



N° d'ordre :

Année 2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

par

Alexandra Berlioz-Barbier

Spécialité : Chimie Analytique

**Développement de méthodologies innovantes basées sur la
nanochromatographie couplée à la spectrométrie de masse pour l'étude de
la bioaccumulation et de la biotransformation de polluants émergents chez
des invertébrés aquatiques d'eau douce**

Thèse soutenue le 09 décembre 2015

Composition du jury

Mme BUDZINSKI Hélène	Directeur de Recherche (CNRS-EPOC)	Rapporteur
Mr BARCELO Damià	Professeur (CSIC-IDEA)	Rapporteur
Mme GARRIC Jeanne	Directeur de Recherche (IRSTEA)	Examineur
Mr LANTERI Pierre	Professeur (Université Claude Bernard)	Président
Mr NETTER Claude	Thermo Fisher Scientific	Examineur
Mr JUNOT Christophe	Ingénieur de Recherche (CEA)	Examineur
Mme CREN-OLIVE Cécile	Responsable Unité R&D Galderma	Co-Directrice de thèse
Mme Vulliet Emmanuelle	Chargé de Recherche (CNRS-ISA)	Co-Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé en Français

L'écosystème aquatique est le résultat d'un équilibre entre l'environnement naturel et les organismes qui s'y développent. Cet équilibre peut être modifié par l'introduction de substances chimiques dues aux activités humaines. Aujourd'hui, l'impact de cette micropollution est encore mal connu, particulièrement pour les organismes constituant les premiers maillons des chaînes trophiques qui requièrent des efforts analytiques importants en raison de leur faible taille. L'objectif de ces travaux est centré sur le développement, la validation et l'application d'outils analytiques permettant d'étudier la bioaccumulation et la biotransformation de polluants émergents chez des invertébrés benthiques. Cette étude s'est focalisée sur 3 organismes aquatiques d'eau douce : *C. riparius*, *G. fossarum* et *P. antipodarum*.

Une méthode analytique pour la quantification de 35 polluants émergents chez les 3 espèces sélectionnées a ainsi été développée. Elle permet d'accéder aux premières données de bioaccumulation des substances d'intérêts à l'échelle d'un individu grâce à la mise en œuvre d'une stratégie analytique entièrement miniaturisée, incluant une extraction MicroQuEChERS suivie d'une analyse par nanochromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Afin de mieux comprendre l'impact d'une telle pollution sur les espèces sélectionnées et d'obtenir une vue globale des capacités de biotransformation de celles-ci, une approche métabolomique a été mise en place. Enfin, un nouveau mode de quantification par MRM³ a été utilisé pour dépasser la complexité de telles matrices, et fournir une évaluation fiable des cinétiques de bioaccumulation de potentiels traceurs de pollution anthropique.

Mots clés : Nanochromatographie liquide, spectrométrie de masse, quantification, métabolomique, invertébré benthique

Titre en Anglais

Development of innovative analytical tools based on nanoliquid chromatography coupled to mass spectrometry for the assessment of bioaccumulation and biotransformation of emerging pollutants in freshwater invertebrates

Résumé en anglais

The aquatic ecosystem is the result of a balance between the natural environment and the organisms that inhabit it. This balance can be modified by the input of excessive amount of substances generated from human activities. Nowadays, the impact of this pollution is still little known, especially regarding the risk of bioaccumulation in the first trophic levels. This lack of data could be partially explained by the lack of suitable analytical method for small organisms. In this context, the aim of this study is to establish the development, the validation and the application of analytical tools for the assessment of bioaccumulation and biotransformation of emerging pollutants in freshwater invertebrates. Three benthic invertebrates are chosen for this project: *C. riparius*, *G. fossarum* and *P. antipodarum*.

Analytical method has been developed for the quantification of 35 emerging pollutants in the selected species. This method provides the first bioaccumulation data of targeted substances in individual scale through the implementation of miniaturized analytical strategy, including an extraction step based on MicroQuEChERS followed by nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry analysis. To better understand the impact of such pollution and to obtain a global view of the biotransformation capacities of the selected organisms, metabolomics approach has been put in place. Finally, a new quantification mode based on MRM³ was used to overcome biotic matrix complexity and assess the bioaccumulation kinetics of potential tracers of anthropic pollution.

Key words: Nanoliquid chromatography, mass spectrometry, quantification, metabolomics, benthic invertebrate

Liste des communications

Publications

Perrodin Y., Bazin C., Orias F., Wigh A., Bastide T., Berlioz-Barbier A., Vulliet E., Wiest L., A posteriori assessment of ecotoxicological risks linked to building a hospital, *Chemosphere*, 144 (2016) 440-445

Berlioz-Barbier A., Baudot R., Wiest L., Gust M., Garric J., Cren-Olivé C., Buleté A., MicroQuEChERS – nanoliquid chromatography – nanospray – tandem mass spectrometry for the detection and quantification of trace pharmaceuticals in benthic invertebrates, *Talanta*, 132 (2015) 796-802

Berlioz-Barbier A., Buleté A., Faburé J., Garric J., Cren-Olivé C., Vulliet E., Multi-residue analysis of emerging pollutants in benthic invertebrates by modified micro-quick-easy-cheap-efficient-rugged-safe extraction and nanoliquid chromatography-nanospray-tandem mass spectrometry analysis, *Journal of Chromatography A*, 1367 (2014) 16-32

Vulliet E., Berlioz-Barbier A., Lafay F., Baudot R., Wiest L., Vauchez A., Lestremau F., Botta F., Cren-Olivé C., A national reconnaissance for selected organic micropollutants in sediments on French territory, *Environmental Science and Pollution Research*, 21 (2014) 11370-11379

Gust M., Gagne F., Berlioz-Barbier A., Besse JP., Buronfosse T., Tournier M., Tutundjian R., Garric J., Cren-Olivé C., Caged mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) as an integrated field biomonitoring tool : Exposure assessment and reprotoxic effects of water column contamination, *Water Research*, 54 (2014) 222-236

Berlioz-Barbier A., Vauchez A., Wiest L., Baudot R., Vulliet E., Cren-Olivé C., Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LS-MS/MS analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 1259-1266

Conférence invitée

Développement de méthodologies innovantes basées sur la nanochromatographie pour l'étude de la bioaccumulation de polluants émergents chez des microorganismes aquatiques d'eau douce - Séminaire « La chimie analytique au service de la santé » - Du 16 au 18 juin 2014 – CHU Genève

Communications orales

Congrès internationaux

Metabolomic investigation of benthic invertebrates exposed to wastewater treatment plant effluents using NanoLC-HRMS - Congrès EuroAnalysis - Du 6 au 10 septembre 2015 – Bordeaux

Multi-residue analysis of emerging pollutants in benthic invertebrates by MicroQuEChERS extraction and NanoLC-MS/MS analysis: a new strategy to evaluate bioaccumulation - Congrès ISEAC 38 – Du 16 au 18 juin 2014 – Lausanne

Contamination assessment of 3 benthic invertebrates exposed to WWTP effluents by combining targeted and holistic analytical methods: What are the relevance and the feasibility of biological tools? – Congrès SETAC – Du 4 au 7 mai 2015 – Barcelonne

Congrès nationaux

Utilisation de la nanochromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour l'évaluation de la contamination de trois invertébrés benthiques exposés aux effluents de station d'épuration - Congrès SEP 2015 - Du 31 mars au 2 avril 2015 – Paris

Communications par poster

Congrès internationaux

Metabolite profiling of 3 benthic invertebrates exposed to wastewater treatment plant effluents by nanoLC-HRMS: a stepping stone to a better understanding of the inter-species response diversity – Congrès SETAC – Du 4 au 7 mai 2015 - Barcelonne

Development of a multi-residue method of emerging pollutants in benthic invertebrates using modified MicroQuEChERS extraction followed by NanoLC-MS/MS analysis: a new strategy to evaluate bioaccumulation – Congrès SETAC – Du 11 au 15 mai 2014 – Basel

Congrès nationaux

Quantification par MRM³ de micropolluants émergent chez un crustacé amphipode par nanochromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse – Congrès SMAP – Du 15 au 18 septembre 2015 - Ajaccio

Caractérisation de la contamination par des substances émergentes de trois invertébrés benthiques: Evaluation de la faisabilité et de la pertinence des outils biologiques – Colloque Effervescence – Du 20 au 21 novembre 2014 – Montpellier

La biodiversité dépend-elle aussi de notre santé – Colloque santé biodiversité – Du 27 et 28 octobre 2014 – Marcy L'Etoile

Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus permettant l'étude de la bioaccumulation de polluants émergents dans des micro-organismes aquatiques d'eau douce par extraction miniaturisée de type QuEChERS suivie d'une analyse par NanoLC-MS/MS – Congrès SMAP 2014 – Du 30 juin au 2 juillet 2014 – Lyon

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	28
CHAPITRE 1: ETAT DE L'ART.....	34
PARTIE A : PROPRIETES ET ANTHROPISATION DES COMPOSES D'INTERETS	35
1. LES COMPOSES PHARMACEUTIQUES.....	35
1.1. Généralités et propriétés physicochimiques.....	35
1.1.1. Définition et classification des composés pharmaceutiques.....	35
1.1.2. Consommation de composés pharmaceutiques.....	36
1.1.3. Propriétés physico-chimiques des substances pharmaceutiques d'intérêts.....	39
1.2. Les sources de contamination environnementales.....	44
1.2.1. Les stations d'épuration : principales voies d'introduction des substances pharmaceutiques dans l'environnement.....	45
a) Les différents traitements mis en jeu dans les stations d'épuration.....	45
b) Devenir des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration : abattement et occurrence	47
1.2.2. Le cas particulier des effluents hospitaliers	50
1.3. Devenir des substances pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques	52
1.3.1. Les phénomènes de dégradation en milieux naturels.....	52
a) La biodégradation.....	52
a) La photodégradation.....	52
1.3.2. Les phénomènes de sorption en milieu naturel.....	53
1.3.3. Données d'occurrence dans les matrices environnementales	53
a) Présence dans les eaux de surface	53
b) Présence dans les sédiments.....	54
1.4. Devenir dans les organismes aquatiques : bioconcentration, bioaccumulation, bioamplification et biotransformation	55
1.4.1. Définitions	55
1.4.2. Bioconcentration et bioaccumulation des substances pharmaceutiques	56
1.4.3. Biotransformation des substances pharmaceutiques	57
1.5. Toxicité et effets des substances pharmaceutiques	59
1.6. Aspects législatifs et réglementaires.....	61
2. LES HORMONES	63
2.1. Généralités et propriétés physico-chimiques des hormones d'intérêt.....	63
2.1.1. Le système endocrinien : définition et fonctionnement	63
2.1.2. Les hormones stéroïdiennes : production, rôle et utilisation.....	64
2.1.3. Propriétés physico-chimiques des hormones d'intérêt.....	65
2.2. Les stations d'épuration : principales voies d'introduction d'hormones dans l'environnement.....	68
2.2.1. Efficacité des procédés de traitement mis en œuvre dans les STEP	68
2.2.2. Données d'occurrence des hormones stéroïdiennes dans les influents et effluents de STEP.....	69
2.3. Devenir des hormones stéroïdiennes dans les systèmes aquatiques	70
2.3.1. Les phénomènes de dégradation en milieu naturel.....	70
a) Les phénomènes de biodégradation	70
b) Les phénomènes de photodégradation.....	71
2.3.2. Les phénomènes de sorption en milieux naturels.....	71

2.3.3.	Données d'occurrence des hormones stéroïdiennes dans les systèmes aquatiques	72
a)	Données d'occurrence dans les eaux de surface	72
b)	Données d'occurrence dans les sédiments	72
2.4.	<i>Devenir des hormones stéroïdiennes dans les organismes aquatiques</i>	72
2.4.1.	Les phénomènes de bioconcentration et de bioaccumulation	72
2.4.2.	Les phénomènes de biotransformation	73
2.5.	<i>Toxicité et effets des hormones stéroïdiennes</i>	74
2.6.	<i>Aspects législatifs et réglementaires</i>	75
3.	LES AGENTS INDUSTRIELS	75
3.1.	<i>Les perfluoroalkyls : PFOA et PFOS</i>	75
3.1.1.	Généralités et propriétés physico-chimiques	75
a)	Historique	75
b)	Définitions et classification	76
c)	Domaines d'usage et applications	79
d)	Données de consommation	79
e)	Propriétés physico-chimiques des perfluoroalkyls d'intérêt	79
3.1.2.	Les sources de contamination environnementale	81
a)	Efficacité des procédés de traitements mis en œuvre dans les STEP	82
b)	Données d'occurrence du PFOA et PFOS dans les influents et effluents de STEP	82
3.1.3.	Devenir du PFOA et du PFOS dans l'environnement	83
a)	Les phénomènes de transport à longue distance	83
b)	Les phénomènes de sorption en milieux naturels	83
c)	Données d'occurrence du PFOA et du PFOS dans les systèmes aquatiques	84
3.1.4.	Devenir du PFOA et du PFOS dans les organismes aquatiques	85
a)	Les phénomènes de bioconcentration et de bioaccumulation	85
b)	Les phénomènes de biotransformation	86
3.1.5.	Toxicité et effets du PFOA et du PFOS	86
3.1.6.	Aspects législatifs et réglementaires	87
3.2.	<i>Le Bisphénol A</i>	88
3.2.1.	Généralités et propriétés physico-chimiques	88
a)	Domaines d'usages et applications	88
b)	Propriétés physico-chimique du Bisphénol A	89
3.2.2.	Sources de contamination environnementale	90
a)	Le devenir du bisphénol A dans les décharges	90
b)	Le devenir du BPA dans les stations d'épuration	90
i.	Elimination et efficacité des procédés de traitement des eaux usées	90
ii.	Données d'occurrence du BPA dans les influents et effluents de STEP	91
3.2.2.	Devenir du BPA dans les systèmes aquatiques	93
a)	Les phénomènes de dégradation en milieux naturels	93
i.	Les phénomènes de biodégradation	93
ii.	Les phénomènes de photolyse	93
b)	Les phénomènes de sorption en milieux naturels	93
c)	Données de présence du BPA dans les systèmes aquatiques	94
3.2.3.	Le devenir du BPA dans les organismes	95
a)	Les phénomènes de bioconcentration et de bioaccumulation	95
b)	Les phénomènes de biotransformation	95
3.2.5.	La toxicité et les effets du BPA	96
3.2.6.	Aspects législatifs et réglementaires	97

3.3.	<i>Les alkylphénols</i>	98
3.3.2.	Généralités et propriétés physico-chimiques.....	98
a)	Nomenclature.....	98
b)	Voies de synthèse et production.....	98
c)	Domaines d'usages et applications.....	98
d)	Propriétés physico-chimiques.....	99
3.3.3.	Les sources de contamination environnementales.....	99
a)	Le devenir des alkylphénols dans les stations d'épuration.....	100
b)	Efficacité des procédés de traitement des eaux usées.....	101
c)	Données d'occurrence dans les effluents de station d'épuration.....	102
3.3.4.	Le devenir des alkylphénols dans l'environnement.....	103
a)	Les phénomènes de dégradation en milieu naturel.....	103
i.	Les phénomènes de biodégradation.....	103
ii.	Les phénomènes de photolyse.....	103
b)	Les phénomènes de sorption en milieu naturel.....	104
a)	Données d'occurrence des alkylphénols dans l'environnement aquatique.....	104
i.	Présence dans les eaux de surface.....	104
ii.	Présence dans les sédiments.....	105
3.3.5.	Devenir des alkylphénols dans les organismes aquatiques.....	105
a)	Les propriétés de bioconcentration et de bioaccumulation.....	105
b)	La biotransformation.....	106
3.3.6.	Toxicité des alkylphénols.....	106
3.3.7.	Aspects législatifs et réglementaires.....	107
3.4.	<i>Autre agent industriel : le cas du filtre UV 4-méthylbenzylidène camphre</i>	108
3.4.2.	Généralités et propriétés physico-chimiques.....	108
a)	Généralités sur les filtres UV.....	108
b)	Propriétés physico-chimiques.....	109
3.4.3.	Les stations d'épurations : principales voies d'introduction des filtres UV dans l'environnement.....	109
3.4.4.	Devenir et occurrence de la 4MBC dans les systèmes aquatiques.....	110
a)	Les phénomènes de dégradation et de sorption en milieu naturel (d'après diaz-cruz, 2008).....	110
b)	Occurrence de la 4MBC dans les systèmes aquatiques.....	110
3.4.5.	Devenir de la 4MBC dans les organismes aquatiques.....	111
3.4.6.	Toxicité et effets de la 4MBC.....	112
4.	LES PESTICIDES.....	113
4.2.	<i>Généralités et propriétés physico-chimiques</i>	113
4.2.1.	Définition.....	113
4.2.2.	Historique et statistique d'usage des pesticides.....	114
4.2.3.	Propriétés physico-chimiques des pesticides d'intérêt.....	115
4.3.	<i>Sources, transferts et devenir des pesticides dans l'environnement</i>	116
4.3.2.	Sources de contamination environnementale.....	116
4.3.3.	Transferts et devenir des pesticides dans l'environnement.....	116
a)	Processus de transfert vers l'air : la volatilisation et la dérive.....	117
b)	Processus de rétention dans les sols.....	118
c)	Processus de transfert vers les eaux souterraines : le lessivage.....	118
d)	Processus de transfert vers les eaux de surface : le ruissellement.....	118
e)	Les phénomènes de dégradation en milieu naturel.....	119
f)	Les phénomènes de sorption en milieux naturels.....	121
4.3.4.	Données d'occurrence des pesticides dans les systèmes aquatiques.....	122

4.4.	<i>Devenir des pesticides dans les organismes aquatiques</i>	124
4.4.2.	Les phénomènes de bioconcentration et de bioaccumulation	Erreur ! Signet non défini.
4.4.3.	Les phénomènes de biotransformation	Erreur ! Signet non défini.
4.5.	<i>Toxicité et effets des pesticides d'intérêt</i>	124
4.6.	<i>Aspects législatifs et réglementaires</i>	125

PARTIE B : EVALUATION DE LA QUALITE DES MILIEUX AQUATIQUES: DU PRELEVEMENT PONCTUEL AU BIOMONITORING 126

1.	LES ECHANTILLONNAGES ACTIFS	126
2.	LES ECHANTILLONNAGES PASSIFS	127
3.	LE BIOMONITORING	128
3.1.	<i>Définition</i>	128
3.2.	<i>Les techniques de biomonitoring</i>	128
3.3.	<i>Les espèces sentinelles : définition et critères de sélection</i>	131
3.4.	<i>Les espèces sentinelles d'intérêt</i>	133
3.4.1.	Gammarus fossarum	133
a)	Classification.....	133
b)	Répartition géographique	134
c)	Ecologie et biologie	134
d)	Anatomie et morphologie	135
e)	Croissance	135
f)	Reproduction.....	136
3.4.2.	Potamopyrgus antipodarum	136
a)	Classification.....	136
b)	Répartition Géographique.....	136
a)	Ecologie et biologie	137
b)	Anatomie et morphologie	137
c)	Reproduction.....	138
d)	Croissance	138
3.4.3.	Chironomus riparius	138
a)	Classification.....	138
b)	Ecologie et biologie	139
3.5.	<i>Principaux avantages et limites d'utilisation des espèces sentinelles choisies</i>	141

PARTIE C : EXTRACTION ET ANALYSE DES COMPOSES D'INTERETS DANS LES MATRICES BIOTIQUES 142

1.	LES TECHNIQUES D'EXTRACTION	142
2.	ANALYSE DES COMPOSES D'INTERETS : SEPARATION ET DETECTION.....	144
2.1.	<i>Séparation des composés d'intérêts</i>	144
2.2.	<i>Détection des composés d'intérêt</i>	145
2.2.1.	Détection par des systèmes optiques	146
2.2.2.	Détection par spectrométrie de masse	146
a)	Les sources d'ions.....	146
b)	Les analyseurs.....	148
i.	Le spectromètre de masse hybride QqToF	149
ii.	Le spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôle.....	150
c)	Les détecteurs	151

PARTIE D : VERS LA MINIATURISATION DES SYSTEMES D'ANALYSES : PRINCIPE ET APPLICATION DE LA NANOCHROMATOGRAPHIE.....	152
1. HISTORIQUE ET DEFINITION DE LA NANOCHROMATOGRAPHIE	152
1.1. <i>Historique de la miniaturisation des systèmes d'analyse</i>	152
1.2. <i>Définition de la nanochromatographie</i>	154
2. ASPECTS THEORIQUES DE LA NANOCHROMATOGRAPHIE LIQUIDE.....	155
3. LE COUPLAGE NANOCHROMATOGRAPHIE LIQUIDE – SPECTROMETRIE DE MASSE (NANOLC-MS)	160
4. APPLICATIONS	161
PARTIE E : PERFORMANCES ANALYTIQUES ET VALIDATION DE METHODES QUANTITATIVES	162
1. CRITERES D'IDENTIFICATION DES COMPOSES : SELECTIVITE ET SPECIFICITE	162
2. PRECISION	163
3. JUSTESSE	164
4. ROBUSTESSE	164
5. RENDEMENT D'EXTRACTION	164
6. EFFETS DE MATRICE	165
7. LIMITES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION.....	166
8. EVALUATION DU MODELE DE REGRESSION	167
PARTIE F : ANALYSES NON-CIBLEES ET APPROCHES METABOLOMIQUES	169
1. DEFINITION.....	169
2. LE WORKFLOW METABOLOMIQUE.....	170
2.1. <i>La problématique et la conception du design expérimental</i>	171
2.2. <i>L'acquisition des données métabolomiques</i>	172
3. PLATEFORMES ANALYTIQUES ET STRATEGIES D'IDENTIFICATION DE METABOLITES	173
4. STRATEGIE D'ANALYSE DE DONNEES METABOLOMIQUES DE TYPE LC-MS.....	176
4.1. <i>Le prétraitement des données métabolomiques</i>	176
a) La détection des caractéristiques spectrales et chromatographiques	177
b) L'alignement des pics	177
c) La normalisation	177
d) Le scaling (mise à l'échelle)	177
4.2. <i>Le traitement statistique et mathématique des données métabolomiques</i>	178
a) Les différents outils statistiques et mathématiques utilisés en métabolomique	178
b) L'analyse en composantes principales (ACP).....	180
i. Généralité sur l'ACP	180
ii. Principe de l'ACP.....	180
iii. Interprétation de l'ACP	181
c) Analyse de variance (ANOVA)	182
i. Généralités	182
ii. Principe de l'ANOVA	182
CHAPITRE 2: MATERIELS &	185METHODES
.....	185
INTRODUCTION.....	186
PARTIE A : LES ORGANISMES SENTINELLES : PRELEVEMENT, ELEVAGE ET MAINTIEN EN LABORATOIRE	186

1.	<i>GAMMARUS FOSSARUM</i>	186
2.	<i>CHIRONOMUS RIPARIUS</i>	188
3.	<i>POTAMOPYRGUS ANTIPODARUM</i>	189
PARTIE B : APPAREILLAGES ET MATERIELS		189
1.	LES STANDARDS ANALYTIQUES ET LES REACTIFS CHIMIQUES.....	189
2.	LES SOLVANTS	190
3.	APPAREILLAGES UTILISES.....	192
3.1.	<i>Appareillage dédié à la nanochromatographie en phase liquide (NanoLC)</i>	192
3.2.	<i>Appareillages dédiés à la détection par spectrométrie de masse</i>	195
3.2.1.	Le cas des analyses ciblées	195
3.2.2.	Le cas des analyses non ciblées.....	197
PARTIE C : METHODES D'ANALYSES RELATIVES A L'ETUDE DE LA BIOACCUMULATION DE 35 POLLUANTS EMERGENTS CHEZ TROIS INVERTEBRES BENTHIQUES		201
1.	PREPARATION D'ECHANTILLON.....	201
1.1.	<i>Prétraitement de l'échantillon</i>	201
1.2.	<i>Extraction de type micro-QuEChERS</i>	201
2.	ANALYSES NANOLC-MS/MS.....	203
2.1.	<i>Pré-concentration en ligne et séparation des composés d'intérêts par NanoLC</i>	203
2.2.	<i>Détection des composés d'intérêts</i>	204
3.	PLAN DE QUALIFICATION DES PERFORMANCES ANALYTIQUES	206
PARTIE D : METHODE D'ANALYSE RELATIVE A L'ETUDE DES CINETIQUES D'ACCUMULATION DE TROIS TRACEURS DE POLLUTION ANTHROPIQUE CHEZ <i>GAMMARUS FOSSARUM</i>		207
1.	PREPARATION D'ECHANTILLON.....	207
2.	ANALYSE PAR NANOLC-MS/MS/MS	208
PARTIE E : APPROCHES METABOLOMIQUES		209
1.	PREPARATION D'ECHANTILLON.....	209
2.	ANALYSE PAR NANOLC-HRMS ET NANOLC-HRMS/MS.....	210
2.1.	<i>Pré-concentration en ligne et séparation nanochromatographique</i>	210
2.2.	<i>Détection par spectrométrie de masse haute résolution</i>	211
3.	TRAITEMENT DES DONNEES BRUTES DE TYPE NANOLC-HRMS	213
3.1.	<i>Prétraitement des données</i>	213
3.2.	<i>Détection des pics chromatographiques</i>	213
3.3.	<i>Analyse par des approches chimiométriques et annotation des pics</i>	214
PARTIE F : SITES D'ETUDE ET STRATEGIE D'EXPOSITION DES ORGANISMES SENTINELLES		214
1.	LE PROJET VERI.....	214
1.1.	<i>Le site d'étude</i>	214
1.1.1.	Caractéristiques du bassin versant Brévenne-Turbine	215
1.1.2.	Caractéristiques de la rivière Brévenne au niveau de la STEP de l'Arbresle.....	217
1.1.3.	Caractéristiques de la STEP de l'Arbresle	217
1.2.	<i>Les systèmes expérimentaux mis en œuvre</i>	218
1.2.1.	Conditions d'exposition des organismes en laboratoire (approche ex situ)	219

1.2.2. Conditions d'exposition des organismes sur le terrain (approche in situ)	220
2. L'OBSERVATOIRE SIPIBEL	222
2.1. Le site d'étude	222
2.1.1. Historique.....	222
2.1.2. Présentation.....	223
2.2. Condition d'exposition des mollusques <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	227
3. LE BASSIN DE LA BOURBRE	227
3.1. Présentation du site d'étude	227
3.2. Condition d'exposition des mollusques <i>Potomopyrgus antipodarum</i>	228
4. ETUDE DES CINETIQUES D'ACCUMULATION DE POLLUANTS EMERGENTS CHEZ <i>GAMMARUS FOSSARUM</i>	228
4.1. Conditions d'exposition des crustacés <i>Gammarus fossarum</i>	228
4.2. Dosage des contaminants dans les milieux d'exposition.....	229
CHAPITRE 3:	230
DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODOLOGIES ANALYTIQUES PERMETTANT LA QUANTIFICATION DE POLLUANTS EMERGENTS CHEZ TROIS INVERTEBRES BENIHIQUES PAR MICROQUECHERS-NANOESI-MS/MS	230
INTRODUCTION.....	231
PARTIE A : MISE AU POINT DE LA METHODE D'ANALYSE DES SUBSTANCES D'INTERETS PAR NANOESI-NANOESI-MS/MS	232
1. OPTIMISATION DES PARAMETRES DE DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM.....	233
2. OPTIMISATION DE L'IONISATION DES COMPOSES PAR NANOESI	237
2.1. Assemblage et réglage de la source NanoSpray® II	237
2.2. Optimisation de la température de source.....	240
2.3. Optimisation de la tension appliquée au spray	242
2.4. Optimisation du gaz rideau (CUR) et du gaz de nébulisation (GS1)	243
3. OPTIMISATION DES CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES.....	244
3.1. Optimisation de la séparation chromatographique	244
3.1.1. Choix de la phase stationnaire	244
3.1.2. Choix de la phase mobile et optimisation des gradients d'élution.....	246
a) Choix des phases mobiles.....	246
b) Optimisation du gradient d'élution	247
3.2. La pré-concentration en ligne : Optimisation de l'étape de trapping.....	251
a) Appareillage et design expérimental.....	251
PARTIE B : OPTIMISATION DE LA PREPARATION D'ECHANTILLON : MISE AU POINT DE LA METHODE D'EXTRACTION PAR MICRO-QUECHERS.....	260
1. OPTIMISATION DE L'ETAPE D'EXTRACTION.....	262
1.1. Influence de la nature et de la concentration des sels	262
1.2. Influence de la nature et du volume du solvant d'extraction	264
2. OPTIMISATION DE L'ETAPE DE PURIFICATION.....	268
PARTIE C : CONSIDERATIONS DES SOURCES DE CONTAMINATION ET INFLUENCE DE LA QUALITE DES SOLVANTS	272

PARTIE D : PERFORMANCES ET VALIDATION DE LA METHODE	274
1. DETERMINATION DES LIMITES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION	275
2. VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES.....	277
2.1. Sélectivité et spécificité des méthodes d'analyse	278
2.2. Validation du modèle de régression	279
2.3. Précisions intra et inter-jour des méthodes mises en œuvre	281
2.4. Rendements d'extraction	284
2.5. Evaluation des effets de matrice	285
CONCLUSION	288
CHAPITRE 4 :	290
<i>ETUDE DE LA BIOACCUMULATION DE POLLUANTS EMERGENTS CHEZ LES INVERTEBRÉS BENTHIQUES: VERS L'EVALUATION DE L'IMPACT DES ACTIVITÉS D'ASSAINISSEMENT SUR LES MILIEUX AQUATIQUES</i>	290
INTRODUCTION.....	291
PARTIE A : LE SITE DE LA BOURBRE.....	292
1. OBJECTIFS ET DEMARCHE	292
2. RESULTATS	293
2.1. Conditions d'exposition	293
2.2. Analyses chimiques.....	293
2.2.1. Analyse de matrices aqueuse	293
2.2.2. Analyse des mollusques encagés.....	294
3. DISCUSSION	295
3.1. Contamination du milieu récepteur.....	295
3.2. Contamination des mollusques encagés	295
4. CONCLUSIONS	297
PARTIE B : L'OBSERVATOIRE SIPIBEL.....	297
1. OBJECTIFS ET DEMARCHES	297
2. RESULTATS	298
2.1. Conditions d'expositions.....	298
2.2. Analyses des matrices aqueuses	300
2.3. Analyse des mollusques encagés.....	300
3. DISCUSSION	301
4. CONCLUSIONS	302
PARTIE B : LE PROJET VERI.....	302
1. OBJECTIFS ET DEMARCHE	302
2. RESULTATS	304
2.1. Conditions d'exposition	304
2.2. Analyses chimiques.....	305
2.2.1. Analyse de l'eau de rivière et de l'effluent de station d'épuration	305
2.2.2. Analyse du biote.....	307

3.	DISCUSSIONS.....	310
3.1.	<i>Contamination des effluents de STEP et du milieu récepteur.....</i>	310
3.2.	<i>Comparaison de la contamination des effluents de STEP, du milieu récepteur et des organismes 311</i>	
3.3.	<i>Comparaison des capacités d'accumulation des trois espèces considérées.....</i>	312
3.4.	<i>Impact des conditions d'exposition : in situ vs ex situ</i>	313
3.5.	<i>Proposition de potentiels traceurs chimiques d'exposition liés au rejet urbain</i>	322
4.	SYNTHESE.....	323
5.	CONCLUSION.....	325
	CONCLUSION.....	326
	CHAPITRE 5:.....	327
	APPROCHES METABOLOMIQUES.....	327
	INTRODUCTION.....	328
	PARTIE A : OPTIMISATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES	329
1.	CONDITIONS DE DETECTION.....	329
2.	CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES.....	330
2.1.	<i>Séparation nanochromatographique.....</i>	330
2.2.	<i>Condition de pré-concentration en ligne.....</i>	332
3.	COMPARAISON DES DIFFERENTS PROTOCOLES DE PREPARATION D'ECHANTILLON.....	335
4.	EMPREINTES MOLECULAIRES OBTENUES DANS LES CONDITIONS OPTIMALES.....	337
	PARTIE B : ANALYSES DES DONNEES METABOLOMIQUES	340
1.	PRETRAITEMENT DES DONNEES	340
1.1.	<i>Calibration des valeurs m/z enregistrées</i>	340
1.2.	<i>Bucketing et alignement des signaux.....</i>	341
2.	TRAITEMENT DES DONNEES.....	343
2.1.	<i>Evaluation de la qualité des données à partir des échantillons QC.....</i>	343
2.2.	<i>Méthode de traitement de données non-supervisée : Analyse en Composantes Principales (ACP) 345</i>	
2.2.1.	<i>Evaluation des scaling de type Pareto et Unit Variance (UV)</i>	345
2.2.2.	<i>Application de l'Analyse en Composantes Principales aux invertébrés benthiques.....</i>	347
2.3.	<i>Méthode de traitement de données supervisée : Analyse de Variance (ANOVA)</i>	349
	PARTIE C : BIOMARQUEURS PUTATIFS ET STRATEGIES D'IDENTIFICATION	351
1.	SELECTION DES VARIABLES DISCRIMINANTES	351
2.	ETUDE DES SIGNAUX DISCRIMINANTS	354
3.	STRATEGIES D'IDENTIFICATION DES VARIABLES DISCRIMINANTES	359
4.	BIOMARQUEURS PUTATIFS.....	367
	CONCLUSION.....	375
	CHAPITRE 6:.....	377

<i>ETUDE DES CINÉTIQUES D'ACCUMULATION ET DE DEPURATION DE POTENTIELS TRACEURS DE POLLUTION ANTHROPIQUES CHEZ <i>GAMMARUS FOSSARUM</i> PAR MICROQUECHERS-NANOLC-MRM³.....</i>	377
INTRODUCTION.....	378
PARTIE A : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE PAR MICROQUECHERS-NANOLC-MRM³	379
1. INTRODUCTION.....	379
2. OPTIMISATION DE LA DETECTION PAR MRM ³	381
3. OPTIMISATION DE LA PRE-CONCENTRATION EN LIGNE	385
3.1. <i>Introduction aux plans d'expériences</i>	385
3.2. <i>Mise en œuvre du plan d'expérience</i>	388
3.3. <i>Interprétation des résultats liés au plan d'expériences</i>	390
4. OPTIMISATION DE LA SEPARATION NANOCHROMATOGRAPHIQUE	395
5. OPTIMISATION DES ETAPES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION	399
6. DETERMINATION DES LIMITES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION METHODOLOGIQUES.....	402
7. VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE	403
7.1. <i>Stratégie analytique</i>	403
7.2. <i>Résultats de la validation</i>	404
8. COMPARAISON DES MODES DE DETECTION MRM ET MRM ³	406
8.1. <i>Spécificité de détection du mode MRM par rapport au mode MRM³</i>	406
8.2. <i>Comparaison de la sensibilité d'analyse des modes MRM et MRM³</i>	408
PARTIE B : APPLICATION A DES ECHANTILLONS REELS : VERS L'EVALUATION DES CINÉTIQUES D'ACCUMULATION ET DE DEPURATION	410
CONCLUSION.....	414
<i>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</i>	416

Liste des figures

Figure 1: Présentation des approches analytiques mises en œuvre dans le cadre de l'étude de la bioaccumulation et de la biotransformation.....	31
Figure 2: Données de consommation des composés pharmaceutiques dans sept pays européens (d'après AFSSAPS, 2011)	37
Figure 3: Répartition des consommations françaises de médicaments par classes thérapeutiques en 2009 (d'après AFSSAPS 2011)	38
Figure 4: Taux d'abattelements de certains composés pharmaceutiques d'intérêt dans les stations d'épuration (d'après Luo et al. 2014).....	49
Figure 5: Fréquence de quantification de certaines substances pharmaceutiques dans 90 effluents de STEP en Europe (Loos, 2013).....	50
Figure 6: Concentrations (ng/L) relevées dans la littérature pour certaines molécules pharmaceutiques d'intérêt mesurées dans des rejets hospitaliers	51
Figure 7: Occurrence de certaines substances pharmaceutiques d'intérêt dans les eaux de surface à travers le monde	54
Figure 8: Schéma simplifié du système endocrinien chez l'homme et principales glandes endocrines.....	64
Figure 9: Représentation du noyau stérane caractéristique des hormones stéroïdienne	66
Figure 10: Concentrations des hormones stéroïdiennes d'intérêt dans les eaux de surface à travers le monde ..	72
Figure 11: Concentrations moyennes de PFOS (en gris) et de PFOA (en noir) dans différentes espèces représentatives de la faune aquatique.....	86
Figure 12: Voie de Synthèse du Bisphénol A.....	88
Figure 13: Effets du BPA à des concentrations environnementales sur la faune aquatique (d'après Flint, 202) ..	97
Figure 14: Schéma de la biodégradation des alkylphénols polyéthoxylés.....	101
Figure 15: Quantités de substances actives (en tonnes) vendues en France de 1998 à 20011 (IUPP, 2012)	115
Figure 16: Processus de dissipation des pesticides dans l'environnement	117
Figure 17: Schéma de la photodégradation et de la biotransformation du diuron.....	120
Figure 18: Dégradation du spinosad en conditions anaérobies dans l'environnement aquatique	121
Figure 19: Concentration totale moyenne en pesticides en 2011 (d'après le rapport 2013 du service de l'observation et des statistiques, SOeS 2013).....	122
Figure 20: Les pesticides les plus quantifiés en France métropolitaine en 2011 (d'après le rapport 2013 du service de l'observation et des statistiques, SOeS 2013) (* molécules interdites, en violet : métabolites, en bleu foncé : molécules dotées de Normes de Qualité Environnementales (NEQ) ; (H) : herbicide ; (F): fongicide).....	123
Figure 21: Répartition géographique de Gammarus fossarum en Europe (Barnard et Barnard, 1983)	134
Figure 22: Vue latérale d'un Gammaridae (d'après Roux, 1970 ; Chevreux et Fage, 1970).....	135
Figure 23: Description des différents stades de développement du chironome: C. riparius (Meigen 1804)(AFNOR, 2010; Durand, 2012; Tachet et al., 2000)	140
Figure 24: Critères de sélection d'une source d'ionisation à pression atmosphérique en fonction des propriétés physico-chimique (polarité et masse molaire) des composés à analyser	147
Figure 25: Source d'ionisation ESI et phénomènes menant à l'ionisation des composés (1 : Nébulisation ; 2 : Désolvatation et évaporation ; 3 : Explosion coulombienne ; 4 : Ionisation)	148
Figure 26: Principe de fonctionnement d'un analyseur triple quadripôle utilisé en monde MRM	151

Figure 27: Historique de la miniaturisation des systèmes d'analyse d'après Manz et al.	153
Figure 28: Schéma du workflow métabolomique.....	171
Figure 29: Analyse en Composantes Principales : (a) scores et (b) loadings plots	181
Figure 30: Prélèvement au troubleau et tamisage des crustacés (Source: Laboratoire d'écotoxicologie, IRSTEA)	187
Figure 31: Système de stabulation des gammarès au laboratoire IRSTEA.....	187
Figure 32: Système d'élevage des chironomes en laboratoire	188
Figure 33: Montage de distillation réel et utilisé dans le cadre de ces travaux	191
Figure 34: Plateformes analytiques utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse (flèches pleines : analyses ciblées ; flèches pointillées : analyses non ciblées).....	192
Figure 35: Principe de fonctionnement du diviseur de flux avec contrôle.....	193
Figure 36: Exemple de configuration de la vanne 10 voies mise en jeu lors l'utilisation du système de pré- concentration en ligne par commutation de colonnes.....	194
Figure 37: Schéma descriptif du rail analytique du spectromètre de masse 5500 QTrap (fourni par le constructeur ABSciex).....	195
Figure 38: Schéma constitutif du MicOTOF-QII®	198
Figure 39: Protocole d'extraction de type Micro-QuEChERS pour l'étude de la bioaccumulation de 35 polluants émergents chez trois invertébrés benthiques.....	203
Figure 40: Gradient d'élution pour le mode d'ionisation positif.....	204
Figure 41: Gradient d'élution pour le mode d'ionisation positif.....	204
Figure 42: Processus de prétraitement des données brutes.....	213
Figure 43: Occupation du sol du bassin versant Brévenne-Turbine.....	216
Figure 44: Principales pressions recensées sur le bassin versant de la Brévenne.....	216
Figure 45: Photographie de la Brévenne au droit de la station d'épuration de l'Arbresle	217
Figure 46: Synoptique de l'approche mise en œuvre pour l'évaluation de l'impact d'un rejet de STEP.....	219
Figure 47: Schéma du laboratoire de terrain	220
Figure 48: Systèmes d'exposition des crustacés ou gastéropodes (A) et des chironomes (B)	221
Figure 49: Cage de terrain.....	222
Figure 50: Vue aérienne du Site Pilote de Bellecombe	223
Figure 51: Site de prélèvement de l'observatoire SIPIBEL	225
Figure 52: Système NanoLC-NanoESI-MS/MS utilisé dans le cadre de ces travaux de thèse	233
Figure 53: Paramètres optimisés de manière automatique par le logiciel.....	234
Figure 54: Schéma de la source NanoESI (NanoSpray II, ABSciex)	238
Figure 55: Acquisitions full scan MS obtenues sans réglage de la position du spray (a) et après réglage optimale (b).....	239
Figure 56: Photographies du spray obtenues en fonction de différents paramètres d'ionisation	240
Figure 57: Impact de la température de la source sur l'ionisation des substances en mode ESI-	241
Figure 58: Impact de la température de la source sur l'ionisation des substances en mode ESI+	242
Figure 59: Impact de la tension appliquée au capillaire de spray sur l'ionisation des substances en mode ESI-	243
Figure 60: Influence de la pression du gaz de nébulisation sur le processus d'ionisation	244
Figure 61: Temps de rétention du premier composé élué en mode positif (a) et en mode négatif (b)	248
Figure 62: Séparation chromatographique obtenue avec le gradient optimal en mode négatif.....	250
Figure 63: Séparation chromatographique obtenue avec le gradient optimal en mode positif	251
Figure 64: Schéma du système de pré-concentration en ligne par commutation de colonne	251

