end of the run.

The chosen column is in the vast majority of cases a capillary column of length 30 m, diameter 0.25 mm, and film thickness 0.25 µm<sup>31-36</sup>. Less usual alternatives to these dimensions are 60 m columns<sup>29,37-39</sup> or even more rarely shorter lengths (15 m, 12 m)<sup>40,41</sup>. Another option is the use of thinner liquid films (0.1 – 0.15 µm), to decrease the retention of the less volatile PACs, to improve peak shapes and to decrease background noise<sup>37,41</sup>.

Similarly to guard columns in LC methods, retention gaps can be inserted between the injector and the GC analytical column. These retention gaps are designed to retain non-volatile compounds, thus minimizing contamination of the column, and to reconcentrate analytes for a better peak shape<sup>42,43</sup>. They are made up of uncoated, deactivated fused silica capillaries of 0.25 to 0.5 mm diameter and 2 to 5 m length.

In the subsections below, we detail the typical parameters and the main issues of a GC method development for the different groups of PACs.

#### 2.2.1.a. PAHs

PAHs have been the most studied PACs in a lot of different environmental samples. For particulate matrices alone, dozens of articles using GC for the determination of PAHs can be found in the literature. This led to the standardization of PAH analysis methods in the United States of America as well as in Europe, with a choice to promote GC as the separation technique in these standards<sup>44-47</sup>. It can explain the relative uniformity in various methods developed for the analysis of PAHs in particulates.

For what regards the stationary phase of the columns, a global consensus is the use of non-polar 5% phenyl – 95% dimethylpolysiloxane, that we can almost qualify as universal<sup>32,34,35,39,48</sup>.

However, it can still be interesting to test other phases, as shown by the study of Sauvain et al. who reported a better resolution of benzofluoranthene b, j and k isomers and of dibenzopyrene [a,e], [a,i] and [a,h] isomers on a medium polarity column : 50% phenyl – 50% dimethylpolysiloxane<sup>43</sup>. Such a stationary phase was also used with success for the determination of PAHs, OPAHs and PASHs by Wang et al.<sup>49</sup>. Similarly, Sklorz et al. were not able to resolve chrysene and triphenylene, as well as b and j isomers of benzofluoranthene, and dibenz[a,h]anthracene and indeno[1,2,3-cd]pyrene on a 5% phenyl column<sup>50</sup>. For these reasons,

Poster et al. considered 50% phenyl – 50% methyl polysiloxane columns as the best choice for GC resolution of PAHs in their review <sup>42</sup>.

In several works, analysts of the National Institute of Standards and Technology presented the use of liquid crystalline columns for the separation of PAHs, a solution offering a unique selectivity based on molecular shape <sup>51,52</sup>. But because of its poor thermal stability, and of the huge development of capillary polysiloxane columns, this phase has not been widely applied in other recent works and is no longer commercially available <sup>53</sup>.

The injection of liquid extracts in the GC instrument has not been stated as a major issue in related articles. It is often performed with “classical” parameters, i.e. temperatures above 250°C, up to 320°C <sup>54–56</sup>.

In splitless mode, a pressure pulse can be applied to “push” the sample and reduce peak broadening. When around one minute of injection is completed, the split valve should be re-opened to avoid clogging of the injector.

The split ratio applied in the injector usually depends on the expected PAHs concentrations and matrix contaminations: the more concentrated the PAHs in the sample and the more highly loaded the matrix, the higher the applied split ratio. The majority of the developed methods involve splitless mode, but split ratios up to 1:20 can be expected <sup>32–34,56,57</sup>.

Nonetheless, Poster et al. rather advised for cold on-column (COC) injection for PAH analysis, stating that the resolution of low-molecular-mass PAHs could be improved <sup>42</sup>.

Programmable Temperature Vaporizer (PTV) can also be interesting, as it enables to inject larger volumes when expected levels are very low, and protects thermolabile compounds by heating and vaporizing them progressively. Scipioni et al. have implemented PTV for the simultaneous determination of PAHs and NPAHs (which are more sensitive than PAHs) <sup>58</sup>. Norlock et al. applied successfully PTV-GC-MS to 16 PAHs, demonstrated the enhancement of sensitivity thanks to higher injected volumes, and detailed the critical PTV parameters to improve sensitivity and robustness of the method <sup>59</sup>.

#### 2.2.1.b. OPAHs

Several categories of oxygenated PAHs should be distinguished: this class is composed of carbonyl, hydroxyl and carboxyl PAHs. Among those, only carbonyl PAHs, i.e. ketones and quinones, can be directly analyzed by GC.

On the other hand, carboxyl and hydroxyl PAHs require derivatization (silylation) in order to increase their volatility and thermal stability. This derivatization step is usually performed with N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) and trimethylchlorosilane (TCMS) to obtain the trimethylsilyl derivatives (ethers or esters) <sup>60–62</sup>. Another possibility is to use pentafluorobenzoyl chloride (PFBCl), as presented by Lin et al. <sup>41</sup>. In this case, hydroxyl functions are acylated.

Because of the polar character of OPAHs, the choice of the best stationary phase requires more consideration for OPAHs determination than for PAHs. Indeed, 5% phenyl and 50% phenyl phases have both been implemented by various labs <sup>17,49,60,63,64</sup>.

Nocun and Schantz compared polar DB-17ms (50% phenyl) with non-polar DB-XLB and reported a better resolution on the more polar column, whereas several compounds such as 1,4-phenanthrenequinone, 9,10-anthraquinone, benzofluorenone, benzanthrone and cyclopentaphenanthrenone could not be quantified on the DB-XLB column because of co-elutions<sup>38</sup>. The same co-elution between 1,4-phenanthrenequinone and 9,10-anthraquinone was reported by Liu et al.<sup>65</sup>.

These results tend to orient the column choice towards intermediate polarity columns for OPAHs.

The sample injection is not anecdotal in the case of OPAHs. Indeed, there is a risk of thermal degradation of OPAHs during injection at high temperature, as reported by various groups for different compounds such as phenanthrenequinone or acenaphthenequinone<sup>38,65</sup>. Because of this, Nocun and Schantz implemented cold on-column injection<sup>38</sup>. Similarly, Albinet and co-workers developed methods with cool injections either programmed from 40 to 320°C (PTV) or set at 140°C<sup>31,63</sup>.

Yet, there is still a majority of works on OPAHs which report classical splitless injections at temperatures above 250°C<sup>33,60,66–68</sup>.

#### 2.2.1.c. NPAHs

In the case of nitrated PAHs GC separation, reference works have been published by the groups of Holly A. Bamford and Dawit Z. Bezabeh in the United States<sup>69,70</sup>. In their articles, they presented a comparison of 5% phenyl and 50% phenyl stationary phases for resolution of NPAHs. On the less polar columns such as 5% phenyl, 2-nitrofluoranthene and 3-nitrofluoranthene cannot be satisfyingly resolved. This is troublesome because they are often used as tracers of primary vs. secondary formation of NPAHs, so they need to be reliably quantified individually (see Section 2.4.3). Bamford et al. reported a better separation of nitrofluoranthene isomers on 50% phenyl columns<sup>69</sup>. In addition, other isomers such as those of nitropyrene, nitroanthracene and nitrophenanthrene showed a better resolution on these more polar columns, encouraging the use of such stationary phases.

However, the same authors reported the poor resolution of nitrobenzo[a]pyrene and nitrobenzo[e]pyrene on a 50% phenyl column. For this reason, Albinet et al. chose to work on a 5% phenyl column. They wanted to study closely the degradation products of benzo[a]pyrene which is the reference compound in terms of toxicity for PACs<sup>31</sup>.

Therefore, the definition of priority compounds in an analytical study of NPAHs is the key factor to settle the choice of the GC column. This explains why, similarly to what we described for OPAHs, both 5% phenyl<sup>31,58,64,71</sup> and 50% phenyl<sup>36,56</sup> columns have been implemented in NPAHs studies.

Another similarity between OPAHs and NPAHs is the risk of degradation in the injector. This was stated, among others, by Albinet et al. who chose to perform cool injections in their studies on polar PAHs derivatives<sup>31,63</sup>, and by Zielinska and Samy in their review of the early

works about nitrated PAHs <sup>24</sup>. Cool injections were also advised by Bamford et al. in what we called above a “reference work” <sup>69</sup>.

Apart from Scipioni et al. and Tutino et al. who implemented a PTV injector from 90 to 290 °C and from 50 to 300°C, respectively, so that degradation of the most volatile and thermosensitive NPAHs could be avoided <sup>36,58</sup>, most of the recent analytical methods still rely on traditional injections above 250°C <sup>41,56,66</sup>. These injections should be performed in splitless mode, because concentrations of NPAHs in particulates are usually very low, so injection parameters should be chosen to enhance the sensitivity.

#### 2.2.1.d. AZAs

Although interests in this class of compounds showed up relatively early in the history of environmental analysis of PACs, especially by gas chromatography <sup>72,73</sup>, only a few works report the analysis of azaarenes. For these compounds, one can consider the article of Chen and Preston from 1998 as a reference. In their study, they detected as much as 47 azaarenes individuals in ambient aerosol samples, and the separation was performed with a non-polar 5% phenyl stationary phase <sup>25</sup>.

A few years later, Sauvain et al. compared 5% phenyl and 50% phenyl stationary phases without observing a major difference in terms of recovery for the three studied AZAs <sup>43</sup>.

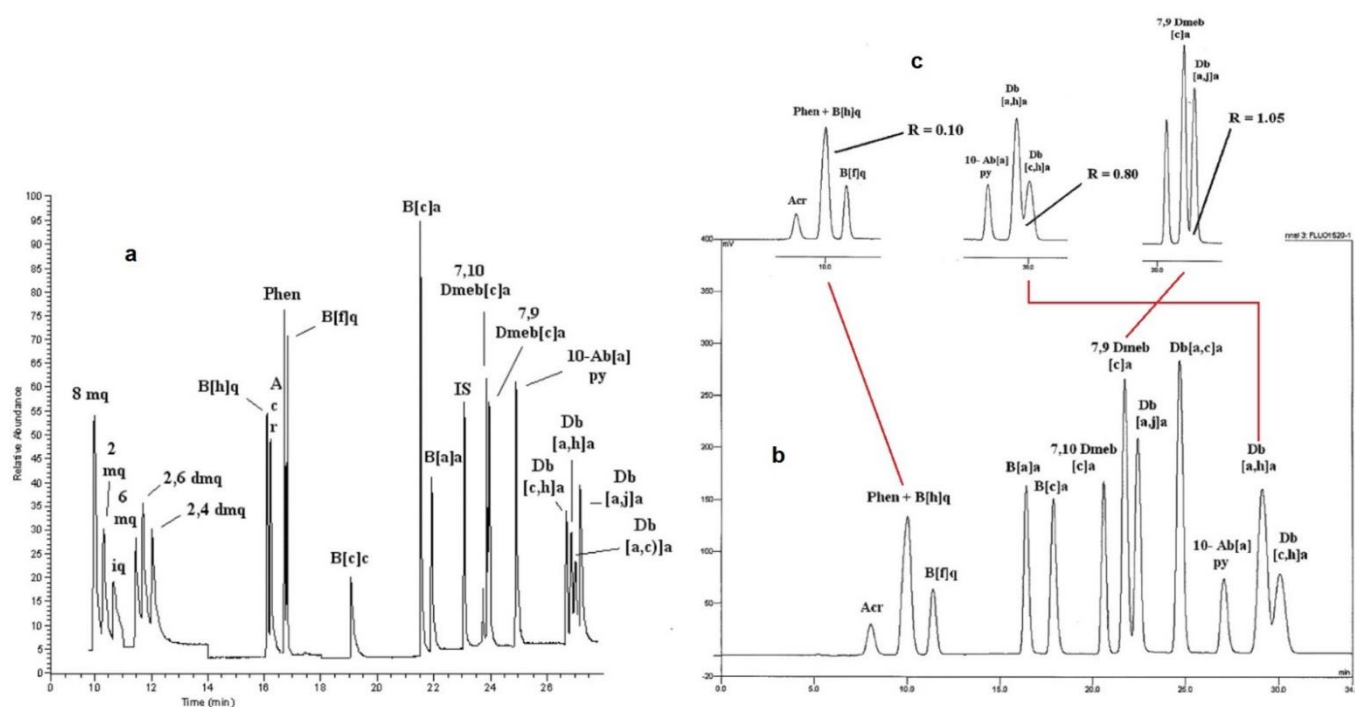
The work of Delhomme and Millet in 2008 had the purpose of comparing the performance of GC and LC for azaarenes determination. Their stationary phase was trifluoropropylmethyl polysiloxane, and enabled to separate 20 different azaarenes in less than 30 minutes, with slight overlaps for the dibenzacridine isomers but still a better resolution than the one obtained with the LC method, as presented in Figure 2.1. This work can therefore be considered as a good starting point for the development of a method targeting AZAs <sup>74</sup>.

Vicente et al. and Alves et al. included quinoline, benzo[h]quinoline, acridine and carbazole in their analysis campaigns of PAHs and derivatives in atmospheric PM, based on the GC method developed by Bandowe and Wilcke for PAHs and OPAHs, involving the use of a classical 5% phenyl column <sup>60,75,76</sup>.

In the works of Delhomme and Millet, Vicente et al. and Alves et al. mentioned above, injections were performed classically, at a temperature of 280°C, and no potential degradation of the AZAs was reported <sup>74-76</sup>. Only Sauvain et al. chose to inject their samples with a temperature ranging from 40 to 300°C in the course of the injection <sup>43</sup>.

#### 2.2.1.e. PASHs

Reference works for the GC separation of PASHs have been based on the analysis of fossil fuel or coal-tar SRMs <sup>29,77</sup>. In both of these articles, authors presented comparisons of different stationary phases. Their conclusions were consistent, because both studies reported the better suitability of polar columns for the resolution of PASHs.



**Figure 2.1 : Comparison of separation of 20 azaarenes obtained with:**  
**a) a GC-MS method with a 50% trifluoropropyl, 50% methylpolysiloxane column (30m x 0.32mm x 0.25 $\mu$ m) (total analysis time = 30 min), and**  
**b) a LC-FLD method with a C18-PAH column (250mm x 4mm i.d.) (total analysis time = 35 min).**  
**In c), LC-FLD chromatogram (b) is zoomed in on co-eluting peaks (resolution inferior to 1.5).**  
*Adapted from Delhomme and Millet <sup>74</sup>*

Schmid and Andersson observed coelutions of dibenzothiophene with naphtho[1,2-b]thiophene and of phenanthrene with naphtho[2,1-b]thiophene on a low-polarity column (30% biphenyl), but these compounds were well resolved on a polar column (100% cyanopropyl) <sup>77</sup>. Mössner and Wise also reported this same coelution between dibenzothiophene and naphtho[1,2-b]thiophene on the non-polar DB-5MS, a problem solved with the use of a 50% phenyl column <sup>29</sup>.

On the other hand, Zeigler et al. studied retention behaviors of PASHs on various columns, and did not quite reach the same results. They stated the coelution of dibenzothiophene with naphtho[1,2-b]thiophene both on the 5% phenyl and on 50% phenyl column. Among the four stationary phases they compared, the lowest proportion of coelutions was obtained on a trifluoropropylmethyl phase, followed by the 5% phenyl and the cyanopropylmethyl phases <sup>78</sup>.

Following these statements, part of the GC methods for PASHs separation in the literature involve the use of polar columns <sup>49,79</sup>, and another part the use of non-polar columns <sup>40,80,81</sup>. Anyway, the coeluting molecules should be known in advance or searched carefully in order to avoid analytical errors. Moreover, according to Andersson et al., even keeping the same phase, results can be different depending on the commercial column used and some coelutions can be fixed by using a different column of the same category <sup>82</sup>.

Wilson et al. listed some other examples of stationary phases used to resolve PASHs such as 50% liquid crystalline-dimethylpolysiloxane and poly-cationic ionic liquids, but these are far less current <sup>53</sup>.

To our knowledge, no particular issue has been described until now concerning a suspected thermal sensibility of SPAHs during the injection. Zeigler et al. reported both injections with a classical injector at 300°C and with a PTV heated from 20 to 300°C <sup>78</sup>. The former solution was applied by Liang et al. at 280°C, the latter by Vu-Duc et al. from 40 to 300°C <sup>79,81</sup>.

### 2.2.2. Liquid chromatography (LC)

LC offers the advantage of enabling analysis of lowly volatile and/or thermo-sensitive compounds. This can be very interesting in the case of OPAHs or NPAHs, as explained above.

However, the resolving power of LC methods is not consistently as good as the one of GC methods, especially for isomers <sup>74</sup>. Moreover, an important difference between both techniques when it comes to multiresidue analysis of complex samples is the lower peak capacity of LC which makes the determination of a high amount of different molecules more difficult <sup>42</sup>.

Studies reporting the use of LC to separate and quantify PACs in particulates generally rely on a separation on reversed-phase C<sub>18</sub> stationary phases with acetonitrile/water or methanol/water mobile phases operated in gradient mode with decreasing proportion of water. Regarding other parameters, in most of the studies the column is not heated above 35°C and volumes injected are between 15 and 25 µL.

Several works advise for the use of a guard column to clean further up the sample before its separation on the analytical column in order to preserve the analytical equipment. This guard column should be composed of a stationary phase similar to the one of the analytical column (i.e. C<sub>18</sub>), with a similar diameter and particle size. Its length is usually around 10 mm <sup>83,84</sup>.

Further details on this “general scheme” are discussed below.

#### 2.2.2.a. PAHs

As reported by Poster et al. in their review, both LC and GC methods are applied in standard analytical methods approved by US federal agencies for the determination of PAHs <sup>42</sup>.

For instance, the EPA Method 610 is able to resolve all of the 16 EPA's PAHs, whereas the GC column described together with this LC method does not adequately resolve as much as four pairs of PAHs: anthracene and phenanthrene; chrysene and benz[a]anthracene; benzo[b]fluoranthene and benzo[k]fluoranthene; dibenz[a,h]anthracene and indeno[1,2,3-cd]pyrene <sup>42</sup>. Nonetheless, these results are to be balanced by the use of a 1.8 m x 2 mm GC glass column packed with 3% OV-17 (50% phenyl methylsilicone) instead of a capillary column, which we now know as more effective, in this EPA Method 610.

In their comparison of GC-MS and LC-FD (see the subsection on fluorescence detection, 2.3.2.b), Wise et al. stated that the first technique is very selective and enables a determination without too much sample handling and upstream clean-up, whereas LC requires more clean-up, but coupled detection techniques such as fluorescence can differentiate some isomers, which is not the case with classical Single Ion Monitoring (SIM) detection in GC-MS. In their study, GC-MS and LC-FD provided comparable results <sup>85</sup>.

The choice of the most suitable analytical technique depends on the priority compounds researched: benz[a]anthracene, anthracene and perylene present a more sensitive and selective detection by LC-FD, whereas GC-MS is more interesting for benzo[ghi]perylene for example <sup>42</sup>. As stated in section 2.2.1.a, GC on capillary columns remains the more common method for PAH analysis.

If LC separation is wished, C<sub>18</sub> is the most appropriate stationary phase, and several suppliers have developed reversed-phases based on cross-linked C<sub>18</sub> which display a particular specificity for PAHs separation <sup>37,84,86–88</sup>. The typical dimensions of these columns are between 3.0 and 4.6 mm diameter, between 50 and 250 mm length, and between 4.0 and 5.0 µm particle size.

Of course, the recent technological developments encourage the implementation of Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UPLC), for which columns have smaller diameters (< 2.5 mm) and particle sizes (< 2 µm) <sup>37,88</sup>.

Elution programs are all based on a mobile phase composed of water with acetonitrile or methanol, flowing at a rate of 0.8 to 1.5 mL·min<sup>-1</sup>. The proportion of the less polar solvent is usually set to increase from 40 to 50% at the beginning of the run to 100% at the end of the program to ensure the elution of non-polar PAHs. Depending on the number of target compounds and on the complexity of the matrix, run times can vary from half an hour to an hour, broadly speaking <sup>86–89</sup>.

#### 2.2.2.b. OPAHs

LC can be very interesting for the analysis of hydroxyl and carboxyl PAHs which require derivatization to be separated by gas chromatography (see Section 2.2.1.b). Thanks to LC, they can be directly analyzed <sup>90,91</sup>. Another advantage of this method for hydroxyl PAHs is their good sensitivity to fluorescence detection.

Moreover, LC is also suitable for ketones and quinones analysis <sup>92–94</sup>. Thus, Letzel et al. have been able to analyze acids, lactones, hydroxides, ketones, quinones and hydroxyquinones derivatives of PAHs together by LC-APCI-MS <sup>95</sup>.

C<sub>18</sub> phases generally offer a good separation efficiency, but Letzel et al. reported coelutions of the most polar degradation products of benzo[a]pyrene on such columns. Therefore, they have compared in their study four types of stationary phases: octadecyl (C<sub>18</sub>), octyl (C<sub>8</sub>), ethyl (C<sub>2-3</sub>), cyanopropyl (CN) and phenyl (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) <sup>93</sup>. They concluded that the best results were obtained with the phenyl column, because the polar substances could be separated in less than 30 minutes with



a methanol/water gradient and kept this phase for further studies <sup>93,96</sup>. In these studies, they reported a general elution scheme of OPAHs in decreasing order of polarity: carboxylated PAHs < dihydroxylated PAHs < hydroxylated PAHs ≈< PAH quinones < PAH ketones. They added that inside a sub-category of compounds, the retention time increases with increasing size of aromatic system. These statements are perfectly consistent with the expectations in the case of reversed phase liquid chromatography.

Delhomme et al. proposed two different gradients for the separations of ketones and for the separation of diketones (quinones): from 60 to 100% methanol in 8.5 minutes and from 30% to 100% methanol in 30 minutes, respectively <sup>92</sup>.

The run time highly depends on the number of different compounds included in the method. Whereas Barrado-Olmedo et al. determined their two only compounds of interest, 1-hydroxypyrene and 2-hydroxyphenanthrene, in 7 minutes in isocratic conditions, Lintelmann et al. needed 47 minutes to separate their 10 OPAHs and 17 PAHs <sup>90,94</sup>.

### 2.2.2.c. NPAHs

A major drawback of NPAHs for the implementation of their LC determination is their poor fluorescence sensitivity (see section 2.3.2.b). Therefore, they require post-column reduction to be analyzed by LC-FD, and similar LC systems with post-column reactions also need to be set up if chemiluminescence is chosen as detection method. To this end, Hayakawa et al. developed a method, later taken over in studies of Kojima et al. and Pham et al. among others, involving four pumps, a pre-column, two analytical columns and a post-column chemiluminescence reaction system <sup>17,83,97</sup>. Such systems require multiple pumps, columns, switching valves, etc. This represents an important technical complexity and several problems to solve during the method development and during the routine operation of the method.

Furthermore, the peaks obtained after LC separation and derivatization of NPAHs in a supplemental column can be broad. This leads to overlaps of peaks and even coelutions, in addition to a higher uncertainty in the quantification.

This is why the choice of mass spectrometry (MS) as detection technique after LC separation of NPAHs has gained a lot of interest <sup>13,98</sup>.

C<sub>18</sub> phases enable the resolution of a lot of NPAHs, even if in studies where many different NPAHs are separated (especially in higher mass ranges), reported run times are relatively long <sup>89,90,97,99</sup>.

Apart from post-column reagents required for the detection of the analytes, mobile phases for NPAHs analysis are similar to those described for PAHs and OPAHs analysis: methanol/water or acetonitrile/water with proportions varying from 30 to 60% organic solvent at the beginning and from 90 to 100% organic solvent at the end of the run when a gradient is applied <sup>90,99</sup>. Isocratic elution procedures have also been proposed <sup>89,97</sup>.

Schauer et al. reported the successful use of a phenyl column with a methanol/water eluent for the separation of NPAHs, except for isomers of nitrobenzo[a]pyrene which could not be resolved. The total run time for the determination of 15 individual NPAHs in their conditions was around 50 minutes<sup>98</sup>. As they used the same stationary phase as Letzel et al. for OPAHs (see Section 2.2.2.b), they could compare the retention behavior of NPAHs with the one of OPAHs, and concluded that the increase of retention time with molecular mass inside the NPAHs category was very similar to the observations of Letzel et al. on OPAHs<sup>93,98</sup>. Adding NPAHs and NPAHs quinones to the previous model, the following order of increasing retention time for polar PAHs derivatives on reversed-phase columns was described: NPAHs quinones < dihydroxylated PAHs < hydroxylated PAHs < NPAHs ≈ PAH quinones.

It is interesting to note that in this study of Schauer et al., results obtained for the measurement of diesel soot SRM 1650a by HPLC-reduction-fluorescence deviated significantly from GC-NCI-MS results from previous works, without the possibility of pinpointing precisely the source of these variations for the authors<sup>98</sup>. This example highlights the variability of PACs determination depending on the chosen analytical method.

#### 2.2.2.d. AZAs

Because of the very few existing publications on the topic of azaarenes analysis in environmental samples, we only have two articles to discuss in this section, those of Delhomme and Millet, and Lintelmann et al.<sup>74,100</sup>.

Both relied on the same kind of LC column: C<sub>18</sub> phases with 250 mm length and 5 μm particle size. Both reported similar run times for a similar number of analytes, respectively the separation of 13 analytes in 35 minutes and 17 analytes in 30 minutes. However, the elution program differed between these studies: whereas Delhomme and Millet started the separation from 70% methanol, Lintelmann et al. started from 5% methanol, but both final conditions were 100% methanol to ensure the elution of most retained compounds.

These works are also complementary because Delhomme and Millet implemented fluorescence as the detection method, and Lintelmann et al. presented the hyphenation of LC with APPI-MS/MS detection.

Delhomme and Millet described their GC method as more appropriate for the analysis of azaarenes because of a better separation than with the LC method, for which coelutions were noticed, particularly between phenanthridine and benzo[h]quinoline. These ones are clearly visible in Figure 2.1. Other coelutions were observed by Lintelmann et al. between isomers of dibenzacridine.

On the other hand, Delhomme and Millet reported that the detection limits of the LC method were lower than those of the GC method, highlighting a major benefit of LC-FD determination of azaarenes. But the problems of resolution, especially between isomers (see Figure 2.1), and of lesser specificity of the fluorescence detection, rather influence the choice of instrument in the favor of GC-MS, hence the higher amount of works reviewed in Section 2.2.1.d.

### 2.2.2.e. PASHs

The separation of PASHs in environmental samples is not frequently performed by HPLC either. As stated by Andersson et al., its relatively low resolving power complicates the analysis of complex samples when several different compounds are targeted, unless a prior fractionation of the PAC content of the sample is performed <sup>82</sup>.

Still, Wilson et al. studied extensively the retention of PASHs on reversed-phase LC columns <sup>101</sup>. Because PAHs and PASHs are comparable in terms of LC retention, C<sub>18</sub> columns is the more appropriate stationary phase for PASHs resolution by LC.

Wilson et al. classified the PASHs in six different categories from three to six rings and defined retention models depending on the length-to-breadth ratios of the compounds, i.e. on their molecular shape. Importantly, they could not resolve satisfyingly the three-ring PASHs, i.e. dibenzothiophene, [1,2-b], [2,1-b] and [2,3-b] isomers of naphthothiophene. These molecules were already defined as problematic in case of GC separation (see Section 2.2.1.e), but the results of Wilson et al. showed no improvement when LC was used. Several other coelutions were observed for bigger PASHs <sup>101</sup>.

### 2.2.3. Two-dimensional chromatography

Samples such as airborne particulate matter or diesel exhaust particulate matter show a very high chemical complexity. In particular, PACs which are widely present in these matrices regroup hundreds of components, with variable molecular size, volatility or polarity.

Therefore, although it is rarely implemented because of its high technical sophistication, comprehensive two-dimensional chromatography can be a solution to resolve various PACs which could not be determined reliably with classical LC or GC. In this purpose, various works using GCxGC or LCxGC systems have been published. They will be the topic of this section.

#### 2.2.3.a. GCxGC

According to what we discussed in Section 2.2.1, it can be difficult to resolve simultaneously polar and non-polar PACs on the same GC column, or to find an ideal temperature program to resolve PAC isomers with very similar physicochemical properties.

Thanks to the capabilities of two-dimensional GC (GCxGC), Fushimi et al. published a method where a lot of PAHs, OPAHs and NPAHs could be determined simultaneously, with very good limits of detection <sup>102</sup>. Manzano et al. developed the same kind of method, but added to their list of analytes PASHs and halogenated PAHs, which brought the number of analytes up to 85 <sup>103</sup>.

They took profit of the orthogonality of 5% phenyl and 50% phenyl stationary phases. This hyphenation is the most commonly implemented, because the difference of polarity between the two columns enables to separate in the second dimension (50% phenyl column) groups of peaks

which are known to coelute in the first dimension (5% phenyl column). The same combination of 5% phenyl and 50% phenyl columns was used the other way round by Zeigler et al. for the resolution of 119 PASHs <sup>78</sup>.

Manzano et al. proposed an even more orthogonal combination, between a liquid crystal column (LC-50) in the first dimension and a nano-stationary phase column (NSP-35) in the second dimension <sup>104</sup>. With this combination, they reported significantly shorter analysis times for complex PAH mixtures compared to 1D GC/MS and potentially reduced sample preparation. They compared this method with the combination of 5% phenyl and 50% phenyl phases and advised for the LC-50 / NSP-35 system because of its better resolution and more accurate quantification of complex PAH mixtures in environmental samples, including extracts with no silica gel clean-up <sup>103,104</sup>. The lesser need of sample clean-up is another advantage of comprehensive GCxGC, which is able to resolve a higher number of compounds and is therefore less sensitive to matrix composition.

Even if the above-cited works offer promising possibilities, we should mention once again that GCxGC is far more difficult to implement than traditional one-dimension GC. It requires a lot of technical knowledge and a longer method development.

#### 2.2.3.b. LCxGC

A Swedish research group has developed for years a LCxGC analytical system and applied it for the determination of PAHs <sup>105,106</sup> and AZAs <sup>107</sup> in various particulate matter samples and SRMs.

This uncommon hyphenation enabled Tollbäck et al. to separate AZAs in two groups, acridines and carbazoles, in the first dimension (LC with a polar dimethylaminopropyl phase), and then to resolve the different compounds of the carbazole group in the second dimension (GC with non-polar 5% phenyl phase) after back-flush of the LC column. The time required for a complete analysis was less than 40 minutes. According to the authors, this system offers a far better sensitivity than if the LC fractionation is performed off-line, and the automation reduces sample handling and time consumption <sup>107</sup>.

The instrumentation presented by Christensen et al. also relies on a polar column (nitrophenylpropyl) in the LC dimension, which was used for the fractionation of PAHs and aliphatic / olefinic / mono- and di-aromatic compounds, with application of a back-flush to recover the PAHs fraction, and then the injection of this fraction on a non-polar GC column (5% phenyl) for separation and MS detection. The main instrumental difference between their work and the one of Tollbäck et al. was the use of PTV injector which offers a good reproducibility even when large volumes are to be injected <sup>105</sup>.

Similarly to what we discussed with two-dimensional GC, the analytical possibilities of on-line LC-GC are really interesting in terms of reducing interferences in complex samples and enhancing sensitivity, but it requires much technical ability and experience for its development and for troubleshooting on daily applications.

## 2.3. Detection

### 2.3.1. Mass Spectrometry (MS)

#### 2.3.1.a. GC-MS

In accordance with the observations reported in the previous section, gas chromatography can be considered as the major separation method for PACs.

Mass spectrometry is the preferable detection method after a GC separation, because it is universal and offers a combination of selectivity and sensitivity with which no other GC detector can compete.

In the GC-MS coupling, regardless of the target compounds, an ionization source is largely predominant over the others: Electron Ionization (EI). Among PACs, the prevalence of EI is verified for PAHs, PASHs and AZAs <sup>29,35,43,74,78,108</sup>.

Generally, the ionization energy is standardized at 70 eV, and the ionizing current, which is only rarely documented, is around 35  $\mu\text{A}$  <sup>19,102</sup>. The EI source temperature is commonly set at 230°C <sup>48,53,60,78</sup>, but some works report a higher heating of the source, up to 300°C <sup>36,102,109</sup>.

A possible justification for using a hotter source is the risk of deposition within the instrument of the less volatile analytes (such as HMW PAHs), which can rapidly cause decreases in sensitivity and reproducibility. To this purpose, Anderson et al. developed a “self-cleaning” ion source with in-source hydrogen injection and a coarser extraction lens, which they operated at 340°C, therefore enhancing sensitivity and reproducibility <sup>54</sup>.

The exception to the use of EI for PACs ionization regards NPAHs. These compounds give higher MS responses when Negative Ion Chemical Ionization (NICI) is used instead of EI. Indeed, according to Bezabeh et al., negative ions formation from NPAHs is favored over positive ions formation, and the electron-withdrawing character of the  $\text{NO}_2$  group promotes electron capture <sup>70</sup>.

With methane ( $\text{CH}_4$ ) as reagent gas in the source, highly electronegative compounds are readily ionized by resonance capture of the thermal electron, whose low energy induces very few fragmentation. NICI yields sensitivities two orders of magnitude greater than those obtained with EI <sup>69</sup>. Furthermore, it is particularly selective towards molecules bearing such electron-withdrawing groups, which leads to a great reduction of background noise and interferences <sup>110</sup>. Therefore, this ionization method has been implemented in lots of studies on NPAHs <sup>19,31,64,108,111</sup>.

Yet, EI can still be used to detect NPAHs with satisfying signals, though lower than those obtained with NICI <sup>36,58,102,112</sup>. The use of EI is appropriate in analytical methods associating NPAHs to other PACs.

NICI operating conditions are less standardized than EI parameters. From the data gathered in our references, NICI electron energy can vary from 45 eV to 207 eV and source temperature from 150 to 300°C <sup>19,31,61,71,108</sup>.

Electron Capture Negative Ionization (ECNI) has been reported by Lin et al. for the determination of NPAHs <sup>41</sup>. The main difference between ECNI and NICI is that the electrons responsible for the ionization of the analytes are not provided by a reagent gas in this case. In ECNI, the only role of the reagent gas is to decelerate the electrons from the filament to close to thermal energy. Nonetheless, considering that the ionization energies of ECNI and NICI are very close, the ion source conditions to achieve ECNI and NICI are identical, so both can compete in the same source for a single mass spectrometry acquisition <sup>113</sup>.

The remaining PAC category which we did not mention above is OPAHs. Indeed, the electronic properties of these molecules make them appropriate to both EI <sup>17,19,38,102,112</sup> and NICI <sup>31,64,71,111</sup>.

They can be included in GC-MS methods either with PAHs or with NPAHs without requiring a major change of ionization technique. However, Cochran et al. found that the detection limits obtained when analyzing OPAHs with EI were lower than when NICI was applied <sup>61</sup>.

EI, CI and ECNI sources are operated under vacuum (although the pressure in an EI source is about  $10^5$  times lower than in CI sources). They correspond to classical setups of GC-MS and have been implemented for decades. On the other hand, more recently, some analytical scientists have adapted atmospheric pressure sources, generally coupled to liquid chromatography (see Section 2.3.1.b), to gas chromatography. These works were reviewed by Li et al. <sup>114</sup>.

The main example of such setups is GC-APCI-MS. It was recently applied by Lammel et al. for the determination of OPAHs and NPAHs <sup>67</sup>. Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) was operated under dry source conditions with nitrogen. This method enabled them to reach low limits of quantification (LOQ), even for high-molecular weight compounds, whose LOQ were below the  $\text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$  level in the particulate phase and in the gas phase.

Even more sensitive and selective for PAHs, Atmospheric Pressure Laser Ionization (APLI) has been presented in hyphenation with GC by Schiewek et al. and Große Brinkhaus et al. <sup>115,116</sup>. This source is far less common than APCI, it was first presented by Constapel et al. in hyphenation with LC <sup>117</sup>. APLI is particularly adapted to non-polar and HMW molecules containing aromatic systems. Therefore, Schiewek et al. applied successfully GC-APLI-MS to PAHs and AZAs, Große Brinkhaus et al. to PAHs and PASHs <sup>115,116</sup>.

However, this source is particularly specific to PAHs and not to a lot of other compounds, thus the lack of commercial availability. In the above-quoted works, GC-APLI-MS systems were "homemade" starting from commercial APCI designs. As well as GC-APCI-MS, these systems require an additional nitrogen flow to work similarly to a LC sprayer and match the pumping speed of the MS. More details about this ionization source are presented in Section 2.3.1.b.

In their work, Schiewek et al. compared sensitivities obtained with APLI and EI. The result was outstanding: with GC-APLI-TOF-MS, they reported a sensitivity  $10^3$  times superior to classical GC-EI-TOF-MS <sup>116</sup>. With a concomitant enhancement of the sensitivity and reduction of background noise because of the selectivity of APLI towards PAHs, Große Brinkhaus et al.

highlighted the possibility of a higher dilution of samples to reduce degradation of the chromatographic system. The concentrations that they measured in coal and suspended PM samples were consistent with GC-EI-MS results <sup>115</sup>.

When simple “1D” MS is performed, Single Ion Monitoring (SIM) mode (or equivalents such as Single Ion Storage (SIS) in Ion Traps) is used for the analytes detection.

It enables to “focus” the detection on only one compound with its characteristic ion, therefore increasing sensitivity and selectivity, but Andersson et al. warned against the inability of SIM mode to distinguish between co-eluting isomers, which is likely for PASHs for instance, or for PAHs pairs such as chrysene/triphenylene or benzofluoranthenes <sup>82</sup>.

The monitored ions depend on the nature of the source, which determines if fragmentation takes place, if the molecular ion is ionized by charge transfer, by protonation or deprotonation, etc. A summary of characteristic ions for various PAC categories, various ion sources and MS<sup>1</sup> or MS<sup>2</sup> setups can be found in Table 2.1.

Quadrupole (Q), ion trap (IT), and increasingly time-of-flight (TOF) are the most frequent GC-MS analyzers. The capabilities of the analyzer also has an influence on the performance of the analytical method. For instance, in their review of GC-MS methods for PAHs determination, Poster et al. stated that the implementation of an ion trap increased selectivity compared to a quadrupole, and that with an IT, the Full Scan (FS) mode could be used instead of SIM without losing sensitivity. On the other hand, linearity issues can arise with ion traps <sup>42</sup>.

The implementation of TOF analyzers seems to be promising, since TOF associates a full spectral sensitivity with a high resolving power, increasing signal-to-noise (S/N) ratios <sup>42</sup>, and presents a very high acquisition rate, enabling to distinguish peaks which could not be totally resolved by GC thanks to very low cycle times in the MS <sup>113</sup>.

#### 2.3.1.b. LC-MS

LC-MS hyphenations have been developed for decades with the implementation of Atmospheric Pressure Ionization (API) methods, comprising Electrospray Ionization (ESI) and Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), the two major sources used in LC-MS. These are particularly suitable for polar compounds, capable of undergoing acid-base ionization reactions. However, to analyze non-polar, aprotic species, some alternatives are to be studied <sup>117,118</sup>.

Among those alternatives, Atmospheric Pressure Photoionization (APPI) is the most developed. It is based on a single-photon ionization process <sup>114,117</sup>.

The main issue with APPI when coupled to LC is the multitude of reactions (such as clustering) due to the mobile phase. Combined to a limited photon flux, it reduces the total ion yield, especially for the molecular ion.

Dopant Assisted APPI (DA-APPI) has been developed to enhance the ionization thanks to a photoionizable compound (e.g. acetone or toluene) which can become a reactant to ionize analytes by charge exchange or proton transfer, similarly to CI. Nonetheless, the formation of adducts complicates the mass spectra interpretation <sup>114,117</sup>.

To overcome the drawbacks of APPI and DA-APPI, Constapel et al. developed a novel source in 2005 : APLI <sup>117</sup>. With the use of a near-UV ( $\lambda=248$  nm) laser beam, APLI relies on resonantly-enhanced multi-photon ionization (REMPI). As its ionization reactions are specific to PAHs and similar molecules, it disables adsorption of photons and energy transfer steps from the LC mobile phase. The resonant enhancement of the ionization process leads to a great sensitivity for PACs and for PAHs in particular.

The choice of the appropriate source is essential to yield an ionization as complete as possible. In the following paragraphs, we review studies where comparisons of the efficiency of different sources for LC-MS analysis of PACs were performed.

To our knowledge, the only successful application of LC-MS for determination of PAHs in environmental samples was obtained with APLI, because their non-polar character prevents an efficient ionization with the most classical commercially available API sources, i.e. ESI and APCI. LC separation of PAHs is preferentially followed by fluorescence detection.

LC-APLI-TOF-MS determination of PAHs was first developed by Constapel et al <sup>117</sup>. The authors obtained LOD at least two orders of magnitude lower than LOD from LC-APCI-TOF-MS <sup>117</sup>. More recently, Thiäner et al. applied this method to analyze PAHs with a particular focus on HMW PAHs (from 6 to 8 rings), which are difficult to analyze by GC-MS because of their low volatility, and reached excellent instrumental detection limits, from 0.008 pg to 1.842 pg <sup>119</sup>. The main problem remaining with APLI is its lack of commercial availability.

OPAHs are slightly more polar than PAHs, thus it is possible to detect them with more familiar sources, i.e. ESI, APCI and APPI. Comparative studies of these sources were performed by Grosse and Letzel and Delhomme et al. <sup>92,96</sup>.

Their conclusions were broadly consistent, as both articles reported that ESI was ineffective for OPAHs ionization. In contrast, APCI enables a good formation of both positive and negative ions. This duality is important because among OPAHs, great differences are observed: hydroxy-PAHs are only detected in negative mode, whereas ketones and lactones are only detected in positive mode.

APPI can also be implemented for OPAHs ionization thanks to its ability to form negative ions, but APCI is preferable for its more efficient ionization in positive mode <sup>96</sup>.

While De Guidi et al. reported the use of ESI for NPAHs analysis, Schauer et al. used APCI in both positive and negative modes <sup>89,98</sup>. LOD obtained by Schauer et al. were higher than LOD of LC-FD methods for NPAHs, but mass spectrometry enables a supplemental distinction of signals and the identification of compounds <sup>98</sup>.



Lastly, azaarenes analysis by LC-MS has been described by Lintelmann et al. with the use of an APPI source in positive mode <sup>100</sup>. More precisely, in this work, DA-APPI was performed with toluene preferred to acetone because of the lower background noise it induced.

In order to present a comprehensive information in our review, the major ions obtained for each PAC category with its corresponding source are reported in Table 2.I.

Furthermore, in Table S1, we review the important API source setups optimized in various studies to enhance the detection of PACs by LC-MS.

### 2.3.1.c. Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)

As discussed in Section 2.3.1.a, SIM mode can be problematic for isomers, which are frequent in PACs analyses. In fact, Antle et al. reported that between 1995 and 2014, up to 75% of analytical studies on PAHs and PASHs using GC-MS in SIM mode with the detection of one ion only resulted to incorrect peak assignments and false positives <sup>80</sup>.

To monitor multiple ions simultaneously for each analyte is a possible solution, but it sometimes does not eliminate all the possible confusions, because some isomers have a very similar structure and therefore exhibit the same fragmentation patterns in the source.

Tandem Mass Spectrometry (MS/MS or MS<sup>2</sup>) has been applied successfully to PAHs <sup>34,54,102,109,112</sup>, OPAHs <sup>67,71,92,94,102,112</sup>, NPAHs <sup>36,67,71,102,112</sup>, AZAs <sup>100</sup> and PASHs <sup>122</sup>. This technique offers more specificity than MS<sup>1</sup>.

For PACs detection after chromatographic separation, MS/MS is often performed with a triple quadrupole used in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. MRM generally takes profit of Collision Induced Dissociation (CID) processes. Depending on the stability of the ion, collision energies from 5 to 50 eV have to be applied in the collision cell to perform fragmentation.

While compounds of the same molecular mass exhibit disturbing signals in SIM mode (either noise at different retention times or interferences at the same retention time), these signals will be reduced with the use of MRM mode. Thus, S/N are generally increased and detection limits reduced with the use of MS/MS.

As stated above, a large majority of Tandem Mass Spectrometers are Triple Quadrupole (QQQ) devices. The use of Quadrupole – Time-Of-Flight (Q-TOF) instruments is increasing because of the enhancement of sensitivity and resolving power and the reduction of cycle time brought by the TOF analyzer (see Section 2.3.1.a). Ion Trap also offers the possibility of performing MS/MS in a sole analyzer thanks to the application of collision energies inside the IT.

For what regards PACs, fragmentation patterns found in MS/MS experiments are given in Table 2.I, with the functional groups cleaved by CID and their associated mass losses.

**Table 2.1 : Major ions monitored in MS methods for the determination of PACs**

	<b>PAHs</b>	<b>OPAHs</b>	<b>NPAHs</b>	<b>AZAs</b>	<b>PASHs</b>
<b>EI</b>	M <sup>+</sup> ; [M-H] <sup>+</sup> ; [M-2H] <sup>+</sup> ; [M+H] <sup>+</sup> ;	M <sup>+</sup> ; [M-CO] <sup>+</sup> ; [M-2(CO)] <sup>+</sup> ; [M-CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; [M-CO <sub>2</sub> -CO] <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> ; [M-NO] <sup>+</sup> ;	M <sup>+</sup> ; [M-CHN] <sup>+</sup> ; [M-CH <sub>2</sub> N] <sup>+</sup> ; [M-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N] <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> ; M <sup>2+</sup> ; [M-H] <sup>+</sup> ; [M-CS-H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
<b>NICI</b>	/	M <sup>-</sup>	M <sup>-</sup> ; [M+H] <sup>-</sup> ;	/	/
<b>APCI</b>	/	M <sup>+</sup> ; [M+H] <sup>+</sup> ;	[M+H] <sup>+</sup> ; [M+H-OH] <sup>+</sup> ; [M+H-NO] <sup>+</sup> ; [M+H-HNO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ;	/	/
<b>MS<sup>1</sup></b>					
<b>APCI</b>	/	M <sup>-</sup> ; [M-H] <sup>-</sup>	M <sup>-</sup> ; [M-NO] <sup>-</sup>	/	/
<b>-</b>					
<b>APPI</b>	/	M <sup>+</sup> ; [M+H] <sup>+</sup> ;	/	[M+H] <sup>+</sup>	/
<b>+</b>					
<b>APPI</b>	/	M <sup>-</sup> ; [M-H] <sup>-</sup>	/	/	/
<b>-</b>					
<b>APLI</b>	M <sup>+</sup>	/	/	M <sup>+</sup>	M <sup>+</sup>
<b>MS<sup>2</sup></b>					
<b>CID</b>	- H (-1) ; - H <sub>2</sub> (-2) ; - C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (-26) ; - C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> (-50)	- CO (-28) ; - (CO+H) (-29) ; - (CO <sub>2</sub> +H) (-45) ; - 2(CO) (-56) ; - (2(CO)+H) (-57)	- C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (-26) ; - NO (-30) ; - NO <sub>2</sub> (-46)	- CH <sub>2</sub> N (-28) ; - C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N (-33) ; - C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> (-53)	- C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (-26) ; - CS (-44) ; - CSH (-45)
<b>Refs</b>	19,34,54,79,109,117,120	17,19,31,92,94,96,121	19,36,98,102,110	74,100,116	78,115,122

\* In this table, alkylated PACs are not taken into account. In the case of the MS detection of these compounds, the loss of the alkyl substitutes (CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, etc ...) gives birth to the major fragments, either in-source or collision-induced.

Among PACs, one group is particularly resistant to CID: parent PAHs. They are only constituted of aromatic rings, do not comprise any heteroatom or alkyl group. Therefore, their structure is very stable, even when CID is applied. This phenomenon complicates their analysis in MRM mode. This is why Lian et al. implemented a “pseudo-MRM” method<sup>34</sup>. This means that the monitoring of the intact molecular ion selected in the first analyzer was also performed in the second analyzer. No fragmentation was targeted in the collision cell, even if mild energies were still applied. Transitions with non-zero mass losses, which give a less intense signal in the case of PAHs, were only used as confirmation. It is worth noting that these transitions corresponded to very small mass losses (mainly the elimination of one or two hydrogen atoms, more rarely of a C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> moiety)<sup>34</sup>.

Villanueva et al. chose to apply “classical” MRM instead of pseudo-MRM for their analysis of PAHs, but they had to apply high CEs (from 18 to 40 eV for LMW PAHs and from 30 to 40 eV for HMW PAHs) to obtain fragments from CID<sup>109</sup>. The predominance of H and C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> knockouts was also observed and is explained in the work of Stockett et al.<sup>120</sup>.

### 2.3.2. Other detectors

Even though MS has become extensive in the field of environmental analysis, other possibilities exist to detect PACs after a chromatographic separation.

They usually offer less sensitivity and do not enable an identification of unknown compounds as MS does.

Still, it can be interesting to implement them on economic grounds or because of their ease of use. In the subsections below, these alternatives to MS and some of their operating parameters are detailed.

#### 2.3.2.a. After GC separation

The traditional detector for GC determination of organic molecules is the Flame Ionization Detector (FID). Only carbon-based molecules can be detected by FID, and their response is approximately proportional to the amount of carbon atoms, which is interesting for PACs and more particularly for PAHs detection<sup>40,42,123</sup>. However, a major inconvenient of FID is that all organic molecules give responses. This is problematic for complex matrices such as atmospheric PM or diesel particulates for instance. These kinds of samples would therefore require a very intensive clean-up before analysis, so that aliphatic compounds and lipids for example can be removed<sup>124</sup>.

Moreover, Cox and Earp have reported a better sensitivity of PAHs determination with a Photoionization Detector (PID)<sup>123</sup>. It is appropriate for volatile and semi-volatile organic compounds whose ionization energy is lower than the energy of emitted photons (from 8 to 12 eV). Its use for PAHs analysis has also been reported by Poster et al.<sup>124</sup>.

A wider variety of detectors is available for polar PACs, especially NPAHs. Indeed, for nitrogen-containing analytes, the use of a nitrogen–phosphorus detector (NPD) can be interesting. This detector works with a flame ionization, similarly to FID, but redox reactions take place selectively with N or P atoms. Therefore, NPD has been broadly applied for NPAHs and AZAs determination<sup>24,40,107</sup>.

The Electron Capture Detector (ECD) is specific to electronegative molecules, which is why it has been used for NPAHs and OPAHs detection<sup>13,24,70</sup>.

For PASHs analysis, the preferred detector is the Atomic Emission Detector (AED). Wavelengths specific to single atoms can be monitored, and AED proved itself particularly efficient for PASHs determination when both carbon ( $\lambda=193$  nm) and sulfur ( $\lambda=181$  nm) selective modes were applied<sup>29,81,82</sup>. The simultaneous recording of carbon emission enables to check the presence of a PASH responsible for the sulfur signal, because otherwise, false positives can occur due to non-sulfur compounds present in high concentrations which may create interferences<sup>82</sup>.

### 2.3.2.b. After LC separation

Like GC, LC can be followed by a selective detector other than MS. To our knowledge, three different kinds of detectors have been implemented for PACs detection after LC separation: ultraviolet (UV), fluorescence (FLD) and chemiluminescence (CLD) detectors.

In the general rule, UV detection is the method of the choice after LC separation. It was applied by Dong and Lee for the determination of PAHs ( $\lambda = 260$  nm) and by Wilson et al. for the determination of PASHs ( $\lambda = 254$  nm ; 294 nm ; 313 nm) <sup>101,125</sup>.

However, the vast majority of PAHs and derivatives exhibit fluorescence, therefore this latter is preferred because it increases significantly the selectivity and the sensitivity compared to UV <sup>124,126</sup>. Among PAHs, acenaphthylene is the only non-fluorescent molecule, and it is therefore the only one detected by UV in LC analysis methods of PAHs <sup>86,87</sup>.

OPAHs and NPAHs are the exceptions to the fluorescence properties of PACs. Indeed, these compounds are not fluorescent and require reduction, either before their LC separation or after it.

Barrado-Olmedo et al. implemented an off-line reduction of NPAHs to amino-PAHs (APAHs) with  $\text{NaBH}_4$  and  $\text{CuCl}_2$ , but the additional time required for such derivatization methods is a major drawback when large sample sets have to be analyzed <sup>24,90</sup>. According to Delhomme et al., if the reduction column is positioned before the separation column, one obtains a decrease in peak areas and a higher variability of retention times. Moreover, the simultaneous injection of all OPAHs and NPAHs of the sample on the reduction column saturates the latter much sooner than if individual PACs reach the reduction column separately <sup>99</sup>. Therefore, on-line post-column reduction of OPAHs and NPAHs is generally favored <sup>92,98,99</sup>. This way, they are reduced to hydroxy-PAHs and amino-PAHs, respectively. A 50 mm long column filled with a Pt catalyst on a  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  support is ideal for the conversion of NPAHs into amino-PAHs <sup>98,99</sup>.

Excitation and emission wavelengths stated in works using LC-UV and LC-FLD for the determination of PACs are transcribed in [Table S2](#).

Finally, chemiluminescence detection (CLD) has been used many times for the analysis of NPAHs following the same initial method <sup>17,83,97</sup>. Similarly to FLD, it requires a prior derivatization of NPAHs, because chemiluminescence is more intense with amino-PAHs. In the method developed by Hayakawa et al., the mobile phase in the separation column is composed of acetonitrile and an aqueous solution of imidazole and perchloric acid buffer at pH 7.6. Then, the post-column chemiluminescence reagent solution is composed of bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate (TCPO) and hydrogen peroxide. The amino-PAHs thus formed are in an excited state thanks to energy transfer from the simultaneous dissociation of TCPO, and exhibit chemiluminescence responsible for their detection <sup>97</sup>. This process and its application to LC-CLD determination of NPAHs was described in detail by Hayakawa <sup>127</sup>.

The sensitivity of CLD has been reported as close to or higher than the sensitivity of FLD for NPAHs <sup>24,127</sup>.

To our knowledge, among PACs, only NPAHs have been extensively analyzed thanks to chemiluminescence detection.

To conclude this section, we would like to highlight that we have presented several different detectors which are each intended for a special class of PACs. Therefore, it is not possible to obtain a sensitive detection of all PACs categories reviewed here in a unique chromatography run if MS is not the detection method.

## 2.4. Occurrence

### 2.4.1. PAHs

Among PACs, PAHs are by far the most extensively studied compounds. They have been measured in airborne particulate matter and dusts of indoor and outdoor environments in the last decades.

The main issue when one wants to compare PAHs levels reported in different studies is that such levels are generally summarized in the form of a sum of all analyzed PAHs ( $\Sigma$ PAHs), but the total number of analyzed PAHs can significantly vary. Indeed, while occurrence studies have long been based on the list of EPA's 16 priority PAHs, it has recently been highlighted that this list is relatively flawed and that some PAHs outside this list are worthy of a more extensive analytical evaluation <sup>12</sup>. This explains why some lists of target compounds have been opened up to more than sixteen, whereas others are reduced due to analytical constraints such as standards availability or robustness of the method.

Therefore, in the sum-up tables reported in the Supplement of this article ([Table S3](#)), we will report mean concentrations of all measured PAHs (total PAHs concentration stated in each study divided by the number of PAHs individual compounds).

In settled dust, PAHs concentrations are below or around the sub- $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  range (see [Table S3.C](#)) <sup>4,39,128</sup>.

In atmospheric PM, PAHs are commonly found at the  $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$  level. According to the work of Cave et al. who informatically reviewed about 3 000 papers dealing with PAHs in particulate samples, most of concentrations given in abstracts were between 0 and  $10 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$  but some outlier data points were in the range  $500 - 2\,000 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$  <sup>129</sup>. This conclusion is illustrated by Figure 2.2, presenting the range of data reported in papers where the most frequently used unit was  $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$ . However, the role of this figure is limited to providing a broad overview of PAHs occurrence values. Cave et al. cannot be sure that each of these data points refer to PAH concentrations and,

if they do, which PAH compound it refers to. Still, the overall distribution trend of PAHs concentrations inside the  $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$  order of magnitude is interesting to notice.

Among recent works, whereas concentrations in the order of  $0.1 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$  have been measured in southern Europe <sup>35,56,108</sup> and Chile <sup>58</sup>, levels of several  $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$  have been obtained in China <sup>68,130–132</sup> and Afghanistan <sup>133</sup>. Hypotheses concerning the regulations of each country on major PAHs sources such as industrial activities, vehicular emissions from traffic and domestic heating can explain these differences.

In addition to international differences regarding PAHs levels, it is also interesting to take a closer look on local variations between sampling locations from the same study. In particular, major differences can be obtained between samples from remote areas and samples collected in urban environments, close to PAHs main sources.

For instance, Schauer et al. reported a tenfold increase in PAHs concentration in an urban area of Munich compared to rural and mountainous environments of the same region <sup>98</sup>. In Chile, Scipioni et al. measured a PAHs concentration about 18 times higher in the urban site of Concepcion than in the remote site of Coyhaique <sup>58</sup>.

Other trends to be studied are seasonal variations. As a general rule, PAHs levels are lower in summer than in winter, mainly because of the reduced emissions due to residential heating, and also due to a higher atmospheric degradation of PAHs into derivatives with the increase of temperature and sunlight. These hypotheses are coherent with results in [Table S3](#).  
<sup>68,89,108</sup>

Nonetheless, Kim et al. reported that indoor sources of pollution in indoor public facilities affect more PAHs levels than seasonal trends <sup>134</sup>, consistently with the conclusions of Delgado-Saborit et al. who reported a possible prevalence of indoor sources (tobacco smoke, wood burning, heating, cooking, ...) over outdoor infiltration of PAHs <sup>135</sup>.

When comparing indoor environments of urban and rural areas, Liaud et al., as well as Anh et al., observed higher PAH levels in rural houses, contradictory to common PAH trends in outdoor environments, with a possible higher contribution of coal and biomass combustion for heating and cooking <sup>55,136</sup>.

Among indoor sources, cigarette smoke seems to be the most crucial one. Indeed, in the study of Delgado-Saborit et al., the highest PAHs concentrations were measured in airborne particulates from pubs where Environmental Tobacco Smoke (ETS) was present <sup>135</sup> and in the study of Castro et al., PAHs levels in  $\text{PM}_{10}$  and  $\text{PM}_{2.5}$  were twice higher in smoker homes than in non-smoker homes <sup>86</sup>. In the United States, Hoh et al. also established the correlation between ETS and PAHs in settled house dust (SHD) <sup>137</sup>. In a previous study, Mitra and Ray identified ETS as the most significant indoor PAHs source, contributing to almost 87% of the PAHs measured in air of smokers' homes <sup>3</sup>.

As suggested by the very high levels of PAHs measured by Li et al. in PM<sub>2.5</sub> close to cooking sources which were up to 36 times higher than the associated background levels, cooking activities, and particularly roasting and frying, are also major PAH sources in indoor environments<sup>9</sup>.

Methods used to assess the source apportionment of PAHs have been reviewed by Tobiszewki and Namieśnik<sup>10</sup>.

First, the predominance of high molecular weight (HMW) over low molecular weight (LMW) PAHs indicates an origin from high temperature combustion processes (e.g. fuels in engines), while the opposite rather suggests a major contribution of low temperature combustions (e.g. wood burning)<sup>10</sup>.

Then, it is common that ratios of pairs of PAHs which have the same molecular weight are calculated to assess the preponderance of particular sources. In that respect, ratios of isomers such as indeno[1,2,3-cd]pyrene / (indeno[1,2,3-cd]pyrene + benzo[ghi]perylene), fluoranthene / (fluoranthene+pyrene) or benz(a)anthracene / (benz(a)anthracene+chrysene) for instance can characterize the carburant responsible for PAHs emission (petrol, diesel, coal, wood, ...) <sup>6,8-10,75</sup>.

Moreover, the concentrations of several individual PAHs are handled because they give special information: for example, chrysene can be used to estimate infiltration ratios between indoor and outdoor air because its only possible source in indoor environments is cigarette smoke<sup>7</sup>, and retene is characteristic of cellulose burning<sup>138</sup>, even if Alves et al. have reported its occurrence in an urban road tunnel, suggesting that vehicular exhausts are probably another source of retene emission and that its use as a wood combustion tracer should be performed with great caution<sup>75</sup>.

The main drawback of these approaches is the atmospheric reactivity of PAHs which disables a certain identification of the source of a PAH mixture, because if they have been emitted long ago, and that their decay rate constants are different, their ratio is not conservative over time. Furthermore, other biases such as gas/particle partitioning or seasonal variations can affect these ratios<sup>10</sup>.

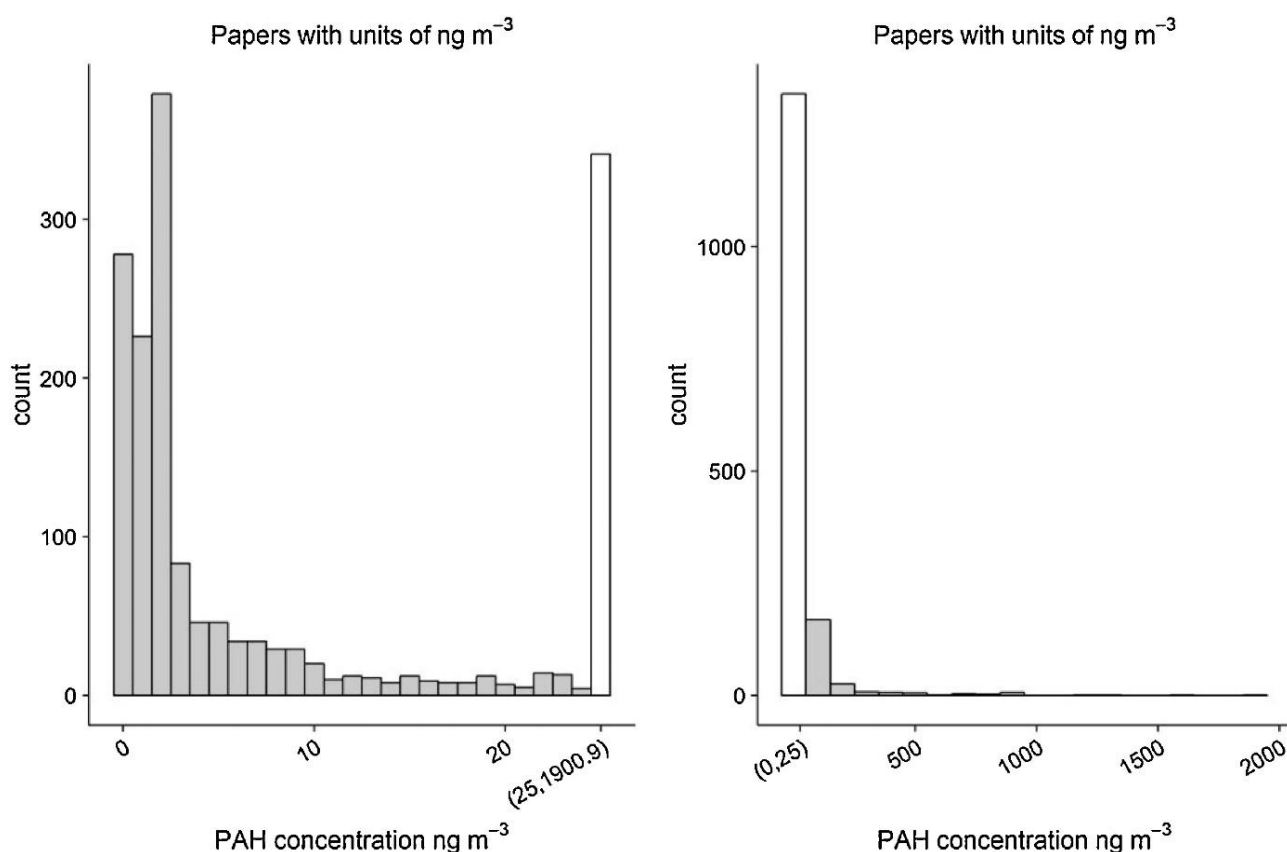
A possible improvement to decrease the uncertainty related to these diagnostic ratios is the use of cross-plots of two diagnostic ratios versus each other<sup>48,57,75,130</sup>.

For the purpose of a more accurate source attribution of PAHs, other research groups have oriented their efforts towards source apportionment based on different methods involving molecular markers outside the PAH category<sup>139</sup>, and statistical methods such as Cluster Analysis (CA) and Principal Component Analysis (PCA) have also been implemented<sup>140</sup>.

Besides the mean PAH concentration, we report in [Table S3](#). the most concentrated PAH measured, to give an additional overview of the most important compounds to include in risk assessment studies. These major PAHs are, in most environmental samples, compounds from the list of 16 priority PAHs, with the exception of benzo(e)pyrene in the studies of Di Filippo et al., Kim et al. and Li et al., and retene in the study of Alves et al<sup>9,108,134,141</sup>. Methylated PAHs such as

2,6-dimethylnaphthalene and 1-methylpyrene have also been found preponderant in combustion exhausts and soots <sup>102,142</sup>.

However, we want to highlight that the sole concentration of a PAH in a sample does not account for the real hazard related to it. Indeed, PAHs toxicities vary significantly inside the group. The most widely used method to assess the toxicity of a sample containing PAH is to use the Toxic Equivalency Factor with respect to B[a]P (TEF = 1). The work taken as reference in most cases for the use of TEFs is the one of Nisbet and LaGoy, where TEFs are attributed to the 16 EPA's priority PAHs. They range between 0.001 and 5 <sup>143</sup>. This explains why dibenz[a,h]anthracene (DB[a,h]A), the only PAH to be associated to a TEF superior to B[a]P, frequently accounts the most for the global toxicity of a PM sample while it is often one of the less concentrated compounds. Furthermore, in their study, Collins et al. added the dibenzopyrene isomers, which are 6-rings PAHs known for their acute toxicity and possible carcinogenicity, and reported PEFs from 1 to 10 for these compounds <sup>26</sup>. Similarly to DB[a,h]A, these HMW PAHs, because of their known toxicological properties, should be included in environmental analyses of PAHs.



**Figure 2.2 : Range of data reported in abstracts dealing with PAH levels where units of ng·m<sup>-3</sup> are used.**

*A “count” refers to the occurrence of a value inside a range in one of the reviewed abstracts. To obtain these data, around 3 000 articles about PAHs were reviewed by data and text mining. Reproduced from Cave et al. <sup>129</sup>*



## 2.4.2. OPAHs

Interests in OPAHs have been lower than those in PAHs up to now, but they have been measured in outdoor atmospheric PM around the world.

On the other hand, only Du et al. measured OPAHs in indoor PM, reporting a higher concentration than in their associated outdoor measurements<sup>111</sup>. Therefore, analysis of OPAHs in indoor environments is a critical lack in the current knowledge of the occurrence of these compounds. Moreover, no data on OPAHs concentrations in settled dusts have been published, and only two articles report OPAHs concentrations in combustion exhausts particulates<sup>61,102</sup>.

For what regards outdoor levels of OPAHs in atmospheric PM, Walgraeve et al. pooled a lot of results and concluded that for individual oxy-PAHs, 50% of the reported concentrations were between 0.080 and 0.960 ng·m<sup>-3</sup> (median: 0.270 ng·m<sup>-3</sup>; n = 689), whereas for individual hydroxylated PAHs, 50% of the reported concentrations were between 0.013 ng·m<sup>-3</sup> and 14.1 ng·m<sup>-3</sup> (median: 0.090 ng·m<sup>-3</sup>; n = 31)<sup>15</sup>.

In terms of geographical variations, while mean concentrations of OPAHs in airborne PM reported in France and Germany for instance were around or below 0.1 ng·m<sup>-3</sup><sup>23,37,64,88</sup>, they reached from 1 to 10 ng·m<sup>-3</sup> in China and Afghanistan<sup>111,131,133</sup>. These results are gathered in [Table S4](#).

Local trends of OPAHs follow those of PAHs: rural and remote areas are in the general rule less affected by OPAHs pollution, as shown by the study led in Czech Republic by Lammel et al. who compared samples from the rural town of Kosetice with samples from Kladno, where important industrial activities are located, and Ostrava, one of the biggest Czech cities with an important industrial activity as well. OPAHs levels in PM were far lower in Kosetice<sup>67</sup>. Similarly, Ringuet et al. reported a 15-fold increase between OPAHs levels in PM of a suburban site in the region of Paris and those of an urban traffic site<sup>23</sup>.

The results of many studies match to confirm the seasonal pattern described in Section 2.4.1: ambient concentrations of PACs are higher in winter than in summer<sup>67,68,88,108</sup>.

First, ambient conditions in winter favor the enrichment of PACs in PM. Furthermore, for OPAHs, this seasonal difference highlights an important observation: higher concentrations in winter imply a predominance of primary emissions of these compounds over secondary formation from atmospheric degradation of PAHs, which would be their main origin in summer<sup>15,19</sup>.

Such conclusions can be confirmed or rejected by the study of some diagnostic ratios, namely the ratio of OPAHs over their corresponding “parent” PAH, such as 9-fluorenone / fluorene or 9,10-anthraquinone / anthracene for instance<sup>131,133</sup>. According to the review of Walgraeve et al., one can expect to find these ratios around 0.1 in winter, and about 20 times higher in summer, when secondary formation of OPAHs due to photochemical activity is the highest<sup>15</sup>. These ratios can also be complemented by the ratio of benzo(e)pyrene over benzo(a)pyrene, which is around 1 close to emission sources, and increases with photochemical aging of PAHs, to which benzo(a)pyrene is particularly sensitive<sup>131</sup>.

### 2.4.3. NPAHs

In [Table S5](#) are reviewed reported levels of NPAHs in airborne PM and in combustion exhausts particulates.

In general, NPAHs levels are lower than PAHs and OPAHs. One exception is the “outlier” study of Keyte et al. in which reported NPAHs concentrations were up to  $287 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$ , which is huge but partly explicable by the sampling place, a road tunnel with heavy traffic in Paris <sup>37</sup>.

Otherwise, typical levels of NPAHs in airborne PM are typically in the  $\text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$  range <sup>23,64,71,88,99</sup>, occasionally closer to the  $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$  level <sup>108,111,131</sup>. In remote or rural areas where few sources of PACs are found, mean levels of the measured NPAHs can even be below the  $\text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$  threshold <sup>58,67,98</sup>.

Nevertheless, toxicological properties of a lot of NPAHs are stronger than those of PAHs for instance, particularly in terms of mutagenicity and carcinogenicity. Indeed, their mutagenicity has been confirmed, some PEFs higher than those of PAHs have been attributed to NPAHs and several NPAHs are classified as probable or possible carcinogens <sup>13,26</sup>.

This is why even at such low concentrations, NPAHs need to be analyzed in atmospheric PM, but also in PM and settled dusts of indoor environments, which has not been the case up to now, except for the study of Du et al. where NPAHs levels were higher indoors than outdoors, a result increasing the interests in such environments, as well as for OPAHs <sup>111</sup>.

Winter concentrations of NPAHs in airborne PM are clearly above summer concentrations <sup>67,99,108</sup>. This observation results from a combination of meteorological parameters (inversion temperature layers for instance), increased emissions, and gas/particle partitioning (higher proportion of NPAHs in the gas phase in summer).

In NPAHs assessment studies, particular interests are drawn in the nature of their source, mainly primary versus secondary formation. For this purpose, one can focus on the 2-nitrofluoranthene to 1-nitropyrene ratio which gives information about the predominance of primary or secondary sources, and on the 2-nitrofluoranthene to 2-nitropyrene ratio which tells if secondary formations of polar PACs are mainly OH-initiated or  $\text{NO}_3$ -initiated <sup>13,19–21,23,24,71</sup>. Similarly to OPAHs, it can also be interesting to study the ratio of NPAHs to their parent PAHs to get information about the atmospheric degradation of PAHs into NPAHs <sup>108,131</sup>.

Moreover, for apportionment between sources of airborne NPAHs, Ma et al. used PMF and Beta statistical methods, and Lin et al. developed a statistical approach based on the correlation coefficient between log-transformed NPAHs and  $\text{NO}_2$  concentrations <sup>20,144</sup>.

#### 2.4.4. AZAs

AZAs have been less determined in environmental samples than the previously introduced PACs. Nonetheless, their occurrence has been shown in several studies. Because of the small amount of such studies, a major challenge for their comparison is the variability of the target molecules. Indeed, while Alves et al., Bandowe et al. and Wei et al. only measured three to four AZAs, Chen and Preston performed a more comprehensive work on 47 AZAs, without being able to identify precisely each isomer (which is why they gathered compounds in groups of isomers) and Delhomme and Millet analyzed 20 AZAs, reporting "group" concentrations depending on the molecules' number of rings <sup>25,27,74,108,131,145</sup>.

Therefore, to review the results with the highest possible representativeness, we present in [Table S6](#) a mean concentration of azaarene individual compounds in airborne PM, either directly reported in the literature or calculated from global results. These levels are generally in the sub- $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$  range, close to those of OPAHs and NPAHs.

To the best of our knowledge, no result has been published regarding AZAs levels in dusts or soots, else than Sauvain et al. who measured dibenzacridine and dibenzocarbazole in outlet particulates of a diesel van, but did not detect any of these above their limit of detection (LOD) <sup>43</sup>. Therefore, more studies are required to assess the ubiquity of AZAs in various environments.

AZAs levels in PM increase in winter, due to more important direct emissions, a greater fraction of AZAs in the particulate phase, and less photochemical degradation among others <sup>25,27,145</sup>.

As described for other PACs, the ratio of AZAs to their related parent PAHs can be interesting for source apportionment. Indeed, AZAs are considered as typical of coal combustion and a predominance of this source can be characterized by high values of the individual AZA / related PAH ratio <sup>145</sup>.

#### 2.4.5. PASHs

PASHs is the class of PACs for which the fewest occurrence data are available for particulate matters. These compounds have mainly been determined in coal- and oil- related samples because they are characteristic of these materials <sup>29,80–82,122</sup>. Other samples studied are generally sediments, natural water or wastewater samples <sup>80,82</sup>.

To the best of our knowledge, the only analytical study reporting concentrations of PASHs in environmental particulate matter was conducted by Wang et al. <sup>49</sup>. In the total airborne PM sampled near a roadside of a national route in Japan, they measured from 0.01 to 0.03  $\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$  of three PASHs: dibenzothiophene, benzo[b]naphtho[1,2-d]thiophene and benzo[b]naphtho[2,1-d]thiophene. These concentrations are lower than the vast majority of PAHs which were determined simultaneously. Of course, this sole result is not sufficient to characterize the

atmospheric pollution caused by PASHs, indoors as well as outdoors, and we encourage analysts willing to study PACs in environmental particulate matters in the future to include PASHs in their projects.

Vu-Duc et al. analyzed 37 PAHs and 5 PASHs in the aerosol of laboratory generated bitumen fumes <sup>79</sup>. They obtained relatively high levels of dibenzothiophene ( $384 \pm 38 \mu\text{g/g}$  of fumes) and lower levels of benzonaphthothiophene isomers. In their sample, PASHs concentrations were far below those of the 9 major PAHs, but above those of 22 non-detected PAHs, emphasizing once more the need of further assessment of PASHs in the environment due to their existing emissions in various combustion processes.

## 2.5. Conclusion

Airborne particulate matter, dust and other particulates such as soot or combustion exhaust particulate matter are major sources of organic pollutants, some of them exhibiting a strong toxicity.

Among these compounds raising concerns, PACs constitute an important category. This class of compounds is made up of hundreds of molecules differing in their polarity, volatility, toxicological properties, etc. Thus, their analysis in environmental studies is a major challenge. While lists of compounds of interest were too much restricted in the past, particularly due to the flawed definition of a single list of 16 compounds of interests, the EPA's 16 priority PAHs list, we propose in the present paper to enlarge the amount of PACs studied in environmental assessments, outside the subclass of non-polar PAHs.

Obviously, this goes together with an increased analytical difficulty. In the present review, we highlight the technical trends which are, in our opinion, the most promising to solve the analytical issues related to trace and ultratrace levels of a huge amount of compounds, including isomers, in complex samples.

Maximizing the number of analytes gathered in a single analytical run similarly to the sensitivity of their detection is the most important challenge of future developments in the field of PACs environmental analysis. To this purpose, current instrumental limitations are expected to be reduced in the coming years.

Among those improvements, the performance of the separation column in terms of number of plates, thus giving higher resolving powers and higher peak capacities, is crucial. This tendency steers the choice of the separation method to GC rather than LC because of their respective peak capacities.

However, the acquisition of a lot of very thin peaks leads to an additional issue for what regards MS detection. Indeed, it requires a very high mass spectral acquisition rate. This parameter is particularly enhanced with TOF analyzers (around  $10^3$  Hz), which we expect to be increasingly used in hyphenation with GC for PACs analysis. Reaching huge resolutions as it could be done with Orbitrap and FT-ICR analyzers is of no real use for PACs, whereas an optimal cycle time is crucial.

MS/MS is also necessary to obtain fragmentation patterns enabling the differentiation of isomers which are numerous among PACs. Therefore, IT and QQQ are not obsolete at all, but Q-TOF can be preferred.

Apart from the technical evolutions, the future of PACs environmental analysis resides in the adjustments of standards and in the transfer of novel methods towards routine control laboratories. A lot of assessment studies performed in such laboratories still focus on the EPA's list and on other elementary compounds. It is necessary that the forthcoming analysis methods include as many compounds as possible, and that they are then rapidly adapted to be used

routinely with appropriate analytical equipment, following precise guidelines in terms of method validation and quality control among others.

We reported typical levels of PACs which can vary from the sub-pg·m<sup>-3</sup> level to several ng·m<sup>-3</sup> in atmospheric particulate matter and in the µg·g<sup>-1</sup> range in settled dusts and combustion exhausts particulates. These occurrence values have to be critically interpreted depending on the sampling location and time because of geographical and seasonal variations, and their health and environmental relevance is strongly related to the individual toxicity of the PACs in question.

## ***Appendix***

Supplemental Content of this article can be found in the online version, at:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993620303757>

## 2.6. References

- (1) Keyte, I. J.; Harrison, R. M.; Lammel, G. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (24), 9333.
- (2) Manzetti, S. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2013**, 33 (4), 311–330.
- (3) Mitra, S.; Ray, B. *Atmos. Environ.* **1995**, 29 (22), 3345–3356.
- (4) Maertens, R. M.; Bailey, J.; White, P. A. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2004**, 567 (2–3), 401–425.
- (5) Slezakova, K.; Castro, D.; Delerue-Matos, C.; Morais, S.; Pereira, M. do C. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, 21 (6), 4492–4501.
- (6) Slezakova, K.; Castro, D.; Delerue-Matos, C.; Alvim-Ferraz, M. da C.; Morais, S.; Pereira, M. do C. *Atmospheric Res.* **2013**, 127, 141–147.
- (7) Choi, H.; Spengler, J. *Environ. Int.* **2014**, 63, 173–181.
- (8) Ravindra, K.; Sokhi, R.; Vangrieken, R. *Atmos. Environ.* **2008**, 42 (13), 2895–2921.
- (9) Li, Y.-C.; Qiu, J.-Q.; Shu, M.; Ho, S. S. H.; Cao, J.-J.; Wang, G.-H.; Wang, X.-X.; Zhao, X.-Q. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, 25 (5), 4750–4760.
- (10) Tobiszewski, M.; Namieśnik, J. *Environ. Pollut.* **2012**, 162, 110–119.
- (11) Keith, L. H. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2015**, 35 (2–4), 147–160.
- (12) Andersson, J. T.; Achten, C. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2015**, 35 (2–4), 330–354.
- (13) Bandowe, B. A. M.; Meusel, H. *Sci. Total Environ.* **2017**, 581–582, 237–257.
- (14) Lammel, G. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2015**, 35 (2–4), 316–329.
- (15) Walgraeve, C.; Demeestere, K.; Dewulf, J.; Zimmermann, R.; Van Langenhove, H. *Atmos. Environ.* **2010**, 44 (15), 1831–1846.
- (16) Atkinson, R.; Arey, J. *Environ. Health Perspect.* **1994**, 102, 10.
- (17) Kojima, Y.; Inazu, K.; Hisamatsu, Y.; Okochi, H.; Baba, T.; Nagoya, T. *Atmos. Environ.* **2010**, 44 (24), 2873–2880.
- (18) Abbas, I.; Badran, G.; Verdin, A.; Ledoux, F.; Roumié, M.; Courcot, D.; Garçon, G. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, 16 (2), 439–475.
- (19) Bandowe, B. A. M.; Meusel, H.; Huang, R.; Ho, K.; Cao, J.; Hoffmann, T.; Wilcke, W. *Sci. Total Environ.* **2014**, 473–474, 77–87.
- (20) Lin, Y.; Qiu, X.; Ma, Y.; Wang, J.; Wu, Y.; Zeng, L.; Hu, M.; Zhu, T.; Zhu, Y. *Atmos. Environ.* **2016**, 138, 108–113.
- (21) Tomaz, S.; Jaffrezo, J.-L.; Favez, O.; Perraudin, E.; Villenave, E.; Albinet, A. *Atmos. Environ.* **2017**, 161, 144–154.
- (22) Lin, Y.; Qiu, X.; Ma, Y.; Ma, J.; Zheng, M.; Shao, M. *Environ. Pollut.* **2015**, 196, 164–170.
- (23) Ringuet, J.; Leoz-Garziandia, E.; Budzinski, H.; Villenave, E.; Albinet, A. *Atmospheric Chem. Phys.* **2012**, 12 (18), 8877–8887.
- (24) Zielinska, B.; Samy, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386 (4), 883–890.
- (25) Chen, H.-Y.; Preston, M. R. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32 (5), 577–583.
- (26) Collins, J. F.; Brown, J. P.; Alexeeff, G. V.; Salmon, A. G. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1998**, 28 (1), 45–54.
- (27) Delhomme, O.; Millet, M. *Atmos. Environ.* **2012**, 47, 541–545.
- (28) Lee, M. L.; Novotny, M.; Bartle, K. D. *Anal. Chem.* **1976**, 48 (11), 1566–1572.
- (29) Mössner, S. G.; Wise, S. A. *Anal. Chem.* **1999**, 71 (1), 58–69.
- (30) IARC. *Bitumens and Bitumen Emissions, and Some N- and S-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Lyon, 2013; Vol. 103.
- (31) Albinet, A.; Leoz-Garziandia, E.; Budzinski, H.; Villenave, E. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1121 (1), 106–113.
- (32) Delgado-Saborit, J. M.; Aquilina, N.; Baker, S.; Harrad, S.; Meddings, C.; Harrison, R. M. *Anal. Methods* **2010**, 2 (3), 231.