<i>Figure 65: Influence de la composition du solvant de chargement au regard de l'aire des pic chromatographique correspondant aux substances les plus apolaires (en mode positif)</i>	<i>254</i>
<i>Figure 66: Largeur de pic à mis hauteur (minutes) pour quelques substances ciblées en fonction des différentes compositions de solvants de chargement (en mode positif)</i>	<i>254</i>
<i>Figure 67: Influence du temps de chargement chez Chironomus riparius sur la réponse des analytes en mode positif</i>	<i>256</i>
<i>Figure 68: Influence du temps de chargement chez Gammarus fossarum sur la réponse des analytes en mode positif</i>	<i>257</i>
<i>Figure 69: Influence du solvant d'injection sur la réponse des analytes en mode positif chez Potamopyrgus antipodarum</i>	<i>257</i>
<i>Figure 70: Asymétrie des composés détectés en nanoLC-MS/MS en mode ESI- selon la nature de la phase de chargement, tamponnée ou non (chez P. antipodarum)</i>	<i>258</i>
<i>Figure 71: Séparation des hormones stéroïdiennes en fonction du temps de chargement (a) 3,5 minutes et (b) 4 minutes.....</i>	<i>259</i>
<i>Figure 72: Influence de la concentration en sels citrates sur la réponse de certains analytes ciblés</i>	<i>263</i>
<i>Figure 73: Rendements d'extraction obtenus avec différents solvants (ou mélanges de solvant) chez Potamopyrgus antipodarum</i>	<i>265</i>
<i>Figure 74: Rendements d'extraction obtenus avec différents solvants (ou mélanges de solvant) chez Chironomus riparius</i>	<i>266</i>
<i>Figure 75: Rendements d'extraction obtenus avec différents solvants (ou mélanges de solvant) chez Gammarus fossarum.....</i>	<i>267</i>
<i>Figure 76: Rendements d'extraction obtenus avec différents protocole de purification chez Potamopyrgus antipodarum</i>	<i>269</i>
<i>Figure 77: Rendements d'extraction obtenus avec différents protocole de purification chez Chironomus riparius</i>	<i>270</i>
<i>Figure 78: Rendements d'extraction obtenus avec différents protocole de purification chez Gammarus fossarum</i>	<i>271</i>
<i>Figure 79: Comparaison de la réponse de certains composés d'intérêts obtenue avec et sans solvants distillés</i>	<i>273</i>
<i>Figure 80: Données de validation du pantoprozole chez Gammarus fossarum</i>	<i>280</i>
<i>Figure 81: Débits des effluents urbains et hospitaliers (m³/s) pour la période d'exposition</i>	<i>298</i>
<i>Figure 82: Débit de la rivière Arves (m³/s) sur la période d'exposition et contribution du rejet de STEP au débit de la rivière (%o).....</i>	<i>299</i>
<i>Figure 83: Température de la rivière Arves (°C) sur la durée de l'exposition pour chaque site d'encagement ...</i>	<i>299</i>
<i>Figure 84: Débit de la Brévenne et pourcentage de l'effluent de STEP dans la rivière au cours des campagnes d'exposition de 2012</i>	<i>304</i>
<i>Figure 85: Contamination globale de Chironomus riparius en été (a) et en automne (b).....</i>	<i>308</i>
<i>Figure 86: Contamination globale de Gammarus fossarum en été (a) et en automne (b)</i>	<i>309</i>
<i>Figure 87: Contamination globale de Potamopyrgus antipodarum en été (a) et en automne (b).....</i>	<i>310</i>
<i>Figure 88: Comparaison des concentrations mesurées chez Gammarus fossarum en fonction des différentes conditions d'exposition pour chaque campagne d'expérimentation</i>	<i>316</i>
<i>Figure 89: Comparaison des concentrations mesurées chez Potamopyrgus antipodarum en fonction des différentes conditions d'exposition pour chaque campagne d'expérimentation</i>	<i>318</i>
<i>Figure 90: Comparaison des concentrations mesurées chez Chironomus riparius en fonction des différentes conditions d'exposition pour chaque campagne d'expérimentation</i>	<i>321</i>

Figure 91: Totale Ion chromatogramme (TIC) de 3 échantillons de chironomes témoins.....	331
Figure 92: Cartographie des signaux détectés (m/z ; tr) en fonction de la composition du solvant de chargement chez <i>Gammarus fossarum</i>	333
Figure 93: Impact de la durée de chargement sur le nombre de composés détectés chez <i>Potamopyrgus antipodarum</i> (mode d'ionisation ESI-)	334
Figure 94: Analyse en composante principale : impact de la congélation et du traitement de l'échantillon (rond : échantillons frais ; croix : échantillons décongelés)	336
Figure 95: Etude des trois matrices investiguées : nombre de signaux détectés en fonction du temps de rétention	338
Figure 96: Etude des trois matrices investiguées : nombre de signaux détectés en fonction du temps de rétention	339
Figure 97: Représentation des échantillons témoins de crustacé (triangles rouges), de larve d'insecte (croix vertes) et de mollusque (ronds bleus) sur le score-plot (à gauche) et le loading-plot (à droite) issus de l'analyse en composantes principales	339
Figure 98: Evolution du nombre de signaux avec la tolérance sur le temps de rétention (a) et avec la tolérance sur la masse (b) lors de la formation de buckets.....	342
Figure 99: Loading plots issus de l'Analyse en Composantes Principales sans scaling (a), avec un scaling de type Pareto (b) et avec un scaling de type UV (c).....	347
Figure 100: Analyses en Composantes Principales (à gauche scores plot ; à droite loadings plot).....	347
Figure 101: Analyse en Composantes Principales pour l'espèce <i>Chironomus riparius</i> lors de la campagne d'exposition automnale (à gauche scores plot ; à droite loadings plot)	348
Figure 102: Etude des profils d'intensité (T = organismes témoins ; E = organismes exposés)	350
Figure 103: Exemple de sélection d'un biomarqueur putatif de première catégorie	353
Figure 104: Répartition des signaux discriminants chez <i>Chironomus riparius</i> lors de la campagne d'exposition automnale (in situ) en fonction de la gamme de masse et de la catégorie à laquelle ils appartiennent ((a) en mode d'ionisation négatif ; (b) en mode d'ionisation positif)	355
Figure 105: Répartition des signaux discriminants chez <i>Chironomus riparius</i> lors de la campagne d'exposition automnale (ex situ) en fonction de la gamme de masse et de la catégorie à laquelle ils appartiennent ((a) en mode d'ionisation négatif ; (b) en mode d'ionisation positif)	356
Figure 106: Cartographie des variables discriminantes (m/z ; tr) détectées en mode d'ionisation négatif chez les organismes exposés en automne selon les approches d'exposition ex- et in situ	356
Figure 107: Profil isotopique expérimental de l'ion à 386,1376 Da (a) et profil isotopique théorique (b) de la molécule $C_{19}H_{21}ClN_5O_2$ correspondant à l'adduit [M-H] du 4-hydroxytrazodone	360
Figure 108: Evolution de la résolution spectrale en fonction de la valeur m/z	361
Figure 109: Massifs isotopiques de l'adduit [M-H] correspondant à $m/z= 162,0555$ Da avec la méthode de masse initiale (50-1000 Da) (a) et après modification des paramètres de transferts (b)	362
Figure 110: Spectre de fragmentation de l'acide 13-Hydroxyoctadecadiénoïque tiré de la base de données spectrale MassBank	363
Figure 111: Spectre de fragmentation de la variable discriminantes correspondant au couple $m/z=295,2293$ Da ; $tr= 51,4$ min (ESI- ; énergie de collision : 25 eV) obtenu sur la plateforme NanoLC-QqToF et annotation des fragments par le logiciel de fragmentation in silico MetFrag	364
Figure 112: Spectre de MS/MS de l'ion 162,0558 Da (énergie de collision : 25 eV)	365
Figure 113: Fragmentation in silico du 3-Methyldioxyindole réalisée à l'aide du logiciel MetFrag	365
Figure 114: Fragmentation in silico le 4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone réalisée à partir du logiciel MetFrag....	366

Figure 115: Métabolisme de la nicotine par le cytochrome P450 (source KEEG).....	366
Figure 116: Annotation des ions produits obtenus par fragmentation de la variable discriminante correspondant au propranolol.....	372
Figure 117: Spectre de fragmentation (Energie de collision = 25 eV) de la variable discriminante ($m/z = 221,1170$ Da ; $t_r = 35,9$ min) annoté comme étant l'un des isomères de l'hydroxyibuprofène.....	373
Figure 118: Fragmentation in silico de l'AINS ibuprofène mettant en évidence la structure du fragment 161,0971 Da.....	374
Figure 119: Principe de fonctionnement de la MRM ³ , réalisé sur un appareil de type QTrap	380
Figure 120: Influence de l'énergie d'excitation sur la fragmentation en MRM ³ (Exemple de la transition 189,4/109,4/79,0 (m/z) de la testostérone).....	382
Figure 121: Spectres de fragmentation MS/MS/MS obtenus à partir des ions 237,3/194,1 de la carbamazépine (A), 286,7/269,1 de l'oxazépan (B) et 189,4/109,1 de la testostérone (C) dans les conditions optimales. Les fragments cerclés en vert sont ceux retenus pour la quantification en MRM ³	383
Figure 122: Aire du pic correspondant à l'oxazépan pour un extrait de <i>Gammarus fossarum</i> dopé à 30 ng/g en fonction du temps de piégeage dans la trappe (FT).....	384
Figure 123: Diagramme simplifié des paramètres propres à un système selon le vocabulaire des plans d'expériences.....	386
Figure 124: Diagramme des effets selon Pareto obtenus à partir de la matrice d'Hadamard. A = carbamazépine ; B = oxazépan ; C = testostérone	390
Figure 125: Etude graphique de tous les effets associés aux quatre facteurs sur l'aire des analytes. A = carbamazépine ; B = oxazépan ; C = testostérone. Un effet contenu dans la zone délimitée par des pointillés n'est pas considéré comme significatif sur la réponse ($p < 0,05$).....	391
Figure 126: Etude graphique de l'interaction entre la composition en MeOH du solvant de reprise et la composition en solvant de la phase mobile de chargement (A = carbamazépine ; B = testostérone)	392
Figure 127: Etude graphique de l'interaction entre temps de chargement et débit de chargement (A = carbamazépine ; B = oxazépan)	393
Figure 128: Etude graphique des résidus (A : droite de Henry et B : distribution des résidus en fonction de la valeur calculé de la réponse).....	393
Figure 129: Surfaces de réponses et courbes d'isoréponses des analytes représentées en 3D (A, B, C) et en 2D (D, E, F) à composition en MeOH dans l'échantillon (10%) et dans la phase mobile de chargement (2%) fixés. A et D = carbamazépine ; B et E = oxazépan ; C et F = testostérone	394
Figure 130: Effet de la distribution de la taille moyenne des particules sur l'homogénéité de remplissage et l'élargissement de bande au regard de la diffusion d'Eddy	397
Figure 131: Chromatogramme A : séparation des composés sur la colonne C18 Acclaim Pep Map Chromatogramme B : séparation des composés sur la colonne C18 Accucore de Thermo Fisher® (Cbz = carbamazépine, Oxa = oxazépan, T = testostérone)	398
Figure 132: Rendements d'extractions moyens des composés ciblés (50 ng/g) après extraction et purification utilisant 3 types de phases dSPE différentes ($n = 3$)	400
Figure 133: Rendements d'extractions moyens des composés ciblés (50 ng/g) après extraction et purification utilisant la phase PSA/C18 à 3 masses différentes ($n = 3$).....	401
Figure 134: Illustration du gain en spécificité apporté par la MRM ³ , comparativement à celle observée en MRM (chromatogrammes reconstruits pour l'analyse MRM ³ (a) et MRM (b) d'un extrait de <i>Gammare</i> dopé à 20 ng/g (poids frais) de testostérone)	407

<i>Figure 135: Droites de calibration de la carbamazépine, de l'oxazépam et de la testostérone obtenue par MRM à partir de crustacés blancs, dopés puis extraits.....</i>	<i>409</i>
<i>Figure 136: Droites de calibration de la carbamazépine, de l'oxazépam et de la testostérone obtenue par MRM³ à partir de crustacés blancs, dopés puis extraits.....</i>	<i>409</i>
<i>Figure 137: Bioconcentration individuelle de la carbamazépine et de l'oxazépam chez Gammarus fossarum exposé pendant 14 jours à une concentration de 200 ng/L de contaminants recherchés. Les points D24h et D48h correspondent aux points de dépuratation</i>	<i>411</i>
<i>Figure 138: Modélisation des cinétiques d'accumulation de la carbamazépine et de l'oxazépam chez Gammarus fossarum.....</i>	<i>413</i>

Listes des tables

Table 1: Structures et caractéristiques physico-chimiques substances pharmaceutiques d'intérêt	40
Table 2: Concentrations de substances pharmaceutiques dans les influents et effluents de stations d'épuration équipées de traitements conventionnels dans différents pays (d'après Luo, 2014).....	48
Table 3: Concentrations médianes et maximales de certaines substances pharmaceutiques dans 90 effluents de STEP en Europe (Loos, 2013)	50
Table 4: Concentrations (ng/g) de certaines substances pharmaceutiques d'intérêt dans les sédiments à travers le monde.....	55
Table 5: Structure et caractéristiques physico-chimiques des hormones d'intérêt	67
Table 6: Abattement des hormones stéroïdiennes dans des STEP à travers le monde	69
Table 7: Occurrence des hormones stéroïdiennes dans des influents et effluents de STEP.....	70
Table 8: Noms et nomenclatures des principaux PFCA	77
Table 9: Noms et nomenclatures des principaux PFSA.....	77
Table 10: Noms et nomenclatures des principaux PFI.....	78
Table 11: Structure et caractéristiques physico-chimiques du PFOA et du PFOS	81
Table 12: Teneurs en PFOA et PFOS dans les effluents de STEP à travers le monde	83
Table 13: Usages du BPA à l'échelle européenne (d'après rapport UE, 2003)	89
Table 14: Propriétés physico-chimiques du BPA (d'après rapport UE, 2003).....	90
Table 15: Présence du BPA dans les influents et effluents de STEP à travers le monde	92
Table 16: Données d'occurrence du BPA dans les eaux de surface et dans les sédiments à travers le monde	94
Table 17: Récapitulatif des différentes applications des alkylphénols	99
Table 18: Propriétés physico-chimiques et structure des alyphénols sélectionnés pour l'étude	99
Table 19: Taux d'abattement des alkylphénols lors de procédés de traitement conventionnels à travers le monde	102
Table 20: Données de présence des alkylphénols dans les eaux de surface à travers le monde.....	105
Table 21: Données de contamination des sédiments par les alkylphénols à travers le monde.....	105
Table 22: Structure et caractéristiques physico-chimique de la 4MBC	109
Table 23: Concentration de 4MBC dans les phases dissoutes et sédimentaires des systèmes aquatiques à travers le monde.....	111
Table 24: Concentrations de la 4MBC dans diverses matrices biotiques à travers le monde	112
Table 25: Structure et propriétés physico-chimiques des pesticides d'intérêt.....	116
Table 26: Avantages et limitation des approches passive et actives de biomonitoring (d'après Besse et al 2012)	131
Table 27: Systématique de <i>G. fossarum</i> (Martin et Davis, 2001).....	133
Table 28: Systématique de <i>P. antiporum</i> (Pnder et Lindberg, 1997 ; Gust, 2010).....	136
Table 29: Systématique de <i>Chironomus riparius</i>	139
Table 30: Synthèse des principaux avantages et limites d'utilisation des modèles biologiques choisies-références bibliographique et normes présentant l'utilisation de ces modèles en écotoxicologie	142
Table 31: Exemples de méthodes d'extraction de polluants émergents dans des matrices biotiques.....	143
Table 32:	144

Table 33: Comparaison des différents systèmes de détection utilisés en couplage avec la chromatographie liquide pour la détection des composés retenus pour cette étude.....	145
Table 34: Comparaison des différentes configurations d'injection les plus couramment rencontrées en NanoLC	160
Table 35: Détermination des degrés de libertés des variances permettant de calculer le Fisher expérimental selon un modèle de régression linéaire ou quadratique	169
Table 36: Les méthodes statistiques les plus utilisées en métabolomiques (en rouge, les méthodes utilisées durant ces travaux de thèse).....	180
Table 37: Conditions optimales de pré-concentration en ligne pour chaque espèce sentinelle et chaque mode d'ionisation.....	203
Table 38: Paramètres de détection des composés d'intérêts en nanoESI (ESI+ et ESI-) : transition MRM (Ion parent > Ion fils), rapport des transitions (T1/T2), et tensions associées aux transitions (DP, CE, CXP)	206
Table 39: Paramètres d'ionisation NanoESI en mode positif et négatif.....	206
Table 40: Gradient d'élution utilisée lors de la séparation des composés (A = H ₂ O + 0,05% acide acétique, B = MeOH + 0,05% acide acétique).....	209
Table 41: Paramètres MRM3 : transitions, ions précurseurs, ions produits issus des deux fragmentations, declustering potential (DP), énergie potentielle (EP), énergie de collision (CE), énergie d'excitation (AF2)	209
Table 42: Gradient d'élution pour l'approche métabolomique	211
Table 43: Paramètres de transfert utilisés pour la méthode NanoLC-HRMS en mode d'ionisation positif et négatif pour une gamme de masse comprise entre 50 et 1000 Da.....	212
Table 44: Paramètres de transfert utilisés pour la méthode NanoLC-HRMS en mode d'ionisation positif et négatif pour une gamme de masse comprise entre 50 et 500 Da.....	212
Table 45: Paramètres de prétraitement des données brutes, identification des pics spectraux et chromatographiques.....	214
Table 46: Paramètres d'ionisation fixés par le constructeur pour l'étape d'optimisation des paramètres de détection en mode automatique.....	233
Table 47: Paramètres de détection des composés d'intérêt (transitions MRM, rapport des transitions (ratio T1/T2) et tensions associés aux transitions (DP, CE et CXP).....	236
Table 48: Paramètres d'ionisation conseillés par le constructeur	240
Table 49: Conditions d'ionisation optimum pour chacun des modes d'ionisation	244
Table 50: Descriptif des colonnes de nanochromatographie greffées C18 disponible chez ThermoFisher®	245
Table 51: Phases mobile utilisées pour la séparation chromatographique en ESI+ et en ESI-	247
Table 52: Paramètres optimaux de pré-concentration en ligne pour chaque espèce sentinelle.....	259
Table 53: Concentration de dopage de chacune des matrices investiguées utilisées lors du développement et de l'optimisation de l'étape de préparation d'échantillon	262
Table 54: Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) obtenues avec la méthode micro-QuEChERS-NanoLC-NanoESI-MS/MS pour les 3 invertébrés benthiques retenus pour cette étude.....	276
Table 55: Données de validation du pantoprazole chez <i>Gammarus fossarum</i>	280
Table 56: Précisions intra et inter-jour obtenues lors du protocole de validation pour <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	282
Table 57: Précisions intra et inter-jour obtenues lors du protocole de validation pour <i>Gammarus fossarum</i>	282
Table 58: Précisions intra et inter-jour obtenues lors du protocole de validation pour <i>Chironomus riparius</i>	283
Table 59: Rendements d'extraction obtenus lors du protocole de validation pour chacune des espèces investiguées.....	285

<i>Table 60: Evaluation des effets de matrices sur 3 niveaux de concentration pour chaque invertébré benthique</i>	286
<i>Table 61: Paramètres physico-chimiques associés à chacune des sites d'études sur la durée de l'exposition ...</i>	293
<i>Table 62: Contamination chimique des échantillons d'eau collectés chaque semaine sur la période d'exposition pour les 4 sites étudiés (moyenne ± écart type).....</i>	294
<i>Table 63: Contamination des mollusques engagés après 42 jours d'exposition</i>	294
<i>Table 64: Caractéristiques physico-chimiques de l'Arves sur la période d'exposition.....</i>	299
<i>Table 65: Contamination des matrices aqueuse (effluents et rivière) sur la période d'exposition des gastéropodes</i>	300
<i>Table 66: Contamination des mollusques engagés après 42 jours d'exposition pour chaque site investigué.....</i>	300
<i>Table 67: Paramètres physico-chimique de la Brévenne et de l'effluent de STEP pour chaque campagne d'exposition (été et automne).....</i>	305
<i>Table 68: Condition d'exposition ex situ pour chaque espèce sentinelle et chaque milieu d'exposition.....</i>	305
<i>Table 69: Concentration des polluants ciblés dans l'eau de rivière et dans les effluents de STEP mesurées lors de la campagne d'été.....</i>	306
<i>Table 70: Concentration des polluants ciblés dans l'eau de rivière et dans les effluents de STEP mesurées lors de la campagne d'automne</i>	306
<i>Table 71: Comparaison des matrices, eau, effluent et biote pour la détection et la quantification de molécules organiques à l'état de traces.....</i>	324
<i>Table 72: Comparaison des capacités de bioaccumulation des organismes sentinelles.....</i>	325
<i>Table 73: Répétabilité des temps de rétention pour 6 signaux choisis au hasard sur la durée de l'analyse</i>	331
<i>Table 74: Efficacité de la calibration interne.....</i>	341
<i>Table 75: Evaluation des caractéristiques chromatographiques sur 5 signaux représentatifs</i>	343
<i>Table 76: Evaluation de deux stratégies de corrections de la valeur de p dans le cas de comparaison multiples</i>	351
<i>Table 77: Nombre de signaux discriminants (m/z ; tr) détectés chez Gammarus fossarum en fonction de chacune des approches d'exposition et chacune des campagnes d'expérimentation</i>	357
<i>Table 78: Nombre de variables discriminantes, de potentiels biomarqueurs issus de l'interrogation de la base de données HMDB et nombre de variables discriminantes concernées par cette annotation pour chaque campagne et chaque approche d'exposition, en mode d'ionisation positif et négatif.....</i>	368
<i>Table 79: Annotations putatives des variables discriminantes</i>	370
<i>Table 80: Paramètres MRM³: transitions, ions précurseurs, ions produits issus des deux fragmentations, declustering potential (DP), énergie potentielle (EP), énergie de collision (CE), énergie d'excitation (AF2)</i>	382
<i>Table 81: Bornes du domaine expérimental pour chaque facteur d'entrée retenu pour la conception du plan d'expérience</i>	388
<i>Table 82: Plan d'expérience et matrices associées pour l'optimisation de l'étape de pré-concentration en ligne</i>	389
<i>Table 83: Paramètres optimaux pour la pré-concentration en ligne déterminés grâce à la méthodologie des plans d'expériences</i>	394
<i>Table 84: Gradient d'élution utilisée lors de la séparation des composés ciblés.....</i>	396
<i>Table 85: Temps de rétention, largeurs à la base des pics et résolution sur les deux colonnes nanochromatographiques testées</i>	398
<i>Table 86: Performances analytiques de la méthode MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³ (LOD et LOQ méthodologiques)</i>	402

<i>Table 87: Paramètres permettant de valider le modèle de régression linéaire choisi pour cette étude</i>	<i>405</i>
<i>Table 88: Précisions intra- et inter-jours déterminées sur trois niveaux de concentration dans le cadre de la validation de la méthode MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³ chez Gammarus fossarum</i>	<i>405</i>
<i>Table 89: Rendements d'extraction et effets de matrice obtenus pour la méthode MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³</i>	<i>405</i>
<i>Table 90: Limites de détection et de quantification obtenues en mode MRM</i>	<i>408</i>
<i>Table 91: Concentrations et facteurs de bioconcentration obtenus après une exposition de 14 jours à 200 ng/L des composés ciblés chez Gammarus fossarum</i>	<i>412</i>
<i>Table 92: Coefficients de variation (CV %) des concentrations interne en carbamazépine et oxazépam mesurées sur 14 jours d'exposition et 2 jours de dépuración chez Gammarus fossarum</i>	<i>414</i>

Liste des équations

Équation 1: Equation reliant le rapport m/z au temps de vol d'un ion	149
Équation 2: Phénomène de dilution chromatographique (D).....	155
Équation 3: Gain de sensibilité (f) résultants de l'utilisation d'une colonne de faible diamètre interne	155
Équation 4: Débit optimal (D_{opt})	156
Équation 5: Equation d'Aris-Taylor.....	156
Équation 6: Volume maximal injectable (V_{max}) sur une colonne LC.....	158
Équation 7 : Evaluation des effets de matrice (EM)	165
Équation 8: Evaluation des effets de matrice dans le cas d'une matrice non-blanche	166
Équation 9: Détermination de la LOD et de la LOQ basée sur la dispersion des paramètres de régression linéaire	166
Équation 10: Evaluation de la LOD et de la LOQ basé sur l'évaluation de la dispersion de l'amplitude du bruit	167
Équation 11: Evaluation de la LOD et de la LOQ dans le cas d'une matrice non-blanche.....	167
Équation 12: Calcul de la valeur de Fisher de régression associée aux données de calibration ($F_{expérimental}$).....	168
Équation 13: Calcul de la variance relative à l'erreur analytique ou à l'erreur due au modèle de régression dans le cas du test de Fisher	168
Équation 14: Calcul des sommes des carrés des écarts associées à l'erreur due au modèle de régression (SS_{lof}) et à l'erreur analytique ($SS\epsilon$)	168
Équation 15: Calcul de la variance associée à la dispersion des échantillons par rapport à la moyenne	177
Équation 16: Calcul du rapport F dans le cas de l'ANOVA.....	182

Introduction
générale

Introduction générale

La santé et le bien-être des populations humaines sont liés à des équilibres toujours délicats à assurer, entre le développement des technologies et la qualité du fonctionnement des systèmes naturels. Si l'accès aux soins et le développement de technologies de pointes sont aujourd'hui indispensables à notre qualité de vie, ils conduisent néanmoins à de nombreuses préoccupations environnementales. La présence, l'impact et le devenir des polluants qualifiés d'émergents, puisque non-réglés à ce jour, dans l'environnement sont des sujets d'intérêt grandissant. Il est aujourd'hui avéré que les effluents de stations d'épuration (STEP) contribuent à la contamination des milieux récepteurs. Les systèmes de traitement des rejets urbains, s'ils sont efficaces pour assurer l'abattement de macro-polluants réglementés depuis longtemps, ne le sont plus totalement face à la diversité des substances à traiter. Ainsi, certains composés sont présents dans l'environnement à des concentrations suffisamment élevées pour perturber l'équilibre naturel des écosystèmes aquatiques. Aujourd'hui, malgré l'existence de procédure d'évaluation du risque environnemental, cette micropollution permanente semble s'imposer comme un phénomène de long terme qui nécessite de développer des connaissances quant à son impact sur les organismes, sur le fonctionnement et la qualité des milieux récepteurs.

Les écosystèmes aquatiques sont une ressource précieuse et constituent donc logiquement l'une des cibles essentielles des politiques nationales et européennes de protection et de gestion des ressources en eau. L'adoption et la mise en place en Europe de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) se sont traduites à l'échelle de chaque bassin hydrographique par la mise en œuvre d'objectifs de retour au bon état écologique et chimique des masses d'eau à l'horizon 2015. L'évaluation du bon état chimique de ces masses d'eau repose sur le suivi et la réduction de substances dites prioritaires, voire dangereuses prioritaires pour certaines. Les émissions de ces substances doivent être réduites de 50% à l'horizon 2015 et doivent être totalement éliminées d'ici à 2020 ou 2028 pour les contaminants récemment ajoutés à la liste des substances prioritaires. Ces travaux de thèse visent à répondre à des besoins méthodologiques soulignés par la DCE, ainsi que par ces directives filles qui imposent désormais des normes de qualité environnementale pour le biote pour quelques substances prioritaires afin d'assurer pour ces micropolluants la protection des milieux vis-à-vis d'un risque de bioaccumulation au sein des réseaux trophiques. A l'exception du domaine marin où la mesure de la contamination chimique dans le biote est aujourd'hui largement utilisée pour le suivi d'une sélection de métaux et de polluants organiques hydrophobes à l'aide de populations naturelles de bivalves reconnus pour leur capacité de bioaccumulation (huitres, moules...), aucune méthodologie, fondée sur des connaissances quant aux capacités de bioaccumulation d'organismes sentinelles n'est disponible en milieu d'eau douce. Ces lacunes s'expliquent notamment par l'absence de méthodologies analytiques adaptées aux matrices environnementales biotiques de très petite taille telles que les invertébrés benthiques, à la base des chaînes trophiques et du fonctionnement des écosystèmes.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans une démarche pluridisciplinaire qui réunit les compétences complémentaires de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) et de l'Institut national de Recherche en

Introduction générale

Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA). Ils ont également bénéficié du support financier et technique du Groupe de Recherche Rhône-Alpes sur les Infrastructures et l'Eau (GRAIE) et du Centre National de Recherche Scientifique (CNRS). Ces travaux ont pour objectifs :

- (i) Le développement d'outils analytiques innovants basés sur la nanochromatographie couplée à la spectrométrie de masse permettant l'étude, à l'échelle d'un individu, de la bioaccumulation et de la biotransformation de contaminants organiques chez des invertébrés aquatiques d'eau douce
- (ii) L'étude, grâce à ces outils, du devenir de polluants émergents au sein des premiers maillons des chaînes trophiques

Les données obtenues contribueront à évaluer l'impact des effluents de station d'épuration en termes de contaminants biodisponibles et de contamination de différentes espèces représentatives des milieux aquatiques d'eau douce.

Afin de répondre aux objectifs précédemment définis, trois espèces de macro invertébrés benthiques représentant au mieux la diversité faunique européenne ont été sélectionnées pour pertinence biologique et écologique, ainsi que pour leur appartenance à différents phylla : *Chironomus riparius* (insecte chironomidé), *Potamopyrgus antipodarum* (mollusque gastropode) et *Gammarus fossarum* (crustacé amphipode) ont été retenus pour ces travaux.

La stratégie analytique mise en œuvre dans le cadre de ce projet et visant à répondre aux objectifs de celui-ci peut être scindée en deux parties selon l'approche utilisée : approche de type ciblé et approche métabolomique (non-ciblée) (Figure 1).



Figure 1: Présentation des approches analytiques mises en œuvre dans le cadre de l'étude de la bioaccumulation et de la biotransformation

La première étape relative à l'approche de type ciblée, nécessaire à l'étude de la bioaccumulation, a tout d'abord nécessité une sélection des composés d'intérêt parmi des listes de polluants environnementaux avérés ou émergents. Les substances retenues pour cette étude ont été sélectionnées à partir des listes de molécules à effet potentiel ou avéré, de forte persistance dans l'environnement ou à tonnage industriel élevé établies par la DCE. Certaines substances ont également été retenues suite aux résultats des campagnes nationales de mesures des contaminants émergents dans les milieux aquatiques financées par l'ONEMA et co-pilotées dans le cadre de la campagne exceptionnelle AQUAREF. La sélection des composés pharmaceutiques d'intérêt a été basée sur les travaux de Besse et Garric (ref) ayant mis en place une méthodologie de priorisation de polluants d'origine pharmaceutique dans l'environnement, ainsi que sur les travaux de Jean et al (ref) relatifs à l'identification et à la priorisation de substances pharmaceutiques potentiellement

Introduction générale

bioaccumulables caractéristiques de rejets hospitaliers. Ainsi, 35 polluants émergents ont été sélectionnés sur la base des travaux précédemment mentionnés, auxquels certains critères méthodologiques et pratiques tels que la disponibilité de standard analytiques et la faisabilité d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) ont été ajoutés. Parmi ceux-ci, on dénombre :

- 19 substances d'origine pharmaceutiques (médicaments et métabolites) : aténolol, amitriptyline, bézafibrate, carbamazépine, cyclophosphamide, desloratadine, diclofénac, econazole, ibuprofène, kétoprofène, lidocaïne, nicardipine, oxazépan, pantoprazole, prednisolone, ritonavir, roxithromycine, tamoxifène, 4-hydroxytamoxifène
- 8 hormones stéroïdiennes (synthétiques ou naturelles) : Œstrone, 17 α -œstradiol, 17 β -œstradiol, 17 α -éthynylœstradiol, lévonorgestrel, mifépristone, noréthindrone, testostérone
- 5 agents industriels : bisphénol A, acide perfluoroactanoïque, perfluorooctane sulfonate, ter-octylphénol, 4-ter-nonylphénol
- 2 pesticides : diuron et spinosad
- 1 filtre UV : 4-methylbenzylidène camphre

La première partie de ce manuscrit présente un état de l'art des connaissances organisé autour des différentes classes de polluants retenus pour cette étude : la nature des composés, l'étude des sources, de l'occurrence et du devenir de ceux-ci au sein systèmes aquatiques seront ainsi détaillés afin de dégager les enjeux majeurs pour chaque famille de composés et d'inscrire ces travaux dans des éléments de contexte pertinents. Nous nous intéresserons également aux stratégies dédiées à la surveillance des milieux aquatiques et plus particulièrement aux techniques de biomonitoring. Ce chapitre sera ainsi l'occasion d'introduire les espèces sentinelles choisies pour cette étude, ainsi que les méthodes d'extraction et d'analyse des composés d'intérêt couramment employées pour les matrices biotiques. Nous profiterons également de ce chapitre pour rappeler la théorie relative à la technique séparative mise en jeu dans le cadre de ce projet : la nanochromatographie liquide (NanoLC). L'analyse compréhensive (non ciblée) de matrice complexe, consacrée dans la littérature sous le nom de métabolomique sera finalement introduite. Nous détaillerons les stratégies couramment employées pour ce type d'approche en précisant les plateformes analytiques adaptées, ainsi que les stratégies de traitement des données.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, les méthodologies analytiques développées et employées pour l'étude de la bioaccumulation et de la biotransformation de contaminants émergents chez les trois invertébrés benthiques retenus pour cette étude seront exposées. Une présentation des sites d'études et des protocoles de stabulation et d'exposition des organismes sentinelles sera également détaillée.

La troisième partie de ce manuscrit se focalisera sur l'analyse de type ciblée des matrices d'intérêt. Nous présenterons le développement et la validation des méthodes d'analyses par extraction miniaturisé de type QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) et nanochromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem (NanoLC-MS/MS) utilisées

Introduction générale

pour évaluer la bioaccumulation des polluants précédemment cités chez chacun des invertébrés retenus pour cette étude.

La quatrième partie de ce manuscrit sera consacré à la synthèse des résultats obtenus dans le cadre de l'analyse d'échantillons réels correspondant aux organismes sentinelles exposés aux effluents de station d'épuration selon différents protocoles d'exposition et divers sites d'étude. Les capacités de bioaccumulation des différentes espèces étudiées en fonction de pressions anthropiques variables et de la présence de facteurs confondant seront ainsi discutées.

Dans la cinquième partie de ce document, nous nous intéresserons à l'analyse globale (non-ciblée) des matrices d'intérêt. Nous présenterons les développements relatifs aux approches métabolomiques mises en œuvre dans le cadre de ces travaux en insistant plus particulièrement sur la mise en place du couplage nanochromatographie liquide – spectrométrie de masse haute résolution (NanoLC-HRMS), le traitement statistique des données de type métabolomiques et la stratégie d'identification de potentiels biomarqueurs.

La sixième et dernière partie de ce mémoire se concentrera sur la mise en place d'outils analytiques permettant l'étude des cinétiques d'accumulation de trois potentiels traceurs de pollution anthropiques (carbamazépine, oxazépam et testostérone) chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*. Nous nous intéresserons notamment à la mise en œuvre d'une quantification par MRM³ (Multiple Reaction Monitoring Cubed), mode de détection inhérent à l'utilisation d'un spectromètre de masse hybride de type quadripôle-trappe ionique (Q-Trap) et qui n'avait jusqu'alors jamais été utilisé pour la quantification de petites molécules (<300 Da).

Chapitre 1:

Etat de l'art

Partie A : Propriétés et anthropisation des composés d'intérêts

1. Les composés pharmaceutiques

1.1. Généralités et propriétés physicochimiques

1.1.1. Définition et classification des composés pharmaceutiques

Dans le langage courant, les substances pharmaceutiques sont souvent désignées par le terme « médicament ». En France, la notion de médicament est précisément définie par l'article L5111-1 du Code de la santé publique : « On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique. Sont notamment considérés comme des médicaments les produits diététiques qui renferment dans leur composition des substances chimiques ou biologiques ne constituant pas elles-mêmes des aliments, mais dont la présence confère à ces produits, soit des propriétés spéciales recherchées en thérapeutique diététique, soit des propriétés de repas d'épreuve. Les produits utilisés pour la désinfection des locaux et pour la prothèse dentaire ne sont pas considérés comme des médicaments. Lorsque, en égard à l'ensemble de ses caractéristiques, un produit est susceptible de répondre à la fois à la définition du médicament prévu au premier alinéa et à celle d'autres catégories de produits régies par le droit communautaire ou national, il est, en cas de doute, considéré comme un médicament ». La directive 2001/83/CE du parlement européen et du conseil du 6 novembre 2001 reprend également cette définition et institue un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain concernant la fabrication, l'importation, la mise sur le marché, la pharmacovigilance, la publicité et la distribution de médicament en Europe. Elle exclut cependant les médicaments à usage vétérinaire qui sont régis par la directive 2001/82/CE.

Le dictionnaire Vidal 2010 répertorie 5000 médicaments. L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) recense 3000 molécules pharmaceutiques à usage humain et 300 à usage vétérinaire, offrant ainsi une vue panoramique sur la diversité et le très grand nombre de molécules pharmaceutiques disponibles sur le marché.

Les composés pharmaceutiques peuvent être classés selon différents critères : leur mode d'action, leur indication thérapeutique ou leur structure et famille chimique. Le système de classement le plus approprié est celui de l'ATC (Anatomique, Thérapeutique, Chimique) établi en 1976 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et inspiré de la classification anatomique développée par l'European Pharmaceutical Market Research Association (EphMRA) et le Pharmaceutical Business Intelligence and Research Group (PBIRG) (OMS, 2003). Les substances pharmaceutiques sont classées en fonction des organes ou des systèmes sur lesquels elles agissent et selon leurs propriétés thérapeutiques, pharmacologiques et chimiques. Cette classification fait appel à 5 niveaux. Le

Chapitre 1 : Etat de l'art

premier se réfère à l'organe ou le système sur lesquels elles agissent et comprend 14 principaux groupes présentés en Annexe 1, il est couramment noté « niveau anatomique ». Les deuxième, troisième, quatrième et cinquième niveaux sont respectivement notés « niveau thérapeutique », « niveau thérapeutique, pharmacocinétiques », « niveau chimique, thérapeutique, pharmacologique » et « substance chimique ». Il existe également un classement ATC pour les médicaments à usage vétérinaire. Ce classement est basé sur celui de la médecine humaine mais toute la nomenclature est précédée de la lettre Q.

Si ce classement a l'avantage d'être exhaustif et permet ainsi d'établir une comparaison entre les différents pays européens, il a cependant l'inconvénient d'être très lourd et très complexe. Dans un souci de simplification, les molécules pharmaceutiques seront donc présentées en fonction des différentes classes thérapeutiques auxquelles elles appartiennent. Une liste non exhaustive des principales classes médicamenteuses sera énoncée en Annexe 2. Elle comprendra principalement les classes médicamenteuses spécifiques des médicaments choisis pour cette étude.

1.1.2. Consommation de composés pharmaceutiques

Le marché mondial du médicament est évalué à environ 855 milliards de dollars de chiffre d'affaire en 2011 contre moins de 200 milliards de dollars en 1990 (LEEM, 2012). Cette spectaculaire évolution témoigne de la large consommation de substances pharmaceutiques à travers le monde.

La comparaison des données de consommation entre les différents pays s'avère toutefois difficile en raison des différences de démographie ou de conditionnement des médicaments. A ces deux aspects, s'ajoutent également les différences de protections sociales dont bénéficient les habitants de chaque pays. Afin de pallier à ces difficultés, l'AFSSAPS met en avant différents indicateurs permettant d'exprimer la consommation de médicaments pour chaque pays (AFSSAPS, 2011). Parmi ces indicateurs, on retiendra la Dose Définie Journalière (DDJ) et l'unité standard. L'unité standard est un indicateur relatif à la prise de médicament. Elle ne prend toutefois pas en compte le dosage des substances actives présentes dans le médicament. Recommandée par l'OMS, la DDJ est l'unité de mesure la plus fréquemment utilisée. Son calcul repose sur la détermination préalable d'une dose quotidienne de référence pour un adulte de 70 kg. Elle permet de comparer différents systèmes de soin au niveau international en s'affranchissant notamment de la présentation du médicament puisqu'elle prend en compte le dosage du principe actif et le conditionnement de celui-ci. Afin de considérer le facteur démographique, les résultats de la DDJ sont fréquemment exprimés pour 1000 habitants et par jour (DDJ/1000 habitants/jour).

D'après une étude publiée par la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (CNAMTS), la France apparaît comme le second pays le plus consommateur de médicaments à usage humain après le Royaume-Uni (Figure 2). Cette étude visait à comparer la consommation de médicament de 7 pays européens mais se limitait toutefois aux 8 principales classes de médicaments (antidiabétiques, antibiotiques, antiasthmatiques, hypolipémiants, antidépresseurs, inhibiteurs de la pompe à proton, tranquillisants et médicaments contre l'hypertension artérielle). La figure 1 nous

Chapitre 1 : Etat de l'art

permet de noter la relative stabilité de la consommation française de médicaments avec une augmentation de seulement 0,5% entre 2006 et 2009.