- (33) Karavalakis, G.; Deves, G.; Fontaras, G.; Stournas, S.; Samaras, Z.; Bakeas, E. *Fuel* **2010**, *89* (12), 3876–3883.
- (34) Lian, W.; Ren, F.; Tang, L.; Dong, D. *Microchem. J.* **2016**, *129*, 194–199.
- (35) Madruga, D. G.; Ubeda, R. M.; Terroba, J. M.; dos Santos, S. G.; García-Camero, J. P. *Indoor Air* **2019**, *29* (5), 817–827.
- (36) Tutino, M.; Di Gilio, A.; Laricchiuta, A.; Assennato, G.; de Gennaro, G. *Chemosphere* **2016**, *161*, 463–469.
- (37) Keyte, I. J.; Albinet, A.; Harrison, R. M. *Sci. Total Environ.* **2016**, *566–567*, 1131–1142.
- (38) Nocun, M. S.; Schantz, M. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (16), 5583–5593.
- (39) Whitehead, T. P.; Metayer, C.; Petreas, M.; Does, M.; Buffler, P. A.; Rappaport, S. M. *Environ. Health Perspect.* **2013**, *121* (5), 543–550.
- (40) Lalah, J. O.; Kaigwara, P. N. *Toxicol. Environ. Chem.* **2005**, *87* (4), 463–479.
- (41) Lin, Y.; Ma, Y.; Qiu, X.; Li, R.; Fang, Y.; Wang, J.; Zhu, Y.; Hu, D. *J. Geophys. Res. Atmospheres* **2015**, *120* (14), 7219–7228.
- (42) Poster, D. L.; Schantz, M. M.; Sander, L. C.; Wise, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386* (4), 859–881.
- (43) Sauvain, J.-J.; Vu-Duc, T.; Huynh, C.-K. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *371* (7), 966–974.
- (44) ASTM International. *Test Method for Determination of Gaseous and Particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ambient Air (Collection on Sorbent-Backed Filters with Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Analysis)*; D6209-98; ASTM International: West Conshohocken, PA, 2004.
- (45) European Commity for Standardization; *EN 15527:2008 - Characterization of waste - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in waste using gas chromatography mass spectrometry (GC/MS)*; 2008.
- (46) International Organization for Standardization; *ISO 18287:2006 - Soil quality - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) - Gas chromatographic method with mass spectrometric detection (GC-MS)*; 2006.
- (47) U.S. Environmental Protection Agency; *Compendium Method TO-13A - Determination of Polycyclic AromaticHydrocarbons (PAHs) in Ambient Air Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)*; 1999.
- (48) Cao, Z.; Wang, M.; Chen, Q.; Zhu, C.; Jie, J.; Li, X.; Dong, X.; Miao, Z.; Shen, M.; Bu, Q. *Sci. Total Environ.* **2019**, *653*, 423–430.
- (49) Wang, Q.; Kobayashi, K.; Zhou, M.; Lu, S.; Dong, S.; Nakajima, D.; Sekiguchi, K.; Terasaki, M. *WIT Transactions on Ecology and The Environment*; WIT Press: Opatija, Croatia, 2014; Vol. 183, pp 131–143.
- (50) Sklorz, M.; Schnelle-Kreis, J.; Liu, Y.; Orasche, J.; Zimmermann, R. *Chemosphere* **2007**, *67* (5), 934–943.
- (51) Poster, D. L.; Schantz, M. M.; Wise, S. A.; Vangel, M. G. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, *363* (4), 380–390.
- (52) Wise, S. A.; Schantz, M. M.; Hays, M. J.; Koster, B. J.; Sharpless, K. E.; Sander, L. C.; Benner, B. A.; Schiller, S. B. *Polycycl. Aromat. Compd.* **1996**, *9* (1–4), 209–216.
- (53) Wilson, W. B.; Sander, L. C.; Oña-Ruales, J. O.; Mössner, S. G.; Sidisky, L. M.; Lee, M. L.; Wise, S. A. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1485*, 120–130.
- (54) Anderson, K. A.; Szelewski, M. J.; Wilson, G.; Quimby, B. D.; Hoffman, P. D. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1419*, 89–98.
- (55) Anh, H. Q.; Tue, N. M.; Tuyen, L. H.; Minh, T. B.; Viet, P. H.; Takahashi, S. *Sci. Total Environ.* **2019**, *672*, 468–478.
- (56) Di Filippo, P.; Riccardi, C.; Gariazzo, C.; Incoronato, F.; Pomata, D.; Spicaglia, S.; Cecinato, A. *J. Environ. Monit.* **2007**, *9* (3), 275.
- (57) Bravo-Linares, C.; Ovando-Fuentealba, L.; Orellana-Donoso, S.; Villenas-Fernández, K.; Hernández-Millán, M.; Mudge, S. M.; Pinaud-Mendoza, J. P.; Loyola-Sepulveda, R. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2017**, *37* (2–3), 189–202.
- (58) Scipioni, C.; Villanueva, F.; Pozo, K.; Mabilia, R. *Environ. Technol.* **2012**, *33* (7), 809–820.



- (59) Norlock, F. M.; Jang, J.-K.; Zou, Q.; Schoonover, T. M.; Li, A. *J. Air Waste Manag. Assoc.* **2002**, *52* (1), 19–26.
- (60) Bandowe, B. A. M.; Wilcke, W. *J. Environ. Qual.* **2010**, *39* (4), 1349–1358.
- (61) Cochran, R. E.; Dongari, N.; Jeong, H.; Beránek, J.; Haddadi, S.; Shipp, J.; Kubátová, A. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *740*, 93–103.
- (62) Simoneit, B. R. T.; Bi, X.; Oros, D. R.; Medeiros, P. M.; Sheng, G.; Fu, J. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41* (21), 7294–7302.
- (63) Albinet, A.; Nalin, F.; Tomaz, S.; Beaumont, J.; Lestremau, F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (13), 3131–3148.
- (64) Kitanovski, Z.; Shahpoury, P.; Samara, C.; Voliotis, A.; Lammel, G. *Atmospheric Chem. Phys.* **2020**, *20* (4), 2471–2487.
- (65) Liu, Y.; Sklorz, M.; Schnelle-Kreis, J.; Orasche, J.; Ferge, T.; Kettrup, A.; Zimmermann, R. *Chemosphere* **2006**, *62* (11), 1889–1898.
- (66) Han, Y.; Ren, L.; Xu, K.; Yang, F.; Li, Y.; Cheng, T.; Kang, X.; Xu, C.; Shi, Q. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1395*, 1–6.
- (67) Lammel, G.; Kitanovski, Z.; Kukučka, P.; Novák, J.; Arangio, A. M.; Codling, G. P.; Filippi, A.; Hovorka, J.; Kuta, J.; Leoni, C.; Přebýlová, P.; Prokeš, R.; Sážka, O.; Shahpoury, P.; Tong, H.; Wietzoreck, M. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54* (5), 2615–2625.
- (68) Wang, G.; Kawamura, K.; Zhao, X.; Li, Q.; Dai, Z.; Niu, H. *Atmos. Environ.* **2007**, *41* (2), 407–416.
- (69) Bamford, H. A.; Bezabeh, D. Z.; Schantz, M. M.; Wise, S. A.; Baker, J. E. *Chemosphere* **2003**, *50* (5), 575–587.
- (70) Bezabeh, D. Z.; Bamford, H. A.; Schantz, M. M.; Wise, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375* (3), 381–388.
- (71) Gao, Y.; Yang, L.; Chen, J.; Li, Y.; Jiang, P.; Zhang, J.; Yu, H.; Wang, W. *Sci. Total Environ.* **2018**, *622–623*, 1400–1407.
- (72) Grimmer, G.; Jacob, J.; Dettbarn, G.; Naujack, K.-W. *Fresenius Z. Für Anal. Chem.* **1985**, *322* (6), 595–602.
- (73) Nielsen, T.; Clausen, P.; Jensen, F. P. *Anal. Chim. Acta* **1986**, *187*, 223–231.
- (74) Delhomme, O.; Millet, M. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2008**, *28* (4–5), 518–532.
- (75) Alves, C. A.; Vicente, A. M. P.; Gomes, J.; Nunes, T.; Duarte, M.; Bandowe, B. A. M. *Atmospheric Res.* **2016**, *180*, 128–137.
- (76) Vicente, E. D.; Vicente, A. M.; Musa Bandowe, B. A.; Alves, C. A. *Air Qual. Atmosphere Health* **2016**, *9* (6), 653–668.
- (77) Schmid, B.; Andersson, J. T. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3476–3481.
- (78) Zeigler, C.; Schantz, M.; Wise, S.; Robbat, A. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2012**, *32* (2), 154–176.
- (79) Vu-Duc, T.; Huynh, C.-K.; Binet, S. *J. Occup. Environ. Hyg.* **2007**, *4* (sup1), 245–248.
- (80) Antle, P. M.; Zeigler, C. D.; Wilton, N. M.; Robbat, Jr., A. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2014**, *94* (4), 332–347.
- (81) Liang, F.; Lu, M.; Birch, M. E.; Keener, T. C.; Liu, Z. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1114* (1), 145–153.
- (82) Andersson, J. T.; Hegazi, A. H.; Roberz, B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386* (4), 891–905.
- (83) Pham, C. T.; Kameda, T.; Toriba, A.; Hayakawa, K. *Environ. Pollut.* **2013**, *183*, 175–183.
- (84) Sangiorgi, G.; Ferrero, L.; Ferrini, B. S.; Lo Porto, C.; Perrone, M. G.; Zangrando, R.; Gambaro, A.; Lazzati, Z.; Bolzacchini, E. *Atmos. Environ.* **2013**, *65*, 205–214.
- (85) Wise, S. A.; Hilpert, L. R.; Byrd, G. D.; May, W. E. *Polycycl. Aromat. Compd.* **1990**, *1* (1–2), 81–98.
- (86) Castro, D.; Slezakova, K.; Delerue-Matos, C.; Alvim-Ferraz, M. da C.; Morais, S.; Pereira, M. do C. *Atmos. Environ.* **2011**, *45* (10), 1799–1808.
- (87) Liaud, C.; Millet, M.; Le Calvé, S. *Talanta* **2015**, *131*, 386–394.
- (88) Tomaz, S.; Shahpoury, P.; Jaffrezo, J.-L.; Lammel, G.; Perraudin, E.; Villenave, E.; Albinet, A. *Sci. Total Environ.* **2016**, *565*, 1071–1083.
- (89) De Guidi, G.; Librando, V.; Minniti, Z.; Bolzacchini, E.; Perrini, G.; Bracchitta, G.; Alparone, A.; Catalfo, A. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2012**, *32* (4), 439–456.

- (90) Barrado-Olmedo, A. I.; Pérez-Pastor, R. M.; García-Alonso, S. *Talanta* **2012**, *101*, 428–434.
- (91) Kishikawa, N.; Morita, S.; Wada, M.; Ohba, Y.; Nakashima, K.; Kuroda, N. *Anal. Sci.* **2004**, *20* (1), 129–132.
- (92) Delhomme, O.; Millet, M.; Herckes, P. *Talanta* **2008**, *74* (4), 703–710.
- (93) Letzel, T.; Rosenberg, E.; Wissiack, R.; Grasserbauer, M.; Niessner, R. *J. Chromatogr. A* **1999**, *855* (2), 501–514.
- (94) Lintelmann, J.; Fischer, K.; Karg, E.; Schröppel, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381* (2), 508–519.
- (95) Letzel, T.; Pöschl, U.; Wissiack, R.; Rosenberg, E.; Grasserbauer, M.; Niessner, R. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (7), 1634–1645.
- (96) Grosse, S.; Letzel, T. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1139* (1), 75–83.
- (97) Hayakawa, K.; Tang, N.; Akutsu, K.; Murahashi, T.; Kakimoto, H.; Kizu, R.; Toriba, A. *Atmos. Environ.* **2002**, *36* (35), 5535–5541.
- (98) Schauer, C.; Niessner, R.; Pöschl, U. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378* (3), 725–736.
- (99) Delhomme, O.; Herckes, P.; Millet, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389* (6), 1953–1959.
- (100) Lintelmann, J.; França, M. H.; Hübner, E.; Matuschek, G. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (10), 1636–1646.
- (101) Wilson, W. B.; Sander, L. C.; Lopez de Alda, M.; Lee, M. L.; Wise, S. A. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1461*, 107–119.
- (102) Fushimi, A.; Hashimoto, S.; Ieda, T.; Ochiai, N.; Takazawa, Y.; Fujitani, Y.; Tanabe, K. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1252*, 164–170.
- (103) Manzano, C.; Hoh, E.; Simonich, S. L. M. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1307*, 172–179.
- (104) Manzano, C.; Hoh, E.; Simonich, S. L. M. *Env. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 7677–7684.
- (105) Christensen, A.; Östman, C.; Westerholm, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381* (6), 1206–1216.
- (106) Masala, S.; Lim, H.; Bergvall, C.; Johansson, C.; Westerholm, R. *Atmos. Environ.* **2016**, *140*, 370–380.
- (107) Tollbäck, P.; Carlsson, H.; Östman, C. *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, *23* (2), 131–137.
- (108) Alves, C. A.; Vicente, A. M.; Custódio, D.; Cerqueira, M.; Nunes, T.; Pio, C.; Lucarelli, F.; Calzolari, G.; Nava, S.; Diapouli, E.; Eleftheriadis, K.; Querol, X.; Musa Bandowe, B. A. *Sci. Total Environ.* **2017**, *595*, 494–504.
- (109) Villanueva, F.; Sevilla, G.; Lara, S.; Martín, P.; Salgado, S.; Albaladejo, J.; Cabañas, B. *Microchem. J.* **2018**, *142*, 117–125.
- (110) Chiu, C.; Miles, W. *Polycycl. Aromat. Compd.* **1996**, *9* (1–4), 307–314.
- (111) Du, W.; Chen, Y.; Shen, G.; Wang, W.; Zhuo, S.; Huang, Y.; Pan, X.; Tao, S. *Atmos. Environ.* **2018**, *187*, 210–217.
- (112) Gbeddy, G.; Egodawatta, P.; Goonetilleke, A.; Ayoko, G.; Chen, L. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *383*, 121–154.
- (113) Gross, J. H. *Mass Spectrometry - A Textbook*, Third Edition.; Springer International Publishing: Cham, 2017.
- (114) Li, D.-X.; Gan, L.; Bronja, A.; Schmitz, O. J. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *891*, 43–61.
- (115) Große Brinkhaus, S.; Thiäner, J. B.; Achten, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (11), 2801–2812.
- (116) Schiewek, R.; Schellenträger, M.; Mönnikes, R.; Lorenz, M.; Giese, R.; Brockmann, K. J.; Gäb, S.; Benter, Th.; Schmitz, O. J. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (11), 4135–4140.
- (117) Constapel, M.; Schellenträger, M.; Schmitz, O. J.; Gäb, S.; Brockmann, K. J.; Giese, R.; Benter, Th. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (3), 326–336.
- (118) Hayen, H.; Karst, U. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000* (1–2), 549–565.
- (119) Thiäner, J. B.; Achten, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (7), 1737–1747.
- (120) Stockett, M. H.; Gatchell, M.; de Ruelle, N.; Giacomozzi, L.; Chen, T.; Rousseau, P.; Maclot, S.; Chesnel, J.-Y.; Adoui, L.; Huber, B. A.; Bērziņš, U.; Schmidt, H. T.; Zettergren, H.; Cederquist, H. *Int. J. Mass Spectrom.* **2015**, *392*, 58–62.
- (121) Allen, J. O.; Dookeran, N. M.; Taghizadeh, K.; Lafleur, A. L.; Smith, K. A.; Sarofim, A. F. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31* (7), 2064–2070.

- (122) Franchina, F. A.; Machado, M. E.; Tranchida, P. Q.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Mondello, L. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1387*, 86–94.
- (123) Cox, R. D.; Earp, R. F. *Anal. Chem.* **1982**, *54* (13), 2265–2270.
- (124) Poster, D. L.; Sander, L. C.; Wise, S. A. In *PAHs and Related Compounds*; Neilson, A. H., Ed.; Hutzinger, O., Series Ed.; The Handbook of Environmental Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1998; Vol. 3 / 31, pp 77–135.
- (125) Dong, T. T. T.; Lee, B.-K. *Chemosphere* **2009**, *74* (9), 1245–1253.
- (126) Wise, S. A.; Sander, L. C.; May, W. E. *J. Chromatogr. A* **1993**, *642* (1–2), 329–349.
- (127) Hayakawa, K. *Biomed Chromatogr* **2000**, *14*, 9.
- (128) Ali, N. *Sci. Total Environ.* **2019**, *696*, 133995.
- (129) Cave, M. R.; Wragg, J.; Beriro, D. J.; Vane, C.; Thomas, R.; Riding, M.; Taylor, C. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *360*, 373–390.
- (130) Niu, X.; Ho, S. S. H.; Ho, K. F.; Huang, Y.; Sun, J.; Wang, Q.; Zhou, Y.; Zhao, Z.; Cao, J. *Environ. Pollut.* **2017**, *231*, 1075–1084.
- (131) Wei, C.; Han, Y.; Bandowe, B. A. M.; Cao, J.; Huang, R.-J.; Ni, H.; Tian, J.; Wilcke, W. *Sci. Total Environ.* **2015**, *505*, 814–822.
- (132) Zhang, J.; Liu, W.; Xu, Y.; Cai, C.; Liu, Y.; Tao, S.; Liu, W. *Environ. Pollut.* **2019**, *255*, 113176.
- (133) Wingfors, H.; Häggglund, L.; Magnusson, R. *Atmos. Environ.* **2011**, *45* (26), 4360–4369.
- (134) Kim, H.-H.; Lee, G.-W.; Yang, J.-Y.; Jeon, J.-M.; Lee, W.-S.; Lim, J.-Y.; Lee, H.-S.; Gwak, Y.-K.; Shin, D.-C.; Lim, Y.-W. *Asian J. Atmospheric Environ.* **2014**, *8* (1), 35–47.
- (135) Delgado-Saborit, J. M.; Stark, C.; Harrison, R. M. *Environ. Int.* **2011**, *37* (2), 383–392.
- (136) Liaud, C.; Dintzer, T.; Tschamber, V.; Trouve, G.; Le Calvé, S. *Environ. Pollut.* **2014**, *195*, 64–72.
- (137) Hoh, E.; Hunt, R. N.; Quintana, P. J. E.; Zakarian, J. M.; Chatfield, D. A.; Wittry, B. C.; Rodriguez, E.; Matt, G. E. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (7), 4174–4183.
- (138) Peixoto, M. S.; da Silva Junior, F. C.; de Oliveira Galvão, M. F.; Roubicek, D. A.; de Oliveira Alves, N.; Batistuzzo de Medeiros, S. R. *Chemosphere* **2019**, *231*, 518–527.
- (139) Robinson, A. L.; Subramanian, R.; Donahue, N. M.; Bernardo-Bricker, A.; Rogge, W. F. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (24), 7803–7810.
- (140) Slezakova, K.; Pires, J. C. M.; Castro, D.; Alvim-Ferraz, M. C. M.; Delerue-Matos, C.; Morais, S.; Pereira, M. C. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20* (6), 3932–3945.
- (141) Di Filippo, P.; Riccardi, C.; Pomata, D.; Buiarelli, F. *Atmos. Environ.* **2010**, *44* (23), 2742–2749.
- (142) Richter-Brockmann, S.; Achten, C. *Chemosphere* **2018**, *200*, 495–503.
- (143) Nisbet, I. C. T.; LaGoy, P. K. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1992**, *16* (3), 290–300.
- (144) Ma, Y.; Cheng, Y.; Qiu, X.; Lin, Y.; Cao, J.; Hu, D. *Environ. Pollut.* **2016**, *219*, 742–749.
- (145) Bandowe, B. A. M.; Meusel, H.; Huang, R.; Hoffmann, T.; Cao, J.; Ho, K. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23* (16), 16025–16036.

## Chapitre 3 :

# Développement de la méthode instrumentale pour l'analyse de Composés Aromatiques Polycycliques par GC-MS/MS

D'après les conclusions de la revue bibliographique présentée dans les Chapitres 1 et 2, la première partie de ces travaux de thèse a eu pour but de mettre au point une méthode d'analyse simultanée de plusieurs dizaines de CAP. L'objectif était d'inclure dans une seule méthode analytique des composés cibles appartenant au groupe des HAP, mais aussi des OHAP, NHAP, AZA et SHAP, afin de pouvoir évaluer l'importance environnementale de ces dérivés simultanément aux HAP. Après une pré-sélection selon l'occurrence dans la littérature et la disponibilité des standards analytiques commerciaux, et l'exclusion de quelques rares composés mal détectés, 79 CAP ont été retenus comme composés cibles dans la méthode finale.

Cette méthode analytique a été conçue pour être appliquée à des matrices atmosphériques particulières telles que les PM ou les poussières déposées.

Les premiers développements ont été axés sur la méthode instrumentale GC-MS/MS, avec pour objectif d'atteindre une séparation optimisée des isomères de CAP afin de pouvoir les quantifier séparément, mais aussi des limites de détection les plus basses possibles grâce à l'optimisation des paramètres d'injection et de détection par spectrométrie de masse. Ceux-ci seront présentés dans ce Chapitre 3.

### 3.1. Démarche expérimentale de développement de la méthode GC-MS/MS

L'instrument utilisé pour ce développement de méthode était un GC-MS Triple Quadripôle (QQQ) de la marque Varian (CP-3800 Gas Chromatograph ; 320 MS Triple Quadrupole), avec un injecteur split / splitless et une source d'ionisation électronique (EI) (voir Figure 3.1).

Pour la séparation chromatographique, la colonne sélectionnée était composée d'une phase stationnaire spécialement destinée à la résolution des CAP (Rxi-PAH, Restek), et disposait de dimensions idéales pour une bonne séparation de nos composés : une longueur de colonne de 60 m permettant un nombre de plateaux théorique plus élevé, un diamètre de 0,25 mm, et une épaisseur de film de 0,10  $\mu\text{m}$  pour une plus faible rétention des composés les moins volatils. Le gaz vecteur choisi était l'hélium.

Les étapes suivies pour le développement de la méthode instrumentale étaient les suivantes :

- Injections des mélanges de composés par groupe (HAP, OHAP, NHAP, AZA et SHAP séparément) avec acquisition en mode « Full Scan » sur le premier quadripôle uniquement, c'est-à-dire en balayage intégral d'une gamme de  $m/z$  allant de 60 à 320. Cette première étape a permis de mettre au point des conditions d'injection et surtout un programme d'élution (débit de gaz vecteur, température de four) permettant une séparation optimale des isomères les plus difficiles à séparer.
- Injections individuelles des standards de chaque CAP d'intérêt afin d'identifier avec certitude leur temps de rétention, toujours en mode « Full Scan ». En plus du temps de rétention, ces injections ont permis d'identifier les ions majoritaires obtenus en MS pour chaque CAP après ionisation électronique.
- Injections des mélanges de composés par groupe en mode « Product Ion » en spectrométrie de masse en tandem ( $MS^2$ ). Ce mode consiste à sélectionner spécifiquement les ions majoritaires observés précédemment dans le premier quadripôle qui est donc utilisé en mode SIM, à les fragmenter dans le deuxième quadripôle (cellule de collision), et à observer l'ensemble des ions fragments résultants dans le troisième quadripôle. Ces injections ont été répétées pour plusieurs valeurs d'énergie de collision prédéfinies (de 0 à 40 V par pas de 5 V). Elles ont ainsi permis d'identifier les transitions  $MS^1 \rightarrow MS^2$  donnant l'intensité de signal la plus élevée. Ce sont ces transitions qui ont été conservées dans la méthode finale d'acquisition MRM.



*Figure 3.1 : Instrument GC-MS/MS Varian CP3800 - 320MS*

### 3.1.1. Optimisation de la méthode de chromatographie en phase gazeuse

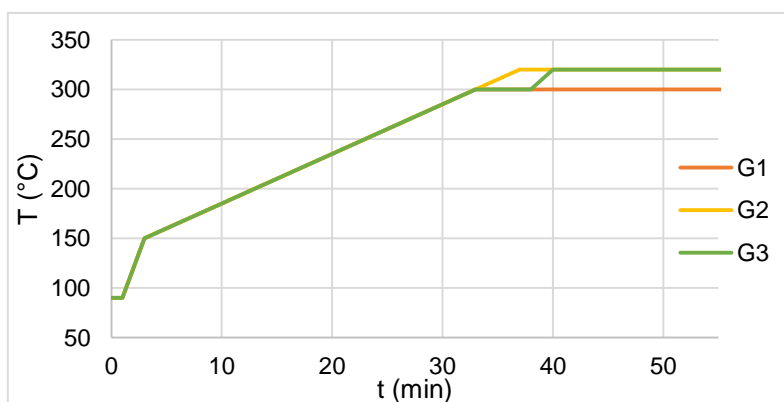
Une séparation satisfaisante de tous les CAP d'intérêt sélectionnés a été obtenue grâce à la sélectivité de la phase stationnaire Rxi-PAH. Néanmoins, il a été nécessaire d'optimiser des paramètres tels que le gradient de température du four, le débit de gaz vecteur, mais aussi les conditions d'injection.

Pour ce qui concerne le gradient de température, la première optimisation a été d'augmenter la température finale du programme, qui avait initialement été fixée à 300°C (programme G1, voir Figure 3.2), jusqu'à 320°C (programme G2, voir Figure 3.2). En effet, si l'on restait à 300°C, on observait une élution lente du HAP le moins volatil (le benzo(ghi)pérylène), avec un temps de rétention ( $t_R$ ) de 53,0 minutes.

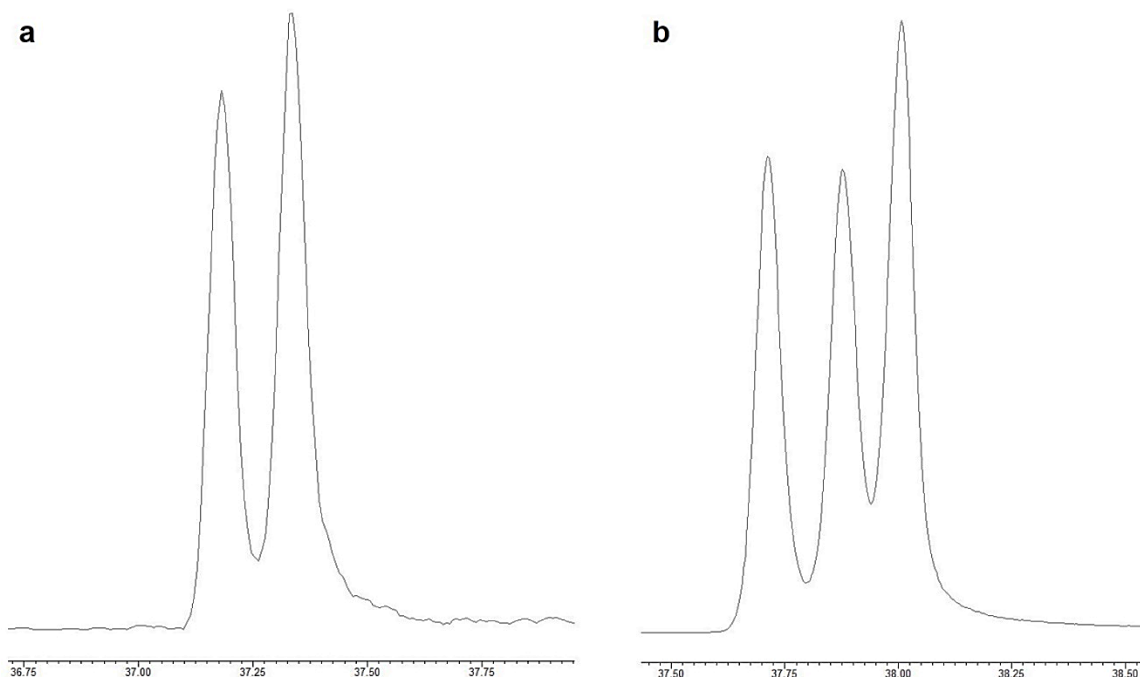
Ensuite, trois composés en particulier nous ont servi d'indicateurs d'efficacité de la méthode de séparation : les trois isomères b, k et j du benzofluoranthène (B(b)FLT, B(k)FLT et B(j)FLT). Selon ce qui a été décrit dans le Chapitre 2, leur résolution en GC est difficile à obtenir car ils ont des températures d'ébullition très proches. Leur concentration est d'ailleurs souvent rapportée sous la forme d'une somme.

Avec un débit de 1,0 mL/min d'hélium et une température finale de 320°C, un premier gradient de température avait été testé en s'appuyant sur des méthodes de la littérature. Il est décrit par G2 dans la Figure 3.2. Le chromatogramme issu de G2 pour le m/z 252 correspondant à l'ion moléculaire des isomères du benzofluoranthène est en Figure 3.3.a. On y voit que seuls deux pics apparaissent pour les trois isomères d'intérêt, ils sont donc mal résolus.

Un gradient de température alternatif, appelé G3, a été mis en place pour essayer de les séparer (voir Figure 3.2). Le résultat obtenu avec G3, i.e. le chromatogramme de la Figure 3.3.b, est signe d'une bonne séparation des isomères. Le seul changement appliqué dans G3 a été d'ajouter un palier de température à 300°C pendant 5 minutes (de 33 à 38 min) au lieu d'augmenter directement la température jusqu'à 320°C. En restant 5 minutes à 300°C qui est la température d'élution des isomères de BFLT, on parvient à les séparer.



**Figure 3.2 : Programmes de température G1, G2 et G3 utilisés pour la séparation des CAP en GC**



**Figure 3.3 : Chromatogramme du m/z 252 correspondant à la séparation par GC des isomères B(b)FLT, B(k)FLT et B(j)FLT : a) avec la méthode G2, b) avec la méthode G3**

Après l'identification du palier à 300°C comme d'un pré-requis pour une bonne séparation des isomères du benzofluoranthène, d'autres optimisations ont été effectuées pour l'ensemble du chromatogramme, notamment pour atteindre une meilleure efficacité, c'est-à-dire des pics plus fins. Dans cette optique :

- Le débit d'hélium a été fixé à 1,5 mL/min d'après les résultats de simulation du logiciel Restek EZGC™ et après une comparaison avec d'autres valeurs de débit.
- La température initiale a été abaissée de 90°C à 60°C pour assurer une bonne condensation des analytes en tête de colonne après leur volatilisation dans l'injecteur.
- Un flux pulsé a été ajouté pendant la première minute après l'injection, avec une pression d'hélium à 50 psi correspondant à un débit de 4,0 mL/min, afin d'améliorer la volatilisation des composés et de réduire leur perte par adsorption sur les parois de l'insert d'injection.

### 3.1.2. Optimisation de la méthode de spectrométrie de masse en tandem : le mode pseudo-MRM

D'après la démarche décrite en 3.1, la première étape du développement de la méthode MS/MS était l'identification des ions résultant de l'ionisation électronique des CAP d'intérêt. On a pu observer que les ions moléculaires  $M^+$  étaient fortement majoritaires pour les HAP, AZA et SHAP. En revanche, des produits de fragmentation en source ont été observés pour beaucoup de OHAP et NHAP.

Ensuite, la principale optimisation de la méthode de détection par MS/MS consistait en la recherche des transitions de masse donnant le signal le plus intense. Lors de cette étape, nous avons pu observer des tendances de fragmentation marquantes pour les différents CAP. En particulier, nous avons identifié un mode d'acquisition alternatif au MRM, le mode pseudo-MRM, comme très prometteur pour notre méthode en termes de sensibilité et de spécificité. Ce mode s'appuie sur le suivi de transitions MS/MS sans perte de masse. Il est particulièrement pertinent pour les molécules stables qui présentent de très faibles rendements de fragmentation.

Nous avons donc souhaité évaluer de manière détaillée les caractéristiques et les avantages de l'utilisation du mode pseudo-MRM pour l'analyse de CAP, pour les différents groupes étudiés et sur différents instruments afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu et leurs implications lors du développement et de l'application d'une méthode d'analyse ciblée de CAP par GC-MS/MS.

Ces travaux ont été présentés dans un article publié en Mars 2022 dans la revue à comité de lecture *Rapid Communications in Mass Spectrometry*.

Ce manuscrit en anglais est à retrouver dans les prochaines pages de ce Chapitre 3.



## The use of pseudo-MRM for a sensitive and selective detection and quantification of Polycyclic Aromatic Compounds by Tandem Mass Spectrometry

Mathieu Galmiche, Anaïs Rodrigues, Estelle Motsch, Olivier Delhomme, Yannis-Nicolas François, Maurice Millet

*Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2022**, 36, 13, e9307

<https://doi.org/10.1002/rcm.9307>

### 3.2. Introduction

The hyphenation of chromatography and tandem mass spectrometry (MS/MS) is a well-known technique for the target analysis of organic micropollutants in environmental matrices. In particular, the Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode is generally the most interesting mode to implement for such applications<sup>1–3</sup>. It is based on the collision-induced dissociation (CID) of a parent ion at a given collision energy and the monitoring of the resulting daughter ions which are specific to each compound, which is why MRM reduces the risk of isobaric interferences on the signal of the target compound. It can be applied on analyzers such as Triple Quadrupoles (QqQ), Ion Traps (IT), Quadrupole – Time-Of-Flight (QTOF), etc.

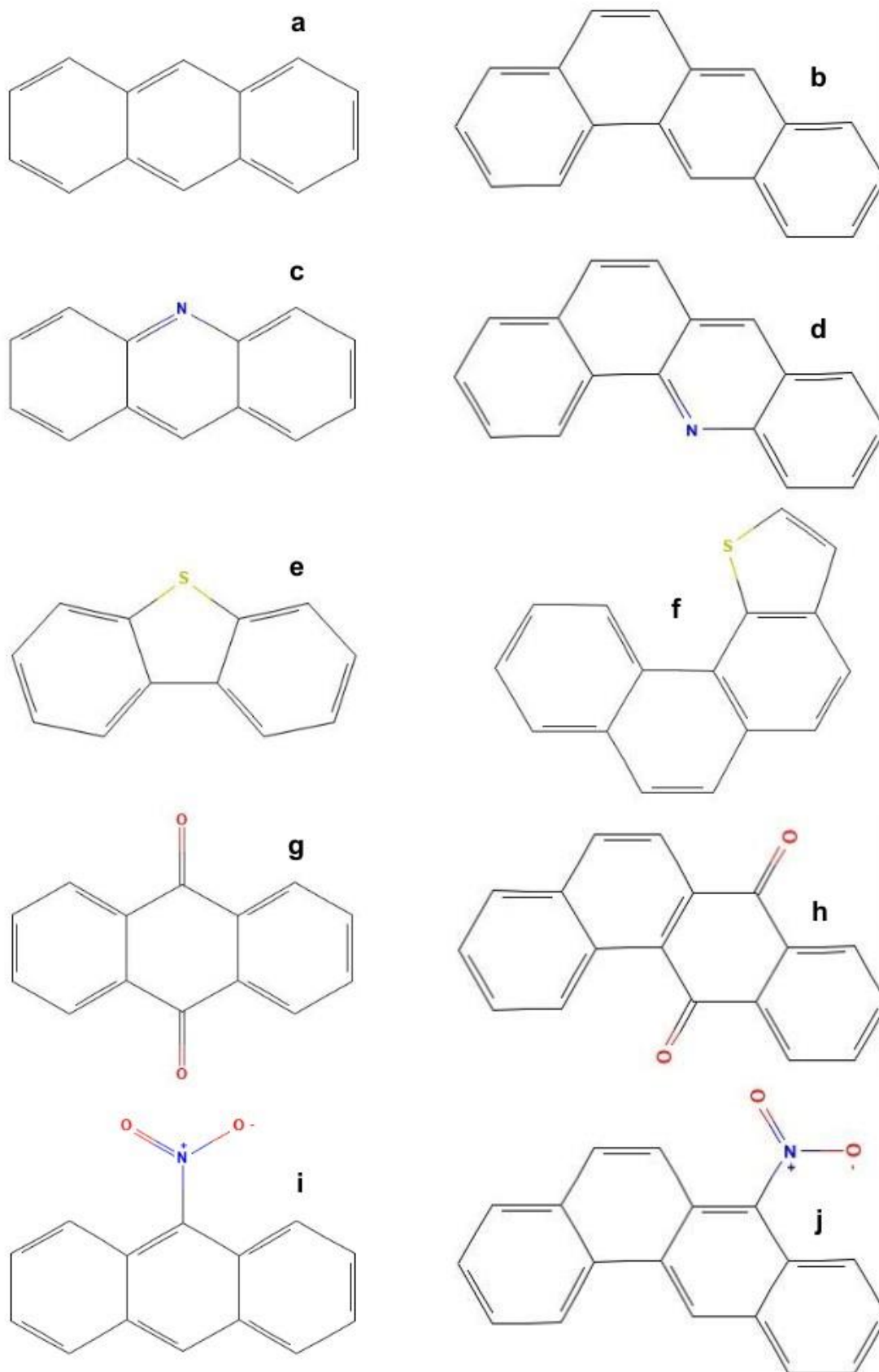
However, MRM requires a good fragmentation yield when the Collision Energy is applied. This yield is related to the presence of labile bonds in the molecule. This is not the case for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), which are very stable structures made up of conjugate aromatic systems, and therefore do not possess any labile chemical bond<sup>4,5</sup>. This leads to a major issue concerning the trace-level determination of PAHs (typically in environmental samples) which is the loss of signal intensity due to the low fragmentation yield obtained for PAHs in MS/MS, and hence higher instrumental detection limits for these compounds.

To overcome this problem, a “pseudo-MRM” mode can be implemented. It relies on the monitoring of transitions with the same  $m/z$  as parent and daughter ion, i.e. transitions with no mass loss between  $MS^1$  and  $MS^2$ <sup>4,5</sup>. It was first presented in 2014 by Shang et al.<sup>5</sup>. They described the interest of this monitoring mode for the particular case of PAHs which are “difficult-to-fragment” compounds. According to their study, pseudo-MRM exhibits a higher sensitivity and a higher signal-to-noise ratio than Single Ion Monitoring (SIM) which is impacted by isobaric interferences and “classic” MRM which is impacted by the low response of daughter ions<sup>5</sup>. Since then, pseudo-MRM has been successfully applied for the trace-level determination of PAHs<sup>6,7</sup>, but in most of recent analytical methods targeting PAHs and their derivatives in environmental samples, classic MRM and SIM are still widely used despite their drawbacks described above<sup>8–12</sup>.

GC-MS is the best possible coupling for the analysis of trace-level PAHs in various samples. Indeed, there is no atmospheric pressure ionization (API) source enabling an efficient ionization of PAHs with LC-MS couplings, apart from the uncommon Atmospheric Pressure Laser Ionization (APLI)<sup>4,13</sup>. On the other hand, the well-known Electron Ionization (EI) has proved to be very adapted to Polycyclic Aromatic Compounds (PACs) ionization for GC-MS analysis<sup>4,14,15</sup>.

In this communication, we present interpreted data arguing in favor of a broader use of pseudo-MRM mode instead of classic MRM mode for a more sensitive, but not less selective, detection of PAHs at trace-level using GC-MS/MS. These data were obtained from three different mass spectrometers, two QqQs and an IT. The different patterns observed for these instruments are discussed here.

Moreover, to supplement the current knowledge about pseudo-MRM application to PACs, we compared PAHs behavior with those of Polycyclic Aromatic Heterocycles such as azaarenes (PANHs) and thiaarenes (PASHs), and substituted PAHs such as nitrated PAHs (NPAHs) and oxygenated PAHs (OPAHs), therefore giving a larger perspective on MS/MS methods for the detection and quantitation of PACs.



**Figure 3.4 : Molecular structures of the Polycyclic Aromatic Compounds studied in this communication: a) anthracene, b) benz(a)anthracene, c) acridine, d) benz(c)acridine, e) dibenzothiophene, f) benzonaphtho(2,1-d)thiophene, g) anthraquinone, h) benzantraquinone, i) 9-nitroanthracene and j) 7-nitrobenz(a)anthracene.**

### 3.3. Materials and Methods

#### 3.3.1. Chemicals

GC-MS/MS experiments were performed by injecting standard solutions of PACs at concentrations giving appropriately intense signals (from 0.1 to 5 mg·L<sup>-1</sup>). The pure standards were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), LGC Standards (Molsheim, France), Cluzeau Info Labo (Sainte Foy la Grande, France) and BCP Instruments (Oullins, France).

Analytical grade ethyl acetate, which was the selected solvent for standard solutions, and acetonitrile and toluene, which were the extraction solvents for the application to a real sample, were purchased from VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France).

In our study of MRM and pseudo-MRM relative signal intensities, we selected ten different PACs, two per group: anthracene and benz(a)anthracene for PAHs, acridine and benz(c)acridine for PANHs, dibenzothiophene and benzonaphtho(2,1-d)thiophene for PASHs, anthraquinone and benzantraquinone for OPAHs, 9-nitroanthracene and 7-nitrobenz(a)anthracene for NPAHs. The chemical structures of these compounds are reported in Figure 3.4.

#### 3.3.2. GC-MS/MS

The first set of GC-MS/MS injections were performed on a CP-3800 Gas Chromatograph (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) coupled to a 320MS Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA). The analytical column used here was a capillary 60 m x 0.25 mm, 0.10 µm Rxi-PAH column (Restek, Bellefonte, PA, USA). The injection was performed in splitless mode at 250°C. A temperature gradient was programmed from 60°C to 320°C in 41 minutes to separate the various PACs. The temperature of the transfer line was set at the final oven temperature, i.e. 320°C, and the source temperature was 250°C. Electron Ionization was performed at 70 eV. Voltages applied in the collision cell ranged from 0 to 40 V, and argon was used as collision gas at a pressure of 1.5 mtorr.

The results obtained from this set injections were compared with those of two different GC-MS/MS setups. The first one was another QqQ instrument, the TSQ Quantum (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). PACs separation was performed on a Trace Ultra Gas Chromatograph (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) equipped with a HP5-ms column (30 m x 0.25 mm, 0.10 µm). The on-column injection mode was used on a Programmable Temperature Vaporization injector. Electron Ionization was performed at 70 eV and 220°C. Argon pressure was 1.5 mtorr, and MS/MS collision energies were from 0 to 50 V.

The second comparative GC-MS/MS study was performed on a Ion Trap ITQ 900 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) with a Trace 1300 Gas Chromatograph (Thermo Fisher

Scientific Inc., Waltham, MA, USA) and a Thermal Desorber TurboMatrix 350 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) used as injector after thermal desorption at 300 °C and cryo-focusing at -20 °C. Electron Ionization was performed at 70 eV and 210°C. In ITs such as this one, it is the helium present in the trap which serves as collision gas. Its flow rate was 0.3 mL/min and the pressure in the ITQ was 40 mtorr. Collision amplitudes ranged from 0.0 to 2.0 arb.

### *3.3.3. Standard Reference Material preparation*

In order to demonstrate the applicability of pseudo-MRM for the determination of PAHs, PANHs and PASHs in complex samples, we analyzed a Standard Reference Material (SRM) from the National Institute of Standards and Technology (NIST) (Gaithersburg, MD, USA). This SRM was Diesel Particulate Matter (PM) from an industrial forklift, registered as SRM 2975.

0.06 grams of SRM 2975 were weighed and deposited on a Glass Fiber Filter (GFF) (Whatman, GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom).

The extraction of Diesel PM was performed by Pressurized Liquid Extraction (PLE) on an ASE 300 instrument (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) with a mixture of acetonitrile and toluene (1:1, v/v), in a 33 mL cell, at 110°C.

The extract was concentrated to 1 mL with a TurboVap II concentrator (Biotage, Uppsala, Sweden) and then diluted 4-fold with ethyl acetate for a better compatibility with the GC-MS/MS analysis.

## 3.4. Results and Discussion

### 3.4.1. MRM and pseudo-MRM behavior of various PACs

The data presented in this communication correspond to the signal intensities obtained for the main  $m/z$  transitions of ten PACs from five different classes at various collision energies.

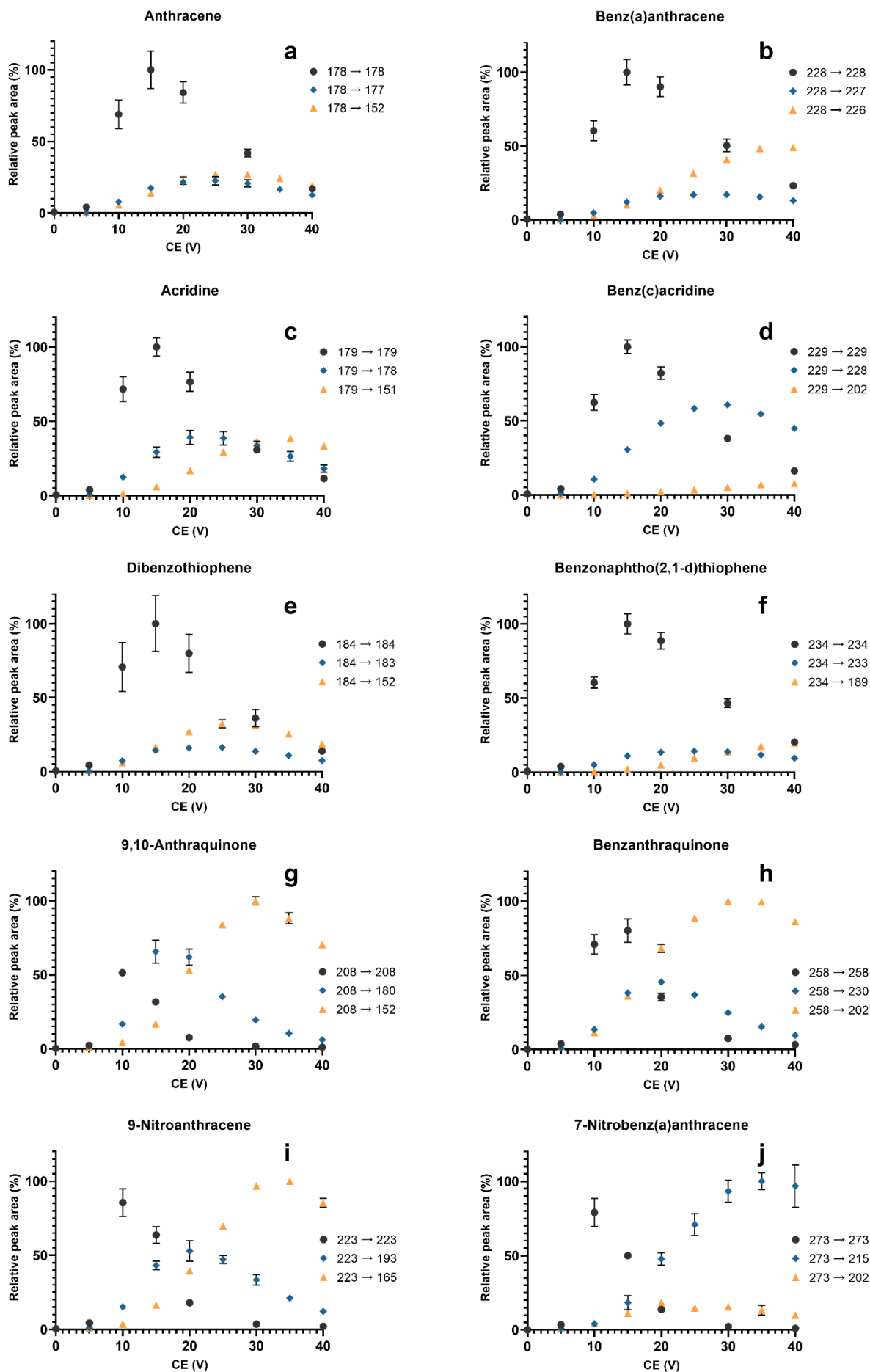
The peak areas measured on the Varian 320MS QqQ for the three most intense mass transitions are represented in Figure 3.5, with applied collision voltages from 0 to 40 V. One of these transitions shows no mass loss, a second transition exhibits a slight mass loss, and the third corresponds to a more important mass loss. The peak areas are normalized by the highest peak area obtained for a given compound so that relative response factors of the less intense transitions can be better observed.

This representation enables to identify for each class of compounds which MS/MS mode gives the most intense signal: the pseudo-MRM (dark grey circles) or the classic MRM (blue diamonds and orange triangles). When comparing the results obtained for the various PACs, we clearly distinguished two main patterns. For PAHs, PANHs and PASHs, the pseudo-MRM transition was highly favored. For the six molecules of these families, the highest possible response of the other MRM transitions relative to the pseudo-MRM transition varied from 20% for benzonaphtho(2,1-d)thiophene (see Figure 3.5.f) to 61% for benz(c)acridine (see Figure 3.5.d). It expresses a signal enhancement from 2 to 5 times when one monitors the pseudo-MRM transition instead of classic MRM transitions.

On the other hand, when PAHs polar derivatives such as OPAHs and NPAHs were studied, the pseudo-MRM mode gave lower intensities than MRM transitions with mass losses: from 51% of the highest obtained peak area in the case of 9,10-anthraquinone (see Figure 3.5.g) to 86% for 9-nitroanthracene (see Figure 3.5.i).

This difference of fragmentation ability between the compounds studied here can easily be explained by their chemical structure: while OPAHs and NPAHs possess labile chemical bonds with electron-withdrawing groups which can be fragmented with the application of low voltages, this is not the case for the aromatic structures of PAHs, PANHs and PASHs where no labile bond can be found (see Figure 3.4). Therefore, mass losses were only obtained at higher voltages applied and at lower yields.

According to these results, we can argue in favor of the monitoring of such pseudo-MRM transitions. Due to their higher peak areas than those of the comparative MRM transitions, they can lead to a more sensitive detection and quantification of PAHs, PANHs and PASHs when trace and ultra-trace levels of these compounds are expected, in environmental samples for instance.



**Figure 3.5 :** For each PAC studied, peak areas of the three main MS/MS transitions relative to the highest peak area obtained for a given compound, depending on the collision energy applied. The dark grey circles correspond to the pseudo-MRM transition, the blue diamonds to the MRM transition with the smaller mass loss, the orange triangles to the MRM transition with the higher mass loss. The error bars express standard deviations on triplicate analyses.

If we focus only on the pseudo-MRM traces (dark grey circles), another major observation is to be drawn from Figure 3.5. One could expect the fragmentation yield to increase with the collision energy, and therefore the pseudo-MRM peak area to drop down continuously with the increase of collision voltage. Instead, we noticed an enhancement of the pseudo-MRM signal from 0 volt, where it is practically nil, to about 15 volts applied, where it reaches a maximum. This pattern was effective for all the PAHs, PANHs and PASHs involved in this communication (see Figure 3.5, a-f).

Our main hypothesis to explain this phenomenon, which can be rather startling at first glance, is related not to the fragmentation of the ions, but to their transmission in the QqQ. Indeed, it is possible that the voltages applied in the second quadrupole (Q2) serve not only as collision energies, but also as ion guides from the first quadrupole (Q1) towards the third (Q3). In particular, the Varian 320MS used here is a U-shaped QqQ. This geometry could increase ions losses from Q1 to Q3 when very low voltages are applied in Q2.

This hypothesis is strengthened by the observation of Shang et al., who reported a decrease of intensity for pseudo-MRM transitions right from the very low collision energies. Their study was performed on a linear triple quadrupole, therefore it is very likely that on this instrument, no voltage was required to transfer the ions from Q1 to Q3<sup>5</sup>.

Actually, it represents an interesting opportunity for trace-level analysis of these compounds in complex matrices. Indeed, if pseudo-MRM was only effective at collision energies close to zero, it would lack specificity, because in this case, isobaric interferences would also respond on the monitored transition, and pseudo-MRM would present no benefit over MS<sup>1</sup> and Single Ion Monitoring (SIM).

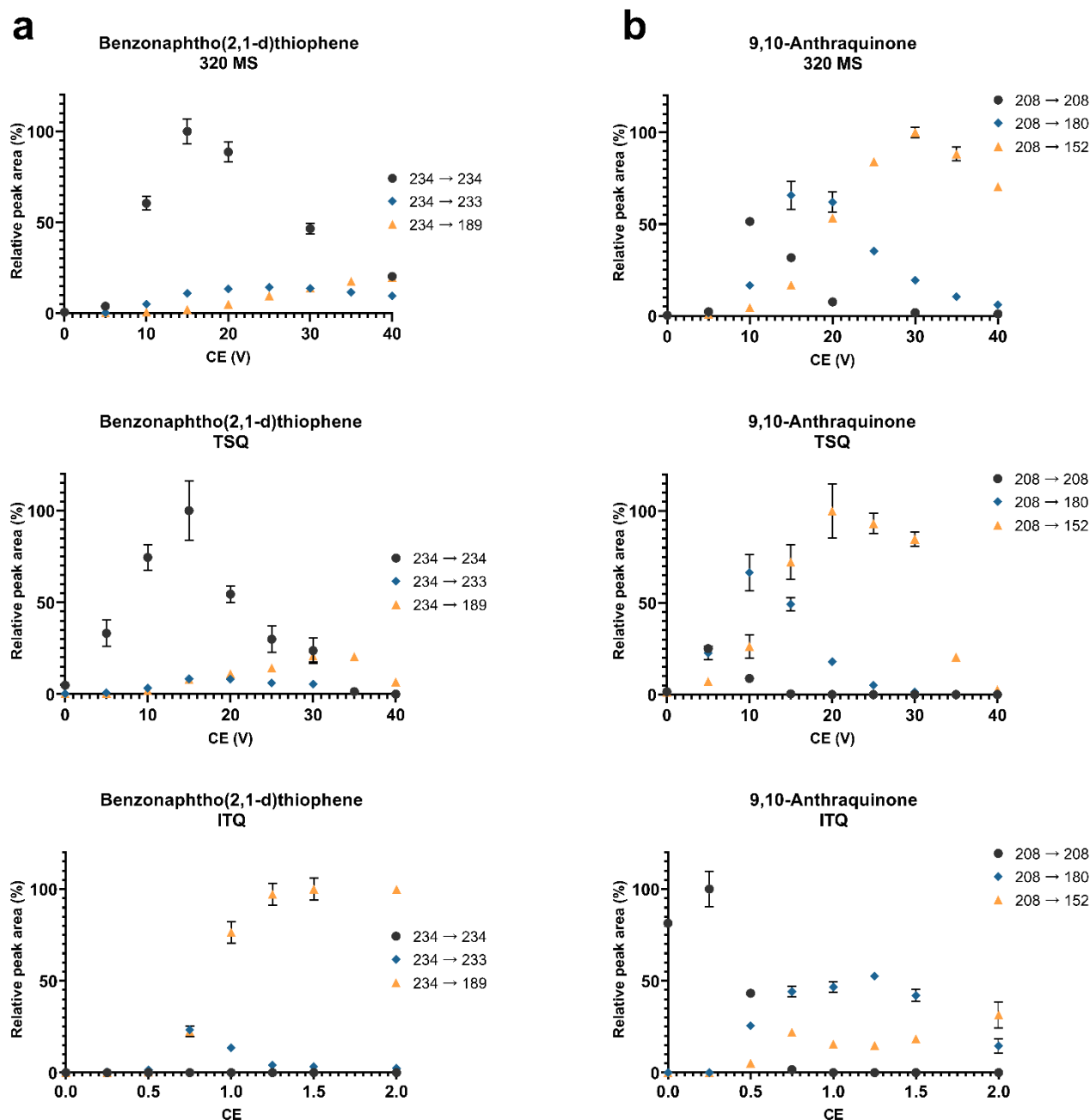
On the contrary, our results (see Figure 3.5 and Figure 3.6) showed that pseudo-MRM is applicable at collision voltages up to 15 – 20 volts in triple quadrupole instruments. At such non-zero collision energies, isobaric interferences which possess chemical structures other than those of PAHs and their heterocyclic derivatives are likely to be fragmented, thus their ability to exhibit pseudo-MRM signal will be severely decreased. Hence, the higher sensitivity obtained with the monitoring of pseudo-MRM transitions does not go along with a lack of selectivity, if non-zero collision energies are applied.

### *3.4.2. Similarities and differences between different mass spectrometers*

#### *3.4.2.a. Comparison of two Triple Quadrupoles*

The results described in 3.4.1, which were obtained with the Varian 320MS instrument, were compared with the exact same MS/MS transitions monitored on a Thermo TSQ Quantum instrument. The goal was to determine whether the pseudo-MRM pattern we observed was specific to our mass spectrometer or reproducible on other instruments.





**Figure 3.6 :** Peak areas of the three main MS/MS transitions relative to the highest peak area obtained for a) benzonaphtho(2,1-d)thiophene and b) anthraquinone. From left to right, the graphs obtained on the Varian 320MS (QqQ), on the Thermo TSQ Quantum (QqQ) and on the Thermo ITQ 900 (IT).

The dark grey circles correspond to the pseudo-MRM transition, the blue diamonds to the MRM transition with the smaller mass loss, the orange triangles to the MRM transition with the higher mass loss.

The error bars express standard deviations on triplicate analyses.

Briefly, the comparison of results obtained on both instruments clearly indicated the same tendency of a higher peak area when transitions with no mass loss were monitored for PAHs, PANHs and PASHs. Even though the relative peak areas of the less intense transitions and the optimal collision energies can slightly differ from one QqQ to another, the most intense transition remained the same for these compounds, i.e. the pseudo-MRM (see Figure 3.6.a).

The geometry of the TSQ is neither linear nor U-shaped but three-dimensional L-shaped. Similarly to the U-shape of the 320MS, and in contrast with the linear QqQ from the work of Shang et al.<sup>5</sup>, it means that the ion path is not direct towards the third quadrupole and the detector. Therefore, here again, voltages in the collision cell (Q2) are required for the pseudo-MRM to be efficient, so that the molecular ion can be quantitatively transferred from Q1 to Q3. Even if the apex of the pseudo-MRM transition breakdown curve was a bit shifted towards lower collision energies in comparison to the results obtained on the 320MS (see Figure 3.6.a), pseudo-MRM still required collision energies around 10 or 15 V on the TSQ instrument. It enables to maintain the specificity of this detection mode. According to these results obtained on two different QqQs, pseudo-MRM seems to be very efficient for the determination of PAHs and their heterocyclic derivatives with triple quadrupole instruments.

#### 3.4.2.b. Comparison of the Triple Quadrupoles with an Ion Trap

We also wanted to compare these results with what would give the same MRM and pseudo-MRM experiments on an IT. Indeed, it is known that MS/MS fragmentation on these analyzers generally shows major differences. While triple quadrupoles perform simultaneously parent ion selection (Q1), fragmentation (Q2) and product ion monitoring (Q3) in three spatially distinct areas of the mass spectrometer, all these processes are happening in the same space in the ion trap<sup>16</sup>.

For instance, when Kang et al. performed MS/MS fragmentation studies on the same molecules (isoflavones) with both a QqQ and an IT, they observed significant differences between the obtained product ion spectra<sup>17</sup>. Similarly, Bristow et al. reported the difficulty of creating “universal” MS/MS CID product ion spectral libraries, because depending on the mass spectrometer, even if the generated product ions are generally the same, their relative abundance can vary greatly<sup>18</sup>.

Consistently with this prior knowledge, we observed completely different MRM trends on our target compounds with the IT compared to those of the QqQs (Figure 3.6).

Indeed, for PAHs, PANHs and PASHs, the monitoring of the pseudo-MRM transitions gave almost no signal. For instance, in Figure 3.6.a, we report peak areas obtained for the benzonaphtho(2,1-d)thiophene which showed the most pronounced pseudo-MRM pattern on the 320MS as well as on the TSQ. On the contrary, on the ITQ 900, no signal above background noise was obtained, while the transition with the higher mass loss was highly favored (see Figure 3.6.a).

It suggests a higher fragmentation ability of the IT where the resonance energies applied, and maybe more importantly the time spent in resonance in the IT, are sufficient to break up stable aromatic structures<sup>19</sup>. Moreover, the pressure in the space where the CID takes place is also much higher in the ITQ (40 mtorr) than in QqQs (1.5 mtorr), which could lead to more collisions happening. This higher fragmentation ability was confirmed by the fact that when one looks at the two MRM transitions for PAHs, PANHs and PASHs, the higher mass loss (-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, -S or -CHS for instance) is always favored over the loss of only one hydrogen atom (- 1 Da). The pattern observed

for benzonaphtho(2,1-d)thiophene and presented in Figure 3.6.a was repetitive for all the PAHs, PANHs and PASHs studied here (data not shown).

Conversely and surprisingly, the other PACs group we distinguished in this study, i.e. polar derivatives (OPAHs and NPAHs), exhibited with the IT a pseudo-MRM prevalence trend which was not found with QqQs (see Figure 3.6.b). In Figure 3.6.b, we present the MRM and pseudo-MRM breakdown curve of 9,10-anthraquinone for which the pseudo-MRM relative peak area was the lowest on the 320MS and on the TSQ. On the ITQ however, the maximal peak area was obtained for the 208 → 208 m/z transition, and the second highest peak area only reached about 53% for the 280 → 180 transition. We could argue that maybe the two selected MRM transitions were not the most intense possible if the fragmentation in the ITQ is really different from the fragmentation in the QqQs, but anyway, pseudo-MRM still gave very high absolute peak areas, around 10<sup>7</sup>.

However, here again, there was a major difference with the pseudo-MRM profile obtained on the QqQs. The pseudo-MRM intensity already decreased from very low fragmentation amplitudes: from 0.5 in the case of anthraquinone (see Figure 3.6.b), and even steadily from 0 for the three other polar PACs (data not shown).

This supports our prior hypothesis that in the case of QqQs, the increase of pseudo-MRM intensity from 0 to about 15 V is due to the necessity of sufficient voltages to transfer the ions from Q1 to Q3, whereas for the IT, the selection, fragmentation and ejection processes take place in the same space, so the only criterion ruling pseudo-MRM intensity is the bond breaking.

Hence, the pseudo-MRM is probably not the best suitable MS/MS mode to use on an IT, because in this case, there is some incompatibility between the necessity of using non-zero collision energies to have a better specificity than at the MS<sup>1</sup> level and the rapid decrease of peak area with the increase of collision energy.

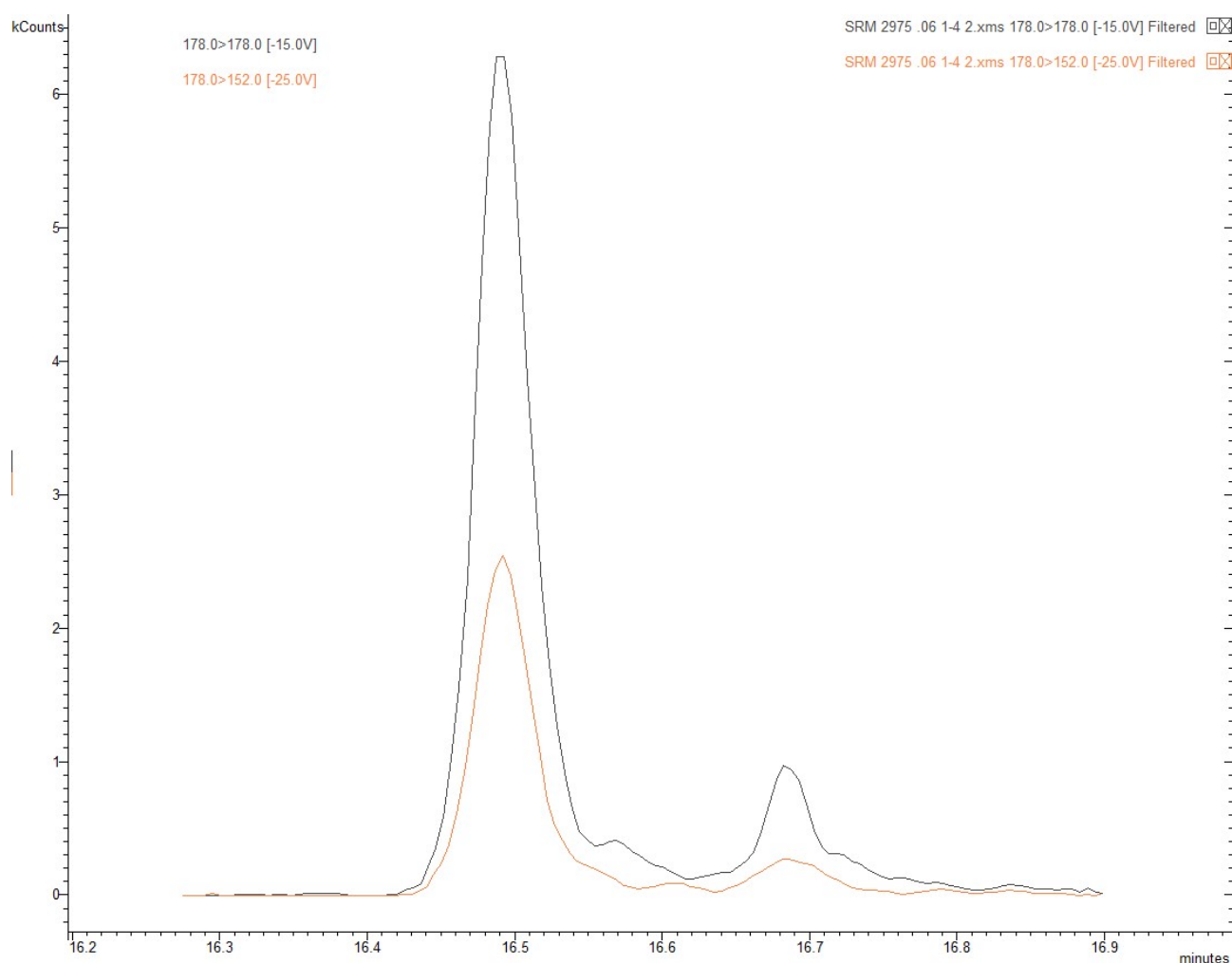
A more global outcome of this instrumental comparative study is the confirmation that in the course of a MS/MS method development, the search of the most intense m/z transitions is to be performed with great care. It is always instrument-dependent, so it is not sufficient to reproduce transitions from the literature, especially if it is not the exact same mass spectrometer used.

### *3.4.3. Application to a complex sample: Diesel Particulate Matter Standard Reference Material*

As described in Section 3.3.3, the applicability of pseudo-MRM to complex matrices was demonstrated thanks to a Diesel PM reference material, SRM 2975. The latter was certified by NIST against its content of PAHs and NPAHs<sup>20</sup>, but previous works also reported the presence of several OPAHs and PASHs in this SRM and their concentrations<sup>21–25</sup>.

The GC-MS/MS instrument selected for this experiment was the Varian 320MS QqQ. It was demonstrated that this instrument showed particularly enhanced responses in the pseudo-MRM mode (see Sections 3.4.1 and 3.4.2), in contrast with the ITQ for which pseudo-MRM was less efficient than MRM. According to the results from Section 3.4.2, PACs fragmentation patterns were equivalent on the Varian 320MS and on the TSQ Quantum.

Among the PACs which exhibit an important pseudo-MRM prevalence, anthracene was present in SRM 2975. The GC-MS/MS chromatogram of anthracene ( $t_R = 16.7$  minutes) and its isomer phenanthrene ( $t_R = 16.5$  minutes) in SRM 2975 is shown in Figure 3.7. The grey trace corresponds to the pseudo-MRM transition ( $178 \rightarrow 178$ ) and the orange trace corresponds to the most intense MRM transition ( $178 \rightarrow 152$ ) (see Figure 3.5.a). The higher signal obtained for phenanthrene conforms with the respective concentrations reported for these two compounds in SRM 2975<sup>20,22,25</sup>.



**Figure 3.7 : Pseudo-MRM ( $178 \rightarrow 178$ , grey trace) and MRM ( $178 \rightarrow 152$ , orange trace) chromatograms of phenanthrene ( $t_R = 16.5$  min) and anthracene ( $t_R = 16.7$  min) in Diesel Particulate Matter SRM 2975.**

**Table 3.I : For phenanthrene and anthracene (PAHs, 178 Da), comparison of MRM / pseudo-MRM peak area ratios in standard solutions (mean value over three standards at different concentrations) and in SRM 2975, and comparison of signal-to-noise ratios of the pseudo-MRM and MRM transitions in SRM 2975.**

	Phenanthrene	Anthracene
<b>MRM / pseudo-MRM ratio (standards)</b>	0.404	0.319
<b>MRM / pseudo-MRM ratio (SRM 2975)</b>	0.412	0.361
<b>Absolute ratio deviation (SRM 2975)</b>	+ 0.009	+ 0.042
<b>Relative ratio deviation (SRM 2975)</b>	+ 2.1 %	+ 13.3 %
<b>pseudo-MRM S/N (SRM 2975)</b>	405	27
<b>MRM S/N (SRM 2975)</b>	208	12

The objective was to evaluate typical indicators of MS/MS methods performance and matrix effects: signal-to-noise ratio (S/N) and ratio between quantitation and confirmation transitions. These indicators are reported for both compounds in Table 3.I. In this case, pseudo-MRM is the most intense transition, so it is considered as the quantitation transition, and MRM is used only as confirmation for a reliable identification of the target PACs.

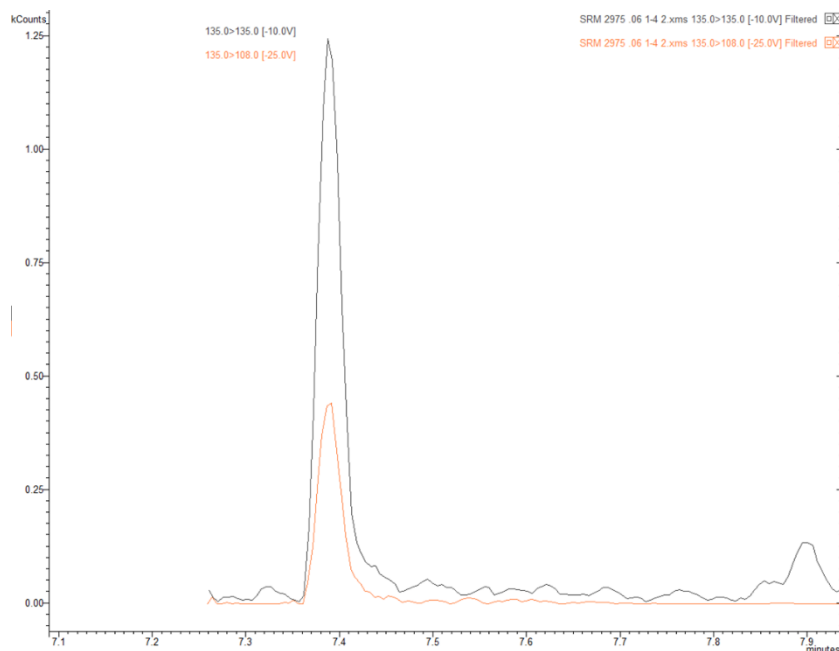
In Table 3.I, the MRM / pseudo-MRM ratios obtained with the injection of the SRM 2975 extract are compared with the mean of the MRM / pseudo-MRM ratios obtained with standard solutions at three different concentrations. The relative difference between these identification ratios in SRM 2975 and in the neat standards is only + 2.1 % for phenanthrene and + 13.3 % for anthracene. Thus, both values are below the commonly accepted criterion of  $\pm 20$  % required for a decisive identification of organic micropollutants in environmental samples.

The comparison of signal-to-noise ratios for phenanthrene and anthracene in SRM 2975 is in favor of their pseudo-MRM transition. Indeed, S/N of the 178  $\rightarrow$  178 transition are about two times higher than S/N of the 178  $\rightarrow$  152 transition for both peaks (405 vs. 208 and 27 vs. 12). This suggests that even in the presence of a complex matrix such as Diesel PM, the sensitivity of pseudo-MRM is higher than the one of MRM, and its specificity is preserved, perhaps due to the non-zero collision energies used, as described in Section 3.4.1.

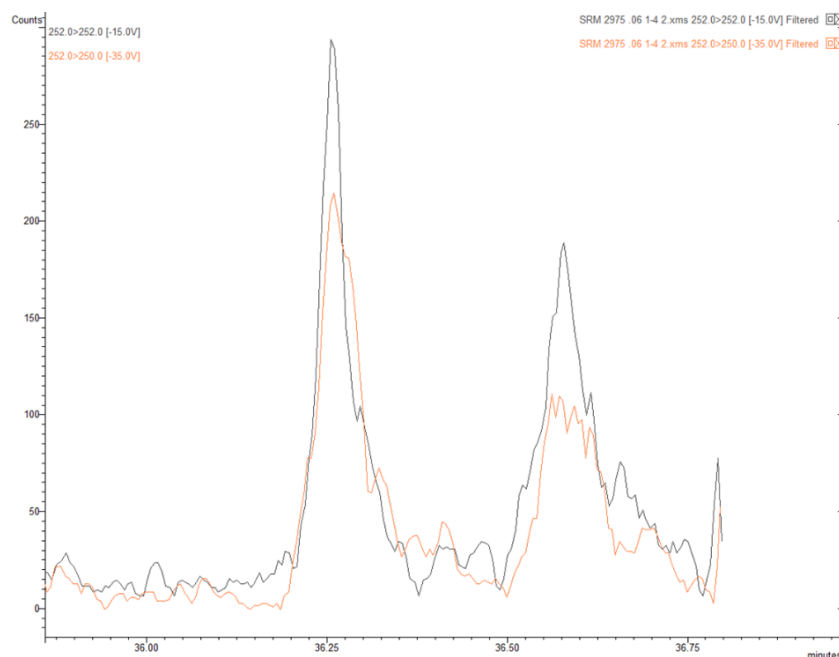
The same study of pseudo-MRM performance for the analysis of Diesel PM was also performed on a N- and S-heterocyclic compound, benzothiazole, and on two heavier PAHs isomers, benzo(e)pyrene and benzo(a)pyrene. Their chromatograms and specificity indicators are reported in Figure 3.8, Figure 3.9 and in Table 3.II of the Appendix of this article. Briefly, all identification ratios of SRM 2975 were in agreement with those of the standard solutions,

supporting the specificity of the pseudo-MRM transition. In the case of benzopyrene isomers, S/N were equivalent for the MRM and pseudo-MRM transitions. In the case of benzothiazole however, S/N was higher for the MRM transition even if the absolute peak area was higher for the pseudo-MRM transition, so the choice of the most appropriate quantitation transition would have to be carefully evaluated for each PAC of interest.

These results confirm the applicability of pseudo-MRM for the quantification of trace-level PAHs, PANHs and PASHs in complex environmental samples, with the possibility of enhancing their detection and thus reduce their limits of quantification.



**Figure 3.8 : Pseudo-MRM (135 → 135, grey trace) and MRM (135 → 108, orange trace) chromatograms of benzothiazole ( $t_R = 7.4$  min) in Diesel Particulate Matter SRM 2975**



**Figure 3.9 : Pseudo-MRM (252 → 252, grey trace) and MRM (252 → 250, orange trace) chromatograms of benzo(e)pyrene ( $t_R = 36.3$  min) and benzo(a)pyrene ( $t_R = 36.6$  min) in Diesel Particulate Matter SRM 2975**

*Table 3.II : For benzothiazole (PASH, 135 Da, tR = 7.4 minutes), benzo(e)pyrene and benzo(a)pyrene (PAHs, 252 Da, tR = 36.3 minutes and 36.7 minutes, respectively) : Comparison of MRM / pseudo-MRM peak area ratios in standard solutions(mean value over three standards at different concentrations) and in SRM 2975, and comparison of signal-to-noise ratios of the pseudo-MRM and MRM transitions in SRM 2975.*

	<b>Benzothiazole</b>	<b>Benzo(e)pyrene</b>	<b>Benzo(a)pyrene</b>
<b>MRM / pseudo-MRM ratio (standard solutions)</b>	0.384	0.791	0.608
<b>MRM / pseudo-MRM ratio (SRM 2975)</b>	0.347	0.863	0.640
<b>Absolute ratio deviation (SRM 2975)</b>	- 0.033	0.072	0.031
<b>Relative ratio deviation (SRM 2975)</b>	- 8.7 %	+ 9.1 %	+ 5.1 %
<b>pseudo-MRM S/N (SRM 2975)</b>	72	26	16
<b>MRM S/N (SRM 2975)</b>	137	30	15

### 3.5. Conclusion

In this communication, we showed data supporting the interest of using pseudo-MRM as a trustworthy alternative to MRM for the trace-level determination of unsubstituted PACs such as PAHs and heterocyclic derivatives, as the latter is generally less sensitive for these compounds. The signal enhancement, and therefore the detection limit decrease, can be from 2 to 5 times according to our results. With the application of collision voltages around 15 V on U-shaped or L-shaped QqQs, the specificity of MRM can be preserved, because isobaric interferences will exhibit a far smaller response with such collision energies applied.

These statements were confirmed by the analysis of a Diesel PM reference material with both MRM and pseudo-MRM. Pseudo-MRM generated signals with higher signal-to-noise ratios than MRM for PAHs such as phenanthrene and anthracene, and the MRM / pseudo-MRM ratios for these compounds were consistent in neat standards and in the complex material.

However, these observations are only valid for triple quadrupoles. The different fragmentation properties of ion traps seem to make them less appropriate to pseudo-MRM.

Anyway, an extensive optimization of the monitored MS/MS transitions should be performed for each instrument when an analytical method is developed, because depending on the mass spectrometer involved, the optimal mass transitions and the optimal collision energies differ.

Finally, pseudo-MRM seems very interesting and applicable to a broader scope of compounds, as long as they have a stable structure with no major labile bond. Such is the case, for instance, of fullerenes, which are compounds for which fragmentation is difficult to obtain, therefore pseudo-MRM has already been successfully applied to the determination of these molecules<sup>26,27</sup>.



### 3.6. References

- (1) Adhikari, P. L.; Wong, R. L.; Overton, E. B. *Chemosphere* **2017**, *184*, 939–950.
- (2) Hermes, N.; Jewell, K. S.; Wick, A.; Ternes, T. A. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1531*, 64–73.
- (3) Yang, J. J.; Han, Y.; Mah, C. H.; Wanjaya, E.; Peng, B.; Xu, T. F.; Liu, M.; Huan, T.; Fang, M. L. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1100*, 88–96.
- (4) Galmiche, M.; Delhomme, O.; François, Y.-N.; Millet, M. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2021**, *134*, 116146.
- (5) Shang, D.; Kim, M.; Haberl, M. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1334*, 118–125.
- (6) Park, G.; Brunswick, P.; Kwok, H.; Haberl, M.; Yan, J.; MacInnis, C.; Kim, M.; Helbing, C.; van Aggelen, G.; Shang, D. *Anal. Methods* **2018**, *10* (46), 5559–5570.
- (7) Lian, W.; Ren, F.; Tang, L.; Dong, D. *Microchem. J.* **2016**, *129*, 194–199.
- (8) Villanueva, F.; Sevilla, G.; Lara, S.; Martín, P.; Salgado, S.; Albaladejo, J.; Cabañas, B. *Microchem. J.* **2018**, *142*, 117–125.
- (9) Idowu, I.; Francisco, O.; Thomas, P. J.; Johnson, W.; Marvin, C.; Stetefeld, J.; Tomy, G. T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2018**, *32* (3), 277–287.
- (10) Jia, J.; Deng, L.; Bi, C.; Jin, X.; Zeng, Y.; Chen, Z. *Atmos. Environ.* **2021**, *252*, 118335.
- (11) Pinheiro, C.; Carreira, R.; Massone, C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2021**.
- (12) Adhikari, P. L.; Overton, E. B.; Pangen, D.; Regmi, B. P. *Microchem. J.* **2022**, *174*, 107074.
- (13) Thiäner, J. B.; Achten, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (7), 1737–1747.
- (14) Lara, S.; Villanueva, F.; Martín, P.; Salgado, S.; Moreno, A.; Sánchez-Verdú, P. *Chemosphere* **2022**, 133745.
- (15) Alves, C. A.; Vicente, A. M.; Custódio, D.; Cerqueira, M.; Nunes, T.; Pio, C.; Lucarelli, F.; Calzolari, G.; Nava, S.; Diapouli, E.; Eleftheriadis, K.; Querol, X.; Musa Bandowe, B. A. *Sci. Total Environ.* **2017**, *595*, 494–504.
- (16) de Rijke, E.; Zappey, H.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. T. *J. Chromatogr. A* **2003**, *984* (1), 45–58.
- (17) Kang, J.; Hick, L. A.; Price, W. E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21* (6), 857–868.
- (18) Bristow, A. W. T.; Webb, K. S.; Lubben, A. T.; Halket, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18* (13), 1447–1454.
- (19) Savaryn, J. P.; Toby, T. K.; Kelleher, N. L. *Proteomics* **2016**, *16* (18), 2435–2443.
- (20) National Institute of Standards & Technology; *Certificate of Analysis - Standard Reference Material 2975 - Diesel Particulate Matter (Industrial Forklift)*; 2021.
- (21) Christensen, A.; Östman, C.; Westerholm, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381* (6), 1206–1216.
- (22) Cochran, R. E.; Dongari, N.; Jeong, H.; Beránek, J.; Haddadi, S.; Shipp, J.; Kubátová, A. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *740*, 93–103.
- (23) Cochran, R. E.; Kubátová, A. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2015**, *95* (5), 434–452.
- (24) Nocun, M. S.; Schantz, M. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (16), 5583–5593.
- (25) Schantz, M. M.; McGaw, E.; Wise, S. A. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (19), 8222–8231.
- (26) Carboni, A.; Helmus, R.; Parsons, J. R.; Kalbitz, K.; de Voogt, P. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1433*, 123–130.
- (27) Farré, M.; Pérez, S.; Gajda-Schranz, K.; Osorio, V.; Kantiani, L.; Ginebreda, A.; Barceló, D. *J. Hydrol.* **2010**, *383* (1–2), 44–51.

## Chapitre 4 :

### Analyse simultanée de 79 Composés Aromatiques Polycycliques par GC-MS/MS

Dans le Chapitre 3, j'ai présenté les développements instrumentaux nécessaires à la mise en place d'une méthode d'analyse ciblée de CAP par GC-MS/MS, avec l'optimisation des méthodes de séparation et de détection.

La suite de ces travaux de thèse a consisté à optimiser également la méthode d'extraction des CAP dans les matrices particulaires, une étape cruciale pour atteindre des limites de quantification basses dans les échantillons environnementaux pour l'ensemble des CAP.

Il a ensuite fallu valider la méthode analytique selon les critères de qualité courants pour l'analyse environnementale (linéarité de l'étalonnage, reproductibilité, taux de recouvrement, etc ...). Pour confirmer cette validation, nous avons également analysé un matériau de référence du « *National Institute of Standards & Technology* » (NIST). Il s'agit de particules d'échappement de moteur diesel, c'est-à-dire de suies de combustion riches en CAP, dont les teneurs en CAP ont été certifiées.

Une première application environnementale de la méthode a ensuite été réalisée sur des PM<sub>10</sub> collectées dans un parking résidentiel de l'agglomération de Strasbourg.

Tous les résultats issus du développement et de la validation de la méthode ont été présentés dans un article soumis en août 2022 dans la revue à comité de lecture *Polycyclic Aromatic Compounds*.

Ce manuscrit en anglais constituera l'ensemble du Chapitre 4 de ma thèse.

## Simultaneous determination of 79 polar and non-polar Polycyclic Aromatic Compounds in airborne particulate matter by gas chromatography – tandem mass spectrometry

Mathieu Galmiche, Alexandre Sonnette, Michel Wolf, Christophe Sutter, Olivier Delhomme, Yannis-Nicolas François, Maurice Millet

*Polycyclic Aromatic Compounds*, **2022**, under review

### 4.1. Introduction

Airborne particulate matter (PM) is of great concern for its known health and environmental effects<sup>1-4</sup>. PM in outdoor air pollution is registered by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as carcinogenic to humans, and is suspected to cause millions of premature deaths in the world each year<sup>3,5-7</sup>.

Among the organic pollutants of interest in airborne PM, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) play a major role<sup>6,8-11</sup>. They have been studied for decades, mainly according to the list of 16 priority pollutants from the U.S. Environmental Protection Agency<sup>12</sup>. Besides these PAHs, their polar derivatives such as nitrated PAHs (NPAHs) and oxygenated PAHs (OPAHs), their heterocyclic derivatives such as Polycyclic Aromatic Nitrogen Heterocycles (PANHs), also called Azaarenes (AZAs), and Polycyclic Aromatic Sulfur Heterocycles (PASHs), also called Thiaarenes (THIAs), were historically neglected, despite documented adverse effects<sup>12,13</sup>. Nowadays, more and more studies aim to evaluate the health risks due to polar and non-polar Polycyclic Aromatic Compounds (PACs), broadening the scope of environmental monitoring of these compounds beyond PAHs<sup>14-16</sup>. When a wide range of PACs were taken into account, the toxicity of the global PACs mixture was found to greatly increase compared to the toxicity of the sole 16 EPA PAHs<sup>17</sup>. It is required that current and future analytical methods tend to involve an increasing number of individual PACs, including polar PACs and “parent” PAHs outside the list of 16 EPA priority PAHs, which can also exhibit considerable genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity<sup>12,14,15,18,19</sup>.

To this end, different analytical strategies can be considered:

- Several analytical methods complementing one another can be implemented concurrently to measure separately various PAC classes: for instance, GC-EI-MS for PAHs and carbonyl-OPAHs, GC-EI-MS with prior derivatization for hydroxyl- and carboxyl-OPAHs, and GC-NICI-MS for nitro-PAHs<sup>20-22</sup>.
- Thanks to the current development of high-resolution mass spectrometry (HRMS) methods, non-target screening is getting particularly powerful and adapted to environmental analysis of PACs<sup>23-27</sup>. Two-dimensional gas chromatography is an additional tool to facilitate this non-target approach<sup>23</sup>. However, the enormous number of existing isomers among PACs can be a major obstacle to the unambiguous identification of PACs individuals, and quantitative determination of each compound is not possible when commercial standards are not available.

- To our knowledge, only three research groups reported the simultaneous determination in a single analytical method of many polar and non-polar PACs<sup>28–30</sup>, knowing that one of them implemented two-dimensional gas chromatography to this purpose<sup>29</sup>. Moreover, in those articles, groups of compounds such as AZAs and PASHs, as well as other critical individual PACs, were not analyzed.

In this article, a single GC-MS/MS method enabling the simultaneous determination of 79 polar and non-polar PACs spread out among the PAHs, OPAHs, NPAHs, AZAs and PASHs groups is described, including the optimization of GC-MS/MS instrumental parameters and of the Pressurized Liquid Extraction (PLE), the validation of the method and its application to a Certified Reference Material and to real-world PM<sub>10</sub> samples.

## 4.2. Materials and Methods

### 4.2.1. Chemicals

Analytical HPLC grade solvents were purchased from VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France). Certified standards of polar and non-polar PACs were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), LGC Standards (Molsheim, France), Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-la-Grande, France) and BCP Instruments (Oullins, France). Deuterated PACs internal standards (ISTDs) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-la-Grande, France) and BCP Instruments (Oullins, France).

### 4.2.2. Samples

PM<sub>10</sub> samples were collected from February to March 2022 in a parking lot from a residential building in the urban area of Strasbourg (Alsace, France, 48°35'30" N, 7°43'32" E). This building was located close to a motorway (< 500 meters), directly beside an urban roadway on one side and beside a tramway line on the other side. The parking lot was semi-closed and had two levels: ground and underground. PM<sub>10</sub> samples were collected thanks to a Sven Leckel LVS6-RV medium-volume air sampler (Sven Leckel Ingenieurbüro GmbH, Berlin, Germany) operated at 2.3 m<sup>3</sup>/h for a whole week. This sampling was performed during six consecutive weeks. Because of noise disturbance from the sampling device, ground-level samples (Week 1, 2 and 3) could only be collected during daytime (from 08:00 to 21:00), whereas underground-level samples (Week 4, 5 and 6) were collected 24 hours a day.

All PM<sub>10</sub> samples were collected on glass fiber filters (GFFs) (Ø 47 mm, GF6, Whatman, GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Before sampling, the GFFs were rinsed with n-hexane and dichloromethane and conditioned at 50°C for at least 48 hours to remove traces of organic contaminants.

Between collection and extraction, PM<sub>10</sub> samples were stored in aluminum foil at -20°C.

### 4.2.3. Extraction and sample preparation

Aerosol samples had to be extracted by solid-liquid extraction. Beforehand, ISTDs (see Table 4.1) were spiked onto the samples at a level consistent with their mid-range calibration level.

Among the available techniques, Pressurized Liquid Extraction (PLE) was selected for a time-efficient and automatable extraction, and for its robustness and repeatability<sup>14,31,32</sup>. PLE was performed on an ASE 300 instrument (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) in 33 mL cells. Pressure was 1500 psi, temperature was 110°C, and two static cycles of 10 minutes each were performed.

In this work, we compared various solvents in order to assess their extraction ability: acetonitrile, dichloromethane, toluene, ethyl acetate, toluene/acetonitrile (1:1, v/v), toluene/dichloromethane (1:1, v/v), n-hexane/acetone (1:1, v/v), n-hexane/dichloromethane (1:1, v/v). The use of these solvents and solvent mixtures in previous works was presented in a literature review<sup>14</sup>.

After PLE, the solvent was evaporated under a gentle stream of nitrogen down to 0.5 mL using a TurboVap II concentrator (Biotage, Uppsala, Sweden) and further two-fold diluted with ethyl acetate for a better suitability of the GC injection.

### 4.2.4. Instrumental method

PACs were separated with a CP-3800 Gas Chromatograph (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) on a 60 m x 0.25 mm x 0.10 µm Rxi-PAH column (Restek, Bellefonte, PA, USA).

A Split/Splitless (SSL) injector was operated at 250°C in splitless mode for the first two minutes of the run, then the split valve was opened at a 1:10 ratio to clean up the injector from remaining non-volatile species which could be deposited. Moreover, a pressure pulse was applied during the first minute of the run, i.e. a flow rate of 4.0 mL/min carrier gas permitted to maximize the volatilization of the compounds and their transfer to the head of the column. The volume of liquid injected was 2 µL.

Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.5 mL/min. The oven temperature was held at 60°C for 1 min, then raised to 150°C at 30°C/min, slowly ramped up to 300 °C at 5°C/min, a temperature held for 5 min before a final ramp up to 320 °C at 10 °C/min, and 9 min at a constant temperature of 320°C. The total run time was 50 minutes. The temperature of the transfer line was set at the final oven temperature, i.e. 320°C.

After their GC separation, compounds were ionized by Electron Ionization (EI) at 70 eV and 250°C. Then, a 320MS triple quadrupole (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) was used as the analyzer in MRM and pseudo-MRM modes. Pseudo-MRM mode was presented in detail in a previous article<sup>33</sup>. The optimal MS/MS transitions are reported in the “Results and Discussion” section (4.3). Argon was used as collision gas at a pressure of 1.5 mtorr.

#### 4.2.5. QA / QC

The analytical method was validated against linearity of the calibration, intra-day and inter-day variability, limits of quantification (LOQ) and recoveries (see Section 4.3.5).

Calibration was performed by internal standardization. 7 deuterated analogs of PACs were selected (4 deuterated PAHs, 1 deuterated OPAH, 1 deuterated NPAH and 1 deuterated AZA) and used as internal standards for the 79 analytes (see Table 4.I). For each analyte, the optimal internal standard was chosen to give the highest possible linearity of the calibration curve and a method recovery close to 100 %. Calibration curves were built in quadratic mode with 1/X weighting. Dynamic calibration range was selected depending on each analyte's response intensity. Calibration curves were only validated if  $R^2 > 0.99$ . At each calibration point, it was verified that the deviation between theoretical and calculated concentrations did not exceed 20 %, except for the instrumental LOQ (iLOQ) at which  $\pm 60$  % was tolerated.

For each injection series, accuracy of the method was checked by injecting a low-level and a high-level standard and calculating its recovery (in %). A  $\pm 20$  % deviation was considered as acceptable. If this criterion was not met, the series was reinjected. The same standard solutions were used to calculate intra-day repeatability over five replicates and inter-day repeatability for five replicates injected over five consecutive days.

LOQs were validated if all the following criteria were consistently met:

- signal-to-noise ratio (S/N) of the quantification transition higher than 10,
- S/N of the confirmation transition higher than 3,
- concentration higher than the average measured concentration in solvent blanks,
- LOQ validated as the lowest point of the calibration curve according to the rules previously presented for the validation of the calibration.

The instrumental LOQs presented in this article are thus not only based on S/N values, but rather on stronger criteria.

Method recoveries were calculated according to the following protocol. Three GFFs previously used for PM sampling were pre-washed by PLE according to the optimized protocol of this work and spiked with a given amount of PACs standards (from 0.1  $\mu\text{g}$  to 2  $\mu\text{g}$  depending on the analyte's response). All surrogates were also spiked on the filters at a level corresponding to their mid-range level used for the calibration. The sample preparation protocol was performed and after GC-MS/MS analysis, recoveries were computed as the ratio of measured vs. theoretical concentration by internal standardization.

To confirm the applicability of our method for the determination of PACs in particulate samples, we analyzed a Standard Reference Material from the NIST: Diesel Particulate Matter from an industrial forklift (SRM 2975)<sup>34</sup>. The analysis of such materials is considered as the gold standard for the validation of new analytical methods<sup>35</sup>. We also took advantage of this experiment to assess the uncertainty of the analytical method. For this purpose, two preparations of the SRM

were done with different weights (0.03 g and 0.04 g) deposited on GFFs, spiked with isotope-labeled surrogates (see Table 4.I) and extracted according to the optimized PLE protocol. These two samples were prepared separately. Each sample preparation was analyzed twice with the GC-MS/MS method, and then reprocessed twice with two different calibration curves. Therefore, when each of these analyses gave a positive quantification, up to eight different values were averaged for each compound and their standard deviation (SD) was determined.

### 4.3. Results and Discussion

#### 4.3.1. Selection of the target compounds

All 79 individual PACs studied in this article are summarized in Table 4.I with their characteristics for this method. The choice of the compounds of interest was made according to commercial standards availability, occurrence reported in the literature and toxicological relevance. Our list of target PACs included 25 PAHs, 17 OPAHs, 14 NPAHs, 17 AZAs and 6 PASHs.

In particular, among the 9 PAHs which have been studied in this work even though they are outside the scope of the 16 EPA's PAHs, we analyzed 7H-benzo(c)fluorene, 1-methylpyrene and 5-methylchrysene which were reported as major contributors to the toxicity of PAHs mixtures<sup>36</sup>.

OPAHs and NPAHs have often been described as very relevant to characterize photochemical ageing of PAHs or typical emission sources such as diesel combustion, but also very important because of their toxicity which can be higher than the one of parent PAHs<sup>37-41</sup>. Although analytical methods for their determination have already been presented<sup>20,42-44</sup>, it is very rare that these compounds are analyzed together with PAHs and heterocyclic derivatives in a single run. Quantifying OPAHs and NPAHs together with non-polar PACs was one of the main goals of this work.

Polycyclic Aromatic Heterocycles are also atmospheric contaminants of great interest. Their health effects need to be addressed, but environmental occurrence data are missing for this purpose<sup>13,15,27,45</sup>. The choice of the azaarenes and thiaarenes studied here was based on the priority semi-polar PACs defined by Schwarz et al. and available occurrence data<sup>12,13,15</sup>.

The exception to this careful selection is the absence of 9-Fluorenone (FLUO) and 9,10-Phenanthrenequinone (PHEQ) in our method. These two OPAHs are of real interest in the context of PACs environmental analysis, but we observed complete degradation of PHEQ to FLUO in the injector, so that precise quantification of both molecules was made impossible. Therefore, we advise that future works targeting the analysis of one of these two molecules by GC-MS with classical high temperature split/splitless injection involve a prior verification of the existence of any conversion from PHEQ to FLUO with commercial standards, because this could seriously hinder an accurate quantification of both molecules.

**Table 4.1 : List of the 79 compounds of interest and 7 internal standards of this work, classified into their respective chemical group, with their abbreviation, molecular mass (in Da), retention time (in min), MS/MS transitions including collision energy (in V), and instrumental limit of quantification (in pg).**

Group	Compound Name	Abbrev.	MM (Da)	RT (min)	Quantitation transition (Q) (CE, V)	Qualification transition (q) (CE, V)	iLOQ (pg)
PAHs n = 25	Naphthalene	NAP	128	7.05	128 → 128 (10)	128 → 102 (35)	5
	Acenaphthylene	ACY	152	10.65	152 → 152 (15)	152 → 151 (25)	5
	Acenaphthene	ACE	154	11.10	154 → 154 (15)	154 → 153 (25)	2
	Fluorene	FLU	166	12.80	166 → 166 (15)	166 → 165 (25)	2
	Phenanthrene	PHE	178	17.15	178 → 178 (15)	178 → 152 (25)	2
	Anthracene	ANT	178	17.30	178 → 178 (15)	178 → 152 (25)	2
	Fluoranthene	FLT	202	22.85	202 → 202 (15)	202 → 200 (30)	2
	Pyrene	PYR	202	24.15	202 → 202 (15)	202 → 200 (30)	2
	Retene	RET	234	24.25	234 → 219 (15)	234 → 204 (30)	5
	11H-Benzo[b]fluorene	B(b)FLU	216	25.60	216 → 215 (25)	216 → 216 (15)	10
	11H-Benzo[a]fluorene	B(a)FLU	216	25.85	216 → 215 (25)	216 → 216 (15)	10
	7H-Benzo[c]fluorene	B(c)FLU	216	25.95	216 → 215 (25)	216 → 216 (15)	5
	1-Methylpyrene	1-MPYR	216	26.75	216 → 215 (25)	216 → 216 (10)	5
	Benz[a]anthracene	B(a)ANT	228	30.05	228 → 228 (15)	228 → 226 (35)	5
	Triphenylene	TPH	228	30.35	228 → 226 (35)	228 → 228 (15)	5
	Chrysene	CHR	228	30.45	228 → 226 (35)	228 → 228 (15)	5
	5-Methylchrysene	5-MCHR	242	32.45	242 → 241 (20)	242 → 242 (20)	5
	Benzo[b]fluoranthene	B(b)FLT	252	35.30	252 → 252 (15)	252 → 250 (35)	2.5
	Benzo[k]fluoranthene	B(k)FLT	252	35.40	252 → 252 (15)	252 → 250 (35)	2.5
	Benzo[j]fluoranthene	B(j)FLT	252	35.50	252 → 252 (15)	252 → 250 (35)	2.5
	Benzo[e]pyrene	B(e)PYR	252	37.10	252 → 252 (15)	252 → 250 (35)	2.5
	Benzo[a]pyrene	B(a)PYR	252	37.40	252 → 252 (15)	252 → 250 (35)	2.5
	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	I(cd)PYR	276	43.30	276 → 276 (15)	276 → 274 (40)	10
	Dibenz[a,h]anthracene	DB(a,h)ANT	278	43.35	278 → 278 (15)	278 → 276 (35)	20
	Benzo[ghi]perylene	B(ghi)PER	276	45.10	276 → 276 (15)	276 → 274 (40)	20
OPAHs n = 17	1,2-Naphthoquinone	1,2-NAPQ	158	7.35	130 → 102 (20)	102 → 76 (15)	200
	1-Indanone	INDO	132	8.50	132 → 104 (10)	132 → 78 (20)	4
	Phthalic Anhydride	PHTLA	148	9.30	104 → 76 (10)	148 → 104 (10)	2
	1,4-Naphthoquinone	1,4-NAPQ	158	10.80	158 → 102 (20)	158 → 130 (15)	40
	1-Naphthaldehyde	NAPL	156	12.15	156 → 128 (20)	156 → 78 (35)	2
	Xanthone	XTO	196	19.10	196 → 139 (35)	196 → 168 (20)	2
	Phenalenone	PNO	180	20.90	180 → 152 (15)	152 → 151 (25)	10
	9,10-Anthraquinone	ANTQ	208	21.75	180 → 152 (15)	208 → 180 (15)	10
	2-Methyl-9,10-Anthraquinone	2-MANTQ	222	24.05	222 → 165 (30)	165 → 164 (20)	10



	1,8-Naphthalic anhydride	1,8-NAPA	198	24.10	154 → 126 (15)	198 → 154 (10)	5
	11H-Benzo[a]fluoren-11-one	B(a)FLUO	230	28.60	230 → 202 (15)	230 → 201 (40)	2
	7H-Benzo[c]fluoren-7-one	B(c)FLUO	230	29.25	230 → 202 (15)	230 → 201 (40)	2
	11H-Benzo[b]fluoren-11-one	B(b)FLUO	230	29.75	230 → 202 (15)	230 → 201 (40)	2
	Benzanthrone	BANTO	230	31.70	230 → 202 (20)	230 → 200 (35)	5
	1,2-Benzanthraquinone	BANTQ	258	32.85	258 → 202 (30)	258 → 230 (20)	20
	5,12-Naphthacene quinone	NACEQ	258	34.40	258 → 202 (30)	258 → 230 (20)	10
	6H-Benzo[cd]pyrene-6-one	B(cd)PYRO	254	38.20	254 → 226 (30)	226 → 224 (15)	20
NPAHs n = 14	1-Nitronaphthalene	1-NNAP	173	14.00	127 → 77 (20)	173 → 115 (25)	10
	2-Nitronaphthalene	2-NNAP	173	14.80	127 → 77 (20)	173 → 115 (25)	10
	5-Nitroacenaphthene	5-NACE	199	22.40	152 → 151 (15)	199 → 141 (20)	25
	2-Nitrofluorene	2-NFLU	211	24.30	211 → 165 (20)	165 → 163 (20)	100
	9-Nitroanthracene	9-NANT	223	24.65	223 → 165 (35)	176 → 150 (30)	10
	9-Nitrophenanthrene	9-NPHE	223	26.15	176 → 150 (30)	223 → 167 (25)	25
	2-Nitrofluoranthene	2-NFLT	247	31.90	247 → 201 (25)	201 → 200 (25)	100
	3-Nitrofluoranthene	3-NFLT	247	32.25	247 → 189 (30)	201 → 200 (25)	200
	4-Nitropyrene	4-NPYR	247	32.60	201 → 200 (25)	247 → 189 (30)	100
	1-Nitropyrene	1-NPYR	247	33.40	201 → 200 (25)	247 → 189 (30)	200
	2-Nitropyrene	2-NPYR	247	33.70	247 → 201 (20)	201 → 200 (25)	200
	7-Nitrobenz[a]anthracene	7-NBANT	273	36.00	273 → 215 (35)	215 → 189 (20)	200
	6-Nitrochrysene	6-NCHR	273	37.90	273 → 215 (30)	226 → 224 (30)	1000
	6-Nitrobenzo[a]pyrene	6-NBPYR	297	44.65	267 → 239 (25)	297 → 267 (20)	2000
AZAs n = 17	Quinoline	QUI	129	7.90	129 → 129 (10)	129 → 102 (25)	5
	Isoquinoline	isoQUI	129	8.15	129 → 129 (10)	129 → 102 (25)	5
	Benzo[h]quinoline	B(h)QUI	179	17.70	179 → 179 (15)	179 → 151 (40)	5
	Acridine	ACR	179	17.95	179 → 179 (15)	179 → 151 (40)	2.5
	Phenanthridine	PHI	179	18.50	179 → 179 (15)	179 → 178 (20)	5
	Benzo[f]quinoline	B(f)QUI	179	18.65	179 → 179 (15)	179 → 178 (20)	2.5
	Carbazole	CAR	167	19.00	167 → 167 (15)	167 → 166 (20)	1
	Benz[c]acridine	B(c)ACR	229	29.35	229 → 229 (15)	229 → 228 (30)	2.5
	Benz[a]acridine	B(a)ACR	229	30.30	229 → 229 (15)	229 → 228 (30)	2.5
	Benzo[a]carbazole	B(a)CAR	217	30.85	217 → 217 (15)	217 → 216 (30)	5
	Benzo[b]carbazole	B(b)CAR	217	32.05	217 → 217 (15)	217 → 216 (35)	5
	Benzo[c]carbazole	B(c)CAR	217	32.45	217 → 217 (15)	217 → 216 (35)	5
	Dibenz[c,h]acridine	DB(c,h)ACR	279	41.05	279 → 279 (15)	279 → 278 (25)	5

	Dibenz[a,c]acridine	DB(a,c)ACR	279	42.05	279 → 279 (15)	279 → 278 (25)	5
	Dibenz[a,h]acridine	DB(a,h)ACR	279	42.20	279 → 279 (15)	279 → 278 (25)	5
	Dibenz[a,j]acridine	DB(a,j)ACR	279	42.40	279 → 279 (15)	279 → 278 (25)	5
	Dibenzo[c,g]carbazole	DB(c,g)CAR	267	46.15	267 → 265 (30)	267 → 267 (15)	5
PASHs n = 6	Benzo[b]thiophene	B(b)T	134	7.25	134 → 134 (10)	134 → 139 (30)	10
	Benzothiazole	BTH	135	7.85	135 → 135 (10)	135 → 108 (25)	2
	Dibenzothiophene	DBT	184	16.55	184 → 184 (15)	184 → 152 (25)	1
	Benzonaphtho(2,1-d)thiophene	BN(2,1)T	234	28.85	234 → 234 (15)	234 → 189 (40)	2
	Benzonaphtho(1,2-d)thiophene	BN(1,2)T	234	29.35	234 → 234 (15)	234 → 233 (25)	2
	Benzonaphtho(2,3-d)thiophene	BN(2,3)T	234	29.75	234 → 234 (15)	234 → 189 (40)	2
ISTDs n=7	Naphthalene-D8	NAP-D8	136	7.00	136 → 136 (10)	136 → 108 (20)	
	1-Nitronaphthalene-D7	1-NNAP-D7	180	13.95	180 → 122 (20)	134 → 82 (25)	
	Phenanthrene-D10	PHE-D10	188	17.00	188 → 188 (15)	188 → 158 (35)	
	Acridine-D9	ACR-D9	188	17.85	188 → 188 (15)	188 → 186 (20)	
	9,10-Anthraquinone-D8	ANTQ-D8	216	21.65	188 → 160 (20)	188 → 188 (15)	
	Pyrene-D10	PYR-D10	212	24.05	212 → 212 (15)	212 → 208 (25)	
	Chrysene-D12	CHR-D12	240	30.30	240 → 240 (15)	240 → 236 (35)	

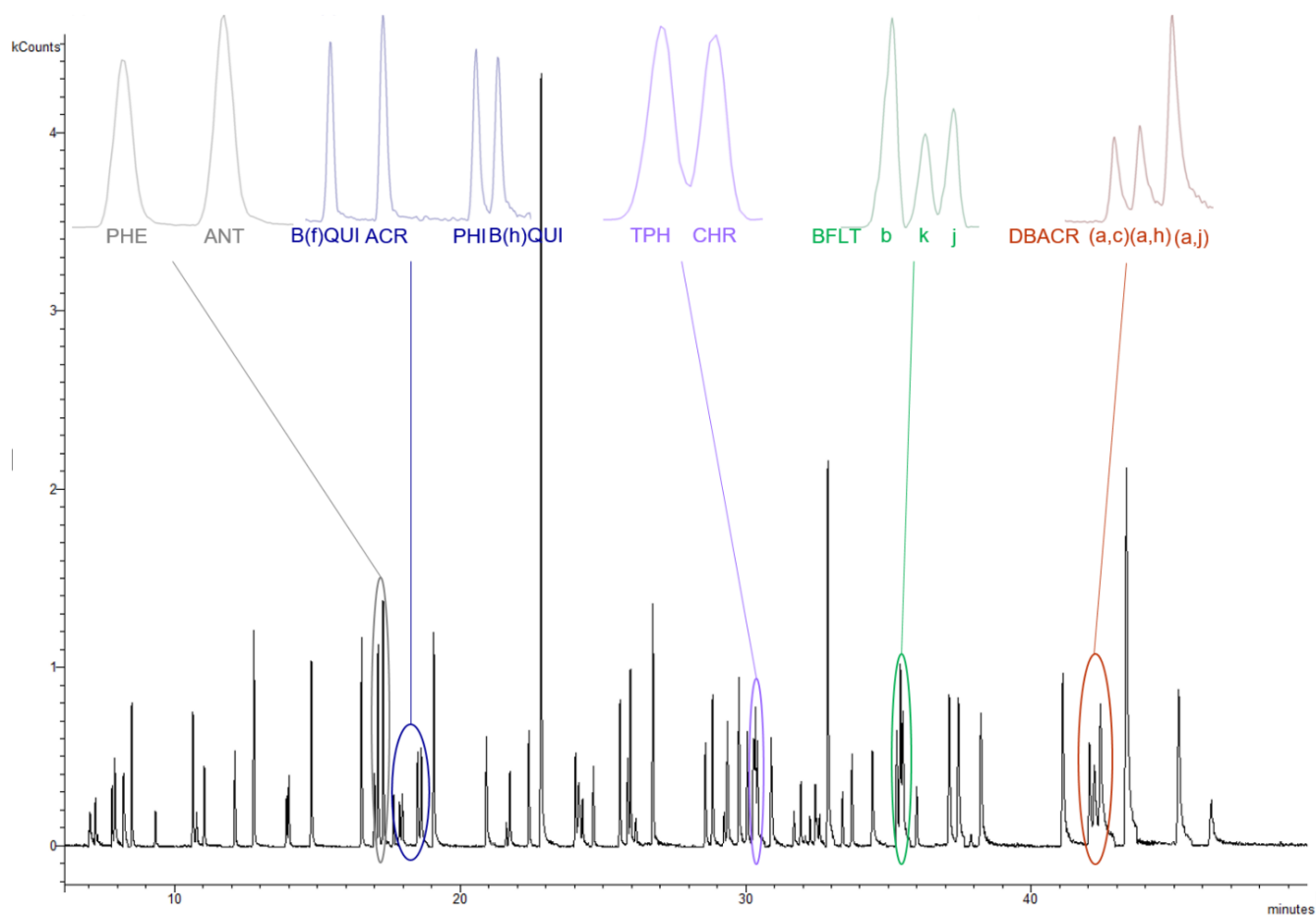
#### 4.3.2. GC separation method

A good separation of PACs was successfully achieved thanks to the Rxi-PAH stationary phase. This stationary phase was specially designed to resolve groups of isobaric PACs which are not separated on the more usual 5% phenyl and 50% phenyl stationary phases<sup>15</sup>. The low film thickness of this column also enabled a lower retention of the high molecular weight (HMW) PACs and a lower peak width. A Total Ion Chromatogram of a standard solution gathering the 79 PACs and 7 deuterated analogs is shown in Figure 4.1. All PACs of interest are eluted between 7.05 minutes (NAP) and 46.15 minutes (DB(c,g)CAR) (see Table 4.1).

A satisfying resolution was particularly obtained for critical pairs of PAH isomers such as phenanthrene and anthracene ( $R = 2.79$ ), triphenylene and chrysene ( $R = 1.13$ ), and benzofluoranthene isomers b, j and k ( $R_{b/k} = 1.27$  and  $R_{k/j} = 1.16$ ) (see Figure 4.1). According to the literature, these isomers are usually difficult to resolve on other stationary phases<sup>15,46-48</sup>. Similar results were obtained for critical azaarenes isomers: phenanthridine and benzo(f)quinoline ( $R = 1.84$ ), and dibenzacridines isomers (a,c), (a,h) and (a,j) ( $R_{(a,c)/(a,h)} = 1.11$  and  $R_{(a,h)/(a,j)} = 1.35$ ) (see Figure 4.1).

For the particular case of benzofluoranthene and benzopyrene isomers, a good improvement of separation was obtained thanks to the addition of an isothermal step at 300°C from 34 to 39 minutes. Additionally, an improvement of sensitivity for the heaviest compounds (M

> 216 Da) was obtained when a pressure pulse was added at the injection (pressure of 50 psi, i.e. He flow rate 4.0 mL/min, during 1 minute). A similar improvement was previously described by Cochran et al. <sup>49</sup>.

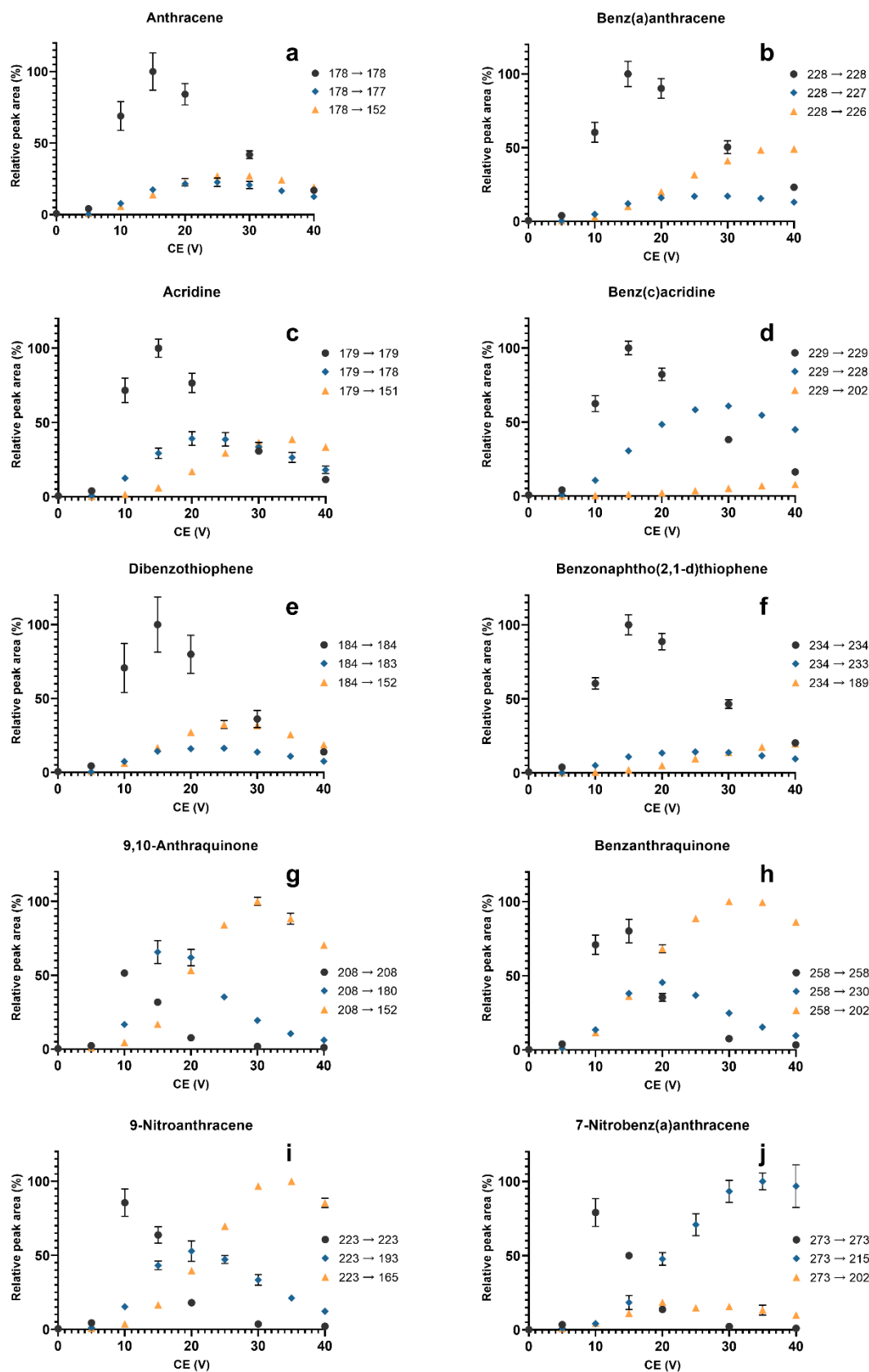


**Figure 4.1 : Total Ion Chromatogram of the 79 targeted Polycyclic Aromatic Compounds and 7 internal standards of this study (tR from 6 to 50 minutes), with a focus on the most critical pairs of isomers.**

#### 4.3.3. MS Detection: MRM and pseudo-MRM

The MS/MS detection of the PACs was also optimized. The major finding of this development was the high improvement of sensitivity for PAHs, AZAs and PASHs when pseudo-MRM mode was used instead of MRM, i.e. MS/MS transitions with no mass loss were monitored <sup>33</sup>.

This is shown in Figure 4.2 with two examples per PAC group. In this figure are reported the peak areas measured for two classic MRM transitions and the pseudo-MRM transition, at various collision energies.



**Figure 4.2 :** For ten different PACs (2 PAHs, 2 AZAs, 2 PASHs, 2 OPAHs and 2 NPAHs), peak areas of the three main MS/MS transitions relative to the highest peak area obtained for a given compound, depending on the collision energy applied.

The dark grey circles correspond to the pseudo-MRM transition, the blue diamonds to the MRM transition with the smaller mass loss, the orange triangles to the MRM transition with the higher mass loss. The error bars express standard deviations on triplicate analyses.

Reproduced from Galmiche et al. <sup>33</sup>.

For BN(2,1)T for example, there was a five-fold signal increase when measuring the transition 234 → 234 instead of classic MRM transitions 234 → 189 and 234 → 233 (see Figure 4.2.f). When such transitions were used for quantification or confirmation of PACs, non-zero collision voltages were applied, so that the selectivity of MRM was preserved in pseudo-MRM<sup>33</sup>. The application of voltages from 10 to 20 volts also gave considerably higher signal intensities and S/N than voltages below 10 volts (see Figure 4.2.f).

On the other hand, pseudo-MRM was not favored for polar PACs such as OPAHs and NPAHs which possess labile chemical groups cleaved by collision-induced dissociation (CID): all OPAHs and NPAHs studied in this work exhibited a loss of signal intensity when pseudo-MRM was used instead of MRM (see Figure 4.2, g to j).

#### 4.3.4. Pressurized Liquid Extraction (PLE)

The selected extraction method of this work was PLE, due to its known benefits for PACs determination in atmospheric particulates samples<sup>14</sup>.

The main parameter optimized here was the nature of the solvent. Indeed, eight solvents were compared in terms of extraction efficiency: acetonitrile (ACN), dichloromethane (DCM), toluene (TOL), ethyl acetate (EtOAc), and the following solvent mixtures in 1:1, v/v proportions : TOL / ACN, TOL / DCM, n-hexane (n-HEX) / DCM and n-HEX / acetone (ACO). These were selected according to the most common solvents presented in the literature for such applications<sup>14</sup>.

Pre-washed GFFs which had been previously used for PM sampling, and therefore still presented particulates sorbed onto them, were spiked with levels of PACs varying from 0.4 to 10 µg depending on the compounds' sensitivity. For this optimization, 15 PACs were selected to cover the broadest possible range of volatility and polarity: 4 PAHs (FLU, PYR, 1-MPYR, B(ghi)PER), 3 OPAHs (PNO, ANTQ, B(b)FLUO), 3 NPAHs (1-NNAP, 1-NPYR, 7-NBANT), 3 AZAs (QUI, PHI, DB(a,c)ACR) and 2 PASHs (DBT, BN(1,2)T). The measured extraction yields relative to the highest extraction yield obtained for each compound are described in Figure 4.3. These data enabled us to identify the most efficient solvent for each compound.

For all PACs, EtOAc and n-HEX / DCM were generally among the solvents giving the lowest yields. Therefore, the possibility of using them as extraction solvents was quickly ruled out.

For PAHs, DCM and TOL / ACN were the most powerful solvents for all compounds, followed by TOL / DCM, ACN and TOL (see Figure 4.3.a).

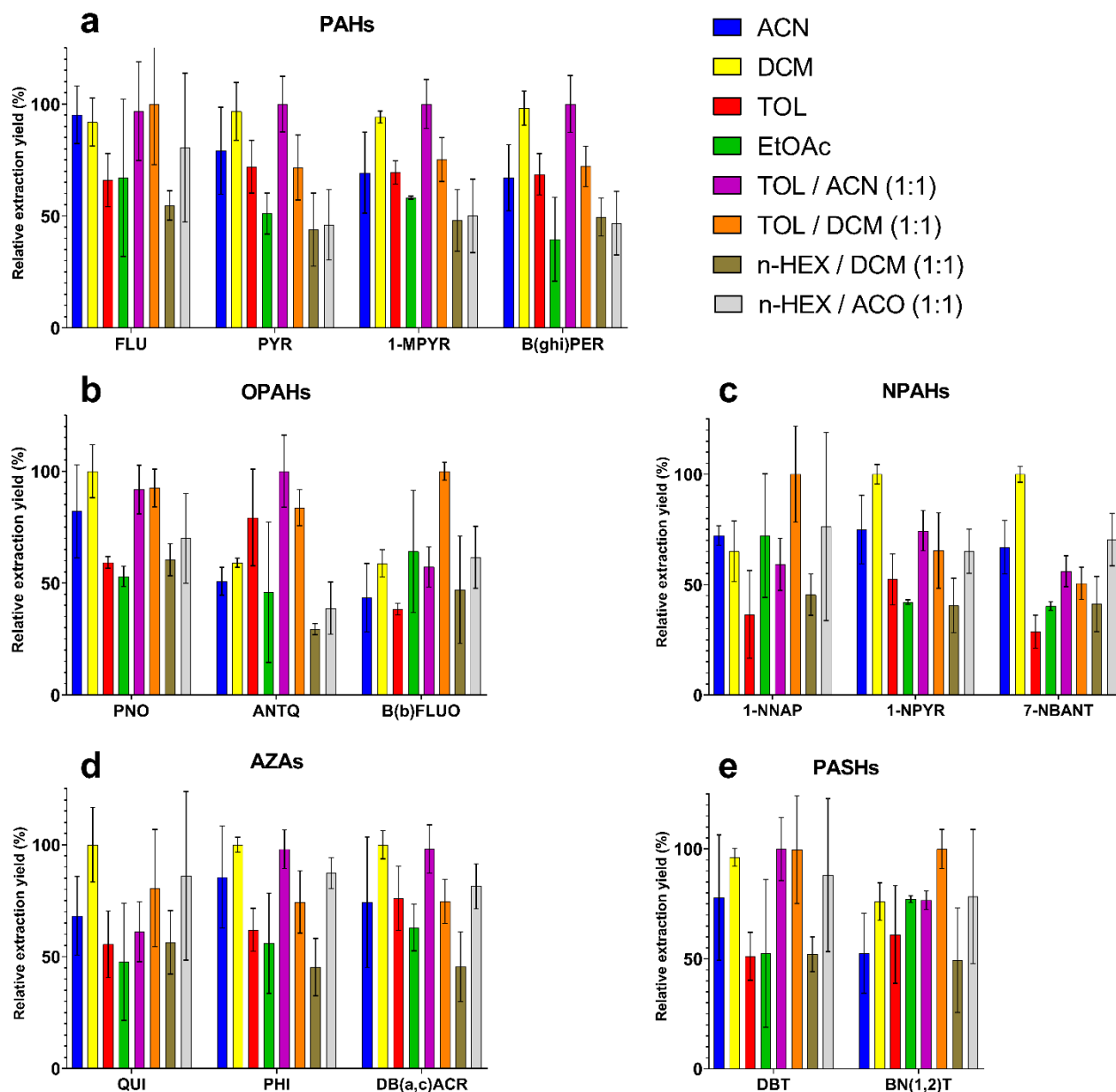
Yields obtained with TOL / DCM were high for all three OPAHs presented in Figure 4.3.b. TOL / ACN was very efficient for PNO and ANTQ but less for B(b)FLUO. ACN and DCM were efficient only for PNO, and TOL only for ANTQ (see Figure 4.3.b).

Results were more ambivalent for NPAHs. Depending on the compound studied, ACN, DCM, TOL / ACN, TOL / DCM and n-HEX / ACO could be considered as relatively efficient

solvents. DCM was particularly more powerful than the other solvents for 1-NPYR and 7-NBANT (see Figure 4.3.c).

DCM was the most efficient solvent for all AZAs presented in Figure 4.3.d. TOL / ACN and n-HEX / ACO also gave satisfying results for these compounds.

For the two PASHs presented in Figure 4.3.e, TOL / DCM, TOL / ACN and DCM were the most efficient extraction solvents.

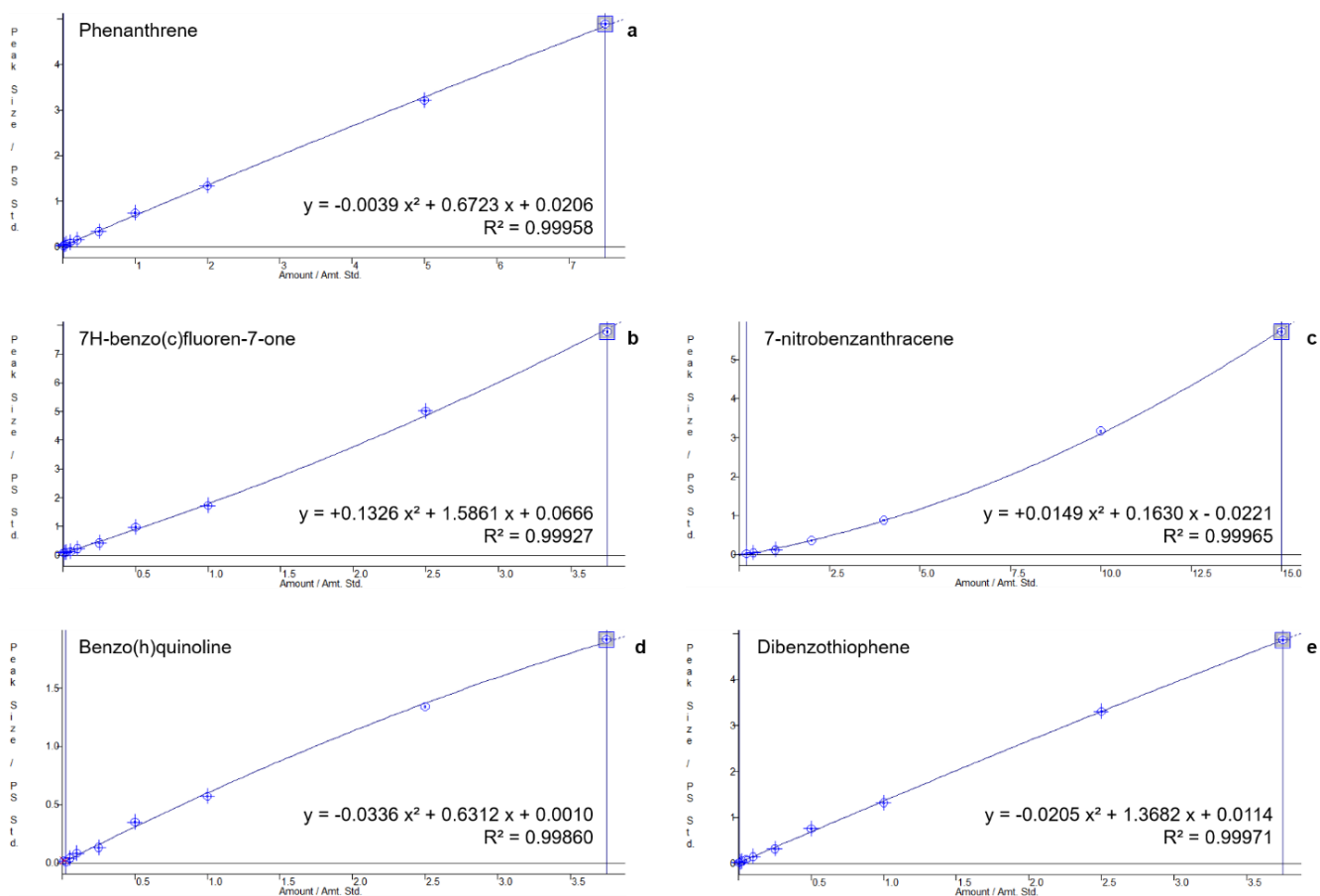


**Figure 4.3 : Pressurized Liquid Extraction yields with eight different solvent or solvent mixtures, for 15 PACs (4 PAHs, 3 OPAHs, 3 NPAHs, 3 AZAs and 2 PASHs), relative to the highest yield obtained for each compound.**

*The error bars express standard deviations on triplicate analyses.*

Considering all those results and the existing differences between each category of PACs and even between different compounds inside their category, a broad selection was first made including DCM, TOL / ACN and TOL / DCM.

Finally, due to the little average deviation between the efficiency of these solvents, we chose to avoid using dichloromethane according to the 2<sup>nd</sup> principle of Green Sample Preparation: “use safer solvents and reagents”<sup>50</sup>. The choice of the toluene / acetonitrile mixture (1:1, v/v) gave very satisfying extraction yields and also enabled us to perform the simultaneous extraction of other organic compounds. To the best of our knowledge, this is the first time that the application of such a solvent is presented for PACs extraction.



**Figure 4.4 : Examples of calibration curves obtained by internal standardization for one PAC per group: a) phenanthrene (PAH), b) 7H-benzo(c)fluoren-7-one (OPAH), c) 7-nitrobenzanthracene (NPAH), d) benzo(h)quinoline (AZA), e) dibenzothiophene (PASH)**

#### 4.3.5. Method validation

Examples of calibration curves for one compound per PAC group are shown in Figure 4.4. All compounds could be validated in terms of linearity of the calibration by internal standardization, with six to ten calibration points depending on the analyte's response. In Table 4.II are reported method validation data for each compound: R<sup>2</sup> values (calibration curves were all obtained with R<sup>2</sup> > 0.99), dynamic calibration ranges, accuracy of the method at a low-range and a high-range

level, as well as intra-day and inter-day precision of the method at a low-range and a high-range level.

Instrumental LOQ (iLOQ) were estimated according to the criteria described in the “QA / QC” section (4.2.5). The values expressed as an injected mass (in pg) are presented in Table 4.I. The corresponding concentration (in  $\mu\text{g/L}$ ) is reported in Table 4.II. iLOQ ranged from 1 pg for CAR and DBT to 2 ng for 6-NBPYR (see Table 4.I). Generally, iLOQ were higher for NPAHs due to the lesser efficiency of EI for these compounds compared to other groups of PACs.

Method recoveries are presented for 15 compounds in Figure 4.5. These are the same compounds which were already studied for the optimization of the extraction method. Method recoveries for these compounds ranged from  $96 \pm 26\%$  for 1-NNAP to  $185 \pm 68\%$  for DB(a,c)ACR. As all mean recoveries of spikes on GFFs were higher than 96 %, no recovery action was specified.

A further and decisive method validation was obtained thanks to the analysis of the Standard Reference Material 2975.

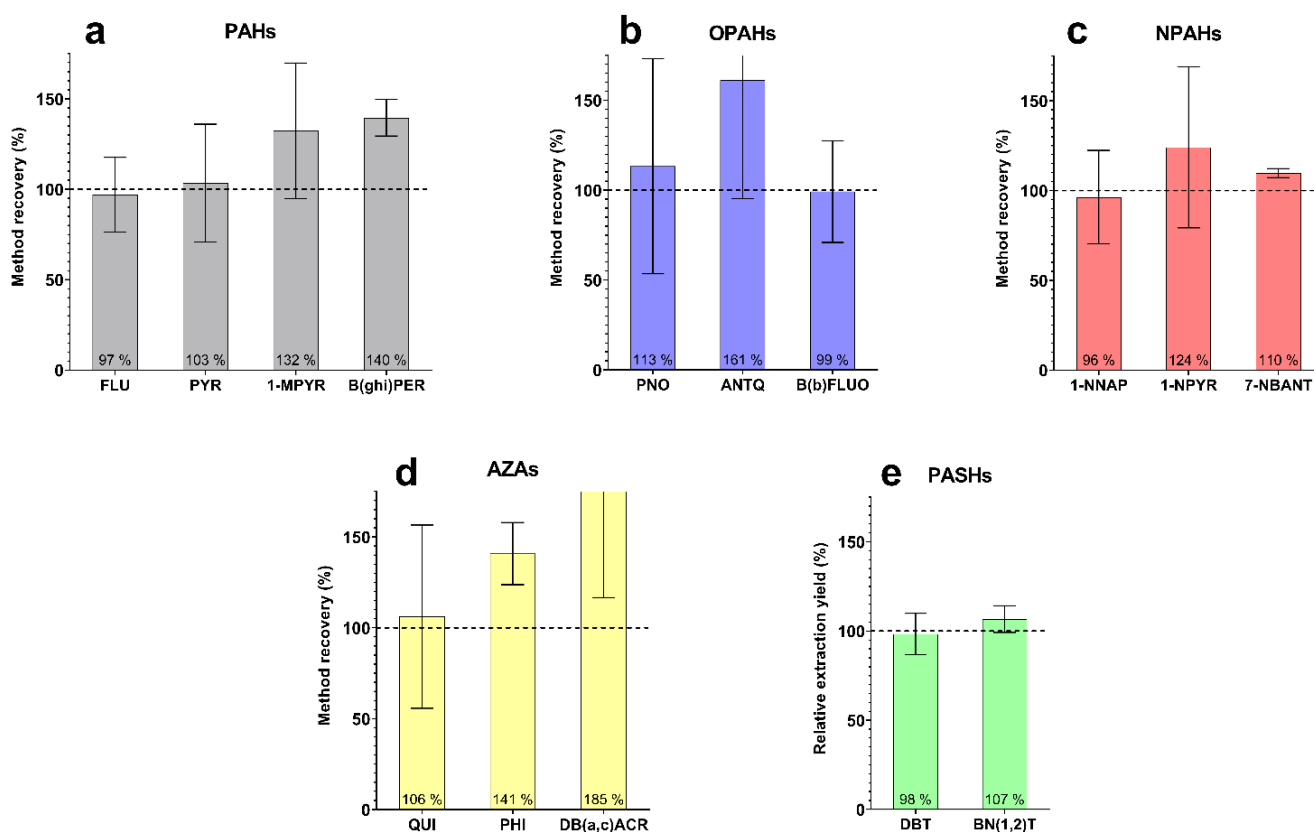


Figure 4.5 : Method recoveries measured for: a) PAHs, b) OPAHs, c) NPAHs, d) AZAs, e) PASHs



**Table 4.II : Method validation data for the 79 PACs of interest of this study: optimal internal standard (ISTD), instrumental limit of quantification (LOQ), calibration range ( $\mu\text{g/L}$ ), calibration regression coefficient ( $R^2$ ), quantification accuracy (%) at a low-range and a high-range level, intra-day and inter-day quantification precision (%) at a low-range and a high-range level**

Group	Compound Name	Abbrev.	ISTD	iLOQ ( $\mu\text{g/L}$ )	Highest cal. level ( $\mu\text{g/L}$ )	$R^2$	Accuracy (%)		Intra-day precision ( $\pm$ %)		Inter-day precision ( $\pm$ %)	
							Low	High	Low	High	Low	High
PAHs n=25	Naphthalene	NAP	PHE-D10	2.5	750	0.99917	109.9 %	104.5 %	32.5 %	7.5 %	11.1 %	19.6 %
	Acenaphthylene	ACY	PHE-D10	2.5	750	0.99973	99.1 %	103.2 %	16.9 %	6.9 %	16.4 %	9.9 %
	Acenaphthene	ACE	PHE-D10	1	750	0.99976	98.2 %	112.4 %	9.6 %	7.8 %	17.3 %	12.2 %
	Fluorene	FLU	PHE-D10	1	750	0.99975	109.7 %	102.0 %	15.2 %	9.0 %	14.1 %	6.5 %
	Phenanthrene	PHE	PHE-D10	1	750	0.99958	104.3 %	100.1 %	5.3 %	8.0 %	9.7 %	6.7 %
	Anthracene	ANT	PHE-D10	1	750	0.99934	84.3 %	101.1 %	15.1 %	12.3 %	17.1 %	12.6 %
	Fluoranthene	FLT	PYR-D10	1	750	0.99953	89.1 %	96.6 %	21.6 %	11.9 %	15.0 %	19.1 %
	Pyrene	PYR	PYR-D10	1	750	0.99922	111.1 %	98.2 %	3.4 %	11.5 %	39.4 %	12.3 %
	Retene	RET	PYR-D10	2.5	750	0.99927	97.9 %	91.0 %	18.2 %	6.2 %	15.0 %	18.2 %
	11H-Benzo[b]fluorene	B(b)FLU	PYR-D10	2.5	750	0.99907	104.8 %	98.7 %	12.5 %	14.6 %	36.8 %	11.6 %
	11H-Benzo[a]fluorene	B(a)FLU	PYR-D10	2.5	750	0.99901	108.9 %	90.5 %	16.8 %	16.4 %	36.5 %	18.7 %
	7H-Benzo[c]fluorene	B(c)FLU	PYR-D10	2.5	750	0.99956	99.5 %	94.2 %	14.6 %	18.8 %	19.5 %	19.3 %
	1-Methylpyrene	1-MPYR	PYR-D10	2.5	750	0.99907	91.8 %	101.8 %	16.1 %	17.1 %	28.1 %	10.7 %
	Benz[a]anthracene	B(a)ANT	PYR-D10	2.5	750	0.99985	125.5 %	103.2 %	29.1 %	9.9 %	31.7 %	14.6 %
	Triphenylene	TPH	PYR-D10	2.5	750	0.99879	123.1 %	96.1 %	33.1 %	7.4 %	18.0 %	13.5 %
	Chrysene	CHR	PYR-D10	2.5	750	0.99425	129.8 %	100.3 %	11.6 %	4.2 %	33.5 %	12.6 %
	5-Methylchrysene	5-MCHR	PYR-D10	2.5	1500	0.99987	108.8 %	99.0 %	27.6 %	15.3 %	20.8 %	13.5 %
Benzo[b]fluoranthene	B(b)FLT	PYR-D10	1.25	375	0.99879	125.4 %	97.2 %	23.5 %	8.0 %	7.2 %	19.8 %	

	Benzo[k]fluoranthene	B(k)FLT	PYR-D10	1.25	375	0.99691	119.7 %	96.7 %	12.6 %	11.5 %	14.0 %	16.5 %
	Benzo[j]fluoranthene	B(j)FLT	PYR-D10	1.25	375	0.99987	136.0 %	100.4 %	22.2 %	9.2 %	20.8 %	16.6 %
	Benzo[e]pyrene	B(e)PYR	PYR-D10	1.25	375	0.99469	134.8 %	96.2 %	38.9 %	11.1 %	20.6 %	18.8 %
	Benzo[a]pyrene	B(a)PYR	PYR-D10	1.25	750	0.99833	154.1 %	100.8 %	6.6 %	11.3 %	18.0 %	13.9 %
	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	I(cd)PYR	PYR-D10	5	1500	0.99882	78.7 %	113.4 %	18.7 %	11.3 %	44.1 %	13.3 %
	Dibenz[a,h]anthracene	DB(a,h)ANT	PYR-D10	10	1500	0.99933	71.4 %	101.3 %	24.6 %	10.0 %	37.7 %	14.7 %
	Benzo[ghi]perylene	B(ghi)PER	PYR-D10	10	1500	0.99969	102.9 %	104.3 %	16.4 %	7.0 %	12.3 %	13.1 %
OPAHs n=17	1,2-Naphthoquinone	1,2-NAPQ	ANTQ-D8	100	3750	0.99709		103.0 %		30.4 %		31.0 %
	1-Indanone	INDO	ANTQ-D8	2	1500	0.99830	126.9 %	126.6 %	23.7 %	29.9 %	20.6 %	12.5 %
	Phthalic Anhydride	PHTLA	PHE-D10	1	750	0.99920	112.4 %	110.1 %	32.1 %	3.9 %	38.4 %	13.8 %
	1,4-Naphthoquinone	1,4-NAPQ	ANTQ-D8	20	1500	0.99978	153.5 %	115.8 %	13.8 %	24.8 %	13.7 %	12.3 %
	1-Naphthaldehyde	NAPL	PHE-D10	1	750	0.99840	98.7 %	106.8 %	13.9 %	11.2 %	19.0 %	10.1 %
	Xanthone	XTO	PHE-D10	1	750	0.99984	107.0 %	103.3 %	14.1 %	14.3 %	23.7 %	18.9 %
	Phenalenone	PNO	PYR-D10	5	1500	0.99967	68.8 %	85.7 %	16.5 %	28.5 %	43.0 %	16.0 %
	9,10-Anthraquinone	ANTQ	ANTQ-D8	5	1500	0.99919	75.4 %	108.4 %	16.4 %	7.3 %	16.4 %	21.8 %
	2-Methyl-9,10-Anthraquinone	2-MANTQ	ANTQ-D8	5	3750	0.99993	69.6 %	114.0 %	23.7 %	12.6 %	23.6 %	7.9 %
	1,8-Naphthalic anhydride	NAPA	PYR-D10	2.5	1500	0.99837	131.9 %	98.1 %	13.7 %	6.3 %	27.4 %	18.2 %
	11H-Benzo[a]fluoren-11-one	B(a)FLUO	ANTQ-D8	1	750	0.99972	79.4 %	102.7 %	31.9 %	10.4 %	18.5 %	12.0 %
	7H-Benzo[c]fluoren-7-one	B(c)FLUO	ANTQ-D8	1	750	0.99927	90.3 %	113.7 %	42.3 %	12.1 %	35.5 %	19.9 %
	11H-Benzo[b]fluoren-11-one	B(b)FLUO	ANTQ-D8	1	750	0.99963	78.0 %	108.7 %	36.1 %	20.9 %	25.3 %	15.2 %
	Benzanthrone	BANTO	ANTQ-D8	2.5	1500	0.99976	104.3 %	106.1 %	16.4 %	6.2 %	38.0 %	7.0 %
	1,2-	BANTQ	PYR-D10	10	3750	0.99956	101.9 %	115.1 %	12.0 %	10.0 %	31.5 %	20.9 %

	Benzanthraquinone											
	5,12-Naphthacene quinone	NACEQ	ANTQ-D8	5	1500	0.99910	118.8 %	106.9 %	10.3 %	7.6 %	33.0 %	11.2 %
	6H-Benzo[cd]pyrene- 6-one	B(cd)PYRO	PYR-D10	10	3750	0.99996	117.9 %	108.4 %	5.7 %	12.5 %	48.6 %	24.2 %
NPAHs n=14	1-Nitronaphthalene	1-NNAP	1-NNAP-D7	5	3750	0.99959	110.9 %	110.7 %	8.8 %	6.9 %	20.1 %	11.9 %
	2-Nitronaphthalene	2-NNAP	1-NNAP-D7	5	3750	0.99971	89.1 %	107.8 %	25.1 %	9.0 %	18.0 %	7.2 %
	5-Nitroacenaphthene	5-NACE	PYR-D10	12.5	3750	0.99983	99.0 %	100.4 %	30.4 %	15.5 %	15.0 %	18.5 %
	2-Nitrofluorene	2-NFLU	PYR-D10	50	3750	0.99974	107.7 %	89.4 %	26.8 %	10.0 %	26.5 %	22.3 %
	9-Nitroanthracene	9-NANT	PYR-D10	5	3750	0.99983	110.5 %	100.1 %	33.9 %	14.7 %	50.2 %	15.4 %
	9-Nitrophenanthrene	9-NPHE	PYR-D10	12.5	3750	0.99987	142.5 %	107.8 %	27.5 %	19.0 %	24.1 %	15.0 %
	2-Nitrofluoranthene	2-NFLT	1-NNAP-D7	50	7500	0.99513	108.5 %	95.6 %	24.0 %	14.9 %	20.1 %	8.9 %
	3-Nitrofluoranthene	3-NFLT	1-NNAP-D7	100	7500	0.99769	139.0 %	101.0 %	8.7 %	14.1 %	23.2 %	14.3 %
	4-Nitropyrene	4-NPYR	PYR-D10	50	3750	0.99971	147.7 %	92.2 %	20.0 %	7.3 %	30.4 %	12.3 %
	1-Nitropyrene	1-NPYR	PYR-D10	100	7500	0.99983	77.4 %	86.2 %	43.2 %	15.1 %	23.6 %	20.7 %
	2-Nitropyrene	2-NPYR	PYR-D10	100	3750	0.99987	123.4 %	107.1 %	10.4 %	19.3 %	55.8 %	19.3 %
	7-nitrobenzanthracene	7-NBANT	1-NNAP-D7	100	7500	0.99963	168.1 %	108.8 %	11.7 %	12.9 %	57.5 %	13.7 %
	6-Nitrochrysene	6-NCHR	1-NNAP-D7	500	7500	0.99993		100.4 %		11.2 %		18.0 %
	6-Nitrobenzo[a]pyrene	6-NBPYR	1-NNAP-D7	1000	7500	0.99800		101.2 %		13.7 %		24.5 %
AZAs n=17	Quinoline	QUI	PHE-D10	2.5	750	0.99847	91.0 %	107.0 %	2.8 %	7.7 %	20.9 %	9.5 %
	Isoquinoline	isoQUI	PHE-D10	2.5	750	0.99960	103.0 %	89.3 %	13.2 %	8.7 %	10.4 %	10.0 %
	Benzo[h]quinoline	B(h)QUI	ACR-D9	2.5	375	0.99860	107.1 %	98.5 %	7.5 %	11.1 %	11.0 %	4.1 %
	Acridine	ACR	ACR-D9	1.25	375	0.99600	134.6 %	97.5 %	12.0 %	15.1 %	15.9 %	12.8 %
	Phenanthridine	PHI	ACR-D9	2.5	375	0.99919	102.7 %	101.2 %	9.1 %	9.4 %	20.9 %	7.4 %
	Benzo[f]quinoline	B(f)QUI	ACR-D9	1.25	375	0.99941	103.6 %	94.1 %	13.3 %	9.9 %	20.8 %	14.4 %
	Carbazole	CAR	ACR-D9	0.5	375	0.99605	138.8 %	94.0 %	28.6 %	14.7 %	19.0 %	8.4 %

	Benz[c]acridine	B(c)ACR	PYR-D10	1.25	375	0.99893	127.2 %	99.1 %	20.9 %	10.0 %	24.6 %	13.9 %
	Benz[a]acridine	B(a)ACR	PYR-D10	1.25	750	0.99847	125.6 %	108.2 %	17.2 %	15.4 %	23.7 %	21.2 %
	Benzo[a]carbazole	B(a)CAR	PYR-D10	2.5	750	0.99941	96.5 %	90.4 %	14.8 %	19.4 %	29.8 %	16.6 %
	Benzo[b]carbazole	B(b)CAR	ACR-D9	2.5	750	0.99772	76.5 %	110.0 %	58.2 %	9.2 %	16.1 %	8.6 %
	Benzo[c]carbazole	B(c)CAR	ACR-D9	2.5	750	0.99865	130.1 %	100.7 %	33.5 %	12.0 %	33.1 %	15.9 %
	Dibenz[c,h]acridine	DB(c,h)ACR	PYR-D10	2.5	750	0.99971	101.8 %	100.5 %	3.0 %	12.1 %	16.5 %	8.2 %
	Dibenz[a,c]acridine	DB(a,c)ACR	PYR-D10	2.5	750	0.99497	68.5 %	112.5 %	20.1 %	10.3 %	24.1 %	10.6 %
	Dibenz[a,h]acridine	DB(a,h)ACR	PYR-D10	2.5	750	0.99838	129.4 %	75.6 %	32.4 %	5.9 %	34.9 %	21.8 %
	Dibenz[a,j]acridine	DB(a,j)ACR	PYR-D10	2.5	750	0.99885	95.1 %	107.0 %	12.3 %	14.9 %	12.0 %	9.5 %
	Dibenzo[c,g]carbazole	DB(c,g)CAR	PYR-D10	2.5	750	0.99686	133.3 %	97.3 %	3.3 %	6.8 %	41.6 %	18.9 %
PASHs n=6	Benzo[b]thiophene	B(b)T	PHE-D10	5	750	0.99617	140.1 %	91.5 %	35.4 %	10.9 %	12.7 %	17.5 %
	Benzothiazole	BTH	PHE-D10	1	750	0.99855	131.2 %	95.5 %	16.6 %	8.4 %	12.8 %	12.9 %
	Dibenzothiophene	DBT	PHE-D10	0.5	375	0.99971	101.5 %	104.8 %	9.1 %	9.4 %	14.1 %	6.7 %
	Benzonaphtho(2,1-d)thiophene	BN(2,1)T	PYR-D10	1	750	0.99980	141.1 %	96.4 %	5.5 %	4.7 %	18.3 %	6.5 %
	Benzonaphtho(1,2-d)thiophene	BN(1,2)T	PYR-D10	1	750	0.99872	115.9 %	87.2 %	4.6 %	6.8 %	21.5 %	26.1 %
	Benzonaphtho(2,3-d)thiophene	BN(2,3)T	PYR-D10	1	750	0.99952	99.2 %	95.8 %	16.3 %	11.8 %	16.4 %	15.6 %

#### 4.3.6. Analysis of a Standard Reference Material: SRM 2975

Up to eight different concentrations were measured for each compound in SRM 2975. The average and SD of these concentrations are presented in Table 4.III. A concentration was reported in Table 4.III when a compound showed at least four positive quantifications.

##### 4.3.6.a. Overall results

Finally, the determination of 57 PACs (out of 79) was obtained. Among them were 20 PAHs (out of 25), 15 OPAHs (out of 17), 4 NPAHs (out of 14), 13 AZAs (out of 17) and 5 PASHs (out of 6). The high amount of detected and quantified PACs in SRM 2975 highlights the relevance of this material for our method validation.

##### 4.3.6.b. Comparison with NIST Certificate of Analysis

Among the 57 quantified PACs, 22 had either a certified or a reference value reported by the NIST (18 PAHs + 4 NPAHs) (see Table 4.III)<sup>34</sup>. When considering their average  $\pm$  SD range, 16 of these 22 compounds were validated with a quantification consistent with the reference (see Table 4.III). This was a very satisfying result and enabled us to firmly validate the analytical method presented in this work.

On the other hand, 8 certified NPAHs could not be detected because of an insufficient LOQ.

Among the few values which were significantly different from their standard, it is worth noting that the concentration of FLT was in line with the work of Cochran et al.<sup>49</sup> and the concentration of 7-NBANT was in accordance with the one reported by Bamford et al.<sup>51</sup>, even though the extraction method used in these studies were different from ours<sup>49,51</sup>. The amount of DB(a,h)ANT had the highest deviation with the standard value (around + 200 %), which could possibly be explained by interfering isomers not targeted in this work, and by the potential contribution of co-eluted I(cd)PYR (MM = 276 Da) on the quantification transition of DB(a,h)ANT (m/z 278  $\rightarrow$  278). However, this “outlier” concentration of DB(a,h)ANT was still consistent with the value reported by Cochran and Kubátová<sup>52</sup>.

##### 4.3.6.c. Uncertified compounds

35 of the 57 PACs quantified in this analysis of SRM 2975 had no certified or reference value<sup>34</sup>. They mostly belonged to the categories of oxygenated PAHs, azaarenes and thiaarenes, except the two methylated PAHs of interest in this study. Among these, 23 compounds were even quantified for the first time ever in SRM 2975. A comparison of the concentrations measured in this study for uncertified PACs with those of previous works from the literature is presented in Table 4.IV.

Notably, all 13 azaarenes measured in this work were never reported before. This result highlights the importance of performing multi-class analysis of PACs including the broadest possible range of PACs. Even though the individual concentrations of AZAs measured here do not exceed 1.3 µg/g, the estimated total concentration of azaarenes in SRM 2975 would be around 10 µg/g. Thus, azaarenes seem to be relevant compounds to study if one wants to address the topic of combustion-related particles.

Similarly, most targeted PASHs were detected and quantified in SRM 2975, with the highest individual concentration for BTH (2.1 µg/g) and a sum of all PASHs concentrations around 3.3 µg/g. The amount of DBT measured in this work is slightly lower than the value of Schantz et al.<sup>53</sup>, while the reported amount of BN(1,2)T is perfectly in line with the results of Christensen et al.<sup>54</sup> (see Table 4.IV).

More occurrence data were available for OPAHs in SRM 2975. However, the discrepancies between the results of various studies made it difficult to conclude on the agreement with our results<sup>42,49,52,55</sup>. For instance, the concentration of ANTQ was about the same as the one reported by Nocun and Schantz<sup>42</sup>, about three times the values of Cochran et al. and Cochran and Kubátová<sup>49,52</sup>, and inferior to the value of Ahmed et al.<sup>55</sup>. The same tendency was also observed for BANTO and BANTQ (see Table 4.IV).

A major finding of this work is the very high total concentration and detection frequency of OPAHs in SRM 2975. 15 OPAHs out of 17 could be quantified, for a total concentration of 200 µg/g, largely exceeding the total concentration of the 20 PAHs which would be around 65 µg/g. In particular, PHTLA (32 µg/g) and NAPA (> 50 µg/g) were two of the three most concentrated PACs in SRM 2975, the third one being the well-known 1-NPYR (38.2 µg/g) (see Table 4.III). These compounds can be classified as highly oxygenated organic molecules (HOM) and were reported as typical of photochemical aging of soot<sup>56</sup>. Therefore, our observation is plausible. However, it would be interesting to explore the formation of these compounds in the course of diesel PM generation and analysis: Do they occur immediately when the particles are released? During the sampling? In the course of the storage period of the material? During the sample preparation? More studies would be necessary to further study this question.

**Table 4.III : Quantification of PACs in SRM 2975 (Diesel Particulate Matter), in  $\mu\text{g/g}$ , with the certified and reference values from the NIST <sup>34</sup>.**

Compound Name	Abbrev.	Concentration (this study, $\mu\text{g/g}$ )	NIST Certified value ( $\mu\text{g/g}$ )	100°C	200°C
				NIST Reference value ( $\mu\text{g/g}$ )	
Naphthalene	NAP	<b>3.59 ± 1.15</b>		1.78 ± 0.48	4.00 ± 0.13
Acenaphthene	ACE	<b>0.19 ± 0.05</b>		0.548 ± 0.029 <sup>b</sup>	
Fluorene	FLU	<b>0.39 ± 0.14</b>		0.440 ± 0.071	2.88 ± 0.19
Phenanthrene	PHE	<b>10.6 ± 1.5</b>		17.3 ± 1.0	20.7 ± 0.3
Anthracene	ANT	<b>0.14 ± 0.07</b>		0.039 ± 0.003	0.049 ± 0.002
Fluoranthene	FLT	<b>15.5 ± 3.6</b>		26.9 ± 1.1	30.9 ± 0.5
Pyrene	PYR	<b>1.03 ± 0.06</b>		0.94 ± 0.11	1.52 ± 0.20
1-Methylpyrene	1-MPYR	<b>0.12 ± 0.05</b>			
Benz[a]anthracene	B(a)ANT	<b>1.10 ± 0.37</b>		0.330 ± 0.037	0.966 ± 0.043
Triphenylene	TPH	<b>4.77 ± 0.27</b>	5.32 ± 0.24		
Chrysene	CHR	<b>4.56 ± 1.54</b>		4.58 ± 0.17	5.73 ± 0.11
5-Methylchrysene	5-MCHR	<b>0.68 ± 0.33</b>			
Benzo[b]fluoranthene	B(b)FLT	<b>&gt; 12<sup>a</sup></b>		11.5 ± 2.8 <sup>b</sup>	
Benzo[k]fluoranthene	B(k)FLT	<b>0.91 ± 0.54</b>		0.699 ± 0.058	1.75 ± 0.09
Benzo[j]fluoranthene	B(j)FLT	<b>1.02 ± 0.45</b>	0.819 ± 0.093		
Benzo[e]pyrene	B(e)PYR	<b>1.09 ± 0.49</b>		1.14 ± 0.06	2.28 ± 0.18
Benzo[a]pyrene	B(a)PYR	<b>1.41 ± 0.77</b>		0.053 ± 0.003	0.766 ± 0.039
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	I(cd)PYR	<b>1.12 ± 0.27</b>		1.37 ± 0.16	2.13 ± 0.12
Dibenz[a,h]anthracene	DB(a,h)ANT	<b>1.67 ± 0.56</b>	0.523 ± 0.047 <sup>*</sup>		
Benzo[ghi]perylene	B(ghi)PER	<b>1.58 ± 0.38</b>		0.489 ± 0.032	1.59 ± 0.09
1-Indanone	INDO	<b>0.30 ± 0.20</b>			
Phthalic Anhydride	PHTLA	<b>31.6 ± 7.7</b>			
1-Naphthaldehyde	NAPL	<b>1.05 ± 0.21</b>			
Xanthone	XTO	<b>0.31 ± 0.06</b>			
Phenalenone	PNO	<b>24.8 ± 4.5</b>			
9,10-Anthraquinone	ANTQ	<b>25.2 ± 3.8</b>			
2-Methyl-9,10-Anthraquinone	2-MANTQ	<b>3.41 ± 0.64</b>			
1,8-Naphthalic anhydride	NAPA	<b>&gt; 50<sup>a</sup></b>			
11H-Benzo[a]fluoren-11-one	B(a)FLUO	<b>6.24 ± 1.63</b>			
7H-Benzo[c]fluoren-7-one	B(c)FLUO	<b>5.17 ± 0.94</b>			
11H-Benzo[b]fluoren-11-one	B(b)FLUO	<b>4.94 ± 2.00</b>			
Benzanthrone	BANTO	<b>13.9 ± 5.5</b>			
1,2-Benzanthraquinone	BANTQ	<b>13.2 ± 5.9</b>			

5,12-Naphthacene quinone	NACEQ	<b>1.77 ± 0.59</b>		
6H-Benzo[cd]pyrene-6- one	B(cd)PYRO	<b>18.1 ± 7.6</b>		
9-Nitroanthracene	9-NANT	<b>4.01 ± 0.84</b>		3.07 ± 0.28    3.94 ± 0.19
3-Nitrofluoranthene	3-NFLT	<b>8.10 ± 1.38</b>	3.80 ± 0.24	
1-Nitropyrene	1-NPYR	<b>38.2 ± 8.0</b>	35.2 ± 2.2	
7-Nitrobenz[a]anthracene	7-NBANT	<b>4.96 ± 0.60</b>	3.57 ± 0.32	
Quinoline	QUI	<b>0.46 ± 0.13</b>		
Isoquinoline	isoQUI	<b>0.45 ± 0.09</b>		
Carbazole	CAR	<b>1.02 ± 0.43</b>		
Benz[c]acridine	B(c)ACR	<b>0.08 ± 0.05</b>		
Benz[a]acridine	B(a)ACR	<b>1.29 ± 0.53</b>		
Benzo[a]carbazole	B(a)CAR	<b>0.55 ± 0.18</b>		
Benzo[b]carbazole	B(b)CAR	<b>1.08 ± 0.84</b>		
Benzo[c]carbazole	B(c)CAR	<b>0.40 ± 0.09</b>		
Dibenz[c,h]acridine	DB(c,h)ACR	<b>0.95 ± 0.38</b>		
Dibenz[a,c]acridine	DB(a,c)ACR	<b>0.80 ± 0.37</b>		
Dibenz[a,h]acridine	DB(a,h)ACR	<b>0.76 ± 0.55</b>		
Dibenz[a,j]acridine	DB(a,j)ACR	<b>0.72 ± 0.46</b>		
Dibenzo[c,g]carbazole	DB(c,g)CAR	<b>1.12 ± 0.64</b>		
Benzothiazole	BTH	<b>2.07 ± 0.56</b>		
Dibenzothiophene	DBT	<b>0.57 ± 0.17</b>		
Benzonaphtho(2,1-d) thiophene	BN(2,1)T	<b>0.30 ± 0.09</b>		
Benzonaphtho(1,2-d) thiophene	BN(1,2)T	<b>0.15 ± 0.05</b>		
Benzonaphtho(2,3-d) thiophene	BN(2,3)T	<b>0.16 ± 0.04</b>		

<sup>a</sup> B(b)FLT and NAPA concentrations were reported as “ > X” because the measured concentrations exceeded the highest calibration level.

<sup>b</sup> for these compounds, the reference values were obtained from extraction temperatures between 100°C and 200°C.

<sup>c</sup> the certified concentration of dibenz(a,h)anthracene is given as a sum of dibenz(a,h + a,c)anthracene.



**Table 4.IV : Quantification of uncertified PACs in SRM 2975 (Diesel Particulate Matter) obtained in this work, together with values previously measured in other works (in µg/g).**

Compound	Concentration (this study)	XLB	17ms	Cochran et al. (46)	PLE, DCM	PLE, MeOH	Soxhlet, DCM	Soxhlet, MeOH	M13	M14	M15	M16	Soxhlet	UAE	E1	E3
		column	column		Nocun & Schantz (40)	DCM	MeOH	DCM	MeOH							
					Cochran & Kubátová (50)				Schantz et al. (51)				Christensen et al. (52)		Ahmed et al. (53)	
1-MPYR	<b>0.12 ± 0.05</b>												0.010 ± 0.005			
5-MCHR	<b>0.68 ± 0.33</b>															
INDO	<b>0.30 ± 0.20</b>															
PHTLA	<b>31.6 ± 7.7</b>															
NAPL	<b>1.05 ± 0.21</b>															
XTO	<b>0.31 ± 0.06</b>															
PNO	<b>24.8 ± 4.5</b>															
ANTQ	<b>25.2 ± 3.8</b>	17.55 ± 3.80	15.95 ± 2.73	8.71 ± 0.33	14.59 ± 1.35	8.00 ± 0.87	8.62 ± 0.74	9.21 ± 0.72							39.1 ± 0.3	36.7 ± 0.2
2-MANTQ	<b>3.41 ± 0.64</b>															
NAPA	<b>&gt; 50<sup>a</sup></b>															
B(a)FLUO	<b>6.24 ± 1.63</b>				5.03 ± 0.69	3.83 ± 0.68	5.54 ± 0.38	3.78 ± 0.50								
B(c)FLUO	<b>5.17 ± 0.94</b>				6.56 ± 0.54	5.15 ± 0.22	5.47 ± 0.35	4.94 ± 0.61								
B(b)FLUO	<b>4.94 ± 2.00</b>				6.94 ± 0.69	4.57 ± 0.21	4.49 ± 0.22	4.62 ± 0.22								
BANTO	<b>13.9 ± 5.5</b>	11.93 ± 2.69	16.28 ± 1.22		7.20 ± 0.75	7.11 ± 0.56	7.40 ± 0.21	7.13 ± 0.42							28.5 ± 0.4	22.2 ± 1.7
BANTQ	<b>13.2 ± 5.9</b>	18.80 ± 3.57	21.93 ± 1.96		5.09 ± 0.27	4.20 ± 0.55	5.13 ± 0.20	4.41 ± 0.30							41.4 ± 1.5	38.0 ± 1.9
NACEQ	<b>1.77 ± 0.59</b>	2.34 ± 0.56	2.54 ± 0.50													

B(cd)PYRO	<b>18.1 ± 7.6</b>	29.44 ± 4.15	39.33 ± 11.70				
QUI	<b>0.46 ± 0.13</b>						
isoQUI	<b>0.45 ± 0.09</b>						
CAR	<b>1.02 ± 0.43</b>						
B(c)ACR	<b>0.08 ± 0.05</b>						
B(a)ACR	<b>1.29 ± 0.53</b>						
B(a)CAR	<b>0.55 ± 0.18</b>						
B(b)CAR	<b>1.08 ± 0.84</b>						
B(c)CAR	<b>0.40 ± 0.09</b>						
DB(c,h)ACR	<b>0.95 ± 0.38</b>						
DB(a,c)ACR	<b>0.80 ± 0.37</b>						
DB(a,h)ACR	<b>0.76 ± 0.55</b>						
DB(a,j)ACR	<b>0.72 ± 0.46</b>						
DB(c,g)CAR	<b>1.12 ± 0.64</b>						
BTZ	<b>2.07 ± 0.56</b>						
DBT	<b>0.57 ± 0.17</b>			0.880 ± 0.100	0.980 ± 0.081	2.240 ± 0.160	2.100 ± 0.170
BN(2,1)T	<b>0.30 ± 0.09</b>						
BN(1,2)T	<b>0.15 ± 0.05</b>						0.12 ± 0.02
BN(2,3)T	<b>0.16 ± 0.04</b>						0.06 ± 0.04

#### 4.3.7. Environmental application: $PM_{10}$ samples from a parking lot

##### 4.3.7.a. General trends in PACs content of the $PM_{10}$ samples

To confirm the application of this analytical method on real-world samples,  $PM_{10}$  was collected in a residential parking lot from an urban area for one week during six consecutive weeks.

In these samples, 19 PAHs, 10 OPAHs, 5 AZAs, 4 PASHs and not any NPAHs were detected in at least one sample, i.e. 38 compounds out of 79 target analytes overall. 16 of them were even detected in all six samples.

All measured concentrations of PACs are reported in Table 4.V.

PAHs total concentrations ranged from 1.2 to 7.7  $ng/m^3$ . PAHs was always the most abundant class of compounds, with the exception of Week 6, when OPAHs were more concentrated.

OPAHs total concentration varied from 0.63 to 6.5  $ng/m^3$ . AZAs total amount was from no AZA detected to 0.23  $ng/m^3$ . PASHs concentration was comprised between 0.15  $ng/m^3$  and 0.32  $ng/m^3$  and BTH accounted for most of the PASHs amount.

There was a high increase in PACs concentration after the first two weeks of sampling (2.3 and 2.8  $ng/m^3$  vs. from 11 to 14  $ng/m^3$ ). This could be because these first two weeks corresponded to winter holidays. One could expect less everyday traffic inside the parking lot during this period, and thus less generation of particulate-phase PACs. Additionally, due to spatial constraints of the parking lot, the ground-level sampling could not be performed at the entrance and exit access of the parking lot, where everyday vehicular traffic was the most constant. Our ground-level samples (Week 1 to 3) were therefore more affected by individual passages of cars directly nearby the sampling device, whereas at the underground level (Week 4 to Week 6), the  $PM_{10}$  sampler could be positioned close to entrance and exit access.

**Table 4.V : Concentration of PACs measured in PM<sub>10</sub> samples from a parking lot over six consecutive weeks in February and March 2022**

Compound	Individual PAC concentrations (pg/m <sup>3</sup> )					
	Ground level (daytime only)			Underground level (day and night)		
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6
NAP	106	274	87	91	111	135
FLU		51	60	46	53	66
PHE	57	79	286	302	173	259
FLT	45	43	415	306	218	161
PYR	98	122	1005	705	439	372
B(b)FLU			266	116	137	83
B(a)FLU			138		171	93
1-MPYR				73	54	
B(a)ANT		113	360	601	458	241
TPH	35	37	111	141	108	102
CHR	95	136	713	621	412	330
B(b)FLT	190	228	1138	> 1000 <sup>a</sup>	> 1000 <sup>a</sup>	871
B(k)FLT	49	133	156	476	435	264
B(j)FLT	91	108	368	547	550	366
B(e)PYR	106	120	454	645	684	380
B(a)PYR	61	172	665	961	989	597
I(cd)PYR	93	124	295	470	575	284
DB(a,h)ANT			113	126	133	55
B(ghi)PER	123	207	447	492	679	328
<b>∑ PAHs</b>	<b>1.2·10<sup>3</sup></b>	<b>1.9·10<sup>3</sup></b>	<b>7.1·10<sup>3</sup></b>	<b>7.7·10<sup>3</sup></b>	<b>7.4·10<sup>3</sup></b>	<b>5.0·10<sup>3</sup></b>
PHTLA	143	352	1138	1484	1025	2231
PNO			507	272	276	247
ANTQ			238	213	198	198
NAPA	616	276	1684	1987	933	1239
B(a)FLUO			227	182	92	134
B(c)FLUO			249	242	113	114
B(b)FLUO			192	177	154	82
BANTO			506	1106	517	1136
BANTQ				152	258	209
B(cd)PYRO				660	665	571
<b>∑ OPAHs</b>	<b>0.76·10<sup>3</sup></b>	<b>0.63·10<sup>3</sup></b>	<b>4.7·10<sup>3</sup></b>	<b>6.5·10<sup>3</sup></b>	<b>4.2·10<sup>3</sup></b>	<b>6.2·10<sup>3</sup></b>
QUI				37		48
isoQUI				33	45	33
CAR	82		64	51	111	64
B(a)ACR						83
DB(a,j)ACR	82					

$\sum$ AZAs	$0.16 \cdot 10^3$		$0.06 \cdot 10^3$		$0.12 \cdot 10^3$		$0.16 \cdot 10^3$		$0.23 \cdot 10^3$	
BTH	153	244	211	259	174	246				
DBT				9						
BN(2,1)T				49					18	
BN(1,2)T									23	
$\sum$ PASHs	$0.15 \cdot 10^3$		$0.24 \cdot 10^3$		$0.21 \cdot 10^3$		$0.32 \cdot 10^3$		$0.17 \cdot 10^3$	
$\sum$ PACs	$2.3 \cdot 10^3$		$2.8 \cdot 10^3$		$12 \cdot 10^3$		$14 \cdot 10^3$		$11 \cdot 10^3$	

<sup>a</sup> Some B(b)FLT concentrations were reported as “> X” because the measured concentrations exceeded the highest calibration level.

#### 4.3.7.b. Individual compounds of particular interest

The most abundant individual PACs on average from Week 3 to Week 6 were PHTLA ( $\approx 1.5 \text{ ng/m}^3$ ), NAPA ( $\approx 1.5 \text{ ng/m}^3$ ) and B(b)FLT ( $\approx 1.1 \text{ ng/m}^3$ ). These three compounds were also among the most concentrated in the Diesel Particulate Matter SRM. This is coherent with the sampling location described here, which should be mostly affected by vehicular exhausts emissions.

On the other hand, 1-NPYR, which was the second most abundant compound in SRM 2975, was not detected. The method LOQ for this compound was about  $1 \text{ ng/m}^3$  for ground-level samples and  $0.5 \text{ ng/m}^3$  for underground-level samples. This LOQ was too high to be able to quantify 1-NPYR in ambient particles of the parking lot.

Among the 16 PACs detected in all six  $\text{PM}_{10}$  samples were 13 PAHs, 2 OPAHs and 1 PASH. This latter was BTH, a 2-ring Polycyclic Aromatic Heterocycle containing a nitrogen and a sulfur atom. This compound was previously described as a potential marker of traffic pollution, partly because of its release from rubber and tires in which it is used as a vulcanizing agent<sup>45,57</sup>. The continual presence of BTH in  $\text{PM}_{10}$  from the parking lot studied in this work reinforces the interest of monitoring Polycyclic Aromatic Heterocycles besides PAHs to assess traffic-related atmospheric pollution.

#### 4.3.7.c. PAHs diagnostic ratios for source apportionment

Diagnostic ratios of several PAHs individual concentrations have been described as an interesting tool for source apportionment of these compounds<sup>15</sup>. However, their use as a sole indicator to firmly identify emission sources of PAHs has also been questioned, notably due to the fact that PAHs concentrations are generally not conservative in the environment<sup>58</sup>. Therefore, the implementation of cross-plots of two PAHs diagnostic ratios has been presented in recent times as an improvement to increase the reliability of source apportionment<sup>15,59,60</sup>.

We decided to use two examples of PAHs diagnostic ratios cross-plots to assess the main emission sources of PAHs in our samples. First, the association of I(cd)PYR / (I(cd)PYR +

B(ghi)PER) and  $B(a)ANT / (B(a)ANT + CHR)$  enables to define regions of the cross-plot characteristic of petrogenic sources, fuel combustion, and biomass or coal combustion<sup>59,61</sup>. Second, the plotting of  $I(cd)PYR / (I(cd)PYR + B(ghi)PER)$  versus  $B(b)FLT / (B(b)FLT + B(k)FLT)$  defines values which are typical of traffic-related emissions. This latter cross-plot of two diagnostic ratios was recently described as more accurate because it should not be affected by spatial and temporal distributions<sup>60,62</sup>.

Results obtained with the PM<sub>10</sub> samples of this study are presented in Figure 4.6. In Figure 4.6.a, samples from weeks 2, 4, 5 and 6 are all in the region of the cross-plot typical of fuel combustion, i.e.  $B(a)ANT / (B(a)ANT + CHR) > 0.35$  and  $I(cd)PYR / (I(cd)PYR + B(ghi)PER)$  between 0.2 and 0.5. Week 1 could not be plotted in Figure 4.6.a because B(a)ANT could not be detected at this time point. Week 3 is the only sample outside the “fuel combustion” area, suggesting a contribution from other sources during this period, but it is still very close to this area ( $B(a)ANT / (B(a)ANT + CHR) = 0.34$ ). The identification of fuel combustion as the main PAH source is very consistent with the fact that PM<sub>10</sub> samples were collected in a parking lot.