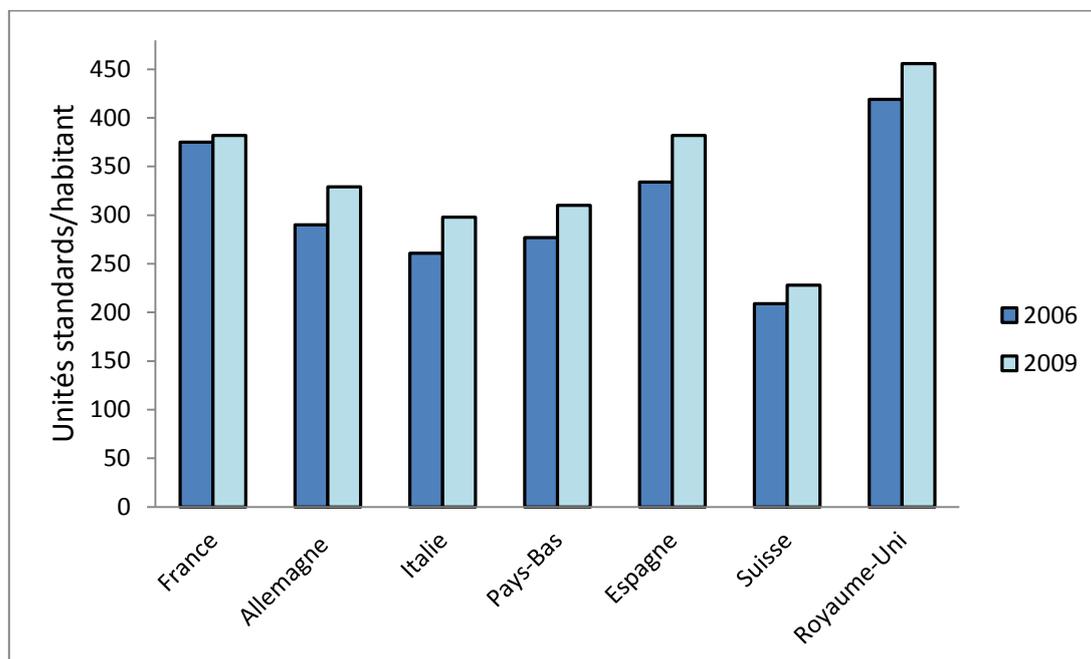


Figure 2: Données de consommation des composés pharmaceutiques dans sept pays européens (d'après AFSSAPS, 2011)

L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé publie en 2011 un rapport d'expertise relatant l'analyse des ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France entre 1999 et 2009. Les médicaments y sont répertoriés selon le classement ATC et les données de consommation sont exprimées en DDJ pour 1000 habitants et par an (Figure 3). Ce rapport permet de hiérarchiser les classes thérapeutiques les plus consommées sur le territoire français entre les années 1999 et 2009. On note alors une forte consommation des médicaments dédiés au système cardio-vasculaire, avec notamment une augmentation considérable, d'environ 70% en dix ans, de la consommation d'hypolipémiants. Ce rapport met en exergue la constante augmentation de la consommation des médicaments lié au système nerveux, et plus particulièrement celle des antidépresseurs. En 2009, la France était le 2ème pays le plus consommateur d'anxiolytiques en Europe derrière le Portugal (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé 2013).

Chapitre 1 : Etat de l'art

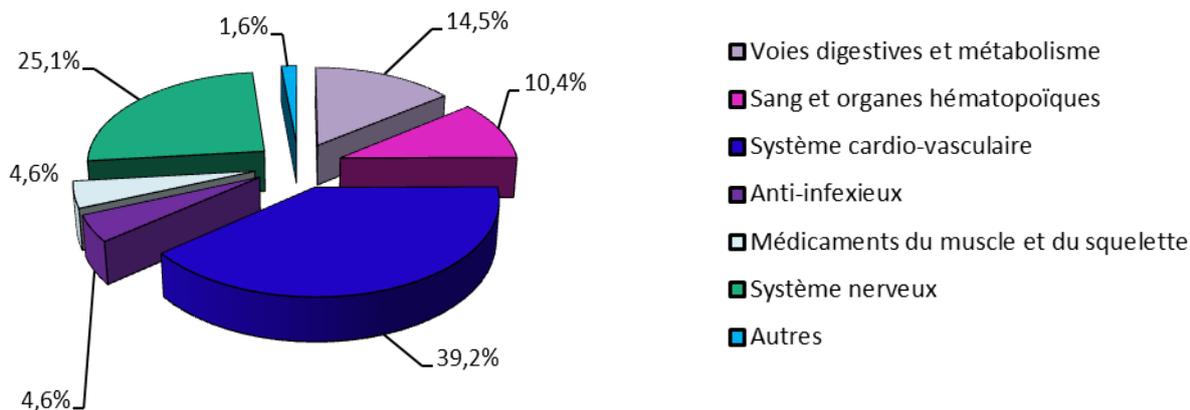


Figure 3 : Répartition des consommations françaises de médicaments par classes thérapeutiques en 2009 (d'après AFSSAPS 2011)

D'après les travaux réalisés par Locatelli et al. en 2011, la France apparaît également comme l'un des plus gros consommateurs européens d'antibiotiques et se place en 2^{ème} position derrière la Grèce.

La consommation détaillée de plus de 100 médicaments à usage humain en France, présentée par Besse et Garric (2007) et basée sur la concaténation des chiffres fournis par diverses sources au niveau national, régional ou local, indique que le paracétamol est le principe actif le plus prescrit (330377kg). Il est 4 fois plus consommé que la molécule classée en 2^{ème} position (metformine) et près de 8 fois plus que la molécule classée en 3^{ème} position (troxerutine). Les anti-inflammatoires (AINS) sont aussi très consommés (ibuprofène : 240024 kg, naproxène : 37332 kg, kétoprofen : 21697 kg, diclofenac : 9896 kg).

Les dernières données disponibles relatives à la consommation de médicaments en France sont celles publiées par l'ANSM en 2013. Le rapport d'expertise recense 2 800 substances actives différentes, correspondant à plus de 11 000 spécialités galéniques, disponibles sur le marché français. Globalement, le marché pharmaceutique national français a progressé à un rythme beaucoup moins soutenu qu'au cours de la décennie précédente. En termes quantitatifs, la consommation demeure toujours élevée mais elle s'est très légèrement infléchie en 2013. En moyenne, un Français consomme toujours 48 boîtes de médicaments par an. En ville, les ventes sont fortement concentrées sur certaines classes. En quantité, ce sont les analgésiques qui sont les plus vendus, suivis par les psycholeptiques et les antibiotiques, le paracétamol restant la molécule la plus consommée. A l'hôpital, les antinéoplasiques représentent le marché le plus important en valeur, devant les immunomodulateurs dont les ventes ont légèrement diminué en 2013. Au troisième et quatrième rang, figurent les antihémorragiques (c'est-à-dire, pour l'essentiel, les facteurs de la coagulation sanguine) et les antiviraux (des antirétroviraux pour plus de 90% du marché hospitalier en valeur de cette classe). Ainsi, ces données relatives à l'année 2013 tendent à confirmer les tendances de consommation, tant sur le plan qualitatif que quantitatif, observées sur les dix dernières années et précédemment détaillées dans cette synthèse bibliographique.

Chapitre 1 : Etat de l'art

A la consommation des médicaments à usage humain s'ajoute la consommation de médicament à usage vétérinaire. Près de 600 substances actives, communes ou non à l'usage humain, sont recensées sur le marché européen. Cependant, l'accès aux données de consommation est plutôt restreint (Kools et al, 2008). Les auteurs montrent que la France est le plus gros consommateur européen de médicaments à usage vétérinaire (1208,2 tonnes), suivie par l'Allemagne (715,77 tonnes) et le Royaume-Uni (425,32 tonnes) La France est le premier marché de l'industrie du médicament vétérinaire à l'échelle européenne. Cependant, celui-ci reste relativement faible en comparaison au marché de l'industrie du médicament à usage humain qui est environ 30 fois plus important. Les antibiotiques représentent plus de 90% du total des médicaments à usage vétérinaire en France (Kools, et al). Les tétracyclines sont les antibiotiques les plus utilisés, suivies des sulfonamides, des pénicilines et enfin des macrolides. Ces 4 familles représentent à elles seules près de 80% du total des ventes des antibiotiques à usage vétérinaire. Malgré une forte utilisation des tétracyclines et des sulfamides, une importante décroissance de leur consommation est à noter entre 1999 et 2011. Elle peut être globalement corrélée aux modifications des pratiques d'élevage, pour lesquels des traitements plus courts sont aujourd'hui favorisés (Chevance et al, 2012).

L'élevage porcin concentre près de 50% du tonnage d'antibiotiques vendus (Chevance et Moulin, 2011). A l'inverse, le tonnage dédié à la pisciculture est très faible (0,28%). Si cette quantité semble minimale, il est nécessaire d'ajouter que les rejets de cultures ont généralement lieu directement dans le milieu naturel.

1.1.3. Propriétés physico-chimiques des substances pharmaceutiques d'intérêts

La table 1 présente les propriétés physico-chimiques des substances pharmaceutiques retenues pour cette étude en fonction des différentes classes thérapeutiques auxquelles elles appartiennent. Les structures chimiques de ces composés montrent de fortes densités électroniques avec des systèmes fortement conjugués ainsi que la présence de nombreux cycles hétéro-atomiques et de groupements cétones, acides carboxyliques, amines, éthers ou encore carbamates. Ces différentes fonctions et hétéroatomes entraînent une polarité très variable des composés sélectionnés. Certaines molécules telles que la cyclophosphamide, l'aténolol ou encore le pantoprazole sont de nature hydrophile comme l'indiquent leur coefficient de partage octanol/eau ($\log K_{ow}$) compris entre 0,16 et 0,80. En opposition, certaines substances pharmaceutiques telles que l'ibuprofène, le bézafibrate et le tamoxifène présentent un caractère hydrophobe moyen à fort avec des $\log K_{ow}$ compris entre 3,97 et 7,10. Ces disparités de polarité et d'hydrophobicité se traduisent aussi par des solubilités dans l'eau limitées à quelques mg/L pour certaines molécules, mais pouvant atteindre plusieurs g/L pour d'autres. Les propriétés physico-chimiques des substances pharmaceutiques retenues pour cette étude semblent donc indiquer une distribution au sein des différents compartiments aquatiques (eau, sédiment, biote) pouvant s'avérer très disparate.

Chapitre 1 : Etat de l'art

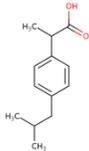
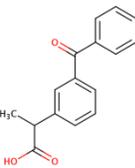
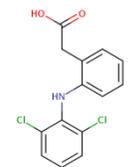
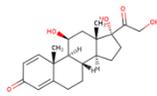
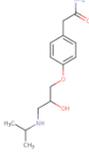
Classe thérapeutique	Composé	Code ATC	N°CAS	Formule brute	Structure	Masse molaire (g/mol)	pKa	Log Kow	Log Koc	Solubilité dans l'eau (mg/L) (température °C)
Analgésiques et antalgiques	Ibuprofène	M01AE01	15687-27-1	C ₁₃ H ₁₈ O ₂		206,3	4,91	3,97	2,60	21 (25)
	Kétoprofène	M01AE03	22071-15-4	C ₁₆ H ₁₄ O ₃		254,28	4,45	3,12	2,46	51 (22)
	Diclofénac	M01AB05	15307-86-5	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂		296,1	4,15	4,51	2,92	2,37 (25)
	Prednisolone	H02AB06	50-24-8	C ₂₁ H ₂₈ O ₅		360,4	12,58	1,62	1,56	223 (25)
β-Bloquant	Aténolol	C07AB03	29122-68-7	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃		266,3	9,6	0,16	2,17	13300 (25)

Table 1: Structures et caractéristiques physico-chimiques substances pharmaceutiques d'intérêt

Chapitre 1 : Etat de l'art

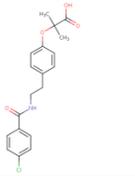
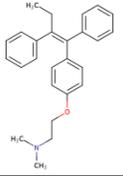
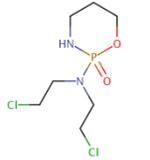
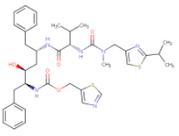
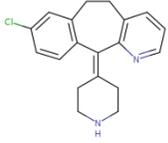
Classe thérapeutique	Composé	Code ATC	N°CAS	Formule brute	Structure	Masse molaire (g/mol)	pka	Log Kow	Log Koc	Solubilité dans l'eau (mg/L) (température °C)
Hypolipémiant	Bézafibrate	C10AB02	41859-67-0	$C_{19}H_{20}ClNO_4$		361,8	3,83	3,97	3,17	1,55 (25)
Anticancéreux	Tamoxifène	L02BA01	10540-29-1	$C_{26}H_{29}NO$		371,5	8,76	7,10	6,89	0,17 (25)
	Cyclophosphamide	L01AA01	50-18-0	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$		261,1	12,78	0,80	2,50	15000 (23)
Antirétroviral	Ritonavir	J05AE03	155213-67-5	$C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$		720,94	13,68	3,9	1,93	1,26 (25)
Antihistaminique	Desloratadine	R06AX27	100643-71-8	$C_{19}H_{19}ClN_2$		310,8	9,73	3,20	6,13	3,95(25)

Table 1 suite: Structures et caractéristiques physico-chimiques substances pharmaceutiques d'intérêt

Chapitre 1 : Etat de l'art

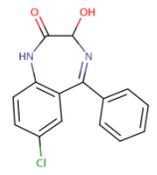
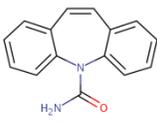
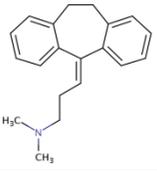
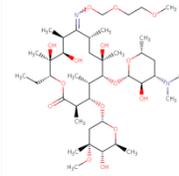
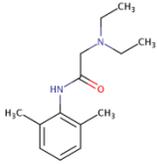
Classe thérapeutique	Composé	Code ATC	N°CAS	Formule brute	Structure	Masse molaire (g/mol)	pka	Log Kow	Log Koc	Solubilité dans l'eau (mg/L) (température °C)
Psychotropes	Oxazépam	N05BA04	604-75-1	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂		286,7	10,61	2,24	3,08	179
	Carbamazépine	N03AF01	298-46-4	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O		236,3	13,90	2,45	3,59	17,7 (22)
	Amitriptyline	N06AA09	50-48-6	C ₂₀ H ₂₃ N		277,4	9,40	4,92	4,05	9,71 (24)
Antibiotique	Roxithromycine	J01FA06	80214-83-1	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅		837,1	9,08-12,45	1,7	2,56	0,02 (25)
Anesthésique local	Lidocaïne	C01BB01	137-58-6	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O		234,3	8,01	2,44	2,96	4100 (30)

Table 1 suite: Structures et caractéristiques physico-chimiques substances pharmaceutiques d'intérêt

Chapitre 1 : Etat de l'art

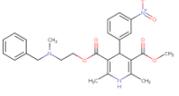
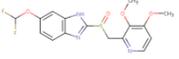
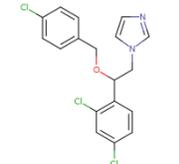
Classe thérapeutique	Composé	Code ATC	N°CAS	Formule brute	Structure	Masse molaire (g/mol)	pKa	Log Kow	Log Koc	Solubilité dans l'eau (mg/L) (température °C)
Vasodilatateur	Nicardipine	C08CA04	55985-32-5	$C_{26}H_{29}N_3O_6$		479,5	8,18	3,82	5,34	2,2 (25)
Inhibiteur de la pompe à protons	Pantoprazole	A02BC02	102625-70-7	$C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$		383,4	3,55-9,15	0,50	4,13	495 (25)
Antifongique	Econazole	D01AC03	27220-47-9	$C_{18}H_{15}Cl_3N_2O$		381,7	6,77	5,50	4,57	1,48(25)

Table 1 suite: Structures et caractéristiques physico-chimiques substances pharmaceutiques d'intérêt

1.2. Les sources de contamination environnementales

Si l'accès aux soins et aux médicaments est un facteur indispensable à notre santé et qualité de vie, il est aujourd'hui avéré que les substances pharmaceutiques contribuent à la contamination des écosystèmes. Les projections sur l'accroissement et le vieillissement de la population, ainsi que le libre accès aux médicaments laissent penser que cette micropollution permanente est un phénomène de long terme, qui nécessite de développer des connaissances permettant d'identifier et de quantifier ses sources.

Les différentes sources de substances pharmaceutiques dans l'environnement peuvent être classées de différentes manières : il existe les sources de pollution dites ponctuelles et les sources de pollution qualifiées de diffuses (Lapworth et al 2012). Les sources de pollution ponctuelles sont facilement identifiables, il s'agit par exemple des effluents industriels, des effluents hospitaliers, des rejets des usines de traitement des eaux usées, des décharges municipales, ou encore des fosses septiques (Bueno et al, 2012). Au contraire, les sources de pollution diffuses sont difficilement identifiables du fait de l'importance de leur portée géographique. Un des exemples est le ruissellement. En effet, le traitement des eaux usées dans les stations d'épuration (STEP) génère des boues résiduelles dans lesquelles certains médicaments peuvent s'être accumulés. En France, ces boues sont ensuite utilisées comme fertilisant sur les sols agricoles. Les substances qui y étaient retenues se retrouvent alors dans le milieu édaphique et peuvent, de ce fait, atteindre les milieux aquatiques par ruissellement des eaux de pluies sur les sols amendés. Dans le cas des médicaments à usage vétérinaires, les substances pharmaceutiques contenues dans les excréments d'origine animale atteignent directement le sol des pâturages lorsqu'il s'agit d'élevage en plein air, ou se retrouve dans les fumiers et lisiers qui, tout comme les boues de STEP, peuvent être épandus sur les sols agricoles. De la même façon, les produits pharmaceutiques qu'ils contenaient sont alors dispersés dans le milieu. Comparer aux sources de pollution ponctuelles, les sources de pollution diffuses ont une charge environnementale généralement plus faible du fait du potentiel d'atténuation naturel dans les sols et les sous-sols (Murray et al, 2010).

Parmi les sources de pollution ponctuelles, les usines de fabrication ou de conditionnement de médicaments ne sont pas de façon générale les sources les plus importantes. Néanmoins, aux endroits où les rejets de ces usines ont lieu, les concentrations peuvent être extrêmement importantes et contribuer de façon majoritaire à la pollution (Phillips et al., 2010, cardoso,2014). Malgré de nombreuses campagnes de sensibilisation au tri des déchets, divers médicaments non-utilisés ou périmés ne sont pas ramenés en pharmacie mais directement jetés dans les éviers ou les toilettes ; ils se retrouvent alors dans les eaux usées. Dans d'autres cas, ils sont jetés avec les déchets ménagers et finissent dans les décharges. Les lixiviats de ces décharges contaminent les sols et les eaux de surface avoisinantes (Buszka, 2009). Selon les premières études menées par Godfrey et al. (2007), 22 substances pharmaceutiques ont été détectées dans des fosses septiques. Ces petits systèmes de traitement des eaux usées qui recueillent principalement les déchets domestiques

Chapitre 1 : Etat de l'art

peuvent être sujets à des risques de fuite qui conduisent à la pollution des sols et des ressources en eau en libérant les composés pharmaceutiques qu'ils contiennent dans l'environnement.

Ces différentes sources de pollution ponctuelles sont cependant négligeables par rapport à l'impact des effluents de station d'épuration (W.C Li, 2014). En effet, une fois ingérés, les médicaments sont excrétés *via* les urines et les fèces. Dans le cas d'une consommation humaine, ils se retrouvent alors dans les eaux usées. Ces dernières sont le plus souvent dirigées vers des stations d'épuration (STEP) où elles seront traitées avant d'être rejetées. Lorsque les molécules pharmaceutiques ne sont pas ou peu éliminées au cours des traitements, elles se retrouvent dans les milieux aquatiques où sont rejetées les eaux traitées (cours d'eau, lacs ou milieu marin). En raison des fortes consommations de médicaments en milieu hospitalier, les centres de soins et en particulier les hôpitaux sont connus pour être des acteurs majeurs de la contamination des eaux usées par les molécules pharmaceutiques (orias, 2014, escher, 2011). Ceci est d'autant plus vrai pour les molécules administrées exclusivement à l'hôpital. Compte-tenu des objectifs de ce projet, il semblait nécessaire de réaliser un focus particulier sur le devenir et l'occurrence des substances pharmaceutiques dans les effluents de station d'épuration.

1.2.1. Les stations d'épuration : principales voies d'introduction des substances pharmaceutiques dans l'environnement

Les systèmes de traitement des eaux usées, s'ils sont efficaces pour assurer l'abattement de macro-polluants (matières en suspension, nutriments...) réglementés depuis longtemps ne le sont plus totalement face à la diversité des substances à traiter (Luo, 2014). Parmi ces substances, les médicaments attirent tout particulièrement l'attention des autorités compétentes, des industriels spécialisés dans le traitement des eaux et de la communauté scientifique. Ainsi, de nombreuses publications scientifiques traitent de l'efficacité des systèmes de traitement des eaux résiduaires au regard de l'abattement des substances pharmaceutiques.

a) Les différents traitements mis en jeu dans les stations d'épuration

L'épuration des eaux usées est un ensemble de techniques qui consistent à dépolluer et purifier suffisamment l'eau pour qu'elle n'altère pas la qualité du milieu naturel dans lequel les effluents seront finalement rejetés. Les STEP sont généralement installées à l'extrémité d'un réseau de collecte. De l'arrivée à la STEP jusqu'au rejet, chaque dispositif est conçu pour extraire au fur et à mesure les différents polluants contenus dans les eaux usées. De manière générale, les traitements peuvent être divisés en différentes étapes :

- Le prétraitement : il permet d'éliminer les éléments solides (sable, graisses...) dont la nature et la taille sont incompatibles avec les procédés d'épuration. Cette étape est assurée par des processus de type physique ou mécanique comme le dégrillage, la dilacération, le dessablage, le déshuilage ou encore le dégraissage. Cette première étape est très faiblement performante au regard de l'élimination des substances pharmaceutiques (Carballa et al. 2005).

Chapitre 1 : Etat de l'art

- Le traitement primaire : il permet d'éliminer une partie de la pollution particulaire. Les matières décantables se rassemblent sous forme de boues au fond du réservoir. Dans certains cas, un traitement physico-chimique est appliqué à ce niveau. Il consiste à ajouter des flocculants aux eaux sortant du prétraitement pour finir d'en éliminer les matières en suspension. Durant cette étape, une partie significative de la charge en substances pharmaceutiques peut être abattue, essentiellement par des phénomènes de sorption. Les travaux de Carballa et al. (2005) indiquent des taux d'abattement de l'ordre de 20 à 45% pour le diclofénac et 10 à 25% pour l'ibuprofène.
- Le traitement secondaire: il est principalement réalisé par voies biologiques. Ces processus utilisent de micro-organismes capables de biodégrader les polluants. La sélection naturelle des espèces et leur concentration dans un bassin permet d'accélérer et de contrôler un phénomène qui se produit communément en milieu naturel. Dans le cas des eaux usées urbaines, on favorise le développement de bactéries aérobies, c'est-à-dire, celles qui utilisent l'oxygène pour se développer. On recense différents systèmes de fonctionnement : le lagunage, les cultures libres (les boues activées (Bonetti, 2007, Vieno, 2007), les bioréacteurs à membrane (Oosterhuis, 2013)) et les cultures fixées (biofiltres, lits bactériens, disques biologiques, filtres plantées) où les bactéries se développent sur un support (Escher, 2011 ; Rosal, 2010). Ces systèmes de traitements secondaires peuvent être différents essentiellement au regard des temps de rétention hydrauliques (HRT). En effet, on considère généralement que les processus de lits fluidisés (boues activées, lagunage) ont des HRT supérieurs à 12 heures au contraire des systèmes à cultures fixées qui ont des temps de séjour hydrauliques inférieurs à quelques heures (1 à 5 heures). Ces traitements peuvent donc présenter des différences significatives en termes d'abattement de substances pharmaceutiques. La carbamazépine par exemple s'est révélée être très réfractaire aux traitements secondaires et ce, quel que soit le procédé employé (Hordern, 2009, Leclercq 2009, ref plus récente ?). A l'inverse, certains chercheurs relatent une élimination quasi-totale du paracétamol (Gros et al, 2010).
- Le traitement tertiaire: il est considéré comme un traitement complémentaire qui vise à réduire les pollutions non biodégradables tels que la DCO, le phosphore, et les composés spécifiques (pesticides, métaux, médicaments....). Cette étape peut être assurée par des procédés physico-chimiques tels que l'adsorption sur charbon actif ou la filtration sur sable, mais également par des procédés plus spécifiques comme l'ozonation qui semble efficace pour éliminer certaines molécules pharmaceutiques (Castiglioni *et al.*, 2006). Gabet-Giraud *et al.* (2010) ont ainsi observé des rendements d'élimination supérieurs à 80 % pour les β -bloquants. Notons cependant que malgré l'avènement de ces traitements complémentaires, les STEP sont encore aujourd'hui principalement équipées uniquement de traitements primaires et secondaires.

Chapitre 1 : Etat de l'art

b) Devenir des substances pharmaceutiques dans les stations d'épuration : abattement et occurrence

Au cours des dernières décennies, l'occurrence de résidus pharmaceutiques dans les effluents de station d'épuration, au regard de l'efficacité des traitements mis en jeu, de la localisation géographique des sites étudiés, mais également des différentes familles de médicaments étudiés est devenue un sujet d'intérêt grandissant pour la communauté scientifique, donnant lieu à de nombreuses publications et reviews (Luo et al, 2014, Gracia-Lor et al, 2012, Deblonde et al. 2012, Göbel, 2007, Jelic et al, 2012, Kasprzyk-Hordern, 2009).

L'efficacité des stations d'épuration vis-à-vis des substances pharmaceutiques est fonction des propriétés physico-chimiques des molécules ainsi que des caractéristiques propres aux usines de traitement. Comme on peut le constater dans la table 2, les concentrations rapportées de certains composés pharmaceutiques ciblés pour cette étude révèlent des variations spatiales et temporelles importantes qui sont dues à un certain nombre de facteurs comme les pratiques spécifiques propres à chaque pays impactant les ventes et le taux de consommation, le taux d'excrétion de la molécule considérée, la consommation d'eau par personne et par jour, la taille de la station d'épuration étudiée et l'efficacité du procédé de traitement mis en œuvre.

Chapitre 1 : Etat de l'art

Classes thérapeutiques	Composés	Site d'étude	Concentration dans l'influent (µg/l)	Concentration dans l'effluent (µg/l)	Références bibliographiques
Analgésique	Diclofénac	Union Européenne, Grèce, Corée, Suède, Suisse, Royaume-Uni, Balkans	<0,001-94,2	<0,001-0,69	Behera, 2011 ; Gracia-Lor, 2012 ; Kasprzyk-Hordern, 2009 ; Loos, 2013 ; Santos, 2009; Stamatis and kanstantinou, 2013; Stamatis, 2010; Terzic, 2008; Zhou,2010; Zorita (2009)
	Ibuprofène	Union Européenne, Grèce, Corée, Suède, Chine, Royaume-Uni, Balkans, Etas-Unis	<0,004-603	ND-55	Behera, 2011 ; Gracia-Lor, 2012 ; Kasprzyk-Hordern, 2009 ; Loos, 2013 ; Santos, 2009; Stamatis, 2010; Singer, 2010 Terzic, 2008; yu and chu, 2009; Zorita (2009)
	Kétoprofène	Union Européenne, Espagne, Corée, Chine, Royaume-Uni, Balkans	<0,004-8,56	<0,003-3,92	Behera, 2011 ; Gracia-Lor, 2012 ; Kasprzyk-Hordern, 2009 ; Loos, 2013 ; Santos, 2009; Stamatis, 2010; Singer, 2010; Terzic, 2008; Zhou, 2010;
Anticonvulsivant	Carbamazépine	Union Européenne, Espagne, Corée, Chine, Royaume-Uni, Balkans, Grèce	<0,04 – 3,78	<0,005 -4,60	Behera, 2011 ; K. Choi, 2008; Kasprzyk-Hordern, 2009 ; Loos, 2013 ; Santos, 2009; Stamatis, 2010; Singer, 2010; Terzic, 2008; Zhou, 2010; Santos et al, 2009
Hypolipémiant	Bézafibrate	Union Européenne, Espagne, Corée, Royaume-Uni, Balkans	0,05 – 1,39	0,03 – 0,67	Behera, 2011 ; Gracia-Lor, 2012; Kasprzyk-Hordern, 2009 ; Loos, 2013 ; Santos, 2009; Stamatis, 2010; Terzic, 2008; Santos et al, 2009
β-bloquant	Aténolol	Corée, Espagne, Suisse, Royaume-Uni, Balkans	0,1 – 33,1	0,13 – 7,60	Alder,2010 ; Behera, 2011 ; Kasprzyk-Hordern, 2009 ; Santos, 2009 ; Terzic, 2008;

Table 2: Concentrations de substances pharmaceutiques dans les influents et effluents de stations d'épuration équipées de traitements conventionnels dans différents pays (d'après Luo, 2014)

A titre d'exemple, en considérant la totalité des données brutes utilisées pour la génération de la Table 2, l'élimination du diclofénac dans les stations d'épuration varient entre 0 et 80%. Pour Behera et al. 2011, il peut être éliminé à plus de 80% dans une STEP possédant un procédé de traitement conventionnel (traitement primaire et traitement secondaire réalisé par voie biologique). Gracia-Lor et al. (2012) reportent des taux d'abattement de 35% pour la période d'avril à octobre 2009, contre 75% pour la période de juin 2008 à janvier 2009, mettant ainsi en évidence des variabilités saisonnières. De la même façon, suivant l'étude considérée, le taux d'abattement des β-bloquants, et en particulier de l'aténolol sont très différents (Gabet-Giroux et al, 2010, Castiglioni et al, 2006). En revanche, pour les antibiotiques appartenant à la famille des macrolides, différentes études mettent en exergue une présence plus importante de ces composés en sortie de STEP qu'en entrée (Gros et al, 2010, Castiglioni et al, 2006). Ces résultats sont toutefois à nuancer puisque dans la majeure partie des cas seules les phases dissoutes et/ou particulières sont analysées. Or, ces molécules sont principalement emprisonnées dans les matières fécales en entrée de STEP, et seront libérées au cours du procédé de traitement. Elles seront donc plus facilement détectables dans les effluents que dans les influents (Göbel et al, 2007).

Malgré quelques différences notables en terme de taux d'abattement, il est toutefois possible de dégager une tendance globale reflétant l'efficacité des procédés de traitement au regard de certains

Chapitre 1 : Etat de l'art

résidus médicamenteux (Figure 4). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'ibuprofène et le kétoprofène présentent des taux d'abattements modérés à élevés avec une efficacité moyenne d'élimination de 91,4% et 51,7%, respectivement. Le bézafibrate et le diclofénac sont quant à eux très faiblement éliminés par les procédés de traitement conventionnels. La carbamazépine semble être le résidu médicamenteux le plus persistant avec une efficacité moyenne d'élimination de 32,7% et une efficacité maximum atteignant seulement les 62,3% (Choi et al. 2008).

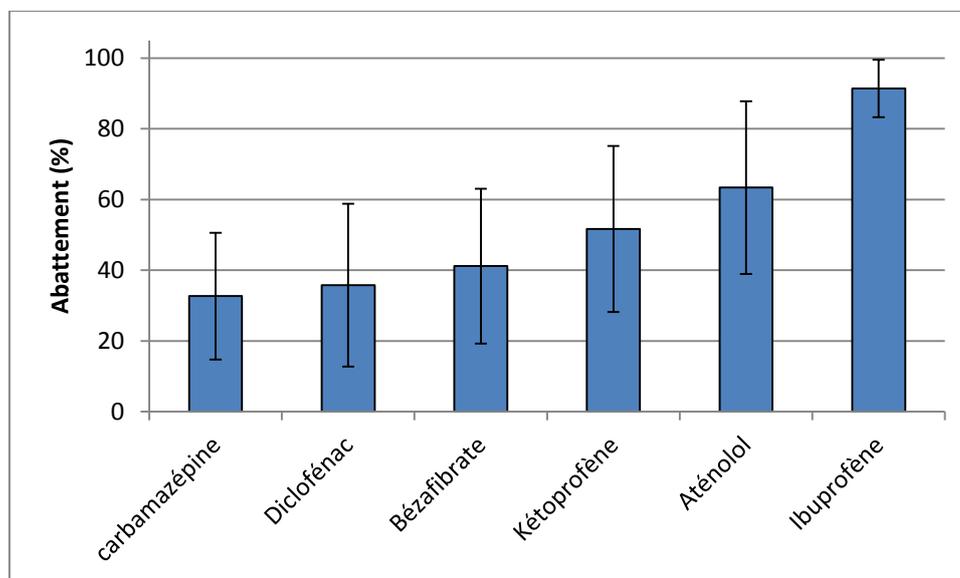


Figure 4: Taux d'abattements de certains composés pharmaceutiques d'intérêt dans les stations d'épuration (d'après Luo et al. 2014)

La plupart des résidus médicamenteux présentent une plage de concentration comprise entre 0,1 et 10 $\mu\text{g/L}$ en entrée de station d'épuration (Table 2). Notons cependant que certains composés (ibuprofène, aténolol) affichent des concentrations bien supérieures à la moyenne. A titre d'exemple, dans une étude réalisée par Santos et al. 2009, l'ibuprofène était la molécule la plus abondante dans les influents de quatre stations d'épuration espagnole, avec des niveaux de concentration allant de 3,73 à 603 mg/L . Ces niveaux particulièrement élevés pourraient s'expliquer par la forte consommation de cet AINS. De plus, il est nécessaire de souligner que les composés pharmaceutiques présentant des taux d'excrétion faibles (ibuprofène, carbamazépine, diclofénac) ne sont pas nécessairement présents en faibles quantité dans les influents de STEP.

La concentration de la plupart des substances pharmaceutiques dans les effluents varie entre 0,001 et 1 mg/L , ce qui correspond globalement à un ordre de grandeur une à deux fois inférieur à celui des influents. Certains composés, dont les concentrations étaient relativement élevées en entrée de STEP présentent des concentrations supérieures à cette moyenne. L'ibuprofène a par exemple été détecté dans des effluents traités à des concentrations pouvant atteindre 1 $\mu\text{g/L}$.

En 2010, lors d'une étude réalisée à l'échelle européenne, 90 effluents de STEP ont été analysés incluant la surveillance de 156 contaminants organiques (Loos, 2013). Les résultats obtenus montrent la présence de 125 substances dans les effluents à des concentrations allant de quelques ng/L à

Chapitre 1 : Etat de l'art

plusieurs mg/L. Parmi les composés les plus pertinents, aux regards de leur fréquence de détection et de leur concentration médiane dans les effluents (Table 3, Figure 5), on retrouve plusieurs substances pharmaceutiques telles que la carbamazépine, l'oxazépam, le diclofénac ou encore l'ibuprofène.

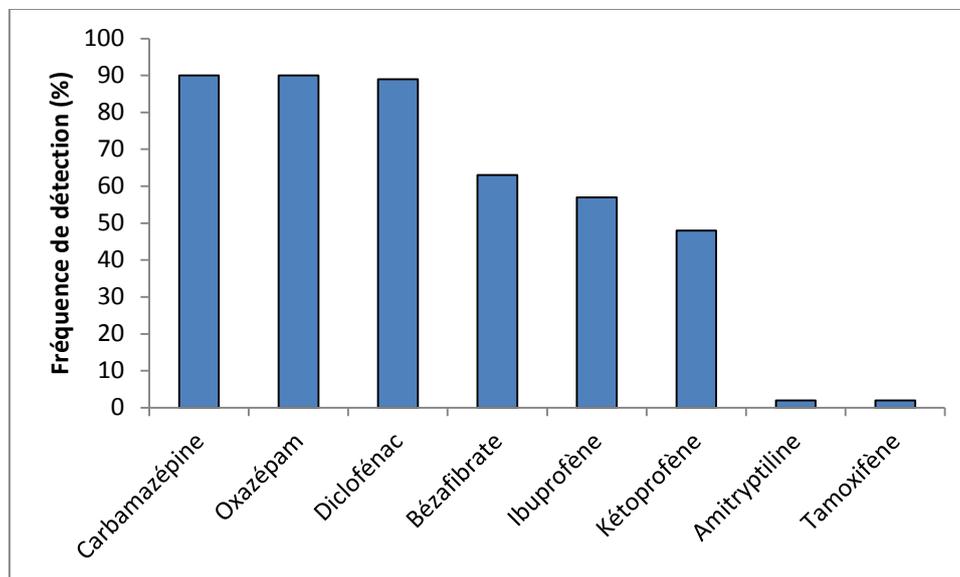


Figure 5: Fréquence de quantification de certaines substances pharmaceutiques dans 90 effluents de STEP en Europe (Loos, 2013)

Composés	Concentration médiane (ng/l)	Concentration maximum (ng/L)
Carbamazépine	752	4609
Oxazépam	64,3	1766
Diclofénac	43,3	174
Bézafibrate	3,5	343
Ibuprofène	7	2129
Kétoprofène	0	1653
Amitryptiline	0	14,6
Tamoxifène	0	12,5

Table 3: Concentrations médianes et maximales de certaines substances pharmaceutiques dans 90 effluents de STEP en Europe (Loos, 2013)

1.2.2. Le cas particulier des effluents hospitaliers

Les centres de soins et en particulier les hôpitaux sont connus pour être des « hot spot » de la contamination des eaux usées par les molécules pharmaceutiques. Ceci est d'autant plus vrai pour les médicaments exclusivement administrés à l'hôpital. La très large gamme d'activités effectuées par les hôpitaux (soins, diagnostiques, chirurgie...) engendre l'utilisation d'une grande variété de substances potentiellement écotoxiques (médicaments, désinfectants, radionucléides). Verlicchi et al, 2010 ont ainsi démontré que les effluents hospitalier pouvaient être jusqu'à 150 fois plus concentrés en micropolluants que les effluents urbains. Dans leur review, Orias et al (2013) mettent en évidence la très grande diversité des composés présents dans les effluents hospitaliers. Les

Chapitre 1 : Etat de l'art

auteurs soulignent également la variabilité des mesures relatives dans la littérature, tant sur le plan qualitatif que quantitatif, qui influence considérablement l'écotoxicité des effluents. Dans les eaux usées provenant d'hôpitaux, les plus fortes concentrations rapportées concernent les agents de contraste utilisés pour les diagnostics médicaux. Ils sont retrouvés à des valeurs supérieures au mg/L (Mullot et al, 2009). Les analgésiques et anti-inflammatoires sont également quantifiés à des niveaux élevés de concentration pouvant atteindre plusieurs mg/L. Cependant, leur gamme de concentrations semble très étendue (Figure 6). Dans le cas des anticancéreux, il est possible de noter une différence significative entre différents médicaments appartenant à cette classe thérapeutiques. En effet, la cyclophosphamide est présente en concentration bien plus importante dans les effluents hospitaliers que le tamoxifène. De manière générale, au regard des résidus pharmaceutiques, on constate que les concentrations mesurées dans les effluents hospitaliers sont d'un ordre de grandeur plus élevé que celles mesurées dans les effluents urbains.

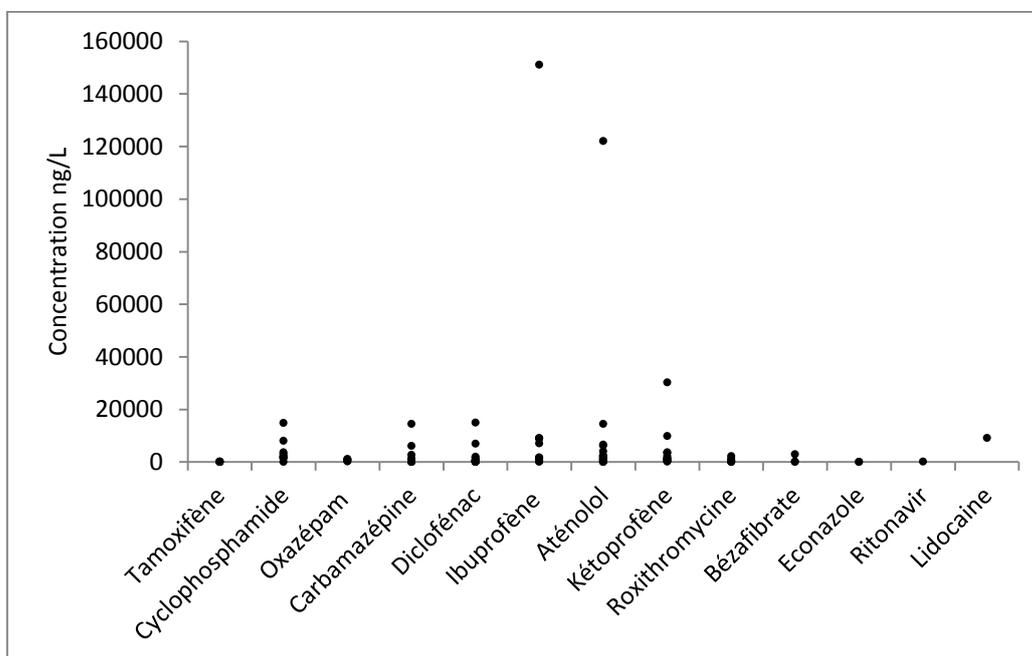


Figure 6: Concentrations (ng/L) relevées dans la littérature pour certaines molécules pharmaceutiques d'intérêt mesurées dans des rejets hospitaliers.

Basée sur les substances médicamenteuses consommées aux Hospices Civils de Lyon (deuxième plus grande structure hospitalière en France (5200 lits)), Jean et Perrodin (2012) présentent une méthode visant à sélectionner et prioriser les produits pharmaceutiques rejetés dans les effluents hospitaliers, au regard de leur impact sur les écosystèmes aquatiques, et plus particulièrement en raison de leur potentiel de bioaccumulation. Sur les 960 médicaments consommés dans ce centre de soin, les auteurs ont établi une liste de 70 substances considérées comme potentiellement bioaccumulables. Basé sur l'analyse des facteurs de risque spécifiques, 14 substances ont été qualifiées de prioritaires. Parmi celles-ci, on dénombre notamment le ritonavir, l'amitriptyline, le tamoxifène, la desloratadine, la nifédipine et le mifépristone, qui ont été retenus dans le cadre de notre étude.

1.3. Devenir des substances pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques

Aujourd'hui, la contamination de nos écosystèmes aquatiques par des résidus médicamenteux est un fait avéré et largement documenté. La distribution de ces substances au sein des différents compartiments environnementaux est essentiellement due à leurs propriétés physico-chimiques et aux caractéristiques du milieu (matière organique, température, pH...). Le devenir de ces contaminants dans les systèmes aquatiques est lié à deux phénomènes : le phénomène de dégradation et le phénomène d'adsorption sur les matrices solides environnementales (particules, sédiments).