This assumption of fuel combustion prevalence for PAHs release in our samples was further investigated in Figure 4.6.b. The corresponding cross-plot was studied for a particular region of interest previously utilized by Xing et al. and Wang et al.<sup>60,62</sup>: for  $I(cd)PYR / (I(cd)PYR + B(ghi)PER)$  from 0.28 to 0.49 and  $B(b)FLT / (B(b)FLT + B(k)FLT)$  from 0.59 to 0.83, the PACs content of the samples was described as traffic-related. The criteria were met for all PM<sub>10</sub> samples, except Week 3 which exhibited a slightly higher  $B(b)FLT / (B(b)FLT + B(k)FLT)$  value (0.88) and is again a slight outlier for which other sources may have contributed to PACs emission. Therefore, results obtained with both cross-plots are consistent with each other, and both suggest the importance of vehicular exhaust as the major source of PACs. These results are a further confirmation of the applicability of the analytical method presented in this paper, since it is in line with the sampling location, a parking lot.

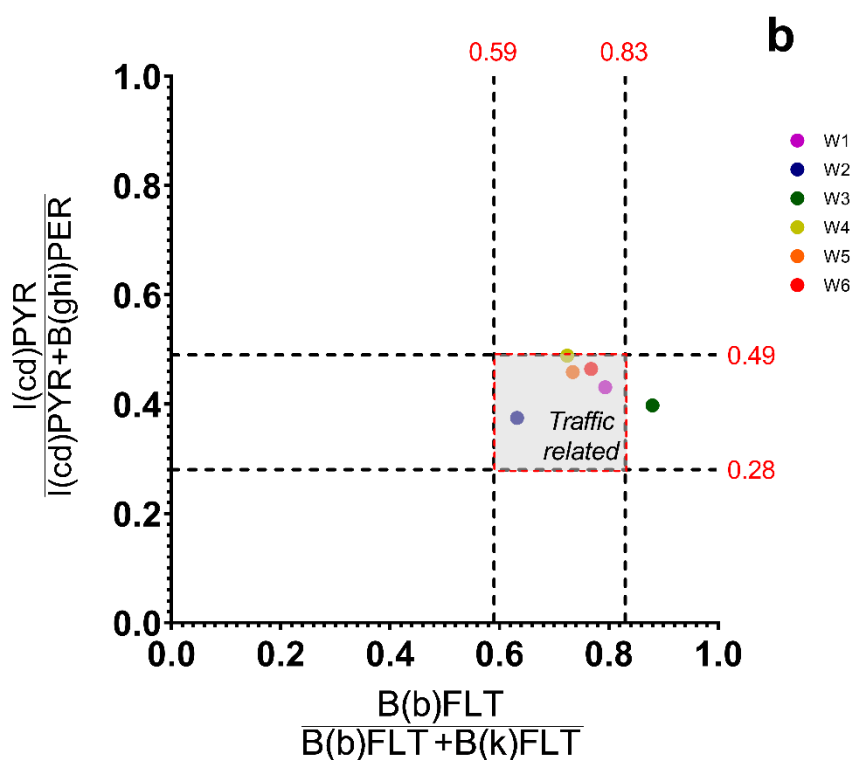
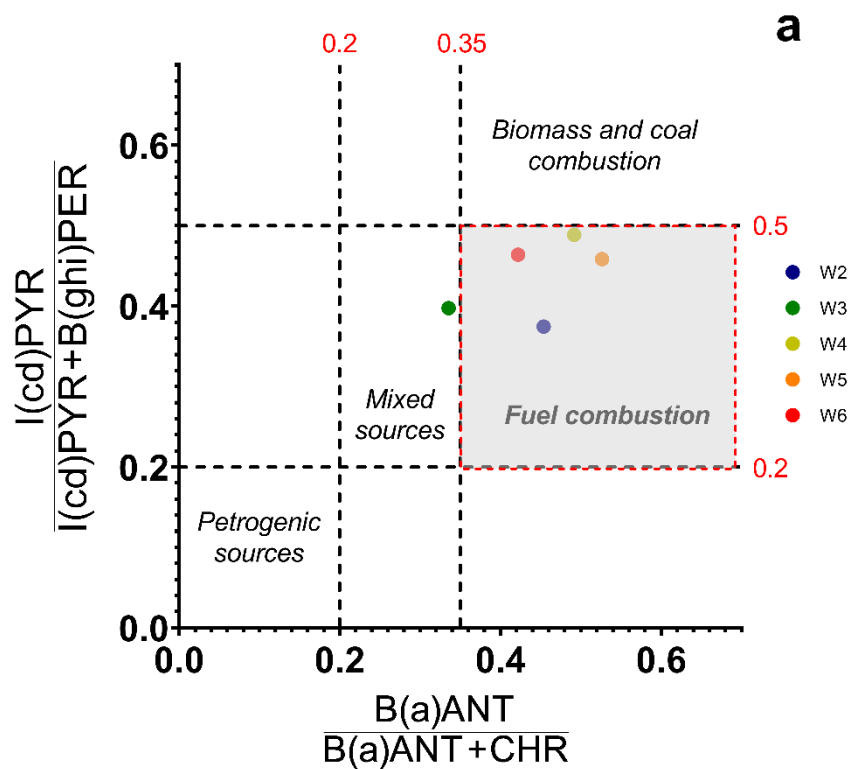
#### 4.3.7.d. Comparison with PACs concentrations from the literature

In this section, the results of this study on PM<sub>10</sub> of a parking lot are compared with previous works from the literature on similar environments.

The sum of the concentrations of 19 PAHs monitored by Villanueva et al. in an underground parking in Spain reached 6.7 ng/m<sup>3</sup><sup>63</sup>. This level is in good agreement with our range of total PAHs concentrations from 1.2 to 7.7 ng/m<sup>3</sup>, also obtained with 19 individual PAHs.

Similarly, Kim et al. reported a mean level of the sum of 24 PAHs of 4.1 ng/m<sup>3</sup> over eight indoor parking lots in Korea<sup>64</sup>. This corresponds to our range of values as well. In their work, highest individual PAHs concentrations were observed for FLT ( $0.54 \pm 0.24$  ng/m<sup>3</sup>) and PYR ( $0.54 \pm 0.29$  ng/m<sup>3</sup>), which were also quite abundant in our samples ( $0.27 \pm 0.11$  ng/m<sup>3</sup> and  $0.63 \pm 0.29$  ng/m<sup>3</sup>, respectively, from Week 3 to 6). However, B(b)FLT and B(a)PYR were even more concentrated in our study.

Overall, the PAHs concentrations reported here are coherent with typical levels from the literature.



**Figure 4.6 : Diagnostic ratios of individual PAHs to assess the main emission sources of the  $PM_{10}$  samples from this work:**

- a)  $I(cd)PYR / (I(cd)PYR + B(ghi)PER)$  versus  $B(a)ANT / (B(a)ANT + CHR)$   
to identify the main combustion source and
- b)  $I(cd)PYR / (I(cd)PYR + B(ghi)PER)$  versus  $B(b)FLT / (B(b)FLT + B(k)FLT)$   
to search for traffic-related samples.

#### 4.4. Conclusion

In this article, the development of a new analytical method aiming at the simultaneous determination of 79 PACs was presented. Much attention was paid to including as many important target compounds as possible in the method, for the purpose of screening a broad range of pollutants in a single method.

Important method parameters were optimized, such as the extraction solvent, the separation gradient, the injection conditions, and most of all the MS/MS transitions for which pseudo-MRM gave a major sensitivity improvement in the case of PAHs, AZAs and PASHs.

The method was firmly validated thanks to the analysis of a Standard Reference Material which gave a quantification of 57 different PACs. 16 of the 22 certified compounds were in their certified range, and 35 additional compounds were reported. It would be interesting that future works also search for these compounds in SRM 2975.

Finally, the method was applied to environmental PM<sub>10</sub> samples collected in an urban parking lot. 38 different PACs were found in these samples and the maximal total concentration was 14 ng/m<sup>3</sup>. In the environmental samples as well as in the SRM, phthalic anhydride and naphthalic anhydride were among the most concentrated compounds, highlighting the interest of more monitoring of these PACs in combustion-related particles. Cross-plots of diagnostic ratios finally confirmed that fuel combustion and vehicular traffic was the main emission source of PACs in the parking lot.

#### Acknowledgements

The authors thank Patricia Lecomte (Restek France) for her competent advises on the implementation of the Rxi-PAH column and on GC troubleshooting.

This work was supported by a Ph.D. grant from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation and the University of Strasbourg.



## 4.5. References

- (1) US EPA. *Health and Environmental Effects of Particulate Matter (PM)*. <https://www.epa.gov/pm-pollution/health-and-environmental-effects-particulate-matter-pm> (accessed 2021-06-03).
- (2) Harrison, R. M. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2020**, 378 (2183), 20190319.
- (3) IARC. *Outdoor Air Pollution*; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Lyon, 2016; Vol. 109.
- (4) Ibalid-Mulli, A.; Wichmann, H.-E.; Kreyling, W.; Peters, A. *J. Aerosol Med.* **2002**, 15 (2), 189–201.
- (5) Moreno, T.; Querol, X.; Alastuey, A.; Ballester, F.; Gibbons, W. *Eur. J. Epidemiol.* **2007**, 22 (1), 1–5.
- (6) Kim, K.-H.; Kabir, E.; Kabir, S. *Environ. Int.* **2015**, 74, 136–143.
- (7) Degrendele, C.; Kanduč, T.; Kocman, D.; Lammel, G.; Cambelová, A.; Dos Santos, S. G.; Horvat, M.; Kukučka, P.; Holubová Šmejkalová, A.; Mikeš, O.; Nuñez-Corcuera, B.; Příbylová, P.; Prokeš, R.; Saňka, O.; Maggos, T.; Sarigiannis, D.; Klánová, J. *Sci. Total Environ.* **2021**, 793, 148528.
- (8) Maertens, R. M.; Bailey, J.; White, P. A. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2004**, 567 (2–3), 401–425.
- (9) Choi, H.; Perera, F.; Pac, A.; Wang, L.; Flak, E.; Mroz, E.; Jacek, R.; Chai-Onn, T.; Jedrychowski, W.; Masters, E.; Camann, D.; Spengler, J. *Environ. Health Perspect.* **2008**, 116 (11), 1509–1518.
- (10) Deziel, N. C.; Rull, R. P.; Colt, J. S.; Reynolds, P.; Whitehead, T. P.; Gunier, R. B.; Month, S. R.; Taggart, D. R.; Buffler, P.; Ward, M. H.; Metayer, C. *Environ. Res.* **2014**, 133, 388–395.
- (11) Oliveira, M.; Slezakova, K.; Delerue-Matos, C.; Pereira, M. C.; Morais, S. *Environ. Int.* **2019**, 124, 180–204.
- (12) Andersson, J. T.; Achten, C. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2015**, 35 (2–4), 330–354.
- (13) Schwarz, M. A.; Behnke, A.; Brandt, M.; Eisenträger, A.; Hassauer, M.; Kalberlah, F.; Seidel, A. *Integr. Environ. Assess. Manag.* **2014**, 10 (3), 415–428.
- (14) Galmiche, M.; Delhomme, O.; François, Y.-N.; Millet, M. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2021**, 134, 116099.
- (15) Galmiche, M.; Delhomme, O.; François, Y.-N.; Millet, M. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2021**, 134, 116146.
- (16) Krzyszczak, A.; Czech, B. *Sci. Total Environ.* **2021**, 788, 147738.
- (17) Tevlin, A.; Galarneau, E.; Zhang, T.; Hung, H. *Environ. Pollut.* **2021**, 271, 116232.
- (18) da Silva Junior, F. C.; Felipe, M. B. M. C.; Castro, D. E. F. de; Araújo, S. C. da S.; Sisenando, H. C. N.; Batistuzzo de Medeiros, S. R. *Environ. Pollut.* **2021**, 278, 116838.
- (19) Galarneau, E. *Environ. Pollut.* **2021**, 117607.
- (20) Bandowe, B. A. M.; Meusel, H.; Huang, R.; Ho, K.; Cao, J.; Hoffmann, T.; Wilcke, W. *Sci. Total Environ.* **2014**, 473–474, 77–87.
- (21) Lin, Y.; Ma, Y.; Qiu, X.; Li, R.; Fang, Y.; Wang, J.; Zhu, Y.; Hu, D. *J. Geophys. Res. Atmospheres* **2015**, 120 (14), 7219–7228.
- (22) Di Filippo, P.; Riccardi, C.; Gariazzo, C.; Incoronato, F.; Pomata, D.; Spicaglia, S.; Cecinato, A. *J. Environ. Monit.* **2007**, 9 (3), 275.
- (23) Xu, C.; Gao, L.; Zheng, M.; Qiao, L.; Wang, K.; Huang, D.; Wang, S. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, 55 (1), 109–119.
- (24) Steimer, S. S.; Patton, D. J.; Vu, T. V.; Panagi, M.; Monks, P. S.; Harrison, R. M.; Fleming, Z. L.; Shi, Z.; Kalberer, M. *Atmospheric Chem. Phys.* **2020**, 20 (21), 13303–13318.
- (25) Olanrewaju, C. A.; Ramirez, C. E.; Fernandez-Lima, F. *Anal. Chem.* **2021**, 93 (15), 6080–6087.
- (26) Shi, X.; Qiu, X.; Jiang, X.; Rudich, Y.; Zhu, T. *J. Hazard. Mater.* **2021**, 407, 124794.
- (27) Grung, M.; Kringstad, A.; Bæk, K.; Allan, I. J.; Thomas, K. V.; Meland, S.; Ranneklev, S. B. *J. Hazard. Mater.* **2017**, 323, 36–44.
- (28) Gbeddy, G.; Egodawatta, P.; Goonetilleke, A.; Ayoko, G.; Jayarathne, A.; Chen, L.; Russell, S. *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1125, 19–28.
- (29) Fushimi, A.; Hashimoto, S.; Ieda, T.; Ochiai, N.; Takazawa, Y.; Fujitani, Y.; Tanabe, K. *J Chromatogr A* **2012**, 1252, 164–170.

- (30) Lara, S.; Villanueva, F.; Martín, P.; Salgado, S.; Moreno, A.; Sánchez-Verdú, P. *Chemosphere* **2022**, 133745.
- (31) Schantz, M. M.; Nichols, J. J.; Wise, S. A. *Anal. Chem.* **1997**, 69 (20), 4210–4219.
- (32) Masala, S.; Ahmed, T.; Bergvall, C.; Westerholm, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 401 (10), 3305–3315.
- (33) Galmiche, M.; Rodrigues, A.; Motsch, E.; Delhomme, O.; François, Y.-N.; Millet, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2022**, 36 (13), e9307.
- (34) National Institute of Standards & Technology; *Certificate of Analysis - Standard Reference Material 2975 - Diesel Particulate Matter (Industrial Forklift)*; 2021.
- (35) Wise, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2022**.
- (36) Richter-Brockmann, S.; Achten, C. *Chemosphere* **2018**, 200, 495–503.
- (37) Collins, J. F.; Brown, J. P.; Alexeeff, G. V.; Salmon, A. G. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1998**, 28 (1), 45–54.
- (38) Durant, J. L.; Busby, W. F.; Lafleur, A. L.; Penman, B. W.; Crespi, C. L. *Mutat. Res. Toxicol.* **1996**, 371 (3–4), 123–157.
- (39) Lammel, G. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2015**, 35 (2–4), 316–329.
- (40) Wietzoreck, M.; Kyprianou, M.; Musa Bandowe, B. A.; Celik, S.; Crowley, J. N.; Drownick, F.; Eger, P.; Friedrich, N.; Iakovides, M.; Kukučka, P.; Kuta, J.; Nežiková, B.; Pokorná, P.; Přibylková, P.; Prokeš, R.; Rohloff, R.; Tadic, I.; Tauer, S.; Wilson, J.; Harder, H.; Lelieveld, J.; Pöschl, U.; Stephanou, E. G.; Lammel, G. *Atmospheric Chem. Phys.* **2022**, 22 (13), 8739–8766.
- (41) Albinet, A.; Leoz-Garziandia, E.; Budzinski, H.; Villenave, E.; Jaffrezo, J.-L. *Atmos. Environ.* **2008**, 42, 43–54.
- (42) Nocun, M. S.; Schantz, M. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405 (16), 5583–5593.
- (43) Albinet, A.; Leoz-Garziandia, E.; Budzinski, H.; Villenave, E. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1121 (1), 106–113.
- (44) Bezabeh, D. Z.; Bamford, H. A.; Schantz, M. M.; Wise, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 375 (3), 381–388.
- (45) Liao, C.; Kim, U.-J.; Kannan, K. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, 52 (9), 5007–5026.
- (46) Sklorz, M.; Schnelle-Kreis, J.; Liu, Y.; Orasche, J.; Zimmermann, R. *Chemosphere* **2007**, 67 (5), 934–943.
- (47) Lian, W.; Ren, F.; Tang, L.; Dong, D. *Microchem. J.* **2016**, 129, 194–199.
- (48) Delgado-Saborit, J. M.; Aquilina, N.; Baker, S.; Harrad, S.; Meddings, C.; Harrison, R. M. *Anal. Methods* **2010**, 2 (3), 231.
- (49) Cochran, R. E.; Dongari, N.; Jeong, H.; Beránek, J.; Haddadi, S.; Shipp, J.; Kubátová, A. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 740, 93–103.
- (50) López-Lorente, Á. I.; Pena-Pereira, F.; Pedersen-Bjergaard, S.; Zuin, V. G.; Ozkan, S. A.; Psillakis, E. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2022**, 148, 116530.
- (51) Bamford, H. A.; Bezabeh, D. Z.; Schantz, M. M.; Wise, S. A.; Baker, J. E. *Chemosphere* **2003**, 50 (5), 575–587.
- (52) Cochran, R. E.; Kubátová, A. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2015**, 95 (5), 434–452.
- (53) Schantz, M. M.; McGaw, E.; Wise, S. A. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (19), 8222–8231.
- (54) Christensen, A.; Östman, C.; Westerholm, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 381 (6), 1206–1216.
- (55) Ahmed, T. M.; Bergvall, C.; Åberg, M.; Westerholm, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407 (2), 427–438.
- (56) Li, M.; Li, J.; Zhu, Y.; Chen, J.; Andreae, M. O.; Pöschl, U.; Su, H.; Kulmala, M.; Chen, C.; Cheng, Y.; Zhao, J. *Chem* **2022**, S2451929422003163.
- (57) Asheim, J.; Vike-Jonas, K.; Gonzalez, S. V.; Lierhagen, S.; Venkatraman, V.; Veivåg, I.-L. S.; Snilsberg, B.; Flaten, T. P.; Asimakopoulou, A. G. *Sci. Total Environ.* **2019**, 649, 703–711.
- (58) Tobiszewski, M.; Namieśnik, J. *Environ. Pollut.* **2012**, 162, 110–119.
- (59) Cao, Z.; Wang, M.; Chen, Q.; Zhu, C.; Jie, J.; Li, X.; Dong, X.; Miao, Z.; Shen, M.; Bu, Q. *Sci. Total Environ.* **2019**, 653, 423–430.

- (60) Xing, W.; Yang, L.; Zhang, H.; Zhang, X.; Wang, Y.; Bai, P.; Zhang, L.; Hayakawa, K.; Nagao, S.; Tang, N. *J. Environ. Sci.* **2022**, *121*, 38–47.
- (61) Bravo-Linares, C.; Ovando-Fuentealba, L.; Orellana-Donoso, S.; Villenas-Fernández, K.; Hernández-Millán, M.; Mudge, S. M.; Pinaud-Mendoza, J. P.; Loyola-Sepulveda, R. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2017**, *37* (2–3), 189–202.
- (62) Wang, T.; Zhao, J.; Liu, Y.; Peng, J.; Wu, L.; Mao, H. *J. Geophys. Res. Atmospheres* **2022**, *127* (5).
- (63) Villanueva, F.; Sevilla, G.; Lara, S.; Martín, P.; Salgado, S.; Albaladejo, J.; Cabañas, B. *Microchem. J.* **2018**, *142*, 117–125.
- (64) Kim, H.-H.; Lee, G.-W.; Yang, J.-Y.; Jeon, J.-M.; Lee, W.-S.; Lim, J.-Y.; Lee, H.-S.; Gwak, Y.-K.; Shin, D.-C.; Lim, Y.-W. *Asian J. Atmospheric Environ.* **2014**, *8* (1), 35–47.

## Chapitre 5 :

# Application environnementale : étude de la présence des CAP dans les particules et les poussières de logements urbains

### 5.1. Description des échantillons environnementaux

Suite au développement d'une méthode d'analyse des CAP par GC-MS/MS présenté dans le Chapitre 4, afin d'étudier la contamination d'un environnement urbain par ce type de composés, une campagne d'échantillonnage a été menée en février 2021.

Celle-ci s'est concentrée sur un immeuble résidentiel de l'agglomération strasbourgeoise, situé dans le quartier de Cronembourg, en périphérie du centre-ville.

La résidence d'intérêt était bordée d'un axe routier urbain au nord, et d'une ligne de tramway ainsi que d'un autre axe routier de l'autre côté (au sud). Elle était également située à moins de 500 mètres d'un axe autoroutier traversant l'agglomération. La situation géographique de l'immeuble est résumée en Figure 5.1.

Au sein de cet immeuble comportant huit étages et un sous-sol, trois logements ont été sélectionnés afin d'évaluer la diversité de pollution qui pouvait exister entre différents logements d'une même résidence, et ainsi estimer l'importance de la pollution extérieure par rapport aux sources d'émission intérieures (liées aux habitudes de vie des résidents). La pollution de l'air par les composés semi-volatils est généralement moins étudiée dans les environnements intérieurs que dans les environnements extérieurs, or c'est bien en intérieur que nous passons de 80 à 90 % de notre temps <sup>1,2</sup>. C'est pourquoi il est pertinent d'améliorer la connaissance de la phase particulière de nos environnements intérieurs.

Le premier logement était situé au deuxième étage de l'immeuble, face à la route. Il sera appelé « 2R » par la suite. Le second logement était également situé au deuxième étage, mais cette fois face à la ligne de tramway. On lui fera donc référence sous l'abréviation « 2T ». Enfin, le troisième logement était localisé au cinquième étage de l'immeuble, proche de la ligne de tramway, même s'il ne lui faisait pas directement face. Il sera appelé « 5T ».

Dans chacun des logements, du 22 février au 26 février 2021, les échantillonnages suivants ont été réalisés :

- Les poussières déposées ont été prélevées dans chaque logement à l'aide d'un aspirateur domestique équipé d'un système de prélèvement Kudzu Science® (voir Figure 5.2.a). Ces prélèvements ont été réalisés en duplicata dans chaque logement, le 22 février 2021, avant de débiter les prélèvements de particules atmosphériques. Il avait été demandé aux occupants des logements de ne pas retirer les poussières par aspiration durant les jours précédant notre

prélèvement. Selon les logements étudiés, en fonction de la présence d'un tapis ou non, les quantités totales de poussières prélevées ont pu être très différentes. Un résumé du type de surface échantillonné, de la surface de sol échantillonnée et de la masse de poussière récoltée pour chaque logement est présenté dans la Table 5.I.

- Les  $PM_{10}$  intérieures ont été collectées par prélèvement actif bas-volume avec des préleveurs Microvol 1100 (Ecotech, Acoem Group) (voir Figure 5.2.b). Chaque échantillon résulte d'un prélèvement diurne d'environ une dizaine d'heures pendant deux jours consécutifs (23 et 24 février ; 25 et 26 février) à un débit d'air de 3 litres par minute (L/min) ( $0,18 \text{ m}^3/\text{h}$ ).

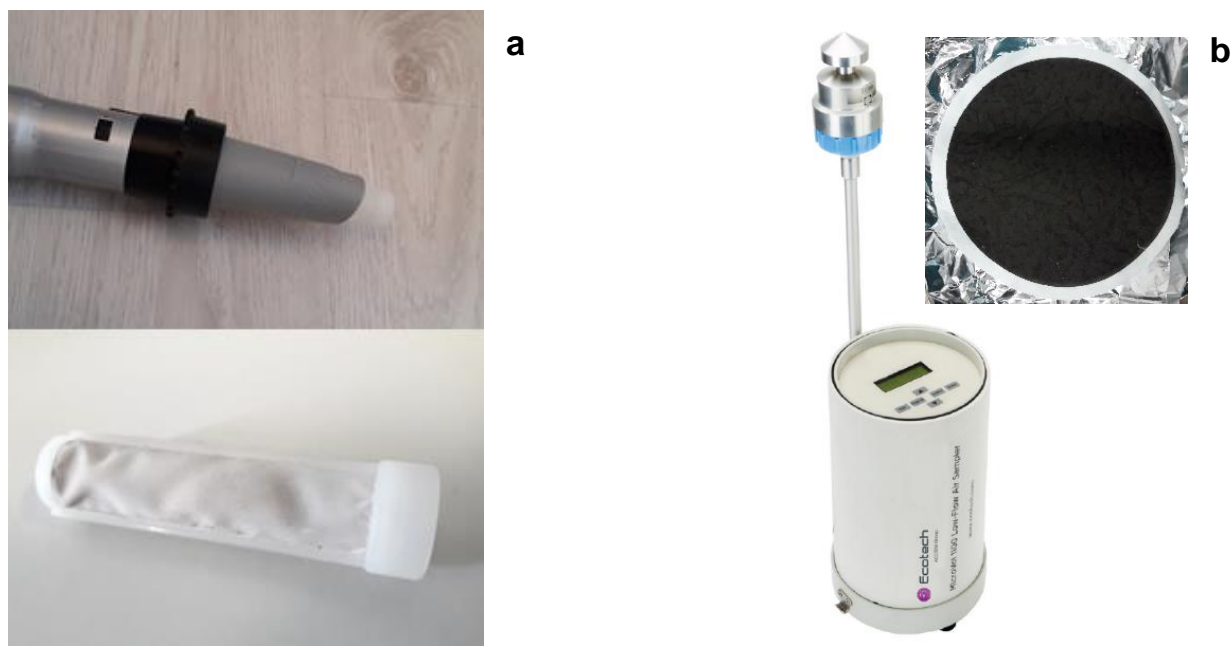
- Simultanément aux  $PM_{10}$  intérieures, les  $PM_{10}$  extérieures ont également été collectées. En utilisant également des préleveurs Microvol 1100, les prélèvements intérieurs et extérieurs ont été effectués en parallèle dans chaque logement, en plaçant un dispositif identique sur le balcon de l'appartement. Les durées de prélèvement sont donc identiques pour les échantillons extérieurs (environ 2 fois 10 heures), mais le débit de prélèvement a pu être augmenté jusqu'à 4 L/min ( $0,24 \text{ m}^3/\text{h}$ ), car les nuisances sonores de la pompe étaient moins gênantes en extérieur.



**Figure 5.1 : Localisation du site de prélèvement d'échantillons urbains**  
(T = ligne de tramway ; R = axe routier)

Tous les prélèvements de  $PM_{10}$  ont été effectués sur des filtres en fibre de verre ( $\varnothing 47 \text{ mm}$ , GF6, Whatman, GE Healthcare) (voir Figure 5.2.b) préalablement conditionnés par rinçage dans

un solvant organique (n-hexane / dichlorométhane, 1:1, v/v) et séchage dans une étuve à 50°C pendant plus de 48 heures.



**Figure 5.2 : Dispositifs de prélèvement des échantillons environnementaux :**  
**a) Membrane Kudzu Science® adaptée sur l'embout d'un aspirateur domestique**  
**b) Préleveur actif bas-volume Microvol (© Ecotech Pty Ltd.) et GFF après prélèvement de PM<sub>10</sub>**

**Table 5.1 : Caractéristiques des prélèvements de poussières déposées réalisés en février 2021 dans les logements de l'aire urbaine de Strasbourg**

Logement	2R		2T		5T	
	Parquet		Tapis		Tapis	
Type de surface	Parquet		Tapis		Tapis	
# duplicat	1	2	1	2	1	2
Aire de prélèvement (m <sup>2</sup> )	5,3	6,0	1,1	1,1	1,4	1,4
Masse de poussière récoltée (g)	0,1702	0,1852	0,9882	0,8063	0,7045	0,5291
Densité surfacique de poussière (g/m <sup>2</sup> )	0,032	0,031	0,90	0,73	0,50	0,38

## 5.2. Concentrations mesurées dans les logements urbains étudiés

Dans ce paragraphe seront rapportées les valeurs de CAP quantifiées dans les logements ainsi qu'en extérieur. Nous pourrions en tirer des premières conclusions sur les différences observées entre les trois logements, entre les échantillons extérieurs et intérieurs, ainsi qu'entre les PM<sub>10</sub> et les poussières.

### 5.2.1. Logement 2R

Les concentrations de CAP mesurées pour le logement du 2<sup>ème</sup> étage face à la route sont répertoriées dans la Table 5.II.

Un résumé de la répartition des CAP quantifiés entre les différents groupes ainsi que des concentrations totales de CAP dans les PM<sub>10</sub> intérieures et extérieures est présenté en Figure 5.3.a.

Pour les mesures de PM<sub>10</sub> au niveau du logement 2R, une très forte différence a été observée entre les valeurs de concentration totale de CAP du premier prélèvement (23 et 24 février) et du second (25 et 26 février), aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur de l'appartement (606 vs. 67 ng/m<sup>3</sup> à l'intérieur, 414 vs. 62 ng/m<sup>3</sup> à l'intérieur).

Mais en réalité, la quasi-totalité de cette différence s'explique par des concentrations anormalement hautes de seulement deux OHAP dans les échantillons du 23-24 février. A elles seules, la 1,4-naphtoquinone (1,4-NAPQ) et la 5,12-naphtacènequinone (NACEQ) s'élèvent à un niveau de 504 ng/m<sup>3</sup> à l'extérieur et 303 ng/m<sup>3</sup> à l'intérieur, soit respectivement 83 % et 73 % de la concentration totale de CAP mesurée dans ces échantillons. Précisons que la concentration en NACEQ a même été sous-évaluée à la hauteur du point d'étalonnage le plus élevé, puisqu'elle était supérieure à ce dernier point d'étalonnage. Ces exceptions sont donc responsables de la concentration anormalement élevée de CAP ainsi que de la surreprésentation des OHAP parmi les CAP dans les échantillons de PM<sub>10</sub> du 23-24 février au niveau du logement 2R (voir Table 5.II et Figure 5.3.a).

Il est intéressant de noter que ces deux composés ne sont généralement pas présentés comme des OHAP prédominants<sup>3</sup>. D'ailleurs, contrairement à d'autres OHAP comme INDO ou NAPL, 1,4-NAPQ et NACEQ ne se retrouvent pas dans tous les échantillons de particules prélevés, mais seulement ponctuellement. Ainsi, sur une mesure d'une semaine par exemple, leur pic de concentration pourrait être « lissé » et leur importance relative négligée. Ceci se confirme par le résultat de Wnorowski *et al* qui n'ont pu mesurer NACEQ que dans les échantillons atmosphériques diurnes, jamais dans les échantillons nocturnes<sup>4</sup>. De plus, 1,4-NAPQ et NACEQ n'ont pas été retrouvés à des concentrations aussi marquantes dans les poussières du logement 2R. Comme les poussières permettent une évaluation de l'accumulation de polluants sur le long terme, cela renforce l'hypothèse de pics d'occurrence singuliers mais non durables de ces composés.

Néanmoins, l'occurrence de 1,4-NAPQ et NACEQ a déjà été rapportée, particulièrement dans des échantillons urbains <sup>4,5</sup>. Bandowe *et al* ont mesuré des pics de concentration de 1,4-NAPQ qui a pu représenter jusqu'à 25 % de la quantité totale de OHAP dans leurs échantillons <sup>6</sup>.

L'occurrence de 1,4-NAPQ et NACEQ peut être due à une photo-oxydation de HAP parents, ou bien à une émission directe, notamment par le trafic automobile <sup>4,5</sup>. Nous avons d'ailleurs détecté la présence de NACEQ dans des particules d'échappement de moteur diesel (voir Chapitre 4).

Parmi les autres résultats majeurs à souligner, il est assez remarquable que pour beaucoup de composés, le ratio intérieur / extérieur des concentrations de CAP soit très proche de 1. En regroupant les composés par famille, on obtient des ratios intérieur / extérieur variant de 0,60 à 1,84. Cette forte proximité entre les niveaux de CAP à l'extérieur et à l'intérieur pourrait suggérer une aération très importante de la part des occupants du logement, qui mènerait à une « uniformisation » des niveaux de CAP entre l'intérieur et l'extérieur.

Le logement 2R se caractérise enfin des deux autres par son absence de tapis, qui nous a mené à prélever les poussières déposées sur le parquet et sur des surfaces plus grandes puisque la densité surfacique de poussières était moindre (voir Table 5.I). Néanmoins, cela n'a pas empêché la quantification de 59 et 54 polluants sur les 79 recherchés dans les deux échantillons de poussière collectés. Si les concentrations des CAP les plus légers sont cohérentes entre les deux échantillons, les CAP les plus lourds ont été quantifiés à des niveaux beaucoup plus élevés dans le duplicat n°1 que dans le duplicat n°2 (voir Table 5.II). Il est difficile d'expliquer avec certitude ce résultat. On peut faire l'hypothèse d'un biais analytique dû à l'encrassement de l'instrument par le duplicat n°1 qui aurait pu gêner l'analyse du duplicat n°2, mais celui-ci devrait être corrigé par l'utilisation des étalons internes. Alors, si l'on se concentre sur les échantillons, on peut relever que le « 22.1 » a été prélevé dans une zone proche d'une grande ouverture vers l'extérieur (baie vitrée). Or une forte concentration des CAP lourds par rapport aux plus légers est une caractéristique de pollution par des combustions de carburant dans des moteurs <sup>3,7</sup>, donc on peut émettre l'hypothèse que l'échantillon « 22.1 » de poussières du logement 2R a été plus directement affecté par le trafic routier que le « 22.2 ».

On remarque que dans chaque famille, les concentrations les plus élevées dans les poussières correspondent également aux composés les plus fréquemment détectés et les plus concentrés dans les PM<sub>10</sub> (voir Table 5.II). C'est le cas, par exemple, du naphtalène (NAP) et du benzo(a)pyrène (B(a)PYR) parmi les HAP, de l'indanone (INDO) et du naphtaldéhyde (NAPL) parmi les OHAP, de la quinoline (QUI) parmi les AZA, et du benzothiazole (BTH) parmi les SHAP.

Mais comme les poussières sont des échantillons atmosphériques qui accumulent les composés organiques semi-volatils sur une plus longue durée que les PM<sub>10</sub>, l'analyse des poussières nous a également permis de quantifier des CAPs présents dans les logements étudiés qui n'avaient pas été détectés dans les PM<sub>10</sub>. C'est le cas pour 42 CAPs exactement (voir Table 5.II). Parmi eux, 7 NHAP ont pu être quantifiés alors que du fait de leur faible sensibilité de détection, aucun composé de cette famille n'avait été retrouvé dans les échantillons de PM<sub>10</sub>.



**Table 5.II : Concentrations de CAP mesurées dans le logement « 2R » du 22 au 26 février 2021, dans les PM<sub>10</sub> extérieures et intérieures (2x2 jours) et dans les poussières (2 prélèvements)**

CAP	PM <sub>10</sub> , extérieur ng/m <sup>3</sup>		PM <sub>10</sub> , intérieur ng/m <sup>3</sup>		Poussières ng/g	
	23-24	25-26	23-24	25-26	22.1	22.2
NAP	8,25	7,62	12,6	11,4	1782	1331
ACY					24	27
ACE	1,83		1,60		493	440
FLU	4,32	2,56	6,60	4,01	706	890
PHE	0,87	1,87	1,98	2,81	158	119
ANT			1,95			
FLT	0,59	0,54	1,15	< 0,28	31	24
PYR					119	82
B(b)FLU					106	< 27
B(a)FLU					75	< 27
B(c)FLU					34	13
1-MPYR					23	22
B(a)ANT					141	45
TPH					58	39
CHR			1,44		47	23
5-MCHR					183	57
B(b)FLT	3,57	5,15	9,10	1,19	112	30
B(k)FLT					60	22
B(j)FLT					85	31
B(e)PYR					107	47
B(a)PYR	5,72	9,92	9,89		479	111
I(cd)PYR					1237	92
DB(a,h)ANT					987	89
B(ghi)PER					784	63
n (HAP)	7	6	9	5	23	23
Σ c(HAP)	25	28	46	19	7,8·10 <sup>3</sup>	3,6·10 <sup>3</sup>
INDO	17,6	8,04	15,2	9,32	1797	756
PHTLA					888	537
1,4-NAPQ	98,9		264			
NAPL	13,6	8,61	20,2	8,14	3902	3491
ANTQ					88	
NAPA					249	37
B(a)FLUO					96	25
B(c)FLUO	11,9				220	8

B(b)FLUO					125	66
BANTO					362	< 13
BANTQ					465	166
NACEQ	> 405		39		334	36
B(cd)PYRO					2191	< 52
<b>n (OHAP)</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>12</b>	<b>11</b>
<b>Σ c(OHAP)</b>	<b>547</b>	<b>17</b>	<b>339</b>	<b>17</b>	<b>11·10<sup>3</sup></b>	<b>5.1·10<sup>3</sup></b>
1-NNAP					< 29	< 29
5-NACE					653	488
9-NPHE					< 73	
2-NFLT					< 293	< 293
4-NPYR					< 293	< 293
1-NPYR					< 585	
7-NBANT					1315	
<b>n (NHAP)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>4</b>
<b>Σ c(NHAP)</b>					<b>2,0·10<sup>3</sup></b>	<b>0,49·10<sup>3</sup></b>
QUI	17,8	7,12	18,1	11,0	4817	2931
isoQUI	1,42		2,15	1,53	462	304
CAR					87	55
B(c)ACR					53	15
B(a)ACR					150	69
B(b)CAR					825	
DB(c,h)ACR					323	41
DB(a,c)ACR					386	44
DB(a,h)ACR					1142	38
DB(a,j)ACR	4,15	9,64	3,21	4,47	613	93
DB(c,g)CAR					698	76
<b>n (AZA)</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>10</b>
<b>Σ c(AZA)</b>	<b>23</b>	<b>17</b>	<b>23</b>	<b>17</b>	<b>9,6·10<sup>3</sup></b>	<b>3,7·10<sup>3</sup></b>
B(b)T					46	27
BTH	10,1	6,26	5,69	7,71	1259	999
DBT					13	8
BN(2,1)T					46	11
BN(1,2)T					37	15
BN(2,3)T					64	22
<b>n (SHAP)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>Σ c(SHAP)</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>1,5·10<sup>3</sup></b>	<b>1,1·10<sup>3</sup></b>
<b>n (CAP)</b>	<b>16</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>11</b>	<b>59</b>	<b>54</b>
<b>Σ c(CAP)</b>	<b>606</b>	<b>67</b>	<b>414</b>	<b>62</b>	<b>31·10<sup>3</sup></b>	<b>14·10<sup>3</sup></b>

### 5.2.2. Logement 2T

Les résultats d'analyse des CAP du logement du 2ème étage face au tramway sont présentés dans la Table 5.III.

Les concentrations totales de CAP dans les PM<sub>10</sub> intérieures et extérieures et les contributions relatives de chaque groupe de CAP se trouvent en Figure 5.3.b.

Pour les deux échantillons collectés sur deux jours chacun, la concentration totale en CAP en intérieur est toujours supérieure à celle mesurée en extérieur (214 vs. 99 ng/m<sup>3</sup> le 23 et 24 février, 243 vs. 169 ng/m<sup>3</sup> le 25 et 26 février), et cette concentration de CAP en intérieur est d'ailleurs relativement stable, alors que celle mesurée en extérieur a presque doublé entre le prélèvement du 23-24 février et celui du 25-26 février.

En revanche, dans le détail, la composition du mélange de CAP n'est pas restée stable pour tous les composés entre les deux prélèvements, même à l'intérieur.

Sur une concentration totale de 243 ng/m<sup>3</sup> dans l'échantillon « 25-26 », 114 ng/m<sup>3</sup> sont dus à une seule molécule, 1,4-NAPQ. La concentration de cette seule molécule suffit à expliquer la proportion anormalement haute des OHAP parmi tous les CAP de l'échantillon (voir Figure 5.3.b). C'est déjà 1,4-NAPQ qui avait causé un pic de concentration dans l'échantillon 2R. Mais comme ce pic n'a pas eu lieu à la même date pour les logements 2R et 2T, et qu'il n'a été mesuré qu'à l'intérieur du logement 2T et non à l'extérieur, on ne peut pas expliquer les deux pics par une seule et même source. Peut-être existe-t-il une source particulière de ce composé dont nous n'avons pas eu connaissance jusqu'à présent et qui serait particulièrement significative en intérieur, due à la cuisson d'aliments par exemple. Similairement à ce qui a été observé dans le logement 2R, 1,4-NAPQ n'a pas été détecté non plus dans les poussières du logement 2T.

Les ratios intérieur / extérieur ne sont pas parfaitement stables sur tous les composés pour les deux prélèvements consécutifs, mais comme pour le logement 2R, on peut les estimer grossièrement autour de 1, même si la distribution des valeurs est plus large (de 0,50 à 4,34 si l'on calcule les ratios par groupe de CAP).

En ce qui concerne les poussières déposées, les deux prélèvements effectués sur le même tapis, avec une densité surfacique de poussière élevée (voir Table 5.I), ont donné des résultats très similaires.

Comme pour le logement 2R, les poussières du logement 2T ont donné un taux de détection élevé (40/79, i.e. 51 %) et 13 CAP ont été mesurés dans les poussières alors qu'ils ne l'étaient pas dans les PM<sub>10</sub>.

Les composés les plus concentrés dans les poussières de 2T correspondent généralement aux plus détectés dans les particules, et sont généralement les mêmes que ceux déjà mis en avant pour 2R : NAP, FLU, NAPL, QUI et BTH.

Ce sont donc généralement les CAP les plus légers qui sont prédominants dans nos échantillons de poussières domestiques.

En revanche, si l'on calcule le ratio entre la moyenne des concentrations retrouvées dans les deux échantillons de poussières (en ng/g) et dans les deux échantillons de PM<sub>10</sub> (en ng/m<sup>3</sup>), on obtient un résultat qui peut nous indiquer grossièrement quels CAP seraient les plus accumulés dans les poussières par rapport à leurs niveaux ambiants dans les particules. Dans notre cas, on ne peut pas parler de facteur d'accumulation dans les poussières au sens strict du terme, car le prélèvement de poussières a été réalisé avant les prélèvements de particules, donc il reflète les concentrations de CAPs pendant les jours qui ont précédé la période du 23 au 26 février plutôt que cette période-ci.

En faisant ce calcul dans le cas du logement 2T, les ratios les plus élevés sont obtenus pour le fluorène (61 m<sup>3</sup>/g) et le fluoranthène (54 m<sup>3</sup>/g). En raisonnant avec les concentrations globales par groupe de CAP, les HAP sembleraient être les plus accumulés dans les poussières (30 m<sup>3</sup>/g) alors que les OHAP seraient les moins accumulés par rapport à leur concentration en suspension dans l'air (8 m<sup>3</sup>/g). Ce résultat est probablement dû à la stabilité relative des composés étudiés sur des périodes de plusieurs jours.

**Table 5.III : Concentrations de CAP mesurées dans le logement « 2T » du 22 au 26 février 2021, dans les PM<sub>10</sub> extérieures et intérieures (2x2 jours) et dans les poussières (2 prélèvements)**

CAP	PM <sub>10</sub> , extérieur ng/m <sup>3</sup>		PM <sub>10</sub> , intérieur ng/m <sup>3</sup>		Poussières ng/g	
	23-24	25-26	23-24	25-26	22.1	22.2
NAP	12,2	40,3	43,8	16,4	543	478
ACY					13	6
ACE	1,84	4,13	1,53	1,53	98	63
FLU	1,14	2,60	3,37	3,06	164	229
PHE			3,30	4,27	76	66
FLT	< 0,2	1,14	0,68	0,60	40	30
PYR	2,51	2,24	3,10	2,23	77	75
B(b)FLU			1,58		30	
B(a)FLU					< 5	
B(c)FLU			0,52		6	
1-MPYR			0,53		10	17
B(a)ANT					83	56
TPH	1,11		1,83		19	13
CHR			2,38		28	13
5-MCHR			4,04			
B(b)FLT	1,78	3,61	3,51	2,16	122	63
B(k)FLT					98	35
B(j)FLT	0,70		1,01		59	27
B(e)PYR			1,51		79	42
B(a)PYR	1,75	3,78	5,49		179	98
I(cd)PYR	1,57		6,36	2,10	77	70
DB(a,h)ANT					241	73
B(ghi)PER	< 2		5,28		84	76
n (HAP)	11	7	18	8	22	19
Σ c(HAP)	25	58	90	32	2,1·10 <sup>3</sup>	1,5·10 <sup>3</sup>
INDO	17,6	6,10	13,0	22,5	184	183
PHTLA	1,19	7,51	8,29	2,07	131	101
1,4-NAPQ	2,62			114		
NAPL	11,5	13,9	18,2	11,8	519	425
ANTQ	6,25		5,92		19	16
NAPA		11,2	5,08			
B(a)FLUO					15	16
B(c)FLUO			0,80	17,8	19	
B(b)FLUO			4,17		20	30

BANTO	< 0,5		4,22		42	73
BANTQ			4,18		22	39
NACEQ					32	20
<b>n (OHAP)</b>	6	4	8	5	10	11
<b>Σ c(OHAP)</b>	39	39	64	168	1,0·10 <sup>3</sup>	0,91·10 <sup>3</sup>
<b>n (NHAP)</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Σ c(NHAP)</b>						
QUI	19,2	13,0	22,4	15,2	536	512
isoQUI	3,40	1,70	3,70	2,74	39	63
PHI						102
CAR					42	99
B(c)ACR						5
B(a)ACR			0,94	3,00		
B(a)CAR		40,9		3,83		
B(b)CAR						
DB(c,h)ACR						
DB(a,c)ACR						
DB(a,h)ACR						
DB(a,j)ACR	2,98		5,83	2,97		
DB(c,g)CAR						
<b>n (AZA)</b>	3	3	4	5	3	4
<b>Σ c(AZA)</b>	26	55	33	28	0,62·10 <sup>3</sup>	0,78·10 <sup>3</sup>
B(b)T					9	17
BTH	9,96	17,4	26,0	15,0	406	256
DBT					8	13
BN(2,1)T			0,98		21	23
BN(1,2)T			0,82		7	11
BN(2,3)T						13
<b>n (SHAP)</b>	1	1	3	1	5	6
<b>Σ c(SHAP)</b>	10	17	28	15	0,45·10 <sup>3</sup>	0,33·10 <sup>3</sup>
<b>n (CAP)</b>	21	15	33	19	40	40
<b>Σ c(CAP)</b>	99	169	214	243	4,2·10 <sup>3</sup>	3,5·10 <sup>3</sup>

### 5.2.3. Logement 5T

Les résultats des analyses de CAP effectuées au niveau du logement du 5ème étage côté tramway sont présentés dans la Table 5.IV.

Les concentrations totales de CAP retrouvées dans les PM<sub>10</sub> et les contributions relatives de chaque groupe sont résumées dans la Figure 5.3.c.

La concentration totale en CAP dans l'échantillon de PM<sub>10</sub> à l'extérieur du logement 5T (86 ng/m<sup>3</sup>) du 23-24 février est comparable à celle mesurée sur le balcon du logement 2T (99 ng/m<sup>3</sup>). La proportion en AZA et en SHAP est également identique dans ces échantillons. Seule la proportion en OHAP du 5T est supérieure à celle du 2T, et inversement pour la proportion en HAP (voir Figure 5.3, b et c).

En revanche, l'échantillon extérieur du 25-26 février est un nouvel exemple de pic de contamination par la 1,4-naphtoquinone. Sa concentration dans cet échantillon est de 211 ng/m<sup>3</sup> pour une concentration totale en CAP de 393 ng/m<sup>3</sup>, soit une contribution de 54 % pour ce seul composé. Si on omet 1,4-NAPQ, on retrouve une somme des CAP à 182 ng/m<sup>3</sup>, toute proche des 169 ng/m<sup>3</sup> du logement 2T.

Dans le logement 5T, 1,4-NAPQ a cette fois été retrouvée dans tous les échantillons de PM<sub>10</sub> prélevés, mais toujours pas dans les poussières déposées.

En revanche, il est intéressant de noter qu'en-dehors de ce pic de concentration de 1,4-NAPQ, d'autres OHAP ont été retrouvés de manière consistante dans les prélèvements de particules du logement 5T. Ainsi, 5T est le seul logement pour lequel les OHAP sont toujours le groupe prédominant dans les 4 échantillons de PM<sub>10</sub> (de 46 à 71 %, voir Figure 5.3.c). Outre 1,4-NAPQ, des composés comme INDO, B(c)FLUO ou BANTO ont pu être retrouvés à des niveaux allant jusqu'à plusieurs dizaines de ng/m<sup>3</sup> dans certains prélèvements de PM<sub>10</sub> du logement 5T. Peut-être que la localisation de l'appartement peut expliquer cette observation : 5T est situé plus loin des axes de transport (ligne de tramway et axes routiers), et plus haut en altitude. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse qu'entre leur lieu d'émission et le préleveur de PM<sub>10</sub>, les HAP risquent de subir plus de réactions de photo-oxydation dans l'atmosphère, et donc plus de OHAP seront formés en amont du prélèvement 5T, comparativement à 2R et 2T.

Pour 5T, il est particulièrement difficile de donner une conclusion sur les ratios de concentration intérieur / extérieur, car ceux-ci se sont avérés peu stables entre les deux périodes de mesure, et aussi fortement affectés par des pics de concentration de composés individuels comme 1,4-NAPQ, NAPA ou B(a)CAR.

Les analyses de CAP dans les poussières de 5T ont donné des résultats cohérents avec les analyses des PM<sub>10</sub> et avec celles des poussières des autres logements : là aussi, les composés les plus concentrés sont parmi les plus volatils : NAP, FLU, NAPL, INDO, QUI et BTH.

Pour les poussières de 5T, les résultats d'analyse s'avèrent très reproductibles entre les deux répliquats de prélèvement, qui ont été réalisés sur deux moitiés du même tapis (voir Table 5.1). En effet, sur la somme de chaque groupe de CAP, l'écart relatif entre les duplicats est de 6,4 % pour les OHAP à 10,5 % pour les AZA.

Dans le cas du logement 5T, l'analyse des poussières est particulièrement significative, puisque les ratios « poussières /  $PM_{10,interieur}$  » évoqués sont plus élevés que ceux de 2T (voir 5.2.2). En revanche, pour 5T comme pour 2T, c'est le fluorène qui présente la valeur maximale de ce ratio ( $135 \text{ m}^3/\text{g}$ ). Et pour 5T comme pour 2T, lorsqu'on compare les groupes de CAP, on observe que ce sont les HAP qui sont les plus accumulés dans les poussières ( $39 \text{ m}^3/\text{g}$ ), alors que les OHAP sont les moins accumulés ( $9 \text{ m}^3/\text{g}$ ).



**Table 5.IV : Concentrations de CAP mesurées dans le logement « 5T » du 22 au 26 février 2021, dans les PM<sub>10</sub> extérieures et intérieures (2x2 jours) et dans les poussières (2 prélèvements)**

CAP	PM <sub>10</sub> , extérieur ng/m <sup>3</sup>		PM <sub>10</sub> , intérieur ng/m <sup>3</sup>		Poussières ng/g	
	23-24	25-26	23-24	25-26	22.1	22.2
NAP	8,60	13	23,4	21,7	1062	1265
ACY					19	23
ACE		2,17			245	329
FLU	1,28	2,37	3,03	3,64	444	453
PHE	1,43	2,83	5,98	3,18	119	117
ANT		8,07				
FLT	0,34	1,91	3,07	0,35	57	57
PYR	0,50	5,73			117	111
B(b)FLU						28
B(c)FLU					16	23
1-MPYR			1,11		17	24
B(a)ANT			1,69		69	43
TPH			2,67	1,45	13	23
CHR		1,97	4,22	1,17	59	34
5-MCHR			4,08			
B(b)FLT	1,19	1,83	10,5	9,90	77	68
B(k)FLT		1,18		1,51	28	24
B(j)FLT					34	36
B(e)PYR		0,62	3,08	1,14	52	57
B(a)PYR		24,2	7,17	5,29	114	102
I(cd)PYR		4,43	9,75		76	82
DB(a,h)ANT			5,55		20	72
B(ghi)PER			9,06	5,04	78	69
n (HAP)	6	13	15	11	20	21
Σ c(HAP)	13	70	94	54	2,7·10 <sup>3</sup>	3,0·10 <sup>3</sup>
INDO	15,9	30,1	19,5	23,4	415	440
PHTLA	5,98	2,37	9,56	12,3		
1,4-NAPQ	13,8	211	82,8	25,5		
NAPL	6,96	15,3	17,8	11,9	1359	1530
ANTQ			10,2		26	23
NAPA	2,22		71,1	14,8	25	
B(a)FLUO			6,37		16	17
B(c)FLUO		19,0	38,0		5	
B(b)FLUO			8,32		23	27

BANTO			39,3		< 4	< 5
BANTQ			8,62		40	54
NACEQ			12,9			
B(cd)PYRO			19,6			
<b>n (OHAP)</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>7</b>
<b>Σ c(OHAP)</b>	<b>45</b>	<b>278</b>	<b>344</b>	<b>88</b>	<b>1,9·10<sup>3</sup></b>	<b>2,1·10<sup>3</sup></b>
4-NPYR					65	
<b>n (NHAP)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Σ c(NHAP)</b>					<b>65</b>	
QUI	16,0	24,3	27,4	19,3	1326	1133
isoQUI	3,14	3,07	5,11	4,87	148	106
CAR					58	58
B(c)ACR			0,41			7
B(a)ACR			1,90			17
B(a)CAR			98,5			
DB(c,h)ACR			1,04			
DB(a,j)ACR	2,54	3,31	5,78	5,33		
<b>n (AZA)</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
<b>Σ c(AZA)</b>	<b>22</b>	<b>31</b>	<b>140</b>	<b>29</b>	<b>1,5·10<sup>3</sup></b>	<b>1,3·10<sup>3</sup></b>
B(b)T					21	23
BTH	6,25	11,0	12,7	19,0	706	598
DBT			0,16		10	11
BN(2,1)T			1,57		16	24
BN(1,2)T			0,94		5	9
BN(2,3)T			1,35			5
<b>n (SHAP)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Σ c(SHAP)</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>0,76·10<sup>3</sup></b>	<b>0,67·10<sup>3</sup></b>
<b>n (CAP)</b>	<b>15</b>	<b>22</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>38</b>	<b>39</b>
<b>Σ c(CAP)</b>	<b>86</b>	<b>390</b>	<b>595</b>	<b>191</b>	<b>7,0·10<sup>3</sup></b>	<b>7,1·10<sup>3</sup></b>

23-24 fév. 2021

25-26 fév. 2021

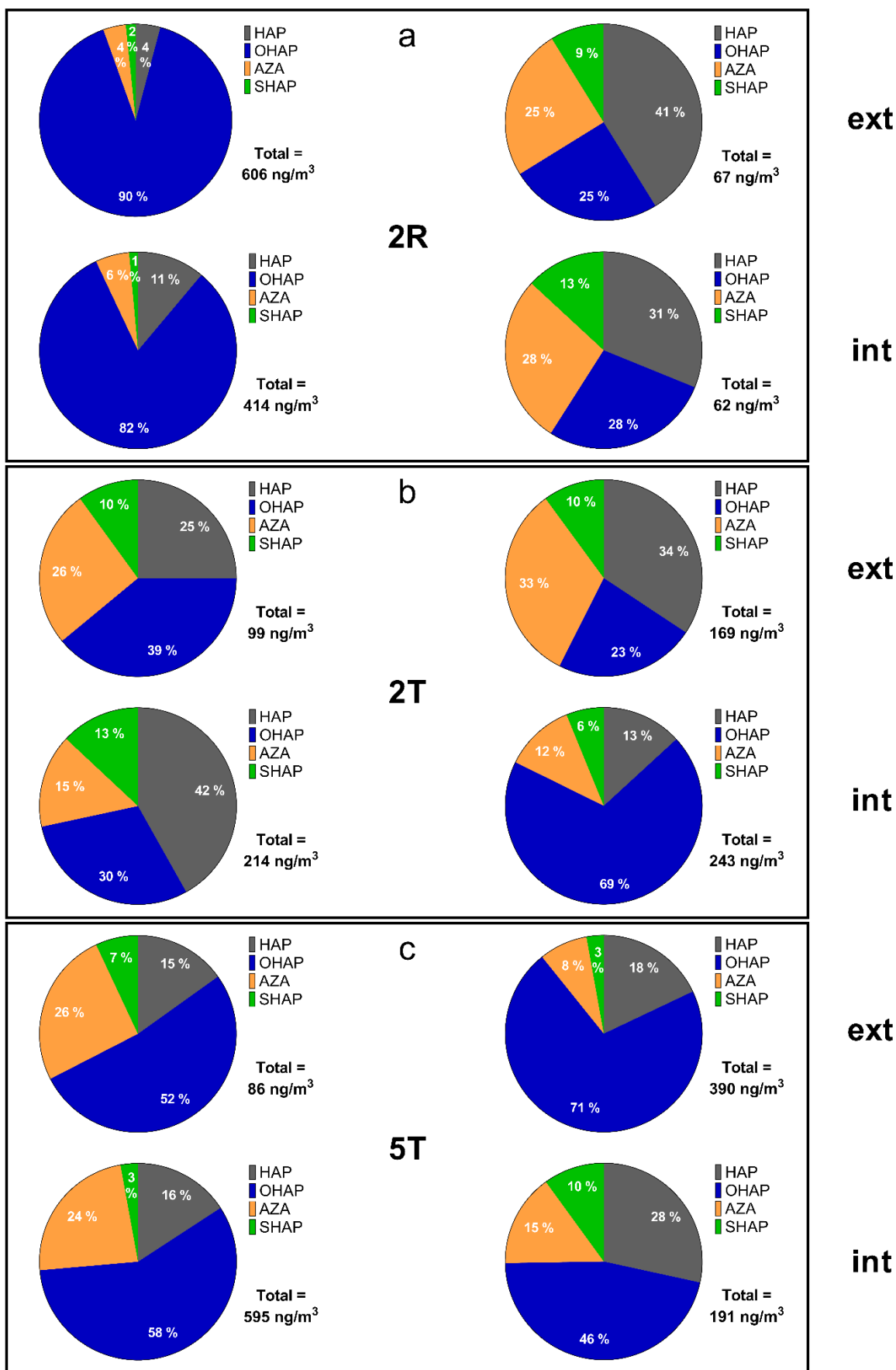


Figure 5.3 : Répartition des CAP entre les différents groupes et concentrations totales mesurées dans les PM10 intérieures et extérieures des logements a) 2R ; b) 2T ; c) 5T

#### 5.2.4. Comparaison entre les trois logements

D'après les résultats présentés dans les sections 5.2.1 à 5.2.3, il est délicat de donner une conclusion définitive sur une pollution atmosphérique par les CAP qui serait plus importante au niveau d'un logement en particulier. En effet, les concentrations totales de CAP peuvent être très variables et les tendances observées ne sont pas répétables sur l'ensemble des prélèvements.

Une raison majeure à cette observation est la présence de pics de pollution par certains composés qui altèrent fortement les valeurs mesurées, comme expliqué dans les paragraphes précédents. Pour éliminer ces artefacts, on réalisera donc la comparaison des PM<sub>10</sub> des différents logements en excluant les composés suivants : 1,4-NAPQ, NACEQ et B(a)CAR.

Les résultats de cette comparaison des niveaux de CAP dans les logements 2R, 2T et 5T, sans prendre en compte les anomalies observées pour les trois molécules citées ci-dessus, sont présentés dans la Figure 5.4.

La Figure 5.4.a montre les concentrations mesurées dans les PM<sub>10</sub> sur les balcons des logements pour la période du 23 au 24 février. Les valeurs sont parfaitement cohérentes pour les trois logements étudiés, tant au niveau de la concentration totale que de la répartition parmi les différents groupes, ce qui laisse supposer d'une pollution « uniforme » par les CAP au niveau de la résidence étudiée.

En revanche, pour le prélèvement du 25-26 février, les niveaux de CAP mesurés dans le logement 5T sont supérieurs à ceux des deux autres logements pour tous les groupes sauf les SHAP. Ils sont particulièrement élevés pour les OHAP, comme discuté dans la section 5.2.3. A l'inverse, pour tous les groupes de CAP, c'est le logement 2R qui présente les concentrations les plus faibles, environ deux fois plus faibles que ceux des autres logements. Ainsi, la concentration totale en CAP y est de 67 ng/m<sup>3</sup>, alors qu'elle est de 129 ng/m<sup>3</sup> au niveau de 2T et de 179 ng/m<sup>3</sup> au niveau de 5T (voir Figure 5.4.b).

Il est ensuite particulièrement intéressant de relever que les concentrations des CAP dans les PM<sub>10</sub> à l'intérieur des logements le 25 et le 26 février sont particulièrement corrélées à celles des PM<sub>10</sub> extérieures. On observe effectivement une somme des CAP à 62 ng/m<sup>3</sup> pour 2R, 125 ng/m<sup>3</sup> pour 2T et 165 ng/m<sup>3</sup> pour 5T, des niveaux équivalents à ceux mesurés sur les balcons respectifs de ces trois appartements (voir Figure 5.4.d). Cette observation vient renforcer l'hypothèse selon laquelle la pollution urbaine ambiante serait la principale source de CAP à l'intérieur des logements étudiés.

La même observation peut être faite pour les échantillons intérieurs et extérieurs du logement 2R sur la période du 23-24 février (111 ng/m<sup>3</sup> à l'intérieur, 102 ng/m<sup>3</sup> à l'extérieur) (voir Figure 5.4, a et c). En revanche, pour les deux autres logements, les niveaux de concentration en CAP sont beaucoup plus importants à l'intérieur sur cette même période, alors que la pollution mesurée à l'extérieur était équivalente pour tous les composés. Sur les deux séries de

prélèvement de deux jours, on observe donc une tendance constante avec la hiérarchie de concentration en CAP suivante : 5T > 2T > 2R.

Le logement le plus haut, celui du 5<sup>ème</sup> étage, serait donc plus affecté par les CAP que ceux du 2<sup>ème</sup> étage, et les logements situés du côté du tramway seraient eux plus contaminés que celui face à la route.

En étudiant uniquement trois appartements, il n'est néanmoins pas possible d'en déduire un lien de cause à effet entre situation du logement et pollution par les CAP, car les habitudes de vie des occupants (aération, sources de combustion à l'intérieur du logement, etc ...) peuvent avoir une influence importante sur les mesures effectuées.

Enfin, lorsqu'on étudie les niveaux des CAP dans les poussières, les résultats diffèrent fortement selon le type de concentration étudiée.

Si on s'intéresse à leur concentration pour une masse de poussière donnée, le logement 2R apparaît comme celui présentant les plus fortes teneurs en CAP des poussières (somme à hauteur de 22,5 µg/g, contre 7,1 µg/g pour 5T et 3,8 µg/g pour 2T) (voir Figure 5.4.e).

En revanche, comme nous l'avons présenté dans la Table 5.I, le logement 2R a pour particularité d'avoir une très faible densité surfacique de poussières (environ 14 fois moins que 5T, et 26 fois moins que 2T). En l'absence de tapis, qui aurait le potentiel d'accumuler la poussière, le prélèvement a été réalisé sur une surface élevée de parquet, pour une faible masse de poussières récupérée. Ainsi, lorsqu'on rapporte les concentrations de CAP à la surface de sol prélevée, les résultats s'inversent, et c'est alors le logement 2R qui apparaît comme le moins pollué (0,7 µg/m<sup>2</sup> de CAP au total), alors que 2T et 5T montrent sensiblement les mêmes niveaux de CAP dans les poussières déposées (3,2 et 3,1 µg/m<sup>2</sup> de CAP au total, respectivement) (voir Figure 5.4.f).

Le résultat obtenu en rapportant les niveaux de CAP à la surface de sol prélevée par aspiration est donc plus en adéquation avec l'observation effectuée sur les PM<sub>10</sub> que celui issu des concentrations massiques de CAP en ng/g.

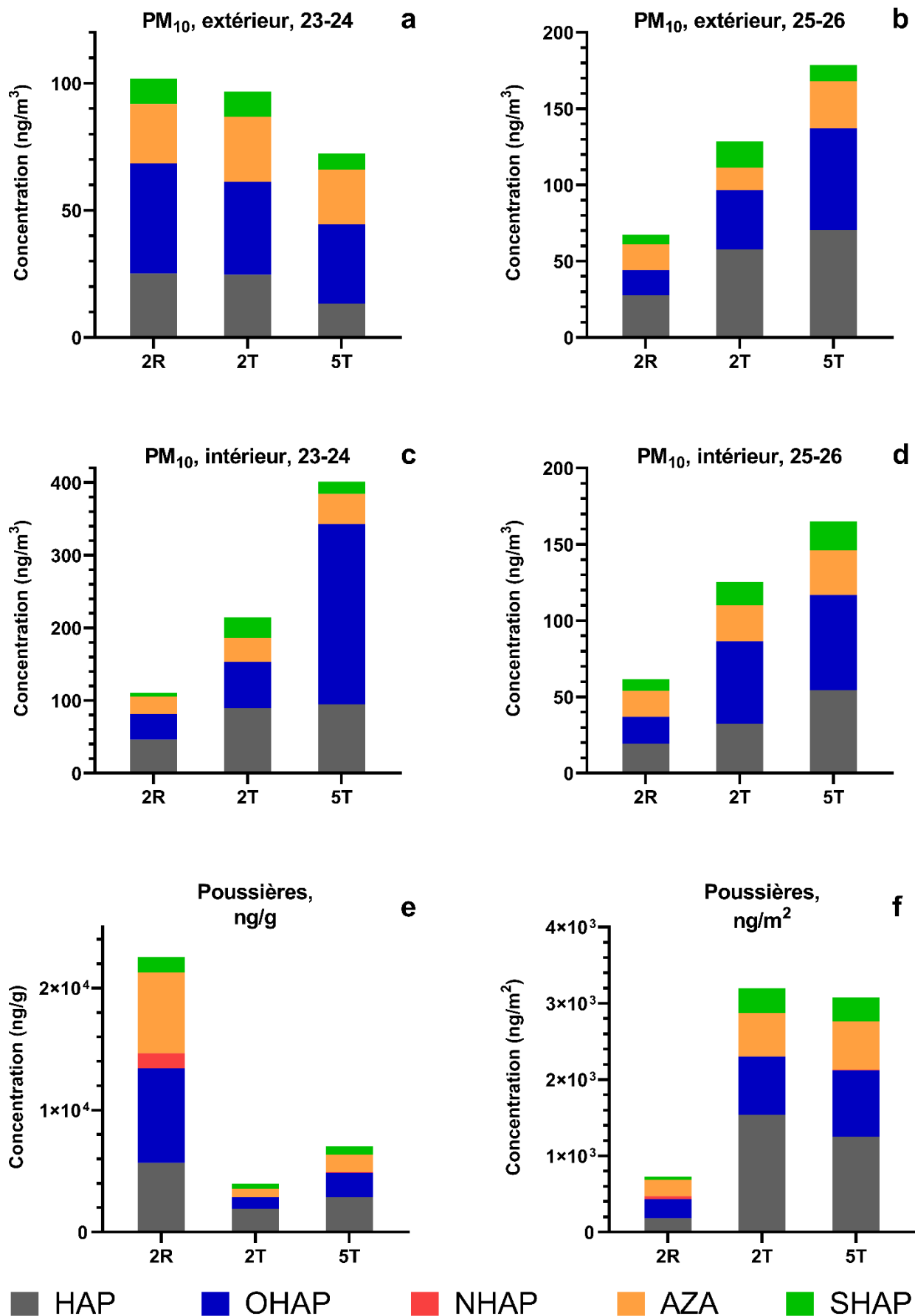


Figure 5.4 : Comparaison des concentrations de CAP mesurées dans les PM<sub>10</sub> extérieures (a et b), les PM<sub>10</sub> intérieures (c et d) et les poussières (e et f) des logements 2R, 2T et 5T

### 5.3. Remarques générales sur les concentrations de CAP observées

#### 5.3.1. Niveaux de polluants atmosphériques principaux sur la période de prélèvement

Afin de pouvoir interpréter les concentrations de CAP décrites dans ce chapitre, nous les avons mises en relation avec celles de certains polluants atmosphériques, mesurées de façon routinière pour surveiller la qualité de l'air au quotidien. En particulier, nous nous sommes concentrés sur les niveaux de particules PM<sub>10</sub> et sur la concentration en ozone (O<sub>3</sub>).

Ces données ont été obtenues avec le soutien d'Atmo Grand Est et sont disponibles en « Open Data »<sup>8</sup>. Elles sont répertoriées dans la Table 5.V en incluant pour chaque polluant la valeur journalière pour nos quatre jours de prélèvement (du 23 au 26 février 2021) ainsi que pour les deux jours qui précédaient (21 et 22 février 2021), mais aussi la moyenne sur l'ensemble du mois de février 2021, et la moyenne sur l'année 2021. Les résultats sur deux sites de prélèvement routiniers d'Atmo Grand Est ont été exploités, l'un représentant une pollution urbaine « de fond » (Strasbourg Nord) et l'autre représentant une pollution influencée par le trafic routier (Strasbourg A35). Pour le site Strasbourg A35, seules les concentrations de PM<sub>10</sub> étaient disponibles.

**Table 5.V : Concentrations des principaux polluants atmosphériques (PM<sub>10</sub> et O<sub>3</sub>) à Strasbourg du 21 au 26 février 2021, en comparaison à leurs moyennes mensuelles et annuelles<sup>8</sup>**

Site	Niveaux de polluants (µg/m <sup>3</sup> )	21/02	22/02	23/02	24/02	25/02	26/02	Moyenne mensuelle (02/2021)	Moyenne annuelle (2021)
Strasbourg Nord	PM <sub>10</sub>	43	37	44	67	92	52	26	17
	O <sub>3</sub>	15	6	13	16	20	27	29	42
Strasbourg A35	PM <sub>10</sub>	56	67	53	86	105	70	40	23

La concentration de particules dans l'air ambiant nous indique que l'étude environnementale effectuée au cours de cette thèse a été réalisée sur une période de pollution atmosphérique importante. En effet, pour le site urbain de fond comme pour le site de trafic routier, les valeurs de PM<sub>10</sub> relevées sont nettement supérieures aux moyennes annuelles de ces mêmes sites. On peut même observer un pic de concentration de particules le 25 février avec une valeur de 92 µg/m<sup>3</sup> pour Strasbourg Nord (3,5 fois la moyenne mensuelle et 5,4 fois la moyenne annuelle), et de 105 ng/m<sup>3</sup> pour Strasbourg A35 (2,6 fois la moyenne mensuelle et 3,6 fois la moyenne annuelle). On peut d'ailleurs ajouter que ces valeurs du 25 février sont supérieures au

seuil d'alerte fixé en France pour la pollution aux PM<sub>10</sub> qui est de 80 µg/m<sup>3</sup>, et que les niveaux de PM<sub>10</sub> sont supérieurs à la limite journalière pour la protection de la santé humaine fixée par l'Union Européenne (UE) qui est de 50 µg/m<sup>3</sup> lors des 6 jours étudiés sur le site Strasbourg A35, et pour 3 jours sur 6 sur le site Strasbourg Nord <sup>9</sup>.

Selon les données de la Table 5.V, la période de prélèvement du 23-24 février correspond à une pollution légèrement plus faible (56 µg/m<sup>3</sup> de PM<sub>10</sub> en moyenne à Strasbourg Nord) que celle du 25-26 février (72 µg/m<sup>3</sup> de PM<sub>10</sub> en moyenne à Strasbourg Nord).

Ceci se confirme pour les concentrations de CAP dans les échantillons extérieurs prélevés au niveau des logements 2T et 5T, mais pas pour le logement 2R (voir 5.2).

A l'inverse des particules dont la concentration est généralement plus élevée en hiver que le reste de l'année, notamment à cause du chauffage des bâtiments et des conditions météorologiques, l'ozone troposphérique est moins abondant en hiver, puisqu'il est formé sous l'action du rayonnement ultraviolet. Cela se vérifie avec les données présentées ici, puisque toutes les concentrations en O<sub>3</sub> de la Table 5.V sont bien inférieures à la moyenne annuelle, et même inférieures à la moyenne mensuelle de février 2021.

Nos prélèvements de particules devraient donc être peu affectés par l'activité photolytique et photooxydative de l'atmosphère, d'après les informations dont nous disposons sur l'ozone. Cela suggère, entre autres, que les OHAP mesurés dans nos échantillons ont une plus grande probabilité de provenir d'émissions directes que de formation secondaire par photo-oxydation des HAP.

Ainsi, comme les niveaux d'espèces oxydantes dans l'atmosphère sont relativement faibles, les HAP émis sur notre période de prélèvement devraient rester majoritairement sous leur forme primaire plutôt qu'être transformés en produits d'oxydation. On pourrait donc supposer que parmi tous les CAP recherchés, les HAP devraient être prédominants dans les PM<sub>10</sub> extérieurs. Ce résultat n'est pourtant observé que pour 2 échantillons sur 6, ceux du 25-26 février pour les logements 2R et 2T (voir Figure 5.3).

Tomaz *et al* avaient fait une observation similaire lors d'un épisode de pollution hivernal : ayant observé une somme des OHAP excédant celle des HAP, les auteurs ont émis l'hypothèse que malgré une prédominance des sources d'émission primaire, au vu de la forte quantité de polluants atmosphériques accumulés sur cette période, les procédés de formation secondaire des OHAP pouvaient tout de même être favorisés <sup>10</sup>.



### 5.3.2. Comparaison des concentrations de CAP retrouvées à celles de la littérature

Afin de mettre en perspective les concentrations de CAP dans les particules et les poussières mesurées au cours de ces travaux, celles-ci ont été comparées à des valeurs obtenues lors de travaux similaires répertoriés dans la littérature depuis 2010.

Pour cela, il a été choisi de comparer les valeurs de concentrations individuelles moyennes des CAP des différentes études, afin de s'affranchir des différences de nombre de composés analysés. En effet, la comparaison de somme de concentrations individuelles aurait été fortement biaisée par le nombre de molécules recherchées qui peut grandement varier d'une étude à l'autre.

Cette comparaison est représentée graphiquement dans la Figure 5.5. Chaque point noir correspond à une valeur d'occurrence de la littérature, et les points correspondant aux concentrations de notre étude ont été indiqués par différentes formes et couleurs. Une échelle logarithmique a été choisie pour mieux visualiser des résultats qui peuvent varier de plusieurs puissances de 10. La ligne rouge correspond à la médiane de toutes les valeurs.

Pour les aérosols extérieurs, suffisamment de données ont été rassemblées pour pouvoir comparer les résultats sur les HAP, les OHAP et les AZA. En revanche, au vu du peu de résultats existants dans la littérature sur les aérosols intérieurs et les poussières, seule la catégorie des HAP a pu être comparée à la littérature pour ces matrices. Afin de rassembler une plus grande quantité de données, les comparaisons d'occurrence dans les PM ont été réalisées quelle que soit la fraction de taille de particules étudiée.

Les articles dont sont issus les données de la Figure 5.5 sont les suivants :

- pour les aérosols extérieurs : <sup>11-33</sup>
- pour les aérosols intérieurs : <sup>14,17,20,34-36</sup>
- pour les poussières : <sup>17,37-44</sup>

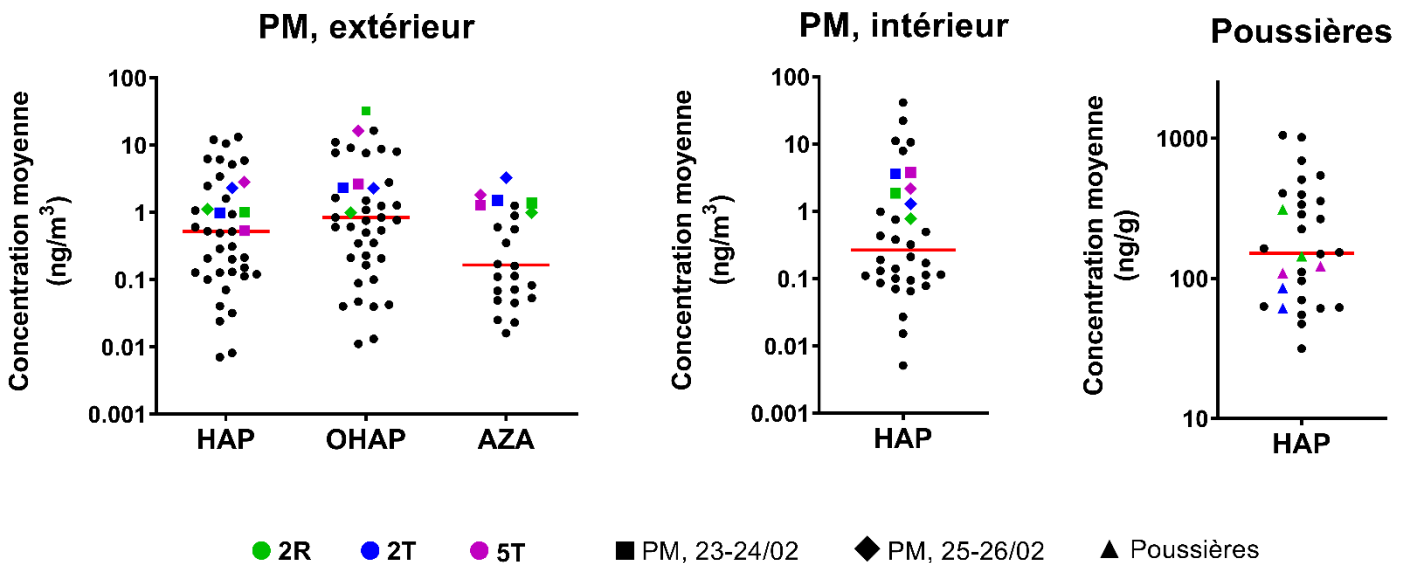


Figure 5.5 : Comparaison des concentrations de CAP des logements 2R, 2T et 5T de cette étude avec des concentrations retrouvées dans des articles de la littérature datés de 2010 à 2022

Les résultats de la Figure 5.5 montrent que les concentrations de CAP mesurées dans les PM<sub>10</sub> sont particulièrement élevées par rapport aux niveaux d'occurrence habituels de ces composés. En effet, toutes nos concentrations individuelles moyennes sont supérieures à la valeur médiane de chaque catégorie. On peut donc dire que les niveaux de concentration de CAP au niveau de la résidence étudiée à Strasbourg sur la période du 23 au 26 février 2021 ont été particulièrement élevés.

Ce résultat concorde avec les données de pollution atmosphérique d'Atmo Grand Est présentées auparavant. Les prélèvements ont été réalisés lors d'un pic de pollution aux particules supérieur aux limites sanitaires, ce qui explique les niveaux élevés de CAP mesurés. De plus, il faut souligner que nos prélèvements ont été effectués de jour uniquement. Or les concentrations de CAP étant généralement plus élevées de jour que de nuit du fait des émissions par le trafic routier et le chauffage résidentiel, le cumul de prélèvement diurnes et nocturnes aurait probablement donné des concentrations plus faibles.

Si l'on s'intéresse de plus près aux données de la Figure 5.5, on remarquera que dans le cas des azaarènes, nos six prélèvements extérieurs constituent six des sept niveaux d'azaarènes les plus élevés répertoriés dans la littérature, à notre connaissance. La seule concentration moyenne d'AZA aussi élevée dans la littérature a été mesurée à Xi'an, en Chine, dans une ville connue pour être très touchée par la pollution atmosphérique avec de très hauts niveaux de particules <sup>24</sup>.

De même, si pour les HAP aucun « record » n'a été battu dans notre étude, les valeurs de concentrations supérieures aux nôtres avaient généralement été mesurées dans des pays plus affectés par la pollution de l'air que les pays européens (Chine, Afghanistan) <sup>18,22,24,25</sup>. Les concentrations relevées à l'extérieur des logements 2R, 2T et 5T entre le 23 et le 26 février 2021 sont environ similaires à celles mesurées par Keyte *et al* dans le tunnel du Parc des Princes à Paris ou encore par Delgado-Saborit *et al* au bord d'une route à Birmingham en Angleterre <sup>14,16</sup>.

Enfin, on peut donner pour les OHAP la même conclusion que pour les HAP, puisque seules les concentrations mesurées en Chine et en Afghanistan sont supérieures à celles de cette étude <sup>18,22,25,26</sup>, à l'exception des concentrations retrouvées à Porto au Portugal par Alves *et al* <sup>11</sup>. De plus, le prélèvement du 23-24 du logement 2R et celui du 25-26 du logement 5T montrent même les plus hautes concentrations moyennes de OHAP jamais relevées. Ces exceptions avaient déjà été discutées en détail dans la section 5.2, où nous avons souligné l'importance des teneurs anormalement élevées en certains composés particuliers, qui ont donc considérablement altéré les niveaux de OHAP jusqu'à les faire dépasser toutes les autres valeurs de la littérature.

Les mesures de HAP dans les PM<sub>10</sub> à l'intérieur des logements 2R, 2T et 5T montrent également des concentrations très élevées par rapport aux références de la bibliographie, même si l'interprétation est plus délicate car il existe quantitativement moins d'études d'occurrence des CAP dans les environnements intérieurs dans la littérature. Là aussi, nos six prélèvements sont tous supérieurs à la médiane, et les seules concentrations qui leur sont supérieures proviennent d'une étude particulière de Li *et al* sur des environnements intérieurs très affectés par différents

types de cuisine, dans laquelle les prélèvements ont été réalisés simultanément à des combustions <sup>35</sup>.

Nos résultats sur les PM<sub>10</sub> intérieures montrent donc que le logement des résidents urbains, dans lequel ils passent une grande partie de leur temps, peut être très affecté par des épisodes de pollution atmosphérique tels que celui du 23 au 26 février 2021, y compris dans des villes moyennes d'Europe occidentale.

Alors, nos résultats sur les poussières déposées sont particulièrement intéressants, puisqu'ils caractérisent une accumulation de CAP sur plusieurs jours, et comme ces échantillons ont été collectés avant le pic de pollution décrit précédemment, ils n'en seront pas affectés.

Ainsi, la tendance s'inverse pour nos échantillons : cinq de nos six concentrations sont inférieures à la valeur médiane. La sixième, qui correspond à la valeur la plus élevée mesurée pour le logement 2R, avait d'ailleurs été « relativisée » dans la section 5.2.4, puisqu'on y avait montré qu'elle paraissait significativement moins élevée lorsqu'elle était rapportée à la surface de prélèvement (en ng/m<sup>2</sup>). Ici, la comparaison a été effectuée avec les concentrations en ng/g, qui sont le plus souvent rapportées dans la littérature.

On peut donc conclure en soulignant que si le site résidentiel urbain étudié au cours de ces travaux peut être fortement affecté par des teneurs élevées en CAP dans l'atmosphère lors de pics de pollution, les concentrations retrouvées dans les poussières des logements sont en adéquation avec des concentrations classiquement retrouvées dans différentes études environnementales de ce type.

Cela permet également de mettre en avant l'intérêt d'étudier la matrice « poussières déposées » lorsqu'on veut caractériser la pollution des environnements intérieurs. Les prélèvements de PM<sub>10</sub> à l'intérieur des logements réalisés dans cette étude ont été plus compliqués à mettre en place car plus contraignants pour les occupants des logements et sources de nuisances sonores. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous avons restreint les prélèvements à seulement deux fois deux jours. A l'inverse, en un seul prélèvement ponctuel, les poussières nous ont donné plus de détections de CAP que les PM<sub>10</sub> (voir Tables 5.II, 5.III et 5.IV), et des résultats plus représentatifs de l'exposition « moyenne » des résidents.

### *5.3.3. Remarques sur certains CAP d'intérêt particulier*

Parmi tous les Composés Aromatiques Polycycliques, un seul dispose d'une valeur réglementaire : le benzo(a)pyrène (B(a)PYR). Elle a été fixée par l'UE à 1 ng/m<sup>3</sup> en moyenne annuelle dans les PM<sub>10</sub> <sup>9</sup>. B(a)PYR est l'un des HAP les plus toxiques et il est utilisé depuis longtemps comme « référence » de toxicité au sein de cette catégorie <sup>45</sup>.

Dans nos échantillons de PM<sub>10</sub>, B(a)PYR a été quantifié au-delà de 1 ng/m<sup>3</sup> quatre fois sur six à l'intérieur des logements et cinq fois sur six à l'extérieur, avec un maximum à 24 ng/m<sup>3</sup> à l'extérieur du logement 5T le 25-26 février (voir Table 5.IV). Ce résultat est inquiétant sur le plan

sanitaire, mais on peut rappeler que la valeur limite est calculée sur la moyenne d'une année complète, or les concentrations de notre étude correspondent à une période de 2 fois 10 heures, en journée seulement, lors d'un épisode de pollution. Il faut donc relativiser son importance, même s'il démontre à nouveau l'ampleur des concentrations de CAP auxquelles on peut être exposé ponctuellement.

Il est également intéressant de recenser les CAP qui ont été détectés dans l'ensemble des 18 échantillons de cette étude. Une fréquence de détection de 100 % traduit en effet une certaine ubiquité d'un polluant dans les environnements étudiés. Ils sont ici au nombre de :

- 4 HAP : le naphthalène (NAP), le fluorène (FLU), le fluoranthène (FLT) et le benzo(b)fluoranthène (B(b)FLT). Tous ces composés sont inclus dans la liste des 16 HAP prioritaires de l'agence de protection de l'environnement américaine (US EPA) et sont étudiés depuis très longtemps <sup>46</sup>. Il n'est donc pas surprenant de les retrouver dans nos échantillons.

- 2 OHAP : l'indanone (INDO) et le naphthaldéhyde (NAPL). Ils ne sont pourtant pas réputés comme étant les composés majoritaires de leur catégorie. Ils ont néanmoins déjà été détectés et quantifiés dans plusieurs études auparavant, même s'ils ne sont jamais apparus comme les OHAP avec les plus hautes concentrations ou les plus hautes fréquences de détection <sup>6,11</sup>.

- 1 AZA : la quinoline (QUI). Ce composé avait déjà été présenté comme l'azaarène majoritaire dans les travaux de Alves *et al* et de Wei *et al* <sup>11,24</sup>. Il est émis lors de combustions comme beaucoup d'autres CAP, mais il est aussi employé dans des formulations de pneus, et peut donc être libéré par l'usure des pneus des véhicules.

- 1 SHAP : le benzothiazole (BTH). Si peu d'études d'occurrence des SHAP existent comparativement aux autres groupes de CAP, le benzothiazole est connu pour être un marqueur de la pollution par le trafic routier, indépendamment des combustions de carburant, puisque celui-ci est un composé très important dans les pneus en tant qu'agent de vulcanisation <sup>47,48</sup>. L'émission par le trafic routier de particules d'usure des matériaux (pneus, frein, route, etc ...) est une problématique environnementale émergente dont l'ubiquité de BTH dans nos échantillons vient renforcer l'importance.

## 5.4. Recherche des sources d'émission de CAP par l'étude de ratios diagnostics

Au vu de la complexité potentielle de la pollution atmosphérique dans un environnement urbain tel que celui étudié dans cette thèse, nous avons tenté d'identifier les principales sources d'émission de CAP responsables des niveaux retrouvés dans les échantillons. Pour cela, nous avons calculé des ratios diagnostics de CAP.

Cette approche a déjà été appliquée dans le Chapitre 4. Elle nous avait permis de confirmer que les CAP mesurés dans les PM<sub>10</sub> d'un parking résidentiel provenaient bien d'émissions de véhicules.

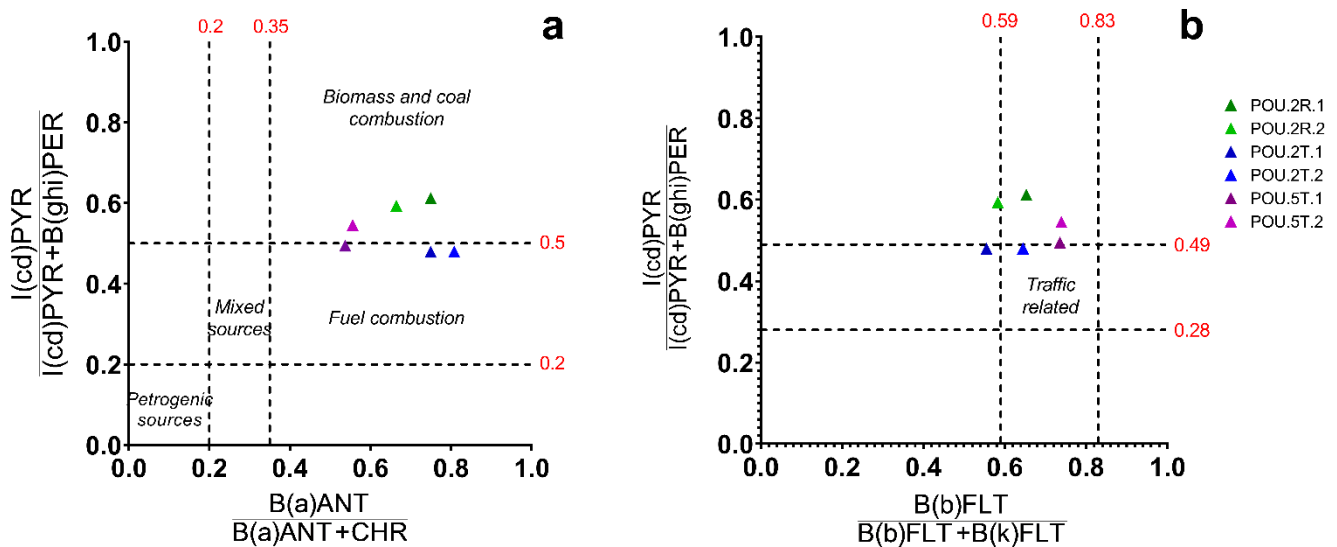
Nous avons donc recalculé les mêmes ratios diagnostics pour évaluer la contribution du trafic routier dans la présence de CAP dans les logements 2R, 2T et 5T : il s'agit des graphiques de corrélation (*cross-plots*) représentés en Figure 5.6 : en Figure 5.6.a le ratio  $I(cd)PYR / (I(cd)PYR + B(ghi)PER)$  en fonction du ratio  $B(a)ANT / (B(a)ANT + CHR)$  qui permet d'identifier un type de source d'émission<sup>7,49</sup> et en Figure 5.6.b le ratio  $I(cd)PYR / (I(cd)PYR + B(ghi)PER)$  en fonction du ratio  $B(b)FLT / (B(b)FLT + B(k)FLT)$  qui permet de déterminer si la présence des CAP est principalement due au trafic routier ou non<sup>50,51</sup>.

Ces ratios diagnostics n'ont pu être mesurés que pour les poussières déposées, puisque ces échantillons présentaient suffisamment de quantifications des HAP d'intérêt, au contraire des échantillons de PM<sub>10</sub> dans lesquels certains de ces HAP n'ont pas été détectés à plusieurs reprises. L'avantage de l'évaluation des ratios diagnostics dans les poussières est qu'elle est représentative de la contamination par les CAP sur un pas de temps plus long, mais son inconvénient est qu'elle est plus affectée par les différentes dégradations des HAP au cours du temps.

D'après la Figure 5.6.b, contrairement à ce qu'on pouvait supposer étant donné la localisation de la résidence, le trafic routier ne peut pas être clairement défini comme l'unique contributeur. En effet, un seul prélèvement (2T.2) présente des ratios parfaitement compatibles avec la zone caractéristique des émissions par le trafic routier. Néanmoins, les six points correspondant aux deux prélèvements de poussières de nos trois logements sont tous relativement proches de cette zone, suggérant une contribution au moins partielle des émissions véhiculaires dans nos échantillons. Étonnamment, ce sont les poussières des logements 2T et 5T qui apparaissent les plus proches de l'intervalle diagnostic du trafic routier, or c'est pourtant le logement 2R qui est situé au plus près de l'axe autoroutier et de l'axe routier majeur (voir Figure 5.1). Au sein d'une même résidence, l'exposition directe des logements face à la route ou non ne semble donc pas être reliée directement à une présence de CAP qui serait typique des émissions véhiculaires.

La Figure 5.6.a confirme que la combustion de carburants ne peut pas être présentée comme la source majoritaire des CAP pour tous les logements. Seules les poussières du logement

2T (qui sont également les plus proches de la zone « trafic routier » de la Figure 5.6.b) sont toutes les deux incluses dans la région du diagramme caractéristique de la combustion de carburants. À l'inverse, les prélèvements de 2R sont inclus dans une zone plutôt typique des combustions de biomasse ou de charbon. Ce résultat est plutôt inattendu, mais on pourrait ici penser que le chauffage au bois de certaines habitations du quartier de Cronenbourg, par exemple, est une source potentielle de CAP, complémentaire au trafic routier, qui pourrait affecter la teneur en CAP des poussières de 2R. Le logement 5T est lui à une situation plutôt intermédiaire entre la combustion de carburants et la combustion de biomasse ou de charbon.



**Figure 5.6 : Graphiques de corrélation de ratios diagnostiques d'identification des sources de CAP pour les échantillons de poussière des logements 2R, 2T et 5T de février 2021**

Ces résultats qui peuvent être très instructifs pour l'identification des sources de pollution principales en milieu urbain sont aussi à relativiser. D'après plusieurs études, les valeurs des ratios diagnostiques de HAP peuvent être fortement affectées par la photodégradation des HAP au cours du temps, or celle-ci n'est pas équivalente pour tous les HAP <sup>7,52</sup>.

D'après les travaux de Gbeddy *et al*, il existerait un ratio diagnostique de HAP moins susceptible que les autres à la photodégradation :  $B(a)PYR / B(ghi)PER$  <sup>52</sup>. S'il est supérieur à 0,6, il correspond à des émissions véhiculaires, alors que s'il est inférieur à 0,6, il traduit des émissions de CAP qui ne sont pas causées par le trafic routier <sup>7,52</sup>.

Dans notre étude sur les poussières, pour tous les échantillons, le ratio  $B(a)PYR / B(ghi)PER$  est supérieur à 0,6 (de 0,61 pour 2R.1 à 2,13 pour 2T.1) (voir Table 5.VI). Si l'on se fie à ce seul ratio diagnostique, on pourrait donc tout de même considérer le trafic routier, si ce n'est comme l'unique source de CAP, au moins comme une source très importante de leur présence dans les logements étudiés ici. Les résultats présentés en Figure 5.6 seraient donc expliqués soit par une contribution complémentaire d'autres sources, soit par une dégradation des HAP qui modifieraient artificiellement les ratios.

La dernière approche que l'on peut utiliser pour caractériser le mélange de CAP de nos échantillons est l'étude de ratios de dérivés polaires par rapport à leur HAP « parent ». Ceux-ci peuvent permettre de caractériser une formation secondaire des dérivés polaires issue de la photodégradation de leur HAP parent plus ou moins prononcée <sup>6</sup>.

Nous avons choisi de mesurer le ratio BANTQ / B(a)ANT dans les échantillons de poussières de 2R, 2T et 5T du fait des concentrations disponibles et des comparatifs existant dans la littérature. Les valeurs sont données dans la Table 5.VI. D'après ces valeurs, on identifie de nettes différences entre les logements : 2R montre une valeur de BANTQ / B(a)ANT beaucoup plus élevée que les autres logements, puisqu'elle y est supérieure à 3, alors que pour 5T elle varie de 0,59 à 1,25 et pour 2T de 0,27 à 0,71. L'activité photochimique de dégradation du HAP parent était donc plus élevée dans le logement 2R. Ce résultat s'alignerait avec la divergence des ratios diagnostics de la Figure 5.6 pour le logement 2R, qui s'éloignent de ceux de 2T et 5T et de la source véhiculaire. Il est donc bien possible que la composition du mélange de CAP du logement 2R ait été plus fortement affectée que les autres par des dégradations photochimiques post-émission. On peut se demander si cela est dû à la surface de prélèvement (du parquet), plus exposée à l'air libre que les tapis dans lesquels ont été collectées les poussières de 2T et 5T (voir Table 5.I).

À titre de comparaison, Bandowe *et al* ont mesuré un ratio BANTQ / B(a)ANT à une moyenne de 2 sur l'ensemble de l'année, avec des valeurs individuelles variant de 0,4 à 7, sachant que ce ratio est généralement plus faible en hiver qu'en été, puisque l'activité photochimique augmente avec le rayonnement UV et la température <sup>6</sup>. De plus, il est spécifié dans la revue de Walgraeve *et al* que ce type de ratio peut généralement varier de 0,1 en hiver à 2 en été <sup>53</sup>.

Ainsi, dans nos prélèvements de février, on pouvait s'attendre à des valeurs de l'ordre de 0,4 à 2, ce qui est bien vérifié pour 2T et 5T, mais pas pour 2R qui présente des valeurs supérieures, caractéristiques d'une activité photochimique particulièrement élevée.

**Table 5.VI : Ratios diagnostics d'intérêt pour caractériser les sources primaires et secondaires de CAP dans les poussières de 2R, 2T et 5T**

	<b>B(a)PYR / B(ghi)PER</b>	<b>BANTQ / B(a)ANT</b>
2R.1	0.61	3.30
2R.2	1.77	3.67
2T.1	2.13	0.27
2T.2	1.29	0.71
5T.1	1.47	0.59
5T.2	1.49	1.25

## 5.5. Conclusion

Dans ce dernier chapitre de la première partie de mes travaux de thèse, la présence de Composés Aromatiques Polycycliques dans les particules et les poussières d'un environnement urbain a été étudiée.

Les échantillons ont été collectés au cours d'un épisode hivernal de pollution aux particules, et des concentrations très élevées de CAP en ont résulté. En effet, les niveaux de CAP dans les PM<sub>10</sub> extérieures et intérieures des logements strasbourgeois étudiés ont atteint des valeurs parmi les plus élevées jamais rapportées dans la littérature. Ces concentrations ne sont probablement pas représentatives de l'exposition moyenne annuelle des habitants, puisque les teneurs en CAP mesurées dans les poussières des logements sont inférieures à la valeur médiane de notre recensement dans la littérature. Néanmoins, ces résultats soulignent l'ampleur des concentrations de CAP observables lors de pics de pollution, ainsi que l'infiltration potentielle des CAP à l'intérieur des habitations. La pollution atmosphérique intérieure est donc très importante à étudier compte tenu de la proportion importante du temps que nous passons à l'intérieur, et des niveaux de polluants organiques qui y sont retrouvés, équivalents voire supérieurs aux concentrations ambiantes extérieures.

Si l'étude de ratios diagnostics de HAP n'a pas permis de l'affirmer avec certitude, il est probable que le trafic routier, associé à d'autres sources telles que le chauffage des bâtiments, ait été une source majeure des CAP retrouvés dans les logements urbains de cette étude.



## 5.6. Références

- (1) Castro, D.; Slezakova, K.; Delerue-Matos, C.; Alvim-Ferraz, M. da C.; Morais, S.; Pereira, M. do C. *Atmos. Environ.* **2011**, *45* (10), 1799–1808.
- (2) Maertens, R. M.; Bailey, J.; White, P. A. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2004**, *567* (2–3), 401–425.
- (3) Galmiche, M.; Delhomme, O.; François, Y.-N.; Millet, M. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2021**, *134*, 116146.
- (4) Wnorowski, A.; Charland, J.-P. *Chemosphere* **2017**, *189*, 55–66.
- (5) Ojeda-Castillo, V.; López-López, A.; Hernández-Mena, L.; Murillo-Tovar, M.; Díaz-Torres, J.; Hernández-Paniagua, I.; del Real-Olvera, J.; León-Becerril, E. *Atmosphere* **2018**, *9* (4), 137.
- (6) Bandowe, B. A. M.; Meusel, H.; Huang, R.; Ho, K.; Cao, J.; Hoffmann, T.; Wilcke, W. *Sci. Total Environ.* **2014**, *473–474*, 77–87.
- (7) Tobiszewski, M.; Namieśnik, J. *Environ. Pollut.* **2012**, *162*, 110–119.
- (8) Atmo Grand Est. *Open Data ATMO Grand Est*.  
<https://data-atmograndest.opendata.arcgis.com/search?tags=Mesures> (accessed 2022-08-18).
- (9) Ministère de la Transition écologique et de la Cohésion des territoires; Ministère de la Transition énergétique. *Tableau des normes Qualité de l’Air*. [ecologie.gouv.fr](https://www.ecologie.gouv.fr/sites/default/files/01_Tableau-Normes-Seuils_réglementaires.pdf).  
[https://www.ecologie.gouv.fr/sites/default/files/01\\_Tableau-Normes-Seuils\\_réglementaires.pdf](https://www.ecologie.gouv.fr/sites/default/files/01_Tableau-Normes-Seuils_réglementaires.pdf) (accessed 2022-08-18).
- (10) Tomaz, S.; Shahpoury, P.; Jaffrezo, J.-L.; Lammel, G.; Perraudin, E.; Villenave, E.; Albinet, A. *Sci. Total Environ.* **2016**, *565*, 1071–1083.
- (11) Alves, C. A.; Vicente, A. M.; Custódio, D.; Cerqueira, M.; Nunes, T.; Pio, C.; Lucarelli, F.; Calzolari, G.; Nava, S.; Diapouli, E.; Eleftheriadis, K.; Querol, X.; Musa Bandowe, B. A. *Sci. Total Environ.* **2017**, *595*, 494–504.
- (12) Barrado, A. I.; García, S.; Barrado, E.; Pérez, R. M. *Atmos. Environ.* **2012**, *49*, 224–232.
- (13) De Guidi, G.; Librando, V.; Minniti, Z.; Bolzacchini, E.; Perrini, G.; Bracchitta, G.; Alparone, A.; Catalfo, A. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2012**, *32* (4), 439–456.
- (14) Delgado-Saborit, J. M.; Stark, C.; Harrison, R. M. *Environ. Int.* **2011**, *37* (2), 383–392.
- (15) Di Filippo, P.; Riccardi, C.; Pomata, D.; Buiarelli, F. *Atmos. Environ.* **2010**, *44* (23), 2742–2749.
- (16) Keyte, I. J.; Albinet, A.; Harrison, R. M. *Sci. Total Environ.* **2016**, *566–567*, 1131–1142.
- (17) Lim, H.; Sadiqsis, I.; de Oliveira Galvão, M. F.; Westerholm, R.; Dreij, K. *Sci. Total Environ.* **2021**, *755*, 142709.
- (18) Lin, Y.; Ma, Y.; Qiu, X.; Li, R.; Fang, Y.; Wang, J.; Zhu, Y.; Hu, D. *J. Geophys. Res. Atmospheres* **2015**, *120* (14), 7219–7228.
- (19) Ma, Y.; Cheng, Y.; Qiu, X.; Lin, Y.; Cao, J.; Hu, D. *Environ. Pollut.* **2016**, *219*, 742–749.
- (20) Madruga, D. G.; Ubeda, R. M.; Terroba, J. M.; dos Santos, S. G.; García-Camero, J. P. *Indoor Air* **2019**, *29* (5), 817–827.
- (21) Masala, S.; Lim, H.; Bergvall, C.; Johansson, C.; Westerholm, R. *Atmos. Environ.* **2016**, *140*, 370–380.
- (22) Niu, X.; Ho, S. S. H.; Ho, K. F.; Huang, Y.; Sun, J.; Wang, Q.; Zhou, Y.; Zhao, Z.; Cao, J. *Environ. Pollut.* **2017**, *231*, 1075–1084.
- (23) Scipioni, C.; Villanueva, F.; Pozo, K.; Mabilia, R. *Environ. Technol.* **2012**, *33* (7), 809–820.
- (24) Wei, C.; Han, Y.; Bandowe, B. A. M.; Cao, J.; Huang, R.-J.; Ni, H.; Tian, J.; Wilcke, W. *Sci. Total Environ.* **2015**, *505*, 814–822.
- (25) Wingfors, H.; Häggglund, L.; Magnusson, R. *Atmos. Environ.* **2011**, *45* (26), 4360–4369.
- (26) Du, W.; Chen, Y.; Shen, G.; Wang, W.; Zhuo, S.; Huang, Y.; Pan, X.; Tao, S. *Atmos. Environ.* **2018**, *187*, 210–217.
- (27) Gao, Y.; Yang, L.; Chen, J.; Li, Y.; Jiang, P.; Zhang, J.; Yu, H.; Wang, W. *Sci. Total Environ.* **2018**, *622–623*, 1400–1407.
- (28) Kitanovski, Z.; Shahpoury, P.; Samara, C.; Voliotis, A.; Lammel, G. *Atmospheric Chem. Phys.* **2020**, *20* (4), 2471–2487.

- (29) Lammel, G.; Kitanovski, Z.; Kukučka, P.; Novák, J.; Arangio, A. M.; Codling, G. P.; Filippi, A.; Hovorka, J.; Kuta, J.; Leoni, C.; Příbylová, P.; Prokeš, R.; Sánka, O.; Shahpoury, P.; Tong, H.; Wietzoreck, M. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54* (5), 2615–2625.
- (30) Ringuet, J.; Leoz-Garziandia, E.; Budzinski, H.; Villenave, E.; Albinet, A. *Atmospheric Chem. Phys.* **2012**, *12* (18), 8877–8887.
- (31) Bandowe, B. A. M.; Meusel, H.; Huang, R.; Hoffmann, T.; Cao, J.; Ho, K. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23* (16), 16025–16036.
- (32) Delhomme, O.; Millet, M. *Atmos. Environ.* **2012**, *47*, 541–545.
- (33) Lintelmann, J.; França, M. H.; Hübner, E.; Matuschek, G. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (10), 1636–1646.
- (34) Kim, H.-H.; Lee, G.-W.; Yang, J.-Y.; Jeon, J.-M.; Lee, W.-S.; Lim, J.-Y.; Lee, H.-S.; Gwak, Y.-K.; Shin, D.-C.; Lim, Y.-W. *Asian J. Atmospheric Environ.* **2014**, *8* (1), 35–47.
- (35) Li, Y.-C.; Qiu, J.-Q.; Shu, M.; Ho, S. S. H.; Cao, J.-J.; Wang, G.-H.; Wang, X.-X.; Zhao, X.-Q. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25* (5), 4750–4760.
- (36) Liaud, C.; Dintzer, T.; Tschamber, V.; Trouve, G.; Le Calvé, S. *Environ. Pollut.* **2014**, *195*, 64–72.
- (37) Alamri, S. H.; Ali, N.; Ali Albar, H. M. S.; Rashid, M. I.; Rajeh, N.; Ali Qutub, M. M.; Malarvannan, G. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18* (5), 2743.
- (38) Ali, N. *Sci. Total Environ.* **2019**, *696*, 133995.
- (39) Anh, H. Q.; Tue, N. M.; Tuyen, L. H.; Minh, T. B.; Viet, P. H.; Takahashi, S. *Sci. Total Environ.* **2019**, *672*, 468–478.
- (40) Civan, M. Y.; Kara, U. M. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23* (23), 23369–23384.
- (41) Hoh, E.; Hunt, R. N.; Quintana, P. J. E.; Zakarian, J. M.; Chatfield, D. A.; Wittry, B. C.; Rodriguez, E.; Matt, G. E. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (7), 4174–4183.
- (42) Maragkidou, A.; Arar, S.; Al-Hunaiti, A.; Ma, Y.; Harrad, S.; Jaghbeir, O.; Faouri, D.; Hämeri, K.; Hussein, T. *Sci. Total Environ.* **2017**, *579*, 1050–1056.
- (43) Peng, H.; Yang, Y.; Liu, M.; Zhou, J. L. *Environ. Geochem. Health* **2012**, *34* (5), 587–596.
- (44) Whitehead, T. P.; Metayer, C.; Petreas, M.; Does, M.; Buffler, P. A.; Rappaport, S. M. *Environ. Health Perspect.* **2013**, *121* (5), 543–550.
- (45) Galmiche, M.; Delhomme, O.; François, Y.-N.; Millet, M. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2021**, *134*, 116099.
- (46) Andersson, J. T.; Achten, C. *Polycycl. Aromat. Compd.* **2015**, *35* (2–4), 330–354.
- (47) Asheim, J.; Vike-Jonas, K.; Gonzalez, S. V.; Lierhagen, S.; Venkatraman, V.; Veivåg, I.-L. S.; Snilsberg, B.; Flaten, T. P.; Asimakopoulos, A. G. *Sci. Total Environ.* **2019**, *649*, 703–711.
- (48) Liao, C.; Kim, U.-J.; Kannan, K. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52* (9), 5007–5026.
- (49) Cao, Z.; Wang, M.; Chen, Q.; Zhu, C.; Jie, J.; Li, X.; Dong, X.; Miao, Z.; Shen, M.; Bu, Q. *Sci. Total Environ.* **2019**, *653*, 423–430.
- (50) Xing, W.; Yang, L.; Zhang, H.; Zhang, X.; Wang, Y.; Bai, P.; Zhang, L.; Hayakawa, K.; Nagao, S.; Tang, N. *J. Environ. Sci.* **2022**, *121*, 38–47.
- (51) Wang, T.; Zhao, J.; Liu, Y.; Peng, J.; Wu, L.; Mao, H. *J. Geophys. Res. Atmospheres* **2022**, *127* (5).
- (52) Gbeddy, G.; Egodawatta, P.; Goonetilleke, A.; Akortia, E.; Glover, E. T. *Environ. Pollut.* **2021**, *269*, 116103.
- (53) Walgraeve, C.; Demeestere, K.; Dewulf, J.; Zimmermann, R.; Van Langenhove, H. *Atmos. Environ.* **2010**, *44* (15), 1831–1846.

## Chapitre 6 :

### Conclusion et perspectives

Dans cette première partie du manuscrit, la problématique de la surveillance des CAP dans les aérosols et les poussières a été abordée.

Les CAP constituent une famille de composés organiques semi-volatils particulièrement importante dans l'étude de la pollution atmosphérique causée par l'activité anthropique. Ils sont effectivement largement libérés par des combustions et leurs sources prédominantes sont ainsi le transport, l'industrie ou le chauffage des bâtiments par exemple.

Une revue de l'état de l'art a montré l'existence de nombreux travaux de développement analytique et d'étude environnementale des HAP depuis des décennies. En revanche, les études menées sur leurs dérivés oxygénés, nitrés et hétérocycliques sont moins nombreuses et plus récentes.

Surtout, très peu d'articles ont présenté une étude simultanée de toutes ces familles avec une seule méthode analytique. Pourtant, chaque groupe de CAP a une importance non négligeable en termes de toxicologie, de chimie atmosphérique ou d'identification des sources d'émission, et chaque groupe peut être présent à des concentrations de l'ordre du  $\text{ng/m}^3$  dans les particules atmosphériques.

Ainsi, la première partie de cette thèse a consisté en la mise en place d'une méthode d'analyse simultanée de 79 CAP par GC-MS/MS pour l'appliquer ensuite à des échantillons de PM et de poussières. Cet objectif impliquait des challenges analytiques majeurs, puisque l'ensemble des CAP sélectionnés présentait une large gamme de polarité et de volatilité.

Il a d'abord fallu optimiser la méthode instrumentale. Les différents paramètres de la séparation chromatographique tels que l'injection, le programme de température ou le débit de gaz vecteur ont été étudiés jusqu'à trouver une méthode permettant de séparer convenablement les isomères de CAP en un temps d'analyse raisonnable. Ainsi, la séparation de tous les composés d'intérêt a finalement été obtenue en moins de 48 minutes, et des isomères critiques tels que la paire triphénylène / chrysène ainsi que les isomères du benzofluoranthène ou de la dibenzacridine ont pu être quantifiés séparément avec des valeurs de résolution proches de 1,5.

Nos efforts se sont ensuite concentrés sur la recherche de transitions MS/MS permettant d'atteindre une intensité de signal la plus élevée possible. En étudiant la fragmentation des CAP, le mode d'acquisition « pseudo-MRM » a alors été identifié comme un choix pertinent pour les HAP, AZA et SHAP. Cette optimisation de la détection par spectrométrie de masse a permis d'augmenter considérablement la sensibilité de la détection tout en conservant la spécificité attendue pour une analyse ciblée dans des matrices complexes.

En plus de l'analyse instrumentale, l'étape d'extraction des CAP dans les particules a également été étudiée. La technique d'extraction par liquide pressurisé a été choisie pour son efficacité et sa robustesse précédemment démontrées dans la littérature. Notre attention s'est surtout portée sur le choix du solvant optimal pour l'extraction quantitative du plus grand nombre de CAP possible. C'est ainsi un mélange de toluène et d'acétonitrile en proportion équivalente qui a été sélectionné pour la méthode finale.

L'ensemble de la méthode analytique développée a alors pu être validée par l'étude de la linéarité de l'étalonnage, des taux de recouvrement, ou encore de la justesse et de la précision. Surtout, c'est un matériau de référence qui a permis la validation de cette méthode analytique, puisque 16 des 22 composés certifiés pour ce matériau (particules d'échappement de moteur diesel) ont été quantifiés à une valeur concordant avec leur certification.

La première application de la méthode ainsi développée et validée était l'analyse de CAP dans les PM<sub>10</sub> d'un parking résidentiel urbain. Il s'agissait d'étudier les niveaux de CAP auxquels pouvaient être exposés les résidents lors de leur présence dans ce parking, en sachant que les véhicules sont une source majeure de CAP.

Nous avons détecté dans ces échantillons 38 des 79 composés cibles, dont 16 avec une fréquence de détection de 100 %. Les niveaux de concentrations de HAP correspondaient à ce que l'on pouvait attendre puisqu'ils étaient en accord avec de précédentes études de la littérature sur des environnements similaires. Ils correspondaient également à des concentrations caractéristiques des émissions véhiculaires, comme l'a montrée l'étude de ratios diagnostics de HAP.

Puis, la principale application environnementale de la méthode d'analyse des CAP a été réalisée sur des échantillons de PM<sub>10</sub> et de poussières prélevés à l'intérieur et à l'extérieur de logements urbains en proche périphérie de Strasbourg. Sur une période totale de cinq jours, quatre échantillons de particules et deux échantillons de poussières ont été collectés pour chacun des trois logements étudiés.

Les résultats d'analyse des PM<sub>10</sub> ont été marqués par de très fortes concentrations de CAP. Notre campagne de prélèvements correspondait à un pic de pollution aux particules, et celui-ci s'est donc accompagné d'un pic d'occurrence de CAP, d'après nos relevés. Les concentrations mesurées atteignaient ainsi des niveaux parmi les plus importants de la littérature.

Ces résultats ont tout de même été relativisés par l'analyse des poussières déposées, qui a montré des teneurs en CAP plus proches de celles publiées dans la littérature, et même en deçà de la valeur médiane de la littérature.

La combinaison des informations ainsi obtenues démontre l'intérêt d'associer l'analyse de poussières déposées à celle des PM, pour associer une évaluation sur le court-terme et sur le moyen-terme. Cette campagne d'échantillonnage a également mis en lumière la contamination potentielle de nos environnements intérieurs, qui s'avère particulièrement importante au vu du

temps passé en intérieur plutôt qu'en extérieur, et qui est pourtant sous-représentée dans la bibliographie par rapport aux études sur l'air et les particules ambiantes.

On peut également noter que le nombre de composés détectés dans les poussières domestiques est si élevé que cette matrice apparaît comme idéale pour évaluer la contamination chimique des environnements intérieurs. Au vu de la diversité chimique attendue dans cette matrice et de l'ensemble des CAP retrouvés dans les échantillons de poussière de ces travaux, on peut imaginer de futures études combinant des stratégies d'analyse ciblée et non-ciblée, pour améliorer la connaissance des molécules présentes dans les poussières déposées, qui seraient finalement un témoin de la qualité de nos environnements intérieurs. L'analyse non-ciblée par GC-HRMS avec un focus particulier sur les CAP permettrait d'identifier les principaux composés de cette famille présents dans les poussières, afin d'effectuer une sélection la plus appropriée possible des molécules à quantifier ensuite lors de l'analyse ciblée.

Si les résultats présentés dans cette première partie sont très intéressants pour mieux évaluer l'occurrence environnementale de l'ensemble des CAP, notre liste de 79 composés n'est certainement pas exhaustive et pourra être complétée à l'avenir. Parmi les autres molécules qui seraient pertinentes à analyser, on peut penser à rajouter d'autres isomères de HAP moins fréquemment étudiés tels que le dibenz(a,c)anthracène, ou encore des HAP plus lourds qui peuvent présenter une toxicité aiguë tels que les dibenzopyrènes, ainsi qu'un plus grand nombre de dérivés alkylés ou de thiaarènes. Néanmoins, ces perspectives ne sont pas sans inconvénient analytique à surpasser : l'ajout d'isomères s'accompagne de co-élutions à résoudre, particulièrement pour tous les dérivés alkylés existant, et l'analyse des HAP les plus lourds nécessite généralement de porter une grande attention à l'encrassement de l'injecteur et de la source d'ionisation et de tolérer un temps d'analyse plus long ainsi qu'une moindre sensibilité pour ces composés.

Il faut également relever la sensibilité médiocre obtenue pour les NHAP avec cette méthode. Du fait de leur limite de quantification haute, ils n'ont pu être quantifiés que dans le matériau de référence de particules diesel. Si l'étude des HAP, OHAP, AZA et SHAP semble tout à fait combinable en une seule méthode GC-MS, l'ionisation des NHAP par ionisation électronique n'est pas assez sensible pour pouvoir les quantifier à l'état d'ultra-traces dans les échantillons environnementaux. Les NHAP ont une grande importance en chimie atmosphérique puisque certains d'entre eux servent de traceurs de sources d'émission.

Il faudrait donc envisager de mettre en place en parallèle une méthode GC-MS utilisant une source d'ionisation chimique pour pouvoir mieux les étudier. Une autre possibilité pour abaisser les limites de quantification serait l'utilisation d'une méthode de pré-concentration en ligne telle que la micro-extraction sur phase solide (SPME). Celle-ci suppose néanmoins une optimisation particulière du type de phase utilisée qui devrait être performante pour les NHAP comme pour les autres groupes de CAP, ainsi que des conditions d'adsorption et de désorption.

Dans la Deuxième Partie de cette thèse, les travaux présentés s'orienteront vers une autre catégorie de contaminants organiques issus de procédés de combustion : les fullerènes. Émis par le même type de source que les CAP, ils ont été bien moins étudiés par le passé, et leur analyse implique des obstacles particuliers à contourner pour pouvoir les quantifier dans des matrices environnementales. C'est pourquoi nous avons souhaité développer une nouvelle méthode analytique ciblée pour quantifier les fullerènes et les CAP dans les mêmes échantillons de particules et de poussières.

---

## **DEUXIÈME PARTIE :**

# **DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODE POUR L'ANALYSE DE FULLERÈNES DANS LES PARTICULES ET LES POUSSIÈRES PAR LC-MS/MS**

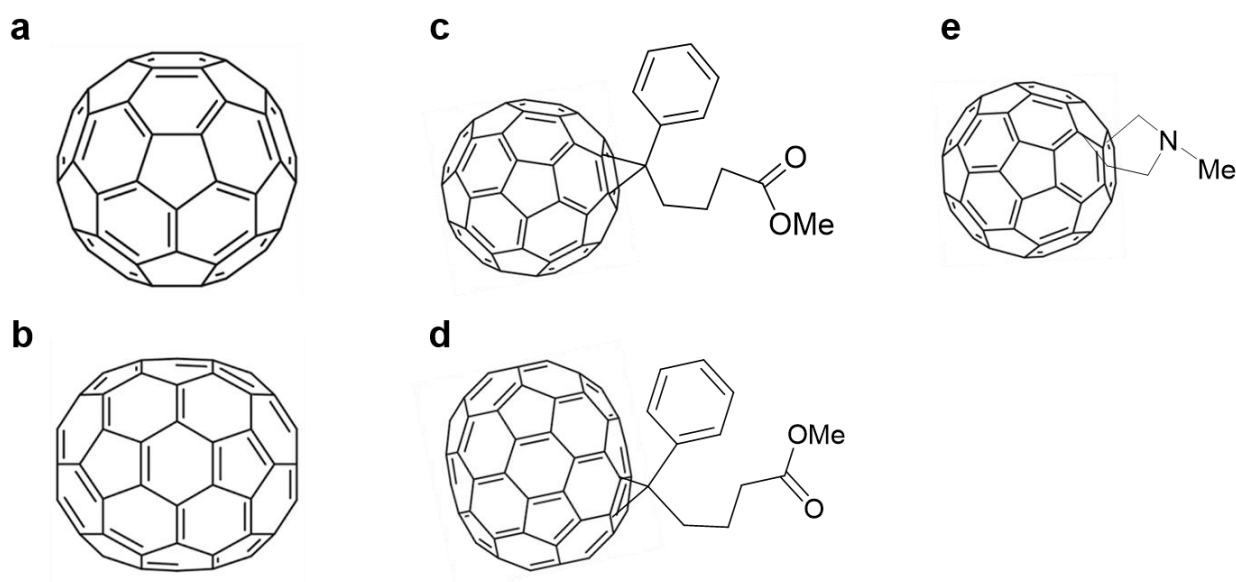
---

# Chapitre 1 :

## État de l'art : Les fullerènes dans l'environnement et leur analyse

Les fullerènes sont une catégorie de molécules dont la première découverte, celle du  $C_{60}$ , a été présentée en 1985 par Kroto *et al* comme celle de la troisième forme allotropique de l'élément carbone, après le diamant et le graphite <sup>1</sup>. Pour cette découverte, Robert Curl, Richard Smalley et Harold Kroto se sont vus attribuer le Prix Nobel de Chimie en 1996.

Cette molécule composée de 60 atomes de carbone a alors attiré l'attention par sa géométrie exceptionnelle, un arrangement de pentagones et d'hexagones en forme de ballon de football (voir Figure 1.1.a). Il a rapidement été remarqué que l'existence de  $C_{60}$  s'accompagnait de celle d'autres fullerènes avec un nombre variable d'atomes de carbones, dont un particulièrement stable,  $C_{70}$  (voir Figure 1.1.b) <sup>2</sup>.



**Figure 1.1 : Formule chimique des cinq fullerènes étudiés dans ces travaux :**  
a)  $C_{60}$ , b)  $C_{70}$ , c)  $C_{61}$ -PCBM, d)  $C_{71}$ -PCBM, e) NMFP

Des sources naturelles de fullerènes ont été identifiées, parmi lesquelles la foudre, les météorites, les charbons et divers matériaux géologiques <sup>2,3</sup>. Ces composés seraient donc présents sur Terre depuis des millions d'années <sup>3,4</sup>.

Mais les fullerènes sont principalement des produits de combustion <sup>2,5,6</sup>. Les combustions, qu'elles soient automobiles ou industrielles, constituent donc une source majeure de leur libération dans l'environnement, en particulier dans l'atmosphère, de manière analogue aux Composés Aromatiques Polycycliques. De plus, cette voie d'émission des fullerènes a été rapportée pour une



large variété de combustibles différents, ce qui laisse supposer d'une multitude d'origines potentielles <sup>5,6</sup>.

Les propriétés physico-chimiques uniques des fullerènes telles que leur affinité électronique, leur hydrophobie ou leur stabilité en ont fait des candidats intéressants pour de nombreuses applications industrielles, principalement dans le domaine des cosmétiques, de l'électronique et de l'énergie <sup>7,8</sup>. Ici, les fullerènes « originels » C<sub>60</sub> et C<sub>70</sub> ne sont pas les seuls concernés. Certains fullerènes fonctionnalisés présentent également des caractéristiques très intéressantes. C'est le cas du [6,6]-Phenyl-C<sub>61</sub> butyric acid butyl ester (C<sub>61</sub>-PCBM) vastement utilisé dans les panneaux photovoltaïques organiques, ou encore du C<sub>60</sub> N-methylfulleropyrrolidine (NMFP) qui est un intermédiaire de synthèse industrielle d'autres fullerènes fonctionnalisés <sup>7,9</sup>. Ainsi, au cours des dernières décennies, la production anthropique industrielle de fullerènes a considérablement augmenté, jusqu'à atteindre un ordre de grandeur de plusieurs dizaines de tonnes produites chaque année <sup>10</sup>.

Les activités humaines pourraient donc causer une émission croissante de fullerènes dans l'environnement. La part de cette émission due à leur utilisation dans divers produits manufacturés ainsi qu'à des fins pharmaceutiques ou cosmétiques se caractérise principalement par un rejet dans l'environnement via les eaux usées <sup>9,11</sup>.

La présence de fullerènes dans les environnements aquatiques a déjà été étudiée à plusieurs reprises par le passé <sup>9,12-16</sup>. De même, afin de mieux comprendre le devenir des fullerènes dans l'environnement, les sols et les sédiments ont également été investigués comme des « réservoirs » potentiels de fullerènes <sup>15,17,18</sup>.

En revanche, la pollution des environnements atmosphériques par les fullerènes a jusqu'ici été relativement peu documentée. Pourtant, elle pourrait bien être significative, puisque les fullerènes libérés par combustion lors de procédés industriels ou de déplacements automobiles y seraient directement transportés.

Le devenir des fullerènes dans l'atmosphère a été discuté par Sanchís *et al* <sup>19</sup>. Avant d'évoquer leurs résultats, il est ici nécessaire de rappeler les définitions des fractions « carbone élémentaire » et « carbone organique » des aérosols <sup>20-22</sup>.

**Carbone élémentaire (EC) :**

Le carbone élémentaire correspond aux particules atmosphériques composées de carbone solide uniquement. Ce sont donc des particules qu'on peut qualifier de graphitiques. Elle se caractérise par ses nombreux sites d'adsorption. Cette fraction peut également être appelée « carbone inorganique », « noir de carbone » (*black carbon*) ou « suie » (*soot*).

### **Carbone organique (OC) :**

Le carbone organique correspond aux molécules organiques adsorbées sur des particules, parmi lesquelles on peut recenser des composés aromatiques, des composés aliphatiques, des acides organiques, etc ... Le carbone organique peut être directement émis dans l'atmosphère ou formé par condensation des espèces gazeuses (*gas-to-particle conversion*).

Sanchís *et al* ont calculé des coefficients de partition appelés « soot – air » et « organic carbon – air ». Ceux-ci caractérisent la sorption des fullerènes sur la fraction élémentaire et organique des particules, respectivement, par rapport à la proportion de fullerènes qui pourraient rester libres en phase gazeuse. Les auteurs ont calculé un coefficient « soot – air » de  $10^3$ , et estimé un coefficient « OC – air » beaucoup plus faible (2 à 3 ordres de grandeur). Cela signifie que les fullerènes présents dans l'atmosphère seront très majoritairement associés aux particules et plus précisément au carbone élémentaire de ces particules <sup>19</sup>. Ce phénomène d'adsorption prédominant sur la fraction EC des aérosols est tout à fait similaire à celui observé pour les HAP, en particulier les plus lourds d'entre eux <sup>23</sup>.

Du fait de leur très faible volatilité, l'étude des fullerènes dans les environnements atmosphériques pourra donc se faire par leur analyse dans la fraction particulaire.

Avant les travaux présentés dans cette thèse de doctorat, trois études avaient été publiées sur ce sujet.

Sanchís *et al* ont recherché dans des échantillons de particules prélevés en mer Méditerranée les fullerènes  $C_{60}$  et  $C_{70}$  ainsi que plusieurs de leurs dérivés :  $C_{60}$  N-methylfulleropyrrolidine (NMFP),  $C_{60}$  pyrrolidine tris-acid ethyl ester (CPTAE), [6,6]-Phenyl- $C_{61}$  butyric acid butyl ester (PCBM) et [6,6]-Thienyl  $C_{61}$  butyric acid methyl ester (ThPCBM) <sup>19</sup>. Sur 43 sites de prélèvement, 28 ont présenté des teneurs quantifiables de fullerènes  $C_{60}$  et  $C_{70}$ . En revanche, aucun dérivé fonctionnalisé de fullerène n'a pu être quantifié. Les concentrations de  $C_{60}$  et  $C_{70}$  mesurées se sont révélées très variables, de  $33 \text{ pg/m}^3$  à  $234 \text{ ng/m}^3$ . Dans l'ensemble, les fréquences de détection (100%) et de quantification (65%) ainsi que les concentrations médianes de  $C_{60}$  ( $60 \text{ pg/m}^3$ ) et  $C_{70}$  ( $480 \text{ pg/m}^3$ ) rapportées par Sanchís *et al* dans cette étude en mer Méditerranée, sur des sites de prélèvement relativement éloignés des sources de pollution, sont étonnamment élevées pour des composés attendus à l'état d'ultra-traces dans l'atmosphère.

Benn *et al* ont analysé divers échantillons de particules dans des environnements urbains ainsi que dans un garage, et des échantillons de sources d'émission directes tels que des suies de combustion de moteurs diesel, de bougies ou encore de feux de forêt <sup>6</sup>. A l'inverse des travaux de Sanchís *et al*, bon nombre de leurs échantillons se sont avérés négatifs. Le fullerène  $C_{70}$  n'a

été détecté dans aucun de leurs échantillons. Seuls deux échantillons de PM collectés dans un garage ont révélé des concentrations de  $C_{60}$  autour de  $2 \text{ pg/m}^3$ . Ces niveaux sont donc bien inférieurs à ceux mesurés par Sanchís *et al*, bien que les échantillons collectés soient plus proches des sources d'émission potentielles des fullerènes<sup>6,19</sup>. De plus, parmi les sources de combustion étudiées, seul le  $C_{60}$  a été identifié, uniquement dans les suies d'échappement de véhicules. Aucun fullerène n'a donc été observé dans les suies de bougie, de cheminée ou encore de feu de forêt<sup>6</sup>. On peut noter que Tiwari *et al* ont eux pu quantifier  $C_{60}$  dans les particules émises par un feu de bois ou une flamme de propane par exemple, en plus d'émissions mieux connues comme des moteurs diesel ou des centrales à charbon<sup>5</sup>.

Enfin, Encinas et Gómez ont présenté l'analyse de  $C_{60}$  dans des échantillons de PM ambiants d'une zone urbaine, ainsi que dans des échantillons similaires prélevés dans un garage, suivant la conclusion de Benn *et al*<sup>24</sup>. Lorsque des teneurs en  $C_{60}$  ont été mesurées au-delà de la limite de détection dans les échantillons d'aérosols ambiants (en extérieur), celles-ci étaient comprises entre  $0.08$  et  $2.27 \text{ pg/m}^3$ . Enfin, dans le garage étudié par Encinas et Gómez, le fullerène  $C_{60}$  n'a été observé que dans quelques-uns des échantillons collectés, avec une concentration maximale de  $10.50 \text{ pg/m}^3$ <sup>24</sup>.

Pour pouvoir détecter et quantifier des niveaux de fullerènes si bas, il est donc nécessaire de disposer de méthodes analytiques performantes en termes de spécificité et surtout de sensibilité. Pour cela, plusieurs étapes de la méthode analytique peuvent être optimisées : le prélèvement des échantillons, l'extraction et le traitement des échantillons, ainsi que l'analyse instrumentale.

Dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons souhaité développer une méthode analytique permettant l'identification et la quantification de fullerènes dans les aérosols, les poussières domestiques et les suies de combustion. L'objectif était d'améliorer la connaissance de l'occurrence des fullerènes dans la fraction particulaire de l'atmosphère et de la relier à l'occurrence des CAP étudiés en parallèle dans les mêmes échantillons.

Comme les CAP, les fullerènes sont en effet des contaminants émergents pouvant être impliqués dans la pollution atmosphérique par le biais de procédés de combustion.

Leur toxicité est en revanche bien moins documentée que celle des CAP. Ceci est notamment dû à la multitude de formes sous lesquelles on peut retrouver les fullerènes, à l'image de  $C_{60}$  qui est le mieux connu et qui, dans des conditions environnementales ou biologiques, peut exister sous forme oxydée ( $C_{60}O$ ), hydroxylée, nanoparticulaire, agrégée, etc<sup>25-27</sup> ...

Les différentes études qui ont pu être menées pour estimer la toxicité de  $C_{60}$  ont pu conclure à de potentiels effets néfastes pour les organismes vivants tels qu'une diminution de la

respiration aérobie ou encore un stress oxydatif <sup>26,28,29</sup>. Ces résultats encouragent à poursuivre les études analytiques sur les fullerènes dans l'environnement.

Les cinq fullerènes d'intérêt de la méthode analytique étaient les suivants : C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>, C<sub>60</sub> N-methylfulleropyrrolidine (NMFP), [6,6]-Phenyl-C<sub>61</sub> butyric acid butyl ester (C<sub>61</sub>-PCBM), [6,6]-Phenyl-C<sub>71</sub> butyric acid butyl ester (C<sub>71</sub>-PCBM). Ils sont décrits en Figure 1.1.

La méthode analytique développée ici s'appuyait sur la technique de chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS).

La faible volatilité des fullerènes les rend inadaptés à la chromatographie en phase gazeuse et leur structure chimique ne permet pas de les séparer par électrophorèse capillaire, la LC est donc la méthode séparative universelle pour les fullerènes.

Après leur séparation, il est possible de détecter les fullerènes grâce leur absorbance dans le domaine de longueur d'onde ultraviolet (UV) <sup>24,30</sup>. Néanmoins, cette méthode de détection offre une sensibilité et une spécificité moindre par rapport à la spectrométrie de masse.

La détection des fullerènes par spectrométrie de masse est possible par l'intermédiaire de différentes sources d'ionisation. Par des mécanismes différents, les trois sources à pression atmosphérique majeures (ESI, APCI et APPI) peuvent permettre l'ionisation des fullerènes, et toutes ont déjà été employées dans la littérature pour cette application <sup>15,19,31,32</sup>.

La principale difficulté pour l'analyse des fullerènes réside dans leur extraction. Dans la littérature, beaucoup d'auteurs ont rapporté des rendements d'extraction de fullerènes soit faibles, soit peu reproductibles, quelle que soit la matrice d'intérêt <sup>6,33,34</sup>.

Si on s'intéresse plus particulièrement à l'extraction de fullerènes dans les particules, les travaux précédents ont tous utilisé l'extraction par ultrasons dans du toluène <sup>6,19,24</sup>. Si le choix du solvant ne fait aucun débat car il est le seul bon solvant pour les fullerènes, les taux de récupération obtenus dans ces études sont assez loin des 100 %. Ainsi, dans notre développement de méthode, nous avons souhaité améliorer l'étape d'extraction en remplaçant l'ultrasonication par l'ASE, qui est une technique dont l'efficacité a été démontrée pour l'extraction quantitative de micropolluants organiques dans les particules atmosphériques (voir Partie 1).

Cette partie de la thèse visait donc à développer une méthode analytique fiable et sensible en optimisant les étapes d'extraction, de séparation et de détection des fullerènes, puis à valider cette méthode et à l'appliquer à des échantillons particuliers réels.

L'ensemble de ces travaux a été présenté dans un manuscrit en anglais soumis en juillet 2022 au journal à comité de lecture *Rapid Communications in Mass Spectrometry*.

Ce manuscrit constituera le prochain chapitre de la thèse.

## Références

- (1) Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. *Nature* **1985**, *318* (6042), 162–163.
- (2) Théobald, J. Les fullerènes: préparation et purification par chromatographie liquide préparative; Université Paul Verlaine - Metz, 1995.
- (3) Buseck, P. R. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2002**, *203* (3–4), 781–792.
- (4) Ebbesen, T. W.; Hiura, H.; Hedenquist, J. W.; de Ronde, C. E. J.; Andersen, A.; Often, M.; Melezhik, V. A. *Science* **1995**, *268* (5217), 1634–1635.
- (5) Tiwari, A. J.; Ashraf-Khorassani, M.; Marr, L. C. *Sci. Total Environ.* **2016**, *547*, 254–260.
- (6) Benn, T.; Herckes, P.; Westerhoff, P. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Elsevier, 2012; Vol. 59, pp 291–303.
- (7) Murayama, H.; Tomonoh, S.; Alford, J. M.; Karpuk, M. E. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures* **2005**, *12* (1–2), 1–9.
- (8) Zakaria, S.; Fröhlich, E.; Fauler, G.; Gries, A.; Weiß, S.; Scharf, S. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25* (1), 562–571.
- (9) Farré, M.; Pérez, S.; Gajda-Schranz, K.; Osorio, V.; Kantiani, L.; Ginebreda, A.; Barceló, D. *J. Hydrol.* **2010**, *383* (1–2), 44–51.
- (10) Hendren, C. O.; Mesnard, X.; Dröge, J.; Wiesner, M. R. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (7), 2562–2569.
- (11) Gottschalk, F.; Sonderer, T.; Scholz, R. W.; Nowack, B. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (24), 9216–9222.
- (12) Bouchard, D.; Ma, X. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1203* (2), 153–159.
- (13) van Wezel, A. P.; Morinière, V.; Emke, E.; ter Laak, T.; Hogenboom, A. C. *Environ. Int.* **2011**, *37* (6), 1063–1067.
- (14) Kolkman, A.; Emke, E.; Bäuerlein, P. S.; Carboni, A.; Tran, D. T.; ter Laak, T. L.; van Wezel, A. P.; de Voogt, P. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (12), 5867–5874.
- (15) Astefanei, A.; Núñez, O.; Galceran, M. T. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1365*, 61–71.
- (16) Chen, Z.; Westerhoff, P.; Herckes, P. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27* (9), 1852.
- (17) Carboni, A.; Helmus, R.; Parsons, J. R.; Kalbitz, K.; de Voogt, P. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1433*, 123–130.
- (18) Sanchís, J.; Božović, D.; Al-Harbi, N. A.; Silva, L. F.; Farré, M.; Barceló, D. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (18), 5915–5923.
- (19) Sanchís, J.; Berrojalbiz, N.; Caballero, G.; Dachs, J.; Farré, M.; Barceló, D. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (3), 1335–1343.
- (20) Apicella, B.; Russo, C.; Carpentieri, A.; Tregrossi, A.; Ciajolo, A. *Fuel* **2022**, *309*, 122356.
- (21) Cao, J. J.; Lee, S. C.; Ho, K. F.; Zou, S. C.; Fung, K.; Li, Y.; Watson, J. G.; Chow, J. C. *Atmos. Environ.* **2004**, *38* (27), 4447–4456.
- (22) Bougiatioti, A.; Zampas, P.; Koulouri, E.; Antoniou, M.; Theodosi, C.; Kouvarakis, G.; Saarikoski, S.; Mäkelä, T.; Hillamo, R.; Mihalopoulos, N. *Atmos. Environ.* **2013**, *64*, 251–262.
- (23) Dachs, J.; Eisenreich, S. J. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34* (17), 3690–3697.
- (24) Encinas, D.; Gómez-de-Balugera, Z. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2018**, *75* (4), 616–624.
- (25) Fortner, J. D.; Lyon, D. Y.; Sayes, C. M.; Boyd, A. M.; Falkner, J. C.; Hotze, E. M.; Alemany, L. B.; Tao, Y. J.; Guo, W.; Ausman, K. D.; Colvin, V. L.; Hughes, J. B. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39* (11), 4307–4316.
- (26) Fortner, J. D.; Kim, D.-I.; Boyd, A. M.; Falkner, J. C.; Moran, S.; Colvin, V. L.; Hughes, J. B.; Kim, J.-H. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41* (21), 7497–7502.
- (27) Chao, T.-C.; Song, G.; Hansmeier, N.; Westerhoff, P.; Herckes, P.; Halden, R. U. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (5), 1777–1783.
- (28) Lyon, D. Y.; Brunet, L.; Hinkal, G. W.; Wiesner, M. R.; Alvarez, P. J. J. *Nano Lett.* **2008**, *8* (5), 1539–1543.

- (29) Spohn, P.; Hirsch, C.; Hasler, F.; Bruinink, A.; Krug, H. F.; Wick, P. *Environ. Pollut.* **2009**, *157* (4), 1134–1139.
- (30) Shareef, A.; Li, G.; Kookana, R. S. *Env. Chem* **2010**, *7*, 292–297.
- (31) Emke, E.; Sanchís, J.; Farré, M.; Bäuerlein, P. S.; de Voogt, P. *Environ. Sci. Nano* **2015**, *2*, 167–176.
- (32) Li, L.; Huhtala, S.; Sillanpää, M.; Sainio, P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403* (7), 1931–1938.
- (33) Jehlička, J.; Frank, O.; Hamplová, V.; Pokorná, Z.; Juha, L.; Boháček, Z.; Weishauptová, Z. *Carbon* **2005**, *43* (9), 1909–1917.
- (34) Pycke, B. F. G.; Halden, R. U.; Benn, T. M.; Westerhoff, P.; Halden, R. U.; Herckes, P.; Halden, R. U. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2011**, *30* (1), 44–57.

## Chapitre 2 :

# Développement de méthode pour l'analyse des fullerènes C<sub>60</sub> et C<sub>70</sub> et leurs dérivés fonctionnalisés dans les PM, les poussières et les suies, par LC-MS/MS

Mathieu Galmiche, Eden Esslinger, Olivier Delhomme, Philippe Schaeffer, Estelle Motsch, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François, Maurice Millet

*Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2022**, under review

### 2.1. Introduction

Fullerenes are a class of compounds that can either occur in the environment from natural sources (volcanoes, wildfires, meteoritic impacts, etc.) or from anthropogenic combustion processes, particularly industrial and vehicular sources<sup>1-5</sup>.

These compounds are also increasingly used for various industrial applications such as photovoltaic cells, microelectronics, cosmetics, water treatment or medicine among others<sup>6-9</sup>. For such applications, fullerenes are categorized as engineered nanomaterials and thus belong to the family of organic engineered nanoparticles, which have been increasingly produced in recent years, around tens of tons annually<sup>6,10-12</sup>. This growing production is therefore of an order of magnitude similar to their release via combustion<sup>5</sup> and combination of both sources raises questions about the release of these carbon-based nanoparticles in the environment<sup>13</sup>.

Indeed, the occurrence of fullerenes under a nanoparticulate form in the environment is related to serious questions about their potential adverse effects for human health and environment<sup>12,14-16</sup>. For instance, increases in oxidative stress and decreases in aerobic respiration rates were reported as negative influences from C<sub>60</sub> fullerene on living organisms<sup>16-18</sup>.

While the presence of fullerenes has already been investigated in environmental matrices such as natural water, wastewater, soils and sediments<sup>10,19-21</sup>, only three previous analytical studies reported their occurrence in atmospheric samples, specifically in the particulate phase<sup>2,22,23</sup>. One of them resulted in the positive identification of C<sub>60</sub> with a level below the lowest calibration level, estimated in the low pg m<sup>-3</sup> range, but only in parking garage samples<sup>2</sup>. Similar conclusions were drawn by Encinas and Gómez-de-Balugera who reported C<sub>60</sub> levels from 0.08 to 2.27 pg m<sup>-3</sup> outdoors and up to a dozen of pg m<sup>-3</sup> in a garage<sup>22</sup>. Sanchís et al. found higher concentrations of C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> in the total particulate fraction of atmospheric samples from the

Mediterranean Sea, but also very wide distributions among all their samples, from 33 pg m<sup>-3</sup> up to 234 ng m<sup>-3</sup>. On the other hand, they did not detect any functionalized fullerene <sup>23</sup>.

However, such functionalized derivatives of fullerenes can still be considered as emerging contaminants. They present peculiar interests in nanotechnology for some of the industrial applications listed above <sup>7,24,25</sup>, but they also raise toxicological issues <sup>26</sup>. Among those functionalized derivatives are N-methylfulleropyrrolidine C<sub>60</sub> (NMFP), [6,6]-phenyl C<sub>61</sub> butyric acid methyl ester (C<sub>61</sub>-PCBM), and [6,6]-phenyl C<sub>71</sub> butyric acid methyl ester (C<sub>71</sub>-PCBM). In analytical studies targeting this kind of compounds in matrices other than aerosols, some positive detections were observed, such as in the case of pond waters at the pg L<sup>-1</sup> concentration and in sediments at the ng kg<sup>-1</sup> level <sup>24</sup> or in wastewater effluents at concentrations up to the µg L<sup>-1</sup> level <sup>19</sup>. These findings confirm the necessity of monitoring these molecules in various environments for further risk assessment purposes.

Therefore, this paper presents a method development for the trace-level determination of the two main pristine fullerenes (C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub>), together with three of their functionalized derivatives (NMFP, C<sub>61</sub>-PCBM, C<sub>71</sub>-PCBM), in airborne particulate matter (PM), settled dust and soot.

In the previously published fullerene determination methods applied to aerosols, Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) was systematically selected <sup>2,22,23</sup>, though Pressurized Liquid Extraction (PLE) has proved itself very efficient and robust for the extraction of non-polar compounds from airborne PM <sup>27</sup>. Prior to this work, only a very limited amount of research papers reported the use of PLE for fullerene extraction, and none of them applied this method to airborne particulates, but rather to soils, sediments or carbonaceous geological materials <sup>20,24,28,29</sup>. In this work, the application of PLE for an optimal extraction of fullerenes from airborne particulates is presented.

Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS) is almost universally applied for the determination of fullerenes in environmental samples. Octadecyl (C<sub>18</sub>) stationary phases are largely predominant in the previously presented methods for fullerene environmental determination <sup>2,21,24,30</sup>. Here, a C<sub>18</sub> phase was compared with a biphenyl stationary phase. To the best of our knowledge, the use of a biphenyl phase for fullerenes separation was only presented once in the literature, with a sole focus on C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub>, and not on their functionalized derivatives <sup>10</sup>.

The most critical aspect of fullerene instrumental analysis resides in the optimization of the Mass Spectrometry (MS) detection method. For this purpose, we compared three different ionization sources (Electrospray ionization (ESI), Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) and Atmospheric Pressure Photoionization (APPI)) to select the most sensitive one.

In this paper, we also critically discuss quality assurance and performance of the Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) method. These are very delicate



aspects to tackle in the case of method development for fullerenes trace-level analysis, since this family of compounds is very tricky. Acute hydrophobicity, sorption capacity on organic matter and on glassware, absence of commercial isotope-labeled standards, etc. are major analytical challenges which could hinder an accurate determination in environmental samples <sup>5,10,13,19,28,31-34</sup>.

## 2.2. Material and methods

### 2.2.1. Chemicals

Pure standards of C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>, C<sub>61</sub>-PCBM, C<sub>71</sub>-PCBM and NMFP were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). LC-MS grade solvents (acetonitrile, methanol and toluene) were purchased from VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France) and Merck Millipore (Molsheim, France).

The Standard Reference Material<sup>®</sup> 2975 (SRM 2975) was purchased from the National Institute of Standards & Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). It is made up of Diesel Particulate Matter from an Industrial Forklift and has been certified for its content in Polycyclic Aromatic Compounds <sup>35</sup>.

### 2.2.2. Sample collection

Airborne PM samples were collected in February 2022 in the parking lot of a residential building. The building was located in the urban area of Strasbourg (Alsace, France, 48°35'26" N, 7°43'34" E).

The sampling was done using a Sven Leckel LVS6-RV medium-volume air sampler (Sven Leckel Ingenieurbüro GmbH, Berlin, Germany) operated at 2.3 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> during one week, and equipped with a PM<sub>10</sub> sampling head.

PM<sub>10</sub> was collected on glass fiber filters (GFFs) (Ø 47 mm, GF6, Whatman, GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom).

Indoor dust samples were collected in February 2021 in urban households from the same residential building as the parking lot PM samples, thanks to a household vacuum cleaner and Kudzu Science kits designed for settled dust sampling (Kudzu Science, Strasbourg, France).

After sampling, the filters and the dust samples were stored in aluminium foil at -20°C until extraction.

### 2.2.3. Sample preparation

After sampling, PLE was applied to GFFs and dust samples at 104 bar and 110°C thanks to an ASE 300 device (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Heating time was 6 minutes, then 2 static cycles of 10 minutes were performed.

Irrespective of the nature of the matrix and of the extraction method chosen, toluene is the preferred and almost only extraction solvent for fullerenes in the literature <sup>4,19,24,36</sup>. We also observed the benefits of toluene for the solubilization of fullerenes, and consistently with the literature, toluene was selected as extraction solvent. However, acetonitrile was added in equal proportion so that the extraction with a toluene / acetonitrile mixture (1:1, v/v) could be applicable for multi-class analysis purposes, including Polycyclic Aromatic Compounds. The PLE extracts were further concentrated to 0.5 mL under a gentle nitrogen stream on a TurboVap II (Biotage AB, Uppsala, Sweden) and stored at -20°C before analysis.

#### 2.2.4. Instrumental analysis

##### 2.2.4.a. LC-MS instruments

LC-ESI-MS/MS analyses were performed on a TSQ Quantum Access Max triple quadrupole mass spectrometer coupled to an Accela 1250 LC pump (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

LC-APCI-MS/MS and LC-APPI-MS/MS analyses were performed on an Esquire 3000<sup>plus</sup> ion trap mass spectrometer (Bruker Scientific Instruments, Billerica, MA, USA) coupled to an Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA).

Comparative direct infusion analyses to assess the electrospray ionization of fullerenes were performed on three other instruments: two Ion Traps (IT), a LCQ Fleet and a LTQ XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), and an Agilent 6120 Single Quadrupole (SQ) (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA).

##### 2.2.4.b. Liquid Chromatography

Two types of columns were compared for fullerene separation: a Nucleodur C<sub>18</sub> Pyramid (150 x 3 mm, 3 µm; Macherey-Nagel GmbH&Co., Düren, Germany) and a Raptor® Biphenyl (150 x 3 mm, 2.7 µm; Restek Corp., Bellefonte, PA, USA).

Compound elution was carried out using toluene (solvent A) and acetonitrile (solvent B) in gradient mode. Elution was programmed as follows: 40 % A maintained for 1 min, then ramped to 50 % A in 7 min, then from 50 % to 60 % A in 4 min. The total duration of the LC run was 12 min before driving the solvent composition back to 40 % A for the next analysis. The eluent flow rate was 0.7 mL min<sup>-1</sup> and the injection volume was set at 20 µL.

##### 2.2.4.c. Mass Spectrometry

Electrospray ionization was performed in negative mode on a heated ESI source (HESI-II, Thermo Fisher Scientific) with the following parameters: spray voltage -4000 V, sheath gas 35, auxiliary gas 5, capillary temperature 300°C, vaporizer temperature 300°C.

Both APCI and APPI analyses were performed in positive and negative ionization mode (see Section 2.3.1) using the following source parameters: capillary voltage  $\pm 3500$  V, nebulizer gas 43.5 psi, dry gas  $6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , capillary temperature  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ , vaporizer temperature  $420 \text{ }^\circ\text{C}$ . For APCI analysis, the Corona discharge was  $\pm 4 \text{ }\mu\text{A}$ .

For all ionization modes, pseudo-MRM was the detection mode implemented to perform LC-MS/MS analyses. It relies on Multiple Reaction Monitoring (MRM) with no mass loss transitions, as described previously by our group<sup>37</sup>. When possible, other MRM transitions were used only as a confirmation.

### *2.2.5. Method validation*

The LC-MS/MS method was validated against linearity of the calibration, precision, intra-day and inter-day repeatability, recovery and limit of quantification.

To obtain the best possible fit of the calibration curve, it was built in quadratic mode with  $1/X$  weighting. These parameters are typical of tandem mass spectrometry detection. External calibration was performed given the absence of an available commercial internal standard (see Section 2.3.5). Precision of the calibration was validated by verifying that the correlation coefficient ( $R^2$ ) was higher than 0.99 and by calculating deviations between theoretical concentrations and recalculated concentrations of calibration solutions.

To evaluate recoveries, GFFs which had been previously used for PM sampling were washed once with the PLE method described in Section 2.2.3 to eliminate natural traces of analytes. Then, the pre-washed GFFs were fortified with five different levels of a standard mixture containing the five fullerenes (20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng and 500 ng). Three replicates were performed for each level, and the whole analytical protocol was applied to these samples. Recoveries were defined as the measured concentrations of the concentrated extracts divided by their theoretical concentrations following the spike.

The instrumental limits of quantification (LOQ) had to meet all of the following criteria to be validated: 1) signal-to-noise ratio (S/N)  $> 10$  for the corresponding standard in toluene, 2) superior to the measured "mean + standard deviation" concentration of fullerenes in at least five solvent blanks, 3) validated as a standard concentration of the calibration range according to the precision criteria.

The method LOQs for our environmental samples were derived from the instrumental LOQs taking into account the sampled mass or volume.

## 2.3. Results and Discussion

### 2.3.1. Mass Spectrometry of Fullerenes

In the following section, results of fullerene neat standard direct infusion using various MS instruments and different ionization sources are presented. A common parameter of these experiments was the solvent used for the standard solutions, which was composed of toluene and acetonitrile (1:1 v/v). It was noticed that toluene was required to obtain a satisfying response for any of the following experiments. In the absence of toluene, the use of other solvents resulted in the severe decrease of fullerene solubility.

The purpose of these experiments was to identify the MS instruments, ionization sources and conditions which enabled the optimal LC-MS detection of fullerenes in various matrices.

#### 2.3.1.a. ESI-MS

ESI-MS experiments were performed on a Triple Quadrupole (TQ), TSQ Quantum Access Max, equipped with an Ion Max API heated electrospray (H-ESI) ion source.

Due to the highly unusual chemical properties of fullerenes, i.e. their composition exclusively made up of carbon atoms, classical electrospray ionization pathways such as protonation and deprotonation in aqueous phase are not possible. With ESI, fullerenes can only be ionized by electron capture in negative mode to form  $M^-$ , due to their electron affinity (around 2.7 eV)<sup>38</sup>.

By performing direct infusion of fullerene standard solutions in a toluene / acetonitrile mixture on the TSQ Quantum Access Max instrument, a high prevalence of the  $M^-$  ion was observed, with additional epoxide adducts ( $[M+O]^-$  and  $[M+O_2]^-$ ) for all compounds. Mass spectra obtained by ESI-MS direct infusion of the  $C_{60}$  pristine fullerene and its functionalized derivative  $C_{61}$ -PCBM are represented in Figure 2.1.a and Figure 2.2.a, respectively. The corresponding mass spectra of other fullerenes are reported in Figure 2.3.a, Figure 2.4.a and Figure 2.5.a (in the Supplement of this article).

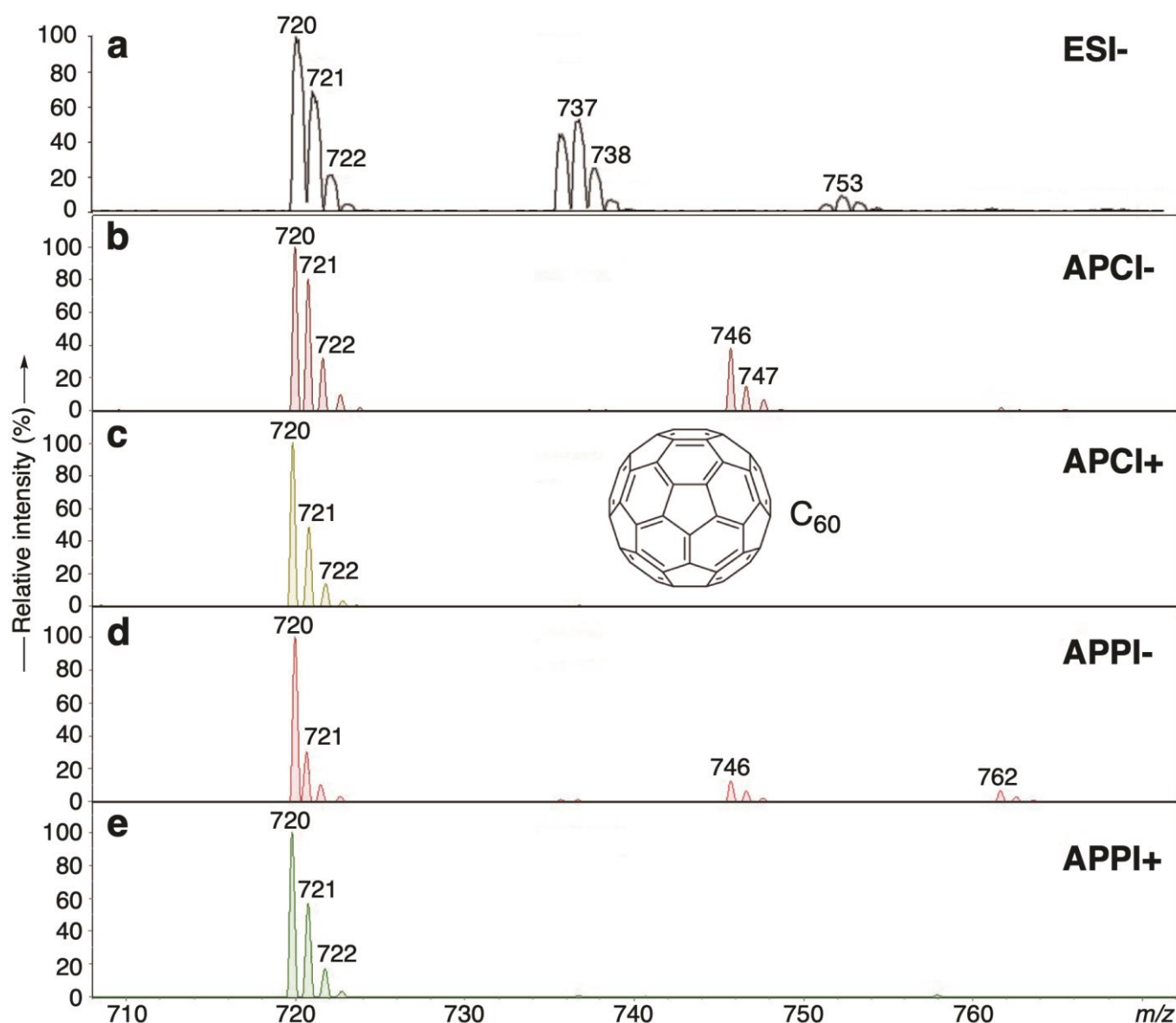
The major finding of the ESI(-)-MS experiments deals with the unreliability of electron-capture ESI for fullerenes on different instruments. Indeed, parallel studies were carried out on two IT mass spectrometers (LCQ Fleet and LTQ XL) equipped with an Ion Max API ESI source. Although the source design was the same for these instruments and for the above-mentioned TSQ, no signal could ever be obtained on these two ITs. A first hypothesis envisaged to explain this observation was the absence of vaporizer heating on these ITs in contrast to the H-ESI of the TSQ, but it was quickly discarded by checking that a satisfying signal was obtained on the TSQ instrument even when the vaporizer was set at ambient temperature.

Obtaining any response was also not possible using ESI in hyphenation with the Esquire 3000<sup>plus</sup> Ion Trap from Bruker Scientific Instruments, whereas the latter was successfully used with an APCI and APPI source (see Section 2.3.1.b and 2.3.1.c).

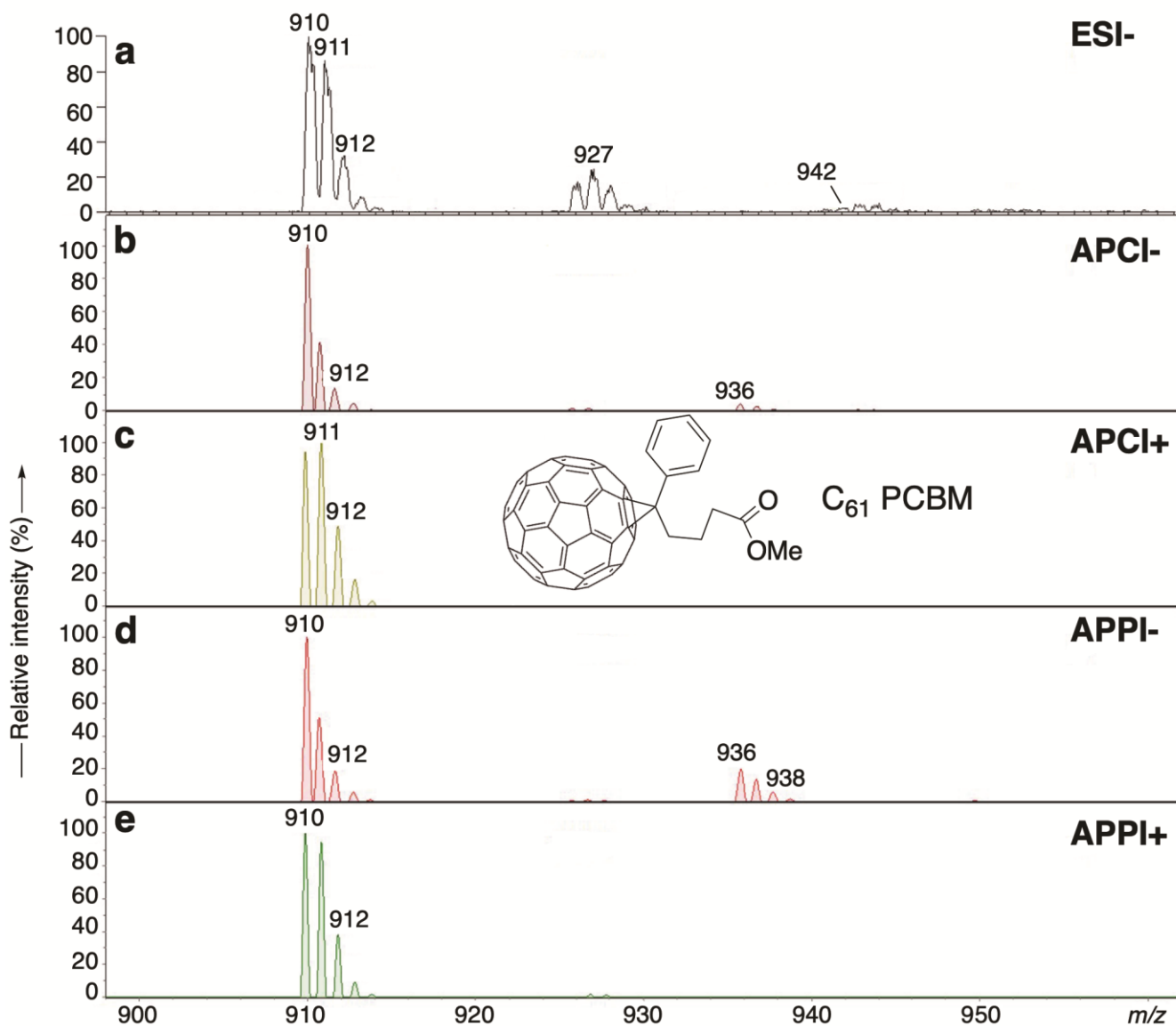
Furthermore, other ESI infusion tests were performed on a Single Quadrupole (Agilent 6120, Santa Clara, CA, USA), and an intense response was observed for the five fullerenes investigated on this instrument.

Notably, the previous works reporting successful electrospray ionization used TQ<sup>19,23,24,39</sup>, Q-TOF<sup>10</sup> or Orbitrap instruments<sup>21</sup>.

To conclude, the combination of these observations could suggest an instability of the electrospray-generated fullerene radical anions in ion trap instruments (confirmed on three different ITs) which would hinder their detection, while the same radical anions are observable on single quadrupole and triple quadrupole instruments.