1.3.1. Les phénomènes de dégradation en milieux naturels

a) La biodégradation

Les réactions intervenant lors des phénomènes de dégradation biotiques sont principalement l'œuvre de bactéries et/ou d'enzymes. Certaines molécules pharmaceutiques tels que l'aténolol, la carbamazépine ou encore l'ibuprofène semblent facilement biodégradables (Yamamoto, 2009). Cependant les phénomènes de dégradations biotiques peuvent être très disparates d'un site à un autre. En effet, ils dépendent principalement de la présence et de la diversité des micro-organismes nécessaires à la biodégradation (Fatta-Kassinos, 2010).

a) La photodégradation

La photolyse est un phénomène de dégradation abiotique qui participe à la dégradation des résidus pharmaceutiques dans l'environnement aquatique. On distingue deux processus de photodégradation : la photolyse directe, initiée par la lumière du soleil et la photolyse indirecte qui nécessite la présence de radicaux libres ou d'oxygène singulet permettant l'oxydation des contaminants. Ces puissants oxydants peuvent être générés par des matières organiques naturelles, des métaux de transition ou certains ions tels que les nitrates (Andreozzi, 2003). Les études concernant la photodégradation des substances pharmaceutiques se sont largement généralisées et mettent en évidence des comportements très différents et l'influence de nombreux facteurs confondants tels que l'intensité du rayonnement, la profondeur de l'eau, la saison, la latitude mais également l'impact de la composition de la matière organique (Monpelat et al. 2009). De nombreux composés pharmaceutiques sont sensibles à la photodégradation (Boreen, 2003). Le diclofénac est dégradé par photolyse directe avec un temps de demi-vie de 33 minutes (Packer, 2003). Notons cependant que la présence d'ions nitrates entraîne une diminution de ce temps de demi-vie (Andreozzi, 2003). Certaines molécules pharmaceutiques sont cependant peu sensibles à la dégradation photochimique, c'est notamment le cas des benzodiazépines (i.e. oxazépam) (calisto, 2011) ou encore de la carbamazépine (Lam et Mabury (2005)).

1.3.2. Les phénomènes de sorption en milieu naturel

La question de la distribution des substances pharmaceutiques entre les différents compartiments environnementaux (eaux, matière en suspension, sédiment...) apparaît comme prépondérante pour la compréhension du devenir de ces contaminants dans les systèmes aquatiques. En effet, certains médicaments peuvent être adsorbés sur la matrice sédimentaire qui s'affiche donc comme un réservoir potentiel de contaminants biodisponibles pour les organismes aquatiques.

Les phénomènes de sorption sur la matière solide sont fortement liés aux propriétés physico-chimiques des contaminants environnementaux et notamment à leurs coefficients de partage octanol-eau (Kow), à leurs coefficients de partage carbone organique – eau (Koc) ainsi qu'à leurs affinités électrochimiques et aux caractéristiques du solide.

Au cours des 10 dernières années, différentes études traitant de l'adsorption de composés pharmaceutiques sur les sédiments ont été effectuées (Chefetz et al, 2008, Duran-Alvarez, 2012, Fenet 2012, Yu et al, 2013, Martinez-hernandez, 2014). Certaines d'entre elles ont souligné une corrélation directe entre la quantité de matière organique des sédiments et le degré de sorption (Fenet, 2012, Yu, 2013). Le degré d'ionisation des groupements fonctionnels de certains médicaments à des pH environnementaux a été reconnu comme un facteur supplémentaire pouvant contrôler la sorption de ces composés sur les sédiments naturels (Schaffer et al., 2012).

Les travaux de Martinez-Hernandez et al (2014) indiquent une faible capacité de sorption de la carbamazépine sur des sédiments naturels. Ces résultats peuvent être corrélés à la faible hydrophobicité de la molécule considérée et à sa forme inchangée à des pH typiques d'une eau de surface. Des résultats similaires ont été rapportés par Williams et al (2009) et Lin et al. 2010. A l'inverse, l'aténolol, ionisé positivement à des pH environnementaux, possède un degré de sorption important. Parmi les mécanismes de sorption possibles, les interactions électrostatiques entre les composés chargés positivement et la surface des sédiments chargés négativement (surface de minéraux argileux) sont probablement les plus importantes (Ramil et al, 2009).

1.3.3. Données d'occurrence dans les matrices environnementales

Les substances pharmaceutiques de par leurs nombreuses sources d'introduction et leurs propriétés physicochimiques sont largement présentes dans les différents compartiments environnementaux, elles sont ainsi couramment qualifiées d'ubiquistes. De nombreuses études ont documenté leur présence dans les eaux de surfaces (fleuves, lacs, rivières, mers, océans), dans les eaux souterraines et dans les sédiments. Par souci de simplification et au regard des objectifs du projet, nous relaterons dans ce manuscrit uniquement les données d'occurrence relatives aux milieux aquatiques (eaux de surface et sédiments).

a) Présence dans les eaux de surface

Les concentrations de substances pharmaceutiques mesurées dans les eaux de surfaces sont variables et s'étendent du ng/l au µg/l. Elles sont le reflet de l'impact de différents paramètres tels

Chapitre 1 : Etat de l'art

que la consommation locale de médicament, la dilution d'un cours d'eau, la technique de prélèvement ou encore la localisation du prélèvement. Ainsi, les concentrations de résidus médicamenteux peuvent être très variables d'une étude à une autre.

Parmi les composés retenus pour cette étude, les analgésiques et les β -bloquants présentent les plus fortes concentrations. Les valeurs concernant le diclofenac varient entre 0,2 et 358 ng/L mais celles concernant l'ibuprofène se situent entre 1,3 ng/L en France (Vulliet et al, 2009) et 2,85 $\mu\text{g/L}$ en Espagne (Garcia-Lor et al 2011), voire même 36,78 $\mu\text{g/L}$ au Costa Rica (Sponberg et al 2011). Certains auteurs trouvent des concentrations similaires pour le kétoprofène (0,5 à 70 ng/L mais jusqu'à 9,8 $\mu\text{g/L}$ au Costa Rica – Sponberg et al 2011).

A l'instar des AINS et des β -bloquants, les psychotropes sont couramment étudiés, par conséquent, nous disposons de nombreuses données quantitatives témoignant de leur présence ubiquitaire dans les eaux de surface (Figure 7). Ainsi, l'anticonvulsivant carbamazépine présente des concentrations environnementales comprises entre ... ng/L et ... ng/L. Les antidépresseurs oxazépam et amitriptyline présentent des concentrations légèrement inférieures à celles de la carbamazépine, de l'ordre de la dizaine à la centaine de ng/L.

A l'inverse, les anticancéreux et les antirétroviraux sont très peu recherchés et retrouvés dans les eaux de surface. On recense tout de même la présence de tamoxifène, de cyclophosphamide et de l'antirétroviral ritonavir.

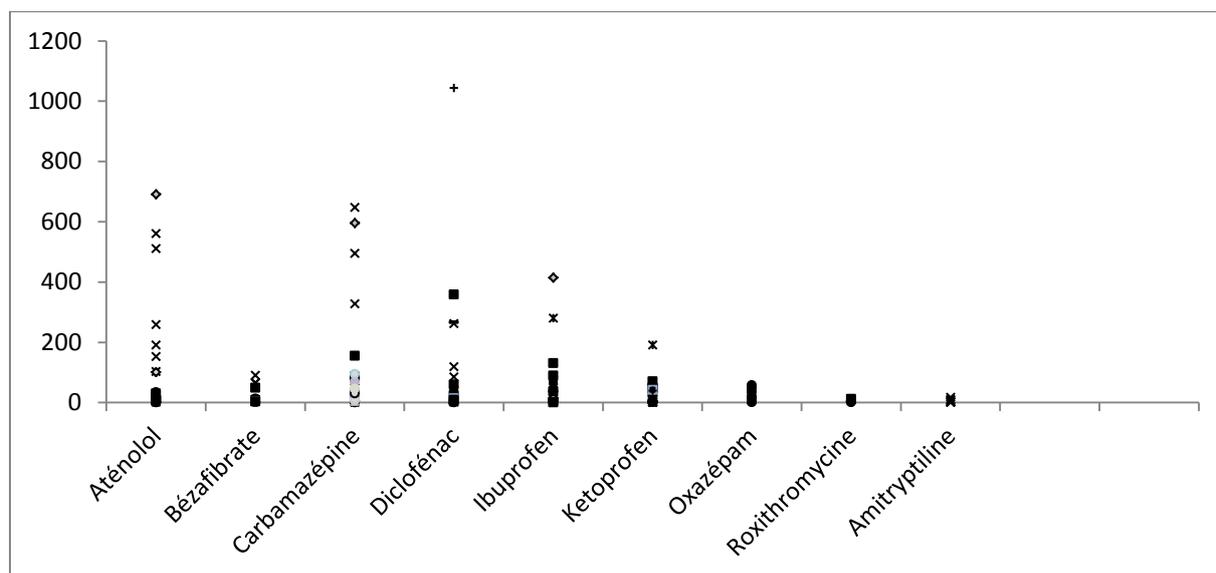


Figure 7: Occurrence de certaines substances pharmaceutiques d'intérêt dans les eaux de surface à travers le monde

b) Présence dans les sédiments

Bien que l'étude des résidus pharmaceutiques dans les différents compartiments environnementaux soit aujourd'hui un sujet d'intérêt grandissant, peu de données relative à l'occurrence de ces micropolluants organiques dans les sédiments sont disponibles dans la littérature. Par ailleurs,

Chapitre 1 : Etat de l'art

lorsque les substances pharmaceutiques sont recherchées dans les sédiments, elles ne sont pas toujours détectées.

Quelques données, sur la contamination des sédiments par certaines substances pharmaceutiques d'intérêts sont présentées dans la Table 4. De manière générale, les concentrations rapportées sont plutôt faibles, de l'ordre du ng/g.

Composés	Localisation de l'étude	Concentration dans les sédiments (min-max) en ng/g	Référence
Bézafibrate	Espagne	ND-0,37	Moreno-Gonzalez (2015)
Carbamazépine	USA	0,1-32,89	Yang, Williams, 2015 (993-1004)
	Brésil	0,12-4,81	Beretta (2014)
	France	0,5-31	Vulliet (2014)
Lidocaïne	USA	ND-0,03	Yang, Williams, 2015 (993-1004)
Diclofénac	Espagne	75-200	Camacho-Muñoz (2013)
	Brésil	0,31-1,06	Beretta (2014)
Ibuprofène	Brésil	0,77-18,8	Beretta (2014)
Aténolol	Brésil	0,48-9,84	Beretta (2014)
Roxithromycine	Shanghai	0,18-3,61	Shi, Zhou (317-323) marine pollution bulletin (2014)

Table 4: Concentrations (ng/g) de certaines substances pharmaceutiques d'intérêt dans les sédiments à travers le monde

1.4. Devenir dans les organismes aquatiques : bioconcentration, bioaccumulation, bioamplification et biotransformation

1.4.1. Définitions

Le terme bioaccumulation est souvent source de confusions tant la littérature mentionne des définitions différentes les unes des autres. Ici, nous suivrons les définitions énoncées par Gobas et Morrison (2000), qui sont de plus en plus acceptées comme standard par la communauté scientifique.

La bioaccumulation est le processus qui provoque une concentration accrue de produits chimiques dans un organisme aquatique par rapport à celle de l'eau, en raison de l'absorption par toutes les voies d'exposition dont l'absorption alimentaire, le transport à travers les surfaces respiratoires et l'absorption cutanée. A l'inverse de la bioaccumulation, la bioconcentration ne prend pas en considération l'adsorption due à la nourriture.

La bioconcentration peut être définie comme l'accumulation d'une substance, dissoute dans l'eau, par un organisme aquatique. Le facteur de bioconcentration (BCF) d'un composé est alors exprimé

Chapitre 1 : Etat de l'art

comme le rapport de la concentration du contaminant organique dans l'organisme étudié et dans l'eau. Ce ratio est généralement calculé lorsque le phénomène a atteint son équilibre.

La bioamplification peut être considérée comme un cas particulier de bioaccumulation dans lequel la concentration du polluant d'intérêt dans l'organisme étudié dépasse celle du régime alimentaire de l'organisme. Le facteur de bioamplification (BMF) peut être défini comme le rapport de la concentration du contaminant organique dans l'organisme et dans l'alimentation de celui-ci. Il est cependant plus significatif d'exprimer les deux concentrations sur une base normalisée de lipide. Un problème se pose évidemment lors de la définition d'un BMF lorsqu'un organisme dispose de plusieurs sources de nourriture qui peuvent présenter des concentrations de polluants différentes. Notons cependant que les produits chimiques qui sont bioaccumulables ne sont pas nécessairement bioamplifiés.

Les phénomènes de biotransformation conditionnent le devenir des contaminants organiques dans un organisme aquatique. Ils peuvent être définis comme la somme des réactions métaboliques qui visent à rendre une molécule exogène hydrosoluble et donc plus facilement excrétable. La biotransformation aboutit à la formation de métabolites qui peuvent être plus ou moins toxiques que la molécule mère.

1.4.2. Bioconcentration et bioaccumulation des substances pharmaceutiques

Selon l'Organisation de coopération et de Développement Economique (OCDE) (OCDE 315, 2008), un contaminant organique est potentiellement bioaccumulable lorsqu'il possède un $\log K_{ow}$ supérieur à trois. Cependant, ce seul critère ne peut être utilisé pour déterminer le potentiel d'accumulation des produits pharmaceutiques car beaucoup d'entre eux possèdent des fonctions ionisables qui rendent leur biodisponibilité vis-à-vis des organismes aquatiques pH-dépendant. Un certain nombre d'études sur les poissons, les daphnies et les plantes portant sur une large gamme de composés pharmaceutiques ont ainsi démontré que la bioaccumulation des médicaments ionisables peut être sensible aux changements de pH de l'environnement (nakamura 2008, kim 2010, valenti 2009, rendal 2011). Howard et Muir (2011) ont déterminé, grâce à l'utilisation d'un modèle QSPR (relation quantitative structure à propriété) que sur 275 médicaments détectés dans l'environnement, 92 étaient potentiellement bioaccumulables.

L'accumulation des substances pharmaceutiques est influencée non seulement par les propriétés physico-chimiques des molécules considérées mais également par un certain nombre de facteurs biologiques. La diversité écologique des organismes aquatiques (taxon, taille, cycle de vie, habitat, stratégie de reproduction et d'alimentation) peut être à l'origine d'une diversité de réponse au regard des phénomènes de bioaccumulation. Cependant, on recense encore aujourd'hui peu d'études relatives à l'influence des caractéristiques des espèces sur les processus d'accumulation et de dépuración des produits pharmaceutiques.

A l'heure actuelle, le devenir des substances pharmaceutiques dans les organismes aquatiques est encore peu renseigné, exception faite du contexte réglementaire lié à l'usage des antibiotiques en

Chapitre 1 : Etat de l'art

aquaculture. Des études cinétiques, réalisées à partir de différentes espèces de poisson ont été récemment effectuées pour estimer les BCF de certains médicaments. Nallani et al, (2011) mettent en évidence la faible capacité de bioaccumulation de l'ibuprofène chez le poisson chat et chez *Pimephales promelas*. Les BCF calculés étaient en effet très faibles et variaient de 0,08 à 1,4 respectivement pour chacune des deux espèces investiguées. Chez la truite arc-en-ciel, les analyses chimiques réalisées par Schwaiger et al (2004) ont révélé une accumulation liée à la concentration de diclofénac dans plusieurs organes examinés. Les quantités les plus élevées de diclofénac ont été détectées dans le foie, suivi par les reins, les branchies et les tissus musculaires. Les BCF variaient de 12 à 2732 dans le foie, de 5 à 971 dans les reins, de 3 à 763 dans les branchies, et de 0,3 à 69 dans les tissus musculaires, en fonction des concentrations de diclofénac appliquées. Le facteur de bioconcentration totale (BCF tot) du diclofénac et de ses métabolites a été grossièrement estimé entre 320 et 950 chez la truite arc en ciel. Meredith-Williams et al ; (2012) ont mis en exergue l'accumulation de la carbamazépine chez deux invertébrés : *Gammarus pulex* et *Notonecta glauca*. Les auteurs ont reporté des facteurs de bioconcentration allant de 5,47 à 8,94 pour *Gammarus pulex* et de 0,17 à 0,33 pour *Notonecta glauca*. Liu et al (2014) ont étudié la distribution, la bioconcentration et le métabolisme de l'antibiotique macrolide roxithromycine chez le carassin (*Carassius carassius*). Après 15 jours d'exposition à différentes concentration de roxithromycine, les BCF étaient de 2,15 à 38,0 dans le foie, de 0,95 à 20,7 dans la bile, de 0,0506 à 19,7 dans les branchies et de 0,0439 à 13,8 dans les tissus musculaires.

A l'inverse des AINS et des antibiotiques, la bioaccumulation des anticancéreux et antirétroviraux n'a que très peu été étudiée. Orias et al, reportent cependant une forte bioconcentration du tamoxifène dans des algues unicellulaires, pour lesquelles le BCF mesuré pouvait atteindre 26500.

Les études de bioconcentration *in vivo* étant relativement coûteuses et fastidieuses, des modèles *in vitro* ont été récemment mis en place et validés. Ces modèles ont notamment permis de prédire plus précisément le BCF de l'ibuprofène et du propranolol (1 et 0,6 respectivement). Toutefois, Gomez et al, 2010 précisent que lorsque les taux de transformations métaboliques sont pris en compte dans les modèles prédictifs, les estimations de BCF sont plus proches des valeurs *in vivo*.

Seules quelques études sont disponibles sur la bioconcentration de produits pharmaceutiques dans le biote lors d'études de terrain. Dans ce cas, les auteurs font rarement référence aux BCF mais mettent en évidence les concentrations intra tissulaires mesurées chez l'organisme étudié. Ainsi, Miller et al, reportent des concentrations pouvant atteindre 6 ng/g de poids sec pour la carbamazépine chez *gammarus pulex*.

1.4.3. Biotransformation des substances pharmaceutiques

La bioaccumulation est d'une importance capitale dans l'évaluation des risques liés aux produits chimiques. Elle est cependant étroitement liée aux phénomènes de biotransformation, qui sont des facteurs clés de la régulation de la charge corporelle et donc de la toxicité des polluants organiques. Il a été démontré que les processus de biotransformation contribuent à diminuer la concentration interne de polluants dans un organisme. Cependant, l'identification des métabolites reste un point

Chapitre 1 : Etat de l'art

crucial, notamment chez les premiers maillons des chaînes trophiques, du fait de leur potentielle toxicité. En raison de la législation, les données de biotransformation des substances pharmaceutiques sont disponibles dans les organismes cibles, cependant il existe encore peu d'études relatives à ces phénomènes chez les organismes non cibles, et plus particulièrement chez les organismes aquatiques.

Les réactions enzymatiques impliquées dans le métabolisme de composés xénobiotiques comprennent des réactions d'oxydation (hydroxylation, désalkylation...), de réduction (déshalogénéation, hydrolyse des amides et des esters...), mais également des réactions de conjugaison, où les groupements fonctionnels des polluants sont conjugués avec des molécules endogènes tels que les hydrates de carbone, les acides aminés, le sulfate ou encore le glutathion. Les enzymes métaboliques sont diverses, allant des oxydases à fonction mixte tels que les P450, jusqu'aux estérases, hydrolases, réductases et transférases. Katagi et al. ont rapporté que de nombreuses activités enzymatiques observées chez les humains et les poissons ont également été décrites chez les invertébrés aquatiques, bien que des différences existent chez ces espèces.

Lahti et al (2011), ont étudié l'accumulation et le métabolisme de 5 substances pharmaceutiques (diclofénac, naproxène, ibuprofène, bisoprolol et carbamazépine) couramment retrouvées dans les systèmes aquatiques chez la truite arc-en-ciel. Les expositions réalisées à des concentrations environnementales pertinentes ont permis de mettre en évidence l'efficacité des processus de biotransformation : plusieurs métabolites ont pu être détectés à des concentrations dépassant nettement celles des composés non métabolisés, les glucuronidés étant les métabolites dominants pour le diclofénac et l'ibuprofène. Cet exemple permet de montrer que l'exposition des organismes aquatiques aux produits pharmaceutiques peut être contrôlée grâce à l'étude des métabolites. En effet, ceux-ci peuvent être considérés comme une preuve ultime de l'adsorption de la molécule mère et sont souvent quantifiés en concentration plus importante que celle-ci, ce qui permet de pallier aux limites des systèmes d'analyses.

Jones et al. (2009) ont mis en évidence la métabolisation de l'ibuprofène chez le poisson zèbre. Les auteurs ont ainsi identifié l'hydroxyibuprofène comme métabolite majoritaire.

Les phénomènes de biotransformation des résidus pharmaceutiques sont encore très peu étudiés chez les invertébrés aquatiques. Dans une étude récente, les métabolites de plusieurs substances pharmaceutiques et biocides ont été identifiés chez *Gammarus pulex* et *Daphnia magna* (Jeon, 2013). Un total de 25 métabolites ont provisoirement été élucidés pour l'irgarol, la terbutryne, le tramadol et la venlafaxine chez *G. pulex* (21 produits d'oxydation et 4 composés conjugués) et 11 chez *D. magna* (7 produits d'oxydation et 4 composés conjugués). Aucune preuve de métabolisation de la clarithromycine et du valsartan n'a cependant été apportée. Sur les 360 métabolites prédits *in silico*, 23 ont pu être détectés, tandis que 2 métabolites identifiés se révèlent être des produits inattendus. Les réactions d'oxydation observées comprenaient majoritairement des réactions de N- et O-déméthylation, des réactions d'hydroxylation et des réactions de N-oxydation. La formation de

Chapitre 1 : Etat de l'art

conjugués glucuronidés, suivie par la formation de conjugués cystéine ont ainsi pu être décrites pour la première fois chez des invertébrés aquatiques d'eau douce.

1.5. Toxicité et effets des substances pharmaceutiques

Les substances pharmaceutiques ont été développées pour produire un effet biologique, de sorte que leurs résidus, métabolites et produits de dégradation dans l'environnement peuvent causer différents effets écotoxicologiques qui sont difficiles à prévoir, en particulier dans des matrices complexes.

La toxicité d'un produit ne lui est pas intrinsèque, elle dépend de sa teneur et de la nature de l'organisme qui l'absorbe. La notion dose-réponse permet d'illustrer ce principe. Selon le dose d'exposition, un même toxique peut entraîner différents effets, on parle alors de toxicité aiguë (absorption unique d'une dose élevée d'une substance chimique) avec un effet léthal ou sublétal, ou de toxicité chronique (exposition à des doses faibles mais répétées pendant une durée plus ou moins longue), provoquant des troubles à apparition progressive (Keck et Venus 2000). La relation entre les concentrations et les réponses au terme d'un test écotoxicologique se présente sous la forme d'une courbe sigmoïde. Le plus couramment, les résultats sont condensés et exprimés à travers la concentration qui induit un effet toxique pour 50% des individus (immobilisation, mortalité) ou une inhibition de 50% de l'activité des organismes (luminescence, croissance) en comparaison du témoin. Cette concentration, dite concentration efficace 50, est la médiane calculée d'après la relation dose-réponse. Le polluant est d'autant plus toxique que la concentration efficace est faible.

La toxicité aiguë des produits pharmaceutiques est généralement évaluée grâce à des tests standardisés en fonction de lignes directrices établies sur la base de bactéries, d'algues, d'invertébrés et de poissons.

Cleuvers et al. (2004) ont évalué la toxicité aiguë à court terme d'anti-inflammatoires non stéroïdiens en utilisant des algues et des invertébrés. Les auteurs rapportent une toxicité relativement faible, avec des valeurs de CE50 comprises entre 68 et 166 mg/L pour la daphnie et entre 72 et 626 mg/L pour les algues.

La toxicité aiguë des β -bloquants a été peu étudiée, à l'exception du propranolol, identifié comme le β -bloquant le plus toxique (Huggets, 2002 2007). La toxicité de l'aténolol a été démontrée par Cleuvers et al en 2005, les auteurs rapportent une valeur de CE50 équivalente à 438 mg/L chez la daphnie.

Bien que la toxicité des hypolipémiants ne soit que très peu étudiée, les travaux de Isidori et al indiquent que la toxicité aiguë du bézafibrate est de l'ordre de plusieurs dizaines de mg/L pour tous les niveaux trophiques étudiés (bactéries, rotifères, crustacés).

Au regard des valeurs de CE50 précédemment mentionnées, il semble peu probable d'observer des effets de toxicité aiguë dans le milieu naturel. En effet, les concentrations à partir desquelles des effets aigus peuvent se produire sont 100 à 1000 fois plus élevées que les concentrations de résidus pharmaceutiques mesurées dans les systèmes aquatiques. Il semble donc plus pertinent de

Chapitre 1 : Etat de l'art

s'intéresser aux effets chroniques des médicaments puisque de nombreuses espèces aquatiques sont continuellement exposées à ces micropolluants et ce, pendant de longues périodes pouvant parfois correspondre à l'intégralité d'un cycle de vie.

Les effets chroniques des AINS sont les plus étudiés, probablement parce qu'ils sont l'un des groupes de médicaments les plus consommés. Des études de toxicité chronique du diclofénac ont démontrées des effets histopathologiques chez la truite arc-en-ciel après 28 jours d'exposition, produisant des lésions rénales à 5 µg/L et des effets subcellulaires à 1 µg/L (Schlesinger, 2004, Tribskorn, 2004). Des expositions réalisées à différentes concentrations d'ibuprofène ont montré une forte augmentation du poids du foie chez les femelles *medaka*, ainsi qu'une amélioration de la production d'œufs (Flippin, 2007). Les auteurs associent ces phénomènes à la production de vitellogénine (lipoprotéine). On peut également noter une réduction significative du taux de croissance chez *Daphnia magna* pour des concentrations allant de 0 à 80 mg/L (Heckmann, 2007). La reproduction a été affectée à toutes les concentrations et complètement inhibée pour les concentrations les plus élevées. Une diminution de l'activité de l'amphipode d'eau douce *Gammarus pulex* a été constatée pour des concentrations d'ibuprofène comprises entre 1 et 10 ng/L.

Les médicaments antiépileptiques agissent dans le système nerveux central en réduisant l'activité neuronale globale. La carbamazépine est mortelle pour le poisson zèbre à 43µg/L et produit des effets sublétaux chez les daphnies (Thacker, 2005). Les femelles *daphnia pulex* exposées à des concentrations de carbamazépine inférieures à 1µg/L ont tendance à se reproduire plus rapidement, suggérant que ce médicament peut induire des effets simulateurs (Lürling, 2006). L'activité de *gammarus pulex* a été réduite par l'exposition à une gamme de concentration comprise entre 1 et 10 ng/L. La carbamazépine peut être adsorbée sur les sédiments, elle présente donc un risque pour les organismes se nourrissant de matière organique. Oetken et al ont montré que l'exposition de *Chironomus riparius* à des sédiments contaminés engendrait un blocus de la nymphose.

Les β-bloquants agissent par inhibition compétitive des récepteurs β-andrénergiques. Les poissons, comme d'autres vertébrés, possèdent des β-récepteurs dans le cœur, le foie et le système reproducteur de sorte que l'exposition prolongée à des médicaments appartenant à cette classe thérapeutique peut causer des effets délétères. L'exposition du méné à tête de boule à l'aténolol au cours du développement embryo-larvaire a montré une altération de la croissance (winter, 2008). Bien que les invertébrés ne possèdent pas de β-récepteurs, un impact potentiellement différent sur ces organismes peut être envisagé.

Il semble cependant nécessaire de souligner que dans un environnement pollué, les organismes aquatiques sont généralement exposés à un mélange complexe de contaminants chimiques. L'exposition à ce cocktail de polluants peut parfois provoquer des effets toxiques, même si les facteurs de stress individuels sont présents à des concentrations inférieures à la NOEC (concentration sans effet observable, de l'anglais No Observed Effect Concentration). Puisque l'évaluation de la toxicité chimique se fait classiquement substance par substance, en négligeant les effets de mélange, il est possible de sous-estimer les effets néfastes sur les organismes aquatiques. En effet, les

Chapitre 1 : Etat de l'art

contaminants possédant des modes d'action similaires ou différents peuvent influencer sur la toxicité des uns et des autres, résultant en un nombre quasi illimité de combinaisons d'effets synergiques, additifs ou antagonistes. On parle alors « d'effet cocktail ». Vasquez et al (2014) fournissent une compilation des études toxicologiques et écotoxicologiques publiées entre 2000 et 2014 et portant sur les effets néfastes de mélanges de médicaments. A titre d'exemple, on peut citer les travaux de Gust et al. (2013) qui mettent en évidence la sensibilité des gastéropodes vis-à-vis des mélanges de produits pharmaceutiques. Les auteurs démontrent que les effets des effluents de STEP sur la réponse immunitaire des escargots sont étroitement liés à ceux du mélange de médicament investigué (antibiotiques, antidépresseurs, β -bloquants, hypolipémiants) en laboratoire, ce qui semble suggérer que ce mélange présente des modes d'action similaires à la toxicité globale des effluents urbains. Backhaus et al. (2011) ont étudié la toxicité de 5 substances pharmaceutiques, ainsi que celle induite par le mélange de celles-ci, sur une communauté de micro-algues marines. Si tous les composés se sont avérés toxiques individuellement, le mélange a provoqué des effets stimulants même lorsque les substances étudiées étaient présentes à des concentrations similaires à leur NOEC individuelle. Ces exemples mettent en évidence la nécessité de prendre en compte les effets de mélange lors de procédures d'évaluation des risques environnementaux.

1.6. Aspects législatifs et réglementaires

La pollution des milieux naturels est un phénomène de long terme qui compromet la qualité des eaux destinées à la consommation humaine mais également le bon fonctionnement de nos écosystèmes aquatiques. En 2000, après un état des lieux s'échelonnant sur près de 6 ans, l'Union Européenne a mis en place la Directive Européenne Cadre sur l'eau (DCE). Ce texte réglementaire a pour objectif le retour au bon état écologique et chimique des masses d'eau en Europe. Son échéance initialement prévue en 2015 a ensuite été reportée à 2027. Ainsi, chaque pays membre se doit de mettre en place des programmes de surveillance des eaux et de réduction d'émission de polluants afin de restaurer une bonne qualité des milieux aquatiques. L'évaluation de la qualité des eaux est réalisée à partir de l'état écologique et chimique des masses d'eau concernées. Ces états sont eux-mêmes définis selon différents paramètres biologiques, physico-chimiques, hydromorphologiques et chimiques.

L'état écologique permet de traduire la qualité des écosystèmes aquatiques, en se basant sur des indices biologiques (indice biologique global normalisé, indice poissons en rivière, indice biologique diatomées et indice biologique macrophytes en rivière), mais également sur des paramètres physico-chimiques (température, salinité, état d'acidification, nutriments, bilan oxygène, etc.) et hydromorphologiques (hydrologie, morphologie et continuité écologique). La classification de l'état écologique comprend cinq stades qui s'échelonnent entre un état qualifié de très bon et un état qualifié de mauvais.

L'état chimique d'un milieu aquatique est basé sur des Normes de Qualité Environnementales qui ont été définies pour chaque polluant ciblée par la DCE. Elles représentent des valeurs seuil de concentration permettant de garantir la qualité des écosystèmes aquatiques. La liste des polluants

Chapitre 1 : Etat de l'art

réglementés par la DCE comprend 41 substances (métaux, pesticides, hydrocarbures). En France, la surveillance des milieux aquatiques vis-à-vis de ces polluants est décrite par les Schémas Directeurs d'Aménagement et de Gestion des Eaux (SDAGE) qui incluent un programme de mesure définissant les protocoles opérationnels. Contrairement à l'état écologique, la classification de l'état chimique ne comprend que deux états: bon et mauvais. Le bon état chimique d'une masse d'eau ne peut être atteint que si toutes les concentrations des polluants ciblés sont inférieures aux Normes de Qualité Environnementales. Si la concentration d'un composé dépasse la valeur seuil alors l'état chimique du cours d'eau considéré est qualifié de mauvais. L'état général d'une masse d'eau est déterminé en associant la qualité écologique et la qualité chimique.

Aujourd'hui, les substances pharmaceutiques n'ont pas de réglementation spécifique quant à leurs rejets dans les milieux aquatiques et ne sont pas prises en compte dans les politiques de protection et de gestion des eaux en France et en Europe. Bien que non encore officiellement intégrées à la liste des substances prioritaires de la DCE, les molécules pharmaceutiques n'en restent pas moins préoccupantes. Ainsi, en 2013, la commission européenne propose d'élargir la liste des polluants réglementés par la DCE, parmi les molécules mentionnées, on retrouve deux hormones (17-alpha-éthinyloestradiol (EE2), 17-bêta-oestradiol (E2)) et un anti-inflammatoire non stéroïdien (diclofénac) pour lequel la Norme de Qualité environnementale pour les eaux de surface a été fixée à 100 ng/L.

La notion de risque environnemental associé aux médicaments à usage humain et vétérinaire est toutefois mentionnée par de nombreuses directives européennes. L'étude de l'écotoxicité des produits pharmaceutiques est ainsi incluse dans les dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM). Les dossiers d'AMM sont constitués par les laboratoires fabricants et permettent d'évaluer l'efficacité, la sécurité et la qualité d'un produit. En Europe et en France, ce sont, respectivement, l'European Medicines Agency (EMA) et l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) qui gèrent ces dossiers et délivrent les AMM.

Les réglementations qui définissent l'évaluation du risque environnemental sont différentes selon le type de médicament (usage humain ou usage vétérinaire).

Concernant les médicaments à usage humain, la ligne directrice EMEA/CHMP/4447/00, entrée en vigueur en décembre 2006, décrit la méthode d'évaluation du risque environnemental qui comprend deux phases. La première phase consiste à prédire les concentrations environnementales (PEC (Predicted environmental concentration)). Pour une eau de surface, elles sont calculées à partir de la dose journalière maximale consommée par habitant, à partir du facteur de pénétration c'est à dire de la proportion de personnes traitées par jour avec cette molécule, à partir du volume d'eau utilisée par jour et par habitant et à partir du facteur de dilution (dilution entre l'effluent de STEP et l'eau de surface). La deuxième phase d'évaluation n'a lieu que si la PEC de la substance étudiée dépasse 0,01 µg/L dans les eaux de surface. Elle comprend alors une sous-étape de prédiction du devenir de la substance ciblée dans l'environnement, basée sur les propriétés physico-chimiques de la molécule ($\log K_{oc}$, $\log K_{ow}$), ainsi qu'une batterie de test visant à déterminer l'écotoxicité du principe actif. A partir du résultat de ces tests, il est possible de prédire la concentration pour laquelle les substances

Chapitre 1 : Etat de l'art

n'auront pas d'effets sur les organismes non-cibles : la PNEC (Predicted Non Effect Concentration). Cette concentration est calculée en appliquant un facteur de "précaution", AF (Assessment Factor), à la plus basse concentration connue pour laquelle la molécule n'engendre aucun effet (NOEC). L'AF permet notamment d'extrapoler les résultats obtenus en laboratoire à des études de terrain. Le rapport PEC / PNEC peut alors être établi. Si ce ratio est inférieur à 1 alors la molécule considérée ne représente pas de risque pour l'environnement. Dans le cas contraire, la molécule présente un risque pour l'environnement et une évaluation plus poussée peut être envisagée.

Notons cependant que la ligne directrice utilisée pour la médecine humaine semble moins contraignante que celle utilisée pour les médicaments vétérinaires. A titre d'exemple, elle ne prend pas en compte les métabolites, les excipients et les médicaments génériques. L'évaluation du risque environnemental pour les médicaments à usage humain apparaît donc encore insuffisante et n'est aujourd'hui pas un critère discriminant pour l'attribution des AMM.

2. Les hormones

2.1. Généralités et propriétés physico-chimiques des hormones d'intérêt

2.1.1. Le système endocrinien : définition et fonctionnement

L'organisme possède deux systèmes de communication, le système nerveux et le système endocrinien, qui travaillent en synergie pour coordonner l'activité cellulaire. Les signaux électrochimiques transmis *via* la moelle épinière et les nerfs périphériques sont à l'origine de réponses coordonnées rapides et brèves. A l'inverse, la communication hormonale reposant sur la production, la libération d'hormones et sur le transport de ces hormones par le sang, est adaptée aux situations qui nécessitent des ajustements fonctionnels plus durables.

Le système endocrinien contrôle et régule de nombreux processus physiologiques dont la reproduction, la croissance et le développement, la mobilisation des moyens de défense de l'organisme, le maintien de l'équilibre des électrolytes, des lipides et des nutriments dans le sang ainsi que la régulation du métabolisme cellulaire. Il est constitué par des organes ou ensemble de cellules, couramment qualifiés de glandes endocrines (Figure 8).

Chapitre 1 : Etat de l'art

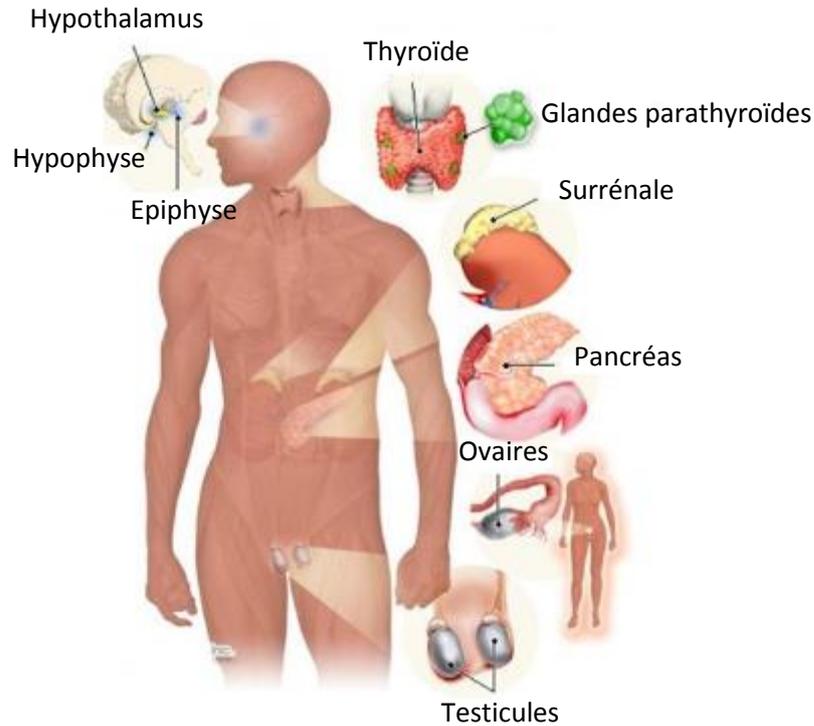


Figure 8: Schéma simplifié du système endocrinien chez l'homme et principales glandes endocrines

Les principales glandes endocrines sont l'épiphyse, l'hypophyse, la thyroïde, les parathyroïdes, les surrénales, le pancréas et les gonades (Figure 8). Elles sécrètent des hormones qui sont des messagers chimiques véhiculés par le sang et qui agissent à distance de leur site de production par fixation sur des récepteurs spécifiques. En modulant le fonctionnement des organes et des tissus cibles, les hormones assurent la régulation de nombreuses fonctions essentielles de l'organisme.

2.1.2. Les hormones stéroïdiennes : production, rôle et utilisation

Les hormones stéroïdiennes sont synthétisées à partir du cholestérol à l'issue de plusieurs réactions enzymatiques. Les œstrogènes, les androgènes et les progestatifs sont les principaux représentants de la classe des hormones stéroïdiennes.

Les œstrogènes sont produits majoritairement par les ovaires et le placenta mais peuvent également être produits en faible quantité par d'autres tissus tels que le foie, la surrénale, les seins et le tissu adipeux. Ces sources secondaires sont particulièrement importantes chez la femme lors de post-ménopause. Il existe quatre œstrogènes naturellement produits par l'organisme : l'œstrone (E1), le 17α -œstradiol (α E2), le 17β -œstradiol (β E2) et l'œstriol (E3). Ce sont des hormones sexuelles femelles mais elles peuvent également être sécrétées par l'homme. Les œstrogènes jouent un rôle clé dans la reproduction mais sont également impliqués dans le développement du système nerveux central ou la formation des os.

Les androgènes sont majoritairement produits par les testicules. La plus importante de ces hormones est la testostérone : principale hormone stéroïdienne masculine bien qu'elle soit aussi produite en faible quantité par les femmes. Elle régit la production des spermatozoïdes, stimule le

Chapitre 1 : Etat de l'art

développement des caractères sexuels secondaires, influence la croissance des glandes annexes (prostates, vésicules séminales...) et favorise l'activité sécrétoire de ces structures.

La progestérone est le seul progestatif naturel. Cette hormone stéroïdienne est sécrétée en grande quantité par les ovaires (plus précisément par le corps jaune). Elle est impliquée dans la grossesse, l'embryogenèse de nombreuses espèces, ainsi que dans le cycle menstruel féminin. La progestérone est aussi un précurseur jouant un rôle intermédiaire dans la biosynthèse des œstrogènes et des androgènes, d'où sa sécrétion en faible quantité dans les surrénales et dans les testicules.

Molécules endogènes, les hormones stéroïdiennes peuvent être aussi administrées à des fins thérapeutiques en médecine humaine et vétérinaire. En effet, la testostérone est utilisée dans les traitements de supplémentation dans le cas d'un dysfonctionnement au niveau de la production. Elle est aussi connue pour être utilisée comme anabolisant permettant d'augmenter la masse musculaire. Elle est à ce titre considérée comme un produit dopant et interdite dans la plupart des pratiques sportives. Les œstrogènes et plus particulièrement l'œstradiol sont utilisés pour les absences ou insuffisances de sécrétion ovarienne à l'adolescence et à l'âge adulte, et pour tenter de réduire les conséquences de la ménopause. L'oestriol, dont le pouvoir oestrogénique est plus faible que celui de l'œstradiol, est utilisé pour sa spécificité d'action vaginale.

Parmi les hormones stéroïdiennes administrées à titre thérapeutiques, on trouve aussi des molécules de synthèse qui sont dérivées des hormones naturelles et qui sont spécifiquement conçues pour agir sur le système endocrinien. Ces hormones synthétiques sont principalement utilisées comme contraceptifs et traitements hormonaux de substitution. L'éthinylœstradiol est l'œstrogène de synthèse le plus couramment employé. Il peut être utilisé pour traiter une déficience ostrogénique, mais il est surtout associé aux progestatifs dans la plupart des contraceptifs oraux. Parmi les progestatifs de synthèse, on peut citer la noréthindrone (ou noréthistérone) utilisée pour retarder les menstruations, ou encore le lévonorgestrel utilisé à faible dose pour son action contraceptive ou à forte dose afin de permettre une contraception d'urgence. La mifépristone est également une hormone stéroïdienne de synthèse dérivée de la noréthindrone et utilisée chez la femme comme abortif pour l'avortement chimique du début de grossesse. Son effet est contraire à celui des progestatifs, elle se fixe sur les récepteurs de la progestérone et inhibe son action, entravant ainsi le développement embryonnaire et entraînant le détachement puis l'élimination de la muqueuse utérine.