**Figure 2.1** : Mass Spectrum obtained by direct infusion of  $C_{60}$  fullerene with a) negative ElectroSpray Ionization, b) negative Atmospheric Pressure Chemical Ionization, c) positive Atmospheric Pressure Chemical Ionization, d) negative Atmospheric Pressure Photolonization, e) positive Atmospheric Pressure Photolonization



**Figure 2.2 :** Mass Spectrum obtained by direct infusion of  $C_{61}$ -PCBM fullerene with a) negative ElectroSpray Ionization, b) negative Atmospheric Pressure Chemical Ionization, c) positive Atmospheric Pressure Chemical Ionization, d) negative Atmospheric Pressure Photolonization, e) positive Atmospheric Pressure Photolonization

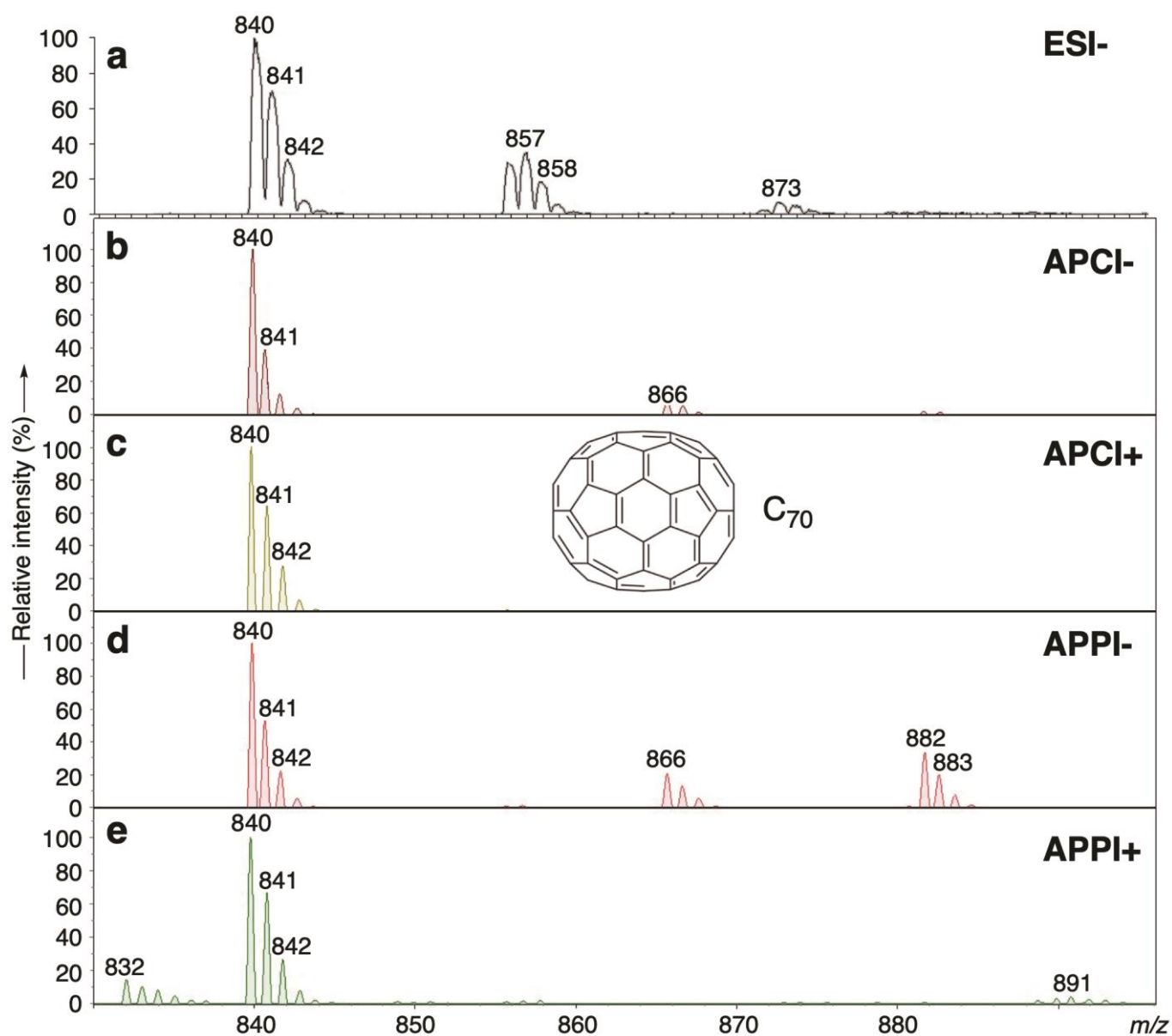
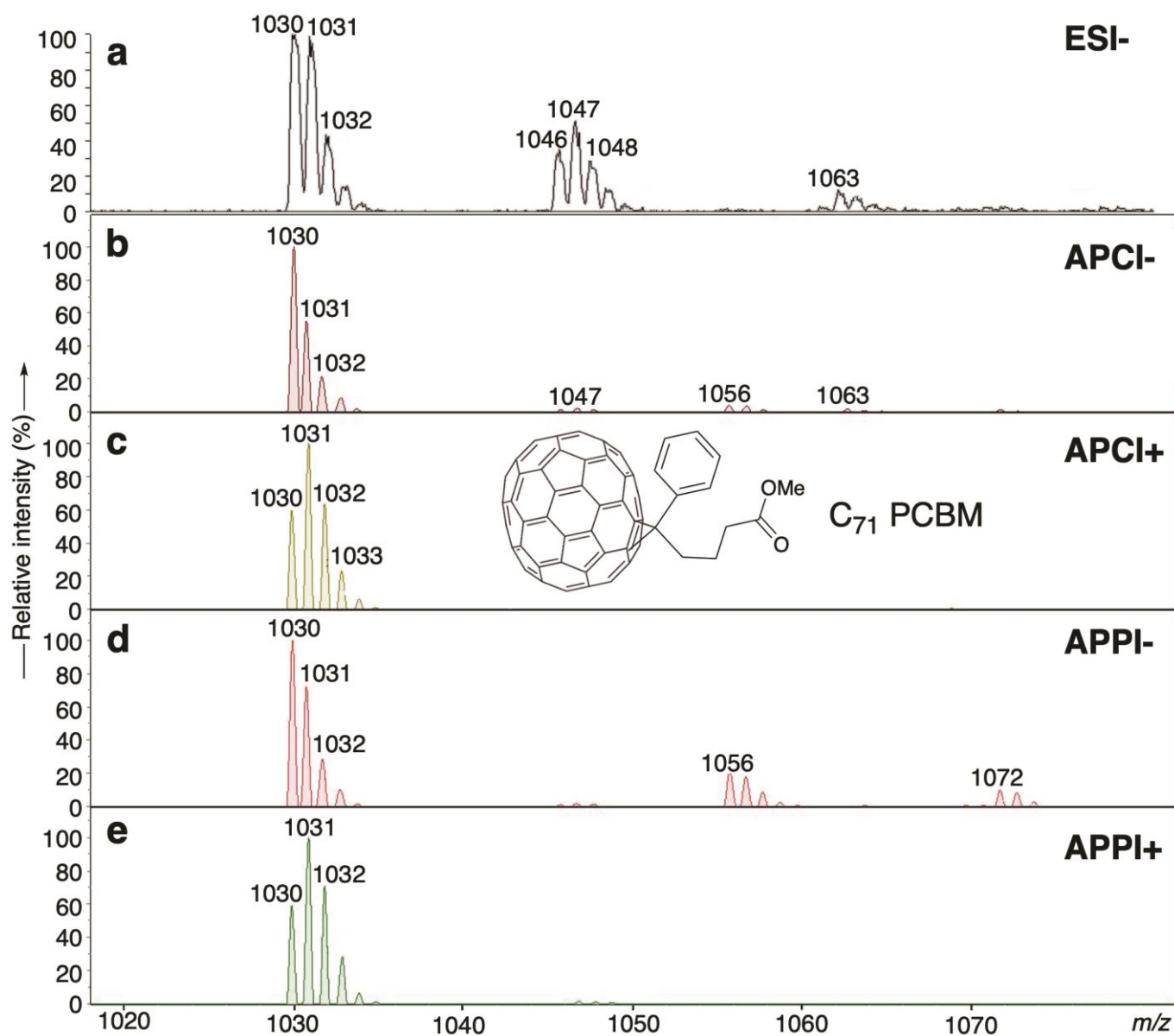


Figure 2.3 : Mass Spectrum obtained by direct infusion of  $C_{70}$  fullerene with a) negative ElectroSpray Ionization, b) negative Atmospheric Pressure Chemical Ionization, c) positive Atmospheric Pressure Chemical Ionization, d) negative Atmospheric Pressure Photolonization, e) positive Atmospheric Pressure Photolonization



*Figure 2.4 : Mass Spectrum obtained by direct infusion of C<sub>71</sub>-PCBM fullerene with a) negative ElectroSpray Ionization, b) negative Atmospheric Pressure Chemical Ionization, c) positive Atmospheric Pressure Chemical Ionization, d) negative Atmospheric Pressure Photolionization, e) positive Atmospheric Pressure Photolionization*



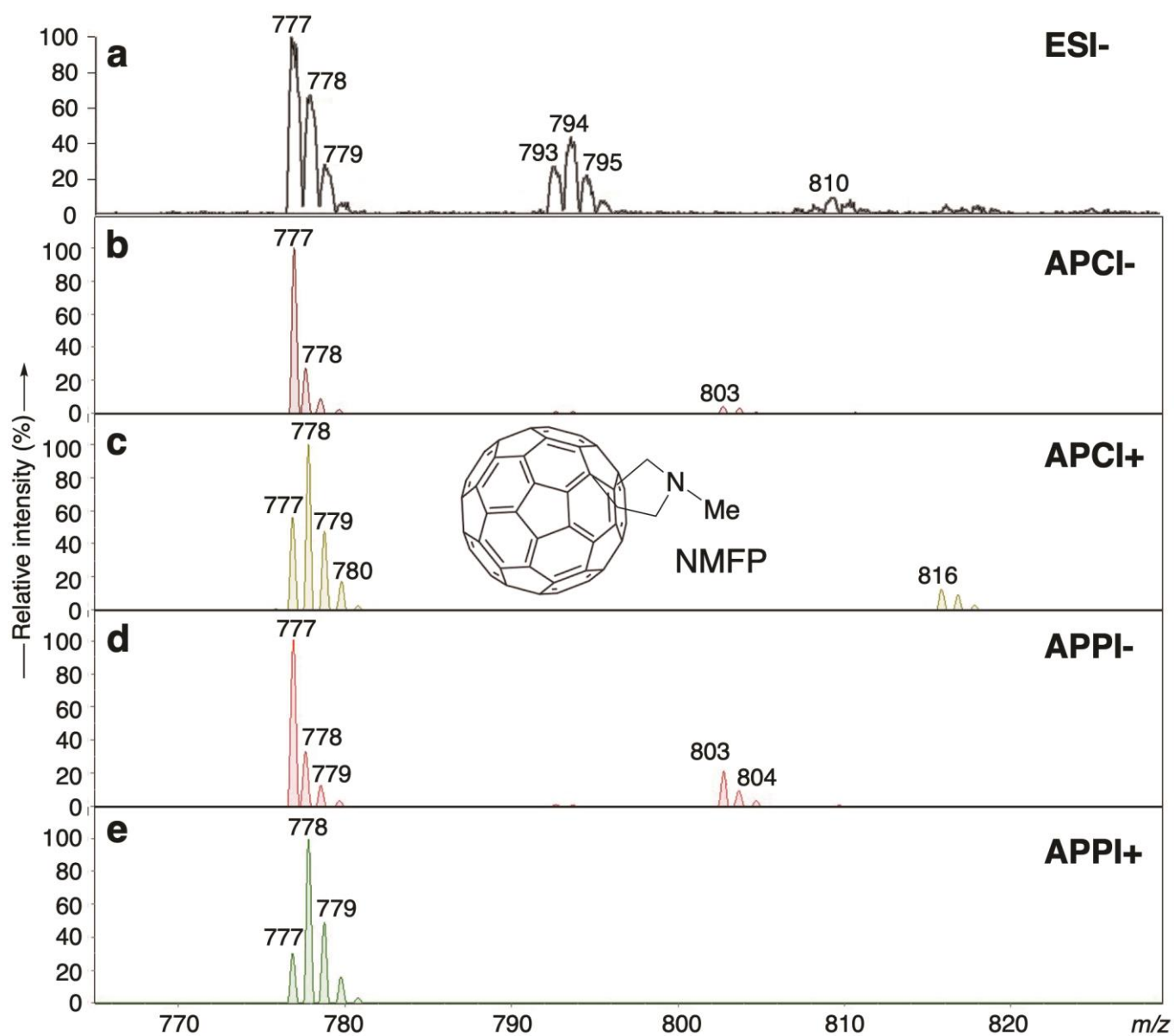


Figure 2.5 : Mass Spectrum obtained by direct infusion of NMFP with a) negative ElectroSpray Ionization, b) negative Atmospheric Pressure Chemical Ionization, c) positive Atmospheric Pressure Chemical Ionization, d) negative Atmospheric Pressure Photolonization, e) positive Atmospheric Pressure Photolonization

### 2.3.1.b. APCI-MS

Unlike ESI, APCI can lead to fullerene ionization both in positive and negative mode. In both modes, charge transfer is the responsible ionization process, either O<sub>2</sub>-mediated electron transfer in APCI(-) or N<sub>2</sub>-mediated proton transfer in APCI(+).

Similarly to the mass spectra obtained using ESI, APCI spectra of fullerenes were dominated by their molecular ions M<sup>+</sup> and M<sup>-</sup>. In the case of the APCI(+) spectra, only the molecular ion and related isotopic ions were observed, whereas with APCI(-), M+26 and M+42 adducts were formed. They correspond to CN addition due to the presence of acetonitrile in the solvent ([M+CN]<sup>-</sup>) and its corresponding epoxide adduct ([M+CN+O]<sup>-</sup>). Interestingly, the epoxide M+16 adduct described in Section 2.3.1.a was either not detected, or only present at very low abundance with APCI(-). APCI mass spectra of studied analytes are presented in windows b and c of Figure 2.1, Figure 2.2, Figure 2.3, Figure 2.4 and Figure 2.5.

The mass spectra of functionalized fullerenes obtained in the positive mode show a variation in the relative proportion of M versus M+1 ions (see Figure 2.2, Figure 2.4 and Figure 2.5). It can be assumed that in the positive mode, the ionization by protonation resulting in [M+H]<sup>+</sup> formation competes with the charge transfer ionization, and the M+1 peak would then correspond to a combination of this [M+H]<sup>+</sup> ion with the M<sup>+</sup> ion resulting from a <sup>13</sup>C isotope. The addition of these two ionization processes caused an increase of the M+1 peak intensity relative to the M peak.

While both polarities are applicable to fullerenes using APCI, they are far from being equivalent in terms of signal intensity. Indeed, for most fullerenes, negative APCI is much more efficient than positive APCI (see Figure 2.6). For instance, the LC-MS/MS peak of C<sub>60</sub> in pseudo-MRM mode is not visible at 1 mg L<sup>-1</sup> in the positive mode, while it has a peak intensity in the 10<sup>5</sup> order of magnitude in the negative mode. For NMFP however, the signal is much more intense using positive ionization (ca. 6 10<sup>4</sup> vs. 1.5 10<sup>4</sup> intensity; cf. Figure 2.6).

### 2.3.1.c. APPI-MS

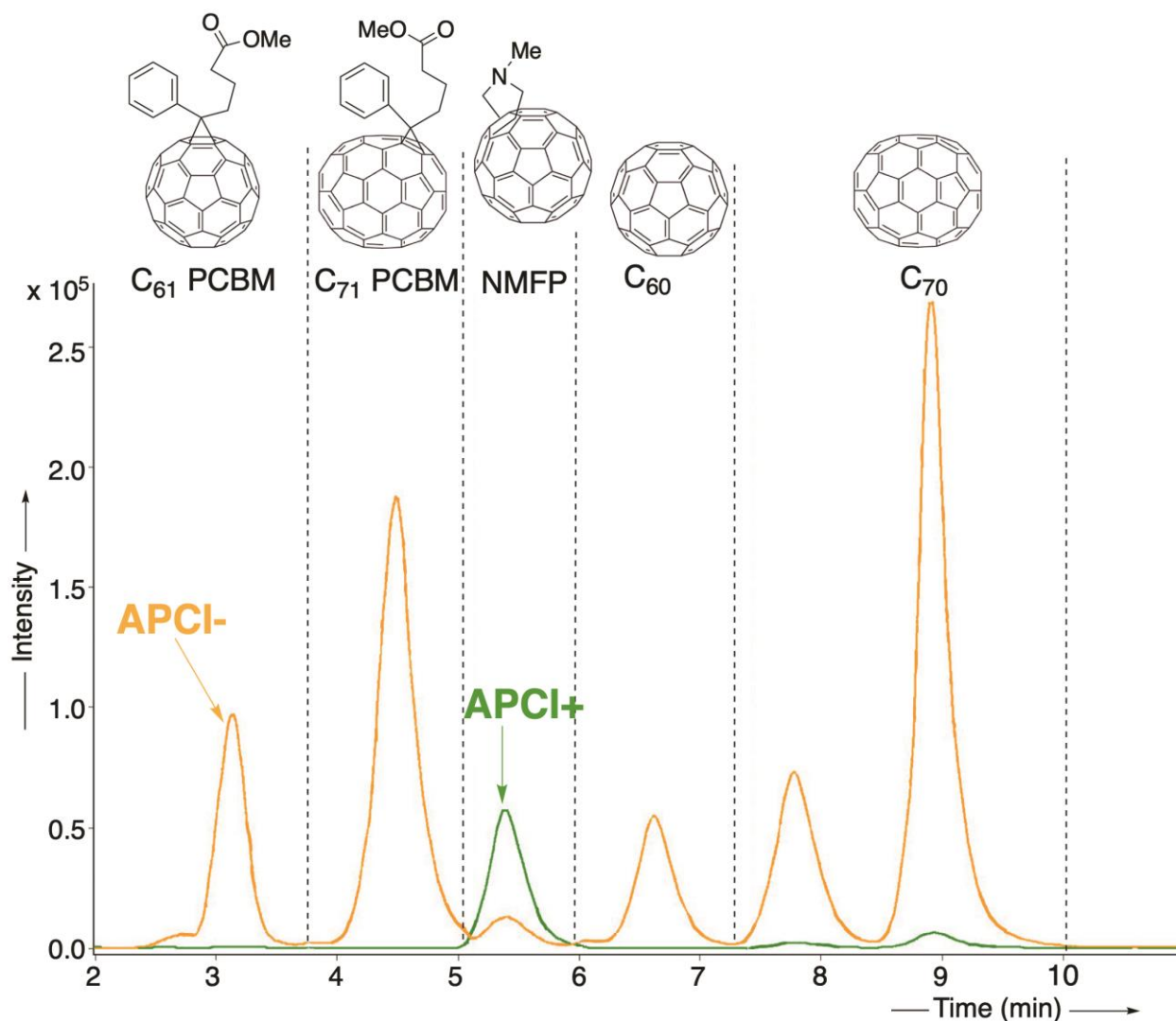
APPI has proved to be very efficient for fullerenes ionization, considering their very low polarity and the use of toluene, which is universally used in LC separation of fullerenes, and serves as a solvent-mediated ionization agent<sup>31,32,38,40,41</sup>.

APPI mass spectra of fullerenes were found to be very similar to APCI spectra (see Figure 2.1, Figure 2.2, Figure 2.3 and Figure 2.4). In the negative mode, the [M+CN]<sup>-</sup> and [M+CN+O]<sup>-</sup> adducts were observed, whereas in the positive mode, only the M<sup>+</sup> ion occurred.

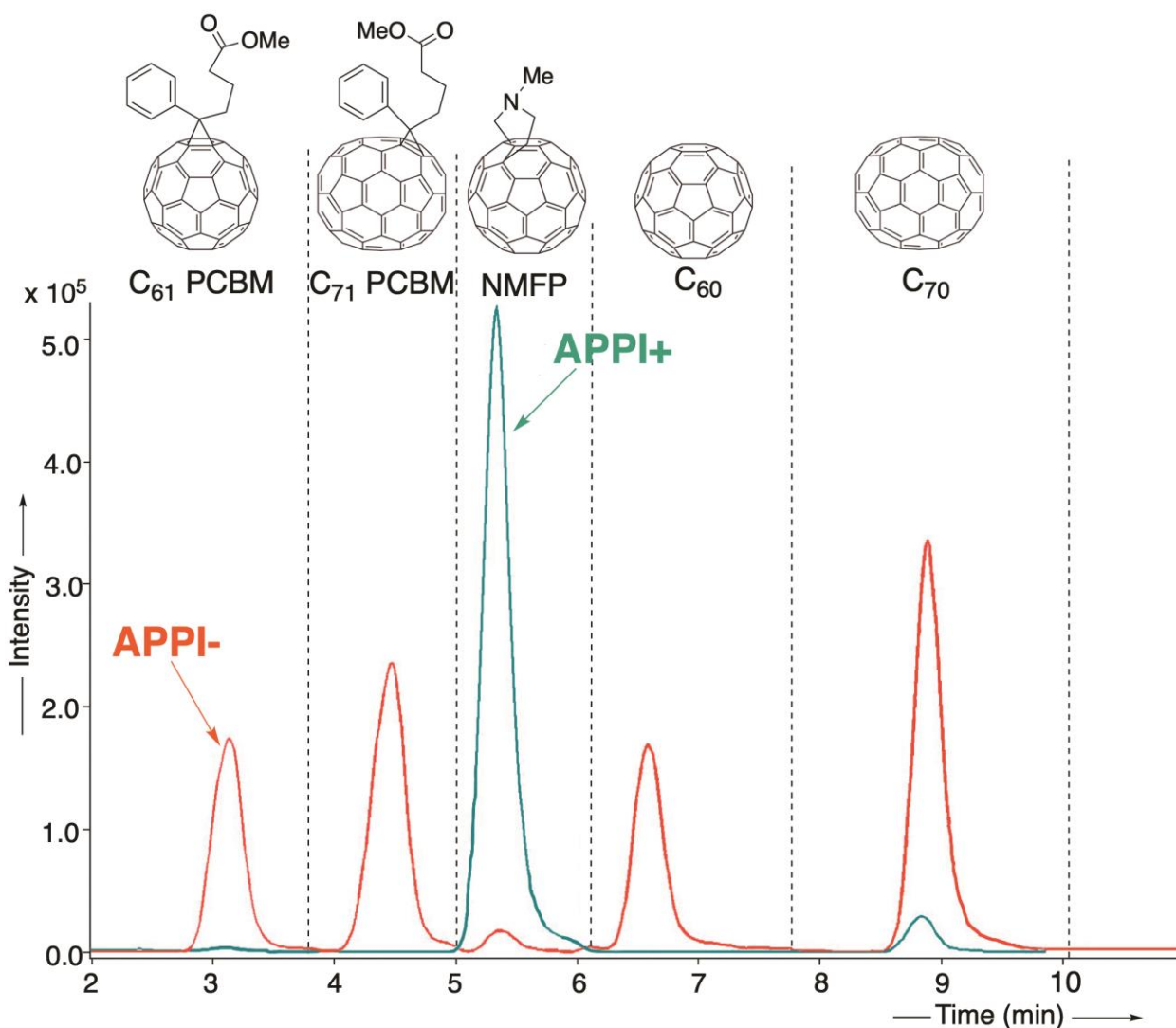
In general, it seems that observed adducts are dependent of various experimental parameters, including the nature of the solvent. Indeed, fullerene adducts other than those

detected in the present study were observed when methanol was used instead of acetonitrile  
7,31,32,40.

Comparison of APPI negative versus positive modes gives about the same results as with APCI (see Section 2.3.1.b). Indeed, negative ionization is highly favored for all the fullerenes, except NMFP which is better ionized in the positive mode. The corresponding overlaid chromatograms are presented in Figure 2.7.



**Figure 2.6 :** LC-APCI-MS Total Ion Chromatogram (pseudo-MRM) of a C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>, C<sub>61</sub>-PCBM, C<sub>71</sub>-PCBM and NMFP mixture at 1 mg L<sup>-1</sup> obtained in negative versus positive mode.



**Figure 2.7 :** LC-APPI-MS Total Ion Chromatogram (pseudo-MRM) of a C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>, C<sub>61</sub>-PCBM, C<sub>71</sub>-PCBM and NMFP mixture at 1 mg L<sup>-1</sup> obtained in negative versus positive mode.

#### 2.3.1.d. Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)

Fullerenes are stable “aromatic-like” structures. Their big carbon cage results in a very high resistance to collision-induced dissociation (CID). Therefore, previous studies presented the MS detection of fullerenes in either Single Ion Monitoring (SIM) mode or in pseudo-MRM mode<sup>7,10,19,23,32</sup>, but it was reported that the use of pseudo-MRM highly increases method sensitivity<sup>19</sup>. The principle and benefits of pseudo-MRM were reported in detail previously<sup>37</sup>.

The MS/MS behavior of fullerene ions obtained using negative ESI with a triple quadrupole was investigated through MS/MS breakdown curves obtained by direct infusion of fullerenes neat standards in toluene on the TSQ Quantum Access Max. The most intense ions observed in MS<sup>1</sup> were used as precursor ions in MS<sup>2</sup>, and the obtained fragment ions were monitored at various collision energies (CE) applied in the collision cell. The corresponding results are presented in Figure 2.8.

As expected, no fragmentation of pristine fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> was observed, and only the intact precursor ion was observed in Q3 after CID in Q2 (i.e. 720 for C<sub>60</sub> and 840 for C<sub>70</sub>), irrespective of the CE (see Figure 2.8.a). The observation of the same phenomenon for functionalized fullerenes was however less expected. Indeed, the chemical structures of functionalized derivatives such as PCBM and NMFP suggest a possible loss of the functionalized group by CID, and therefore an intense MS/MS transition from the molecular ion M<sup>-</sup> to a fragment corresponding to the bare carbon buckyball was expected. Surprisingly, according to our results presented in Figure 2.8.b for C<sub>61</sub>-PCBM, these fragment ions only occur quantitatively at collision voltages above 45 V, and the maximal intensity of the corresponding transition only accounts for about 20 % of the intensity of the pseudo-MRM transition.

Finally, one can notice an increase of the pseudo-MRM signal intensity from 0 to about 15 V applied, while one could expect a constant signal decrease already from very low collision voltages. This phenomenon was already described and was attributed to the geometry of the source from the mass spectrometer<sup>37</sup>. The TSQ Quantum Access Max is three-dimensional L-shaped, therefore the ions path is not direct from Q1 towards Q3, and the application of collision voltages in Q2 could help facilitating the parent ion transmission in the TQ, thus enhancing the signal.

This pattern is actually an advantage for environmental analysis of fullerenes, because it maintains the specificity of MRM: the application of slight collision energies could result in the fragmentation of possible isobaric interferences which would be less resistant to CID than fullerenes. Therefore, with TQ instruments, pseudo-MRM mode highly increases the sensitivity for fullerene detection without affecting its specificity.

The pseudo-MRM pattern was also observed on the ion trap with APCI and APPI sources. C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> are not subject to fragmentation, whether positively or negatively charged, even at high fragmentation amplitudes (CE > 1.5) (Figure 2.9).

However, in the case of functionalized fullerenes, it is worth noting that positively charged ions obtained with APCI and APPI sources were more subject to fragmentation than negatively charged ions. Already at moderate collision energies, the intensity of the positively charged molecular ion decreased, in favor of a range of fragments corresponding to the breaking of covalent bonds from the functional group, down to the fragment made up of the carbon buckyball skeleton only (see Figure 2.10). On the other hand, negatively charged molecular ions of functionalized fullerenes only yielded their corresponding pristine fullerene, at fairly low intensities, and only when high collision energies were applied (see Figure 2.10).

In general, tandem mass spectra obtained were very similar using APCI and APPI sources. The only differences concerned the relative intensities of fragments which could vary between both sources at the same collision energy.

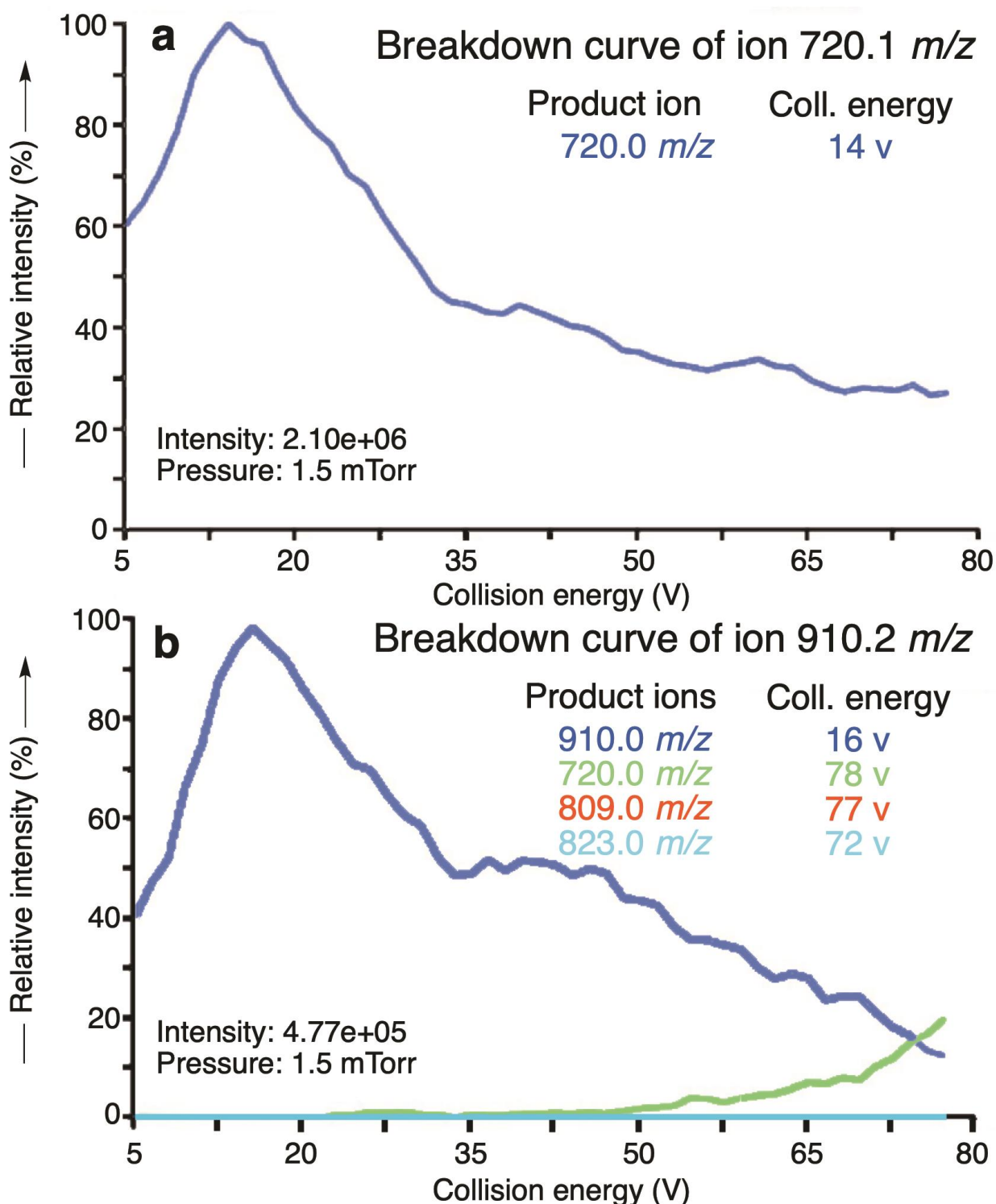


Figure 2.8 : MS/MS breakdown curve obtained by negative electrospray (ESI<sup>-</sup>) direct infusion and Collision-Induced Dissociation (CID) from 5 to 80 V of a) C<sub>60</sub> and b) C<sub>61</sub>-PCBM on a Triple Quadrupole instrument

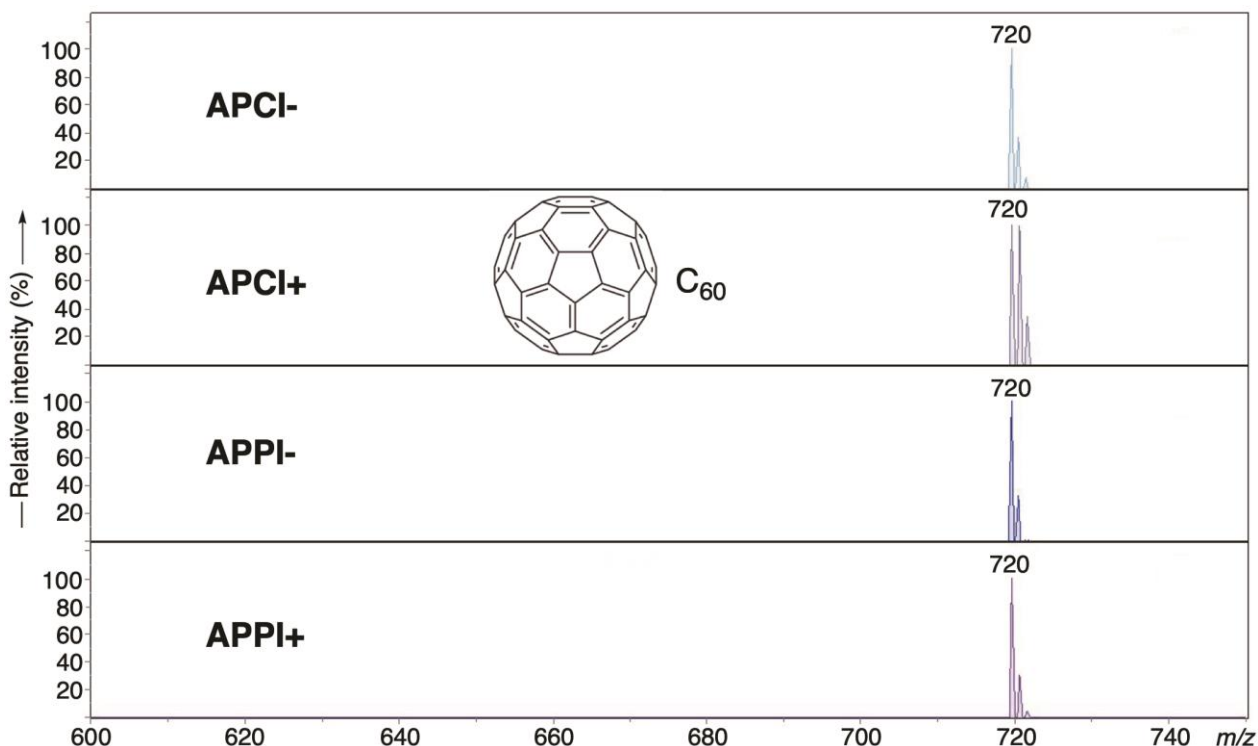


Figure 2.9 : MS/MS fragmentation Mass Spectrum of C<sub>60</sub> (parent ion: m/z = 720) with a) negative Atmospheric Pressure Chemical Ionization and CE = 1.5, b) positive Atmospheric Pressure Chemical Ionization and CE = 1.5, c) negative Atmospheric Pressure Photolonization and CE = 1.5, d) positive Atmospheric Pressure Photolonization and CE = 1.5

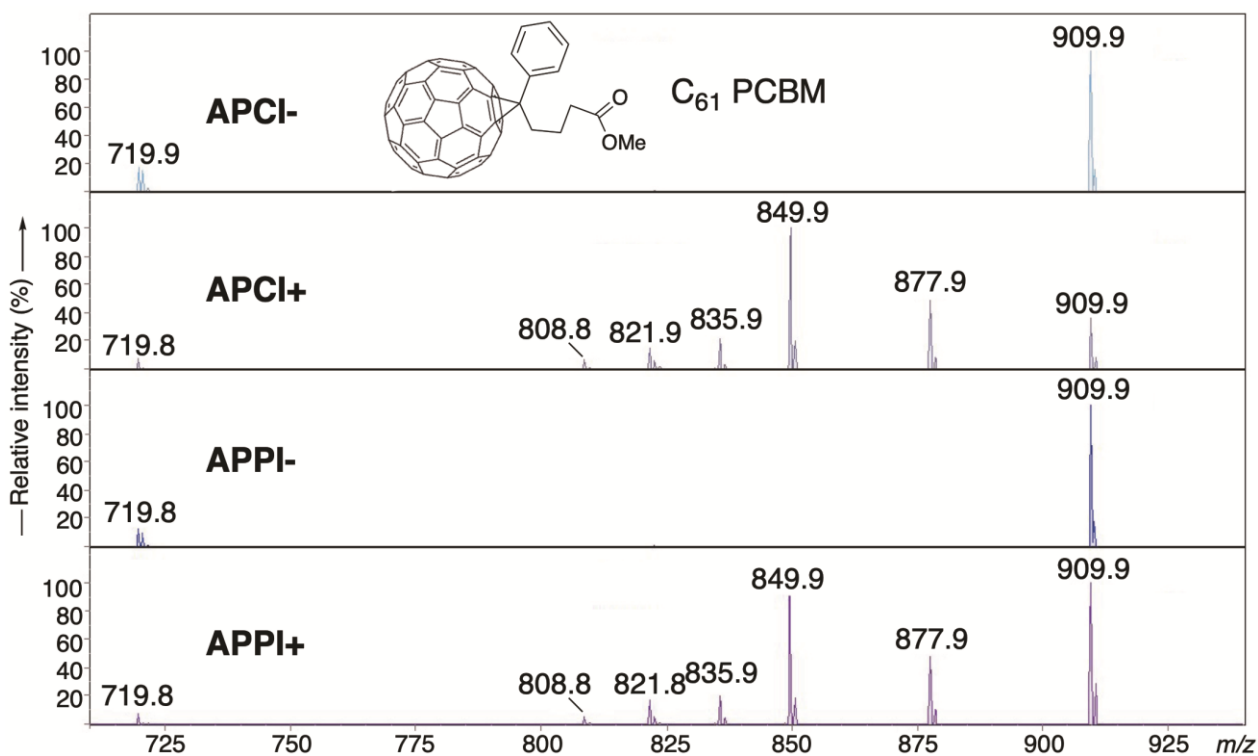


Figure 2.10 : MS/MS fragmentation Mass Spectrum of C<sub>61</sub>-PCBM (parent ion: m/z = 910) with a) negative Atmospheric Pressure Chemical Ionization and CE = 1.4, b) positive Atmospheric Pressure Chemical Ionization and CE = 0.9, c) negative Atmospheric Pressure Photolonization and CE = 1.2, d) positive Atmospheric Pressure Photolonization and CE = 0.8

### 2.3.2. Liquid Chromatography

To separate the five fullerenes investigated in our study, a C<sub>18</sub> stationary phase was used: the Nucleodur C<sub>18</sub> Pyramid (150 x 3 mm, 3 µm particle size; Macherey-Nagel GmbH&Co., Düren, Germany). The performance of this column was compared to that of another kind of column having a different stationary phase: the Raptor® Biphenyl (150 x 3 mm, 2.7 µm particle size; Restek Corp., Bellefonte, PA, USA).

The biphenyl phase, even after careful optimization of the various LC parameters (see caption of Figure 2.11), did not enable a satisfying separation of our compounds. The LC-ESI(-)-MS chromatogram obtained for the fullerene mixture with the Raptor® Biphenyl column in the optimized conditions is represented in Figure 2.11.a. The comparative LC-ESI(-)-MS chromatogram obtained with the Nucleodur C<sub>18</sub> Pyramid column on the same instrument is displayed in Figure 2.11.b.

To support the visual impression of a better fullerene separation on the Nucleodur C<sub>18</sub> Pyramid column, the number of theoretical plates (N) of each column for each studied fullerene is reported in Table 2.I, and the resolution (R) between consecutive peaks obtained with each column is shown in Table 2.II. It can be concluded that for all the peaks, the value of N was always the highest with the C<sub>18</sub> column (from 2 to 8 times higher than with the biphenyl column). The higher efficiency of the C<sub>18</sub> column was confirmed by the resolution values, from 1.9 to 6.3, while those obtained using the biphenyl column ranged from 0.4 to 3.5, including three of the four resolutions below the critical value of 1.5.

It could be hypothesized that the lack of selectivity of the biphenyl phase was due to the interference of toluene used in the mobile phase, which could saturate the π-π interaction sites of the biphenyl phase, making them unavailable for our analytes. Therefore, the C<sub>18</sub> phase was selected for our analytical method.

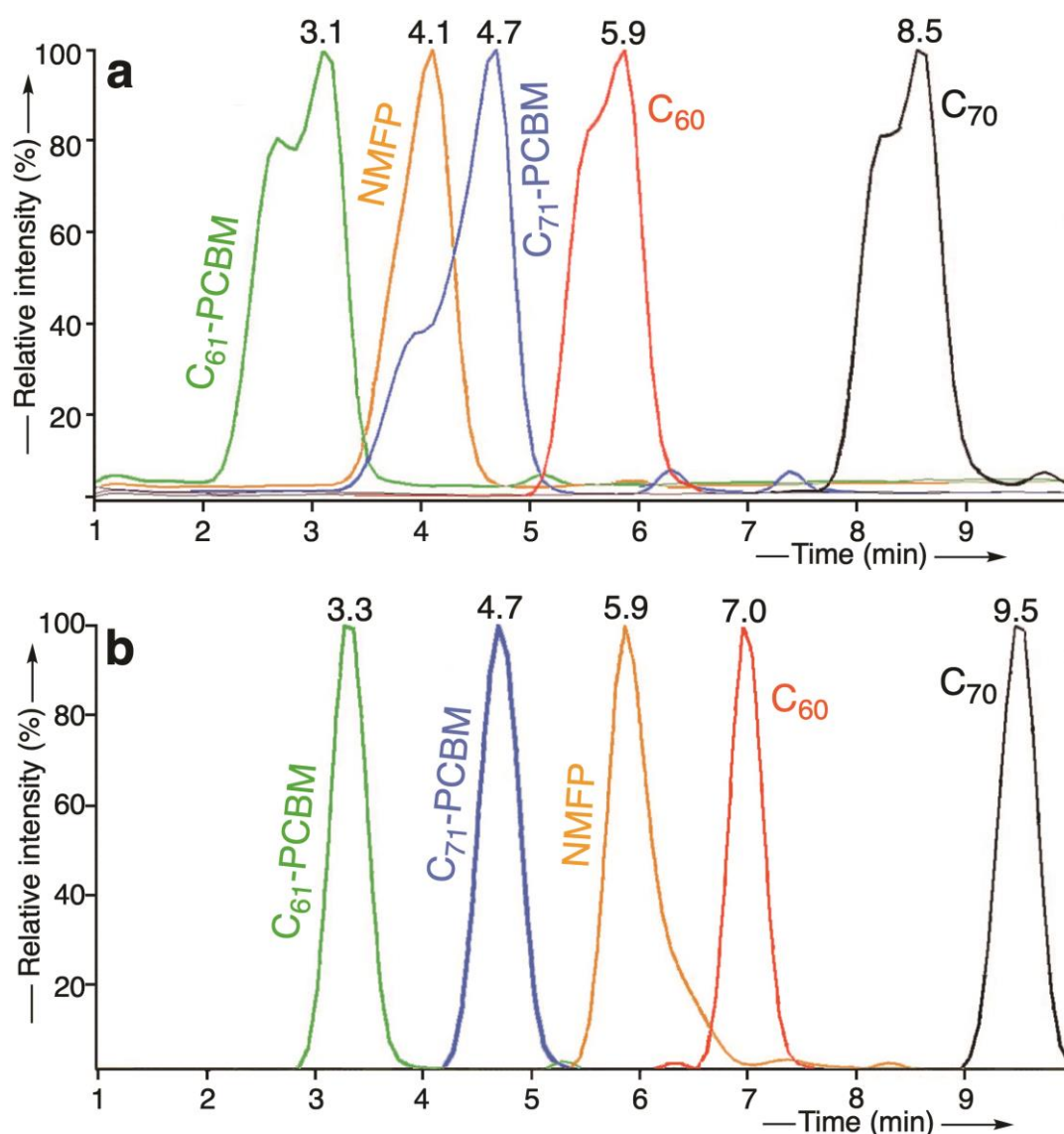
Two polar solvents were also compared in association with toluene: acetonitrile and methanol. It was reported in the literature that no significant differences were observed between these two solvents in terms of peak shape and resolution using a C<sub>18</sub> stationary phase. However, compounds are eluted faster when methanol is used instead of acetonitrile<sup>24,40</sup>. After optimization of the LC method, we reached the same conclusion, as illustrated in Figure 2.12 and Figure 2.13. Broadly, the peak of C<sub>70</sub> was more intense and more focused with methanol in the eluent, while the shape of the other peaks was generally better with acetonitrile. The elution order of NMFP and C<sub>71</sub>-PCBM was inverted when methanol was used instead of acetonitrile in the eluent.

Acetonitrile in combination with toluene was finally chosen as the optimal mobile phase. The same LC method was used for LC-ESI-MS/MS, LC-APCI-MS/MS and LC-APPI-MS/MS analyses (reconstituted Total Ion Chromatogram in Figure 2.12). The five fullerenes studied in this work elute in the following order: first C<sub>61</sub>-PCBM, then C<sub>71</sub>-PCBM, NMFP, C<sub>60</sub> and last C<sub>70</sub>.



**Table 2.I : Number of theoretical plates (N) measured for each fullerene peak by LC-ESI(-)-MS with the biphenyl and C<sub>18</sub> columns.**

<b>N (LC-ESI(-)-MS)</b>	<b>Biphenyl</b>	<b>C<sub>18</sub></b>	<b>C<sub>18</sub> / Biphenyl Ratio</b>
<b>C<sub>61</sub>-PCBM</b>	157	832	5.3
<b>C<sub>71</sub>-PCBM</b>	204	1724	8.5
<b>NMFP</b>	402	838	2.1
<b>C<sub>60</sub></b>	870	5122	5.9
<b>C<sub>70</sub></b>	1611	8190	5.1

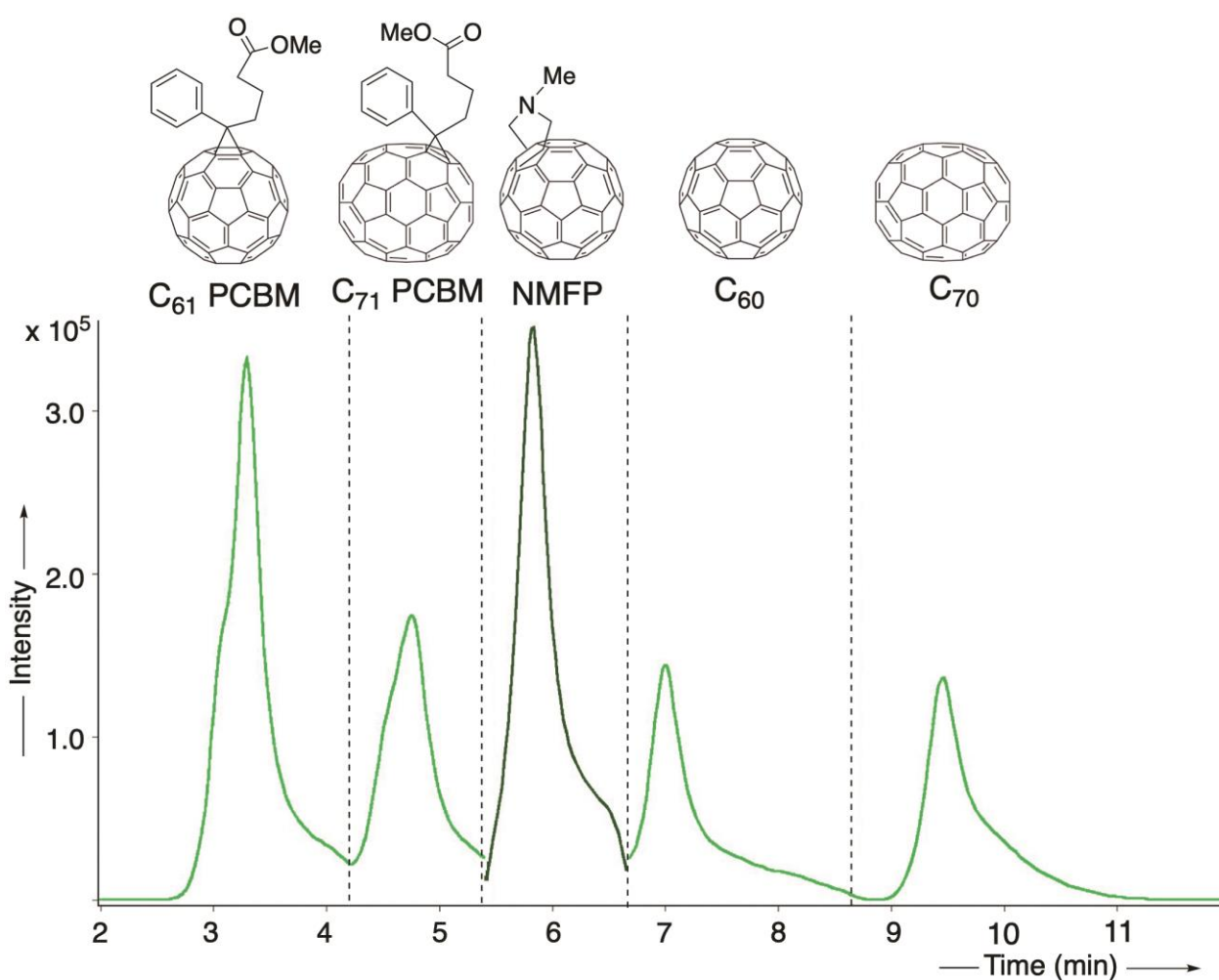


**Figure 2.11 : LC-ESI(-)-MS Single Ion Monitoring Chromatogram of a C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>, C<sub>61</sub>-PCBM, C<sub>71</sub>-PCBM and NMFP mixture obtained a) on the biphenyl column (150 x 3 mm, 2.7 μm; Restek Corp., Bellefonte, PA, USA) and b) on the C<sub>18</sub> column (150 x 3 mm, 3 μm; Macherey-Nagel GmbH&Co., Düren, Germany) (relative intensities for each compound).**

For the biphenyl column (a), the LC gradient was 30 % toluene / 70 % acetonitrile initial to 45 % toluene / 55 % acetonitrile final in 14 minutes. For the C<sub>18</sub> column (b), the LC gradient was 40 % toluene / 60 % acetonitrile initial (maintained for 1 minute) to final 60 % toluene / 40 % acetonitrile in 10 minutes. The LC flow rate was set at 0.7 mL/min.

**Table 2.II : Resolution (R) measured for each pair of fullerene consecutive peaks by LC-ESI (-)-MS using a biphenyl (150 x 3 mm, 2.7 μm; Restek Corp., Bellefonte, PA, USA) and a C<sub>18</sub> (150 x 3 mm, 3 μm; Macherey-Nagel GmbH&Co., Düren, Germany) HPLC column.**

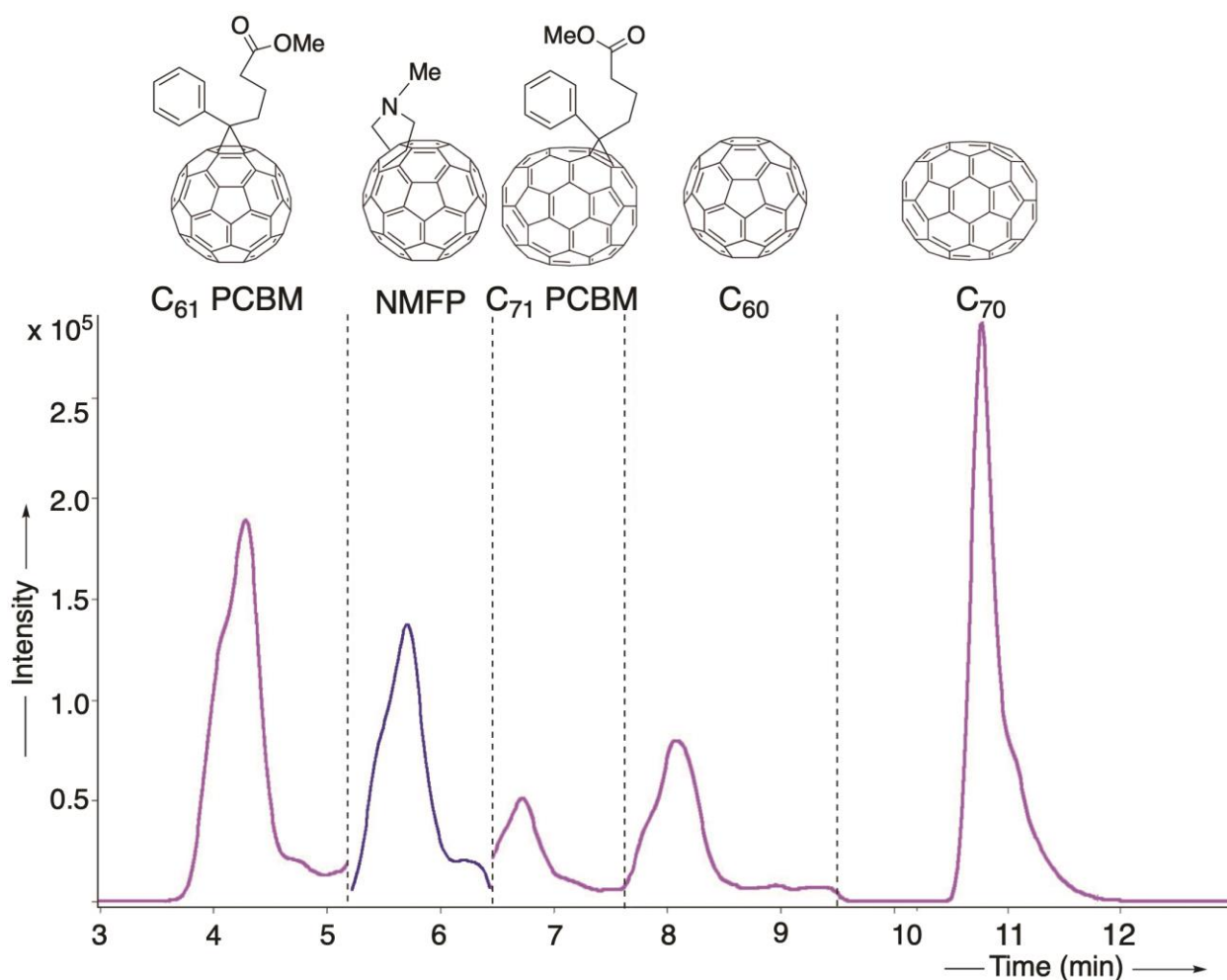
<b>R (LC-ESI(-)-MS)</b>	<b>Biphenyl</b>	<b>C<sub>18</sub></b>	<b>C<sub>18</sub> / Biphenyl ratio</b>
<b>Peaks # 1 - 2</b>	1.4	3.0	2.2
<b>Peaks # 2 - 3</b>	0.4	1.9	5.1
<b>Peaks # 3 - 4</b>	1.2	2.0	1.6
<b>Peaks # 4 - 5</b>	3.5	6.3	1.8



**Figure 2.12 : LC-APPI-MS/MS Total Ion Chromatogram (pseudo-MRM) of a C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>, C<sub>61</sub>-PCBM, C<sub>71</sub>-PCBM and NMFP mixture obtained using a C<sub>18</sub> column (150 x 3 mm, 3 μm; Macherey-Nagel GmbH&Co., Düren, Germany) eluting with a toluene/acetonitrile gradient.**

The LC gradient was 40 % toluene / 60 % acetonitrile initial (maintained for 1 minute) to 50 % toluene / 50 % acetonitrile in 8 minutes, and to final 60 % toluene / 40 % acetonitrile after 12 minutes. The LC flow rate was set at 0.7 mL/min.

Negative mode ionization was used for all compounds except NMFP.



**Figure 2.13 : LC-APPI-MS Total Ion Chromatogram (pseudo-MRM) of a C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>, C<sub>61</sub>-PCBM, C<sub>71</sub>-PCBM and NMFP mixture obtained using a C<sub>18</sub> column (150 x 3 mm, 3 μm; Macherey-Nagel GmbH&Co., Düren, Germany) eluting with a toluene/methanol gradient.**

The LC gradient was 33 % toluene / 67 % methanol initial (maintained for 7 minutes) to final 55 % toluene / 45 % methanol in 10 minutes. The LC flow rate was set at 0.7 mL/min. Negative mode ionization was used for all compounds except NMFP.

### 2.3.3. Comparison between LC-ESI-MS/MS, LC-APCI-MS/MS and LC-APPI-MS/MS

The results obtained from direct infusion of fullerene standard solutions were used to select the most intense MS/MS transitions, which were then employed for the LC-MS/MS methods. Those transitions are summarized for each LC-MS/MS analysis in Table 2.III, Table 2.IV, Table 2.V. Apart from variations of optimal collision energies, all transitions were shown to be identical in ESI, APCI and APPI modes in terms of parent and fragment ions.

The main method parameter which we wanted to compare in this section was the LOQ. The goal was to obtain the most sensitive detection, given that fullerenes are generally found at very low concentrations. Instrumental LOQ obtained with each ionization source are reported in Table 2.VI.

**Table 2.III : Optimized tandem Mass Spectrometry quantitation (Q) and confirmation (q) transitions of the LC-ESI(-)-MS/MS method developed on the TSQ Quantum Access Max instrument.**  
Collision voltages (in volts) are reported under brackets after the m/z values of parent and fragment ions.

<b>LC-ESI(-)-MS/MS transitions</b>	<b>Q</b>	<b>q</b>
<b>C<sub>61</sub>-PCBM</b>	910 -> 910 (16 V)	910 -> 720 (80 V)
<b>C<sub>71</sub>-PCBM</b>	1030 -> 1030 (17 V)	1030 -> 840 (80 V)
<b>NMFP</b>	777 -> 777 (14 V)	777 -> 720 (80 V)
<b>C<sub>60</sub></b>	720 -> 720 (15 V)	721 -> 721 (13 V)
<b>C<sub>70</sub></b>	840 -> 840 (13 V)	841 -> 841 (14 V)

**Table 2.IV : Optimized tandem Mass Spectrometry quantitation (Q) and confirmation (q) transitions of the LC-APCI-MS/MS method developed on the Esquire 3000<sup>plus</sup> instrument.**  
Collision voltages (in volts) are reported under brackets after the m/z values of parent and fragment ions.

<b>LC-APCI-MS/MS transitions</b>	<b>Q</b>	<b>q</b>
<b>C<sub>61</sub>-PCBM (-)</b>	910 -> 910 (0.3)	910 -> 720 (1.5)
<b>C<sub>71</sub>-PCBM (-)</b>	1030 -> 1030 (0.5)	1030 -> 840 (2.0)
<b>NMFP (+)</b>	778 -> 778 (0.4)	777 -> 777 (0.4)
<b>C<sub>60</sub> (-)</b>	720 -> 720 (0.5)	721 -> 721 (0.5)
<b>C<sub>70</sub> (-)</b>	840 -> 840 (0.5)	841 -> 841 (0.5)

**Table 2.V : Optimized tandem Mass Spectrometry quantitation (Q) and confirmation (q) transitions of the LC-APPI-MS/MS method developed on the Esquire 3000<sup>plus</sup> instrument.**  
Collision energies (in volts) are reported under brackets after the m/z values of parent and fragment ions.

<b>LC-APPI-MS/MS transitions</b>	<b>Q</b>	<b>q</b>
<b>C<sub>61</sub>-PCBM (-)</b>	910 -> 910 (0.3)	910 -> 720 (1.5)
<b>C<sub>71</sub>-PCBM (-)</b>	1030 -> 1030 (0.5)	1030 -> 840 (2.0)
<b>NMFP (+)</b>	778 -> 778 (0.4)	777 -> 777 (0.4)
<b>C<sub>60</sub> (-)</b>	720 -> 720 (0.5)	721 -> 721 (0.5)
<b>C<sub>70</sub> (-)</b>	840 -> 840 (0.5)	841 -> 841 (0.5)

It appears clearly that ESI is less sensitive than APCI and APPI, from two to ten times.

LOQ obtained with APCI and APPI are much closer for most compounds, even equal for the two pristine fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub>. The only major difference observed concerns NMFP, for which the instrumental LOQ is ten times lower with APPI, due to an enhanced response of NMFP with APPI in the positive ionization mode, as stated in Section 2.3.1.c (Figure 2.7). These results are in good agreement with those of Li et al. who only studied pristine fullerenes, and of Astefanei et al. who only presented results about the functionalized derivatives <sup>24,31</sup>. Both works resulted in a broad rating like APPI > APCI > ESI. However, the study of Astefanei et al. was based on negative ionization of NMFP <sup>24</sup>, while we rather used positive ionization which we found more efficient for this compound.

In addition to its higher LOQs, the LC-ESI-MS/MS method was not selected because of some additional issues. First, the linearity of its calibration range (from the LOQ to 500 µg·L<sup>-1</sup>) was poorer than the linearity obtained using APCI and APPI sources. With the use of a quadratic fit and 1/X weighting, correlation coefficients (R<sup>2</sup>) were frequently lower than 0.99. The same conclusion was previously drawn by Li et al. <sup>31</sup>.

Moreover, the intra-day repeatability was also lower, with relative standard deviations (RSD) often exceeding 15 % (comparative values for the LC-APPI-MS/MS method are given in Section 2.3.5). This suggests that the ionization processes involved in APCI and APPI are more robust for fullerenes than electrospray electron capture ionization which would be more sensitive to parameters such as ambient moisture or traces of water in the solvent for example.

LC-APCI-MS/MS and LC-APPI-MS/MS methods exhibited similar performances, but APPI was finally selected as the most appropriate source due to its low LOQs and its known specificity towards non-polar compounds <sup>32</sup>.

**Table 2.VI : Instrumental Limits of Quantification (LOQ) of LC-ESI-MS/MS, LC-APCI-MS/MS and LC-APPI-MS/MS methods, expressed in pg injected.**

<b>Instrumental LOQ (pg)</b>	<b>C<sub>60</sub></b>	<b>C<sub>70</sub></b>	<b>C<sub>61</sub>-PCBM</b>	<b>C<sub>71</sub>-PCBM</b>	<b>NMFP</b>
<b>ESI</b>	200	100	100	100	100
<b>APCI</b>	100	40	40	40	100
<b>APPI</b>	100	40	20	20	10

#### 2.3.4. Extraction recoveries

In this section are reported the recoveries of the method, including Pressurized Liquid Extraction yields and other steps of the sample preparation such as concentration of the extract.

The whole experiment designed for the determination of method recoveries was presented in Section 2.2.5. Those recoveries are represented for each of the five analytes at each of the five spiking levels in Figure 2.14.

The mean recoveries over all the spiking levels ranged from 75 % for NMFP to 95 % for C<sub>60</sub>. Compared to studies determining fullerenes in aerosol samples, these recoveries are higher than those previously published using ultrasonication of filters in toluene : from 24 to 53 % in the study of Benn et al., from 50 to 56 % in that of Encinas and Gómez, and from 60 to 71 % in the study of Sanchís et al.<sup>2,22,23</sup>. This demonstrates the higher performance of our method, and more generally the interest of using PLE for the extraction of fullerenes from aerosol, as was already shown by Shareef et al. for soil samples and by Astefanei et al. for sediment samples<sup>24,29</sup>.

RSD over the five spiking levels ranged from  $\pm 12$  % for C<sub>71</sub>-PCBM to  $\pm 33$  % for C<sub>70</sub>. For the five studied fullerenes, a general trend is a lower recovery and/or a higher variability at the lowest spiking levels (see Figure 2.14). It is generally expected that method reproducibility is lower at low concentrations. Indeed, small losses of analytes can lead to high relative variations of the recovery when the spiked amount is low.

In the case of fullerenes, glassware sorption seems to be the major pathway for analyte loss during sample preparation. This issue was already raised multiple times in the literature. Núñez et al. used plastic vials to avoid sorption on glass materials<sup>32</sup>, whereas Sanchís et al. advised for the use of silica glassware to avoid sorption on plastic materials<sup>9,34</sup>. In our method, the extraction was performed in ASE stainless steel cells, which is an efficient material to reduce sorption<sup>29</sup>. However, the extract was then recovered in glass bottles, and the concentration of the extract was performed in glass tubes. To minimize losses, glassware was rinsed with toluene at each transfer from a container to another, following the advice of Farré et al.<sup>19</sup>. Still, it could be insufficient to ensure a total recovery of fullerenes, and other issues such as photodegradation during the concentration of the extract should be kept in mind as possible sources of analyte loss<sup>9</sup>.

Hence, even though some of our matrix recoveries exhibit substantial standard deviations (SD) inside triplicates (e.g.  $93 \pm 45$  % for C<sub>60</sub> fortified at 20 ng), the overall recoveries and RSD are in a satisfying range for the validation of the analytical method, considering the great analytical complexity related to these analytes<sup>13</sup>.

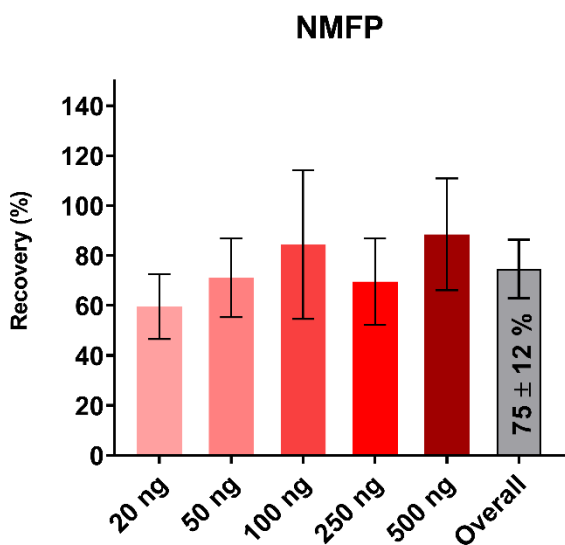
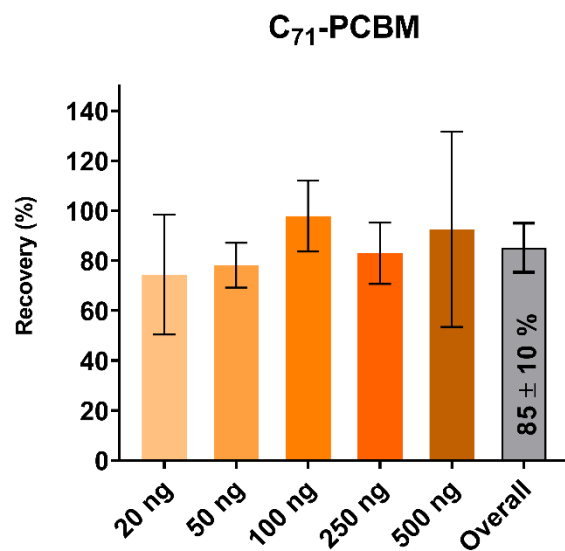
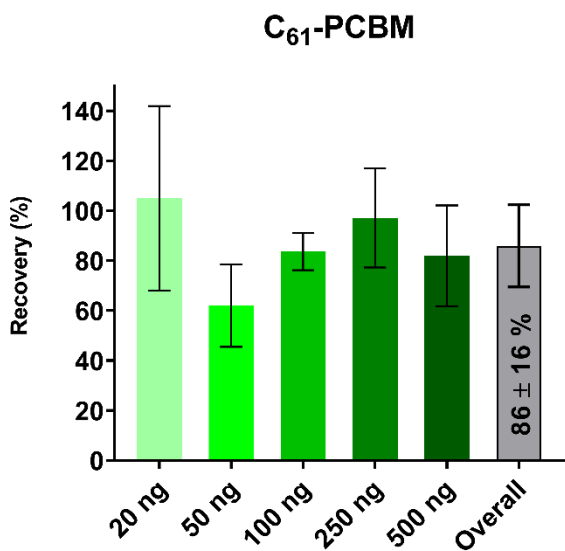
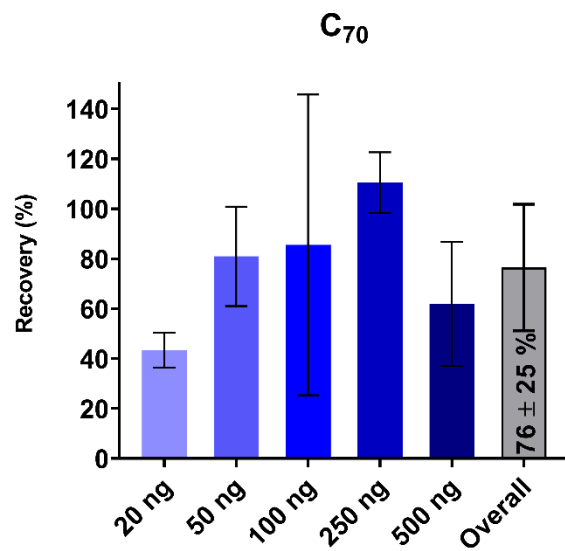
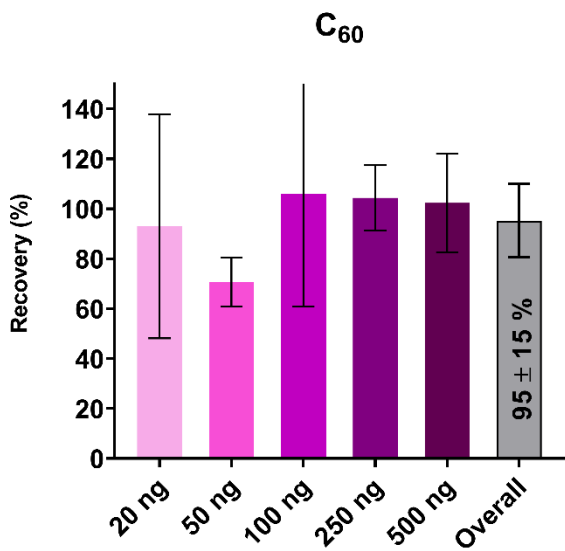


Figure 2.14 : Recovery (in %) of the five fullerenes spiked at five different levels on GFFs using Pressurized Liquid Extraction

### 2.3.5. LC-APPI-MS/MS method validation

The LC-APPI-MS/MS method was selected as the ideal method compared to LC-APCI-MS/MS and LC-ESI-MS/MS methods (see Section 2.3.3).

The first step of the method validation consisted in confirming the accuracy of the calibration. To this purpose, eight calibration curves were built from eight different sets of ten fullerene standard solutions in toluene, with concentrations ranging from 0.5 to 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . At most, there could be ten validated calibration levels in a series, but for each series, six was considered as the minimal acceptable number of validated calibration levels. All quadratic calibration curves showed very good fit with all  $R^2 > 0.99$ , most of them being even  $> 0.999$ .

For a more complete validation of the calibration range, the latter was evaluated in terms of precision. Deviations between theoretical concentrations and recalculated concentrations of standard solutions obtained from the calibration curve were determined. The mean and SD of this deviation for each compound at each calibration point over the eight series were reported (see Figure 2.15). The acceptability criterion was set at  $\pm 30\%$  for all levels, except for the LOQ at which  $\pm 60\%$  was allowed due to commonly higher deviations at the lowest calibration levels<sup>42,43</sup>. For  $C_{70}$ ,  $C_{61}$ -PCBM and NMFP, deviations are indeed below the  $\pm 30\%$  tolerance for all levels above the LOQ, and below the  $\pm 60\%$  tolerance at the LOQ. In the case of  $C_{60}$  and  $C_{71}$ -PCBM, the “mean - SD” value at the 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  level is below the - 30 % tolerance (Figure 2.15).

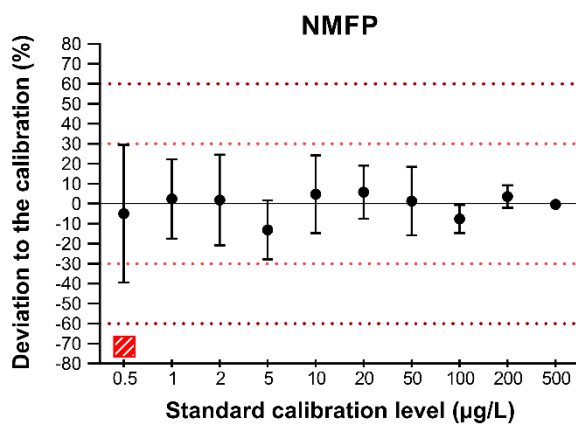
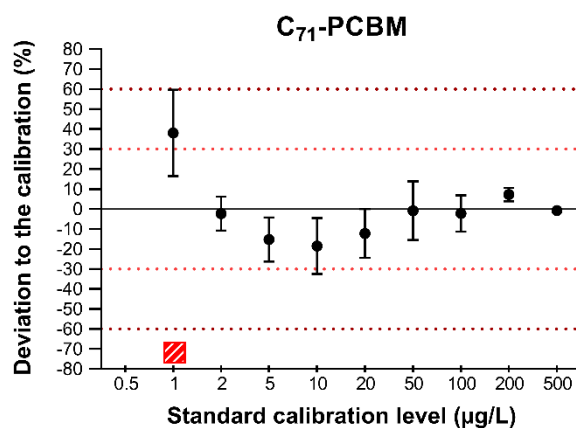
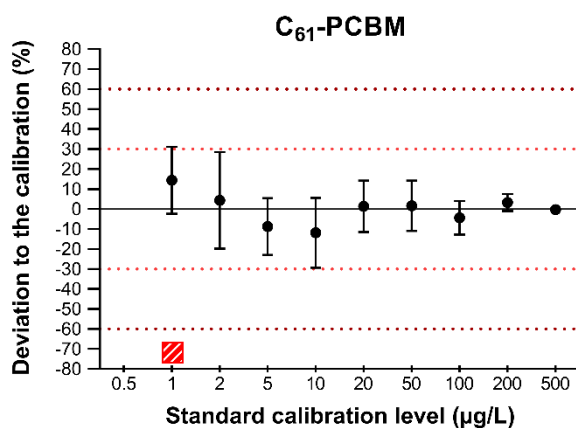
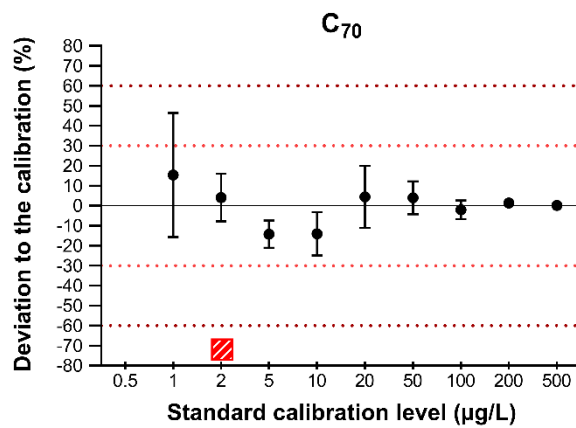
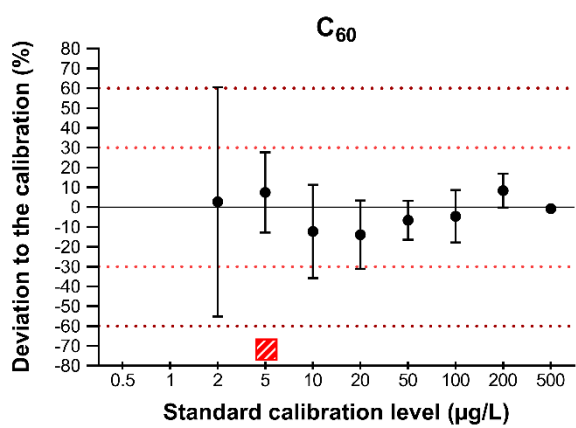
For quality assurance purposes, all calibration curves used for the analysis of real-world samples or recovery validation extracts were checked against these precision criteria and re-injected or even re-prepared if exceeding the maximal acceptable deviations.

External calibration was performed because we could not purchase any commercial isotope-labeled fullerene such as the  $^{13}\text{C}_{60}$  used in previous studies. The supplier of  $^{13}\text{C}_{60}$  reported in those studies is no longer in business<sup>5,20,30</sup>. We found no other chemical capable of acting as internal standard for our method because of the uniqueness of fullerene behavior. It would have to match, even approximately, the hydrophobicity of fullerenes for the sample preparation steps, their reversed-phase retention in non-aqueous conditions, and their ionization properties. We argue in favor of more availability of  $^{13}\text{C}$ -labeled fullerenes, either pristine or functionalized. This would enhance method performance and facilitate method validation.

Intra-day repeatability was validated at a low-range level (10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and at a high-range level (200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) over five replicate injections performed during the same day. For all five fullerenes, RSD were below the maximal accepted value of 15 %. They ranged from 3.1 % for  $C_{60}$  at 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  to 10.6 % for  $C_{70}$  at 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  (see Table 2.VII).

Inter-day repeatability was validated similarly to intra-day repeatability, at the same low-range and high-range levels, with five replicates injected over five consecutive days. For all five fullerenes, RSD were below the maximal accepted value of 15 %. They ranged from 5.4 % for  $C_{61}$ -PCBM at 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  to 12.6 % for  $C_{71}$ -PCBM at 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  (see Table 2.VII).





**Figure 2.15 : Precision profiles of eight calibration curves for C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>, C<sub>61</sub>-PCBM, C<sub>71</sub>-PCBM and NMFP. Deviations between theoretical concentrations and recalculated concentrations of standard solutions obtained from the calibration curve (%) over ten concentration levels are represented. The light red dashed line stands for the ± 30 % maximal accepted deviation. The dark red dashed line stands for the ± 60 % maximal accepted deviation, only valid at the LOQ. The red squares with white stripes indicate the validated LOQ for each compound.**

**Table 2.VII : Intra-day and inter-day repeatability calculated as relative standard deviations on the measured concentration of each fullerene over five replicates (%).**

	Level	C <sub>60</sub>	C <sub>70</sub>	C <sub>61</sub> -PCBM	C <sub>71</sub> -PCBM	NMFP
<b>Intra-day repeatability (%)</b>	10 µg L <sup>-1</sup>	3.1 %	10.6 %	6.0 %	12.6 %	5.4 %
	200 µg L <sup>-1</sup>	6.6 %	7.4 %	7.7 %	9.0 %	4.8 %
<b>Inter-day repeatability (%)</b>	10 µg L <sup>-1</sup>	6.6 %	8.2 %	5.4 %	12.6 %	8.9 %
	200 µg L <sup>-1</sup>	5.7 %	7.9 %	8.4 %	5.7 %	11.6 %

Limits of quantification (LOQ) were defined according to several criteria reported in Section 2.2.5. In addition to the common “S/N > 10” rule, we specified that the LOQ level should be validated against precision with a deviation within the ± 60 % range defined previously. Moreover, the validated LOQ should be below the mean + SD of concentrations measured when integrating the background noise signal of solvent blanks.

For C<sub>60</sub>, C<sub>61</sub>-PCBM, C<sub>71</sub>-PCBM and NMFP, all criteria were met at the same calibration level which could then be validated as LOQ. For C<sub>70</sub> however, while 1 µg L<sup>-1</sup> could have been considered as LOQ regarding S/N and precision of the calibration, the measured mean + SD of blank injections often exceeded 1 µg L<sup>-1</sup>, therefore only 2 µg L<sup>-1</sup> could be the successfully validated LOQ.

All validated instrumental LOQs are reported in Table 2.VI. In Table 2.VIII, these instrumental LOQs are associated with their corresponding method LOQ for each environmental sample of this work.

Generally, our instrumental LOQs were quite higher than those obtained in studies involving more recent and powerful MS instrumentation<sup>10,34,41</sup>, but were still lower than those from several other studies<sup>19,22,29</sup>.

Finally, this analytical method was validated in terms of recovery. All results regarding method recoveries were already presented in Section 2.3.4 and in Figure 2.14.

The common standards in environmental analytical chemistry state that recoveries should be between 70 % and 120 % of the spiked amount, with less than 20 % SD<sup>42,43</sup>.

In our case, not all experiments could meet this standard. Indeed, as discussed previously, no internal standard was available. This complicated severely our method validation, because the sample preparation issues mentioned in Section 2.3.4 could not be corrected using an internal standard. However, on average, over the five concentration levels tested, all compounds showed mean recoveries between 75 % and 95 %, and four of them had SD < 20 %. This was a satisfying outcome given the results previously published in the literature and the present analytical challenge (see Section 2.3.4).

**Table 2.VIII : Instrumental and Method Limits of Quantification (LOQ) of the PLE-LC-APPI-MS/MS method, assuming recoveries of 100 %, for all kinds of collected environmental samples presented in this study (daytime PM<sub>10</sub>, day- and night-time PM<sub>10</sub>, household dust, Diesel Particulate Matter)**

	<b>C<sub>60</sub></b>	<b>C<sub>70</sub></b>	<b>C<sub>61</sub>-PCBM</b>	<b>C<sub>71</sub>-PCBM</b>	<b>NMFP</b>
<b>Instrumental LOQ (pg)</b>	100	40	20	20	10
<b>Instrumental LOQ (µg L<sup>-1</sup>)</b>	5.0	2.0	1.0	1.0	0.5
<b>Sample LOQ (ng)</b>	2.5	1.0	0.50	0.50	0.25
<b>LOQ PM<sub>10</sub> - 7 days - daytime only (pg m<sup>-3</sup>)</b>	12	4.7	2.4	2.4	1.2
<b>LOQ PM<sub>10</sub> - 7 days - day and night (pg m<sup>-3</sup>)</b>	6.5	2.6	1.3	1.3	0.65
<b>LOQ settled dust (min) (ng g<sup>-1</sup>)</b>	2.4	0.98	0.49	0.49	0.24
<b>LOQ settled dust (max) (ng g<sup>-1</sup>)</b>	15	5.9	2.9	2.9	1.5
<b>LOQ diesel PM SRM (ng g<sup>-1</sup>)</b>	68	27	14	14	6.8

### 2.3.6. Application to environmental samples

A first series of three weekly medium-volume PM<sub>10</sub> samples was collected during daytime only. Therefore, the method quantification limits for these samples were from 1.2 pg m<sup>-3</sup> for NMFP to pg m<sup>-3</sup> for C<sub>60</sub> (see Table 2.VIII).

A second series of three weekly medium-volume PM<sub>10</sub> samples was collected during a whole week, including day and night. The resulting sampled volume was thus higher, and the associated method LOQs were from 0.65 pg m<sup>-3</sup> for NMFP to 6.5 pg m<sup>-3</sup> for C<sub>60</sub> (see Table 2.VIII).

Among all these samples, none exhibited any fullerene concentration above the quantification limit.

This means that in the parking lot aerosol samples, C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> occur at far lower levels than those reported by Sanchís et al. in aerosols from the Mediterranean Sea (from 33 to 233 800 pg m<sup>-3</sup>, with median values of 60 pg m<sup>-3</sup> for C<sub>60</sub> and 480 pg m<sup>-3</sup> for C<sub>70</sub>)<sup>23</sup>. In this same work, no functionalized fullerenes were detected in the environmental samples, like in the case of

our samples <sup>23</sup>. C<sub>60</sub> is also present at lower concentrations than the highest detected C<sub>60</sub> concentrations in the study of Encinas and Gómez (about 10 pg·m<sup>-3</sup>). However, in this latter study, 26 samples out of 36 showed no trace of C<sub>60</sub> above the method LOQ which was 2 ng per filter, i.e. around 2 pg m<sup>-3</sup> according to the disclosed information about the sampling <sup>22</sup>. The high prevalence of the parking lot PM samples below 2 pg m<sup>-3</sup> is in line with our results. Finally, Benn et al. reported C<sub>60</sub> concentrations in the range of 2-3 pg m<sup>-3</sup> below their lowest calibration point, which are also inferior to our LOQ for this compound.

The absence of any fullerene detection in the airborne PM samples from the present study is therefore consistent with previously published results.

The amount of collected settled dust varied highly depending on the household, from 0.17 g to 1.02 g. Hence, the method LOQ varied from 0.24 to 1.5 ng g<sup>-1</sup> for NMFP and from 2.4 to 15 ng g<sup>-1</sup> for C<sub>60</sub> (see Table 2.VIII).

To our knowledge, this study is the first ever dealing with the determination of fullerenes in household settled dust. All analyzed samples did not show the presence of detectable fullerenes, suggesting that household dust is not a major pathway leading to substantial human exposure to fullerenes. However, other similar studies would still be relevant and very useful for a more comprehensive assessment of fullerenes occurrence in similar indoor environments.

A Diesel Particulate Matter Standard Reference Material (SRM 2975) was also analyzed with the view of studying the presence of fullerenes in such a combustion exhaust sample. From the Diesel PM studied in this work, two distinct sample preparations were performed, where 29.5 and 37.1 mg of this SRM were deposited on a GFF. The lowest resulting method LOQ was from 6.8 ng g<sup>-1</sup> for NMFP to 68 ng g<sup>-1</sup> for C<sub>60</sub> (see Table 2.VIII).

In this sample as well, no fullerene concentration above the LOQ could be measured.

The most comprehensive previous investigation of fullerenes in combustion exhausts was performed by Tiwari et al. <sup>5</sup>. These authors only targeted C<sub>60</sub>, which was measured at 130 ng g<sup>-1</sup> and 41 µg g<sup>-1</sup> in two exhaust particulates samples of a diesel-powered generator operated at 90 % load, but they did not detect it in the exhaust particulates of a diesel-powered generator operated at 0 % load. They also quantified C<sub>60</sub> at 44 ng g<sup>-1</sup> and 120 ng g<sup>-1</sup> in two samples of exhaust plume particles from a gasoline-powered lawn mower <sup>5</sup>. As we did not detect this compound in SRM 2975, the C<sub>60</sub> concentration in this material should therefore be inferior to the values measured by Tiwari et al. in exhaust plumes particles.

More generally, Tiwari et al. underlined the possibility of a high variability in combustion conditions which could affect the release of fullerenes and also their extractability from the particles. Moreover, when C<sub>60</sub> was investigated in four ash samples, it could not be detected, and a <sup>13</sup>C<sub>60</sub> surrogate spiked onto these samples could not be recovered <sup>5</sup>. Similarly, in the study of Benn et al., no C<sub>60</sub> could be detected in the analyzed soot samples <sup>2</sup>. This could mean that soot and ash are very sorptive matrices from which fullerenes could not be extracted, explaining why we were not able to quantify fullerenes in SRM 2975.

As stated by Tiwari et al. <sup>5</sup>, combustion processes can still be considered as major incidental sources of fullerenes, hence their monitoring in such kind of samples, as well as in environmental samples (outdoor aerosols, indoor dust, soil, sediment, water, etc.), should be further undertaken in future studies.

A more comprehensive and reliable environmental assessment of fullerenes would then require available internal standards such as isotope-labeled fullerenes and even certified reference materials to enable inter-laboratory studies.

The use of new generation mass spectrometers with higher sensitivities could also help to reach lower limits of quantification, so that very low levels of fullerenes could be detected to gather more data about their environmental occurrence.

## 2.4. Conclusion

In this article, a method development for the environmental assessment of C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> fullerenes and some of their functionalized derivatives was described. Several parameters of the analytical method were optimized and comparison of two liquid chromatography stationary phases for a more efficient separation of fullerenes, as well as three ionization sources for the enhancement of the detection sensitivity, were reported. In the end, a C<sub>18</sub> stationary phase was preferred to a biphenyl stationary phase, and APPI was selected as the optimal source as compared to ESI and APCI sources. Furthermore, MS detection was enhanced with the implementation of pseudo-MRM.

A major improvement about fullerenes determination in aerosols was the higher extraction recoveries reached (from 75 % to 95 %) as compared to the recoveries reported in the literature, thanks to Pressurized Liquid Extraction which was used instead of Ultrasound Assisted Extraction.

Even though we managed to validate our analytical method according to linearity, precision, repeatability and LOQ, some RSD on recoveries were fairly high. This issue is likely due, in part at least, to the absence of commercially available isotope-labeled standard, and we argue for a better availability of such internal standards and surrogates in order to improve method performance for target analysis of fullerenes in the environment.

No quantification of fullerenes could be obtained from the environmental samples investigated here, due to their absence or too low concentration. Therefore, our results do not raise a particular health or environmental risk associated to fullerenes in such matrices. However, in view of the literature on this topic, we would like our analytical development to serve as a step forward towards more environmental assessment of these compounds in a wide range of matrices (water, sediment, soil, atmosphere, indoor dust, biomonitoring in living organisms, etc.) and additional compounds among polar derivatives of fullerenes.

## Acknowledgements

The authors thank Clarisse Gosset-Erard (LSMIS, Université de Lorraine) for her advises on the creation of the figures, Thomas Weissenberger (Université de Strasbourg) for the access to the LCQ Fleet instrument, Cyrille Lamboley and Patricia Lecomte (Restek, France) for supporting our LC tests with the gracious loan of the biphenyl column, and Kudzu Science for providing the settled dust sampling kits.

This work was supported by a Ph.D. grant from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation and the University of Strasbourg.