2.1.3. Propriétés physico-chimiques des hormones d'intérêt

Les hormones stéroïdiennes, naturelles ou de synthèse, se caractérisent par un noyau cyclopentanophénanthrénique (stérane) hydrophobe partiellement ou totalement hydrogéné (Figure 9).

Chapitre 1 : Etat de l'art

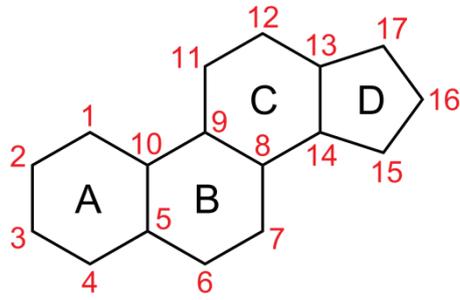


Figure 9: Représentation du noyau stérane caractéristique des hormones stéroïdienne

Chapitre 1 : Etat de l'art

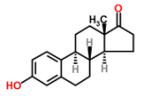
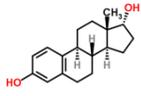
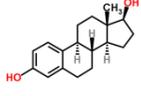
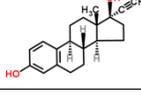
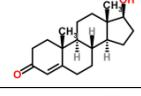
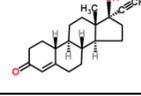
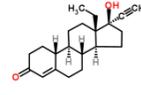
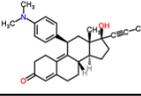
Classes	Produit	Formule brute	CAS	Structure	Masse molaire	Log Kow	Log Koc	pKa	Solubilité dans l'eau (mg/L)
Œstrogènes naturels	Œstrone	$C_{18}H_{22}O_2$	53-16-7		270,4	3,1-4,0		10,3-10,8	
	17α-Œstradiol	$C_{18}H_{24}O_2$	57-91-0		272,4	3,1-4,0		10,5-10,7	
	17β-Œstradiol	$C_{18}H_{24}O_2$	50-28-2		272,4	3,1-4,0		10,5-10,7	
Œstrogènes de synthèse	17α-EthynylŒstradiol	$C_{20}H_{24}O_2$	57-63-6		296,4	3,7-4,1		10,2	
Androgène	Testostérone	$C_{19}H_{28}O_2$	58-22-0		288,4	3,0-3,4		19,7	
Progestatif de synthèse	Noréthindrone	$C_{20}H_{26}O_2$	68-22-4		298,4	2,7-3,22		17,6	
	Lévonorgestrel	$C_{21}H_{28}O_2$	797-63-7		312,4	3,8		17,9	
Anti-progestatif de synthèse	Mifépristone	$C_{29}H_{35}NO_2$	84371-65-3		429,6	5,13-5,33		12,87 4.89	

Table 5: Structure et caractéristiques physico-chimiques des hormones d'intérêt

Chapitre 1 : Etat de l'art

Dans le milieu aquatique, à des pH avoisinant 7, les hormones stéroïdiennes d'intérêt sont principalement sous leur forme neutre. Le logarithme de leur coefficient de partage octanol/eau ($\log K_{ow}$) leur confère un caractère moyennement hydrophile à faiblement hydrophile. Elles sont donc potentiellement bioaccumulables. La solubilité de ces molécules dans l'eau indique une possible diffusion de ces molécules dans la phase aqueuse des systèmes aquatiques (Table 5).

2.2. Les stations d'épuration : principales voies d'introduction d'hormones dans l'environnement

Les hormones stéroïdiennes sont sécrétées aussi bien par l'homme que par la femme mais également par de nombreux organismes vivants, et ce durant toute leur vie. A cette sécrétion naturelle, il faut ajouter la prise éventuelle de traitements de supplémentation ou de traitements contraceptifs qui engendrent l'utilisation d'hormones synthétiques. L'organisme humain est capable de métaboliser facilement et d'excréter rapidement ces hormones stéroïdiennes, qu'elles soient d'origine naturelle ou bien synthétique. Elles sont principalement dégradées au niveau du foie où elles sont biotransformées par sulfatation ou glucuronidation. Cette biotransformation donne lieu à des métabolites solubles qui seront excrétés dans l'urine ou la bile. Cependant, les taux de métabolisation n'atteignant pas 100%, une partie des hormones sont excrétées sous leur forme inchangée *via* les urines ou les fèces (Liu, Kanjo, 2009) et se retrouvent donc dans les eaux usées.

2.2.1. Efficacité des procédés de traitement mis en œuvre dans les STEP

Certains auteurs considèrent que la majorité des hormones présentes dans les eaux usées sont éliminées lors de processus de biodégradation induits par les traitements secondaires biologiques. En effet, l'élimination de ces composés par décantation primaire, précipitation chimique, volatilisation et adsorption sur les boues semble relativement faible (Svenson, 2003 ; Andersen, 2003, Braga, 2005, Gabet-Giraud, 2010). Parmi ceux-ci, le procédé par boues activées, largement appliqué dans le monde entier, permet d'obtenir, en règle générale, des taux d'élimination relativement élevés pour les hormones stéroïdiennes (Table 6). Cependant certaines études ont suggéré que l'efficacité d'élimination de ces micropolluants pouvait s'avérer très variable. Pour trouver la raison de ces variabilités, de nombreuses études ont été menées : elles ont montré que certains paramètres tels que la température (suzuki et maruyama 2006), le temps de rétention hydraulique (clara et al. 2009), l'âge des boues ou encore la nitrification (Gabet-giraud, 2006) pouvaient influencer l'efficacité d'élimination des hormones. Ceci reflète la nécessité d'optimiser les paramètres de fonctionnement des traitements conventionnels des eaux usées afin d'obtenir des abattements stables.

Il semble peu probable, d'un point de vue pratique et économique, de mettre en place des systèmes de traitement avancés (traitements tertiaires) dans toutes les stations d'épuration. Cependant, avec un accroissement des pénuries d'eau potable à travers le monde, l'utilisation des effluents de STEP comme source d'eau potable ou le recyclage des effluents pour une utilisation particulière dans certains pays ne semble qu'une question de temps. Dans ce cas, les procédés d'oxydation avancés ou

Chapitre 1 : Etat de l'art

de filtration sur charbon actif peuvent être envisagés en raison de leur grande efficacité d'élimination des hormones (Liu 2009).

Composés	Localisation de l'étude	Abattement (%)	Références
Œstrone	Canada	-55 - 98	Servos et al 2005
	Australie	64 -100	Tan 2006
	Pennsylvanie	41 - 89	Chimchiran, 2007
	Japon	100	Ito, 2008
	Italie	-22 - 95	Baronti, 2000
	France	29-100	Gabet-Giraud, 2010
Œstradiol	Canada	-18,5 – 98,8	Servos et al 2005
	Pennsylvanie	52 - 99	Chimchiran, 2007
	Italie	59-98	Baronti, 2000
	Australie	96 (moyenne)	Braga 2005
	France	59-100	Gabet-Giraud, 2010
17 α -éthynylœstradiol	Italie	52-100	Baronti, 2000
	Pennsylvanie	55	Chimchiran, 2007
	France	33-45	Cargouet, 2004
	USA	71-93	Drewes, 2005
Testostérone	USA	81-99	Drewes, 2005
	Japon	100	Ito, 2008
Noréthindrone	Chine	100	Chang et ,Wan 2011
Lévonorgestrel	Canada	48-76	Nasuhoglu,2012

Table 6: Abattement des hormones stéroïdiennes dans des STEP à travers le monde

2.2.2. Données d'occurrence des hormones stéroïdiennes dans les influents et effluents de STEP

Les données de présence des hormones stéroïdiennes d'intérêt, dans les influents et effluents de stations d'épuration sont présentées dans la Table 7.

Composés	Localisation de l'étude	Concentration dans l'influent (g/L)	Concentration dans l'effluent (ng/L)	Référence
Œstrone	Italie	25-132	2,5-82	Baronti 2000
	Canada	19-78	1-96	Servos 2005
	Pays-Bas	20-130	<0,3-11	Vethaak, 2005
	Pennsylvanie	57,8-83,3	6,3-49,1	Chimchiran, 2007
	Australie	ND-18,3	ND-6,7	Tan, 2006
	Chine	19,1-6,5	8,6-0,2	Chang,wan 2011
17 β -Œstradiol	Italie	4,0-25	0,35-3,5	Baronti 2000
	Canada	2,4-26	0,2-14,7	Servos 2005
	Pays-Bas	17-150	<0,8	Vethaak, 2005
	Pennsylvanie	ND-161,6	ND-5,4	Chimchiran, 2007
	Chine	3,8-0,9	0,8-0,2	Chang,wan 2011
17 α -Œstradiol	Pays-Bas	<0,7-15	<0,4	Vethaak, 2005
	Canada	ND-1	ND-38	Fernandez, 2007
	Chine	0,7-1,1	0,1-0,7	Chang,wan 2011
17 α -Ethynylœstradiol	Italie	0,4-13	ND-1,7	Baronti 2000
	France	4,9-7,1	2,7-4,5	Cargouet, 2004

Chapitre 1 : Etat de l'art

	Pays-Bas	<0,3-5,9	<0,3-2,6	Vethaak, 2005
	Pennsylvanie	ND-1,2	ND-0,6	Chimchiran, 2007
	USA	<0,7-14,4	<0,7-4,1	Drewes, 2005
Testostérone	Pennsylvanie	ND-23,8	ND-26,6	Chimchiran, 2007
	Canada	ND-95	ND-21	Fernandez, 2007
	USA	19,4-143	<1-4,9	Drewes, 2005
	Chine	21-76,7	0,2-1,2	Chang,wan 2011
Noréthindrone	Canada	26-224	0-159	Fernandez, 2007
	Chine	12-4,6	ND	Chang,wan 2011
	France	NA	5,2-41	Vulliet, 2007
Lévonorgestrel	Malaisie	ND-1266	ND-16	(Al-Qaim, 2014)
	France	NA	0,9-17,9	Vulliet, 2007
Mifépristone	Chine	0,40-1,62	0,70-0,75	Liu, zhang, yin 2010

Table 7: Occurrence des hormones stéroïdiennes dans des influents et effluents de STEP

Les concentrations mesurées dans les influents de stations d'épuration sont de l'ordre de la dizaine à la centaine de ng/L. Dans les effluents, ces concentrations sont significativement plus faibles, témoignant de l'efficacité des procédés de traitements des eaux usées. Au regard de la quantité d'hormones stéroïdiennes présentes dans les effluents de STEP, il semble nécessaire de mettre l'accent sur les efforts analytiques consentis pour atteindre des concentrations à l'état d'ultra traces dans des matrice si complexes.

2.3. Devenir des hormones stéroïdiennes dans les systèmes aquatiques

2.3.1. Les phénomènes de dégradation en milieu naturel

a) Les phénomènes de biodégradation

Tout comme dans les STEP, en milieu naturel, les hormones stéroïdiennes sont largement biodégradées par les différents microorganismes présents au sein des écosystèmes aquatiques. Writer et al (2011) ont étudié la biodégradation de l'œstrone, de l'œstradiol et de l'éthynylœstradiol dans l'eau, le biofilm et les sédiments. Les auteurs suggèrent que la biodégradation des composés ciblés est contrôlée par le partitionnement sur la matière organique. En effets, même si les phénomènes de biotransformation sont en général très rapides (<1h), l'adsorption sur le biofilm et les sédiments limite considérablement la biodisponibilité des estrogènes, ce qui ralentit inévitablement les processus de transformation biologiques. La biodégradation semble également dépendante des capacités métaboliques des différentes communautés hétérotrophes. Les auteurs soulignent également que les œstrogènes considérés peuvent être minéralisés à la fois dans le biofilms et dans les sédiments. Cependant, les processus de biotransformation induits par les communautés microbiennes présentent dans ces compartiments environnementaux peuvent générer des métabolites intermédiaires qui peuvent encore présenter des propriétés oestrogéniques. A titre d'exemple, les auteurs mentionnent la biotransformation de l'œstradiol en œstrone. Yang 2010, ont également démontré la biodégradabilité de la testostérone dans des conditions environnementales pertinentes. Cependant, tout comme dans le cas des œstrogènes, les

Chapitre 1 : Etat de l'art

produits de dégradation formés (dehydrotestostérone, androstènedione) sont encore préoccupants en raison de leur potentiel de perturbation endocrinienne.

b) Les phénomènes de photodégradation

De nombreuses études relatent le comportement photochimique des hormones stéroïdiennes dans l'environnement aquatique. Des études réalisées en laboratoire, sous lumière naturelle simulée, ont indiqué que l'œstradiol et l'éthynylœstradiol pouvaient être photodégradés dans les eaux de rivière avec des temps de demi-vie d'environ 10 jours (Jürgens, 2002). Dans le milieu marin, les phénomènes de photolyse semblent plus rapides : Zuo et al. (2006) ont évalué des temps de demi-vie inférieur à 1,5 jours pour les deux œstrogènes précédemment mentionnés. De nombreux photoproduits primaires et secondaires ont pu être identifiés, correspondant pour la plupart à des composés phénoliques hydroxylés ou à des composés de type quinone (Mazellier, 2008).

L'œstrone peut être dégradé par la lumière du soleil : un temps de demi-vie de 8h a été observé par Caupos et al (2011). Les auteurs ont démontré que la présence de carbone organique dissous pouvait conduire à une dégradation rapide de l'œstrone. Ce phénomène pourrait être d'une importance majeure, notamment dans les zones épipelagiques des milieux aquatiques. Notons également, qu'en présence d'acides humiques, la vitesse de photodégradation de l'œstrone augmente de manière significative. Ce phénomène peut être attribué à l'induction de la photosensibilisation par des espèces réactives de l'oxygène. Le pH du milieu a également un effet considérable sur le taux de dégradation de cette hormone stéroïdienne, la dégradation maximale survenant à un pH neutre (Chowdhury, 2010).

La testostérone est également soumise aux phénomènes de photolyse. Robert B Young (2013) ont estimé que le temps de demi-vie de cet androgène était compris entre 3,7 et 10,8 heures sous lumière naturelle. Les auteurs ont également montré que la présence de matière organique dissoute dans le milieu pouvait ralentir et inhiber les phénomènes de photodégradation. La photolyse provoque le clivage de l'anneau stéroïde et la formation de photoproduits fortement oxydés, entraînant ainsi une diminution de l'activité androgénique. Plusieurs de ces photoproduits ont par ailleurs pu être identifiés dans le milieu naturel (Vulliet et al, 2013).

2.3.2. Les phénomènes de sorption en milieux naturels

La préoccupation des effets écologiques induits par la présence d'hormones stéroïdiennes dans l'environnement a donné lieu à des travaux de recherches permettant d'évaluer la mobilité et la distribution de ces composés dans les systèmes aquatiques. Linda S. Lee et al (2003). ont conduit des études permettant d'évaluer la sorption simultanée d'hormones stéroïdiennes, dont l'œstradiol, l'éthynylœstradiol, l'œstrone et la testostérone, dans le sol et dans les sédiments d'eau douce. Les auteurs indiquent que l'équilibre de sorption des composés d'intérêts est atteint en quelques heures. Les valeurs de $\log K_{ow}$ calculés lors de cette étude sont comprises entre 3 et 4, indiquant qu'une fraction significative de ces composés sera associée aux sédiments. Les phénomènes de sorption sont

Chapitre 1 : Etat de l'art

toutefois dépendants des caractéristiques de la matière solide telles que la taille des particules (Qi, Zang, Ren, 2014) ou la composition chimique (Chen, 2012, sorption estrone).

2.3.3. Données d'occurrence des hormones stéroïdiennes dans les systèmes aquatiques

a) Données d'occurrence dans les eaux de surface

Les données d'occurrence des hormones stéroïdiennes dans les eaux de surface sont représentées sur la Figure 10.

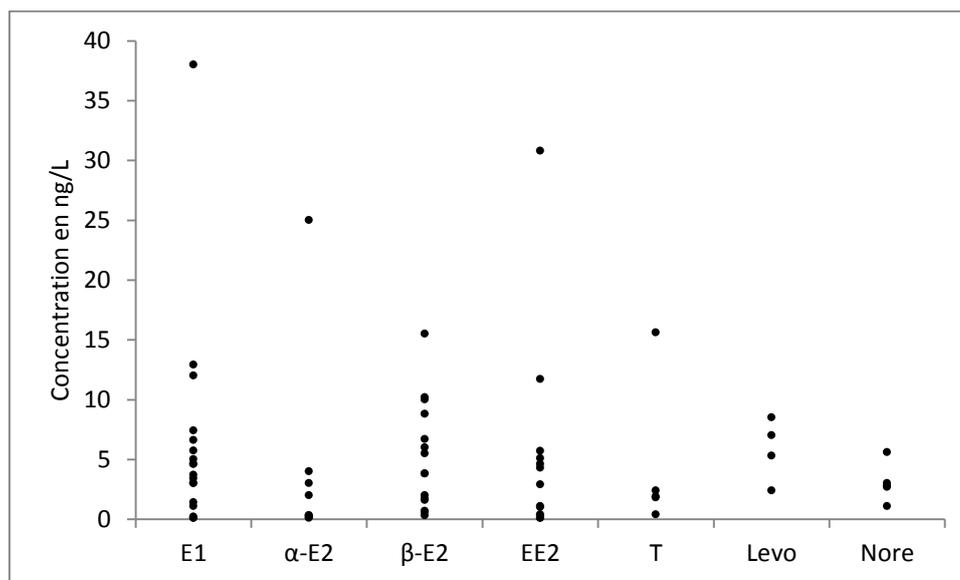


Figure 10: Concentrations des hormones stéroïdiennes d'intérêt dans les eaux de surface à travers le monde

La concentration des hormones stéroïdiennes dans les eaux de surface est globalement faible (<10ng/L).

b) Données d'occurrence dans les sédiments

2.4. Devenir des hormones stéroïdiennes dans les organismes aquatiques

2.4.1. Les phénomènes de bioconcentration et de bioaccumulation

En raison de leur introduction dans les systèmes aquatiques, les hormones stéroïdiennes présentent un risque considérable pour de nombreux organismes. L'étude de la bioaccumulation de ces micropolluants chez les organismes non-cibles est donc une étape cruciale pour déterminer leurs impacts réels sur les écosystèmes aquatiques, mais également pour prédire le potentiel de bioamplification de ces composés par le biais de la chaîne alimentaire. Les facteurs de bioaccumulation (BAF), de bioconcentration (BCF) donnent une mesure de la répartition des composés entre les organismes et leur environnement et/ou leur alimentation. La charge corporelle, qui peut être calculée à partir de ces facteurs de bioaccumulation et de bioconcentration indique la quantité réelle de composé dans l'organisme. A l'heure actuelle, les données disponibles dans la

Chapitre 1 : Etat de l'art

littérature indiquent que l'exposition des poissons à des concentrations environnementales d'hormones stéroïdiennes résulte d'une accumulation qui peut induire des effets indésirables (Knudsen et al, 2011 ; Lavelle and sorensen, 2011). Huang et al, (2015) relatent des BCF compris entre 8 et 40 pour l'œstradiol, et entre 64 et 123 pour l'éthinylœstradiol, chez le carassin (*Carassius Carassius*). A l'inverse des vertébrés aquatiques, pour lesquels les œstrogènes sont impliqués dans la fonction sexuelle, l'existence de récepteurs sexuels chez les invertébrés n'a pas été démontrée (Köhler et al, 2007). Le développement et la différenciation des caractéristiques sexuelles chez les insectes ne sont pas sous contrôle hormonal alors qu'ils sont régis par les androgènes chez les crustacés (Defur et al 1999, nijhout, 1994). Ainsi, les invertébrés aquatiques devraient être peut sensibles aux œstrogènes. Dussault et al, 2009 ont cependant démontré la capacité de deux invertébrés benthiques (*Chironomus tentans* et *Hyaella azteca*) à accumuler l'éthinylœstradiol. Les auteurs relatent des facteurs de bioaccumulation compris entre 18 et 215 pour la larve d'insecte et entre 34 et 142 pour l'amphipode. En revanche, l'adsorption de cette hormone par *Chironomus tentans* était significativement supérieure à celle d'*Hyaella azteca* lorsque l'exposition se faisait par l'intermédiaire de sédiments dopés. Ces résultats mettent en évidence la nécessité de prendre en compte les différentes voies d'exposition ainsi que le comportement et les traits de vie des différentes espèces présentes au sein des systèmes aquatiques. L'exposition à travers des proies contaminées pourrait être à l'origine de risque important pour les vertébrés aquatiques sensibles aux estrogènes. Il semble donc nécessaire d'étudier l'accumulation de ces hormones stéroïdiennes dans d'autres organismes aquatiques et d'évaluer les relations entre accumulation, niveau trophique et facteurs spécifiques à chaque espèce (métabolisme et physiologie).

Bien que la bioaccumulation des hormones synthétiques soit peu étudiée chez les organismes aquatiques, certains auteurs ont pu mettre en évidence l'accumulation du lévonorgestrel chez la moule (*dreissena polymorpha*) (Contardo-jara, 2011). Les auteurs rapportent des facteurs de bioconcentration bien plus importants que dans le cas des œstrogènes (29,8<BCF<350).

2.4.2. Les phénomènes de biotransformation

Les voies d'élimination métaboliques des hormones stéroïdiennes sont dépendantes de l'organisme considéré mais également des facteurs environnementaux. Ces effets biochimiques ont le potentiel de modifier l'homéostasie des hormones stéroïdiennes, mais également d'impacter les processus hormono-dépendants tels que la croissance, le développement et la reproduction. Parks et al. (1998) ont étudié les procédés de biotransformation de la testostérone chez le méné à tête de boule (*Pimephales promelas*). Les auteurs mettent en évidence une variété de métabolites, incluant des dérivés d'oxydo-réduction, d'hydroxylation, ou encore de conjugaison. Les mâles, les femelles et les juvéniles semblent éliminer la testostérone à la fois sous forme libre et conjuguée. Cependant, les femelles éliminent les androstane-diols plus rapidement que les mâles. De la même manière, les auteurs rapportent une cinétique de métabolisation plus rapide chez les juvéniles que chez les adultes.

Chapitre 1 : Etat de l'art

Labadie et al. (2007) ont étudié l'adsorption et le métabolisme de deux substances œstrogéniques, l'œstrone et l'œstradiol, chez la moule (*M. edulis*). Ils ont été les premiers à rapporter la nature des métabolites formés *in vivo* chez un invertébré. Les auteurs ont ainsi démontré que la moule métabolisait rapidement l'œstrone en œstradiol. Ils ont également mis en évidence la conjugaison de ces composés avec des esters d'acide gras (C16), ce qui prouve que la C17-kétoreductase et la C16-acyltransférase sont des enzymes importantes pour le métabolisme des œstrogènes chez les invertébrés aquatiques. Il semblerait donc que les voies de métabolisation des hormones œstrogéniques chez les invertébrés diffèrent de celles des vertébrés. Chez les vertébrés, on observe la formation de conjugués glucuronidés ou sulfatés polaires, alors que chez les invertébrés les œstrogènes sont estérifiés pour former des conjugués lipophiles d'acides gras à longue chaîne carbonée.

2.5. Toxicité et effets des hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes sont des molécules capables d'agir à très faibles doses. Leur présence dans les milieux aquatiques, même à l'état de traces, peut induire une réponse chez les organismes possédant des récepteurs spécifiques, et par conséquent fortement perturber l'équilibre des écosystèmes. Des études menées sur des poissons ont montré que des concentrations de l'ordre de 1 ng/L de β -E2 peuvent induire des effets perturbateurs endocriniens (Hansen et al, 1998) et notamment impacter la production des spermatozoïdes chez les espèces considérées (Adeoya-Osiguwa et al, 2003). De même, la capacité de EE2 à modifier la fécondité des poissons et de mollusques a été démontrée à des concentrations environnementales (Jobling et al, 2003 ; Gutjahr-Gobell 2006). Il semblerait que β E2 et EE2 soient les œstrogènes possédant le plus fort effet perturbateur endocrinien, devant E1 et α E2 (Tanaka et al, 2001). Au cours des dernières années, de nombreux travaux ont décrit les effets perturbateurs endocriniens des œstrogènes chez les poissons, cependant, il existe peu d'études relatant d'effets similaires chez les invertébrés aquatiques. Breitholtz et al. ont étudié l'impact de EE2 et β E2 sur la mortalité, le développement, la fécondité et la reproduction d'un crustacé (*Nitocra spinipes*). Les auteurs notent qu'aucun des deux œstrogènes n'induit des effets mesurables. Luna et al (2013) ont également démontré que le EE2 ne causait pas d'effet sur la reproduction du gastéropode d'eau douce (*Physa pomilia*), cependant ils ont mis en évidence une diminution du taux de croissance de la population lorsque celle-ci était exposée au mélange EE2/fluoxétine. Ces résultats soulignent l'importance de tester des expositions simultanées de plusieurs perturbateurs endocriniens afin de simuler au mieux la pollution des milieux naturels.

Barbosa et al. (2008) ont évalué la toxicité de la testostérone chez la daphnie (*Daphnia magna*). En dessous de sa limite de solubilité dans l'eau, cet androgène n'a pas induit de toxicité aiguë. En revanche, les tests de toxicité chronique ont révélé une diminution significative de la fécondité. Notons cependant que les effets de toxicité chronique ont été observés à des concentrations plus élevées que les concentrations mesurées dans l'environnement. Néanmoins, les auteurs soulignent que l'altération de la reproduction des daphnies est susceptible de se produire dans le milieu naturel et pourrait être associée à l'ultime réponse d'une exposition à long terme.

Chapitre 1 : Etat de l'art

Pour les poissons exposés au lévonorgestrel, aucune NOEC n'a pu être établie : une inhibition de la reproduction a lieu, même à des concentrations inférieures à 1 ng/L (Zeilinger et al, 2009). Une exposition à des concentrations plus importantes provoque une masculinisation des femelles (Fick et al, 2010).

En ce qui concerne les effets des hormones contraceptives sur les invertébrés aquatiques, une expérience de 7 jours n'a révélé aucun effet de l'éthinylœstradiol et de la medroxyprogestérone sur la fécondité du crustacé aquatique *Ceriodaphnia dubia*, à des concentrations comprises entre 5 µg/L et 5 mg/L (Jukosky, 2008), alors que l'exposition au mélange de l'éthinylœstradiol et de la noréthindrone (6 ng/L et 94 ng/L, respectivement) a diminué de manière significative le nombre de descendants chez *daphnia magma* (Hiromi goto 2003). L'accumulation du lévonorgestrel chez la moule (*Dreissena polymorpha*) induit une perturbation des fonctions fondamentales des cellules qui pourrait impacter directement la reproduction et la croissance des organismes (Contardo-jara 2011).

2.6. Aspects législatifs et réglementaires

A l'instar des substances pharmaceutiques, les hormones synthétiques, utilisées comme traitement de supplémentation ou comme contraceptifs, sont soumis à autorisation de mise sur le marché (AMM). Au regard de la réglementation visant à préserver les masses d'eaux européennes, on note que le 17β-œstradiol et le 17α-éthinyloœstradiol sont aujourd'hui inclus dans la liste de surveillance de la DCE. Ces substances sont donc soumises à révision pour leur possible identification comme substances prioritaires ou comme substances dangereuses prioritaires. Cependant, les valeurs de Norme de Qualité environnementale du texte publié en 2013 sont extrêmement basses, respectivement à 400 pg/L pour β-E2 et à 35 pg/L pour EE2. Notons qu'aujourd'hui, les verrous analytiques sont tels que la quantification de ces substances à ces teneurs devient particulièrement difficile.

3. Les agents industriels

3.1. Les perfluoroalkyls : PFOA et PFOS

3.1.1. Généralités et propriétés physico-chimiques

a) Historique

L'émergence des produits perfluorés doit son incroyable ascension au prix Nobel de chimie de 1906, Henri Moissan, qui fut le premier à isoler l'élément Fluor. La première synthèse de polymères polyfluorés fait son apparition en 1938, sous forme de polytétrafluoroéthylène (PTFE) synthétisé par un jeune chimiste américain Roy Plunkette (Lindstrom, 2011). Le PTFE est fabriqué à partir de l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) utilisé en tant qu'adjuvant (Lehmler, 2005). Il fut tout d'abord utilisé comme joint d'étanchéité de bombe nucléaire lors de la Seconde Guerre Mondiale par l'armée américaine du fait de sa résistance aux acides corrosifs utilisés pour la production de l'uranium 235. En 1949, la compagnie Dupont dépose la célèbre marque Téflon[®]. Le Téflon[®] étant un mélange de PTFE et d'autres fluoropolymères. En 1956, la compagnie 3M lance alors le procédé scotchgard[®]

Chapitre 1 : Etat de l'art

utilisé comme traitement de protection de tissus dont l'ingrédient clef est le perfluorooctane sulfonate (PFOS) (Betts, 2007).

Ainsi, depuis leurs premières applications industrielles, l'utilisation de PFOA et de PFOS a connu un essor considérable. Aujourd'hui, leur production tend à décroître du fait des nombreux problèmes sanitaires et environnementaux liés à l'utilisation de ces composés chimiques et des récentes réglementations légiférant leurs applications.

b) Définitions et classification

Les alkyls perfluorés (PCF) ou perfluoroalkyls sont des composés aliphatiques dont tous les atomes d'hydrogène présents sur les atomes de carbone de la chaîne alkyle ont été substitués par des atomes de fluor, excluant les atomes présents sur le groupement terminal. Ils sont donc constitués d'une chaîne alkyle hydrophobe de longueur variable (typiquement de C4 à C16) et généralement fonctionnalisé par un groupe terminal hydrophile. Le PFOA et le PFOS sont les deux substances perfluoroalkyles les plus connues. On note également l'existence de substances polyfluoroalkyles. Contrairement aux perfluoroalkyls, les polyfluoroalkyls sont des substances aliphatiques où tous les atomes d'hydrogène ont été substitués sur quelques atomes de carbone de la chaîne alkyle par des atomes de fluor. Ces molécules sont donc constituées d'un fragment perfluoroalkyl C_nF_{2n+1} mais également d'un fragment CH₂-CH₂. Les substances poly et perfluoroalkyls sont souvent désignées par l'abréviation PFAS dans la littérature (Buck, 2011).

De façon schématique, les alkyls perfluorés peuvent être classés en 4 catégories :

- La famille des acides perfluoroalkyles (PFAA) qui regroupe :
- les acides perfluoroalkyles carboxyliques (PFCA) : ce sont des composés perfluorés comportant à l'extrémité de leur chaîne carbonée une fonction carboxylique. Les principaux représentants sont le PFOA et l'acide perfluorononanoïque (Table 8).

Formule Chimique	n	Non	Abréviation
	1	Acide perfluoropropanoïque	PFPrA
	2	Acide perfluorobutanoïque	PFBA
	3	Acide perfluoropentanoïque	PFPeA
	4	Acide perfluorohexanoïque	PFHxA
	5	Acide perfluoroheptanoïque	PFHpA
	6	Acide perfluorooctanoïque	PFOA
	7	Acide perfluorononanoïque	PFNA
	8	Acide perfluorodécanoïque	PFDA
	9	Acide perfluoroundécanoïque	PFUnA

Chapitre 1 : Etat de l'art

	10	Acide perfluorododécanoïque	PFDoA
	11	Acide perfluorotridécanoïque	PFTrA

Table 8: Noms et nomenclatures des principaux PFCA

- les acides perfluoroalcanes (ou alkyle) sulfonique (PFSA) : ce sont des composés perfluorés comportant une fonction sulfonate à l'extrémité de leur chaîne carbonée. Le principal représentant est le PFOS. Les formules chimiques, les noms et les abréviations courantes des principaux PFSA sont présentés dans la Table 9.

Formule chimiques	n	Non	Abréviation
	2	Sulfonate de perfluorobutane	PFBS
	5	Sulfonate de perfluorohexane	PFHxS
	6	Sulfonate de perfluoroheptane	PFHpS
	7	Sulfonate de perfluorooctane	PFOS
	9	Sulfonate de perfluorodécane	PFDS

Table 9: Noms et nomenclatures des principaux PFSA

- les acides perfluoroalcanes (ou alkyle) sulfinique (PFSiAs) : ce sont des composés perfluorés comportant un groupement $-SO_2H$ à l'extrémité de leur chaîne carbonée.
- les acides perfluoroalkyles phosphonique (PFPA) : ce sont des composés perfluorés comportant un groupement $-P(=O)(OH)_2$ à l'extrémité de leur chaîne carbonée.
- les acides perfluoroalkyles phosphinique (PFPIA) : ce sont des composés perfluorés comportant un groupement $-P(=O)(OH)(C_mF_{2m+1})$ à l'extrémité de leur chaîne carbonée.
- La famille des fluorotélomères :
 Les fluorotélomères sont des composés perfluorés comportant généralement une chaîne carbonée de petite taille (2 atomes de carbone le plus souvent). On distingue plusieurs sous-catégories de fluorotélomères dont les alcools (FTOH), les oléfines (FTO), les iodures (FTI), les sulfonates (FTS), les acrylates (FTA), les cétones (FTK), mais également les aldéhydes et les époxydes.
- La famille des dérivés sulfonamido perfluoroalcanes qui regroupe les perfluoroalcanes sulfonamides, sulfonamidoéthanol, sulfonamidoéthyl acrylates et sulfonamidoéthyl méthacrylates. Ils jouent un rôle analogue à celui de précurseur dans la fabrication des PFSA (ex : PFOS), mais aussi de tous les composés ayant dans leur structure un groupe perfluoroalcane sulfonamido $C_nF_{2n+1}SO_2N$.

Chapitre 1 : Etat de l'art

- La famille des acides perfluoroalkyles et polyfluoroalkyles carboxyliques éthers dont les sels sont notamment utilisés comme matériaux alternatifs dans la fabrication des fluoropolymères.

Plus récemment, (Ruan et al, 2010) ont mis en évidence l'usage de composés iodés complètement perfluorés dans plusieurs secteurs industriels (PFI) (Table 10).

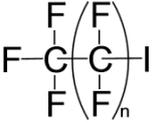
Formule Chimique	n	Nom	Abréviation
	5	Iodure de perfluorohexane	PFHxI
	7	Iodure de perfluorooctane	PFOI
	9	Iodure de perfluorodécane	PFDI
	11	Iodure de perfluorododécane	PFDol

Table 10: Noms et nomenclatures des principaux PFI

Le sulfonate de perfluorooctane (PFOS), molécule de choix pour cette étude, appartient à la famille des PFC et à la sous famille des PFSA. Les dérivés du PFOS comprennent un grand nombre de molécules. Certains organismes en charge de la problématique en dénombrent de 56 à 175, cette variabilité est notamment due aux différentes manières de définir ce qu'est réellement un dérivé du PFOS. La principale différence réside dans le fait que certains organismes considèrent uniquement les substances qui présentent les structures $C_8F_{17}SO_2$ et/ou $C_8F_{17}SO_3$ alors que d'autres prennent en compte toutes les substances pouvant potentiellement former du sulfonate de perfluorooctane. La terminologie utilisée dans ce mémoire est issue de la réglementation européenne et française :

- PFOS : pour le sulfonate de perfluorooctane ainsi que les sels et l'acide libérant en solution l'ion sulfonate de perfluorooctane (hormis le cas où l'acide et un des sels sont spécifiquement mentionnés)
- Substance apparentées et/ou dérivées et/ou précurseurs du PFOS ; pour les composés pouvant former le sulfonate de perfluorooctane lors de leur dégradation.

L'acide perfluorooctanoïque (PFOA), second alkyl perfluorés retenu pour cette étude, appartient à la famille des PFC et à la sous-famille des PFCA. Dans la littérature, l'abréviation PFOA est un terme générique qui peut représenter à la fois la forme acide et les sels. Nous utiliserons ici ce terme pour désigner l'ensemble de ces composés.

Les alkyls perfluorés sont élaborés principalement à partir de deux méthodes : la fluoration électrochimique (ECF) et la télomérisation (Prevedourous et al, 2006, Buck et al. 2011) dont les principes sont détaillés en Annexe 3.

Chapitre 1 : Etat de l'art

c) Domaines d'usage et applications

De par leurs propriétés physico-chimiques particulières, les alkyls perfluorés entrent dans la composition de nombreux produits. Ils sont principalement utilisés en tant que surfactants et peuvent servir d'émulsifiants ou de dispersants. Ils sont ainsi retrouvés dans une large gamme de produits de consommation courantes comme le papier, les boîtes de conserves, certains produits cosmétiques ou en tant que revêtement imperméabilisant de chaussures. Ingrédients clés de la synthèse de certains polymères, ils contribuent à la fabrication de nombreux plastiques (PTFE, PVDF) (Banks RE, 1994 ; Kissa 1994, 2001).

Les utilisations mentionnées ci-dessus, de manière non exhaustive, illustrent la situation au début des années 2000. De par l'évolution de la réglementation, certaines de ces utilisations n'ont plus lieu d'être au jour de la rédaction de ce manuscrit. Selon la durée de vie des produits pouvant contenir des alkyls perfluorés, il est toutefois possible qu'un certain nombre d'entre eux soient encore en usage. Les utilisations récentes au sein de l'Union Européenne se limitent aux applications pour lesquelles aucune alternative appropriée n'a été trouvée (OSPAR 2005) : industrie photographique, photolithographie, traitement de surface des métaux, fluides hydrauliques et fabrication de semi-conducteurs.

d) Données de consommation

Depuis le début des années 2000, l'OCDE suit la fabrication et l'utilisation de PFOS, de PFOA et d'autres produits ou mélanges contenant ces substances. D'après l'enquête de 2004, plus de 3000 tonnes de composés de PFOS aurait été fabriquées ou importées en 2003. L'Union européenne estimait un volume pouvant aller jusqu'à 10 000 tonnes pour l'ensemble des produits surveillés. L'enquête de 2006 indiquait, quant à elle, une quantité de PFOS et de substances apparentées comprise entre 74 et 175 tonnes (OCDE, 2006). Ces différentes enquêtes, bien que présentant une forte variabilité, montrent que l'utilisation de ces substances est en forte diminution. En 2009, seuls quatre PFOS et substances apparentées ont été signalés comme ayant été produits en 2008 dans les pays de l'OCDE (OCDE, 2009). Au jour de la rédaction de ce manuscrit, même s'il est impossible d'exclure une potentielle production de ces substances en Europe celle-ci ne peut être que très marginale. Il semblerait qu'actuellement seule la Chine produise encore des quantités importantes de ces substances. D'après le programme « Arctic pollution 2009 », elle était le leader mondial (AMAP, 2009) de production de PFOS en 2009.

e) Propriétés physico-chimiques des perfluoroalkyls d'intérêt

La liaison carbone-fluor est une des liaisons les plus fortes (≈ 450 kJ/mol), conférant ainsi aux alkyls perfluorés une très grande stabilité. La force de cette liaison augmente avec le nombre de fluor autour de la liaison carbone (Kissa 1994, 2001). La plupart de ces molécules possèdent un groupement hydrophile (groupement fonctionnel) et un groupement hydrophobe (chaîne carbonée), ce qui leur confère un caractère amphiphile. Cependant, la plupart d'entre eux sont non miscibles

Chapitre 1 : Etat de l'art

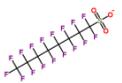
dans l'eau et les solvants hydrocarbonés, créant ainsi une troisième phase. Par conséquent les coefficients de partage octanol-eau du PFOA et du PFOS ne peuvent être calculés (Lehmler, 2005).

Le sel potassique du PFOS a une solubilité moyenne dans l'eau ultra-pure de 680 mg/L (Giesy et al 2010). Comme il s'agit d'un acide fort, il est principalement sous sa forme ionisée dans une eau à pH neutre et peut donc établir facilement des liaisons ioniques avec des cations présents dans le milieu. Ceci diminue sa solubilité qui passe de 370 mg/L dans une eau continentale à 12,4 mg/L dans une eau de mer (Giesy, 2010).

Bien que la valeur officielle du pKa du PFOA, disponible sur les fiches de données de sécurité de l'INERIS, soit fixée à 2,5, cette valeur est sujette à controverse. Suivant les études, elle oscille entre 0 et 3,8 (Burns et al. (2008)) (Table 11). Cependant, cette absence de consensus sur le pKa est d'une importance négligeable dans le cadre de notre étude compte-tenu du pH des différents compartiments environnementaux (rarement inférieur à 6). Dans ce contexte, nous pouvons estimer que le PFOA, tout comme le PFOS, sont principalement sous leur forme anionique dans les milieux aquatiques.

En 2006, Higgins et Luthy publient une étude relative à la sorption de surfactants perfluorés sur des sédiments naturels. Cette étude permet de déterminer la valeur des coefficients de partition ($\log K_{oc}$) pour le PFOA et le PFOS (Table 11). Elle met également en exergue l'influence des paramètres physico-chimiques du milieu sur les phénomènes de sorption (structure des particules de sédiments, carbone organique, pH, dureté...) ainsi que l'influence de la longueur de la chaîne carbonée des composés perfluorés d'intérêts. Des études plus récentes (Ahrens, 2010, Munoz 2015) tendent à confirmer ces observations et témoignent de la nécessité d'améliorer notre compréhension vis-à-vis des processus qui contrôlent le comportement et le devenir des alkyls perfluorés au sein des écosystèmes aquatiques. Ces comportements ont un impact non négligeable sur leur biodisponibilité et leur toxicité.

Le tableau ci-dessous apporte une synthèse des différentes propriétés physico-chimiques du PFOA et du PFOS. Le PFOS n'existant pas sous sa forme moléculaire, c'est un ion qui existe uniquement en solution, il ne possède pas de numéro CAS.

Non d'usage	Numéro CAS	Formule moléculaire	Structure	Masse molaire g/mol	pKa	Solubilité aqueuse (à 25°C)	Log K_{oc}
Acide perfluorooctanoïque (PFOA)	335-67-1	$C_8HF_{15}O_2$		414,07	0-3,8 (Burns, 2008)	9,5 g/l	2,06 (Higgins and Luthy, 2006)
Sulfonate de perfluorooctane (PFOS)	Inexistant	$C_8F_{17}SO_3^-$		499,12	-3,3 (valeur calculée pour l'acide) Brooke et al	680 mg/L (valeur calculée pour le sel potassique)	2,48 (higgins and luthy, 2006)

Chapitre 1 : Etat de l'art

					2004	de PFOS)	Valeur pour la forme anionique
--	--	--	--	--	------	----------	--------------------------------

Table 11: Structure et caractéristiques physico-chimiques du PFOA et du PFOS

3.1.2. Les sources de contamination environnementale

Les alkyls perfluorés sont introduits dans l'environnement via deux types de sources : les sources d'émission directe et indirecte.

Les sources de pollution indirecte sont liées à la dégradation environnementale de certains composés perfluorés qualifiés de précurseurs. A titre d'exemple, la biotransformation de l'alcool 8 :2 fluorotélomère (8 :2FTOH) ou la dégradation atmosphérique du perfluorobutane sulfonamidoéthanol (C4F9COOH) sont à l'origine de la formation de PFOA (Buck, 2011).

Les sources d'émission directe correspondent à la fabrication des produits manufacturés, à l'élimination, aux usages mais aussi aux impuretés de fabrication. Elles sont directement liées au cycle de vie des produits. Les effluents industriels, les lixiviats de décharges et les effluents de stations d'épuration urbaines et industrielles sont ainsi à l'origine de la dissémination d'alkyls perfluorés dans l'environnement.

Les émissions totales, incluant les sources d'émission directe et indirecte, de substances à base de fluorure de perfluorooctylsulfonyle, utilisées comme intermédiaires de synthèse de plusieurs substances per et poly fluoroalkyles ont été estimées entre 6800 tonnes et 45300 tonnes entre 1972 et 2002, tandis que les émissions totales de perfluoroalkylcarboxylates variaient de 3200 tonnes à 7300 tonnes (1951-2004) (Ahrens et Bundschuh, 2014). Après 2002, on observe une diminution des émissions de composés chimiques à base de fluorure de perfluorooctylsulfonyle qui peut être corrélée à l'arrêt de la production de PFOS par la société 3M et au contexte réglementaire qui sera détaillé dans la suite de ce manuscrit. Les projections sur les émissions de perfluoroalkylcarboxylates mettent en évidence une possible diminution de celles-ci. Elles pourraient être comprises entre 20 et 6420 tonnes entre 2016 et 2020 (wang 2014). Cependant, la libération de substances perfluoroalkyles à longue chaîne dans le milieu aquatique pourrait se poursuivre à l'avenir lors de la dégradation d'autres produits fluorés (i.e. fluorotélomères) ou à partir des produits historiques encore en usage à l'heure actuelle mais qui seront inévitablement mis au rebus un jour ou l'autre.

Plus de 95% des émissions de substances poly et perfluoroalkyles a lieu dans l'environnement aquatique. Bien que les émissions ayant lieu dans l'atmosphère soient plutôt faibles (5%), cette source de pollution ne peut être considérée comme négligeable au regard de la contamination de nos écosystèmes aquatiques. En effet, certains composés poly et perfluoroalkyles sont volatiles : ils entrent dans l'atmosphère, où ils peuvent être dégradés lors de processus d'oxydation atmosphérique et former ainsi des perfluoroalkyls plus persistants comme les PFSA et les PFCA. Ces micropolluants persistants peuvent ensuite être transportés dans les systèmes aquatiques *via* les retombées atmosphériques.

Chapitre 1 : Etat de l'art

Le ruissellement provenant de zones agricoles ou urbaines, contaminées par l'application de biosolides ou de dépôts atmosphériques peut également être considéré comme une source de pollution diffuse non négligeable.

Les stations d'épuration industrielles et municipales sont, quant à elles, considérées comme la principale voie d'introduction des perfluoroalkyls dans les systèmes aquatiques. Le rejet total des PFAS en provenance des STEP est compris entre 10 et 10 000 g/j (Ahrens and Bundschuh, 2014).

a) Efficacité des procédés de traitements mis en œuvre dans les STEP

Au regard de la littérature, les traitements conventionnels semblent peu efficaces pour assurer l'élimination des perfluoroalkyls. De nombreuses études ont examiné la distribution et le devenir de ces composés fluorés durant les processus de traitement des eaux usées. Les concentrations du PFOA et du PFOS sont souvent plus importantes dans les effluents que dans les influents de station d'épuration. Les phénomènes intervenant lors des procédés de traitement biologique (i.e. boues activées) entraînent la biodégradation de certains composés fluorés, provoquant ainsi la formation de PFOA et de PFOS. A titre d'exemple, le PFOA peut provenir de la biodégradation de l'alcool 8 :2 fluorotélomère alors que le PFOS résulte de la biodégradation du 2-(N-éthylperfluorooctanesulfonamido) éthanol (Lange 2002, Martin 2004).

Les phénomènes de sorption déterminent le devenir de ces composés dans les stations d'épuration (Zareitalabad, 2013). Ainsi, le PFOA est majoritairement contenu dans la phase aqueuse alors que la moitié du PFOS est retenue dans les boues (Becker et al, 2010 ; Guo 2010 ; Huset 2008).

b) Données d'occurrence du PFOA et PFOS dans les influents et effluents de STEP

D'après une récente étude consacrée à la surveillance de polluants émergents dans les effluents de stations d'épuration européenne, le PFOA est l'un des composés les plus souvent détecté : les auteurs rapportent une fréquence de détection proche de 99% (Loos, 2013). Ce composé perfluoré présente également un niveau de concentration médian élevé (12,9 ng/L), proche de celui du PFOS (12,2 ng/L). Parmi tous les PFAS recherchés lors de cette étude, le PFOA affiche l'une des concentrations maximales mesurées les plus importantes (15,9 µg/L). Le PFOS arrive, quant à lui, en cinquième position avec une concentration maximale mesurée équivalente à 2,1 µg/L. Notons cependant que les concentrations maximales correspondant au PFOA et au PFOS ont été mesurées dans des effluents de stations d'épuration industrielles.

Des niveaux de concentration similaires, de l'ordre du ng/L, ont été rapportés dans la littérature (Table 12).

Localisation	Concentration du PFOA dans les effluents de STEP (min-max) en ng/L	Concentration du PFOS dans les effluents de STEP (min-max) en ng/L	Références
Europe	<1-15940	<0,5-2101	Loos, 2013
USA	58-1050	3-68	Sinclair Kannan 2006
Danemark	<2-115,4	<1-1115	Bossi 2008

Chapitre 1 : Etat de l'art

Suisse	12-35	16-303	Huset 2008
Allemagne	9-93	12-336	Becker, 2008,2010
Japon	10-68	42-635	Marakami 2009
Corée	3,4-591	ND-8,9	Guo, 2010
Chine	3-191	1-75	Chen 2012
Hong-Kong	ND-4,1	19-50	Ma et Shih 2010

Table 12: Teneurs en PFOA et PFOS dans les effluents de STEP à travers le monde

3.1.3. Devenir du PFOA et du PFOS dans l'environnement

La persistance du PFOA et du PFOS dans l'environnement est aujourd'hui un fait avéré et reconnu depuis longtemps. Des études ont ainsi mis en évidence l'extrême résistance du PFOS aux attaques biologiques et chimiques (Key et al, 1998, Vecitis, 2009 ; Liu and Majia Avendano, 2013). De plus, aucune preuve expérimentale de la photolyse directe ou indirecte du PFOS n'est encore disponible (Hatfield 2001). Liou et al, 2010, ont évalué la biodégradabilité du PFOA. Les auteurs concluent que ce composé perfluoré ne peut être dégradé de manière naturelle par des microorganismes. L'absence de produits de dégradation a été confirmée par spectrométrie de masse haute résolution, en outre supportée par l'absence de production de fluorure.

Le devenir du PFOA et du PFOS dans l'environnement semble donc régi exclusivement par les phénomènes de transport à longue distance et par les phénomènes de sorption qui déterminent leurs distributions au sein des différents compartiments environnementaux.

a) Les phénomènes de transport à longue distance

Plusieurs études ont mis en évidence la présence de PFAS au niveau des pôles suggérant un transport de ces composés à longue distance. Giesy and Kannan (2001) ont montré la présence de PFOS chez des phoques, otaries et ours polaire provenant de régions polaires très reculées. Yamashita et al. (2005) ont également mis en évidence la présence de PFOS et de PFOA dans les océans Atlantique et Pacifique en surface mais aussi en profondeur (1000-4400m). Ces résultats semblent suggérer le rôle majeur des courants océaniques dans le transport de ces composés à partir des zones côtières. La contamination de ces régions éloignées est d'un ordre de grandeur de un à deux fois plus élevée dans la phase aqueuse que dans la phase aérienne (Ahrens and Bundschuh, 2014; Shoeib et al., 2006; Wania, 2007; Yamashita et al., 2008). Cependant le moyen de transport à longue distance des perfluoroalkyls fait aujourd'hui débat. Le transport *via* la phase aqueuse semble dominant pour les PFAS ionisables, alors que le transport par voie atmosphérique semble être privilégié pour les PFAS volatiles (Ahrens, 2011).

b) Les phénomènes de sorption en milieux naturels

La sorption des composés perfluorés dans les sédiments détermine leur devenir et leur distribution au sein des écosystèmes aquatiques. Bien que le PFOA et le PFOS possèdent tous les deux la capacité à s'accumuler dans les sédiments, il semblerait que le PFOS présente une affinité plus importante avec les matrices solides que le PFOA (Higgins 2006). Cependant, la distribution de ces PFAS entre la

Chapitre 1 : Etat de l'art

phase aqueuse et la phase solide des systèmes aquatiques fait aujourd'hui débat. En effet, une récente review met en évidence les différences significatives existant entre les valeurs de K_{oc} déterminées en laboratoire et celles pouvant être calculées à partir des données de concentration mesurées dans les eaux de surface et dans les sédiments (Zareitalabad, 2013). Les auteurs concluent que les expériences en laboratoire ne reflètent pas totalement la distribution réelle du PFOA et du PFOS en milieu naturel. Elles conduiraient à une surestimation des concentrations de ces composés perfluorés dans la phase aqueuse et à l'inverse à une sous-estimation des concentrations dans les phases solides. Malgré l'absence de consensus sur les valeurs de K_{oc} du PFOA et du PFOS, il semblerait que la communauté scientifique soit unanime quant à la complexité des phénomènes de sorption en milieu naturel, dépendant de nombreux paramètres comme le pH (Higgins, 2006) ou la salinité du milieu (You, 2010), la teneur en carbone organique des sédiments (Munoz, 2015) ou encore la nature du groupe fonctionnel du composé considéré (Higgins, 2006).

c) Données d'occurrence du PFOA et du PFOS dans les systèmes aquatiques

De nombreuses données relatives à l'occurrence du PFOA et du PFOS sont disponibles dans la littérature. Leur répartition géographique au sein des écosystèmes aquatiques est très large, elle s'étend jusqu'aux pôles. La review de Zareitalabad et al. (2013) regroupe plus de 400 résultats relatifs aux concentrations environnementales de ces perfluoroalkyls à l'échelle mondiale. Ces deux composés sont globalement présents à hauteur de quelques ng/L dans les eaux de surface. Les concentrations les plus élevées ont été mesurées aux Etats-Unis et correspondent à plusieurs dizaines de ng/L en moyenne. A l'inverse, parmi les 10 pays considérés, le Canada et le Brésil présentaient les concentrations les plus faibles (< 1 ng/L). En 2009, l'ANSES a réalisé une campagne nationale visant à déterminer l'occurrence des composés perfluorés dans les eaux destinées à la consommation humaine, notamment les eaux de surface (ANSES, 2011). Sur les 135 échantillons analysés, le PFOS est la molécule la plus fréquemment quantifiée, avec une fréquence de quantification de 36%, suivi par le PFOA (11% des échantillons). Les concentrations associées sont de l'ordre de quelques ng/L à quelques dizaine de ng/L.

Les données relatives à la présence de ces contaminants environnementaux dans les sédiments sont plus rares que pour les matrices aqueuses. Les concentrations médianes extraites des données présentes dans la review de Zareitalabad et al. (2013) sont de 0,3 ng/g pour le PFOA et 0,5 ng/g pour le PFOS. En 2012, dans le cadre national de l'Etude Prospective sur les Contaminants Emergents financé par le ministère de l'écologie et l'ONEMA, la distribution spatiale et la répartition de 22 substances perfluorées dans 133 rivières et lacs français ont été étudiées (Munoz et al. 2015). La fréquence de détection du PFOA s'élevait à environ 16% avec des concentrations mesurées comprises entre 0,11 et 1,1 ng/g (poids sec). La fréquence de détection du PFOS était cependant beaucoup plus importante que pour le PFOA (75%), de même que pour les concentrations mesurées (< 0,01 – 17 ng/g (poids sec)). Les auteurs mettent également en évidence une corrélation entre la présence de ces contaminants et celles de grande agglomérations et/ou de sites industriels.

3.1.4. Devenir du PFOA et du PFOS dans les organismes aquatiques

a) Les phénomènes de bioconcentration et de bioaccumulation

Les phénomènes de bioconcentration et de bioaccumulation des PFAS au sein des organismes aquatiques dépendent des conditions du milieu (teneur en carbone organique, température, salinité) et des propriétés physico-chimiques des molécules. Ces dernières sont principalement déterminées par la longueur de chaîne des PFAS et leurs groupements fonctionnels. Par exemple, les courtes chaînes sont surtout hydrophiles et sont généralement mobiles dans les hydrosystèmes, tandis que les composés à plus longues chaînes sont hautement hydrophobes, ils ont tendance à se lier aux particules et ont un potentiel important de bioaccumulation (Ahrens and Bundschuh, 2014). Contrairement à certaines molécules lipophiles persistantes et bioaccumulables, le caractère amphiphile des composés perfluorés étudiés leur confère une capacité de bioconcentration et de bioaccumulation très complexe et encore mal connue. Il semblerait que les PFAS aient plus d'affinités pour les tissus riches en protéines comme le sang, les muscles ou encore le foie (Kelly et al., 2009; Luebker et al., 2002). Cependant, la distribution des PFAS dans les tissus pourrait être fortement influencée par la présence de phospholipides, ces derniers étant les constituants essentiels des membranes cellulaires et associés aux tissus riches en protéines (Armitage, 2012). Ainsi, la distribution tissulaire des PFAS dans diverses espèces de poisson d'eau douce diminue du sang au foie et du cerveau au muscle (Shi and Wang 2012). Le potentiel de bioaccumulation des PFAS dépend de la structure chimique de la molécule considérée. A titre d'exemple, il a été montré que les isomères ramifiés sont éliminés plus rapidement que les isomères linéaires (Benskin, 2009). En outre, l'accumulation et l'élimination des PFAS dépendent de l'espèce, du sexe et varient en fonction des périodes de reproduction (Sharpe 2010, Lee 2010).

La littérature rapporte des BCF de 3,43 et 1,5 chez le poisson, de 2,41 et 1,47 chez le crabe, de 2,33 à 1,70 chez les gastéropodes, et de 1,89 et 1,65 chez les bivalves pour le PFOS et le PFOA respectivement (Jonathan E. Naille, 2013).

Dans le biote, le PFOS semble être le PFAS dominant. On constate une augmentation de la concentration de ce composé perfluoré le long de la chaîne alimentaire, indiquant un potentiel de bioaccumulation élevé. En revanche, le PFOA affiche un potentiel de bioaccumulation plus faible qui semble être similaire pour les espèces des différents niveaux trophiques. Les concentrations maximales de PFOS et de PFOA sont relativement similaires chez les invertébrés alors que chez les poissons, les reptiles, les oiseaux ou encore les mammifères, la concentration maximale du PFOS est trois fois supérieure à celle du PFOA (Figure 11, d'après Ahrens et Bundschuh 2014). Ces différences peuvent être expliquées par la différence de longueur de la chaîne fluorocarbonée et par la fonctionnalisation de ces deux molécules d'intérêt (Martin, 2003).

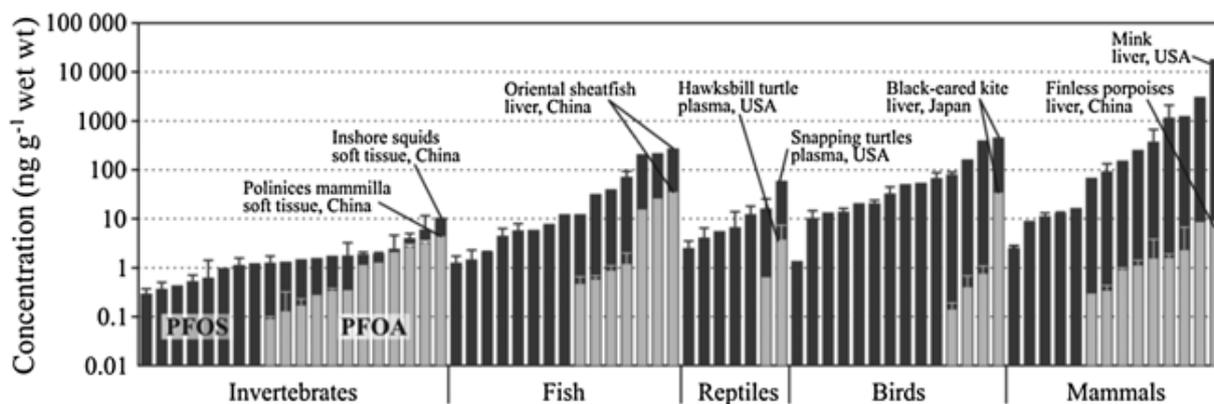


Figure 11: Concentrations moyennes de PFOS (en gris) et de PFOA (en noir) dans différentes espèces représentatives de la faune aquatique

Aux cours des dernières années, les concentrations de PFSA dans le biote semblent indiquer une légère décroissance qui peut être corrélée à l'arrêt de la production de PFOS en 2002 (Paul, 2009). En revanche, les concentrations d'autres PFAS, et plus particulièrement des PFCA, ne montrent aucune tendance claire et sont même en hausse selon le composé, le niveau trophique et la localisation de l'étude (Sturm 2010).

b) Les phénomènes de biotransformation

Le PFOA et le PFOS sont reconnus comme étant des proliférateurs de peroxydase. Ils s'accumulent dans le foie où ils inhibent la glutathion peroxydase, une sélénoprotéine essentielle pour la conversion de l'hormone thyroïdienne (Hagenaars, 2008). Outre leur rôle en tant que modulateur direct de la β -oxydation, principale voie métabolique de dégradation des lipides et des acides gras, ces composés perfluorés ont montré une aptitude à moduler l'activité du cytochrome P450 (CYP) en modifiant notamment l'expression des gènes régulateurs (Yeung 2007, Hagenaars 2008, Krovell, 2008). Le CYP joue un rôle central dans le métabolisme oxydatif et la biotransformation d'une large gamme de composés endogènes et exogènes (Nelson, 1996). En raison de son rôle dans la détoxification de xénobiotiques, l'altération de l'expression du CYP450 engendre des risques considérables d'un point de vue écotoxicologique (Williams, 1998). L'étude récente de Mortensen (2011) a permis de confirmer l'impact du PFOA et du PFOS sur le CYP450 chez le saumon d'Atlantique (*Salmo salar*). Notons cependant que les études de biotransformation des PFAS chez les organismes aquatiques sont encore très rares.

3.1.5. Toxicité et effets du PFOA et du PFOS

A l'heure actuelle, la plupart des études portant sur la toxicité des PFASs sont essentiellement centrées sur celle du PFOS et du PFOA chez l'homme (Lau et al., 2007). Peu d'études relatent l'impact toxique de ces molécules sur les écosystèmes aquatiques. Des tests de toxicité aigüe sur *Daphnia magna* ont mis en évidence une CL50 estimée à 130 mg/L pour le PFOS (Boudreau 2003). D'autres tests de toxicité aigüe chez des moules d'eau douce (*Unio complanatus*) exposées à diverses concentrations de PFOS ont permis d'établir une CL50 comprise entre 51 et 68 mg/L pour cette

Chapitre 1 : Etat de l'art

espèce (Drottar et Krueger 2000). L'étude de la toxicité du PFOS et du PFOA chez *Daphnia magna* et *Moina macrocopa* montre une CE50 pour le PFOA 10 fois plus élevée que pour le PFOS (Ji et al., 2008). Ces deux composés provoquent également une diminution de la survie et de l'indice gonadosomatique chez le medaka (*Oryzias latipes*) (Ji et al., 2008). Liu et al. 2007 ont mis en évidence l'activité oestrogénique du PFOA et du PFOS. Cependant, les mécanismes exacts de la perturbation endocrinienne de ces composés restent à ce jour inconnus.

En plus de l'ubiquité et de la persistance des PFAS dans l'environnement, la littérature relate la présence de mélanges complexes de PFAS dans les eaux de surface. Ainsi, Liu et al. ont montré une augmentation significative de l'écotoxicité du PFOA lorsque celui-ci est présent en mélange avec du PFOS. De la même manière, le profil d'expression génique de *Gobiocypris rarus* peut être modifié lors de l'exposition à un mélange de PFAS.

3.1.6. Aspects législatifs et réglementaires

La réglementation de nombreux pays, dont la France, a adopté des restrictions d'utilisation concernant le PFOA et le PFOS. Ces mesures tendent à limiter la présence de ces substances dans l'environnement. Le PFOS et ses substances connexes (sels et précurseurs) sont apparentés aux Polluants Organiques Persistants (POP) définis par l'UNECE9, dans le cadre du protocole Aarhus de 1998 (UNECE, 2005). Cette substance est d'ailleurs inscrite dans la Convention de Genève sur les polluants de l'air pouvant être transportés sur de longue distance (PATLD10), hors des frontières (UNECE, 2006b). La commission OSPAR11 a inscrit le PFOS et ses sels dès 2003 sur la liste des produits chimiques devant faire l'objet de mesures prioritaires (OSPAR, 2005). Depuis mai 2009, le perfluorooctane sulfonique acide (PFOS), ses sels et le fluorure de perfluorooctanesulfonyl (PFOSF) font partie des 9 substances rajoutées sur la liste des substances couvertes par la Convention de Stockholm sur les POPs (Stockholm Convention, 2009). A ce titre, le PFOS et ses dérivés sont concernés par le règlement (CE) n°850/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 modifié concernant les POPs. Ce texte indique une interdiction de production, de mise sur le marché et d'utilisation de ces substances en tant que telles, dans des préparations ou bien encore sous forme de constituant d'articles. Des exceptions sont attachées à cette interdiction, notamment en terme de production. Si la quantité rejetée dans l'environnement est minimisée, la production et la mise sur le marché sont autorisées pour certains usages spécifiques (agents tensioactifs utilisés dans des systèmes contrôlés de dépôt électrolytique, résines photosensibles ou revêtements antireflet pour les procédés photolithographiques, revêtements appliqués dans la photographie aux films, aux papiers ou aux clichés d'impression, traitements antibuée pour le chromage dur (VI) non décoratif dans des systèmes en circuit fermé et fluides hydrauliques pour l'aviation).

En 2000, lors de la mise en place de la DCE, le PFOS ne faisait pas partie des 33 substances réglementées. Néanmoins, ce polluant organique a été retenu en 2008 parmi les substances soumises à révision pour leur possible identification comme substance prioritaire ou comme substance dangereuse prioritaire (Annexe III Directive 2008/105/EC du Parlement européen et du Conseil établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau). En janvier

Chapitre 1 : Etat de l'art

2012, la Commission Européenne a proposé d'ajouter 15 substances à la liste des 33 polluants qui sont surveillés et contrôlés dans les eaux de surface de rivières, lacs et eaux côtières. Parmi ces 15 substances figurent le PFOS (Commission Européenne, 2012b). En août 2013, le parlement européen et le conseil de l'union européenne officialisent l'entrée du PFOS dans la DCE et lui attribuent une norme de qualité environnementale égale à 65 µg/L pour les eaux de surface. Notons également que cet alkyl perfluoré est l'une des rares substances pour laquelle une norme de qualité environnementale pour le biote est disponible (9,1 ng/g de poids frais).

A l'inverse du PFOS, la législation concernant le PFOA vis-à-vis de la gestion et de la protection des masses d'eau semble beaucoup plus succincte. En effet, malgré l'ubiquité et la persistance de ce composé organique, il reste aujourd'hui exclu de la DCE. L'Allemagne et la Norvège ont été les premiers pays européens à mettre en place des mesures de restrictions relatives à la fabrication et à l'importation de produits contenant du PFOA. Dans un souci d'harmonisation, ils ont établi une proposition à l'agence européenne des produits chimiques (ECHA) visant à classer le PFOA comme substance prioritaire. En juin 2013, les états membres incluent cet alkyl perfluoré parmi les substances candidates pour la prochaine révision du règlement REACH. (www.ocde.org/env/ehs/risk-management/PCF_FINAL-Web.pdf)

3.2. Le Bisphénol A

3.2.1. Généralités et propriétés physico-chimiques

Le 2,2-(4,4-dihydroxyphényle) propane, plus connu sous le nom Bisphénol A (BPA) est une molécule d'origine anthropique obtenue à partir de la réaction de deux moles de phénol avec une mole d'acétone (Figure 12).

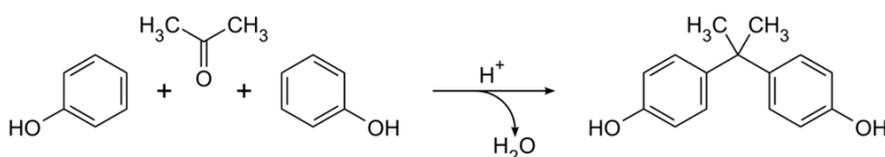


Figure 12: Voie de Synthèse du Bisphénol A

a) Domaines d'usages et applications

Le BPA est une substance chimique utilisée depuis plus de 50 ans en association à d'autres substances chimiques pour la fabrication des polycarbonates, des retardateurs de flammes et d'autres produits spécifiques. Il est également utilisé en tant que monomères dans la fabrication de résines époxy, de polyacrylates et de plastiques recyclés. Ces matières plastiques de haute performance, rigides et transparentes, trouvent de nombreuses applications dans des domaines variés (Table 13). L'ANSES a réalisé une étude de filières en 2011 dont l'objectif était d'identifier de manière plus systématique les secteurs d'activité, les produits et articles de consommation concernés par l'utilisation de bisphénol A. Elle a identifié près d'une soixantaine de secteurs

Chapitre 1 : Etat de l'art

potentiellement utilisateurs de cette substance en France et a listé de manière non exhaustive des usages, articles et préparations susceptibles de contenir du bisphénol A (câbles, mastics, adhésifs, récipients à usage alimentaire ou non, optiques de phares, articles de sports, fluides de freinage, fluides caloporteurs, matériels d'installation électrique, appareils électroménagers, dispositifs et appareils médicaux, encres d'imprimerie...), montrant ainsi qu'une très grande diversité de types de produits et d'articles étaient concernés.

Domaine d'usage	Consommation (tonne/an)	Principales applications des produits finis	% de la consommation à l'échelle européenne
Synthèse de polycarbonates	486880	Emballages alimentaire, application médicales, industrie électrique et électronique	71,1
Synthèse de résine époxy	171095	Adhésifs, plastifiants et composant électriques, matériaux de construction, revêtement de cannettes	25,0
Synthèse de résine phénoplastes	8800	-	1,1
Production de résines polyester	3000	-	0,4
Fabrication protection de boîtes	2460	-	0,4
Utilisation dans le processus de production de PVC	2250	-	0,3
Production de BPA alkylé	2020	-	0,3
Production de papier thermique	1400	-	0,2
Synthèse de polyols/polyuréthanes	950	-	0,1
Synthèse de polyamides modifiés	150	-	<0,1
Production de pneus	110	-	<0,1
Fluide de frein	45	-	<0,1
Autres usages	5990	-	0,9

Table 13: Usages du BPA à l'échelle européenne (d'après rapport UE, 2003)

La production et l'utilisation de Bisphénol A sont en constante augmentation, et peuvent être corrélées à la production croissante de polycarbonates (Table 13). Entre 1997 et 1999, la production moyenne, à l'échelle européenne était de l'ordre de 684 500 tonne par an.

b) Propriétés physico-chimique du Bisphénol A

Les propriétés physico-chimiques du BPA sont regroupées dans la Table 14. Ce composé a une solubilité aqueuse de 300 mg/L à 25°C et présente une bonne affinité pour la matière organique ($\log K_{oc} = 6,57$). Il semble modérément lipophile ($\log K_{ow} = 3,4$) et peu volatil. L'ensemble de ces

Chapitre 1 : Etat de l'art

propriétés physico-chimiques semble indiquer que le BPA possède de bonne capacité de dispersion dans l'environnement et spécifiquement dans les systèmes aquatiques.

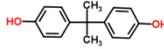
Non d'usage	Numéro CAS	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Structure	pKa	Pression de vapeur saturante (KPa)	Solubilité aqueuse (à 25°C) (mg/l)	Log Kow	Koc (l/Kg)
Bisphénol A	80-05-7	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228		11,3	5,5*10 ⁻⁹	300	3,4	715

Table 14: Propriétés physico-chimiques du BPA (d'après rapport UE, 2003)

3.2.2. Sources de contamination environnementale

Dans le rapport de l'évaluation des risques de 2003, la commission européenne identifie deux principales sources d'émission du BPA : 80% de ce dérivé phénolique serait rejeté *via* les stations d'épuration et près de 10% via les rejets de décharges urbaines. Ainsi, l'INERIS (rapport 2010) estime que 92,2% des émissions totales de BPA se retrouvent dans les écosystèmes aquatiques.

a) Le devenir du bisphénol A dans les décharges

La mise en décharge d'un très grand nombre d'objets liés à notre mode de vie et contenant du BPA représente une source importante d'introduction de ce dérivé phénolique dans les milieux aqueux. Ainsi, de nombreuses études reportent des concentrations de BPA dans les lixiviats de décharge pouvant aller de la centaine de ng/L à plusieurs milliers de µg/L (yamamoto, 2001 ; Fuhacker, 2000 ; urase (2003)). A titre d'exemple, lors de l'analyse de lixiviats de sites d'enfouissement localisés en Allemagne, le BPA a été détecté à des concentrations pouvant atteindre 3,61 mg/L. Il semble également important de noter que les concentrations de BPA dans les lixiviats de décharge semblent relativement similaires pour les décharges d'ordures ménagères et pour les décharges industrielles (urase 2003).

b) Le devenir du BPA dans les stations d'épuration

i. Elimination et efficacité des procédés de traitement des eaux usées

Le BPA est rejeté dans l'environnement aquatique via les stations d'épuration. Ainsi, un nombre important d'études ont contribué à l'enquête et à l'analyse de ce dérivé phénolique au regard de l'efficacité des procédés de traitement des eaux usées. Bien que l'efficacité d'élimination varie d'une station d'épuration à une autre, la moyenne des taux d'abattement rapportée pour le BPA avoisine 84% (Melcer, 2011). Stasinakis et al démontrent que le BPA est éliminé par biodégradation et par sorption. Cependant, des études de bilan de masse montrent que la biodégradation est le processus de suppression dominant (Stasinakis et al (2008)). Guerra et al. (2015) ont analysé le BPA dans des échantillons aqueux collectés à partir de 25 STEP canadiennes. Les auteurs mettent en exergue

Chapitre 1 : Etat de l'art

l'influence de conditions opérationnelles telles que le temps de rétention hydraulique, le temps de rétention des solides et l'influence du taux de matière en suspension sur l'élimination du BPA. La biodégradation apparaît d'autant plus importante que la température et la concentration des boues en matière en suspension sont élevées (Zhao, 2008). Le phénomène d'adsorption du BPA sur les boues semble également pH dépendant et concentration dépendant (Clara, 2004).

Bien que le BPA soit relativement bien abattu par des procédés de traitement classiques, il n'en demeure pas moins que la part non dégradée représente malgré tout un risque pour les milieux récepteurs. Ainsi, comme pour beaucoup d'autres perturbateurs endocriniens, il s'est avéré que les procédés de traitement avancé (UV, H₂O₂, ozonation) étaient capables non seulement d'éliminer le BPA mais également d'abaisser son pouvoir oestrogénique (Esplugas 2007).

ii. Données d'occurrence du BPA dans les influents et effluents de STEP

Plusieurs études menées à travers le monde mettent en exergue la présence de BPA dans les influents et dans les effluents de station d'épuration (Table 15). Sur la base de la concentration médiane ou en utilisant la concentration moyenne lorsque la médiane n'était pas disponible, les données recensées dans le tableau x mettent en évidence une concentration de BPA de l'ordre de la centaine de ng/L dans les eaux brutes en Asie, en Océanie et aux Etats Unis. Notons cependant que des études réalisées dans certains pays européens rapportent des concentrations de BPA beaucoup plus importantes que celles mentionnées dans les travaux précédemment cités. Les fortes concentrations retrouvées en Allemagne peuvent cependant être corrélées à la présence de nombreuses usines de production de BPA dans ce pays. En effet, en 2007, notre voisin européen était le quatrième producteur de BPA au monde (Huang, 2012).

Chapitre 1 : Etat de l'art

Continent	Pays	Influent (ng/L)			Effluent (ng/L)			Reference
		Gamme de concentration (minimum-maximum)	Médiane (Med) /Moyenne (M)	Nombre d'échantillons	Gamme de concentration (minimum-maximum)	Médiane (Med) /Moyenne (M)	Nombre d'échantillons	
Asie	Japon	40-9600	NA	35	10-510	NA	47	Nasu et al., 2001
	Japon	188-453	362 (Med)	5	11.1-139	15.5 (Med)	11	Nakada et al., 2006
	Chine	330-470	420 (Med)	23	29-57	40 (Med)	23	Jin et al., 2008
	Chine	NA	837	3	NA	3,7	3	Nie et al., 2012
Europe	Danemark	NA	1700 (M)	4	NA	280 (M)	4	Jacobsen et al., 2004
	Allemagne	150-7220	2260	12	30-2520	490	12	Weltin et al., 2002
	Allemagne	542-3000	NA	2	162-258	NA	12	Korner et al., 2000
	Allemagne	<20-12205	1352 (Med)/4451 (Med)	66	<20-7625	<20	66	Hohne and Puttmann, 2008
	Grèce	<140-2140	680 (Med)	30	<140-1100	70 (Med)	30	Stasinakis et al., 2008
	Grèce	NA	676	5	NA	33	5	Pothitou et al., 2008
	Italie	332-339	334 (M)	7	13-36	32 (M)	7	Lagana et al., 2004
	Italie	NA	1940, 2190 (M)	NA	NA	310, 470, 500 (M)	NA	Bertanza et al., 2011
	Pays-Bas	250-5620	1410 (Med)	12	<43-4190	1180 (Med)	7	Vethaak et al., 2005
	Spain	NA	2400 (M)	6	NA	620 (M)	6	Sanchez-Avila et al., 2009
Espagne	960-1600	NA	12	260-360	NA	12	Ballesteros-Gomez et al., 2007	
Amérique du Nord	Canada	80-4980	329	36	10-1080	136	34	Lee and Peart, 2000a
	Canada	193-2440	342	8	31-223	112	7	Lee and Peart, 2000b
	Canada	210-2400	1275 (Med)	8	20-450	180 (Med)	8	Lee et al., 2005
	Canada	88-590	298 (Med)	10	33-1054	305 (Med)	28	Fernandez et al., 2007
	USA	281-3641	399	6	14-50	19	5	Drews et al., 2005
Océanie	Australie	ND - 2850	NA	30	12-87	NA	30	Tan et al., 2007
	Australie	70-627	NA	NA	12-148	54 (M)	32	Ying et al., 2008

Table 15: Présence du BPA dans les influents et effluents de STEP à travers le monde

3.2.2. *Devenir du BPA dans les systèmes aquatiques*

Le devenir du BPA au sein des écosystèmes aquatiques est régi par plusieurs processus biotiques et abiotiques. Au regard de ses propriétés physico-chimiques, ce dérivé phénolique apparaît peu volatil et hydrolysable dans les eaux naturelles. Les phénomènes de dégradation et de sorption vont donc principalement influencer le devenir de ce polluant dans l'environnement.

a) *Les phénomènes de dégradation en milieux naturels*

i. *Les phénomènes de biodégradation*

Le BPA peut être dégradé dans les systèmes aquatiques en présence de différentes populations bactériennes. Au contraire des milieux marins où les mécanismes de photodégradation semblent être majoritaires, la biodégradation s'affiche comme l'une des voies de dégradation principale du BPA en milieu d'eaux douces (Kang et kondo 2005). Ces phénomènes sont toutefois dépendants de la température (la biodégradation augmente lorsque la température du milieu augmente (kang et kondo 2002)) et de la richesse du milieu en bactéries (staples 1998, gassara, 2011). Lobos et al (1992) ont mis en évidence deux voies de dégradation du BPA en présence de bactérie. La voie majoritaire conduit à la formation de deux métabolites : l'acide 4-hydroxybenzoïque et le 4-hydroxy-acétophénone, qui sont rapidement dégradés en CO₂ et incorporés aux cellules bactériennes. Le BPA est très rapidement biodégradé dans les sols et dans les sédiments, avec des valeurs de demi-vie comprises entre 3 et 37,5 jours (Yang et al, 2014). Ainsi, ce micropolluant organique ne devrait pas être persistant dans l'environnement (Michalowicz, 2014).

ii. *Les phénomènes de photolyse*

Le BPA apparaît comme une molécule très sensible aux phénomènes de photolyse. La photodégradation de ce polluant dans les systèmes aquatiques nécessite cependant une énergie suffisante et une période de temps suffisamment longue (Barbierie 2008). Les phénomènes de dégradation par photolyse apparaissent également comme très fortement dépendants des conditions du milieu. Ainsi, la présence de catalyseurs tels que NaCl, Fe³⁺ (sajiki, 2004), la présence d'acides humiques et d'algues (zhan, 2007) peuvent affecter l'efficacité de ces phénomènes. La photolyse indirecte du BPA semble favorisée par les photo-oxydants générés par l'irradiation de la matière organique dissoute (Chin et al, 2004).

b) *Les phénomènes de sorption en milieux naturels*

Certains chercheurs ont évalué l'impact de la nature du milieu récepteur sur les phénomènes de sorption du BPA dans les sédiments. Ainsi, Li et al, 2007, ont montré que la présence de certains métaux lourds provoque une augmentation significative de la sorption du BPA sur les sédiments. En revanche, la présence de certains tensioactifs anioniques provoque une légère diminution de ces phénomènes. Il a également été constaté que le comportement de sorption du BPA peut être affecté par le pH et la force ionique du milieu (zeng 2006). Certains travaux laissent à penser que les

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

dynamiques de sorption/désorption sont dictées par la présence et la nature de substances humiques (Sun 2006, Hou 2006). Plus récemment, Sun (2010 et 2012) et al, ont révélé que la matière organique condensée d'un sol ou d'un sédiment possédait une plus grande capacité de sorption que l'acide humique. Les auteurs concluent également que les fines particules de sédiment jouent un rôle plus important que les particules de taille grossière dans la sorption et le transfert du BPA, en raison de l'abondance de matière organique condensée.

c) Données de présence du BPA dans les systèmes aquatiques

Le BPA a fait l'objet d'un certain nombre de travaux relatant son ubiquité dans les eaux de surface. Les études documentant sa présence dans les sédiments sont toutefois plus rares. Une synthèse est présentée dans la Table 16.

	Localisation	Milieu	Concentration de BPA en ng/L (min-max)	Références
Eaux de surface	Portugal	Estuaire	<80-10700	Ribeiro 2008
	France	Eaux de rivière	40-175	Baugros 2008
	Chine	Eaux de rivière	43,5-639	Gong 2009
	Japon	Eaux de rivière	<500-900	Kang 2006
	USA	Eaux de rivière	1,9-158	Li 2004
	Allemagne	Eaux de rivière	16-100	Wiegel, 2004
	Royaume-Uni	Eaux de rivière	<5,3-24	Liu 2004
	Espagne	Eaux de rivière	327-2575	Navarro 2010
	Pays Bas	Estuaire	<10-330	Belfroid 2002
	Italie	Eaux de rivière	<2-175	Loos,2007
	Grèce	Eaux de rivière	55-152	Luo, 2014
	Mexique	Eaux de barrage	<0,5-7	Félix-Canedo, 2013
	Localisation	Milieu	Concentration de BPA en ng/g (min-max)	Références
Sédiment	Allemagne	Sédiments de rivière	7-1630	Stachel, 2005
	Pays-Bas	Sédiments de rivière	<1.1-43	Vethaak, 2005
	Chine	Sédiments de rivière	0,58-2,16	Dong 2009
	USA	Sédiments marins	1,5-5	Stuart 2005
	Japon	Sédiments marins	0,5-11	Kawahata, 2004
	France	Sédiments de rivière	<8,5-226	Vulliet 2014

Table 16: Données d'occurrence du BPA dans les eaux de surface et dans les sédiments à travers le monde

La PNEC du BPA dans l'eau, calculée par l'INERIS est fixée à 1,6 µg/L, avec un facteur d'extrapolation de 10. Afin de prendre en compte l'effet sur le développement des cellules du sperme, une PNEC conservatrice de 0,1 µg/L a été calculée avec une NOEC de 1 µg/L (Liu et al 2011). En se basant sur la méthode des coefficients de partage, une valeur de PNEC chronique pour les sédiments a été établie à 26 µg/kg (poids humide). Les concentrations relatives à l'occurrence du BPA dans les eaux de

surface et dans les sédiments sont parfois supérieures à la PNEC fixée indiquant la présence de risques toxiques potentiels pour les organismes aquatiques.