## 2.5. References

- (1) Apicella, B.; Russo, C.; Carpentieri, A.; Tregrossi, A.; Ciajolo, A. *Fuel* 2022, 309, 122356.
- (2) Benn, T.; Herckes, P.; Westerhoff, P. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Elsevier, 2012; Vol. 59, pp 291–303.
- (3) Buseck, P. R. *Earth Planet. Sci. Lett.* 2002, 203 (3–4), 781–792.
- (4) Isaacson, C. W.; Kleber, M.; Field, J. A. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43 (17), 6463–6474.
- (5) Tiwari, A. J.; Ashraf-Khorassani, M.; Marr, L. C. *Sci. Total Environ.* 2016, 547, 254–260.
- (6) Hendren, C. O.; Mesnard, X.; Dröge, J.; Wiesner, M. R. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45 (7), 2562–2569.
- (7) Kolkman, A.; Emke, E.; Bäuerlein, P. S.; Carboni, A.; Tran, D. T.; ter Laak, T. L.; van Wezel, A. P.; de Voogt, P. *Anal. Chem.* 2013, 85 (12), 5867–5874.
- (8) Murayama, H.; Tomonoh, S.; Alford, J. M.; Karpuk, M. E. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures* 2005, 12 (1–2), 1–9.
- (9) Sanchís, J.; Aminot, Y.; Abad, E.; Jha, A. N.; Readman, J. W.; Farré, M. *Carbon* 2018, 128, 54–62.
- (10) Carboni, A.; Helmus, R.; Parsons, J. R.; Kalbitz, K.; de Voogt, P. *J. Chromatogr. A* 2016, 1433, 123–130.
- (11) Gottschalk, F.; Sonderer, T.; Scholz, R. W.; Nowack, B. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43 (24), 9216–9222.
- (12) Hendricks, N.; Olatunji, O. S.; Gumbi, B. P. *Nanomaterials* 2021, 11 (12), 3319.
- (13) Pycke, B. F. G.; Halden, R. U.; Benn, T. M.; Westerhoff, P.; Halden, R. U.; Herckes, P.; Halden, R. U. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2011, 30 (1), 44–57.
- (14) Benn, T. M.; Westerhoff, P.; Herckes, P. *Environ. Pollut.* 2011, 159 (5), 1334–1342.
- (15) Sanchís, J.; Freixa, A.; López-Doval, J. C.; Santos, L. H. M. L. M.; Sabater, S.; Barceló, D.; Abad, E.; Farré, M. *Environ. Res.* 2020, 180, 108715.
- (16) Spohn, P.; Hirsch, C.; Hasler, F.; Bruinink, A.; Krug, H. F.; Wick, P. *Environ. Pollut.* 2009, 157 (4), 1134–1139.
- (17) Fortner, J. D.; Kim, D.-I.; Boyd, A. M.; Falkner, J. C.; Moran, S.; Colvin, V. L.; Hughes, J. B.; Kim, J.-H. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41 (21), 7497–7502.
- (18) Lyon, D. Y.; Brunet, L.; Hinkal, G. W.; Wiesner, M. R.; Alvarez, P. J. J. *Nano Lett.* 2008, 8 (5), 1539–1543.
- (19) Farré, M.; Pérez, S.; Gajda-Schranz, K.; Osorio, V.; Kantiani, L.; Ginebreda, A.; Barceló, D. *J. Hydrol.* 2010, 383 (1–2), 44–51.
- (20) Sanchís, J.; Božović, D.; Al-Harbi, N. A.; Silva, L. F.; Farré, M.; Barceló, D. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405 (18), 5915–5923.
- (21) van Wezel, A. P.; Morinière, V.; Emke, E.; ter Laak, T.; Hogenboom, A. C. *Environ. Int.* 2011, 37 (6), 1063–1067.
- (22) Encinas, D.; Gómez-de-Balugera, Z. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2018, 75 (4), 616–624.
- (23) Sanchís, J.; Berrojalbiz, N.; Caballero, G.; Dachs, J.; Farré, M.; Barceló, D. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46 (3), 1335–1343.
- (24) Astefanei, A.; Núñez, O.; Galceran, M. T. *J. Chromatogr. A* 2014, 1365, 61–71.
- (25) Bouchard, D.; Ma, X. *J. Chromatogr. A* 2008, 1203 (2), 153–159.
- (26) Johnston, H. J.; Hutchison, G. R.; Christensen, F. M.; Aschberger, K.; Stone, V. *Toxicol. Sci.* 2010, 114 (2), 162–182.
- (27) Galmiche, M.; Delhomme, O.; François, Y.-N.; Millet, M. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2021, 134, 116099.
- (28) Jehlička, J.; Frank, O.; Hamplová, V.; Pokorná, Z.; Juha, L.; Boháček, Z.; Weishauptová, Z. *Carbon* 2005, 43 (9), 1909–1917.
- (29) Shareef, A.; Li, G.; Kookana, R. S. *Env. Chem* 2010, 7, 292–297.
- (30) Zakaria, S.; Fröhlich, E.; Fauler, G.; Gries, A.; Weiß, S.; Scharf, S. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018, 25 (1), 562–571.

- (31) Li, L.; Huhtala, S.; Sillanpää, M.; Sainio, P. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 403 (7), 1931–1938.
- (32) Núñez, O.; Gallart-Ayala, H.; Martins, C. P. B.; Moyano, E.; Galceran, M. T. *Anal. Chem.* 2012, 84 (12), 5316–5326.
- (33) Saleh, T. A. *Trends Environ. Anal. Chem.* 2020, 28, e00101.
- (34) Sanchís, J.; Oliveira, L. F. S.; de Leão, F. B.; Farré, M.; Barceló, D. *Sci. Total Environ.* 2015, 505, 172–179.
- (35) National Institute of Standards & Technology. *Certificate of Analysis - Standard Reference Material 2975 - Diesel Particulate Matter (Industrial Forklift)*; 2021.
- (36) Wang, Q.; Li, L.; Long, C.-L.; Luo, L.; Yang, Y.; Yang, Z.-G.; Zhou, Y. *Environ. Technol.* 2020, 41 (8), 1015–1022.
- (37) Galmiche, M.; Rodrigues, A.; Motsch, E.; Delhomme, O.; François, Y.-N.; Millet, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2022, 36 (13), e9307.
- (38) Kawano, S.; Murata, H.; Mikami, H.; Mukaibatake, K.; Waki, H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20 (18), 2783–2785.
- (39) Isaacson, C. W.; Usenko, C. Y.; Tanguay, R. L.; Field, J. A. *Anal. Chem.* 2007, 79 (23), 9091–9097.
- (40) Chen, H.-C.; Ding, W.-H. *J Chromatogr A* 2012, 1223, 15–23.
- (41) Emke, E.; Sanchís, J.; Farré, M.; Bäuerlein, P. S.; de Voogt, P. *Environ. Sci. Nano* 2015, 2, 167–176.
- (42) AFNOR. *NF T 90-210 - Water Quality - Protocol for the initial method performance assessment in a laboratory*; 2018.
- (43) International Organization for Standardization. *ISO 11352 - Water quality — Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data*; 2012.



## Chapitre 3 :

### Conclusion et perspectives

Suite au développement de méthode présenté dans la Première Partie de cette thèse pour l'analyse de Composés Aromatiques Polycycliques dans les particules et les poussières, la Deuxième Partie a consisté en un autre développement de méthode analytique, pour des composés issus de sources similaires aux CAP, c'est-à-dire des combustions : les fullerènes.

Les deux fullerènes majeurs, C<sub>60</sub> et C<sub>70</sub>, ainsi que trois de leurs dérivés fonctionnalisés, ont été sélectionnés comme composés cibles.

Pour l'analyse de ces molécules, certaines de leurs propriétés telles que leur hydrophobicité nous ont menés à choisir des solvants d'extraction, des éluants de chromatographie liquide et des méthodes d'ionisation peu conventionnelles.

La méthode LC-MS/MS a notamment été optimisée par la comparaison de deux phases stationnaires différentes (C<sub>18</sub> et biphenyle) afin d'obtenir la meilleure séparation possible des fullerènes. Pour obtenir une bonne sensibilité, l'ionisation des fullerènes par trois sources différentes (l'APCI, l'APPI et l'ESI) a été étudiée, en mode positif et en mode négatif. Leur fragmentation en MS/MS a également été investiguée.

Les résultats obtenus lors du développement de méthode ont conduit aux choix suivants : la séparation des fullerènes en LC a été effectuée sur une phase stationnaire C<sub>18</sub> avec une phase mobile composée de toluène et d'acétonitrile, l'ionisation des fullerènes a été obtenue par APPI en mode négatif pour tous les composés sauf le NMFP préférentiellement ionisé en mode positif, et le mode pseudo-MRM a permis d'améliorer la réponse des fullerènes en MS/MS.

Les rendements d'extraction moyens obtenus dans ces travaux grâce à l'utilisation de l'extraction par liquide pressurisé (PLE) avec un mélange de toluène et d'acétonitrile ont été très satisfaisants (entre 75 % et 95 %) et supérieurs à ceux rapportés dans la littérature pour des matrices particulières similaires.

Cependant, nous avons observé certaines variabilités assez importantes sur les recouvrements de la méthode. Cette problématique peut être majoritairement attribuée à l'absence de standard interne isotopique disponible sur le marché. Cette difficulté a donc quelque peu réduit les performances de la méthode. Néanmoins, la méthode développée pour l'analyse des fullerènes par LC-MS/MS a pu être validée selon la linéarité de l'étalonnage, la précision, ou encore les limites de quantification.

Une application environnementale a été réalisée sur trois types d'échantillons : les poussières déposées de logements, les PM<sub>10</sub> d'un parking résidentiel, et le matériau de référence de particules d'échappement de moteur diesel (NIST). Aucun fullerène n'a pu être quantifié dans tous ces échantillons.

Les résultats environnementaux ainsi obtenus n'incitent donc pas à soulever des risques sanitaires ou environnementaux particuliers pour les fullerènes dans les particules ou les poussières.

Néanmoins, les développements analytiques réalisés au cours de ce projet peuvent servir de nouvelle base à la communauté scientifique pour relancer certaines études environnementales des fullerènes dans une variété de matrices la plus large possible : eaux, sols, sédiments, atmosphère, êtres vivants, etc ...

Certaines complexités analytiques propres aux fullerènes doivent encore être résolues pour parvenir à une meilleure connaissance du devenir de ces composés dans l'environnement. Entre autres, leurs très faibles concentrations nécessitent d'utiliser des spectromètres de masse particulièrement performants pour les retrouver à l'état d'ultra-traces, et leur sorption particulièrement prononcée sur des particules, des matières organiques ou encore la verrerie de laboratoire est un enjeu à prendre en compte afin de minimiser les pertes de fullerènes au cours du protocole analytique et ainsi d'aboutir à des quantifications fiables à de très basses concentrations.

---

## **TROISIÈME PARTIE :**

# **MISE EN PLACE D'UNE APPROCHE MÉTAPROTÉOMIQUE POUR LA CARACTÉRISATION DE LA FRACTION BIOLOGIQUE DES PARTICULES ET DES POUSSIÈRES**

---

# Chapitre 1 :

## État de l'art : La métaprotéomique et son intérêt pour les aérosols et les poussières

### 1.1. La fraction biologique des aérosols et des poussières : composition et impacts sanitaires

Les particules et les poussières peuvent être composées d'une fraction biologique que l'on nomme « bioaérosol ». Celle-ci regroupe des particules organiques contenant des composants cellulaires issus de différents organismes (qui peuvent être vivants ou morts), et elle peut représenter jusqu'à 25 % de la masse totale de l'aérosol atmosphérique <sup>1,2</sup>. Dans certains échantillons, si l'on ne prend en compte que la fraction grossière des aérosols, cette proportion peut même grimper jusqu'à 70 % <sup>3</sup>.

Les bioaérosols peuvent être issus de nombreux organismes, et leur composition est donc extrêmement variable. Voici une liste de contributeurs à la fraction biologique des particules et des poussières décrits dans la littérature comme significatifs :

- **Les virus.** Ils se distinguent des autres composants des bioaérosols par leur taille beaucoup plus petite (de 0,02 à 0,3  $\mu\text{m}$ ) <sup>2,4</sup>. Néanmoins, ils sont rarement isolés individuellement dans l'atmosphère, mais plutôt associés à des particules plus grosses <sup>2</sup>. Les virus présents dans les bioaérosols constituent une voie de transmission majeure de la plupart des maladies végétales et animales, comme l'a récemment montré la pandémie de COVID-19 avec la transmission du virus SARS-CoV-2 par les aérosols <sup>2,5</sup>.

- **Les bactéries.** Elles peuvent provenir d'une grande diversité de sources telles que les sols ou les eaux usées d'où elles peuvent se volatiliser, mais aussi les fragments d'êtres vivants qui peuvent les héberger (squames de peau par exemple) <sup>2,6</sup>. Leur taille une fois en suspension dans l'atmosphère peut généralement varier de 0,5 à 10  $\mu\text{m}$  <sup>4</sup>. On peut distinguer différents groupes (*phyla*) de bactéries par leur séquence d'ARN ribosomique <sup>7</sup>. Les plus fréquemment retrouvés dans les bioaérosols selon la littérature sont *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Actinobacteria* <sup>2,6,8,9</sup>.

- **Les moisissures.** De nombreuses espèces du taxon *Fungi* peuvent se retrouver en suspension dans l'atmosphère. Les moisissures et les spores fongiques formant des bioaérosols peuvent avoir une taille de 0,5 à 50  $\mu\text{m}$  <sup>2,4</sup>. Il a été rapporté que la fraction respirable de l'aérosol (c'est-à-dire les particules les plus fines) présente une proportion élevée d'allergènes et de pathogènes humains provenant des *Fungi* <sup>10</sup>. Les genres les plus communément retrouvés dans les aérosols sont *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* et *Aspergillus* <sup>2,6,10-12</sup>. Les espèces des genres *Alternaria* et *Cladosporium* sont capables de libérer des allergènes en environnement extérieur, tandis que celles des genres *Penicillium*, *Cladosporium* et *Aspergillus* sont connus pour

être les moisissures prédominantes et ubiquistes dans nos environnements intérieurs <sup>11-14</sup>. Les spores de ces moisissures sont responsables d'allergies respiratoires, particulièrement celles de *Cladosporium* et *Alternaria* <sup>11,14</sup>. Ceux de la moisissure *Aspergillus fumigatus* sont également connus pour déclencher une forme particulière d'allergie bronchopulmonaire appelée « aspergillose » <sup>11,15</sup>.

- **Les pollens.** Ce sont des grains microscopiques destinés à former les gamètes mâles des végétaux. Leur taille varie de 5 à 250 µm <sup>4,16</sup>. Mais les grains de pollens peuvent se fragmenter et ainsi libérer des particules beaucoup plus petites : des granules cytoplasmiques de 30 nm à 5 µm dont les effets allergènes seront encore plus prononcés puisqu'ils pourront pénétrer plus profondément dans l'appareil respiratoire, ou s'agréger à d'autres particules de l'aérosol <sup>2,15,16</sup>. Si l'on considère les pollens comme des allergènes majeurs en extérieur, ils peuvent aussi pénétrer quantitativement dans nos intérieurs par l'aération, ou en se fixant sur des capteurs passifs tels que les cheveux ou les vêtements <sup>16</sup>.

- **Les acariens.** Ceux-ci sont parmi les sources d'allergènes les plus significatifs en intérieur <sup>11,13</sup>. L'allergène principal sécrété par les acariens a été retrouvé dans les poussières des matelas de 90 % des logements français étudiés par Dallongeville *et al* <sup>13</sup>. Les acariens contribuent principalement aux bioaérosols par l'intermédiaire de particules fécales ou de leur cadavre, avec des tailles de particules allant de 10 à 40 µm <sup>4,11,17,18</sup>. Les espèces majoritairement responsables des allergies aux acariens dans le monde sont *Dermatophagoides farinae* et *Dermatophagoides pteronyssinus*, principalement par l'intermédiaire de leurs protéines allergènes Der f 1 et Der p 1 <sup>11,18,19</sup>.

- **Les débris d'origine végétale.** Au sein des bioaérosols, en fonction des environnements étudiés, les fragments de végétaux peuvent représenter une fraction importante de la masse totale <sup>1,2</sup>. Ceux-ci incluent de nombreux types de matière organique tels que les substances humiques, la cellulose ou d'autres polymères biogéniques <sup>2</sup>.

- **Les débris d'origine animale.** Dans l'environnement intérieur, il est bien connu que les animaux domestiques sont une source d'émission importante d'allergènes vers les aérosols, notamment via leur fourrure <sup>11,18</sup>. D'autres animaux de notre environnement peuvent également contribuer à ce type d'exposition, à l'image des souris dont l'allergène Mus m 1 a été retrouvé dans les poussières de 100% des chambres à coucher et dans les PM<sub>10</sub> de 84% des chambres à coucher étudiées par Matsui *et al* <sup>20</sup>. Une fois sécrétés par les animaux et libérés dans l'atmosphère, les allergènes sont généralement associés à des particules inférieures à 10 µm et ainsi transportés par celles-ci <sup>18</sup>.

Toutes ces sources de matériel biologique dans les particules et les poussières mènent à des risques sanitaires majeurs qui relèvent en général de l'hypersensibilité : rhinite allergique, alvéolite allergique, asthme et dermatite allergique sont les principales maladies concernées <sup>16,21,22</sup>. On observe que l'incidence de ces maladies est en constante augmentation au cours des dernières années <sup>18,21,22</sup>. Ce phénomène peut être expliqué par la pollution de l'air et le changement climatique qui imposent des stress aux allergènes ainsi qu'au système immunitaire humain <sup>2,18,22</sup>.

De plus, certains cas particuliers parmi les composants de l'aérosol biologique, tels que la bactérie *Legionella*, la moisissure *Aspergillus*, ou encore les virus de type *Influenza*, peuvent provoquer de graves pathologies pour l'homme et les animaux dès lors qu'une exposition, même ponctuelle, a lieu <sup>15</sup>.

Les maladies évoquées ci-dessus font suite à une exposition prononcée des patients par inhalation lorsque les allergènes et les pathogènes sont associés aux particules respirables <sup>22</sup>, mais aussi par ingestion ou contact cutané lorsqu'ils sont dans les poussières sédimentées <sup>8</sup>. Pour bien évaluer les risques sanitaires induits par les bioaérosols, il est important de considérer à la fois les environnements extérieurs et les environnements intérieurs, dans lesquels l'Homme passe environ 90 % de son temps, comme des lieux d'exposition potentiels. Un des piliers pour une bonne connaissance des bioaérosols et de leur importance est donc l'étude d'une multitude d'environnements différents par la communauté scientifique <sup>12,13,23</sup>.

## 1.2. Les méthodes de caractérisation de la fraction biologique des aérosols et des poussières

Les informations rapportées dans la section précédente ont pu être obtenues par une large palette de méthodes d'analyse des bioaérosols.

Tout d'abord, la microscopie optique est largement employée pour étudier les pollens et les spores fongiques <sup>2,16,24,25</sup>. À l'aide de comparaisons avec des banques de données, il est possible d'identifier l'espèce d'origine d'un grain de pollen par son examen microscopique <sup>16</sup>. Il est également possible de quantifier les pollens en comptant un à un les grains de pollens à l'aide du microscope optique <sup>16</sup>. Cette étude qualitative et quantitative par microscopie optique a pour inconvénient d'être très fastidieuse, réservée uniquement à certains composants des bioaérosols que sont les pollens et les moisissures, et inadaptée aux particules inférieures à 2 µm qui ne sont pas visibles en microscopie optique <sup>2</sup>. Pour améliorer la caractérisation des bioaérosols par microscopie optique, il est possible d'utiliser une technique dite d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) avec des colorants qui se lient à l'ADN ou à l'ARN et permettent une réponse fluorescente du matériel biologique de l'échantillon, que l'on peut alors quantifier <sup>2,3</sup>. Néanmoins, la fluorescence ne permet pas d'éviter le problème du comptage manuel des particules biologiques, et ne permet pas toujours de distinguer avec certitude les différents organismes <sup>2,3</sup>.

La culture de microorganismes permet d'identifier des espèces ou des groupes de microorganismes vivants dans les échantillons particulaires atmosphériques, et de donner une tendance globale sur la quantité de cellules viables dans l'échantillon <sup>2,13,26</sup>. Néanmoins, seules les bactéries et les moisissures à la fois viables et cultivables peuvent être étudiées par cette technique, ce qui réduit très fortement la portée des méthodes de caractérisation basées sur la culture cellulaire <sup>2</sup>.

La fraction biologique des particules et des poussières peut également être caractérisée par son génome et son transcriptome. Par exemple, la méthode appelée « Polymerase Chain Reaction » (PCR) a été utilisée avec succès pour l'identification de taxons de pollens <sup>16,27</sup>, de moisissures <sup>10,25</sup>, de bactéries <sup>9</sup> ou encore de virus bactériophages dans les aérosols <sup>28</sup>. Cette technique permet d'amplifier grâce à des amorces les régions caractéristiques de l'ADN d'une espèce afin de l'identifier <sup>2</sup>. Elle peut aussi permettre une quantification partielle d'espèces d'intérêt <sup>2,12,27,29</sup>. Les analyses de bioaérosols par amplification du génome sont donc particulièrement intéressantes, mais elles nécessitent des amorces à la fois sensibles et spécifiques aux espèces ciblées <sup>2,16</sup>. D'autres éléments spécifiques aux bioaérosols peuvent compliquer l'analyse par PCR, comme la dégradation de l'ADN environnemental par l'action de la lumière, d'espèces oxydantes ou de l'humidité, ou encore l'inhibition de l'amplification de l'ADN par les acides humiques qui peuvent être présents dans les bioaérosols <sup>2</sup>. Pour rehausser le niveau d'information obtenu, la PCR peut ensuite être complétée par des étapes de séquençage du génôme <sup>2,10</sup>.

Si l'objectif d'une étude n'est pas forcément l'identification de tous les organismes composant la fraction biologique d'un échantillon atmosphérique, mais plutôt une estimation quantitative de l'importance du bioaérosol, plusieurs méthodes sont à disposition, à différentes échelles moléculaires <sup>2,30</sup>.

La première d'entre elles est le dosage colorimétrique de la quantité totale de protéines présentes dans un échantillon. Divers dosages sont disponibles sur le marché, et diffèrent par les réactifs qu'ils utilisent pour former le complexe protéine-ligand absorbant dans le domaine du visible de manière proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon <sup>30,31</sup>. On peut notamment donner les exemples des dosages Bradford, Bicinchoninic Acid Assay (BCA) ou encore NanoOrange qui ont été appliqués pour quantifier les protéines présentes dans les bioaérosols <sup>30,32-34</sup>. Ces techniques donnent donc une information quantitative, mais ne permettent pas de connaître la nature des protéines ni de remonter à leurs sources. De plus, leur utilisation peut être restreinte par la faible quantité de protéines présentes dans un échantillon de particules ou de poussières qui pourrait ainsi se situer en-dessous de la limite de détection de ces dosages <sup>23</sup>.

Il est également possible de doser les acides aminés dans des échantillons atmosphériques <sup>30,33</sup>. Ces petites molécules qui constituent les protéines sont également des bons traceurs quantitatifs des bioaérosols. Néanmoins, cette méthode d'analyse nécessite de réaliser une étape de dérivation des acides aminés puis de les analyser par HPLC-UV, ce qui peut être considéré comme plus fastidieux que le dosage des protéines <sup>30,33</sup>. De plus, la quantité d'acides aminés n'est pas évidente à relier à la quantité de protéines lorsqu'on ne connaît pas l'identité des protéines présentes <sup>30</sup>.

Enfin, il existe des traceurs moléculaires organiques pour évaluer l'importance des sources biogéniques des particules et des poussières. Ces composés utilisés comme traceurs sont de la famille des sucres : arabitol, mannitol, glucose et levoglucosan en sont les principaux exemples <sup>2,35,36</sup>. Le mannitol est caractéristique des spores fongiques, tandis que le levoglucosan est un produit de pyrolyse de la cellulose, donc un traceur de combustion de biomasse végétale <sup>36</sup>. Ce type de molécules est généralement analysé par des méthodes chromatographiques, avec ou sans dérivation préalable <sup>35,37</sup>.

Les molécules caractéristiques des bioaérosols (acides aminés, sucres, etc ...) peuvent aussi être analysés par spectrométrie de masse « directe » des aérosols. Des spectromètres de masse dédiés aux aérosols ont même été mis en place pour une analyse directe de ces échantillons sur le terrain, comme l'ont fait Schneider *et al* en Amazonie <sup>2,36</sup>. Ceux-ci peuvent fonctionner soit par désorption et ionisation simultanée des composés organiques à l'aide d'un laser, soit par désorption thermique puis ionisation électronique <sup>36,38</sup>. Leur interface est conçue spécialement pour pouvoir introduire directement les particules en suspension dans le spectromètre de masse, dont l'analyseur peut être soit un quadripôle, soit un analyseur à temps de vol <sup>38-40</sup>.

Plus rarement, certaines méthodes spectroscopiques ont été utilisées pour caractériser les bioaérosols, à l'image de la spectroscopie de fluorescence, ou encore les spectroscopies infrarouge (IR) et Raman, particulièrement adaptées à la caractérisation des pollens <sup>2,16</sup>. Ce type



de méthode permet généralement d'obtenir une « signature » de l'échantillon, mais ne suffit pas à atteindre une identification claire des composants des bioaérosols s'ils sont composés d'un mélange complexe. La spectroscopie ne peut alors servir que de pourvoyeuse d'informations pour ensuite réaliser une analyse de données multivariée par exemple <sup>2</sup>.

Enfin, pour clore cette section, on peut évoquer l'analyse ciblée de certaines protéines d'intérêt des bioaérosols. Dans cette optique, l'utilisation de différents immunotests a été présentée dans la littérature. Des tests de type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ont été utilisés par Buters *et al* pour quantifier l'allergène de bouleau Bet v 1 <sup>41</sup>, par Celenk pour quantifier l'allergène d'ambrosie Amb a 1 <sup>42</sup>, ou encore par Dallongeville *et al* pour quantifier les allergènes d'acariens Der p 1 et Der f 1, l'allergène de chien Can f 1, et l'allergène de chat Fel d 1 <sup>13</sup>. Ce type de tests est donc utile pour étudier l'occurrence d'allergènes particuliers dans différents environnements afin d'évaluer notre exposition à ceux-ci, mais il ne donne qu'un aperçu très restrictif de l'ensemble du matériel biologique contenu dans les aérosols.

Ainsi, parmi toutes les méthodes présentées auparavant, aucune ne permet l'identification simultanée de l'ensemble des composants de la fraction biologique d'un échantillon de particules ou de poussière afin de déterminer ses sources principales.

### 1.3. La métaprotéomique

La métaprotéomique pourrait être un outil puissant pour aboutir à l'objectif évoqué ci-dessus. Ce nouveau domaine de la chimie analytique environnementale a été introduit en 2004 par Paul Wilmes et Philip Bond comme « la caractérisation globale de l'ensemble des protéines du microbiote environnemental à un instant donné »<sup>43</sup>.

La métaprotéomique complète ainsi les trois autres branches des sciences « métagénomiques » que sont la metagénomique, la metatranscriptomique et la metabolomique<sup>44,45</sup>. Celles-ci sont également utiles pour caractériser les microbiomes environnementaux, mais à des échelles moléculaires et biologiques différentes. Elles permettent d'étudier, respectivement : la diversité génétique et les mutations au sein d'une communauté microbienne, l'expression et la régulation des gènes, et enfin les métabolites générés par l'activité fonctionnelle des microorganismes de l'environnement. C'est pour étudier cette activité fonctionnelle des espèces présentes dans l'environnement et leurs phénotypes que la métaprotéomique a un rôle important à jouer<sup>44,45</sup>.

L'analyse métaprotéomique est basée sur l'approche de la protéomique dite « bottom-up », c'est-à-dire qu'elle implique :<sup>44-47</sup>

- l'extraction en solution de l'ensemble des protéines de l'échantillon grâce à des détergents, des agents dénaturants (chaotropes) ou encore des tampons de pH,
- la réduction et l'alkylation des ponts disulfures, et la digestion des protéines par une enzyme (généralement la trypsine) permettant de former des peptides,
- l'analyse des peptides générés par cette digestion grâce à une méthode séparative (chromatographie liquide ou électrophorèse capillaire) couplée à la spectrométrie de masse avec une source d'ionisation électrospray,
- la comparaison des spectres de masse et des spectres de fragmentation obtenus avec ceux de banques de données de protéines générés *in silico*, afin de reconstituer le protéome de l'échantillon par l'intermédiaire des peptides, grâce à des outils bioinformatiques.

La métaprotéomique a déjà été appliquée avec succès à différents types d'environnements : des eaux usées et des boues de station d'épuration<sup>48,49</sup>, des matières dissoutes et des matières organiques de rivières<sup>50</sup> et d'océans<sup>47,51</sup>, des sols agricoles<sup>52</sup>, et enfin des aérosols<sup>53,54</sup>.

#### 1.4. La métaprotéomique pour caractériser les bioaérosols et les poussières : Pertinence et développements analytiques nécessaires

Jusqu'à présent, dans la littérature, seuls deux articles ont présenté l'application de cette approche métaprotéomique pour la caractérisation des bioaérosols : celui de Liu *et al*<sup>53</sup> et celui de Piovesana *et al*<sup>54</sup>.

Liu *et al* ont étudié plusieurs échantillons de particules fines, de particules grossières et de particules totales non discriminées en taille, prélevés sur un pas de temps d'une semaine sur le toit du « Max Planck Institute for Chemistry » à Mayence en Allemagne, c'est-à-dire dans un environnement périurbain extérieur. A titre d'exemple, dans un échantillon de particules totales, ils ont pu identifier 33 protéines. Vingt d'entre elles provenaient de plantes (dont plusieurs allergènes de pollens) et dix provenaient de moisissures<sup>53</sup>.

Piovesana *et al* se sont intéressés à divers environnements de travail italiens : une usine de compostage, une station de traitement des eaux usées, et une exploitation agricole. Ils y ont prélevé les PM<sub>10</sub> quotidiennement. Ils ont pu identifier 179 protéines au niveau de l'usine de compostage, 15 protéines dans les aérosols de la station d'épuration, et jusqu'à 444 protéines dans les PM<sub>10</sub> de l'exploitation agricole. Dans tous les échantillons analysés dans cette étude, les moisissures étaient la source de protéines majoritaire. Venaient ensuite les protéobactéries particulièrement significatives dans les échantillons de l'usine de compostage et de la station d'épuration, et les végétaux verts ainsi que les animaux qui constituaient une source de protéines importante au niveau de l'exploitation agricole<sup>54</sup>.

Ces deux articles montrent donc qu'il est possible d'identifier grâce à la métaprotéomique les protéines présentes dans les bioaérosols, quel que soit le lieu de prélèvement. Ils montrent également la diversité potentielle des protéines que l'on peut retrouver dans ces échantillons environnementaux, liée à la diversité des organismes dont elles sont issues.

Mais pour y parvenir, les auteurs de ces travaux ont dû passer par un développement analytique important.

Un des principaux enjeux de la mise en place d'une méthode métaprotéomique est de trouver une méthode d'extraction efficace pour récupérer quantitativement toutes les protéines de l'échantillon<sup>44,45,47</sup>. Cette étape a donc été particulièrement étudiée par Liu *et al* et Piovesana *et al*.

Liu *et al* ont identifié la sonication comme une meilleure technique d'extraction physique que la simple agitation<sup>53</sup>. Piovesana *et al* ont également utilisé la sonication pour extraire les protéines de leurs échantillons, mais ont ajouté une étape de broyage des filtres de prélèvement à l'aide d'un mortier et d'azote liquide en amont de l'extraction<sup>54</sup>. Les méthodes proposées sont identiques en durée d'extraction (2 fois 1 heure), mais diffèrent par le volume de solution dans lequel les protéines ont été extraites (2 fois 2 mL pour Liu *et al*, 2 fois 15 mL pour Piovesana *et al*)<sup>53,54</sup>.

Les deux articles présentent une comparaison de plusieurs compositions du solvant d'extraction des protéines. Pour cela, ils ont ajouté sur des filtres de prélèvement d'aérosol en fibre de verre des quantités connues de protéines standard telles que l'albumine de sérum bovin (BSA) <sup>53,54</sup>.

Liu *et al* ont comparé les solutions d'extraction suivantes : 100 % d'eau, 50 % d'acétonitrile dans l'eau, 10 % de tampon phosphate salin (PBS) dans l'eau, 0,1 % de dodécylsulfate de sodium (SDS) dans l'eau, un mélange glycine (192 mM) / SDS (0,1 %) dans l'eau, et enfin un mélange Tris (25 mM) / glycine (192 mM) / SDS (0,1 %) dans l'eau. Ils ont obtenu les meilleurs rendements d'extraction, d'une valeur de  $88 \pm 6$  %, avec le mélange Tris / glycine / SDS. Les autres solutions d'extraction qui comportaient du SDS, un détergent anionique, se sont montrées efficaces également, avec des rendements supérieurs ou égaux à 70 %. En revanche, les trois premières solutions citées n'ont pas permis d'extraire la BSA des filtres de prélèvement à plus de 50 % <sup>53</sup>.

Piovesana *et al* ont comparé des solutions d'extraction à la composition plus complexe. Les rendements d'extraction les plus élevés pour les deux niveaux de concentration et les cinq protéines étudiées ont été obtenus avec des détergents alternatifs au SDS : le déoxycholate de sodium (SDC) à 1 % et le dodécanoate de sodium (SD) à 0,5 % dans une solution de Tris-HCl tamponnée à pH 8,5. Ces rendements sont de l'ordre de 80 à 90 % et sont supérieurs à ceux obtenus avec le protocole de Liu *et al* qui a été testé également dans l'étude de Piovesana *et al*, particulièrement au niveau de concentration en protéines le plus faible, pour lequel il ne dépasse pas 55 % <sup>54</sup>.

Les deux méthodes de métaprotéomique présentées dans la littérature diffèrent donc par leurs résultats et les agents d'extraction qu'elles ont identifiés comme optimaux. On peut l'expliquer par de légères différences de protocole de préparation d'échantillon (broyage du filtre, quantité de protéines dopée, volume d'extraction, précipitation des protéines, lyophilisation, purification, etc ...).

Le dosage des protéines extraites a ensuite été réalisé grâce au dosage colorimétrique BCA dans ces deux articles. En revanche, la suite du protocole diffère grandement entre les deux articles.

En effet, alors que Liu *et al* ont choisi une approche « in-gel », Piovesana *et al* ont appliqué une préparation d'échantillon « in-solution ». Ces deux approches sont les deux grandes alternatives disponibles lorsqu'on souhaite mettre en place un protocole de protéomique bottom-up <sup>46</sup>.

Liu *et al* ont utilisé un gel d'électrophorèse monodimensionnel dénaturant (SDS-PAGE). Celui-ci leur a permis de séparer les protéines selon leur masse moléculaire, puis les différentes fractions protéiques ont été soumises à réduction et alkylation des ponts disulfures et digérées par la trypsine, toujours dans leurs bandes de gel respectives <sup>53</sup>. Piovesana *et al* ont préféré reprendre les protéines dans une solution de Tris-HCl à un pH de 8,5 et réaliser les étapes de réduction, alkylation et digestion dans cette même phase liquide <sup>54</sup>.

Il faut garder à l'esprit que le choix du type de préparation d'échantillons influe fortement sur les différents détergents et autres agents d'extraction ou tampons utilisés tout au long du protocole d'analyse protéomique <sup>46</sup>. Ce n'est ainsi pas un hasard si Liu *et al* ont utilisé une solution

de Tris / glycine / SDS pour l'extraction des protéines, puisque pour l'étape de SDS-PAGE, le SDS sert à former des complexes avec les protéines que l'on peut séparer selon une relation directe avec leur taille, et le Tris ainsi que la glycine jouent un rôle dans la migration des protéines à l'intérieur du gel <sup>46,53</sup>.

A l'inverse, l'étape d'analyse instrumentale est relativement standardisée dans le domaine de la protéomique pour les approches bottom-up et pour la métaprotéomique « exploratoire » <sup>46,47</sup>. Celle-ci s'appuie sur des instrumentations de type nano-LC-MS/MS avec une séparation des peptides en phase inverse et un spectromètre de masse à haute résolution. C'est effectivement ce type de mode opératoire qui a été présenté pour l'application de la métaprotéomique aux bioaérosols <sup>53,54</sup>.

L'élution et la séparation des protéines en phase liquide a été réalisée sur des colonnes C<sub>18</sub> aux dimensions « nano » (25 cm de longueur, 75 µm de diamètre interne et des microparticules de silice de 2 µm de diamètre), selon un gradient de phase mobile d'une très forte proportion d'eau à une très forte proportion d'acétonitrile <sup>53,54</sup>.

L'analyse des peptides par MS/MS se fait, dans ces travaux comme dans la plupart des méthodes de métaprotéomique, en mode « Data-Dependent Acquisition » (DDA). Cela signifie qu'à chaque spectre de masse, les ions les plus intenses obtenus en MS<sup>1</sup> sont fragmentés par collision (CID). Leurs ions fragments sont alors analysés dans le deuxième analyseur pour donner le spectre MS/MS résultant.

Les deux publications discutées dans cette section se sont appuyées sur des spectromètres de masse de type Quadrupole – Orbitrap. Dans l'étude de Piovesana *et al*, celui-ci a été utilisé à une résolution de 60 000 pour un m/z de 400, et Liu *et al* évoquent une résolution de 70 000 pour des m/z entre 300 et 1650 <sup>53,54</sup>. De telles résolutions de masse sont nécessaires pour assurer un bon niveau de confiance sur les résultats d'identification des protéines, en particulier pour éviter les fausses identifications.

Enfin, un challenge important de l'analyse métaprotéomique réside dans le traitement des données issues des spectres de masse obtenus <sup>44,45,47</sup>.

En effet, chaque jeu de données obtenu en métaprotéomique contient une très vaste diversité biologique <sup>47</sup>. La recherche de protéines à partir des analyses LC-MS/MS effectuées passe donc par l'utilisation de bases de données très larges. Au vu du grand nombre d'organismes sources de protéines dans les particules et les poussières, de telles bases de données sont nécessaires si l'on veut maximiser la reconstitution du protéome de l'échantillon. Néanmoins, en contrepartie, utiliser des bases de données trop larges augmente le risque de fausses identifications <sup>44,45,47</sup>.

Dans le cas des analyses métaprotéomiques de bioaérosols, Liu *et al* ainsi que Piovesana *et al* ont réalisé une recherche de protéines dans la base de données « Swiss-Prot » sans restreindre à aucune taxonomie, ce qui regroupe donc un nombre total de plus de 550 000 protéines <sup>53,54</sup>.

Un risque d'erreur supplémentaire dans le cadre de la métaprotéomique provient de la coexistence dans un même échantillon d'espèces « cousines ». Celles-ci présentent des protéines

homologues qui peuvent posséder des parties de séquence peptidique identiques, compliquant ainsi l'identification certaine des protéines et de leurs taxons <sup>44,47</sup>.

Les workflows bioinformatiques de génération des banques de données de protéines, de recherche des protéines inconnues dans ces banques de données, ou encore d'attribution taxonomique et fonctionnelle sont donc des sujets de recherche particulièrement brûlants dans le domaine de la métaprotéomique <sup>44,47</sup>.

## 1.5. Références

- (1) Jaenicke, R. *Science* **2005**, *308* (5718), 73–73.
- (2) Després, V. R.; Huffman, J. A.; Burrows, S. M.; Hoose, C.; Safatov, A. S.; Buryak, G.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Elbert, W.; Andreae, M. O.; Pöschl, U.; Jaenicke, R. *Tellus B Chem. Phys. Meteorol.* **2012**, *64* (1), 15598.
- (3) Prass, M.; Andreae, M. O.; de Araujo, A. C.; Artaxo, P.; Ditas, F.; Elbert, W.; Förster, J.-D.; Franco, M. A.; Hrabě de Angelis, I.; Kesselmeier, J.; Klimach, T.; Kremper, L. A.; Thines, E.; Walter, D.; Weber, J.; Weber, B.; Fuchs, B. M.; Pöschl, U.; Pöhlker, C. *Biogeosciences* **2021**, *18* (17), 4873–4887.
- (4) Morawska, L.; Salthammer, T. In *Indoor Environment*; WILEY-VCH, 2003; pp 1–46.
- (5) Lee, B. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17* (19), 6960.
- (6) Chen, X.; Kumari, D.; Achal, V. *Atmosphere* **2020**, *11* (9), 919.
- (7) Yarza, P.; Yilmaz, P.; Pruesse, E.; Glöckner, F. O.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W. B.; Euzéby, J.; Amann, R.; Rosselló-Móra, R. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12* (9), 635–645.
- (8) ANSES. *Exposition aux poussières sédimentées dans les environnements intérieurs*; Rapport d'expertise collective 2017-SA-0192; 2019.
- (9) Triadó-Margarit, X.; Caliz, J.; Reche, I.; Casamayor, E. O. *Atmos. Environ.* **2019**, *203*, 79–86.
- (10) Fröhlich-Nowoisky, J.; Pickersgill, D. A.; Despres, V. R.; Pöschl, U. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (31), 12814–12819.
- (11) Pomés, A.; Chapman, M. D.; Wünschmann, S. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2016**, *16* (6), 43.
- (12) Triadó-Margarit, X.; Veillette, M.; Duchaine, C.; Talbot, M.; Amato, F.; Minguillón, M. C.; Martins, V.; de Miguel, E.; Casamayor, E. O.; Moreno, T. *Indoor Air* **2017**, *27* (3), 564–575.
- (13) Dallongeville, A.; Le Cann, P.; Zmirou-Navier, D.; Chevrier, C.; Costet, N.; Annesi-Maesano, I.; Blanchard, O. *Sci. Total Environ.* **2015**, *536*, 964–972.
- (14) RNSA, APSF, Atmo France. *Rapport de surveillance des pollens et des moisissures dans l'air ambiant en 2020*; 2021.
- (15) Parisot, C.-J. *Le peuple des airs*; 2021.
- (16) Hamzé, M. *Vers une meilleure connaissance de l'exposition aux grains de pollens allergisants et de leur altération par la pollution de l'air*; Université de Lille, 2022.
- (17) Choopong, J.; Reamtong, O.; Sookrung, N.; Seesuyay, W.; Indrawattana, N.; Sakolvaree, Y.; Chaicumpa, W.; Tungtrongchitr, A. *J. Proteome Res.* **2016**, *15* (2), 422–430.
- (18) Martorano, L.; Erwin, E. A. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2018**, *6* (6), 1835–1842.
- (19) Bordas-Le Floch, V.; Le Mignon, M.; Bouley, J.; Groeme, R.; Jain, K.; Baron-Bodo, V.; Nony, E.; Mascarell, L.; Moingeon, P. *PLOS ONE* **2015**, *10* (8), e0136258.
- (20) Matsui, E. C.; Simons, E.; Rand, C.; Butz, A.; Buckley, T. J.; Breyse, P.; Eggleston, P. A. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, *115* (2), 358–363.
- (21) Singh, A. B. *Glob. J. Immunol. Allerg. Dis.* **2014**, *2* (1), 19–28.
- (22) Reinmuth-Selzle, K.; Kampf, C. J.; Lucas, K.; Lang-Yona, N.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Shiraiwa, M.; Lakey, P. S. J.; Lai, S.; Liu, F.; Kunert, A. T.; Ziegler, K.; Shen, F.; Sgarbanti, R.; Weber, B.; Bellinghausen, I.; Saloga, J.; Weller, M. G.; Duschl, A.; Schuppan, D.; Pöschl, U. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (8), 4119–4141.
- (23) Šantl-Temkiv, T.; Sikoparija, B.; Maki, T.; Carotenuto, F.; Amato, P.; Yao, M.; Morris, C. E.; Schnell, R.; Jaenicke, R.; Pöhlker, C.; DeMott, P. J.; Hill, T. C. J.; Huffman, J. A. *Aerosol Sci. Technol.* **2020**, *54* (5), 520–546.
- (24) D'Ovidio, M. C.; Di Renzi, S.; Capone, P.; Pelliccioni, A. *Sustainability* **2021**, *13* (6), 3154.
- (25) Banchi, E.; Ametrano, C. G.; Stanković, D.; Verardo, P.; Moretti, O.; Gabrielli, F.; Lazzarin, S.; Borney, M. F.; Tassan, F.; Tretiach, M.; Pallavicini, A.; Muggia, L. *PLOS ONE* **2018**, *13* (3), e0194489.
- (26) González-Toril, E.; Amils, R.; Delmas, R. J.; Petit, J.-R.; Komárek, J.; Elster, J. *Biogeosciences* **2009**, *6* (1), 33–44.

- (27) Kraaijeveld, K.; de Weger, L. A.; Ventayol García, M.; Buermans, H.; Frank, J.; Hiemstra, P. S.; den Dunnen, J. T. *Mol. Ecol. Resour.* **2015**, *15* (1), 8–16.
- (28) Lim, J.-H.; Nam, S. H.; Kim, J.; Kim, N. H.; Park, G.-S.; Maeng, J.-S.; Yook, S.-J. *Atmos. Environ.* **2021**, *265*, 118720.
- (29) Longhi, S.; Cristofori, A.; Gatto, P.; Cristofolini, F.; Grando, M. S.; Gottardini, E. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* **2009**, *103* (6), 508–514.
- (30) Reinmuth-Selzle, K.; Tchipilov, T.; Backes, A. T.; Tscheuschner, G.; Tang, K.; Ziegler, K.; Lucas, K.; Pöschl, U.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Weller, M. G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2022**, *414* (15), 4457–4470.
- (31) Krohn, R. I. In *Current Protocols in Cell Biology*; 2002; p A.3H.1-28.
- (32) Staton, S. J. R.; Woodward, A.; Castillo, J. A.; Swing, K.; Hayes, M. A. *Ecol. Indic.* **2015**, *48*, 389–395.
- (33) Song, T.; Wang, S.; Zhang, Y.; Song, J.; Liu, F.; Fu, P.; Shiraiwa, M.; Xie, Z.; Yue, D.; Zhong, L.; Zheng, J.; Lai, S. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (12), 6773–6781.
- (34) Miguel, A. G.; Cass, G. R.; Glovsky, M. M.; Weiss, J. *Env. Sci Technol* **1999**, *33* (23), 4159–4168.
- (35) Samaké, A.; Jaffrezo, J.-L.; Favez, O.; Weber, S.; Jacob, V.; Albinet, A.; Riffault, V.; Perdrix, E.; Waked, A.; Golly, B.; Salameh, D.; Chevrier, F.; Oliveira, D. M.; Bonnaire, N.; Besombes, J.-L.; Martins, J. M. F.; Conil, S.; Guillaud, G.; Mesbah, B.; Rocq, B.; Robic, P.-Y.; Hulin, A.; Le Meur, S.; Descheemaeker, M.; Chretien, E.; Marchand, N.; Uzu, G. *Atmospheric Chem. Phys.* **2019**, *19* (5), 3357–3374.
- (36) Schneider, J.; Freutel, F.; Zorn, S. R.; Chen, Q.; Farmer, D. K.; Jimenez, J. L.; Martin, S. T.; Artaxo, P.; Wiedensohler, A.; Borrmann, S. *Atmospheric Chem. Phys.* **2011**, *11* (22), 11415–11429.
- (37) Yi, Y.; Liu, X.; Fu, M.; Li, Z.; Zhou, R.; Wang, Y.; Wei, B.; Meng, J.; Hou, Z.; Yan, L. *Aerosol Air Qual. Res.* **2019**, *9* (12), 2671–2682.
- (38) Pratt, K. A.; Prather, K. A. *Mass Spectrom. Rev.* **2012**, *31* (1), 17–48.
- (39) Canagaratna, M. r.; Jayne, J. t.; Jimenez, J. l.; Allan, J. d.; Alfarra, M. r.; Zhang, Q.; Onasch, T. b.; Drewnick, F.; Coe, H.; Middlebrook, A.; Delia, A.; Williams, L. r.; Trimborn, A. m.; Northway, M. j.; DeCarlo, P. f.; Kolb, C. e.; Davidovits, P.; Worsnop, D. r. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26* (2), 185–222.
- (40) Laskin, A.; Laskin, J.; Nizkorodov, S. A.; Laskin, A.; Laskin, J.; Nizkorodov, S. A. *Environ. Chem.* **2012**, *9* (3), 163–189.
- (41) Buters, J. T. M.; Thibaudon, M.; Smith, M.; Kennedy, R.; Rantio-Lehtimäki, A.; Albertini, R.; Reese, G.; Weber, B.; Galan, C.; Brandao, R.; Antunes, C. M.; Jäger, S.; Berger, U.; Celenk, S.; Grewling, Ł.; Jackowiak, B.; Sauliene, I.; Weichenmeier, I.; Pusch, G.; Sarioglu, H.; Ueffing, M.; Behrendt, H.; Prank, M.; Sofiev, M.; Cecchi, L. *Atmos. Environ.* **2012**, *55*, 496–505.
- (42) Celenk, S. *Atmos. Environ.* **2019**, *209*, 212–219.
- (43) Wilmes, P.; Bond, P. L. *Environ. Microbiol.* **2004**, *6* (9), 911–920.
- (44) Van Den Bossche, T.; Kunath, B. J.; Schallert, K.; Schäpe, S. S.; Abraham, P. E.; Armengaud, J.; Arntzen, M. Ø.; Bassignani, A.; Benndorf, D.; Fuchs, S.; Giannone, R. J.; Griffin, T. J.; Hagen, L. H.; Halder, R.; Henry, C.; Hettich, R. L.; Heyer, R.; Jagtap, P.; Jehmlich, N.; Jensen, M.; Juste, C.; Kleiner, M.; Langella, O.; Lehmann, T.; Leith, E.; May, P.; Mesuere, B.; Miotello, G.; Peters, S. L.; Pible, O.; Queiros, P. T.; Reichl, U.; Renard, B. Y.; Schiebenhoefer, H.; Sczyrba, A.; Tanca, A.; Trappe, K.; Trezzi, J.-P.; Uzzau, S.; Verschaffelt, P.; von Bergen, M.; Wilmes, P.; Wolf, M.; Martens, L.; Muth, T. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 7305.
- (45) Arsène-Ploetze, F.; Bertin, P. N.; Carapito, C. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22* (18), 13599–13612.
- (46) Muller, L. *Développements de méthodes de préparation d'échantillons pour l'analyse protéomique quantitative: application à la recherche de biomarqueurs de pathologies*; Université de Strasbourg, 2017.
- (47) Saito, M. A.; Bertrand, E. M.; Duffy, M. E.; Gaylord, D. A.; Held, N. A.; Hervey, W. J.; Hettich, R. L.; Jagtap, P. D.; Janech, M. G.; Kinkade, D. B.; Leary, D. H.; McIlvin, M. R.; Moore, E. K.; Morris, R. M.; Neely, B. A.; Nunn, B. L.; Saunders, J. K.; Shepherd, A. I.; Symmonds, N. I.; Walsh, D. A. *J. Proteome Res.* **2019**, *18* (4), 1461–1476.
- (48) Li, S.; Hu, S.; Shi, S.; Ren, L.; Yan, W.; Zhao, H. *RSC Adv.* **2019**, *9* (40), 22841–22852.



- (49) Püttker, S.; Kohrs, F.; Benndorf, D.; Heyer, R.; Rapp, E.; Reichl, U. *Proteomics* **2015**, *15* (20), 3596–3601.
- (50) Borsetto, C.; Raguideau, S.; Travis, E.; Kim, D.-W.; Lee, D.-H.; Bottrill, A.; Stark, R.; Song, L.; Cha, C.-J.; Pearson, J.; Quince, C.; Singer, A. C.; Wellington, E. M. H. *Water Res.* **2021**, *201*, 117382.
- (51) Bridoux, M. C.; Neibauer, J.; Ingalls, A. E.; Nunn, B. L.; Keil, R. G. *J. Mar. Syst.* **2015**, *143*, 39–48.
- (52) Bona, E.; Massa, N.; Novello, G.; Boatti, L.; Cesaro, P.; Todeschini, V.; Magnelli, V.; Manfredi, M.; Marengo, E.; Mignone, F.; Berta, G.; Lingua, G.; Gamalero, E. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *95*.
- (53) Liu, F.; Lai, S.; Reinmuth-Selzle, K.; Scheel, J. F.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Després, V. R.; Hoffmann, T.; Pöschl, U.; Kampf, C. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (23), 6337–6348.
- (54) Piovesana, S.; Capriotti, A. L.; Foglia, P.; Montone, C. M.; La Barbera, G.; Zenezini Chiozzi, R.; Laganà, A.; Cavaliere, C. *Proteomics* **2019**, *19* (23), 1900152.

## Chapitre 2 :

### Développement de la méthode d'analyse métabotéomique

L'objectif des travaux présentés dans le chapitre suivant était de réaliser des premiers développements bioanalytiques afin de mettre en place, à moyen terme, un protocole d'analyse métabotéomique de particules et de poussières au laboratoire.

Comme je l'ai expliqué dans le chapitre précédent, l'extraction des protéines des aérosols est un des enjeux majeurs du développement de méthode métabotéomique. Les premières expériences réalisées au cours de ces travaux de thèse ont donc été l'évaluation de l'extraction des protéines en solution avec différents agents d'extraction, en ajoutant sur des filtres de prélèvement d'aérosols des quantités connues de protéines standard.

Par la suite, l'efficacité de l'ensemble du workflow de protéomique bottom-up, incluant des purifications par précipitation des protéines et une approche « in-solution », a également été vérifiée.

#### 2.1. Protocole d'évaluation de l'extraction des protéines dans les bioaérosols

De manière similaire à ce qu'ont pu réaliser Liu *et al* et Piovesana *et al*, une évaluation quantitative des rendements d'extraction des protéines dans différentes conditions a été effectuée au cours de ces travaux de thèse <sup>1,2</sup>.

Pour cela, un protocole a été mis en place selon le schéma décrit en Figure 2.1. Il est composé des étapes suivantes :

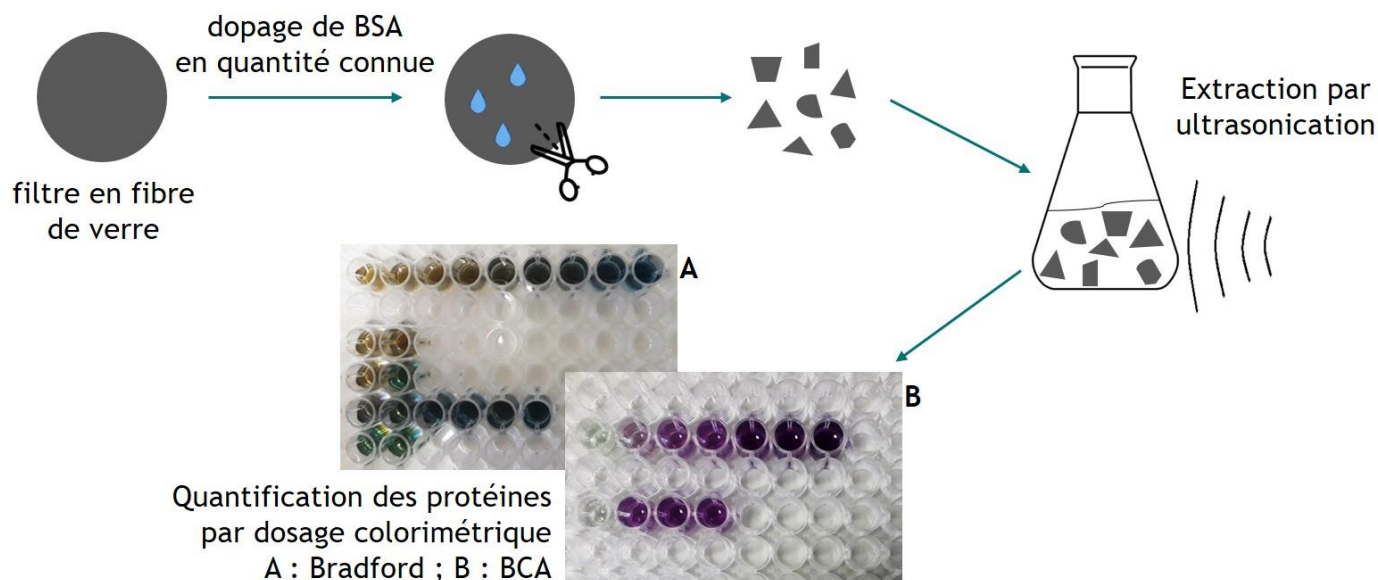
Des filtres en fibre de verre (GFF) qui avaient déjà servi au prélèvement de particules de type PM<sub>2,5</sub> pour de précédents travaux de l'équipe de physico-chimie de l'atmosphère de l'ICPEES ont été pré-lavés par ultrasonication dans un mélange en proportion 1:1 d'eau et d'acétonitrile afin d'éliminer les traces éventuelles de protéines naturellement présentes dans ces échantillons, mais tout en conservant les particules prélevées pour garder la meilleure représentativité possible de ces conditions d'évaluation par rapport aux échantillons réels de particules atmosphériques.

On ajoute sur ces filtres de particules pré-lavés une quantité connue d'une protéine témoin : l'albumine de sérum bovin (BSA). Cette protéine est facilement disponible et communément utilisée dans le domaine de la protéomique pour les développements et les validations de méthode <sup>1,3</sup>. Dans notre protocole, il a été décidé de doper 100 µg de BSA sur les

filtres avec 50 µL d'une solution à 2 g/L dans l'eau ultrapure. Cette quantité est cohérente avec les essais effectués par Liu *et al* et Piovesana *et al*<sup>1,2</sup>, ainsi qu'avec la gamme linéaire de quantification des protéines de nos dosages colorimétriques ultérieurs. Le volume de 50 µL a été choisi pour une absorption idéale de la solution sur le filtre et une incertitude minimale sur le volume dopé. Avant l'extraction, on attend environ vingt minutes pour s'assurer d'une bonne absorption de la solution de BSA.

- Après absorption complète de la solution standard de BSA, le filtre est découpé en plusieurs petits morceaux. Ceux-ci sont ensuite introduits dans le contenant utilisé pour l'extraction, un tube conique Eppendorf™ d'une capacité de 5 mL. Sur ces fragments de filtres est enfin ajoutée la solution d'extraction (2 ou 4 mL selon les essais, voir Section 2.2).
- L'extraction des protéines depuis le filtre en fibre de verre vers la solution aqueuse est ensuite réalisée par ultrasonication. Les tubes sont placés dans un bain à ultrasons pendant une durée d'extraction dont l'influence est présentée dans la Section 2.2. Cette durée est décomposée en cycles de 30 minutes d'ultrasonication suivies de 5 minutes de « repos » des tubes Eppendorf™ dans de la glace pour maintenir la température de la solution d'extraction ainsi que celle du bain à ultrasons sous une limite maximale tolérée de 37°C. Au-delà de 37°C, certains composants de la solution tels que les agents dénaturants pourraient être dégradés<sup>4</sup>.
- Une fois l'extraction terminée, le surnageant du tube est récupéré le plus quantitativement possible. Ici, il faut néanmoins souligner que les fragments de filtre en fibre de verre ont tendance à fortement absorber la solution d'extraction, qu'il est alors difficile de collecter complètement. À titre d'exemple, lorsque le volume d'extraction est de 2 mL, on récupère généralement un volume final de 1,5 à 1,7 mL. Le surnageant est ensuite centrifugé deux fois consécutivement afin de précipiter les fragments de filtre et les particules présentes dans la solution. Ces deux centrifugations sont chacune réalisées à la vitesse maximale, 21 000 g, pendant 20 minutes.
- Les extraits ainsi centrifugés doivent ensuite être concentrés. En effet, dans le cadre du développement de méthode avec 100 µg de BSA dopés, si on considère un rendement d'extraction maximal dans 2 mL de solution, la concentration résultante de 50 µg/mL se situe en-dessous de la limite de détection des dosages colorimétriques utilisés par la suite. Il est donc nécessaire d'augmenter cette concentration, pour atteindre des concentrations plus proches de 500 voire 1000 µg/mL, soit un facteur de concentration de 10 à 20. De plus, si l'on se positionne dans l'optique de l'application du protocole d'extraction à des échantillons réels de bioaérosols, on peut supposer que la quantité de protéines sera dans ce cas très faible, et qu'il sera donc également nécessaire de concentrer le plus possible l'extrait avant de pouvoir réaliser les étapes suivantes de la préparation d'échantillon.

Dans notre protocole, cette concentration de l'échantillon a été effectuée par évaporation du solvant dans un dispositif de type « concentrateur centrifuge » (miVac, Genevac™), jusqu'à un volume final environ égal à 100  $\mu$ L pour respecter les facteurs de concentration évoqués ci-dessus. C'est finalement cet extrait concentré qui sera ensuite dosé par divers tests colorimétriques pour quantifier le rendement d'extraction de BSA avec notre méthode.



**Figure 2.1 : Schéma résumé du protocole d'évaluation des rendements d'extraction des protéines sur des filtres en fibre de verre utilisés pour le prélèvement d'aérosols**

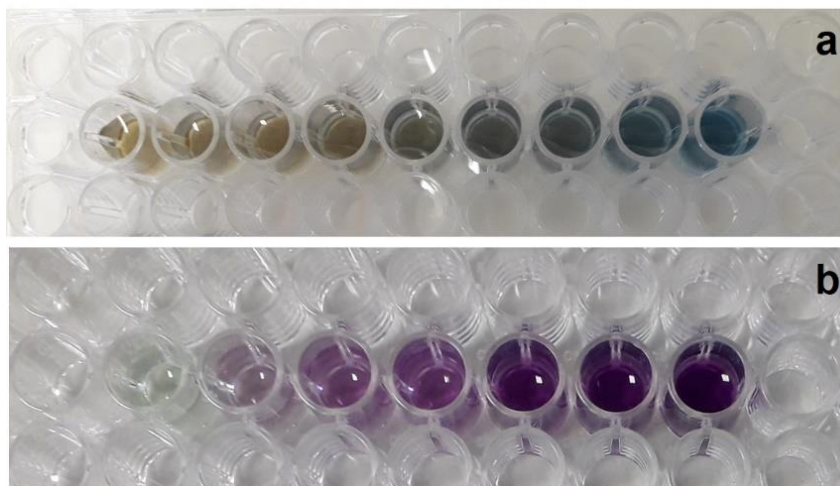
Le premier type de dosage qui a été testé est appelé méthode de Bradford, du nom de son premier initiateur<sup>5</sup>. Elle s'appuie sur la différence d'absorbance du colorant appelé « bleu de Coomassie G-250 » lorsqu'il se lie à des protéines. Cela cause une évolution de couleur de la solution, de teintes rougeâtres lorsque le bleu de Coomassie est libre en solution (absorbance maximale à 465 nm), jusqu'au bleu lorsqu'il forme un complexe avec des protéines (absorbance maximale à 610 nm, différence maximale d'absorbance entre le colorant libre et sa forme complexée par les protéines à 595 nm)<sup>5-7</sup>. La formation du complexe peut se faire par liaison avec toutes les chaînes latérales basiques et aromatiques des acides aminés, ce qui rend la méthode de Bradford applicable à l'ensemble des protéines, même si on peut attendre une certaine variabilité de la réponse selon la composition en acides aminés<sup>5,6,8</sup>. On peut ainsi mesurer l'absorbance de la solution à 595 nm, et celle-ci doit donner une réponse directement proportionnelle à la concentration des protéines selon la loi de Beer-Lambert<sup>5</sup>. La gamme de couleurs obtenue pour une concentration de BSA variant de 0 à 20  $\mu$ g/mL est présentée en Figure 2.2.a.

Au cours de ces travaux, le dosage dit « Bicinchoninic Acid (BCA) Assay » a également été utilisé pour la quantification des protéines. Celui-ci a été présenté en 1985 par Smith *et al*<sup>9</sup>. Ici, l'évolution de la couleur de la solution en présence de protéines provient de plusieurs réactions successives<sup>6,9</sup>. Dans un premier temps, le cuivre (II) du réactif est réduit en cuivre (I) en présence des protéines en milieu basique. Cette réaction est particulièrement favorisée par la présence des

acides aminés tyrosine et cystéine, mais on considère généralement la variabilité inter-protéines du BCA comme relativement faible <sup>6-8</sup>. L'espèce  $\text{Cu}^+$  ainsi formée en solution est complexée par le ligand BCA. C'est ce complexe BCA/Cu(I) qui présente une forte absorbance à 562 nm. Comme pour la méthode de Bradford, l'absorbance à 562 nm de la solution augmente donc linéairement selon la concentration en protéines <sup>6,9</sup>. La gamme de couleur ainsi obtenue de 0 à 100  $\mu\text{g/mL}$  de protéines est décrite en Figure 2.2.b.

Les deux méthodes de quantification des protéines qui ont été employées diffèrent donc principalement par les réactifs qu'elles utilisent pour obtenir des complexes protéiques absorbant dans le domaine du visible. Elles sont néanmoins similaires en ce qui concerne leur gamme de concentration de protéines donnant une réponse linéaire : de 1 à 2000  $\mu\text{g/mL}$  pour le dosage Bradford et de 5 à 2000  $\mu\text{g/mL}$  pour le dosage BCA <sup>6,7</sup>.

En revanche, ces deux méthodes diffèrent par leur tolérance à différents composés qui peuvent interférer dans la formation du complexe et donc dans la quantification des protéines <sup>6,7</sup>. Nous y reviendrons dans la Section 2.2.1 lorsqu'il s'agira de comparer la performance de différents agents d'extraction des protéines.



**Figure 2.2 : Gamme de couleur obtenue par ajout de protéines dans une solution de réactifs permettant les dosages colorimétriques a) Bradford ; b) BCA**

## 2.2. Optimisation des conditions d'extraction des protéines dans les bioaérosols

### 2.2.1. Evaluation de la composition de la solution d'extraction

Afin d'extraire quantitativement les protéines des particules ou des poussières, il faut associer une méthode de lyse mécanique à des agents d'extraction efficaces dans une solution aqueuse qu'on appelle parfois « tampon de lyse »<sup>4,10</sup>. La méthode de lyse mécanique utilisée ici est l'ultrasonication, qui a déjà démontré son efficacité pour les bioaérosols selon les publications précédentes sur ce sujet<sup>1,2</sup>.

Parmi les composés régulièrement utilisés pour l'extraction des protéines en solution aqueuse, on peut distinguer plusieurs catégories. Les formules chimiques des molécules évoquées dans les paragraphes suivants sont répertoriées dans la Figure 2.3.

- **Les chaotropes.** Les trois plus connus d'entre eux sont l'urée, la thiourée et le chlorure de guanidinium (ou guanidine-HCl)<sup>3,4,11,12</sup>. Ils permettent d'affaiblir les interactions hydrophobes, et ainsi de rendre les membranes cellulaires plus perméables afin d'extraire les protéines qui s'y trouvent<sup>12,13</sup>. Ce sont des agents dénaturants qui stabilisent l'état déplié des protéines en solution, puisqu'ils sont également capables de rompre les liaisons hydrogène entre les groupements polaires des protéines<sup>4,11,12</sup>.

- **Les détergents.** Ils permettent également de solubiliser les protéines lorsqu'ils forment des auto-assemblages appelés « micelles »<sup>11,12</sup>. Il existe une très grande diversité de détergents comportant des propriétés chimiques très différentes.

Historiquement, le détergent le plus utilisé pour l'extraction et la solubilisation des protéines contenues dans des cellules ou des tissus est le SDS<sup>3</sup>. C'est un détergent ionique puisqu'il comporte une tête chargée (groupement sulfate) au bout d'une longue chaîne carbonée. Il est un des agents dénaturants les plus puissants, il est donc très efficace pour solubiliser les protéines<sup>12</sup>. Il pose néanmoins des problèmes de compatibilité avec la suite du workflow bioanalytique puisqu'il gêne la digestion enzymatique s'il est présent à plus de 0,1 %, ainsi que la séparation par chromatographie en phase liquide. Il engendre également beaucoup de suppression d'ions et d'encrassement de la source électrospray pour la détection ESI-MS<sup>3,11,12</sup>.

Il existe des détergents ioniques alternatifs au SDS qui présentent moins d'inconvénients pour les protocoles de protéomique, tels que le SD ou encore le SDC, un sel d'acide biliaire. Ce sont des agents dénaturants plus faibles que le SDS mais qui peuvent être facilement retirés par acidification de l'échantillon<sup>12,14</sup>.

Parmi tous les autres types de détergents, on peut évoquer les détergents non-ioniques qui sont généralement moins « puissants » que les détergents ioniques. Triton X-100, Brij ou encore NP-40 en sont des exemples<sup>4,11,12</sup>. Il existe également des détergents zwitterioniques tels

que le CHAPS qui ont des propriétés « intermédiaires » entre les détergents ioniques et non-ioniques <sup>4,11,12</sup>. Par exemple, le CHAPS permet une meilleure solubilisation des protéines que les sels d'acides biliaires et les détergents non-ioniques, mais il n'est pas dénaturant <sup>12</sup>. Enfin, des formules commerciales de détergents labiles et compatibles avec les protocoles de protéomique et la spectrométrie de masse ont également été mises au point. On peut citer ici les exemples du RapiGest, du MaSDeS (ioniques) ou du PPS (zwitterionique) <sup>11,12</sup>.

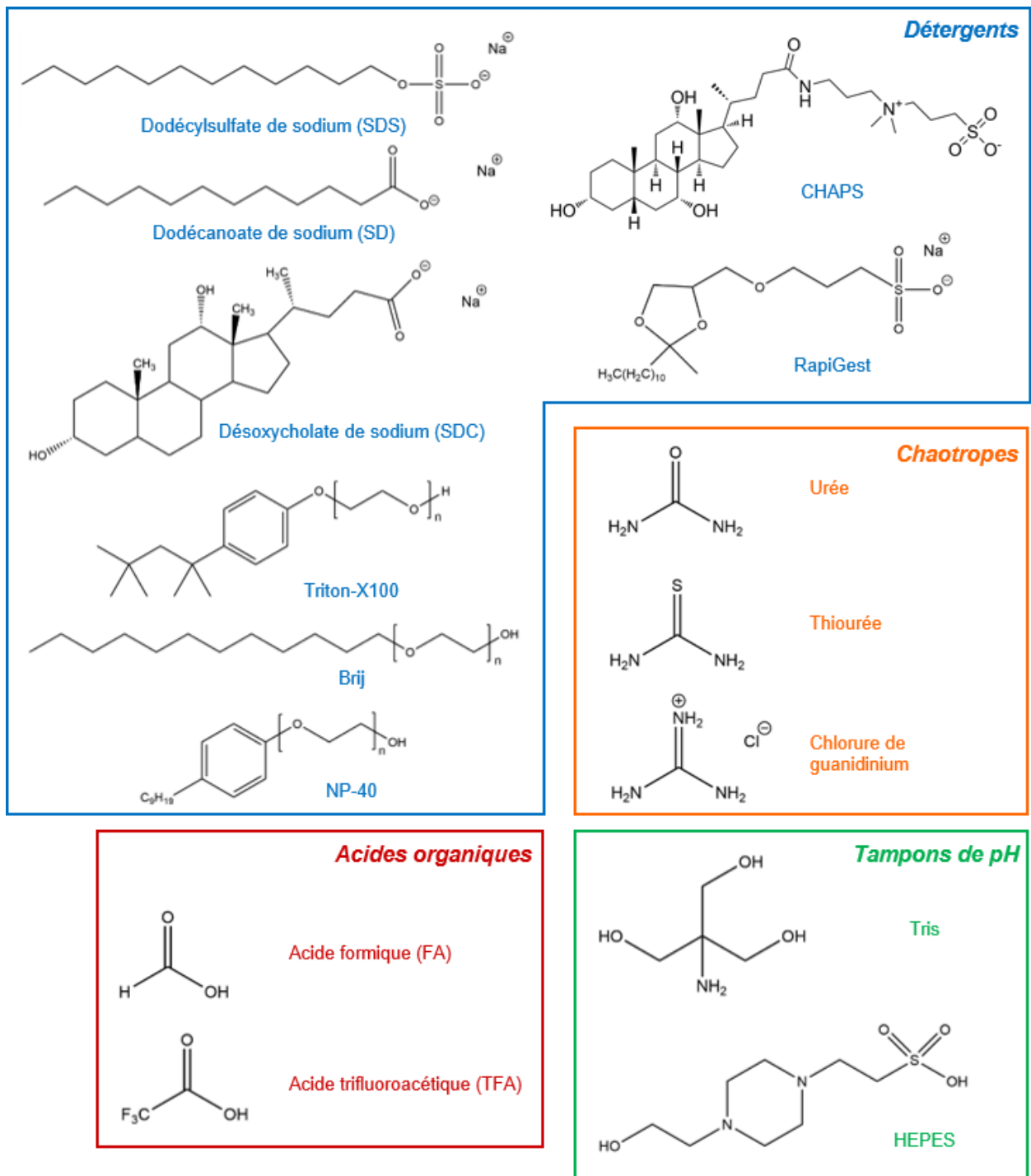


Figure 2.3 : Formules chimiques, noms et abréviations des principaux agents utilisés pour l'extraction des protéines en solution

- **Les acides organiques.** L'acide formique (FA) et l'acide trifluoroacétique (TFA) sont les deux acides organiques les plus utilisés pour la protéomique, du fait de leur bonne compatibilité avec l'analyse par LC-MS. Comme les détergents et les chaotropes, ils aident à la disruption des membranes cellulaires et à la solubilisation des protéines <sup>11,12</sup>.

- **Les tampons de pH.** Ils permettent d'effectuer l'extraction et le traitement de l'échantillon à une valeur de pH adaptée aux protéines. Parmi les plus communs, on peut citer les tampons Tris (pKa = 8,3), HEPES (pKa = 7,6) ou PBS (pKa = 7,2).

Dans mes travaux de thèse, six formulations de tampons de lyse aqueux ont été testées afin de comparer leurs rendements d'extraction :

**A** : 0,1 % de SDS dans l'eau

**B** : 0,1 % de SD dans l'eau

**C** : Un tampon dit « UTCT » contenant de l'urée à 0,8 M, de la thiourée à 0,2 M, du CHAPS à 0,1 % et du Tris à 2 mM

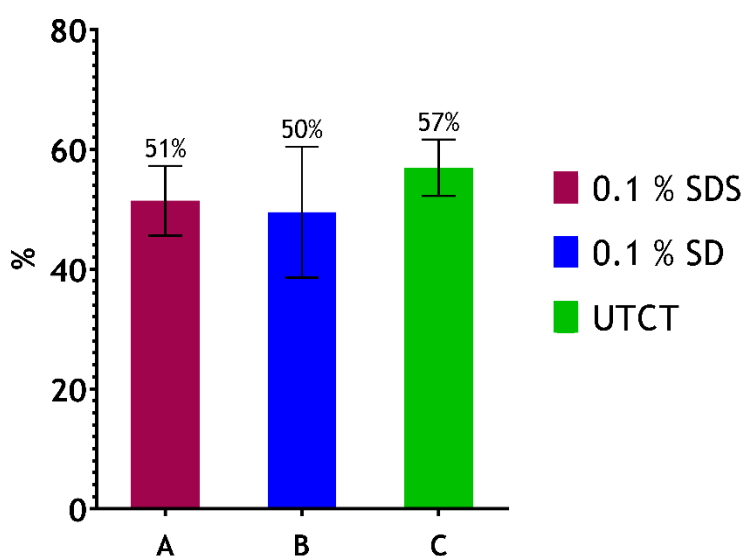
**D** : Un tampon « UTCT 5X » : urée 4 M, thiourée 1 M, CHAPS 0,5 %, Tris 10 mM

**E** : Un tampon « UTCT 10X » : urée 8 M, thiourée 2 M, CHAPS 1 %, Tris 20 mM

**F** : Un tampon commercial « SDS-Tris-Gly » contenant du SDS à 0,1 %, du Tris à 25 mM et de la glycine à 192 mM.

Chacun a été employé dans un protocole d'extraction avec les paramètres suivants : les filtres ont été extraits avec 2 mL de solution tampon pendant 4 heures suivant la procédure décrite en 2.1. Les rendements d'extraction moyens et les écarts-types obtenus sur trois réplicats pour les solutions d'extraction A, B et C sont représentés graphiquement dans la Figure 2.4. On a obtenu pour **A** :  $51 \pm 6$  %, pour **B** :  $50 \pm 11$  % et pour **C** :  $57 \pm 5$  %.

### Rendements d'extraction de BSA (%)



*Figure 2.4 : Rendements d'extraction (en %) obtenus sur 100 µg de BSA dopés sur des filtres en fibre de verre après 4 heures d'extraction dans 2 mL des tampons d'extraction A, B et C*



On observe donc une légère amélioration du taux de récupération de la BSA avec l'utilisation du tampon dit « UTCT ». Cela peut s'expliquer par la combinaison dans cette même solution d'extraction d'un tampon de pH, d'un détergent zwitterionique et de deux chaotropes. Cette formulation de solution d'extraction a déjà démontré son efficacité dans de précédents travaux d'analyse protéomique <sup>15</sup>.

En revanche, l'efficacité des tampons D, E et F n'a finalement pas pu être évaluée. En effet, les tampons D et E, c'est-à-dire les tampons UTCT 5X et 10X, se sont révélés inadaptés à l'étape de concentration de l'échantillon incluse dans notre protocole (voir 2.1). En prenant en compte des facteurs de concentration de l'ordre de 10 à 20 fois, on obtient alors des concentrations en urée, thiourée, CHAPS et Tris qui deviennent supérieures à leur solubilité dans l'eau <sup>16</sup>. Ainsi, avant même d'atteindre le volume final souhaité autour de 100 µL, on observe la précipitation des composants du tampon de lyse, ce qui empêche la récupération de l'extrait pour la suite du protocole.

En ce qui concerne le tampon F, qui correspond à la solution présentée comme optimale par Liu *et al* pour extraire les protéines <sup>1</sup>, c'est son incompatibilité avec les dosages colorimétriques Bradford et BCA qui a empêché son évaluation.

Tout d'abord, on peut signaler que le SDS est incompatible avec le dosage Bradford lorsqu'il est à une concentration supérieure à 0,1 % environ selon le fournisseur, voire à 0,01 % selon d'autres études <sup>6</sup>. D'après notre protocole d'extraction, une fois l'extrait concentré, la teneur en SDS est de l'ordre de 1 à 2 %. Ainsi, lorsqu'on veut quantifier les protéines d'une solution contenant du SDS, on observe une couleur « vert émeraude » quelle que soit la concentration en protéines. La solution n'est donc plus analysable dans la gamme d'absorbance de la méthode Bradford. C'est pourquoi les résultats obtenus pour le tampon A et présentés en Figure 2.4 ont été obtenus par dosage BCA, pour lequel le SDS ne présente pas d'interférence colorimétrique.

Malheureusement, le tampon de lyse F contenant du Tris et de la glycine s'est aussi révélé inapproprié à la méthode BCA. Ici, c'est une teinte bleutée claire qui a été observée lors du dosage des extraits issus du tampon F. Cette couleur se trouvant hors de la gamme standard du dosage, le BCA n'a pu être appliqué avec succès aux extraits F. Les rendements d'extraction obtenus avec le tampon de lyse « SDS-Tris-Gly » n'ont donc pas pu être déterminés.

Le tampon de lyse A était donc incompatible avec le dosage Bradford. Le tampon B composé de SD à 0,1 % dans l'eau ne présentait aucune interférence, ni avec la méthode Bradford, ni avec la méthode BCA. Son rendement d'extraction rapporté en Figure 2.4 est celui mesuré avec le dosage BCA, mais les résultats obtenus avec le dosage Bradford sont similaires ( $47 \pm 8$  % contre  $50 \pm 11$  %).

Enfin, le tampon C présentait des interférences avec la méthode BCA. Dès l'ajout de solution d'extraction C vierge de toute protéine dans les réactifs de la méthode BCA, la solution virait au pourpre très sombre. Les rendements présentés dans la Figure 2.4 sont donc ceux qui ont été quantifiés par dosage Bradford.

Parmi les agents d'extraction testés dans cette partie, les interférences de couleur de chacun avec les méthodes Bradford et BCA sont résumées dans la Table 2.1.

En conclusion de cette section, on rappellera enfin que les rendements d'extraction les plus élevés parmi ceux qui ont pu être mesurés sont ceux obtenus avec le tampon « UTCT ».

**Table Chapitre 2.1 : Interférences colorimétriques de divers composants des tampons de lyse vis-à-vis des dosages de protéines Bradford et BCA**

Agents d'extraction	Bradford		BCA	
	Augmentation de la quantité de protéines	Augmentation de la quantité de protéines	Augmentation de la quantité de protéines	Augmentation de la quantité de protéines
SDS	✗	●	✓	
SD	✓		✓	
Tris / Glycine	?		✗	●
Urée / Thiourée / CHAPS	✓		✗	●

### 2.2.2. Evaluation de la durée d'extraction

Un autre paramètre important de la méthode d'extraction des protéines est sa durée. Liu *et al* et Piovesana *et al* ont appliqué leur protocole de sonication pendant 2 fois 1 heure <sup>1,2</sup>.

Ici, l'évolution du rendement d'extraction de la BSA entre 2 heures et 4 heures a été étudiée. Les deux expériences ont été réalisées avec l'utilisation du tampon de lyse composé de SDS à 0,1 % dans l'eau.

On a observé une augmentation significative du taux de récupération des protéines lors de l'augmentation de la durée d'extraction : **44 ± 4 % après deux heures** contre **55 ± 6 % après 4 heures**. Cette durée de quatre heures a donc été conservée pour la suite des tests d'extraction.

### 2.2.3. Evaluation du nombre de cycles d'extraction

Après avoir identifié la durée de quatre heures comme idéale, il a été décidé de comparer les rendements obtenus si l'extraction était réalisée en un seul cycle de quatre heures ou bien en deux cycles consécutifs de deux heures, puisque Liu *et al* et Piovesana *et al* ont préféré mettre en œuvre deux cycles d'extraction <sup>1,2</sup>.

Pour conserver le même volume d'extrait dans les deux expériences, l'extraction en un seul cycle a été faite avec 2 mL de SDS à 0,1 %, alors que dans le cas de l'extraction en deux cycles, 1 mL de solution de SDS a été ajouté à chaque cycle, puis les deux extraits ont été rassemblés.

Ici, on a pu conclure à une extraction significativement moins efficace avec le protocole à deux cycles, puisqu'il a donné des rendements très faibles (**32 ± 3 %**), alors que les rendements obtenus en un seul cycle de 4 heures avec 2 mL de solution étaient de **55 ± 6 %**. On peut principalement expliquer cette diminution de rendement par le volume de 1 mL à chaque cycle qui est insuffisant. En effet, avec 1 mL de solution, on ne parvient qu'à recouvrir à peine superficiellement les fragments de filtre dans l'Eppendorf™, cela ne permet donc pas une extraction efficace des protéines du filtre vers le tampon de lyse.

Alors, pour approfondir la question du nombre de cycles sans être freiné par le volume, le même type d'expérience a été répété en comparant une extraction de 4 heures dans 4 mL avec deux extractions de 2 heures dans 2 mL chacune. Ces extractions ont été effectuées avec le tampon UTCT.

L'extraction à un seul cycle a donné un rendement de **54 ± 5 %**. L'extraction à deux cycles a donné un rendement de **61 ± 8 %**. Les résultats seraient donc ici légèrement en faveur du protocole d'extraction comprenant deux cycles, mais la différence entre les rendements d'extraction moyens sont compris dans la marge d'erreur des triplicats d'extraction.

### 2.2.4. Evaluation du volume d'extraction

La plupart des extractions décrites dans ce chapitre ont été réalisées dans 2 mL de solution. L'objectif était ici d'augmenter le taux de récupération de BSA en augmentant le volume de tampon de lyse à 4 mL.

Cette expérience a été menée après l'optimisation de la composition de la solution d'extraction, c'est donc ici l'UTCT qui a été utilisé. Aucun changement significatif de rendement d'extraction n'a été observé par la modification du volume d'extraction, puisque celui-ci a été quantifié à **57 ± 5 % avec 2 mL de solution**, et à **54 ± 5 % avec 4 mL de solution**. De plus, selon

le résultat déjà décrit en 2.2.3, un rendement de  $61 \pm 8 \%$  a été obtenu lors de l'extraction avec 2 fois 2 mL de solution.

Etant donné l'aspect chronophage de l'étape de concentration de l'échantillon par évaporation du tampon de lyse, et puisqu'aucune amélioration majeure n'a été apportée par l'augmentation du volume de tampon de lyse, il a été décidé de rester à 2 mL de solution.

### 2.2.5. Conclusion et perspectives d'amélioration

Dans cette partie, j'ai présenté les essais réalisés au cours de ma thèse dans le but d'optimiser l'étape d'extraction de protéines contenues dans les particules atmosphériques. Comme cela a été mentionné dans les sections 1.4 et 2.2, cette étape est l'une des plus cruciales de la méthode métaprotéomique.

La comparaison de plusieurs compositions du tampon de lyse a donné lieu à la sélection d'un tampon contenant de l'urée, de la thiourée, du CHAPS et du Tris.

L'étude de l'influence de la durée, du nombre de cycles et du volume d'extraction nous a mené à effectuer l'extraction des protéines pendant un seul cycle de 4 heures, comprenant 7 périodes de 30 minutes de sonication suivies chacune de 5 minutes de refroidissement de l'échantillon sur glace, dans 2 mL de tampon de lyse.

Ces paramètres optimisés nous ont permis d'atteindre les rendements d'extraction les plus élevés. Cependant, la valeur de  $57 \pm 5 \%$  reste encore loin des résultats présentés par Liu *et al* qui ont rapporté  $88 \pm 6 \%$  de récupération de la BSA <sup>1</sup>, et Piovesana *et al* qui ont obtenu entre 85 et 90 % d'extraction selon les protéines utilisées pour leurs tests <sup>2</sup>. Il nous reste donc des possibilités d'amélioration de notre protocole.

Tout d'abord, on pourrait décrire les tests de solutions d'extraction présentés précédemment comme « préliminaires ». Lors de ceux-ci, seules trois formules de tampons de lyse ont réellement été comparées. Dans un premier temps, la solution dite « SDS – Tris – Gly » mériterait de pouvoir être évaluée, puisque Liu *et al* l'ont décrite comme optimale <sup>1</sup>. Dans cette optique, si l'on s'en tient aux méthodes couramment disponibles à la Plateforme Protéomique Strasbourg-Esplanade (Fédération de Recherche FR1589, CNRS), c'est-à-dire aux méthodes Bradford et BCA, il faudrait réaliser en amont du dosage une étape supplémentaire pour retirer les composants interférents de la solution, par exemple une précipitation et une reprise des protéines dans une solution compatible avec le dosage. Il serait alors nécessaire d'effectuer la même étape sur les extraits « UTCT » pour pouvoir comparer les résultats.