3.2.3. Le devenir du BPA dans les organismes

a) Les phénomènes de bioconcentration et de bioaccumulation

Comparé aux compartiments environnementaux non-biotiques où l'occurrence du BPA est largement documenté, on recense relativement peu d'études relatives à l'accumulation du BPA dans le biote. En 1977, Miti et al furent les premiers à étudier la bioaccumulation du BPA chez la carpe *Cyprinus Carpio*. Les auteurs relatent un facteur de bioconcentration compris entre 20 et 68, et concluent alors à la faible capacité de bioaccumulation du BPA. Depuis le BCF du BPA a été calculé pour plusieurs espèces de poisson d'eau douce, la littérature rapporte des valeurs de 49 et de 18 pour le méné d'argent (*Anabarrilius alburnops*) et le carassin (*Carassius auratus*) respectivement (Kang et kondo 2005). Une étude concernant l'exposition de palourdes d'eau douce (*Pisidium amnicum*) à des concentrations environnementales de BPA a démontré l'influence de la température sur les phénomènes de bioconcentration, les BCF calculés variant de 110 à 144 (Heinonen et al 2002). A faible dose, le BPA est très rapidement biodégradé de sorte que la bioaccumulation se produit généralement uniquement à des doses élevées (kang 2007, Pritchett 2002). Notons cependant que la dégradation du BPA étant plus lente en milieu maritime, la bioconcentration de ce dérivé phénolique est souvent plus importante dans les organismes marins que les organismes d'eau douce (Kang et Kondo, 2005).

b) Les phénomènes de biotransformation

Si les processus de biotransformation du BPA ont été très largement étudiés chez les mammifères, peu d'études ont été effectuées chez les organismes aquatiques. Les processus de conjugaison du BPA avec des glucuronides et des sulfates ont pu être observés chez des vertébrés ainsi que chez certaines espèces d'invertébrés. Lindholm et al (2001) ont mis en évidence la présence de métabolites glucuronidés chez la truite arc-en-ciel exposée au bisphénol A (100µg/L) pendant 12 heures, alors que chez les crustacés, le BPA est principalement conjugué avec des mono et des disulfates (Michalowicz, 2014). Atkinson et Roy (1995) ont démontré que le BPA pouvait être hydroxylé et oxydé en une orthoquinone (3,4-quinone BPA). En présence de peroxydase, ce composé peut former des liaisons covalentes avec l'ADN, induisant des dommages irréversibles au niveau du matériel génétique. En outre, il a été prouvé que le BPA-quinone présentait une forte toxicité pour les organismes vivants en raison de sa participation à des réactions d'oxydoréduction et de la génération d'espèce réactives de l'oxygène (Atkinson et Roy (1995, 2002).

Des études récentes menées par Nakamura et al, (2011) ont montré que le BPA était transformé par les microsomes des cytochromes P450 par une réaction de substitution ipso en hydroquinone, en 4-isopropylphénol (IPP) et en alcool hydroxycumyle (AHC). Les auteurs ont également démontré que l'activité oestrogénique de l'IPP était semblable à celle du BPA alors que celle de l'AHC était cent fois

plus importante. Ces exemples mettent en exergue la nécessité de prendre en compte les métabolites lors d'une étude de risques.

3.2.5. La toxicité et les effets du BPA

Le bisphénol A est un xeno-œstrogène non stéroïdien qui présente une activité œstrogénique (Witorsch, 2002). Il peut se fixer sur les récepteurs à œstrogène ER et déclencher des réponses similaires à celles induites par l'hormone naturelle de l'homme : la 17- β -œstradiol (Stahlhut, 2009). Il peut également agir comme un récepteur antagoniste des androgènes (Urbatzka, 2007). La perturbation endocrinienne induite par le BPA a été mise en évidence au travers de nombreux tests *in vivo* et *in vitro*. La plupart des études portant sur les effets du BPA mettent l'accent sur les perturbations liées au système endocrinien. Cependant, certains travaux mettent en évidence d'autres effets liés à des modes d'action différents. A des concentrations allant de 1,1 à 12,8 mg/L, le BPA est systématiquement toxique pour divers taxons, y compris les daphnies (Brennan et al, 2006), les mysidacés (Hirano, 2004) et certains poissons (Alexander, 1988). Sur la base de la CE50 et de la CL50 dont les valeurs rapportées varient de 1 à 10 mg/L (environnement canada 2008), le BPA est classé comme « modérément toxique » et « toxique » pour le biote aquatique par la Commission Européenne et l'Agence Américaine de la Protection de l'Environnement, respectivement. Cependant, des études révèlent que le BPA peut avoir des effets nuisibles sur les organismes aquatiques à des concentrations environnementales qui sont généralement de l'ordre du $\mu\text{g/L}$. Plusieurs travaux ont mis en évidence des effets sur le développement des invertébrés aquatiques à différents niveaux d'exposition. Une faible concentration de BPA (0,08 $\mu\text{g/L}$) peut induire une inhibition de la croissance chez la larve d'insecte *Chironomus riparius* (Watts 2003). Des expositions à fortes concentrations (>300 $\mu\text{g/L}$) sont la cause d'une importante mortalité chez les oursins de mer (Arslan et Parlak, 2008). Des effets sur la reproduction des invertébrés lié à l'exposition au BPA ont également été rapportés. Chez le mollusque d'eau douce (*Marisa cornuarietis*), des niveaux d'exposition supérieurs à 1 $\mu\text{g/L}$ ont entraîné une féminisation des organismes (Oehlmann 2000). Chez la moule *Mytilus edulis* des dommages sur les ovocytes et sur les follicules ovariens ont été observés après exposition au BPA pendant 3 semaines à 50 $\mu\text{g/L}$ (Aarab et al 2006).

Alors que les effets sur la reproduction et le développement des invertébrés liés à l'exposition au BPA semblent avérés, beaucoup ont été observés à des niveaux actuellement bien au-dessus des concentrations environnementales. Certaines études font toutefois figure d'exception et sont détaillées dans la Figure 13. Si l'effet du BPA semble varier considérablement entre les différents taxons, il semblerait que certains invertébrés affichent une hypersensibilité au BPA, c'est notamment le cas des mollusques d'eau douce et des larves d'insectes.

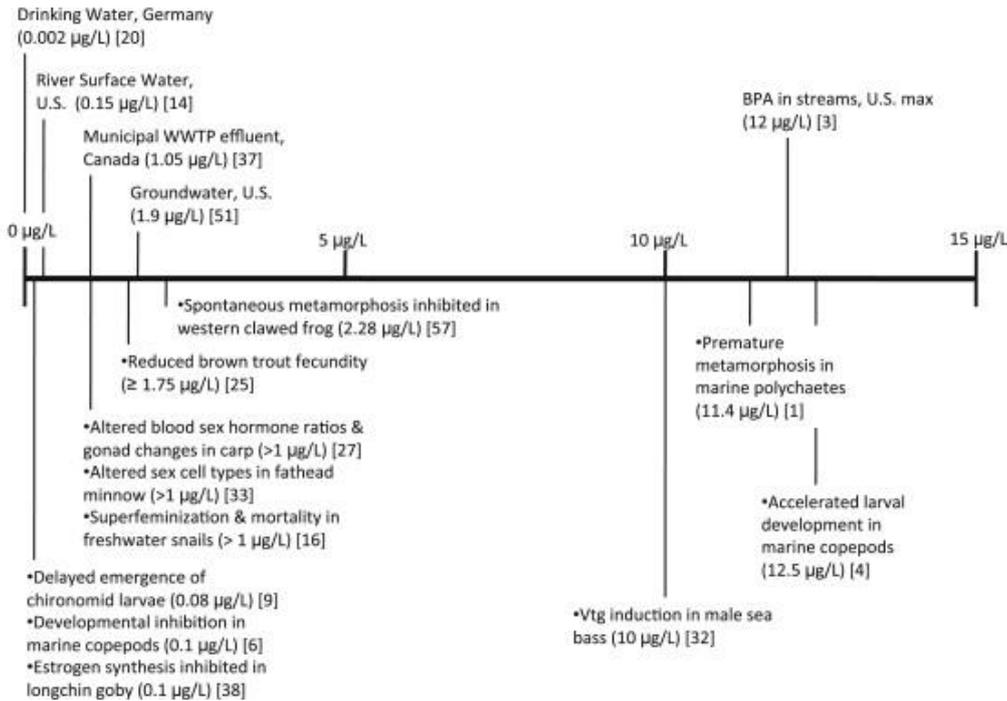


Figure 13: Effets du BPA à des concentrations environnementales sur la faune aquatique (d'après Flint, 202)

3.2.6. Aspects législatifs et réglementaires

La Directive Européenne 90/128/EEC sur les matières plastiques et la Directive 67/548/EEC concernant les matières constitutives des emballages fixent une limite de migration spécifique (LMS) égale à 3 mg/kg de nourriture pour la protection du consommateur. A la suite d'un avis de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) publié en 2002, la LMS a été abaissée à 0,6 mg/kg (Directive 2004/19/CE, premier amendement de la Directive n°2002/72/CE). En France, il faut attendre 2011 pour voir apparaître les premières restrictions concernant l'utilisation du BPA ; la fabrication de biberons contenant du BPA est interdite depuis le 1er mai 2011, son importation et sa mise sur le marché le sont depuis le 1er juin 2011. Notons que bien avant cette réglementation, de nombreux industriels français avaient décidé de supprimer le BPA de la formulation de certains produits dédiés à l'alimentation des nourrissons. Ces interdictions sont appliquées depuis 2008 au Canada et 2009 aux Etats-Unis (INERIS 2010).

Bien que le BPA et certains de ses produits dérivés (Tetrabromobisphénol A) aient fait l'objet d'évaluation comme substances dangereuses prioritaires par la commission européenne pour une éventuelle entrée dans la liste des substances prioritaires de la DCE (texte adopté par le parlement le 22 mai 2007, document A6-0125/2007), ces dérivés phénoliques n'ont pas été retenus parmi les 15 substances récemment ajoutées à cette liste.

3.3. Les alkylphénols

3.3.2. Généralités et propriétés physico-chimiques

a) Nomenclature

La nomenclature des alkylphénols est assez complexe et source de nombreuses confusions. Ainsi, l'INERIS propose en 2005 un éclairage sur la nomenclature des principaux alkylphénols produits et retrouvés dans l'environnement. Bien que seuls le 4-*tert*-octylphénol et le 4-nonylphénol soient concernés par notre étude, un tableau récapitulatif des principaux alkylphénols est présenté en Annexe 4.

b) Voies de synthèse et production

La première synthèse d'alkylphénols est datée du début des années 40. Ces dérivés phénoliques sont fabriqués presque exclusivement par réaction catalytique entre une oléfine et un phénol, un crésol ou un xylénol (Reed, 1978). Le nonylphénol est produit par réaction entre un phénol et un mélange d'isomères de nonène. Dans les mélanges commerciaux, 80% des alkylphénols sont des 4-nonylphénols et 20% des octylphénols. Le 4-nonylphénol est un mélange d'isomères composé de 3 à 6% de nonylphénols présentant leur radical alkyle en position *ortho*, de 90 à 93% de nonylphénols présentant leur radical alkyle en position *para* et de 2 à 5% de décylphénol (Rabouan et al. 2012). L'octylphénol est issu de l'alkylation d'un phénol et du diisobutylène suivie d'une distillation sous vide. Il n'existe pas à l'heure actuelle d'exemple de synthèse naturelle d'alkylphénols. La consommation annuelle en Europe de l'ouest était de 77 000 tonnes en 2003 (OSPAR 2004), dont 80% étaient réservés à la consommation de nonylphénol. La production annuelle de nonylphénol est marquée par une croissance exponentielle et atteint aujourd'hui 154 200 tonnes aux Etats-Unis, 16 500 tonnes au Japon et 16 000 tonnes en Chine (soares, 2008).

c) Domaines d'usages et applications

Les alkylphénols sont fabriqués en grande quantité et servent principalement d'intermédiaires de synthèse dans la fabrication d'agents tensioactifs (alkylphénols polyéthoxylés (APEO) et de résines phénoliques. Ils servent également d'additifs ou d'antioxydants dans la production de nombreux plastiques (Dupuis et al, 2012), mais la littérature mentionne aussi leur utilisation dans des produits de soins corporels (Guenther, 2002). Ils apparaissent donc indispensables à la formulation d'un grand nombre de produits commerciaux et bénéficient d'une grande variété d'applications (Table 17).

Nonylphénol (NP)	Octylphénol (OP)
Production des éthoxylates de NP et des oxines phénoliques	Intermédiaires de synthèse organique
Production de résines époxy	Peintures
Plastiques	Laques et vernis
Cosmétiques	Isolants
Détergents et décapants	Encres d'imprimerie

Lessives	Adhésifs
----------	----------

Table 17: Récapitulatif des différentes applications des alkylphénols

d) Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des alkylphénols dépendent de la longueur mais également de l'isomérie (ou arborescence) de leur chaîne alkyle.

Leur solubilité aqueuse augmente avec l'arborescence de leur radical alkyl (Talmage, 1994) mais diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. Elle augmente aussi en fonction de la température, cependant au-delà de 25°C les variations observées ne sont plus significatives (Ahel et Giger 1993a).

Le log K_{ow} témoigne des propriétés lipophiles des alkylphénols choisis pour cette étude (Table 18). Par comparaison avec leurs homologues éthoxylés, les alkylphénols semblent plus facilement bioaccumulables dans les organismes aquatiques du fait de l'absence de chaînes éthoxylées, groupements polaires, qui confèrent à la molécule un caractère plus hydrophile (Ahel et Giger 1993b).

Le log K_{oc} permet de définir la distribution d'un composé entre la phase solide (sols, sédiment...) et la phase dissoute. Plus cette constante est élevée, plus le composé d'intérêt possède une affinité importante pour la matière organique, et donc des propriétés d'adsorption accrues. D'après la Table 18, ce coefficient est compris entre 5,18 et 5,39, induisant une adsorption non négligeable des composés d'intérêts sur les composantes particulaires. Cette affinité peut être justifiée par les interactions de type hydrophobe entre les chaînes alkyles et la phase particulaire : les capacités d'adsorption sont donc d'autant plus grandes lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente. (Lara-Martin et al, 2008).

En conclusion, les propriétés physico-chimiques des alkylphénols d'intérêt semblent témoigner de leurs capacités de dispersion dans tous les compartiments aquatiques, tant dans la phase dissoute que dans la phase particulaire.

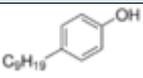
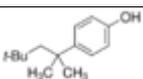
Non de la molécule	Numéro CAS	Formule chimique	Masse molaire (g/mol)	Structure	Solubilité aqueuse (mg/L à 20,5°C)	Log Kow	Log Koc	pKa
4-NP	84852-15-3	C ₁₅ H ₂₄ O	220,3		5,43	4,48	5,39	5,48
4-t-OP	140-66-9	C ₁₄ H ₂₂ O	206,3		12,6	4,12	5,18	5,04

Table 18: Propriétés physico-chimiques et structure des alkylphénols sélectionnés pour l'étude

3.3.3. Les sources de contamination environnementales

De par les domaines d'application des alkylphénols, trois voies majoritaires sont responsables de leur introduction dans les systèmes aquatiques.

La voie prédominante est celle des rejets de station d'épuration de par les fortes concentrations retrouvées dans les effluents. En effet, les traitements conventionnels ne permettant pas d'abattre la totalité de ces micropolluants organiques, les STEP contribuent de manière significative à l'introduction continue d'alkylphénols dans les systèmes aquatiques. Les rejets industriels sont également considérés comme une source non négligeable de pollution. Bergé et al, (2014), donnent un aperçu de la contribution des rejets industriels à l'échelle du bassin versant de l'agglomération parisienne. L'analyse des rejets industriels, incluant différents secteurs d'activité (industries pharmaceutiques et cosmétique, industries textile, métallurgie...) a confirmé l'omniprésence des alkylphénols dans les rejets industriels. Les auteurs soulignent notamment la contribution non négligeable des industries pharmaceutiques au regard de l'introduction d'alkylphénols dans l'environnement. Enfin, les eaux de ruissellement apparaissent comme une source de contamination environnementale minoritaire principalement liée aux usages agricoles (association d'alkylphénols et de pesticides ou épandage de boues contenant des alkylphénols) et aux usages urbains.

a) Le devenir des alkylphénols dans les stations d'épuration

Le devenir des alkylphénols dans les stations d'épuration doit être corrélé à celui de leurs homologues polyéthoxylés. En effet, les phénomènes de dégradation et de transformation biologiques des alkylphénols polyéthoxylés (APEO) engendrent la formation d'alkylphénols (Figure 14). La biodégradation primaire des APEO conduit à la perte successive de groupements «éthoxy » (White R, 1994). En conditions anaérobies, les produits de dégradation sont majoritairement des alkylphénols mono et diéthoxylés. En conditions aérobies, les produits de dégradation sont des acides alkylphénoxy polyéthoxyacétiques et des acides carboxyalkylphénoxy polyéthoxyacétiques (Lu 2008, Soares 2008). L'alkylphénol est, quant à lui, le produit de dégradation ultime et ce quelles que soient les conditions (aérobies et anaérobies). La biodégradation primaire est dépendante des conditions de fonctionnement de la station d'épuration (température, agitation des eaux) (ahel, 1994) et semble être favorisée par la présence de micro-organismes (corvini et al, 2006). La biodégradation ultime conduit à la conversion complète des produits de dégradation issus de la biodégradation primaire en CO₂, H₂O et sels minéraux (ahel, 1994). Certains micro-organismes sont capables de dégradé les alkylphénols. Cependant ces phénomènes de biodégradation sont dépendants de la longueur, de la ramification et de la position de la chaîne alkyle, de la concentration initiale en alkylphénols, du pH et de la concentration en oxygène (Corvini, 2006).

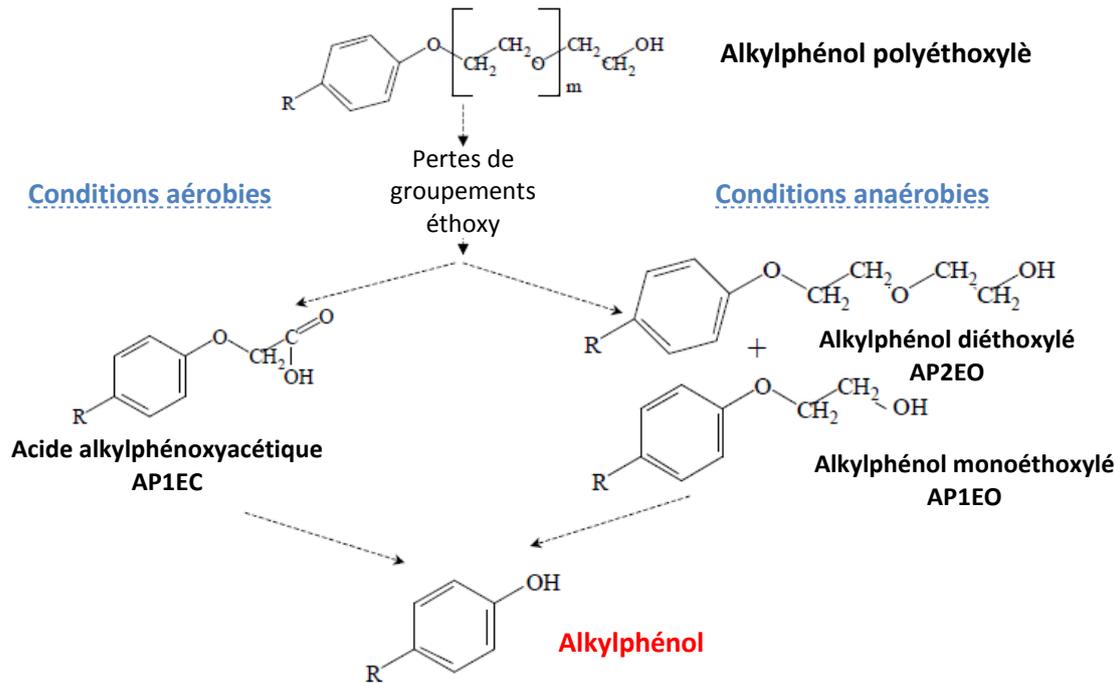


Figure 14: Schéma de la biodégradation des alkylphénols polyéthoxylés

b) Efficacité des procédés de traitement des eaux usées

Au regard de la littérature, les traitements préliminaires et primaires semblent peu efficaces pour assurer l'élimination des alkylphénols. Cependant, notons que la mise en œuvre de traitements primaires additionnés de traitements physicochimiques permet d'abaisser la concentration de ces substances phénoliques dans la phase dissoute. A titre d'exemple, des agents flocculants peuvent être utilisés pour coaguler la matière organique entraînant ainsi la diminution de matière en suspension. Les 4-NP et 4-t-OP ayant une grande affinité pour les phases particulières, ils se retrouveront donc préférentiellement dans les boues (Janex Habibi 2009, Matamoros and salvado 2013).

Les traitements secondaires et plus particulièrement les traitements biologiques (boues activées, biofiltres, lits bactériens) semblent induire une forte diminution de la concentration des alkylphénols dans la phase dissoute (Bruchet 2006). Cependant, tout comme dans le cas des traitements primaires additionnés d'agents flocculant, les alkylphénols se retrouvent dans les boues. Les bioréacteurs à membranes affichent de meilleurs taux d'abattelements que les procédés par boues activées et permettent de diminuer l'adsorption des alkylphénols sur les boues (Cases 2011, Gonzales 2007).

La littérature relate des taux d'abattelements moyen de 77,5% et 84,2% pour les nonylphénols et les octylphénols respectivement (Table 19). Des résultats contradictoires ont cependant été rapportés, notamment concernant l'élimination des nonylphénols allant de 21,7% (stasinakis et al, 2008) à 99,0% (Janex-Habibi, 2009). Cette disparité met en évidence la complexité de l'évaluation du devenir des alkylphénols dans les STEP et met l'accent sur la nécessité de prendre en compte les aspects biologiques et opérationnels des traitements mis en œuvre. Des paramètres tels que le temps de

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

résidence hydraulique, la concentration initiale en composé d'intérêt, la nature du substrat organique ou encore le pH et la température sont autant de paramètres qui peuvent affecter l'élimination des alkylphénols (zhang et al, 2008, Lu et al, 2008). L'efficacité des procédés de traitements conventionnels au regard de l'abattement des alkylphénols semble ainsi dépendante des paramètres opérationnels des usines de traitement des eaux usées (Teske et arnold, 2008).

Composés	Localisations	Taux d'abattement (%)			Références
		Min-Max	Moyenne	Ecart type	
Nonylphénol	Chine, France, Allemagne, Grèce, Italie, Espagne, USA, Balkans	21,7 - 99	77,5	26	Céspedes 2008, Janex-Habibi 2009, Kasprzyk-hordem 2009, Martin 2010, Nie 2012, Pothitou and Voutsas 2008, Terzic 2008
Octylphénol	Chine, France, Allemagne, Royaume-Uni, Italie, Espagne, USA,	<0 – 96,7	84,2	14,2	Céspedes 2008, Janex-Habibi 2009, Martin 2010, Nie 2012, Pothitou and Voutsas 2008, Terzic 2008, Stasinakis 2008

Table 19: Taux d'abattement des alkylphénols lors de procédés de traitement conventionnels à travers le monde

Les procédés de traitements avancés, également appelés traitements tertiaires, sont également très efficaces pour éliminer les alkylphénols. Hernandez-Leal (2011) rapportent des taux d'élimination proche de 80% lors de l'utilisation de filtration sur carbone activé ou lors de procédés d'ozonation.

c) Données d'occurrence dans les effluents de station d'épuration

De manière générale, les influents de station d'épuration contiennent des quantités importantes d'APEO et d'alkylphénol, d'autant plus lorsque les bassins versants sont urbanisés et industrialisés (Coquery et al. 2011 ; Bergé et al. 2014). Bien que les APEO soient assez bien éliminés par les traitements mis en jeu dans les stations de traitement des eaux usées, les phénomènes de biodégradation engendrent la formation d'une quantité non négligeable d'alkylphénols qui sont alors retrouvés à des concentrations de l'ordre du µg/L dans les effluents (Table 20).

Composé	Localisation de l'étude	Influents (min – max) (µg/L)	Effluents (min – max) (µg/L)	Références bibliographiques
4-NP	France	1,0 -101,6	0,1 – 7,8	Janex-Habibi 2009
	France	4,1 – 10,6	0,31 – 1,36	Bergé 2012
	Espagne	5,6 – 17,5	0,3 – 2,1	Céspedes 2008
	Chine	4,2 – 18,7	<0,1 – 0,44	Lian 2009

4-t-OP	France	0,2 – 8,7	0,1 – 1,3	Janex-Habibi 2009
	Espagne	1,3 – 4,0	0,1 – 0,3	Cespedes 2008

Table 20: Concentrations des alkylphénols d'intérêt dans les influents et effluents de STEP

3.3.4. Le devenir des alkylphénols dans l'environnement

Bien que les alkylphénols soient souvent présents en quantité importante dans les effluents de station d'épuration, les phénomènes de dilution induits par leur introduction dans les milieux aquatiques vont permettre d'abaisser la teneur de ces composés phénoliques. Deux phénomènes vont contrôler le devenir des alkylphénols dans les systèmes aquatiques : les phénomènes de dégradation et les phénomènes de sorption.

a) Les phénomènes de dégradation en milieu naturel

i. Les phénomènes de biodégradation

Bien que les phénomènes de biodégradation identifiés dans les STEP soient similaires à ceux ayant lieu dans le milieu naturel, les cinétiques de dégradation sont cependant beaucoup plus lentes dans le milieu récepteur (Naylor, 2006). La minéralisation des alkylphénols peut avoir lieu dans la phase aqueuse. On constate tout d'abord une ouverture du cycle aromatique, suivi d'un processus de métabolisation pour aboutir finalement à la minéralisation complète du composé (Fujii, 2001). L'élimination de la chaîne alkyle et la division ultérieure de tous les atomes de carbone, couplée à une possible décarboxylation, a été proposée comme processus alternatif à l'attaque du cycle aromatique (Corvini et al, 2004). Le temps de demi-vie du nonylphénol est estimé entre 2,5 jours et 40 jours (Staples 2001). La biodégradation des alkylphénols peut être variable d'un système aquatique à un autre. De plus, les variabilités saisonnières induisant des changements de température et conduisant à des modifications significatives du milieu récepteur (épisode de crue et d'étiage), conditionnent l'acclimatation des micro-organismes responsables de la biodégradation des alkylphénols et donc leur élimination. Le pourcentage de minéralisation des alkylphénols dans la phase aqueuse passe ainsi de 30% à 7°C à 70% à 25°C (Manzano et al 1999). Il est toutefois difficile de différencier les variations inter-saisonnières des variations intrinsèquement liées aux sources de contamination. Dans les sédiments, les phénomènes de biodégradation anaérobie sont beaucoup plus importants que les mécanismes aérobie (Li et al, 2008), la dégradation des alkylphénols y est donc beaucoup plus lente (Jin et al 2008). Certains auteurs ont reporté des temps de demi-vie pouvant aller jusqu'à 60 ans (Shang, 1999). Ces micropolluants organiques apparaissent donc persistants dans les sédiments naturels.

ii. Les phénomènes de photolyse

Des études menées en mésocosmes ont mis en évidence que le nonylphénol pouvait être dégradé sous une intensité lumineuse de 0,05 à 0,09 m².kW⁻¹.h⁻¹. Ainsi, cette dégradation peut avoir lieu en milieu naturel puisque l'énergie mentionnée ci-dessus est équivalente à celle du rayonnement solaire

à la mi-journée (Ahel, 1994). Deux produits de dégradation ont ainsi pu être identifiés : 1,4-hydroxybenzène et le 1,4-benzoquinone. A l'instar de nombreux micropolluants, les phénomènes de photolyse des alkylphénols sont dépendants d'un grand nombre de paramètres physico-chimiques : la présence de catalyseur comme des ions Fe^{3+} ou des espèces réactives de l'oxygène augmente les cinétiques de photodégradation alors que la présence de matière organique dissoute, agissant comme une barrière des rayonnements UV, semble ralentir ces processus.

b) Les phénomènes de sorption en milieu naturel

Les phénomènes de sorption en milieux naturels conditionnent le transport et la distribution des alkylphénols au sein des écosystèmes aquatiques. Leurs valeurs de K_{oc} semblent suggérer leur possible adsorption sur la matière solide, qu'elle soit de nature colloïdale, particulaire ou sédimentaire. D'après Isobe et al, 2001, 20% du 4-NP sont associés à la phase particulaire. Les phénomènes de sorption sont dépendants de la teneur en carbone organique des matières en suspension (, Li et al 2007). Plus récemment, Koniecko et al, 2014 ont démontré qu'il existait une corrélation positive entre les teneurs en 4-NP et 4-t-OP mesurés dans les sédiments et leur teneur à la fois en carbone organique et en carbone graphite. Le carbone graphite ou noir de carbone est produit lors des phénomènes de combustion industriels ou domestiques, il peut être un vecteur de transport pour les alkylphénols qui peuvent atteindre les systèmes aquatiques lors de retombés atmosphériques. La présence d'autres micropolluants dans le milieu aquatique peut également influencer les phénomènes de sorption des composés phénoliques. En effet, l'occurrence de composés possédant des propriétés tensioactives et permettant la formation de micelles peut favoriser l'adsorption des alkylphénols sur les matières solides (Hout et al, 2006). Les phénomènes de sorption des alkylphénols semblent être variables en fonction de la saison (Cailleaud 2007). Ainsi, Li et al 2004 ont montré que le pourcentage de nonylphénol dans la phase particulaire pouvait atteindre 60% en août et décroître en fonction de la température pour atteindre 28% en décembre.

Ces observations nous permettent de mettre l'accent sur la complexité liée à la distribution des alkylphénols au sein des écosystèmes aquatiques. Il apparaît donc indispensable de réaliser des analyses sur chacune des phases (dissoute, particulaire et sédimentaire) afin d'évaluer et de comprendre au mieux la contamination des systèmes aquatiques par les alkylphénols.

a) Données d'occurrence des alkylphénols dans l'environnement aquatique

i. Présence dans les eaux de surface

Depuis plus de 20 ans, le nombre d'études relatant la présence d'alkylphénols dans l'environnement a considérablement augmenté. Bien que les différents travaux de recherche existants se soient majoritairement focalisés sur le nonylphénol, ils permettent de mettre en évidence le caractère ubiquiste de ces micropolluants dans l'environnement. Concernant les études relatives à la présence des alkylphénols d'intérêt dans les eaux de surface, la littérature rapporte des concentrations variant de quelques ng/L à plusieurs $\mu\text{g/L}$ (Table 21). La comparaison et l'interprétation de ces données s'avèrent toutefois délicates tant les différences en termes d'échantillonnage (échantillonnage

ponctuel, échantillon composite, saison, débit...), de techniques analytiques, de techniques de quantification, et localisation géographique (différentes pressions anthropiques) sont hétérogènes.

Localisation	Milieu aquatique	Concentration de nonylphénol (min-max) en ng/L	Concentration de octylphénol (min-max) en ng/L	Références
Canada	Rivière	140-200	<9	Loyo-Rosales 2003
Espagne	Fleuve	20-500	60-900	Brix 2012
Chine	Rivière	80-1500	20-60	Zhang 2011
Allemagne	Rivière	<10-770	<10-420	Quednow et Puttmann 2008
Grèce	Rivière	558-2704	NA	Stasinakis 2012
Corée du Sud	Rivière	115-336	NA	Kim 2009
USA	Fleuve	ND-6200	NA	Gross 2004
Italie	Fleuve	130-580	NA	Patroleco 2006

Table 21: Données de présence des alkylphénols dans les eaux de surface à travers le monde

ii. *Présence dans les sédiments*

Les alkylphénols sont présents dans les sédiments à des concentrations parfois supérieures aux eaux de surface correspondantes (Brix 2012). La littérature relate des valeurs pouvant aller jusqu'au µg/g pour le nonylphénol. Les concentrations rapportées pour l'octylphénol sont toutefois plus faibles, de l'ordre du ng/g (Table 22).

Localisation	Milieu aquatique	Concentration de nonylphénol (min-max) en ng/g (poids sec)	Concentration de octylphénol (min-max) en ng/g (poids sec)	Références
Espagne	Fleuve	69-5999	1-143	Navarro 2010
Chine	Rivière	145-349	15-31	Zhang 2011
USA	Baie	7-13700	2-45	Ferguson, 2001
Corée du Sud	Rivière	25-932	NA	Li et al, 2004
Canada	Lac	ND - 1750	ND - 52	Mayer 2007
Espagne	Rivière	5 - 1731	ND-25	Gonzalez 2004

Table 22: Données de contamination des sédiments par les alkylphénols à travers le monde

3.3.5. Devenir des alkylphénols dans les organismes aquatiques

La biodisponibilité et la toxicité des alkylphénols sont dictées par l'ensemble de leurs propriétés physico-chimiques.

a) *Les propriétés de bioconcentration et de bioaccumulation*

Par leur absence de chaîne éthoxylée, les alkylphénols possèdent un potentiel de bioaccumulation supérieur à celui de leurs homologues éthoxylés (Servos, 1999). De même, la longueur et la ramification de la chaîne alkyle peut impacter la capacité de ces xénobiotiques à être bioaccumulés par les organismes vivants. Ainsi, Cailleaud et al, 2011 ont démontré que le facteur de bioconcentration du nonylphénol (324) était cent fois supérieur à celui de son homologue mono

éthoxylé (3,02) chez le copépode (*Eurytemora affinis*). Il semblerait que le phénomène de bioconcentration du nonylphénol soit plus important chez les organismes à la base des réseaux trophiques : les BCF calculés variant de 13 à 408 chez le poisson (soares 2008) et de 1740 à 4184 chez la moule bleue (staples 2004). Des BCF encore plus importants ont été mesurés chez certaines espèces d'algues (Correa-Reyes, 2007). Cheng et al (2006) ont étudié l'influence de la saison sur l'accumulation du nonylphénol et de l'octylphénol chez deux invertébrés marins. Les auteurs rapportent des BCF compris entre 2000 et 2900 pour le nonylphénol et entre 2500 et 4100 pour l'octylphénol. Cette variabilité saisonnière semble être liée au rythme de vie des organismes considérés et plus particulièrement aux périodes de reproduction. La principale voie d'introduction des alkylphénols chez les organismes aquatiques semble être la voie des branchies ou la voie dermique (Smith et Hill, 2004, pickford 2003). Les phénomènes de bioamplification le long de la chaîne trophique apparaissent quant à eux négligeables (Correa reyes 2007, Hu 2005). Les auteurs émettent l'hypothèse d'une métabolisation plus importante chez les organismes occupant le haut de la pyramide trophique et n'excluent pas le risque de contamination chronique liée à l'ingestion de nourriture contaminée.

b) La biotransformation

La biotransformation du nonylphénol est relativement bien documentée dans la littérature (Thibaut 1999, arukwe 2000, vazquez-duhalt, 2006). Chez la truite arc-en-ciel, le nonylphénol est d'abord métabolisé sous forme de composés glucuronidés qui sont ensuite hydrolysés, formant ainsi l'acide 9-(4-hydroxyphényle)-nonanoïque, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide 3-(4-hydroxyphényle)-2-propénoïque et l'acide 3-(4-hydroxyphényle)-propionique. Ferreira-Leach et Hill (2001) ont mis en évidence deux métabolites de l'octylphénol chez la truite arc-en-ciel : l'octylphénol-glucuronide et l'octylcatéchole. Cependant il semble nécessaire de préciser que la métabolisation de xénobiotiques est fonction de l'espèce considérée : les capacités de dépuration et d'élimination sont donc différentes d'une espèce à une autre (Smith et Hill 2004).

3.3.6. Toxicité des alkylphénols

Si les alkylphénols possédant de longues chaînes éthoxylées sont considérés comme étant peu toxiques, l'absence de ce groupement caractéristique hydrophile chez les alkylphénols est à l'origine de leur toxicité. Ainsi le nonylphénol est 200 fois plus toxique que le nonylphénol monoéthoxylé (Servos, 1999).

La toxicité des alkylphénols est aujourd'hui un fait avéré et largement documenté : on recense dans la littérature pas moins de 53 valeurs de toxicité chronique pour différentes espèces de poissons, d'invertébrés et d'algues incluant des espèces marines et des espèces d'eau douce (Vazquez-Duhalt).

Le nonylphénol et l'octylphénol présentent des valeurs de toxicité aiguë similaires, variant de 17 à 3000 µg/L chez le poisson, de 20 à 3000 µg/L chez les invertébrés et de 27-2500 µg/L chez les algues (Servos, 1999). Les valeurs de toxicité chronique sont équivalentes pour chacun des alkylphénols retenus pour cette étude, la littérature rapporte des valeurs de 6 µg/L chez le poisson (truite arc-en-

ciel) et de 3,9 µg/L chez les invertébrés (Servos, 1999). Au regard des concentrations environnementales rapportées dans le tableau X, il semblerait donc que certains sites présentent des risques importants pour de nombreuses espèces aquatiques.

Cependant, la conséquence majeure de la présence d'alkylphénols dans l'environnement semble être sa capacité à agir comme perturbateur endocrinien. Les alkylphénols sont considérés comme des oestrogéno-mimétiques ayant une action antagoniste du 17β-œstradiol, en raison de leur similitude de structure (Preuss et Ratte, 2007). En plus de son effet oestrogénique, le nonylphénol présente des capacités anti-androgéniques (Hill et Smith, 2006). Bien que la majeure partie des études se soit focalisée sur l'induction de la synthèse de la vitellogénine chez divers organismes aquatiques (Hemmer et al, 2001 ; Chikae et al, 2003), un nombre important d'effets sur différents organismes ont été signalés, comprenant des anomalies de développement, la féminisation des populations, l'augmentation de l'incidence de l'hermaphrodisme, la réduction de la fécondité, la réduction du développement des gonades et de la fonction de reproduction ou encore une diminution de la production d'œufs (Vazquez-Duhalt, 2006). Chez la daphnie, le nonylphénol a été considéré comme responsable de l'élimination métabolique de la testostérone résultant de l'augmentation du niveau d'androgène dans l'organisme (Baldwin, 1997). Il est couramment admis qu'une exposition au nonylphénol engendre des effets délétères sur le système immunitaire. Matozzo et al 2008, ont par exemple mis en évidence des modifications de la réponse fonctionnelle des hémocytes chez la coque exposée à des concentrations sublétales de nonylphénol. Des travaux de recherche ont également démontré la capacité des alkylphénols à induire des troubles du métabolisme protéique, lipidique et calcique (Schoenfuss 2008, Matozzo, 2008, Meier, 2007). Les alkylphénols semblent être capables d'initier de nombreuses réponses et d'interférer avec les systèmes de régulation des différents types de cellules mettant en jeu différents modes d'action. Ces observations laissent à penser que les effets des alkylphénols peuvent être très variables en fonction des espèces.

3.3.7. Aspects législatifs et réglementaires

L'ubiquité, la toxicité et la persistance des alkylphénols ont conduit les autorités compétentes à mettre en place des mesures restrictives concernant l'utilisation de ces polluants organiques. A la suite du plan d'action OSPAR (1992), les nonylphénols ainsi que leurs homologues polyéthoxylés ont été inscrits sur la liste « OSPAR » des produits chimiques devant faire l'objet de mesures prioritaires en 1998 ; ceci découlant d'une étude d'évaluation des risques révélant des rapports PEC / PNEC voisin de 1 dans certains systèmes aquatiques, indiquant le caractère potentiellement toxique de ces substances. En 2000, l'octylphénol fait lui aussi son entrée sur la liste OSPAR. Cette même année, les 4-NP et 4-t-OP entrent dans la liste des 33 substances classées comme « prioritaires » et « prioritaires dangereuses » de la DCE (DCE, 2000/60/CE). La directive fille de la DCE (2008/105/CE) fixe des Normes de Qualité Environnementales dans les eaux de surface qui sont de 0,3 et 0,01 µg.L-1 pour le 4-NP et 4-t-OP respectivement. Il paraît cependant intéressant de mentionner que ces composés ne possèdent pas à l'heure actuelle de Normes de Qualité environnementales relatives aux matrices biotiques. A la suite de leur identification comme substances dangereuses, les nonylphénols

et les nonylphénol-polyéthoxylés ont fait l'objet d'une restriction d'emploi et de mise sur le marché. Ainsi, la Directive 2003/53/CE du 18 juin 2003 spécifie que les NP et NPEO ne peuvent être placés sur le marché ou employés comme substances ou constituants de préparations dans des concentrations égales ou supérieures à 0,1% de la masse pour les applications et usages suivants : le nettoyage industriel et institutionnel (sauf si les liquides sont recyclés ou incinérés), les produits de nettoyage domestique, le traitement des textiles et cuirs, l'usinage de métaux, les produits de traitement des trayons (traitement vétérinaire), la fabrication de papier et pâtes à papier, les produits cosmétiques et d'hygiène corporelle (sauf spermicides) et les coformulants pour pesticides et biocides. Ces dispositions de mise sur le marché et d'usages sont applicables, dans les pays membres de la communauté européenne, à compter du 17 janvier 2005 (INERIS, 2005). En France, le 3 mai 2011, l'assemblée nationale a adopté une loi visant à interdire la fabrication, l'importation et la vente de produits contenant des APEO. Bien que les autorités Européenne, Canadienne, Japonaise ou encore Américaine aient engagées des processus de substitution et de régulation de ces composés, de nombreux pays comme la Chine et l'Inde continuent de produire ces substances en tonnage important.

3.4. Autre agent industriel : le cas du filtre UV 4-méthylbenzylidène camphre

3.4.2. Généralités et propriétés physico-chimiques

a) Généralités sur les filtres UV

Un filtre ultraviolet, ou filtre UV est un composé qui filtre les ondes électromagnétiques et bloque ou absorbe les radiations ultraviolettes. De nature chimique ou minérale, les filtres UV sont utilisés dans une vaste gamme d'applications. Selon la directive 76/768/CEE relative aux cosmétiques, un filtre UV se définit comme « une substance qui, contenue dans des produits cosmétiques de protection solaire, est destinée spécifiquement à filtrer certaines radiations pour protéger la peau contre certains effets nocifs de ces radiations ». A ce titre, 27 molécules sont autorisées en cosmétique dans l'Union Européenne, dont 26 sont des molécules organiques, parmi celles-ci on retrouve la 4-méthylbenzylidène camphre (4-MBC). Les filtres UV entrent dans la composition d'une grande variété de cosmétiques (produits de soin corporel, lotions, baumes à lèvres, shampooings, laques, crèmes et parfums ; Rodil et Moeder, 2008a) afin de protéger la peau et les cheveux ainsi que pour assurer la stabilité des formulations (Díaz-Cruz et Barceló, 2009). Ces composés sont également incorporés dans divers matériaux (plastiques, peintures, textiles ; Kunisue et al., 2010 ; Kameda et al., 2011) ainsi que dans les emballages alimentaires (Moreta et Tena, 2011). Selon un rapport exhaustif sur les produits de soin corporel, les filtres UV ont connu la plus forte croissance des ventes : 13% en Europe de 2002 à 2003 (ACNielsen Global Services, 2004). Dans les crèmes solaires, la concentration maximale autorisée en filtres UV varie, selon les molécules, entre 0,5 et 15 %. La 4-MBC peut quant à elle être utilisée dans la formulation de produit cosmétiques à une concentration maximale de 4% (rapport ANSM 2009BCT0051).

b) Propriétés physico-chimiques

En termes de propriétés physicochimiques, les filtres UV comportent un ou plusieurs noyaux aromatiques, parfois conjugués avec des doubles liaisons carbone-carbone et des groupements carbonyle. La délocalisation des électrons par conjugaison permet l'absorption des photons de longueur d'onde comprise entre 280 et 315 nm (UV-B) et 315 et 400 nm (UV-A). En effet, lorsque la molécule reçoit une radiation UV, elle passe dans un état excité puis retourne dans son état fondamental en dissipant l'énergie par des vibrations et/ou en réémettant une radiation moins dangereuse pour la peau (infrarouge par exemple). La 4MBC est un composé fortement conjugué, peu polaire et peu soluble dans l'eau. Elle possède en outre un fort caractère hydrophobe ($\log K_{ow}=4,65$). Les propriétés physico-chimiques de cette molécule sont relatées dans la Table 23.