De plus, parmi l'ensemble des chaotropes, détergents, acides organiques et tampons de pH disponibles sur le marché, il reste encore beaucoup de choix possibles pour optimiser la composition du tampon de lyse.

Ensuite, une méthode de lyse mécanique alternative à l'ultrasonication pourrait être investiguée. Par exemple, le broyage par billes de céramique peut être une méthode intéressante pour extraire les protéines, mais il nécessite une instrumentation particulière <sup>10,17</sup>. Une autre alternative serait celle proposée par Piovesana *et al*, c'est-à-dire le broyage cryogénique dans un mortier, qui nécessite tout de même d'utiliser de l'azote liquide <sup>2</sup>.

Enfin, à ce stade du développement, une fraction des pertes de protéines semble incompressible. En effet, comme je l'ai évoqué en 2.1, lorsque l'extraction est effectuée dans 2 mL de solution, seuls environ 1,6 mL d'extrait sont généralement récupérés. Le reste de l'extrait est absorbé par le filtre en fibre de verre. On peut considérer que de ce fait, une petite partie des protéines ne peut pas être récupérée. Peut-être le broyage préalable du filtre permettrait-il de réduire ce phénomène ?

Jusqu'à présent, j'ai évoqué les premiers tests d'optimisation réalisés pour mettre au point la méthode de métaprotéomique, concernant l'extraction d'une protéine témoin, la BSA. Par la suite, nous évaluerons l'efficacité de la suite du protocole pour l'identification des protéines, et l'élargissement des développements à une plus large gamme de protéines.

## 2.3. Etude du protocole d'analyse protéomique bottom-up

Suite à l'extraction de la BSA dopée sur des GFF, nous avons voulu vérifier l'applicabilité du protocole de préparation d'échantillons en solution, semblable à celui mis en place par Piovesana *et al*, et suivant une méthode de protéomique déjà appliquée régulièrement par la Plateforme Protéomique Strasbourg-Esplanade.

A partir de trois extraits distincts de BSA (A, B et C), obtenus avec la même méthode d'extraction, nous avons appliqué l'ensemble du workflow de protéomique bottom-up comprenant les étapes présentées en 1.3.

L'objectif était de vérifier si à l'issue de la préparation d'échantillon et de l'analyse par nanoLC-MS/MS, on identifiait bien les peptides correspondant à la séquence de la BSA, avec un niveau de confiance suffisant, et sans interférence ou impureté significative.

### 2.3.1. Précipitation des protéines

La précipitation des protéines a pour rôle d'isoler les protéines de toutes les autres espèces, notamment organiques, qui peuvent avoir été extraites dans le tampon de lyse au préalable. Il s'agit donc d'une purification. Elle permet surtout de retirer les détergents et autres composants de la solution d'extraction qui seraient incompatibles avec la suite du protocole <sup>2</sup>.

Une quantité de 10 µg de BSA a été précipitée. Cette quantité a été maintenue constante pour les trois réplicats. Le volume d'extrait qui a été prélevé pour la précipitation des protéines a donc été adapté en fonction des résultats préalables du dosage des protéines. Ceci est décrit dans la Table 2.II.

**Table 2.II : Masse de BSA précipitée et volume d'extrait nécessaire pour la précipitation pour les réplicats A, B et C d'application du protocole de métaprotéomique**

Réplicat	m <sub>BSA, précip</sub> (µg)	C <sub>BSA</sub> (µg/µL)	V <sub>extrait, précip</sub> (µL)
A	10	0,542	18,44
B	10	0,725	13,79
C	10	0,689	14,52

Le volume total de chaque extrait avant l'étape de précipitation a été ajusté à 50 µL pour tous les réplicats avec du bicarbonate d'ammonium à 50 mM. Les protéines ont alors été précipitées dans 5 volumes, c'est-à-dire 250 µL d'une solution d'acétate d'ammonium à 0,1 M dans le méthanol glacial. Cette opération est effectuée sur la nuit, à - 20°C.

Ensuite, l'échantillon a été centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes, en maintenant la température à 4°C dans la centrifugeuse, pour s'assurer que les protéines, insolubles dans la solution d'acétate d'ammonium dans le méthanol, soit bien culottées au fond de l'Eppendorf™. Le

surnageant a été éliminé, et le culot de protéines a ensuite été lavé deux fois par 250 µL d'une solution d'acétate d'ammonium à 0,1 M dans un mélange 80 % méthanol / 20 % eau. Pour améliorer la purification de l'échantillon, cette série de précipitation des protéines suivie de deux lavages du culot a été répétée une deuxième fois.

A l'issue de ces deux cycles de purification, les protéines culottées ont été dissoutes à nouveau dans 100 µL d'une solution de bicarbonate d'ammonium à 50 mM.

### *2.3.2. Réduction et alkylation des ponts disulfures et digestion enzymatique*

Dans les protocoles d'analyse protéomique bottom-up, des agents réducteurs sont utilisés pour rompre les ponts disulfures, ce qui permet d'éviter des repliements et des liaisons intra-protéine afin que l'intégralité de la séquence d'acide aminés soit disponible pour la digestion ultérieure<sup>4</sup>. Dans notre méthode, c'est le dithiothreitol (DTT), agent réducteur le plus commun, qui a été utilisé. 5 µL de DTT à 0,1 M ont été ajoutés dans les 100 µL de solution contenant les protéines, et la solution a alors été portée à 95°C pendant 10 minutes.

Suite à la réduction des ponts disulfures, il faut ensuite alkyler les fonctions thiols pour éviter que ceux-ci ne se reforment. Pour cela, on utilise de l'iodoacétamide (IAA). 10 µL d'IAA à 0,1 M ont été ajoutés, et la réaction d'alkylation a eu lieu pendant 30 minutes, à température ambiante, à l'abri de la lumière.

Après ces étapes, on peut réaliser la digestion enzymatique des protéines présentes en solution. La trypsine a été choisie comme enzyme de digestion (aussi appelée protéase) car elle est aujourd'hui utilisée de manière quasi-universelle en protéomique bottom-up<sup>18</sup>. Cette protéase coupe spécifiquement les liaisons C-terminales des résidus arginine (R) et lysine (K) de la séquence protéique<sup>18-20</sup>. Elle est donc adaptée pour une majorité des analyses protéomiques, puisque ces résidus K et R sont généralement assez abondants, ce qui évite de former des peptides de masse moléculaire trop élevée. Notre protocole repose sur l'ajout de 200 ng de trypsine pour 10 µg de protéines. On a donc ajouté 2 µL de trypsine à 100 ng/µL à notre solution, et la digestion a été effectuée à 37°C pendant une nuit.

A l'issue de cette digestion, la solution contenant les peptides obtenus a été évaporée à sec dans un concentrateur centrifuge. Les peptides ont ensuite pu être remis en solution dans un solvant adapté à la séparation chromatographique, ici dans FA à 0,1 % dans l'eau, à une concentration totale de protéines de 100 ng/µL. La masse de peptides injectée ensuite pour l'analyse instrumentale était de 500 ng.

### 2.3.3. Analyse instrumentale : nanoLC-MS/MS

L'instrument utilisé pour l'étape de séparation par chromatographie en phase gazeuse était un système Easy-nanoLC-1000 (Thermo Fisher Scientific).

La séparation des peptides tryptiques de l'extrait de BSA a été réalisée sur une colonne « nano » de phase stationnaire C<sub>18</sub> (Thermo Acclaim PepMap™), de longueur 25 cm et de diamètre interne 75 µm, avec une granulométrie de 3 µm et une porosité de 100 Å.

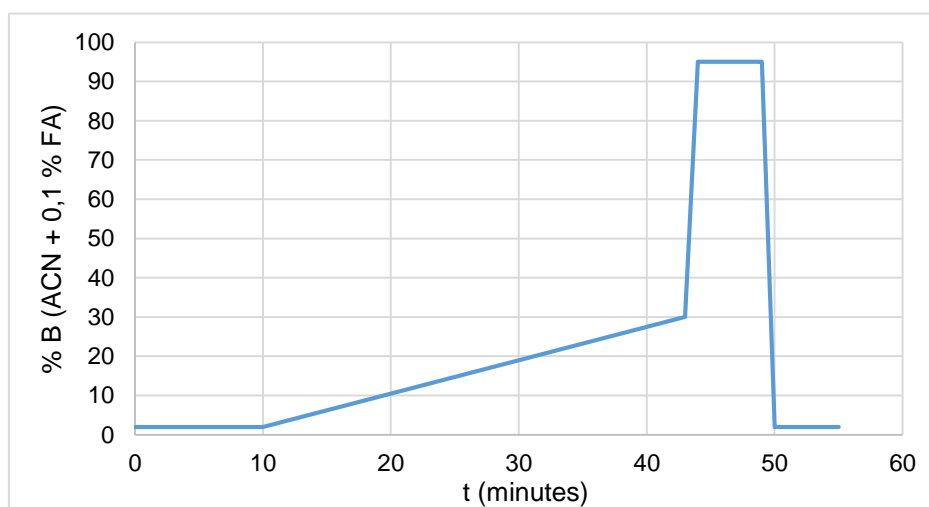
Cette colonne est précédée d'une pré-colonne de phase stationnaire identique mais de longueur 2 cm.

Les deux solvants utilisés dans la phase mobile sont A : 0,1 % de FA dans l'eau, et B : 0,1 % de FA dans l'acétonitrile. Le programme d'élution d'environ une heure qui a été utilisé se décompose en les étapes suivantes :

- 2 % de B pendant les 10 premières minutes (conditions peu éluantes pour le chargement des peptides sur la colonne)
- gradient de 2 à 30 % de B de 10 à 43 minutes
- gradient de 30 à 95 % de B de 43 à 44 minutes et maintien à 95 % de B de 44 à 49 minutes (pour éluer les peptides les moins hydrophiles)

Ces étapes sont décrites graphiquement par la Figure 2.5.

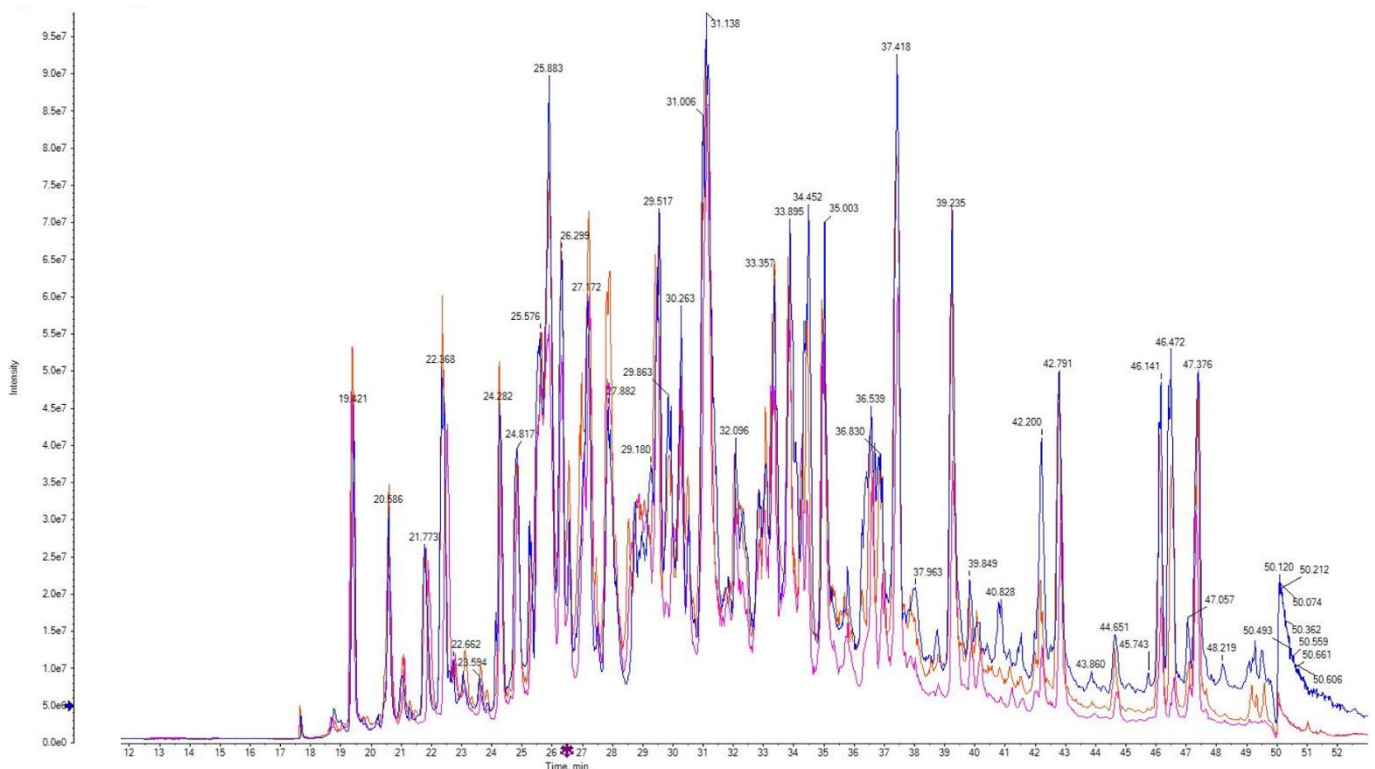
Le débit de phase mobile a été maintenu à 300 nL/min.



**Figure 2.5 : Schéma du gradient d'élution pour la séparation des peptides tryptiques par nanoLC en phase inverse**

Le chromatogramme de « courant d'ions total » (TIC) correspondant à l'élution des peptides de l'extrait de BSA selon les conditions présentées ci-dessus est présenté en Figure 2.6.





**Figure 2.6 : Chromatogramme TIC de trois réplicats d'extraits de BSA dopée sur filtre en fibre de verre, après purification, digestion trypsique et analyse par nanoLC-MS/MS**

Après l'élution des peptides, ceux-ci sont ionisés par protonation dans la source nano-électrospray (nano-ESI) du spectromètre de masse, à une tension de 2300 volts.

L'analyseur du spectromètre de masse utilisé pour cette étude est un Q-TOF (TripleTOF 5600, Sciex). L'analyse a été effectuée en mode DDA « Top 20 ». Cela signifie que le cycle d'acquisition se décompose en :

- un balayage en MS<sup>1</sup> par l'analyseur TOF des m/z de 350 à 1250 pour des charges de 2+ à 5+ pendant 0,25 s qui mène à la sélection des 20 ions les plus abondants ;
- un balayage en MS<sup>2</sup> des ions fragments obtenus par « collision-induced dissociation » (CID) des 20 ions parents sélectionnés dans le premier cycle. Pour chaque ion parent, 2 spectres MS<sup>2</sup> sont enregistrés pendant 0,06 s.

Le temps de cycle total est donc de 1,45 s.

La fragmentation par CID des peptides cause la rupture des liaisons peptidiques entre le C-terminal et le N-terminal des acides aminés, formant des ions appelés b et y, caractéristiques de chaque acide aminé<sup>20,21</sup>. L'ion b est associé au N-terminal de l'acide aminé, alors l'ion y est associé au C-terminal. Un schéma de fragmentation d'un peptide théorique constitué de deux acides aminés consécutifs est présenté en Figure 2.7.

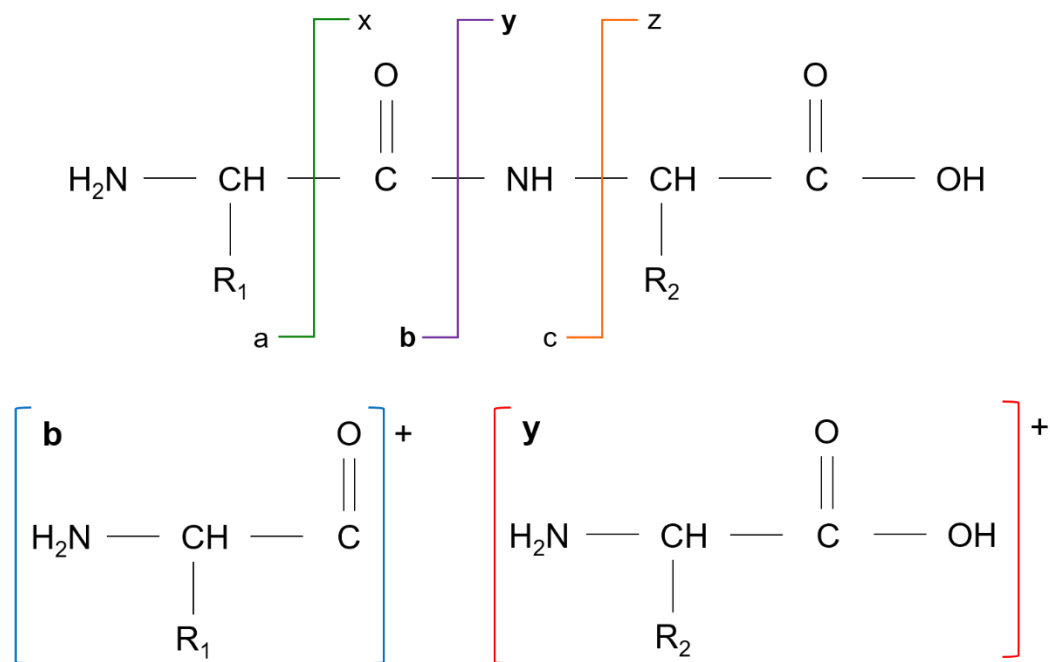


Figure 2.7 : Schéma de fragmentation d'un peptide composé de deux acides aminés

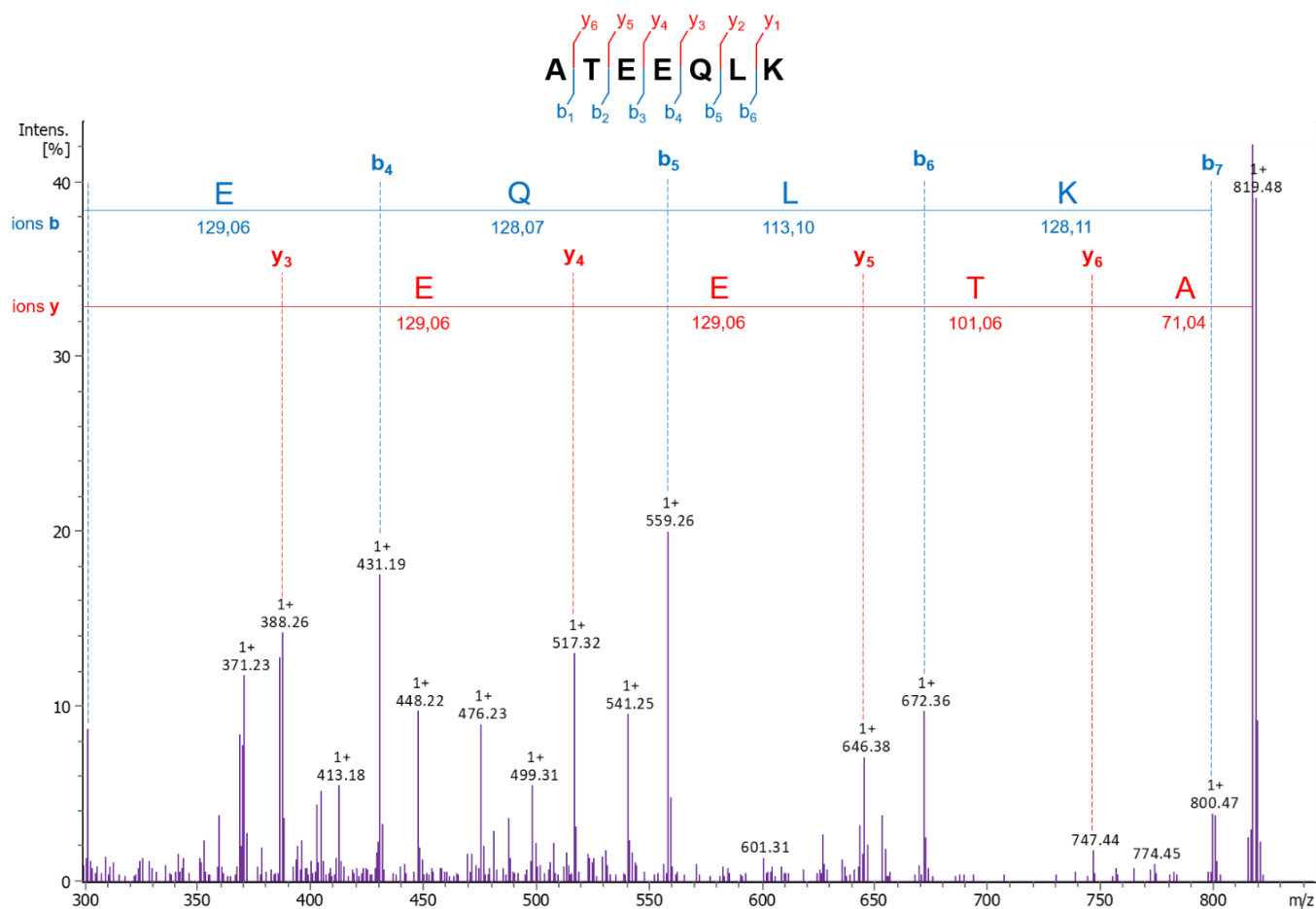


Figure 2.8 : Spectre MS/MS du peptide ATEEQLK de la BSA, obtenu par fragmentation de l'ion parent de m/z 818,48

Cette rupture de liaison peptidique en CID a lieu car elle est la plus faible en énergie. Pour obtenir d'autres fragments (a/x ou c/z, voir Figure 2.7), il faudrait utiliser des techniques de fragmentation plus énergétiques.

L'étude des ions b et y permet de reconstituer la séquence d'acides aminés ainsi que l'illustre la Figure 2.8. Dans cette figure, on présente le spectre de fragmentation par CID du peptide ATEEQLK de la BSA. L'ion moléculaire du peptide obtenu en MS<sup>1</sup> a un m/z de 818,48. Lorsqu'on le fragmente, on observe des séries d'ions b et y. La différence de masse entre les pics permet de retrouver l'acide aminé correspondant et ainsi de reconstituer la séquence d'acides aminés qui composent le peptide.

#### 2.3.4. Identification des protéines par recherche en banque de données

Une fois les spectres MS/MS acquis, l'identification des peptides se fait par comparaison à des spectres MS/MS théoriques générés *in silico* pour des protéines répertoriées dans des banques de données.

Cette comparaison se fait de manière automatisée grâce à des moteurs de recherche. Pour ces travaux, nous avons utilisé le moteur de recherche Mascot (Matrix Science). La recherche de protéines a été effectuée dans la base de données Swiss-Prot, qui est parmi les plus génériques, tout en ne répertoriant que des protéines « vérifiées ».

Nous avons donc voulu contrôler l'applicabilité de notre protocole d'analyse protéomique, c'est-à-dire évaluer si l'on retrouvait bien dans nos extraits uniquement des peptides issus de la BSA. La recherche a été effectuée en restreignant aux protéines issues des mammifères dans la banque de données Swiss-Prot (« All entries », 566 000 protéines).

La recherche Mascot a été effectuée avec les paramètres suivants :

- enzyme : trypsine
- charge du peptide : 2+, 3+, 4+
- écart de m/z toléré :  $\pm 20$  ppm en MS<sup>1</sup>,  $\pm 0,5$  Da en MS<sup>2</sup>
- modification permanente : carbamidométhylation des cystéines (C). Celle-ci provient de l'alkylation des cystéines par l'IAA lors de la préparation d'échantillon.
- modification variable : oxydation des méthionines (M), déamidation des asparagines (N) et des glutamines (Q), acétylation du N-terminal de la protéine. Elles peuvent être naturellement présentes sur les protéines, ou générées par la préparation d'échantillon également.
- 3 « missed cleavages » autorisés. Cela signifie que Mascot peut rechercher des identifications parmi des peptides où 3 liaisons consécutives à K et R n'ont pas été coupées par la trypsine.
- Taux de faux-positifs (FDR) de 1 % maximum. Le FDR est calculé en effectuant une recherche dans une banque de données comportant des séquences leurres <sup>11</sup>. Ainsi, si un spectre MS/MS expérimental est identifié comme une séquence leurre, il s'agit d'un faux-positif. L'équation définissant le FDR est la suivante <sup>11</sup> :

$$FDR = 2 \times \frac{\text{identifications avec des séquences leurres}}{\text{nombre de séquences leurres} + \text{identifications avec des séquences cibles}} \times 100$$

L'analyse nanoLC-MS/MS du réplicat A de l'extrait de BSA a généré 13 018 spectres MS/MS. Lors de la recherche, ces spectres ont été concordants à 1 321 peptides.

Au total, 43 protéines ont été identifiées, mais beaucoup d'entre elles avec un très faible niveau de confiance. Une liste des 23 protéines les plus significatives de cette analyse se trouve dans la Table 2.III. Il s'agit de celles qui ont été confirmées par l'identification d'au moins cinq peptides différents.

Dans la Table 2.III figurent également deux indices de la certitude sur l'identification des protéines et de l'abondance relative des protéines dans le mélange : le score Mascot et l'emPAI <sup>22-24</sup>.

**Score Mascot :**

Le score Mascot caractérise la probabilité qu'une identification de peptide corresponde en réalité à un évènement aléatoire. Si P est la probabilité absolue d'une fausse identification, le score Mascot est défini comme  $-10 \cdot \log(P)$ . Ainsi, plus cette probabilité est faible, plus le score Mascot est élevé, et donc plus le niveau de confiance sur l'identification est élevé.

Ce score est notamment fonction du nombre de correspondances trouvées entre les spectres MS/MS expérimentaux et ceux générés *in silico* (*spectra matches*), de la tolérance sur les différences entre m/z expérimentaux et théoriques, ou encore du nombre d'identifications positives de séquences leurres.

**emPAI :**

L'emPAI (*Exponentially Modified Protein Abundance Index*) est un indice permettant une quantification relative approximative des protéines dans un mélange selon son nombre de peptides identifiés. Il a été défini par Ishihama *et al* en 2005 <sup>23</sup>. Il se base sur le rapport entre le nombre de peptides observés pour une protéine et le nombre de peptides théoriquement existants pour cette protéine selon les conditions de digestion et les modifications post-traductionnelles précisées. Sa définition mathématique est la suivante :

$$emPAI = 10^{\frac{\text{peptides observés}}{\text{peptides observables}}} - 1$$

Cette valeur doit être proportionnelle à l'abondance relative de la protéine dans le mélange de protéines étudié.

Les protéines ont été ordonnées par emPAI décroissant dans la Table 2.III. C'est bien l'albumine de sérum bovin qui a été la protéine identifiée de manière prédominante dans l'échantillon, avec un emPAI de 292,9, contre seulement 6,8 pour la deuxième protéine la mieux

classée. Parmi les autres plus importantes, notons l'albumine de mouton, qui possède une très forte homologie de séquence avec la BSA, c'est pourquoi beaucoup de peptides de la BSA ont pu être assignés à l'albumine de mouton. Enfin, des contaminants classiquement observés en protéomique ont également été identifiés : les kératines d'origine humaine introduites lors de la préparation d'échantillon (voir Table 2.III).

Il est intéressant d'étudier le recouvrement de séquence de la BSA, c'est-à-dire le nombre d'acides aminés identifiés au sein de peptides par rapport au nombre total d'acides aminés de la protéine (607 au total). Ce recouvrement s'élève à 89 % dans notre expérience. Seuls 62 acides aminés, répartis sur 6 peptides seulement, n'ont pas pu être identifiés (voir Figure 2.9).

**Table 2.III : Résumé des protéines identifiées dans l'analyse nanoLC-MS/MS de l'extrait de la BSA dopée sur GFF par recherche dans la base de données SwissProt.**

*Les protéines sont classées selon la valeur de leur emPAI.*

*Le code couleur appliqué permet de visualiser les protéines ayant donné le plus d'identifications de spectres MS/MS (en vert) et ceux qui en ont le moins (en rouge)*

Protéine	emPAI	Score Mascot	Nb. de "matches" MS/MS	Nb. de peptides identifiés	Description de la protéine
<b>ALBU_BOVIN</b>	<b>292,9</b>	<b>22459</b>	<b>1030</b>	<b>89</b>	<b>Albumin OS=Bos taurus</b>
ALBU_SHEEP	6,8	7560	426	32	Albumin OS=Ovis aries
KRT86_HUMAN	5,1	920	39	23	Keratin, type II cuticular Hb6 OS=Homo sapiens
TTHY_BOVIN	5,1	586	20	7	Transthyretin OS=Bos taurus
K2C1_HUMAN	4,9	1227	43	26	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens
KRT85_HUMAN	4,7	568	34	23	Keratin, type II cuticular Hb5 OS=Homo sapiens
K1C10_HUMAN	2,6	745	24	16	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens
A1AG_BOVIN	2,4	252	11	7	Alpha-1-acid glycoprotein OS=Bos taurus
K1C9_HUMAN	2,1	1052	31	17	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens
KT33A_HUMAN	1,9	392	18	12	Keratin, type I cuticular Ha3-I OS=Homo sapiens
K1H1_HUMAN	1,8	428	19	12	Keratin, type I cuticular Ha1 OS=Homo sapiens
ALBU_PIG	1,7	4736	152	17	Albumin OS=Sus scrofa
KT33B_HUMAN	1,6	336	17	11	Keratin, type I cuticular Ha3-II OS=Homo sapiens
K22E_HUMAN	1,6	351	20	15	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens
KRT34_HUMAN	0,9	245	12	8	Keratin, type I cuticular Ha4 OS=Homo sapiens
ALBU_FELCA	0,7	6000	177	9	Albumin OS=Felis catus
K2C5_HUMAN	0,7	170	14	8	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens
K2C75_BOVIN	0,5	160	11	6	Keratin, type II cytoskeletal 75 OS=Bos taurus
ALBU_EQUAS	0,4	122	7	6	Albumin OS=Equus asinus
ALBU_HUMAN	0,4	2344	92	6	Albumin OS=Homo sapiens

## Protein sequence coverage: 89%

Matched peptides shown in **bold red**.

```
1 MKWVTFISLL LFFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA
51 FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
101 VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKLK PDPNTLCDEF
151 KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVVFQE CCQAEDKGAC
201 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA RLSQKFPKAE
251 FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLCADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
301 CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL
351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKYEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL
401 KHLVDEPQNL IKQNCDFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS
451 RSLGKVGTRC CTKPESERP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC
501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT
551 ALVELLHKHP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTALA
```

**Figure 2.9 : Visualisation du recouvrement de séquence de la BSA obtenu lors de l'analyse nanoLC-MS/MS de l'extrait.**

*Les acides aminés des peptides identifiés sont notés en rouge et en gras. Ceux qui n'ont pas été retrouvés sont notés en noir.*

### 2.3.5. Conclusion

L'application d'un protocole protéomique suivant une approche en solution a permis de confirmer qualitativement l'extraction en solution de la BSA décrite en 2.2 pour compléter l'estimation quantitative du dosage de protéines.

La première satisfaction à l'issue de cette expérience réside dans la répétabilité des résultats obtenus pour chacun des trois réplicats d'extraction de la BSA en solution. En effet, pour trois manipulations complètement indépendantes, on a obtenu des chromatogrammes nanoLC-MS/MS tout à fait superposables. De plus, chacun a donné un nombre d'identifications de peptides similaire (entre 1 321 et 1 584), une prédominance de la BSA parmi les protéines identifiées, et un recouvrement de séquence de la BSA entre 88 et 91 %.

La deuxième satisfaction réside justement dans cette identification de la BSA avec un haut niveau de confiance et dans l'ampleur du recouvrement de séquence qu'on peut qualifier de « quasi-total », ce qui confirme que notre protocole bottom-up est a priori fonctionnel.

Ces conclusions positives seront à confirmer par l'analyse de mélanges de protéines plus complexes que la seule BSA.

## 2.4. Application des conditions d'extraction optimisées et du protocole d'analyse protéomique bottom-up à un mélange standard de protéines

### 2.4.1. Conception de l'expérience

Afin de transposer les premiers développements réalisés jusqu'ici à une plus grande variété de protéines, le protocole de métaprotéomique a été appliqué en remplaçant la BSA dans la solution de dopage sur les GFF par un mélange de huit protéines « modèles ». Ces huit protéines sont répertoriées dans la Table 2.IV avec leur masse moléculaire issue de la base de données SwissProt et leur point isoélectrique (pI) calculé grâce à l'outil de modélisation Prot pi | Protein Tool <sup>25</sup>.

**Table 2.IV : Liste des 8 protéines incluses dans le mélange « modèle » avec leur abréviation, leur masse moléculaire et leur point isoélectrique**

<b>Protéine</b>	<b>Abréviation</b>	<b>Masse moléculaire (kDa)</b>	<b>pI</b>
<b>Albumine de sérum bovin</b>	BSA	66,4	5,9
<b>Catalase</b>	CATA	59,9	6,9
<b>Aldolase A</b>	ALDA	39,3	7,8
<b>Alcool Déshydrogénase 1</b>	ADH1	36,8	6,3
<b>β-Caséine</b>	CASB	25,1	5,3
<b>Lysozyme C</b>	LYSC	16,2	8,9
<b>Cytochrome C</b>	CYTC	11,7	9,3
<b>Insuline</b>	INS	11,4	7,2

Cet ensemble de protéines permet donc une meilleure représentativité vis-à-vis d'un mélange de protéines issues d'un échantillon environnemental qui peuvent différer grandement par leur masse moléculaire, leur composition en acides aminés, leur hydrophobicité, etc ...

Ce mélange de protéines a été dopé sur des GFF préalablement utilisés pour l'échantillonnage de particules atmosphériques. L'extraction des protéines a été réalisée selon les conditions optimisées présentées en 2.2. Ce dopage a été effectué à trois niveaux différents de quantité totale de protéines : 40 µg, 80 µg et 120 µg. En parallèle, le même protocole a été appliqué simultanément à un filtre dopé avec 120 µg de BSA uniquement, en guise de contrôle.

Au préalable, la concentration réelle en protéines de la solution standard a été contrôlée par dosage Bradford. La solution a été préparée à une concentration théorique de 0,2 g/L par protéine, soit 1,6 g/L de protéines au total.

En réalisant un dosage Bradford de cette solution standard par rapport à une gamme d'étalonnage de BSA, qui sert toujours de calibrant pour nos quantifications de protéines, on a mesuré une concentration de  $1,16 \pm 0,08$  g/L.

Cette différence de -28 % par rapport à la concentration attendue peut s'expliquer par plusieurs hypothèses : une erreur de préparation de solution due à la précision limitée de la balance vis-à-vis des très faibles masses de protéines standard prélevées, une dégradation éventuelle des protéines standard qui aurait rendu leur masse réelle dans la solution inférieure à la masse théoriquement attendue, ou bien une sensibilité des protéines d'intérêt plus faible que celle de la BSA pour le dosage Bradford.

Quel que soit le phénomène majoritairement impliqué ici, celui-ci ne doit pas interférer dans l'interprétation des résultats obtenus après l'extraction du mélange de protéines. C'est pourquoi il a été décidé d'en tenir compte et de doper sur les filtres la masse souhaitée selon la concentration mesurée par la méthode de Bradford et non selon la concentration théorique. Ce sont donc 34,7  $\mu$ L, 69,4  $\mu$ L et 104,2  $\mu$ L de solution mélange des huit protéines qui ont été ajoutés sur les filtres pour atteindre respectivement 40  $\mu$ g, 80  $\mu$ g et 120  $\mu$ g.

#### *2.4.2. Quantification des rendements d'extraction des protéines*

À l'issue de l'extraction dans le tampon UTCT et de la concentration des extraits par évaporation, la quantité de protéines récupérée dans les dopages « 80  $\mu$ g » et « 120  $\mu$ g » a été mesurée par dosage Bradford. Celle du dopage « 40  $\mu$ g » étant attendue au niveau de la limite de détection du dosage, sa mesure n'a pas été pertinente.

Finalement, les extraits dosés ont eux aussi donné une réponse colorimétrique équivalente à la limite de détection du dosage, ce qui n'était pas attendu. Les valeurs quantifiées pour chaque extrait nous permettent d'assurer que le rendement est inférieur à 30 % dans le cas du dopage à 80  $\mu$ g, et inférieur à 20 % pour l'extraction du mélange de protéines à 120  $\mu$ g. Ces rendements d'extraction sont évidemment insatisfaisants.

En comparaison, le rendement d'extraction mesuré pour la BSA extraite simultanément au mélange de protéines dans un autre Eppendorf™ était de 50 %. Ainsi, lui aussi était légèrement inférieur aux 57 % rapportés en 2.2, suggérant une possible perte de protéines au moment du dopage, de l'extraction (température trop élevée par exemple) ou bien une incertitude sur le



volume final de l'extrait final concentré. Mais cette légère différence ne peut pas expliquer à elle seule le très faible taux de récupération du mélange des huit protéines.

### 2.4.3. Analyse bottom-up de l'extrait de protéines modèles

Pour mieux comprendre les résultats de quantification, la suite du workflow bottom-up a été appliquée à tous les extraits. L'objectif était principalement d'évaluer si une ou deux protéines en particulier avaient été « perdues », ou si la faible extraction était imputable à l'ensemble des protéines.

À cause d'une panne électronique, l'instrument TripleTOF 5600 présenté en 2.3.3 n'a pas pu être utilisé pour cette série d'analyses. Les analyses ont donc été effectuées sur un système Easy-nanoLC-1000 couplé à un spectromètre de masse Q-Exactive Plus (Thermo-Fisher Scientific).

C'est pourquoi certains paramètres instrumentaux diffèrent légèrement par rapport aux précédents résultats. Si la colonne de nanoLC et le débit de phase mobile restent inchangés, le gradient utilisé ici était d'une durée totale de 160 min : avec les éluants A et B identiques à ceux décrits en 2.3.3, le gradient se fait de 5 % à 20 % de B en 120 minutes, de 20 % à 32 % de B en 15 minutes, de 32 % à 95 % de B en 1 minute, et la composition de l'éluant est maintenue à 95 % de B pendant 24 minutes.

Dans cette expérience, l'acquisition MS/MS est réalisée en mode DDA également, avec un temps de scan de 100 ms en MS<sup>1</sup> et de 100 ms pour chaque précurseur en MS<sup>2</sup>. La principale différence réside dans la résolution du spectromètre de masse, puisque le Q-Exactive a été utilisé à une résolution de  $70 \cdot 10^3$  pour un m/z de 200 en MS<sup>1</sup> et de  $18 \cdot 10^3$  en MS<sup>2</sup>, alors la résolution du TripleTOF 5600 pour un tel m/z n'était que de  $30 \cdot 10^3$  en MS<sup>1</sup> et de  $15 \cdot 10^3$  en MS<sup>2</sup>. Cette spécificité de l'instrument nous a permis de réduire les tolérances de masse lors de la recherche en banque de données (10 ppm au lieu de 20 ppm en MS<sup>1</sup> et 0.02 Da au lieu de 0.5 Da en MS<sup>2</sup>).

Dans le cas de l'extrait de BSA qui avait pu être dosé avec succès, 10 µg de protéines ont été précipités pour correspondre au protocole présenté en 2.3. Après précipitation des protéines, digestion trypsique, analyse par nanoLC-MS/MS, et recherche des protéines avec Mascot dans la base de données « Swiss Prot : All entries », nous avons identifié la BSA comme prépondérante dans l'extrait correspondant, avec l'emPAI le plus élevé de toutes les protéines rapportées, et un recouvrement de séquence de 93 %. Une fois encore, les autres protéines identifiées étaient principalement des albumines issues d'autres organismes qui possèdent une forte homologie de séquence avec la BSA, ainsi que des kératines humaines.

Pour les extraits du mélange des huit protéines, ne pouvant pas déterminer exactement la concentration des protéines, ce sont 80 µL d'extrait concentré qui ont été précipités (c'est-à-dire le volume maximal disponible) pour chaque extrait.

Comme cette analyse est qualitative et non quantitative, nous avons tenté de comparer les différentes protéines selon deux indices permettant de caractériser l'abondance relative des protéines. Le premier est l'emPAI, précédemment décrit en 2.3.4 <sup>23,24</sup>.

Le second est le NSAF, présenté par Zybailov *et al* en 2006 <sup>26</sup>. Il se distingue principalement de l'emPAI en s'appuyant sur le nombre d'identifications de spectres MS/MS (*spectra matches*) plutôt que sur le nombre de peptides identifiés. L'intérêt d'utiliser le NSAF plutôt que l'emPAI est donc de s'affranchir du biais pouvant survenir lorsqu'un peptide est séquencé plusieurs fois dans la même analyse (car un peptide peut être présent sous différentes formes selon ses états de charge ou les modifications éventuellement portées par ses acides aminés).

**NSAF :**

Le NSAF (*Normalized Spectral Abundance Factor*) est un indice basé sur le ratio du nombre de « matches » MS/MS permettant d'identifier une protéine par le nombre d'acides aminés de cette même protéine. Il est relatif au mélange de protéines de l'échantillon, puisqu'il est calculé par rapport à la somme des ratios obtenus pour chacune des protéines.

Sa définition mathématique est la suivante :  $NSAF = \frac{SpC/L}{\sum_{i=1}^N (SpC/L)}$

avec *SpC* le nombre de *spectra matches* et *L* la longueur, c'est-à-dire le nombre d'acides aminés de la protéine

Les protéines ayant le NSAF le plus élevé correspondent à celles qui ont l'abondance relative la plus élevée.

En ce qui concerne les extraits du mélange de protéines standard dopé à 120 µg, malgré les faibles quantités mesurées lors du dosage Bradford précédent, toutes les protéines sauf l'insuline ont bien été retrouvées lors de l'analyse protéomique.

En sélectionnant parmi toutes les protéines retrouvées seulement celles présentant 5 peptides identifiées et en les triant par NSAF décroissant, 6 des 7 premières protéines sont bien nos protéines d'intérêt (la septième étant l'albumine ovine, très similaire à l'albumine bovine).

Que l'on regarde prioritairement l'emPAI ou le NSAF, la BSA est toujours la protéine la mieux identifiée et la plus abondante, de loin. Viennent ensuite CATA, LYSC, ALDA, CYTC et ADH1 dont l'ordre peut varier selon l'indice étudié, mais qui sont toutes identifiées avec au moins 57 spectres et 10 peptides, et des recouvrements de séquence entre 47 et 74 %.

En revanche, CASB est assez mal identifiée, avec seulement 23 spectres, 5 peptides et un recouvrement de séquence de 23 %. Elle est moins bien classée que certaines protéines

homologues ou certains contaminants. L'insuline, elle, n'a pas été identifiée du tout lors de cette analyse.

Tous ces résultats, ainsi que les recouvrements de séquence des protéines d'intérêt, sont compilés dans la Table 2.V.

Le résultat principal à retenir de cette expérience est que malgré les très faibles rendements d'extraction mesurés par dosage Bradford, une partie des protéines modèles a bien été récupérée dans notre extrait, et celle-ci est suffisamment abondante pour une identification certaine des protéines.

**Table 2.V : Résultats d'analyse bottom-up nanoLC-MS/MS de l'extrait du mélange de 8 protéines modèles dopées sur GFF à 120 µg**

Protéine	emPAI	NSAF	Nb. d'acides aminés	Nb. de matches MS/MS	Nb. de peptides identifiés	Recouvrement de séquence
<b>BSA</b>	<b>749,5</b>	<b>0,271</b>	<b>607</b>	<b>1980</b>	<b>87</b>	<b>92%</b>
ALBU_SHEEP	13,0	0,110	607	806	33	
<b>CATA</b>	<b>78,5</b>	<b>0,094</b>	<b>527</b>	<b>598</b>	<b>33</b>	<b>66%</b>
<b>LYSC</b>	<b>81,0</b>	<b>0,055</b>	<b>147</b>	<b>98</b>	<b>10</b>	<b>70%</b>
<b>ALDA</b>	<b>88,9</b>	<b>0,049</b>	<b>364</b>	<b>213</b>	<b>29</b>	<b>74%</b>
<b>CYTC</b>	<b>125,1</b>	<b>0,045</b>	<b>105</b>	<b>57</b>	<b>11</b>	<b>60%</b>
<b>ADH1</b>	<b>9,4</b>	<b>0,041</b>	<b>348</b>	<b>173</b>	<b>16</b>	<b>47%</b>
CATA_CANLF	5,1	0,035	527	222	18	
[... 13 protéines ...]						
<b>CASB</b>	<b>2,2</b>	<b>0,009</b>	<b>224</b>	<b>23</b>	<b>5</b>	<b>23%</b>
[... 27 protéines ...]						

#### 2.4.4. Comparaison des dopages de protéines à différentes masses

Dans la section 2.4.3, nous avons montré que l'extrait UTCT des protéines modèles dopées sur le GFF pour une masse totale de protéines de 120 µg, malgré un faible rendement d'extraction, a bien pu être caractérisé grâce à notre protocole bottom-up.

Au vu des faibles quantités extraites selon le dosage des protéines, la question suivante concerne les dopages effectués à des niveaux plus faibles de protéines : 80 et 40 µg. Le protocole a été appliqué à ces extraits de manière identique à l'extrait de 120 µg (même volume précipité, mêmes dilutions, etc ...). C'est donc ici l'occasion d'évaluer la performance de notre méthode pour de plus faibles quantités de protéines, afin de s'approcher des conditions environnementales des aérosols.

En particulier, on pourra comparer les valeurs d'emPAI obtenues pour chaque protéine lors des différentes analyses. En effet, comme il s'agit d'un indice absolu du nombre de peptides identifiés sur le nombre de peptides théoriques, les valeurs des différentes analyses sont comparables. A l'inverse, le NSAF est relatif à chaque analyse, mais il est quand même intéressant de vérifier si celui-ci est stable pour les différents niveaux de dopage des protéines.

De la même façon que pour le dopage à 120 µg dans la Table 2.V, les résultats d'analyse des dopages à 80 et 40 µg sont présentés dans la Table 2.VI et la Table 2.VII, respectivement.

**Table 2.VI : Résultats d'analyse bottom-up nanoLC-MS/MS de l'extrait du mélange de 8 protéines modèles dopées sur GFF à 80 µg**

Protéine	emPAI	NSAF	Nb. d'acides aminés	Nb. de matches MS/MS	Nb. de peptides identifiés	Recouvrement de séquence
<b>BSA</b>	<b>666,5</b>	<b>0,246</b>	<b>607</b>	<b>1860</b>	<b>81</b>	<b>83%</b>
<b>CATA</b>	<b>128,3</b>	<b>0,106</b>	<b>527</b>	<b>697</b>	<b>38</b>	<b>69%</b>
ALBU_SHEEP	10,1	0,098	607	743	29	
<b>LYSC</b>	<b>103,8</b>	<b>0,050</b>	<b>147</b>	<b>91</b>	<b>10</b>	<b>59%</b>
<b>ALDA</b>	<b>34,1</b>	<b>0,046</b>	<b>364</b>	<b>211</b>	<b>22</b>	<b>54%</b>
<b>CYTC</b>	<b>62,2</b>	<b>0,044</b>	<b>105</b>	<b>57</b>	<b>10</b>	<b>55%</b>
CATA_CANLF	6,5	0,041	527	272	20	
[... 4 protéines ...]						
<b>ADH1</b>	<b>17,1</b>	<b>0,030</b>	<b>348</b>	<b>131</b>	<b>21</b>	<b>54%</b>
[... 6 protéines ...]						
<b>CASB</b>	<b>2,2</b>	<b>0,008</b>	<b>224</b>	<b>23</b>	<b>3</b>	<b>16%</b>
[... 23 protéines ...]						

**Table 2.VII : Résultats d'analyse bottom-up nanoLC-MS/MS de l'extrait du mélange de 8 protéines modèles dopées sur GFF à 40 µg**

Protéine	emPAI	NSAF	Nb. d'acides aminés	Nb. de matches MS/MS	Nb. de peptides identifiés	Recouvrement de séquence
<b>BSA</b>	<b>349,4</b>	<b>0,264</b>	<b>607</b>	<b>1848</b>	<b>77</b>	<b>86%</b>
<b>CATA</b>	<b>111,5</b>	<b>0,112</b>	<b>527</b>	<b>684</b>	<b>38</b>	<b>70%</b>
<b>ALDA</b>	<b>52,3</b>	<b>0,051</b>	<b>364</b>	<b>214</b>	<b>27</b>	<b>60%</b>
<b>CYTC</b>	<b>250,7</b>	<b>0,049</b>	<b>105</b>	<b>60</b>	<b>12</b>	<b>67%</b>
<b>LYSC</b>	<b>81,0</b>	<b>0,047</b>	<b>147</b>	<b>80</b>	<b>9</b>	<b>55%</b>
CATA_CANLF	6,5	0,046	527	279	21	
ALBU_HUMAN	12,2	0,041	609	286	36	
<b>ADH1</b>	<b>7,3</b>	<b>0,028</b>	<b>348</b>	<b>112</b>	<b>15</b>	<b>43%</b>
[... 17 protéines ...]						
<b>CASB</b>	<b>1,3</b>	<b>0,006</b>	<b>224</b>	<b>15</b>	<b>3</b>	<b>16%</b>
[... 10 protéines ...]						

Voici les conclusions principales que l'on peut donner en comparant ces trois tableaux :

- La BSA est toujours la protéine la plus abondante dans les trois extraits, et sa valeur de NSAF est constante (entre 0,246 et 0,271). En revanche, son emPAI diminue légèrement lorsque la concentration diminue (750 à 120 µg, 667 à 80 µg et 349 à 40 µg), de même que son recouvrement de séquence (de 92 % à 120 µg à 83 % à 80 µg). Cela n'empêche pas une caractérisation satisfaisante de la BSA.

- De manière générale, tous les NSAF sont constants entre les analyses, ce qui signifie que l'abondance relative des protéines est la même dans chaque extrait. Les variations de quantité totale de protéines n'ont pas affecté la composition du mélange de protéines modèles après l'extraction.

- La variation de NSAF la plus élevée a été observée pour ADH1, puisque sa valeur a diminué de 0,041 à 120 µg à 0,028 à 40 µg, suggérant peut-être une caractérisation plus délicate de ADH1 lorsque sa concentration dans l'extrait diminue. Mais comme l'emPAI et le recouvrement de séquence de ADH1 ne diminuent pas significativement sur ces trois analyses, il n'y a pas à s'en inquiéter.

- CATA, ALDA, CYTC et LYSC sont correctement identifiées dans les trois extraits, y compris pour le niveau de dopage le plus bas, où l'on a toujours au minimum 60 spectres et 9 peptides identifiés pour ces protéines, ce qui est équivalent au résultat obtenu pour le niveau de dopage le plus élevé. De même, les recouvrements de séquence de ces protéines restent globalement stables. La diminution de la quantité de protéines entre le dopage à 120 µg et celui à 40 µg ne semble donc pas affecter la caractérisation de ces protéines.

- CASB, qui posait déjà problème lors du dopage à 120 µg (voir 2.4.3), est de moins en moins bien caractérisée lorsqu'on diminue la quantité totale de protéines. Pour les dopages à 40 et 80 µg, on n'observe plus que 3 peptides identifiés et seulement 16 % de recouvrement de séquence.

La  $\beta$ -caséine et l'insuline semblent donc être de potentielles candidates pour notre recherche des protéines perdues lors de l'extraction.

On peut désormais se demander si les différences observées sont dues à une extraction différente selon les protéines, ou bien à des artefacts liés à la solution mélange de protéines utilisée pour le dopage et aux standards commerciaux des protéines.

#### 2.4.5. Comparaison des résultats d'analyse bottom-up avant et après extraction

Pour tenter d'y répondre, le mélange de protéines a été directement analysé selon le protocole bottom-up en solution, sans passer par l'étape de dopage / extraction. Ainsi, en comparant les résultats d'analyse protéomique directe du mélange de protéines à ceux de l'analyse des extraits de filtres, on pourra tenter de mettre en lumière des tendances concernant l'extraction favorisée de certaines protéines par rapport aux autres.

Le principal outil utilisé pour comparer les protéines avant et après extraction sera le NSAF. En effet, il permet d'estimer l'abondance relative des protéines dans l'échantillon analysé. Ainsi, en dehors des valeurs absolues qui seront difficilement comparables car l'analyse de la solution de dopage avant extraction a été réalisée sur le TripleTOF, et les analyses des extraits sur le Q-Exactive, il sera surtout question ici d'évaluer le classement des protéines les unes par rapport aux autres. Ces données ne sont pas quantitatives et doivent être traitées avec recul. Nous les étudierons seulement pour estimer des tendances.

La comparaison des NSAF est donnée dans la Table 2.VIII.

En comparant les protéines entre elles, on remarque d'après la Table 2.VIII que la procédure d'extraction semble défavorable à deux protéines en particulier : l'aldolase A et le cytochrome C. En effet, ce sont les deux seules protéines pour lesquelles le nombre de correspondances entre spectres MS/MS expérimentaux et *in silico* est plus faible dans l'analyse après extraction du filtre (environ deux fois plus faible pour CYTC). Ceci se caractérise aussi par leur classement par NSAF par rapport aux autres protéines. CYTC et ALDA avaient respectivement les premier et deuxième NSAF les plus élevés lors de l'analyse avant extraction, elles n'ont plus que le cinquième et le quatrième après extraction.

Parmi les huit protéines sélectionnées, le cytochrome C peut faire office d'extrême puisque cette protéine dispose à la fois d'une des plus faibles masses moléculaires et du pI le plus élevé (voir Table 2.IV). En revanche, les propriétés de l'aldolase A sont plutôt « intermédiaires » par rapport aux autres protéines en termes de masse et de pI. Il est donc difficile de conclure à une tendance d'extraction défavorable selon la masse moléculaire et le pI d'après ces résultats.

À l'inverse, les plus fortes améliorations du nombre de « matches » sont observées pour l'albumine de sérum bovin et la catalase. En particulier, la catalase est passée du cinquième meilleur NSAF lors de l'analyse directe de la solution standard au deuxième meilleur NSAF après l'extraction, et la BSA du troisième au premier score. Ces deux protéines, les plus lourdes, avec des pI relativement faibles, pourraient donc être les mieux extraites parmi notre mélange.

Enfin, l'insuline qui n'avait pas été détectée dans l'extrait n'a pas pu être bien identifiée dans la solution standard non plus. Cela pourrait s'expliquer par une erreur lors de la préparation de la solution, par un standard commercial dégradé, ou bien par un problème d'applicabilité du protocole bottom-up à l'insuline. Par exemple, on peut relever que l'insuline ne possède que 9 résidus K et R sur 105 acides aminés, et qu'ils sont très inégalement répartis le long de la séquence. Il n'est donc pas impossible que l'étape de digestion trypsique soit peu efficace pour l'insuline. Sa non-détection dans les extraits n'est donc pas forcément causée uniquement par l'étape d'extraction.

**Table 2.VIII : Résultats d'analyse bottom-up du mélange de huit protéines modèles**  
**a) après dopage à 120 µg sur un filtre et extraction ; b) directement depuis la solution standard.**  
*Les protéines dont l'extraction semble favorisée ont un rang noté en vert.*  
*Celles qui semblent sous-représentées après extraction ont un rang noté en rouge.*

Protéine	a) après extraction			b) avant extraction		
	Rang par NSAF (/8)	NSAF	Nb. de « matches »	Rang par NSAF (/8)	NSAF	Nb. de « matches »
<b>BSA</b>	1	0,271	1 980	3	0,094	226
<b>CATA</b>	2	0,094	598	5	0,057	119
<b>ALDA</b>	4	0,049	213	2	0,181	261
<b>ADH1</b>	6	0,041	173	4	0,077	106
<b>CASB</b>	7	0,009	23	7	0,023	20
<b>LYSC</b>	3	0,055	98	6	0,039	23
<b>CYTC</b>	5	0,045	57	1	0,221	92
<b>INS</b>	8	/	0	8		2

## 2.5. Références

- (1) Liu, F.; Lai, S.; Reinmuth-Selzle, K.; Scheel, J. F.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Després, V. R.; Hoffmann, T.; Pöschl, U.; Kampf, C. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (23), 6337–6348.
- (2) Piovesana, S.; Capriotti, A. L.; Foglia, P.; Montone, C. M.; La Barbera, G.; Zenezini Chiozzi, R.; Laganà, A.; Cavaliere, C. *Proteomics* **2019**, *19* (23), 1900152.
- (3) Wiśniewski, J. R.; Zougman, A.; Nagaraj, N.; Mann, M. *Nat. Methods* **2009**, *6* (5), 359–362.
- (4) Bodzon-Kulakowska, A.; Bierzynska-Krzysik, A.; Dylag, T.; Drabik, A.; Suder, P.; Noga, M.; Jarzebinska, J.; Silberring, J. *J. Chromatogr. B* **2007**, *849* (1–2), 1–31.
- (5) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (6) Krohn, R. I. In *Current Protocols in Cell Biology*; 2002; p A.3H.1-28.
- (7) Carson, S.; Miller, H. B.; Witherow, D. S.; Srougi, M. C. In *Molecular Biology Techniques*; Elsevier, 2019; pp 95–102.
- (8) Reichelt, W. N.; Waldschitz, D.; Herwig, C.; Neutsch, L. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *43* (9), 1271–1280.
- (9) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. *Anal. Biochem.* **1985**, *150* (1), 76–85.
- (10) Arsène-Plöetz, F.; Bertin, P. N.; Carapito, C. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22* (18), 13599–13612.
- (11) Muller, L. *Développements de méthodes de préparation d'échantillons pour l'analyse protéomique quantitative: application à la recherche de biomarqueurs de pathologies*; Université de Strasbourg, 2017.
- (12) Speers, A. E.; Wu, C. C. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (8), 3687–3714.
- (13) Ingram, L. O. *J. Bacteriol.* **1981**, *146* (1), 331–336.
- (14) Pasing, Y.; Colnoe, S.; Hansen, T. *Proteomics* **2017**, *17* (6), 1500462.
- (15) Normant, V.; Kuhn, L.; Munier, M.; Hammann, P.; Mislin, G. L. A.; Schalk, I. J. *ACS Infect. Dis.* **2022**, *8* (1), 183–196.
- (16) Seidell, A. *Solubilities of Organic Compounds*, D. Van Nostrand Company, Inc.; 1941; Vol. 11.
- (17) Khong, M.-T.; Berl, V.; Kuhn, L.; Hammann, P.; Lepoittevin, J.-P. *Chem. Res. Toxicol.* **2021**, *34* (9), 2087–2099.
- (18) Zhang, Y.; Fonslow, B. R.; Shan, B.; Baek, M.-C.; Yates, J. R. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (4), 2343–2394.
- (19) Olsen, J. V.; Ong, S.-E.; Mann, M. *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3* (6), 608–614.
- (20) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*, Freeman and Company.; 2008; Vol. Fourth edition.
- (21) Roepstorff, P.; Fohlman, J. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11* (11), 601–601.
- (22) *Mascot database search - Help - Scoring*. matrixscience.com. [https://www.matrixscience.com/help/scoring\\_help.html](https://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html) (accessed 2022-07-28).
- (23) *Mascot database search - Help - Quantitation: emPAI protocol*. matrixscience.com. [https://www.matrixscience.com/help/quant\\_empai\\_help.html](https://www.matrixscience.com/help/quant_empai_help.html) (accessed 2022-08-16).
- (24) Ishihama, Y.; Oda, Y.; Tabata, T.; Sato, T.; Nagasu, T.; Rappsilber, J.; Mann, M. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4* (9), 1265–1272.
- (25) *Prot pi | Protein Tool*. protpi.ch. <https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool#IsoelectricPoint> (accessed 2022-05-07).
- (26) Zybailov, B.; Mosley, A. L.; Sardu, M. E.; Coleman, M. K.; Florens, L.; Washburn, M. P. *J. Proteome Res.* **2006**, *5* (9), 2339–2347.



## Chapitre 3 :

### Conclusion et perspectives

Dans la dernière partie de ces travaux de thèse, de premiers développements analytiques ont été apportés afin de mettre au point une méthode de screening métaprotéomique de la fraction biologique des aérosols et des poussières.

Mes efforts se sont concentrés sur la préparation d'échantillons, dont l'efficacité est indispensable à la réussite du développement de méthode. Pour cela, les premières expériences menées ont été l'étude de la récupération de protéines « témoin » préalablement ajoutées sur des filtres de prélèvement d'aérosols. La protéine témoin sélectionnée pour ces premiers essais était la BSA.

Ces expériences nous ont permis d'identifier un tampon de lyse plus efficace que les autres pour extraire les protéines en solution. Il s'agit d'un mélange d'urée, de thiourée, de CHAPS et de Tris appelé UTCT. Elles nous ont également permis de définir un temps d'extraction optimal (4 heures) et de conclure à la faible influence du volume et du nombre de cycles d'extraction sur le taux de récupération des protéines.

À la suite de ces développements, nous avons vérifié le bon fonctionnement d'un protocole de protéomique bottom-up préalablement établi. Jusqu'ici, avec les quantités de protéines témoin utilisées pour les premiers développements, on peut estimer que celui-ci est efficace. Dans un premier temps, les optimisations visées concernaient plutôt l'étape d'extraction, c'est pourquoi ce protocole n'a pas encore été optimisé. Par la suite, il serait pertinent d'évaluer de légères modifications.

On peut par exemple penser à l'utilisation d'autres agents réducteurs, tels que la tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), alternative intéressante au DTT car considéré comme plus stable et plus efficace.

Pour l'étape de digestion, on pourrait aussi envisager l'utilisation d'autres enzymes que la trypsine qui coupent la chaîne peptidique à des résidus différents de K et R, telles que la chymotrypsine, la pepsine, ou l'endoprotéinase Lys C<sup>20</sup>. On peut même envisager l'utilisation simultanée de plusieurs enzymes, qui soient chacune très sélectives, afin de générer une grande variété de peptides différents (et donc complémentaires) qui nous permettraient alors d'obtenir un meilleur recouvrement du protéome de l'échantillon<sup>18</sup>.

Un autre paramètre qui pourrait être important est la durée du gradient d'élution en chromatographie en phase liquide. En effet, plus l'élution des peptides est lente, plus on va pouvoir gagner en information. Puisqu'on travaille en mode « data-dependent », si la séparation des peptides est meilleure, il est plus facile d'isoler l'ion parent du peptide pour le fragmenter et même de l'isoler plusieurs fois lors de cycles MS/MS différents, alors qu'il risquerait d'être perdu si d'autres peptides abondants lui sont coélus.

Ce paramètre a été étudié pour le digest de BSA présenté en 2.3. Au vu de la simplicité de cet échantillon (une seule protéine, à concentration élevée), l'augmentation du temps d'analyse chromatographique de 60 minutes à 250 minutes a apporté une certaine amélioration, mais finalement peu utile (recouvrement de séquence de 93 % au lieu de 89 %, emPAI de 1270 au lieu de 293). En revanche, pour des échantillons beaucoup plus complexes, l'utilisation d'une méthode d'élution plus longue que celle de 60 minutes pourrait avoir un réel intérêt.

Après l'optimisation de l'extraction pour la BSA et la vérification du protocole bottom-up, nous avons souhaité transféré cette méthode à un mélange légèrement plus complexe de protéines modèles.

C'est ici que les premières difficultés majeures sont intervenues. En effet, si 6 des 8 protéines du mélange ont pu être correctement caractérisées par nanoLC-MS/MS, les résultats quantitatifs du dosage colorimétrique des protéines indiquent de très faibles rendements d'extraction, alors que ceux-ci restent satisfaisants lorsque seule la BSA est extraite. Ce résultat est très difficile à expliquer. Il faudrait pouvoir le confirmer avec un autre mélange de protéines pour pouvoir écarter les hypothèses de mauvaise préparation de solution ou de standards dégradés.

À cet effet, la réalisation d'une expérience similaire avec des mélanges commerciaux de protéines plus complexes mais aussi mieux standardisés, tels que le « Universal Proteomics Standard Set » (UPS 1, Sigma-Aldrich) ou son analogue à concentrations de protéines variables, le « Proteomics Dynamic Range Standard Set » (UPS 2, Sigma-Aldrich), serait pertinente.

Si les résultats de cette expérience venaient à être similaires à ceux-ci, c'est-à-dire peu concluants, il faudrait revoir plusieurs paramètres du protocole d'extraction afin de l'améliorer, tel que je l'ai décrit dans la conclusion de la section 2.2.5.

Enfin, quand les résultats de ce type d'expériences auront pu être validés, la méthode d'analyse métabotéomique développée pourra être appliquée à des échantillons environnementaux.

En particulier, une série de prélèvements a été réalisée d'avril à juillet 2022. À cette période, nous avons collecté les particules de type PM<sub>10</sub> en extérieur, sur le toit de l'institut de botanique de Strasbourg. Comme les prélèvements couvrent la saison pollinique, il serait intéressant de pouvoir identifier des protéines issues des végétaux, particulièrement des pollens, dans ces échantillons.

D'après les résultats de la Première Partie de cette thèse, l'étude des poussières déposées semble être particulièrement pertinente pour caractériser la contamination des milieux intérieurs. On pourra donc par la suite envisager de transférer le workflow de métabotéomique à ce type d'échantillon, afin d'y rechercher les contaminants biologiques majeurs de nos intérieurs, tels que les allergènes d'animaux domestiques, d'acariens, mais aussi les moisissures et les bactéries.

---

# **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**

---

Ces travaux de thèse visaient à une meilleure caractérisation de la fraction particulaire de l'atmosphère, au niveau des particules microscopiques en suspension, mais aussi des poussières déposées.

Il s'agissait de développer des méthodes analytiques afin d'associer à la quantification de contaminants organiques une identification de la fraction protéique des particules et des poussières.

Le premier développement analytique, qui a constitué la majeure partie de ces travaux de thèse, a permis l'analyse combinée dans une seule et même méthode de 79 Composés Aromatiques Polycycliques (CAP) par GC-MS/MS.

Ce résultat a été obtenu grâce à l'utilisation d'une phase stationnaire à la sélectivité optimale pour cette famille de molécules, suite à une optimisation des différents paramètres de séparation par GC tels que le programme de température ou le débit de gaz vecteur.

L'étape de détection par spectrométrie de masse a également été optimisée. Ici, les transitions MS/MS ont été recherchées pour obtenir l'intensité de signal la plus élevée possible et ainsi atteindre les limites de quantification les plus basses possibles. Le mode pseudo-MRM a ainsi été identifié comme le mode de détection idéal pour les HAP et leurs dérivés hétérocycliques. Celui-ci consiste en un suivi de transitions sans perte de masse entre le premier analyseur et le second. Il est donc particulièrement adapté pour ce type de composés très stables qui sont peu aptes à se fragmenter. Il a ainsi permis d'augmenter la réponse des HAP, AZA et SHAP jusqu'à un facteur 5 pour certains composés.

Le développement de méthode instrumental a été complété par l'optimisation de l'extraction des CAP dans les particules, avec une méthode d'extraction par solvant accéléré pour laquelle le solvant optimal était un mélange de toluène et d'acétonitrile en proportion équivalente.

Cette méthode analytique a ensuite été validée par l'analyse d'un matériau de référence certifié de particules d'échappement de moteur diesel. Parmi les 22 composés certifiés, 16 ont pu être quantifiés conformément à leur certification, et 57 CAP au total ont été détectés dans ce matériau. Trente-cinq d'entre eux n'avaient donc pas été certifiés auparavant. Ce résultat nous a permis de confirmer l'intérêt de suivre le plus grand nombre de CAP possible, parmi les différents groupes, pour obtenir une caractérisation représentative de ces composés. L'étude des seuls 16 HAP « historiques » de l'US EPA ne suffit pas à une évaluation environnementale complète de l'occurrence des CAP.

Une première application environnementale de cette méthode analytique a été réalisée sur des échantillons de PM<sub>10</sub> collectés dans un parking résidentiel. Les concentrations de CAP qui y ont été retrouvées correspondaient aux valeurs de la littérature pour des environnements similaires, et les ratios diagnostics de HAP ont permis de définir les échappements de véhicules comme la source principale des CAP dans ces échantillons.

Ensuite, cette méthode a été employée pour quantifier les CAP dans les particules et les poussières de logements urbains. Ces prélèvements ont été effectués en hiver, lors d'un pic de pollution aux particules. Ce pic de pollution s'est confirmé par la présence de CAP à des niveaux

très élevés dans les PM<sub>10</sub> intérieures et extérieures des trois logements étudiés. En revanche, dans les poussières déposées qui sont plus représentatives de la contamination à long terme des logements, les teneurs en CAP correspondaient plutôt à des niveaux inférieurs à la valeur médiane relevée dans la littérature. Dans tous ces échantillons domestiques, les HAP et les OHAP constituaient les groupes de CAP majoritaires.

Les perspectives de ces travaux sont nombreuses. En effet, maintenant que la méthode analytique est développée et validée, elle pourrait être appliquée à une multitude d'environnements. D'après nos résultats, le choix de l'étude d'environnements intérieurs semble tout à fait pertinent au vu de leur importance dans nos vies quotidiennes et des niveaux de CAP qui y sont retrouvés. Ainsi, on pourrait envisager l'étude de lieux de travail (bureaux, usines, boutiques, etc ...) en plus des lieux d'habitation, mais aussi des comparaisons entre logements ruraux et urbains, ou encore en fonction des habitudes de vie des occupants (fumeurs ou non-fumeurs, type de cuisson préférentiel, etc ...). Pour l'identification et la quantification des CAP dans les environnements intérieurs, l'analyse des poussières déposées plutôt que des PM semble être un choix intéressant au vu de la moindre gêne occasionnée par le prélèvement et de la représentativité temporelle des poussières par rapport à celle beaucoup plus courte des PM.

Du point de vue analytique, la principale marge d'amélioration concerne la faible sensibilité de l'analyse des NHAP qui n'ont pu être quantifiés dans aucun de nos échantillons environnementaux du fait de leur limite de quantification élevée. Mais pour résoudre ce problème, la seule solution serait d'utiliser une source d'ionisation différente, telle que la CI ou l'APCI. Il y aurait donc deux méthodes distinctes à utiliser pour quantifier à la fois les NHAP et les autres groupes de CAP. Enfin, on pourra envisager de compléter la liste des CAP d'intérêt au fil des informations nouvellement rapportées par la communauté scientifique sur ces composés, en termes de toxicité et d'occurrence notamment. Pour ce faire, l'appui des méthodes d'analyse non-ciblées sera certainement constructif.

Le deuxième développement de méthode d'analyse ciblée concernait également des composés émis dans l'atmosphère par des combustions : les fullerènes. Ce type de molécules a été beaucoup moins étudié que les CAP dans le compartiment atmosphérique, mais pourrait être considéré comme un contaminant émergent au vu des quelques études ayant rapporté leur présence dans les eaux et les sédiments par exemple.

La structure des fullerènes leur confère certaines propriétés chimiques problématiques pour leur analyse. En premier lieu, leur hydrophobicité nous a empêchés d'utiliser des solvants usuels, tant pour la préparation d'échantillons que pour la chromatographie. C'est un mélange toluène / acétonitrile qui a été utilisé pour obtenir une bonne séparation des fullerènes en LC. Celui-ci a aussi permis d'obtenir l'extraction des fullerènes dans les échantillons particuliers simultanément à celle des CAP, afin de réaliser l'analyse de ces deux types de composés, dont les sources sont similaires, dans les mêmes échantillons.

La détection des fullerènes par spectrométrie de masse a également été soigneusement étudiée. De manière encore plus prononcée que pour les CAP, le mode pseudo-MRM a permis

une détection bien plus sensible des fullerènes que le mode MRM « classique ». De plus, nous avons comparé l'efficacité des trois principales sources d'ionisation à pression atmosphérique pour les fullerènes. C'est l'APPI qui a donné le plus de sensibilité et de reproductibilité pour ces molécules, de manière assez attendue au vu de leur structure chimique.

Néanmoins, ces optimisations ne nous ont pas permis d'atteindre des limites de détection suffisamment basses pour détecter des fullerènes dans les échantillons que nous avons étudiés, c'est-à-dire le matériau de référence de particules diesel, les poussières domestiques et les PM<sub>10</sub> du parking, alors que nous avons pu y mesurer des concentrations de CAP.

En plus de la sensibilité de la méthode instrumentale qui pourrait être insuffisante, on peut également se demander si la méthode d'extraction, qui avait été validée par des dopages de standards de fullerènes sur des filtres, est effectivement transposable avec les mêmes rendements d'extraction à des échantillons de particules plus chargés en suie, sur lesquels les fullerènes pourraient donc être adsorbés bien plus fortement.

Au vu des optimisations déjà effectuées pour la méthode instrumentale LC-MS/MS, il me semble que la seule option permettant une amélioration très significative des limites de détection serait de transposer cette méthode sur un instrument plus récent, avec un spectromètre de masse plus sensible, et éventuellement une réduction des dimensions de la colonne de séparation en phase liquide ainsi que des volumes extra-colonne de la LC, afin de moins diluer les fullerènes.

Pour les vérifications attenantes à l'extraction des fullerènes, l'idéal serait de disposer d'un analogue de fullerène marqué à l'isotope <sup>13</sup>C. On pourrait alors doper ce standard interne dans des échantillons réels riches en suie tels que le matériau de référence de particules diesel, et ainsi vérifier sa récupération après extraction, afin d'évaluer la proportion de fullerènes qui resterait adsorbée sur les particules.

Enfin, des premiers développements ont également été effectués pour mettre en place une méthode de screening métabolomique de la fraction biologique des aérosols.

Très peu d'études de ce type ont été présentées au préalable dans la littérature. Il a donc fallu débiter le développement avec peu d'informations initiales. Nous avons choisi d'axer nos efforts sur la problématique de l'extraction des protéines dans les aérosols, puisque les méthodes d'analyse protéomique par LC-MS/MS et CE-MS/MS étaient déjà communément validées dans la littérature ainsi que dans notre laboratoire et chez notre partenaire, la Plateforme de Protéomique Strasbourg-Esplanade.

Cette étude consistait ici principalement en la comparaison de différents protocoles afin d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction possibles. Nous avons retenu comme tampon d'extraction optimal un mélange d'urée à 0,8 M, de thiourée à 0,2 M, de CHAPS à 0,1 % et de Tris à 2 mM. Cette comparaison de différents agents d'extraction a été effectuée sur une seule protéine témoin, l'albumine de sérum bovin. Elle a été suivie de l'étude de l'influence de la durée d'extraction, du volume d'extraction ou encore du nombre de cycles d'extraction. La méthode finalement sélectionnée consistait en une extraction de 4 heures dans 2 mL de solution.

Nous avons ensuite transposé la méthode d'extraction optimale à un mélange de huit protéines témoins. A ce stade, des difficultés de récupération des protéines ont été rencontrées, et des rendements très faibles ont été obtenus.

Grâce à l'analyse LC-MS/MS des extraits et avec l'utilisation de critères semi-quantitatifs tels que le NSAF, nous avons pu constater que l'extraction n'était pas homogène pour toutes les protéines étudiées. Elle semblait notamment favorable à l'albumine de sérum bovin et à la catalase, mais peu efficace pour le cytochrome C ou l'aldolase A.

Si les résultats préliminaires de ce développement de méthode métaprotéomique sont très intéressants, un long chemin reste à parcourir dans ce projet. Il faudra tout d'abord vérifier les résultats obtenus pour le mélange des huit protéines avec l'utilisation d'autres standards, ou de mélanges commerciaux déjà préparés avec des concentrations de protéines certifiées.

Il sera également intéressant de chercher à encore améliorer les rendements d'extraction des dopages de protéines sur filtres en fibre de verre, puisque ceux-ci n'ont pas dépassé 60 %. Les principales pistes dans cette optique sont l'ajout d'une étape de lyse mécanique et l'étude d'autres compositions du tampon de lyse.

Enfin, on pourra tester certaines optimisations sur l'ensemble du protocole d'analyse protéomique, y compris en utilisant d'autres types de purification que la précipitation des protéines ou bien en modifiant le protocole de précipitation.

À la suite de ces optimisations, on pourra alors rechercher les protéines présentes dans les aérosols. Si nos premiers échantillons seront des particules extérieures potentiellement affectées par la présence de pollens, on pourra rapidement se tourner vers les environnements intérieurs qui disposent également de nombreuses sources de bioaérosols. À l'image de la conclusion dressée pour les polluants organiques, l'étude des poussières déposées par la métaprotéomique serait très pertinente pour les environnements intérieurs. Il faudrait alors vérifier que la méthode d'extraction soit bien applicable à cette matrice également.

Il me semble que les résultats obtenus au cours des trois grandes parties de cette thèse ont été fondateurs du point de vue des développements analytiques réalisés. Ces travaux dans le domaine de la chimie analytique pourront servir de point de départ à de futures études dans le domaine de la chimie environnementale, qui seront elles-mêmes des travaux conséquents à entreprendre.

La métaprotéomique me semble être un domaine très prometteur pour la caractérisation au niveau biologique de l'impact de la pollution chimique de l'environnement.

Pour parvenir à comprendre les interconnexions entre la composition biologique et la composition chimique des particules et des poussières, il faudra d'abord recueillir une quantité importante de données sur de nombreux échantillons environnementaux. Les CAP et les fullerènes ne peuvent pas rester la seule catégorie chimique étudiée, bien que les premiers soient des polluants très importants en milieu urbain. Il faudra également s'intéresser à d'autres composés, dont certains ont déjà été identifiés comme intimement liés aux bioaérosols, tels que les sucres.

Ensuite, il faudra disposer d'identifications suffisamment fiables des protéines contenues dans les aérosols, grâce à un protocole bioanalytique optimisé et des outils bioinformatiques utilisés avec justesse.

Enfin, toutes ces informations ainsi rassemblées ne sauraient être interprétées sans l'appui d'outils statistiques performants. Pour pouvoir rendre des conclusions pertinentes sur d'éventuelles corrélations entre pollution chimique et composition biologique, il sera nécessaire d'utiliser des outils d'analyse de données tels que l'analyse en composantes principales (ACP) ou le regroupement hiérarchique (CAH).

C'est alors que nous pourrons mieux comprendre les associations qui existent entre molécules et êtres vivants, entre polluants et matière biogénique, dans les particules et les poussières de notre atmosphère. Et c'est ainsi que nous comprendrons à quels risques ces particules et ces poussières nous exposent au quotidien.



---

# ANNEXES

---

## Liste des publications

- Mathieu Galmiche, Adeline Colin, Marie-Christelle Clavos, Christelle Pallez, Christophe Rosin, Xavier Dauchy \*  
Determination of Nitroaromatic Explosive Residues in Water by Stir Bar Sorptive Extraction-Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.  
*Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2021**, 413 (1), 159–169.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02985-y>  
(travaux de stage Master 2 - ANSES)
- Mathieu Galmiche, Olivier Delhomme, Yannis-Nicolas François, Maurice Millet \*  
Environmental Analysis of Polar and Non-Polar Polycyclic Aromatic Compounds in Airborne Particulate Matter, Settled Dust and Soot: Part I: Sampling and Sample Preparation.  
*TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2021**, 134, 116099.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116099>
- Mathieu Galmiche, Olivier Delhomme, Yannis-Nicolas François, Maurice Millet \*  
Environmental Analysis of Polar and Non-Polar Polycyclic Aromatic Compounds in Airborne Particulate Matter, Settled Dust and Soot: Part II: Instrumental Analysis and Occurrence.  
*TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2021**, 134, 116146.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116146>
- Mathieu Galmiche \*, Anaïs Rodrigues, Estelle Motsch, Olivier Delhomme, Yannis-Nicolas François, Maurice Millet  
The use of pseudo-MRM for a sensitive and selective detection and quantification of polycyclic aromatic compounds by tandem mass spectrometry.  
*Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2022**; 36(13), e9307.  
<https://doi.org/10.1002/rcm.9307>

## Liste des communications

- M.Galmiche, O.Delhomme, Y.François, M.Millet  
*Simultaneous determination of 82 polar and non-polar Polycyclic Aromatic Compounds by gas chromatography – tandem mass spectrometry*  
**Oral**, Journée des Doctorants en Chimie de l'Université de Strasbourg 2020, en ligne, 12/11/2020
- M.Galmiche, O.Delhomme, A.Sonnette, V.Duflot, Y.François, M.Millet  
*Détermination simultanée de 80 composés aromatiques polycycliques polaires et non-polaires dans des poussières et des particules fines par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse*  
**Oral**, 14ème Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'AFSEP, Paris, France, 06/10/2021
- M.Galmiche, O.Delhomme, A.Sonnette, V.Duflot, Y.François, M.Millet  
*Simultaneous determination of 80 polar and non-polar Polycyclic Aromatic Compounds in airborne PM and settled dust by GC-MS/MS*  
**Poster**, 69<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 04/11/2021
- M.Galmiche, L.Kuhn, M.Millet, Y.François  
*La métaprotéomique appliquée aux poussières et aux particules atmosphériques*  
**Oral**, Journée scientifique « Omics » du club Grand-Est de l'AFSEP, Illkirch-Graffenstaden, France, 26/11/2021
- M.Galmiche  
*Spéciation chimique organique et métaprotéomique des particules et poussières intérieures*  
Ma Thèse en 180 secondes, Finale Régionale Alsace, Strasbourg, France, 24/03/2022
- M.Galmiche, L.Kuhn, M.Millet, Y.François,  
*Development of Extraction and Sample Preparation Methods for the Application of Metaproteomics to Bioaerosol*  
**Poster**, SETAC Europe 32<sup>nd</sup> Annual Meeting, Copenhagen, Denmark, 17/05/2022
- M.Galmiche, E.Esslinger, O.Delhomme, P.Schaeffer, P.Adam, E.Motsch, E.Leize-Wagner, Y.François, M.Millet  
*Method Development for the Analysis of C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> Fullerenes and Their Derivatives in Aerosol and Settled Dust*  
**Poster**, SETAC Europe 32<sup>nd</sup> Annual Meeting, Copenhagen, Denmark, 17/05/2022

- M.Galmiche, E.Esslinger, O.Delhomme, P.Schaeffer, P.Adam, E.Motsch, E.Leize-Wagner, Y.François, M.Millet  
*Développement de méthode pour l'analyse de fullerènes dans les particules atmosphériques et les poussières par LC-MS/MS*  
**Oral**, Midi du Club Jeunes de l'AFSEP, en ligne, 05/07/2022

## Résumé

Les aérosols et les poussières sont des sources d'exposition à une grande diversité de composants chimiques et biologiques. Pour mieux les caractériser, plusieurs développements analytiques ont été entrepris dans cette thèse.

Une méthode GC-MS/MS a été développée pour analyser simultanément 79 Composés Aromatiques Polycycliques. Elle a permis de quantifier ces composés dans des particules d'échappement de moteur diesel, des aérosols d'un parking, ou encore des poussières de logements urbains.

Une méthode LC-MS/MS a été développée pour analyser les fullerènes. Celle-ci a pu être validée, mais aucun fullerène n'a été détecté dans les échantillons environnementaux étudiés.

Un screening méta-protéomique de la fraction biologique des aérosols et des poussières a été mis au point. La méthode d'extraction des protéines a été optimisée. Des analyses bottom-up ont ensuite été réalisées afin de vérifier l'identité des protéines extraites.

Ces développements analytiques visent à atteindre une meilleure connaissance des fractions chimiques et biologiques des aérosols et des poussières.

Mots-clés : Particules en suspension dans l'air (PM), Poussières, Chromatographie en phase gazeuse (GC), Chromatographie en phase liquide (LC), Spectrométrie de masse (MS), Chimie analytique, Chimie de l'environnement, Protéomique

## Résumé en anglais

Aerosol and settled dust are responsible for human exposure to a wide range of chemical and biological components. To characterize them, several analytical developments are presented in this thesis.

A GC-MS/MS method was developed to simultaneously determine 79 Polycyclic Aromatic Compounds. It enabled the quantification of these compounds in diesel exhaust particulates, airborne particulates from a parking lot, and settled dust from urban dwellings.

A LC-MS/MS method was developed to analyze fullerenes. It was successfully validated, but no detection of fullerenes was obtained in the environmental samples of interest.

A metaproteomics workflow was implemented for the characterization of the biological fraction of aerosol and settled dust. The main optimization was the enhancement of the extraction of proteins. Subsequent bottom-up analyses were performed to identify the extracted proteins.

All these analytical developments aim at a better understanding of the composition of chemical and biological fractions of aerosol and settled dust.

Keywords: Airborne Particulate Matter (PM), Settled dust, Gas Chromatography (GC), Liquid Chromatography (LC), Mass Spectrometry (MS), Analytical chemistry, Environmental chemistry, Proteomics