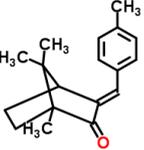
Composé	Formule moléculaire	N° CAS	Structure	Masse molaire (g/mol)	Log K_{ow}	Solubilité dans l'eau (mg/L)
4-MBC	$C_{18}H_{22}O$	36861-47-9		254,4	4,95	17

Table 23: Structure et caractéristiques physico-chimique de la 4MBC

3.4.3. Les stations d'épurations : principales voies d'introduction des filtres UV dans l'environnement

La pénétration des filtres UV utilisés en cosmétique à travers la peau étant faible, estimée entre 0,1 et 4 % (Giokas et al., 2007). Ces composés peuvent être directement introduits dans le milieu aquatique lors des activités de baignade. Cependant, leur apport principal est indirect, il est lié aux eaux usées, suite aux douches et aux lessives (Plagellat et al., 2006).

Liu et al (2012) (environmental pollution 225-232), mettent en évidence la faible capacité des traitements primaires à éliminer la 4MBC. Cependant les auteurs rapportent un taux d'abattement compris entre 78 et 97% lors de l'utilisation d'un traitement secondaire biologique (boues activées). Des résultats similaires ont été publiés par Kupper et al, 2006 et Tsui et al, 2014. Le caractère lipophile de ce composé laisse en effet présager une adsorption préférentielle sur les boues de station d'épuration : cette hypothèse a en outre été démontrée par Gago-Ferrero (2011).

La présence de 4-MBC dans les effluents et influents de stations d'épuration est variable selon les sites d'étude et présente une variabilité saisonnière importante qui peut être attribuée à l'utilisation plus importante de crème solaire lors de la saison estivale (Tsui, Leung, 2014). Certains auteurs rapportent des valeurs de concentration comprises entre 48 et 3280 ng/L pour les effluents de station d'épuration et comprises entre 38 et 2700 ng/L pour les influents (Gago, Tsui, Kupper, Liu). Ces résultats mettent en évidence l'introduction de 4-MBC dans les systèmes aquatiques via les rejets des usines de traitement des eaux usées, indiquant un risque potentiel pour les écosystèmes.

3.4.4. Devenir et occurrence de la 4MBC dans les systèmes aquatiques

- a) Les phénomènes de dégradation et de sorption en milieu naturel (d'après diaz-cruz, 2008)

Les réactions photochimiques induites par le rayonnement solaire sont susceptibles d'être les principaux processus abiotiques régissant le sort des molécules organiques dans les eaux de surface. La photolyse provoque la dissociation de molécules absorbantes en fragments réactifs (radicaux libres) ou en intermédiaires réactifs. Les filtres UV organiques contiennent des groupements chromophores susceptibles d'absorber la lumière à des longueurs d'ondes présentes dans le spectre solaire, mais ils peuvent également subir des transformations indirectes en présence de photosensibilisateurs. La photostabilité des filtres UV a principalement été étudiée pour évaluer la qualité des crèmes solaires. Cependant peu d'efforts ont été investis à l'étude des phénomènes de photolyse dans l'environnement. Les travaux de Sakkas et al (2003) indiquent que les processus de photodégradation environnementale dépendent de la présence d'autres composés, et notamment de celle de matière organique dissoute. Rodil et al, 2009 ont évalué la photostabilité de la 4MBC dans l'eau sous lumière artificielle, les auteurs concluent à une relative stabilité de ce composé après 72 heures d'irradiation. La photoisomérisation peut conduire à la formation d'espèces qui absorbent moins la lumière UV que la molécule parent (Plaguellat, 2006). Dans les systèmes aquatiques, assimilables à des milieux dilués, cette isomérisation est rapide et réversible, ce qui conduit à la présence de mélange d'isomères. Un certain nombre de filtres UV existent dans l'environnement sous leurs formes isomériques cis et trans du fait de la présence d'une double liaison exocyclique C=C adjacente au noyau aromatique. Les composés commerciaux sont généralement des isomères trans qui s'isomérisent en forme cis lors de l'exposition au rayonnement UV (Poiger, 2004). Dans le cas de la 4MBC, les deux isomères peuvent être chiraux et peuvent comprendre des isomères optiques (énantiomères), qui présentent des propriétés physico-chimiques identiques, mais qui peuvent différer dans leur comportement et dans leurs effets biologiques. La dégradation biotique de ces composés peut être énantio-sélective ou stéréo-sélective, favorisant ainsi la présence dans l'environnement de l'une des formes (Ariens 1989). Buser et al. (2005) ont démontré que la composition stéréoisomérique de la 4MBC dans l'environnement était influencée par les processus de dégradation biotique des STEP. En ce qui concerne les eaux de surface, les auteurs rapportent des ratios racémique/stéréoisomère qui dépendent de l'activité microbienne du site d'étude. De la même manière, la composition d'énantiomère de la 4MBC dans le biote dépend de l'espèce considérée. Peu d'études sont relatives à la sorption des filtres UV. Bien que certains auteurs aient étudié l'occurrence de ces micropolluants organiques dans la matrice sédimentaire des systèmes aquatiques, la 4MBC n'est que rarement quantifiée.

- b) Occurrence de la 4MBC dans les systèmes aquatiques

La Table 24 présente les concentrations de 4MBC mesurées dans les eaux de surface et dans les sédiments de différents systèmes aquatiques à travers le monde. Ces résultats semblent indiquer le

caractère ubiquiste de ce micropolluant, bien que celui-ci soit majoritairement présent dans la phase dissoute.

Localisation de l'étude	Milieu	Concentration de 4MBC dans la phase dissoute (min-max) (ng/L)	Références
Bangkok	Eaux de rivière	ND	Tsui et al, 2014
Espagne	Eaux de rivière	ND-12,6	Gago-Ferrero,2013
Espagne	Eaux de rivière	264-794	Roman et al,2011
Suisse	Eaux de rivière	12-17	Fent et al, 2010
Chine	Eaux de rivière	10-5790	Liu et al, 2010
Allemagne	Eaux de rivière	5-15	Rodil et Moeder, 2008
Allemagne	Eaux de lac	ND-148	Rodil et Moeder, 2008
Suisse	Eaux de lac	ND-28	Balmer, 2005
Hong-Kong	Eaux de mer	173-379	Tsui et al, 2014
Espagne	Eaux de mer	358-758	Roman et al,2011
Localisation de l'étude	Milieu	Concentration de 4MBC dans les sédiments (min-max) (ng/g)	Références
Colombie	Sédiments de rivière	ND-17,2	Baron, 2013
Espagne	Sédiments de rivière	ND	Gago-Ferrero,2011
Japon	Sédiments de rivière	ND	Kameda, 2011
Allemagne	Sédiments de rivière	ND-4	Ricking et al, 2003
Colombie	Sédiments marins	ND-7,90	Baron, 2013
Allemagne	Sédiments de lac	ND	Rodil et Moeder, 2008

Table 24: Concentration de 4MBC dans les phases dissoutes et sédimentaires des systèmes aquatiques à travers le monde

3.4.5. Devenir de la 4MBC dans les organismes aquatiques

Jusqu'à présent, très peu de données sont disponibles sur la bioaccumulation des filtres UV dans les organismes aquatiques. Gago-Ferro (2012) mettent en exergue ce manque de données et résument les divers travaux relatifs à ce sujet. La plupart des études sont concentrées sur différentes espèces de poissons, bien que dans une moindre mesure, les phénomènes de bioaccumulation aient été étudiés chez les mollusques et les crustacés. Une étude réalisée par Nagtegaal et al (1997) fournit les premières informations relatives à la présence de filtres UV chez la perche et le gardon. Les résultats semblent indiquer que la 4MBC peut être accumulée de manière sélective en fonction de l'espèce considérée ; la perche accumule la 4MBC principalement dans les tissus musculaires, alors que le gardon présente un niveau de concentration plus élevé dans les abats. Buser et al ont démontré que la composition énantiomérique de 4MBC chez la perche était très différente de celle observée dans l'eau du lac environnant. En revanche, elle était similaire chez le gardon. Ces résultats semblent indiquer que la bioconcentration ou le métabolisme de ce composé peuvent être différents d'une

espèce à une autre. Les facteurs responsables de ces différences restent cependant très flous. La 4MBC, ainsi que d'autres composés de type benzotriazole ont été analysés chez une grande variété d'espèces aquatiques par Nakata et al. Bien que la 4MBC ait été détectée dans des échantillons issus de différentes études européennes, elle n'a été détectée dans aucun des échantillons de cette étude japonaise. Les auteurs suggèrent qu'il existe différents profils de contamination du biote par les filtres UV qui dépendent principalement des différences d'utilisation entre les pays. Les concentrations de 4MBC mesurées chez différentes espèces aquatiques à travers le monde sont reportées dans la Table 25.

Localisation de l'étude	Espèces considérées	Concentration de 4MBC dans le biote (min-max) (ng/g dw)	Références
Chine	Poissons sauvages	0,2-2,3	Peng et al, 2015
Espagne	Poissons de rivière (Luciobarbus Sclateri)	ND	Gago-Ferrero 2015
Espagne	Poissons de rivière (Barbus graellsii)	<2,3-2,7	Gago-Ferrero 2015

A compléter avec la review Gago-Ferrero (2012)

Table 25: Concentrations de la 4MBC dans diverses matrices biotiques à travers le monde

3.4.6. Toxicité et effets de la 4MBC

Les études écotoxicologiques relatives à l'exposition du biote aux filtres UV sont peu fréquentes. Cependant, les quelques rares études semblent être concluantes. Les poissons ont longtemps été considérés comme des traceurs permettant d'évaluer l'ampleur de la contamination lipophile des écosystèmes aquatiques. Par conséquent, la plupart des études écotoxicologiques sur l'effet des filtres UV ont été menées sur différentes espèces de poissons lors de tests *in vivo*. Il a été démontré que la 4MBC pouvait avoir une activité hormonale oestrogénique (Inui,2003). Des essais sur l'inhibition de la reproduction de l'algue verte *Scenedesmus vacuolatus* n'ont montré aucun effet de la 4MBC (rodil 2009). En revanche, des études similaires d'exposition de ce même composé ont montré une inhibition de la croissance chez *Desmodesmus suspicatus* après 72h (Sieratowic, 2011). L'évaluation des effets de mélange de produit chimiques a attiré une attention toute particulière au cours des dernières décennies. En ce qui concerne les filtres UV, ces effets sont largement inconnus et sont une préoccupation importante des études environnementales. En effet, ces substances sont habituellement formulées sous forme de mélanges complexes permettant d'atteindre des indices de protection élevés. Tenant compte de la grande diversité des filtres UV présents sur le marché et de la présence d'autres perturbateurs endocriniens dans les systèmes aquatiques, les filtres UV peuvent agir de façon additive. En effet, des interactions cumulatives ont été rapportées dans quelques études (Brian, 2005 ; Kunz 2006 et 2009). Ces articles démontrent en particulier des effets

synergiques importants lors de la combinaison de filtres UV, malgré leur présence en concentration équivalente aux NOEC individuelles.

4. Les pesticides

4.2. Généralités et propriétés physico-chimiques

4.2.1. Définition

Les pesticides ou produits phytosanitaires sont définis par la directive 91/414/CE comme des substances actives (ou préparation contenant une ou plusieurs substances actives) destinées à :

- Protéger les végétaux ou les produits vitaux des végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action
- Exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (régulateurs de croissance)
- Assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que ces substances ou produit ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil de la Commission concernant les agents conservateurs
- Détruire les végétaux indésirables
- Freiner ou prévenir la croissance indésirable des végétaux

Le terme « produit phytosanitaire » fait référence au domaine de l'agriculture, cette dénomination ne couvre donc pas les produits utilisés dans un même but, mais dont l'usage est non-agricole. Il faut donc souligner l'existence des biocides, substances réservées à des usages domestiques tels que l'entretien des espaces publics ou encore des voiries, qui sont régis par une autre directive européenne (directive 98/8/CE). Cependant, le terme générique « pesticide » est largement employé et ce dans de nombreux domaines. Il englobe tous les usages (agricoles ou domestiques) et nous l'utiliserons donc, par abus de langage, comme synonyme du terme produit phytosanitaire dans ce mémoire.

Il existe deux grandes classifications des pesticides : ces composés peuvent être regroupés par famille chimique ou par cible. La classification par famille rassemble des produits ayant des groupements chimiques fonctionnels identiques. On distingue ainsi parmi les grandes familles chimiques les organophosphorés, les organochlorés, les carbamates et thiocarbamates et les pyréthriinoïdes de synthèse. Une classification peut également être établie par cible. Les pesticides se répartissent alors en trois catégories principales : les herbicides, les fongicides et les insecticides qui luttent respectivement contre les « mauvaises herbes », les champignons et les insectes. Nous pouvons également noter l'existence d'autres catégories comme les rodenticides (contre les rongeurs), les nématicides (contre les nématodes), les molluscicides (contres les escargots, les limaces) ou les corvicides (contre les corbeaux).

La restriction de l'utilisation et même l'interdiction des pesticides de synthèse, en plus de la demande croissante pour les cultures de l'agriculture biologique ont nécessité le développement de

nouveaux pesticides plus respectueux de l'environnement. On parle alors de biopesticides, contraction de « pesticides biologiques ». Ils sont définis par la Commission européenne comme une « forme de pesticides basés sur des micro-organismes ou des produits naturels ». Ces produits sont typiquement produits par la culture et la concentration d'organismes naturels ou de leurs métabolites, dont des bactéries et autres microbes (champignons, nématodes...). Ils sont souvent considérés comme des éléments importants des programmes de lutte intégrée et sont utilisés comme substituts des pesticides chimiques.

4.2.2. Historique et statistique d'usage des pesticides

L'existence des premières pratiques phytosanitaires apparaît au milieu du 19^{ème} siècle où la multiplication des échanges commerciaux constitue un facteur important d'accroissement du nombre d'espèces nuisibles (Fourche, 2004). Le phylloxéra (insecte homoptère) menace alors les vignobles français et le doryphore, coléoptère originaire des Etats-Unis attaque les cultures de pommes de terre. L'extension de ces crises jugées sanitaires se poursuit jusqu'à la seconde guerre mondiale. Les premiers pesticides alors utilisés sont d'origine minérale, principalement des dérivés de l'arsenic, de l'alumine, mais aussi du soufre et du cuivre comme la célèbre bouillie bordelaise, un fongicide utilisé depuis la fin des années 1800 contre le mildiou. A l'aube du 20^{ème} siècle, la chimie organique se développe avec notamment la synthèse de produits de la famille des organochlorés comme le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) dont les propriétés insecticides, découvertes en 1948 pour le chimiste Paul Hermann Müller furent en premier lieu utilisées à des fins médicales pour la destruction des insectes porteurs du paludisme et typhus. Il faudra attendre la fin de la Seconde Guerre Mondiale pour voir apparaître l'utilisation de ce célèbre organochloré sur les parcelles agricoles. Au cours de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, de nombreuses découvertes ont permis d'enrichir la famille des pesticides notamment par les recherches menées sur les gaz de combat. Ainsi, au fil des années, les organophosphorés remplacent peu à peu les organochlorés. Les herbicides de la famille des urées substituées (diuron) et des atrazines voient le jour au Etats-Unis dans les années 50. A partir des années 80, un ralentissement de la consommation de pesticides peut être observé, lié en partie à la découverte de substances actives plus efficaces nécessitant des tonnages plus faibles.

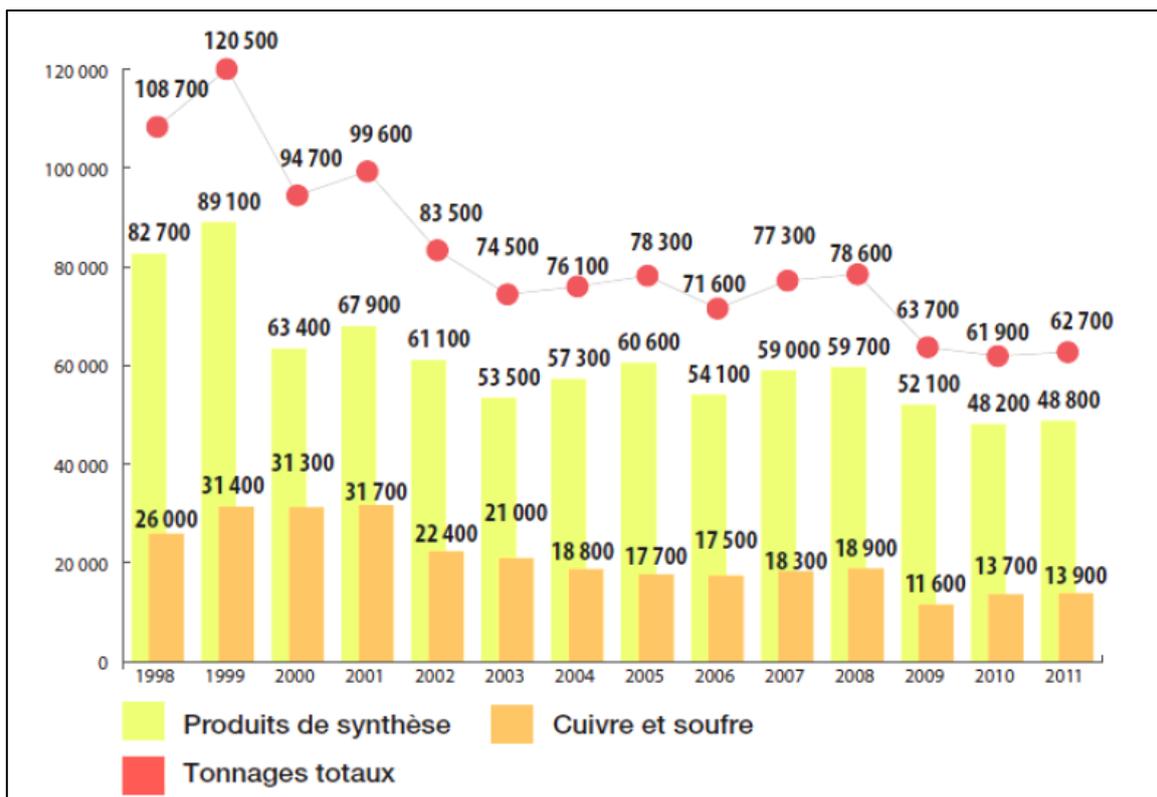


Figure 15: Quantités de substances actives (en tonnes) vendues en France de 1998 à 2011 (IUPP, 2012)

Malgré la baisse constante du tonnage des substances actives vendues entre 1999 et 2011 (Figure 15), la France reste le premier consommateur de pesticides au niveau européen avec plus de 62000 tonnes de substances actives vendue en 2011 (UIPP, 2012), et se place au 3ème rang mondial derrière les Etats-Unis et l'Inde. La grande majorité des substances actives vendues en France sont des produits de synthèse avec 48800 tonnes en 2011 contre 13900 pour les produits inorganiques (cuivre et soufre). En France, la viticulture représente 20% de cette consommation totale, pour seulement 3% de la Surface Agricole Utile (SAU), et concentre la majorité des tonnages de soufre et de cuivre (Auberto et al., 2005). Aujourd'hui, le marché mondial des pesticides est d'environ 44 milliards de dollars. Les herbicides représentent presque la moitié de ce marché avec 45,2%. Les insecticides constituent 26,1% du marché et les fongicides 25,9%. Ces trois classes de produits phytosanitaires représentent à elles-seules presque la totalité du marché mondial (97%).

4.2.3. Propriétés physico-chimiques des pesticides d'intérêt

De la famille des phénylamines, le diuron appartient à la sous classe des phénylurées et au groupe des urées substituées. Ce produit phytosanitaire ayant un effet herbicide agit par inhibition de la production photosynthétique de dioxygène en bloquant le transfert des électrons au niveau du photosystème II de la photosynthèse. Sa solubilité dans l'eau est moyenne (Table 26) mais suffisante pour qu'on le trouve dans les eaux superficielles, les nappes phréatiques, ou après évaporation dans les eaux de pluies, brumes, brouillards et rosées. Son hydrolyse est négligeable à pH neutre mais augmente à mesure que les conditions deviennent fortement acides ou alcalines (Spencer, 1982;

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

Salvestrini et al., 2002); conduisant à son dérivé principale, la 3,4-Dichloroaniline. Le diuron possède un coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{ow} = 2,6$) faible à modéré. Ce composé présente un $\log K_{oc}$ qui prédit son affinité pour les particules organiques du sol. Cette valeur élevée de $\log K_{oc}$ montre une grande capacité d'adsorption et, par conséquent, une répartition hétérogène dans le sol.

Le spinosad est une substance active de produit phytosanitaire qui présente un effet insecticide. Considéré comme l'un des premiers biopesticides, il a été enregistré et commercialisé pour la première fois en Corée et aux États-Unis entre 1996 et 1997. Il a été initialement formulé comme un concentré de suspension pour des applications en serre ou en plein champ (par exemple Tracer[®], Spintor[®], Success[®]). Le spinosad est actuellement homologué dans plus de 80 pays à travers le monde pour contrôler plusieurs organismes appartenant aux groupes des lépidoptères, diptères, ou encore coléoptères. C'est un produit fermenté dérivé du mélange de deux toxines (spinosyne A et D) sécrétées par une bactérie vivant dans le sol (*Saccharopolyspora spinosa*). Structurellement, les spinosynes se composent d'un système cyclique macrolide central (aglycone) avec un sucre rhamnose en position 9 et un sucre forosamine en position 17. Le terme «spinosad» fait référence à la combinaison de deux principes actifs de structure similaire, spinosynes A et D, qui diffèrent par un groupe méthyle en position 6 sur le noyau macrolide central. Les principales caractéristiques physico-chimiques sont synthétisées dans la Table 26.

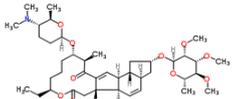
Classe	Produit	CAS	Formule brute	Structure	Masse molaire (g/mol)	Log Kow	Pka	Log Koc	Solubilité dans l'eau (mg/L)
Herbicide	Diuron	330-54-1	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O		233,1	2,8			42 (25)
Insecticide	Spinosad	131929-60-7	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀		731,9	4-4,5	7,87-8,10		235 (20)

Table 26: Structure et propriétés physico-chimiques des pesticides d'intérêt

4.3. Sources, transferts et devenir des pesticides dans l'environnement

4.3.2. Sources de contamination environnementale

La majorité des pesticides émis dans l'environnement sont issues des pratiques de traitement agricole. Bien que seulement 5% de la consommation française de pesticides soit attribuée aux usages non-agricoles (entretien des espaces publics, jardinage...), ceux-ci peuvent contribuer de manière significative à la pollution de nos écosystèmes aquatiques du fait des taux de transfert plus élevés en milieu urbain qu'en milieu rural (surfaces urbaines imperméabilisées, transfert direct vers les eaux de surface, faible dégradation biologique).

4.3.3. Transferts et devenir des pesticides dans l'environnement

L'application de pesticides sur les cultures engendre une dissémination de substances actives vers des compartiments environnementaux non cibles : l'air, le sol, les eaux souterraines et les eaux de

surface. Aubertot et al. (2005) considèrent que seulement 25 à 80% des substances actives appliquées parviennent jusqu'à leur cible. Les processus responsables de ces transferts sont la volatilisation, la dérive, la rétention, le lessivage et le ruissellement (Figure 16).

Ces processus sont soumis à de nombreux facteurs, intrinsèques à la molécule ou liés aux conditions environnementales. Les phénomènes de dégradation en milieu naturel jouent également un rôle prépondérant au regard de l'impact des pesticides sur les écosystèmes. Ces phénomènes sont à l'origine de sous-produits qui peuvent être plus ou moins néfastes pour l'environnement que la substance active d'origine.

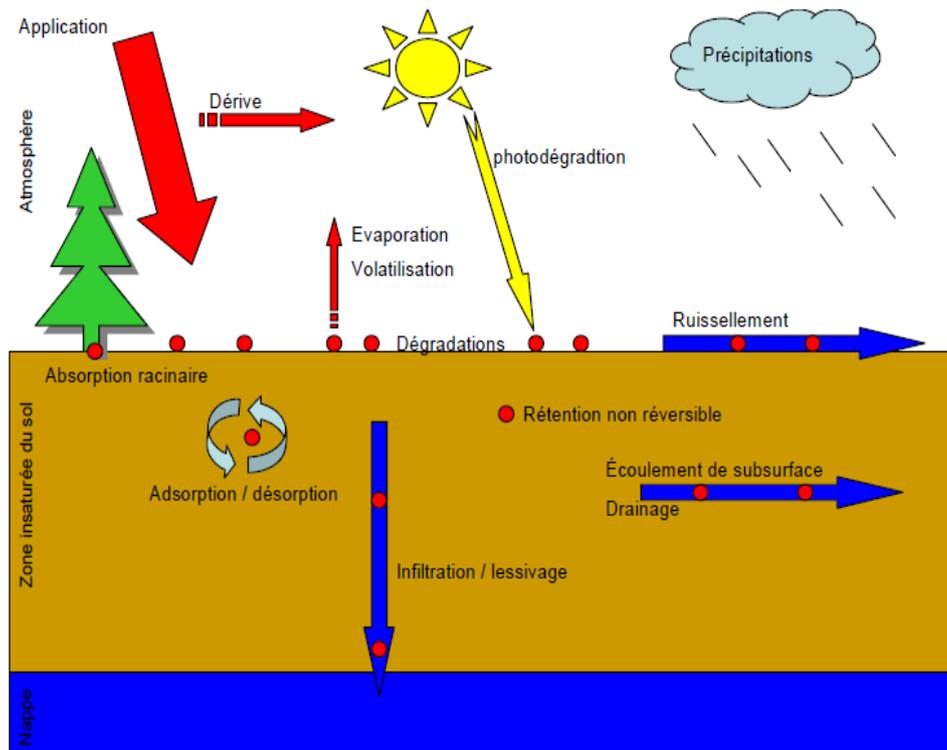


Figure 16: Processus de dissipation des pesticides dans l'environnement

a) Processus de transfert vers l'air : la volatilisation et la dérive

Lors de l'application de pesticides, une partie de la quantité épanchée peut se retrouver dans l'air. Certaines sources font état de pertes atmosphériques à hauteur de 90% de la dose appliquée (Bedos et al 2002). Les phénomènes de volatilisation (passage de la phase aqueuse à la phase gazeuse) ainsi que les phénomènes de dérivation (dispersion de microgouttelettes dans l'air) sont à l'origine de la dissémination de pesticides dans l'air. La volatilisation des pesticides est essentiellement liée aux propriétés physico-chimiques de la molécule et plus particulièrement à la constante de Henry (H). Cette constante physique permet d'évaluer la tendance d'un produit à passer de l'état dissout à l'état gazeux. Ainsi, plus H est élevée, plus le produit a tendance à se volatiliser. La variation des conditions climatiques peut cependant influencer ce processus : l'augmentation de la température ou du vent accentue les processus de volatilisation (Klöppel et Kördel, 1997). Le phénomène de dérive est, quant à lui, principalement dépendant du matériel agricole utilisé (type de buse), mais

également des facteurs climatiques comme la vitesse du vent (Ammons, 2000, Meli, 2003). Les pesticides ayant subi un phénomène de dérivation peuvent retomber en dehors de la zone de traitement et contaminer directement les masses d'eau avoisinantes (rivière, ruisseau, lac...) (Reichenberger, 2007).

b) *Processus de rétention dans les sols*

La rétention des pesticides dépend des capacités de sorption de la substance active déterminées notamment par les valeurs de K_{oc} et K_d mais également des caractéristiques du sol considéré (taux de matière organique, taux d'argile...). La rétention des pesticides dans le sol est un processus cinétique au même titre que la dégradation qui débute avec l'application du pesticide et se poursuit jusqu'à atteindre un niveau seuil de rétention. On distingue deux types de rétention, la rétention réversible et la rétention non-réversible (Schiavon, 1988). La rétention réversible se mesure généralement grâce à des techniques d'extraction des pesticides et en étudiant les temps d'élution des pesticides dans des colonnes de sol. La rétention non-réversible se définit comme une rétention dont l'extraction de la molécule induit un changement substantiel de la matrice de rétention ou de la molécule extraite. En terme d'évaluation de risque, la formation de résidus non extractibles est considérée à la fois comme une atténuation de la biodisponibilité de pesticides mais également comme une augmentation de leur rémanence dans les sols en raison des processus de relargage à long terme (Burriuso, 2006).

c) *Processus de transfert vers les eaux souterraines : le lessivage*

Le processus de lessivage des pesticides correspond au transfert de ces substances actives des couches superficielles du sol vers les eaux souterraines (nappes phréatiques) ou au transfert de la zone non saturée à la zone saturée du sol. Deux types de transfert sont à différencier : le transfert matriciel et le transfert préférentiel. Le transfert matriciel correspond à la percolation de l'eau dans le sol, entraînant la lixiviation des molécules. La vitesse de transfert dépend alors des caractéristiques du sol, des propriétés physico-chimiques de la molécule, de la vitesse d'infiltration et de l'épaisseur de la zone non saturée du sol considéré. Le transfert préférentiel correspond au transfert des pesticides de la zone superficielle du sol vers la zone saturée. Il est souvent défini comme un transfert vertical rapide qui engendre la contamination des eaux souterraines, le temps de dissipation des pesticides étant limité (Delphin et Chapot, 2006). L'écoulement préférentiel serait à l'origine de la présence de molécules difficilement lessivables dans les nappes phréatiques (Jaris et Dubus, 2006). La modélisation de ces transferts préférentiels reste cependant très complexe du fait de l'estimation difficile de la présence et du rôle exact des macropores du sol dans ce processus.

d) *Processus de transfert vers les eaux de surface : le ruissellement*

Le ruissellement inclut les pesticides dissous, en suspension ou adsorbés sur les matières en suspension et transportés par l'eau depuis une surface traitée (Leonard, 1990).

On distingue 3 types de ruissellements :

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

- Le ruissellement hortonien qui résulte d'un dépassement de la capacité d'infiltration du sol
- Le ruissellement sur sol saturé engendré par une saturation des capacités de stockage couplée à celle des transferts latéraux. Ce ruissellement s'opère généralement lors de remontées de nappe coïncidant avec une section verticale concave de talweg (Lecomte 1999).
- Le ruissellement hypodermique, également nommé écoulement de sub-surface, qui se produit lorsque la conductivité latérale est plus importante que la conductivité verticale.

Le principal processus responsable du transport de pesticides via le ruissellement correspond à la mobilisation des pesticides épandus sur les sols. Ce processus résulte d'un ensemble de mécanismes complexes détaillés par Lecomte et al 1999 et inclut :

- La diffusion des pesticides de la solution d'épandage du sol vers la masse d'eau ruisselante
- L'augmentation des échanges sol/eau ruisselante générée par l'impact des gouttes de pluie lors des épisodes de précipitation
- La désorption des pesticides à partir du sol
- La dissolution de cristaux contenant potentiellement des pesticides et présents à la surface du sol
- La mise en suspension de ces mêmes cristaux
- L'érosion des particules du sol sur lesquelles des pesticides peuvent être adsorbés

Les phénomènes de ruissellement sont dépendants de nombreux paramètres comme l'aménagement du territoire, les pratiques agricoles, les caractéristiques du sol considéré et le climat.

e) Les phénomènes de dégradation en milieu naturel

Dès leurs applications, les pesticides peuvent être soumis aux phénomènes de dégradation qui peuvent être de nature physico-chimique et/ou biologique.

Les processus de dégradation physico-chimiques les plus courants sont la photolyse et l'hydrolyse.

L'hydrolyse et la photodégradation

Du fait de sa lenteur, l'hydrolyse des pesticides reste marginale, à l'inverse de la photodégradation qui peut jouer un rôle majeur dans la transformation des pesticides présents dans la couche superficielle des masses d'eau (Barcelo, 2000 ; Al Housari et al 2011). Au regard des pesticides d'intérêt choisis pour cette étude, Jirkhovsky et al (1997) relatent la possible photodégradation du diuron. Les auteurs mettent en évidence l'existence de plusieurs produits de dégradation (Figure 17). En solution aqueuse, les principaux photoproduits primaires résultent de la substitution de l'atome de chlore par un groupe hydroxyle. L'irradiation après dispersion sur un support solide conduit principalement à la formation du N-(3,4-dichlorophenyl)-N'-N'-formylmethylurea (produit 3) et de produits déméthylés (produits 4 et 5).

Photodégradation

Biodégradation

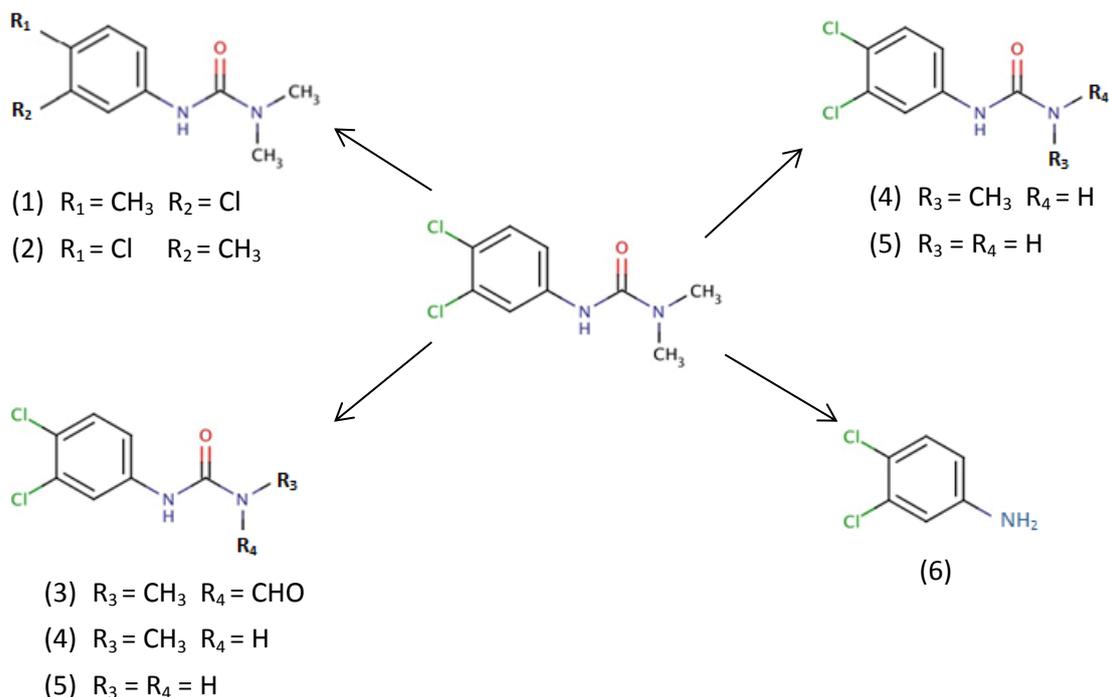


Figure 17: Schéma de la photodégradation et de la biotransformation du diuron

La photolyse apparaît comme la principale voie de dégradation du spinosad dans les systèmes aquatiques. Ce processus est très rapide : les temps de demi-vie observés sont de l'ordre de 1 à 2 jours en été sous irradiation solaire. En conditions aqueuses, la photolyse engendre principalement la perte de sucre et la réduction de la liaison 13-14 du noyau macrolide formant ainsi un photoproduit majoritaire identifié comme étant le 13,14-dihydrospinosyn A C-17 PsA (Cleveland, 2002).

✚ Les phénomènes de biodégradation

Les microorganismes présents au sein de nos écosystèmes aquatiques participent activement à la dégradation des pesticides. De nombreuses études traitent de la biodégradation du diuron. La plupart de ces travaux ont consisté à surveiller la disparition du diuron et à mettre en évidence les microorganismes capable de le dégrader (Hassink, 1994, Esposito 1998, Shelton 1996). Quelques études ont cependant décrit la nature des métabolites (Figure 17) ; les principaux métabolites observés sont des dérivés mono et diméthylés (produits 4 et 5) ainsi que la 3,4-Dichloroaniline (produit 6). Des études de toxicité réalisées sur les métabolites 4 et 5 montrent que les produits de biodégradation présentent une toxicité non-cible plus élevée que celle de la molécule mère (Tixier, 2000). Ces travaux mettent en évidence l'importance d'identifier les produits de dégradation qu'il semble nécessaire d'inclure aux démarches d'évaluation des risques environnementaux. Les transformations biotiques participent également à la dégradation du spinosad dans les systèmes aquatiques. Bien que négligeables par rapport aux phénomènes de photolyse, la biodégradation du

spinosad peut être considérée comme une voie importante de dégradation en absence de lumière. En condition anaérobie, la dégradation de cet insecticide donne lieu à de nombreux métabolites (Figure 18) mis en évidence par Cleveland et al (2002).

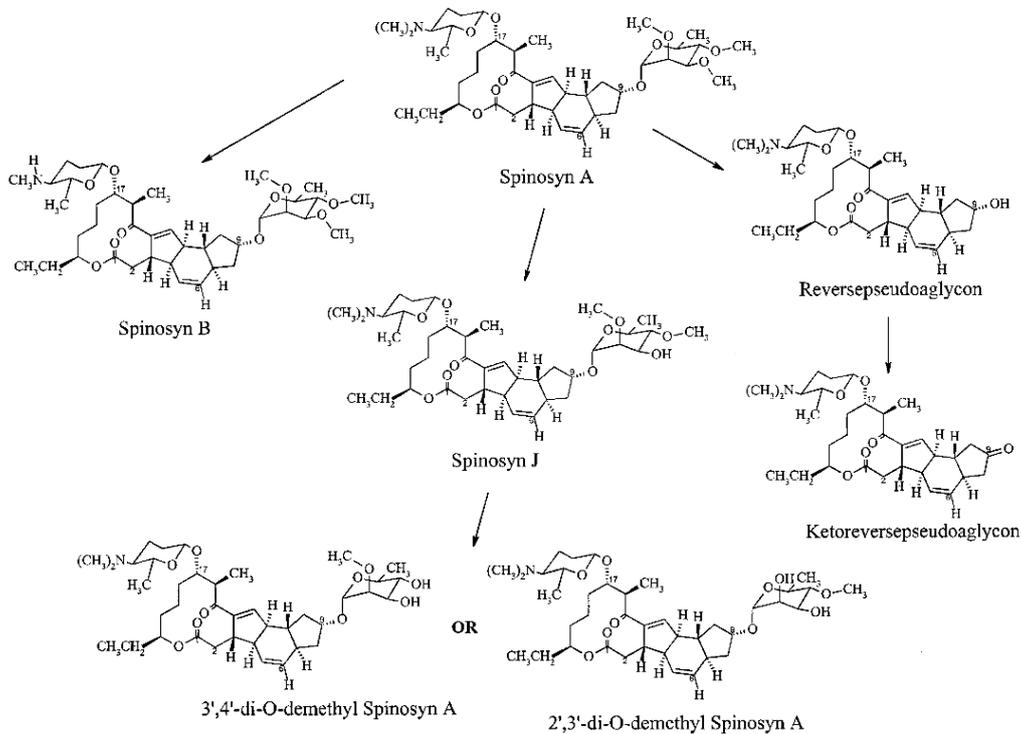


Figure 18: Dégradation du spinosad en conditions anaérobies dans l'environnement aquatique

f) Les phénomènes de sorption en milieux naturels

Suivant leurs propriétés physico-chimiques, les pesticides peuvent être accumulés dans les sols et dans les sédiments. L'adsorption sur les particules de sol peut être décrite par l'équation suivante :

$$K_d = \frac{x}{m \times C_e}$$

Où K_d est le coefficient de distribution de la molécule considérée entre les phases solide et liquide, x la quantité de polluant adsorbée sur le sol, m la masse de sol et C_e la concentration du polluant en solution (en équilibre avec la phase adsorbée).

Au regard de l'affinité importante de nombreux pesticides pour la matière organique, le coefficient de partage K_d est couramment rapporté à la teneur en carbone organique du sol ou du sédiment considéré. Ce coefficient de partage normalisé (K_{oc}) est exprimé de la manière suivante :

$$K_{oc} = K_d \times \frac{100}{C}$$

Où C représente le pourcentage de carbone organique contenu dans la phase solide.

D'une manière générale, l'affinité des pesticides pour les particules solides augmente avec le K_{oc} et diminue lorsque la solubilité de la molécule augmente (Clavet et al, 2005). Pour les composés

ionisables, le pH du milieu conditionne la distribution de la molécule entre la phase liquide et les phases solides.

La littérature met en évidence la capacité du diuron à s'adsorber sur les sols et les sédiments (Smernik, 2015, Rocha 2013, Umali 2012). Cependant, ces phénomènes de sorption sont dépendants de nombreux paramètres comme les caractéristiques du sol, la présence plus ou moins importante de minéraux, d'acides humiques ou encore de carbone organique. A l'inverse du diuron, l'adsorption du spinosad sur les matrices solides n'a que très peu été étudiée : seul Cleveland et al, mentionne une partition rapide de cet insecticide entre la phase liquide et les phases solides des systèmes aquatiques.

4.3.4. Données d'occurrence des pesticides dans les systèmes aquatiques

D'après le rapport 2013 du service de l'observation et des statistiques (SOeS 2013), 93% des cours d'eau de France métropolitaine sont contaminés par des pesticides. Cette étude met en évidence l'ubiquité des pesticides dans les eaux de surface (Figure 19). Notons cependant que la majorité des sites de mesure présente des concentrations annuelles en pesticides inférieures à 0,5 µg/L. Les points au-delà de ce seuil se situent dans les régions céréalières et viticoles principalement localisées dans le bassin parisien, en Adour-Garonne et le long du Rhône.

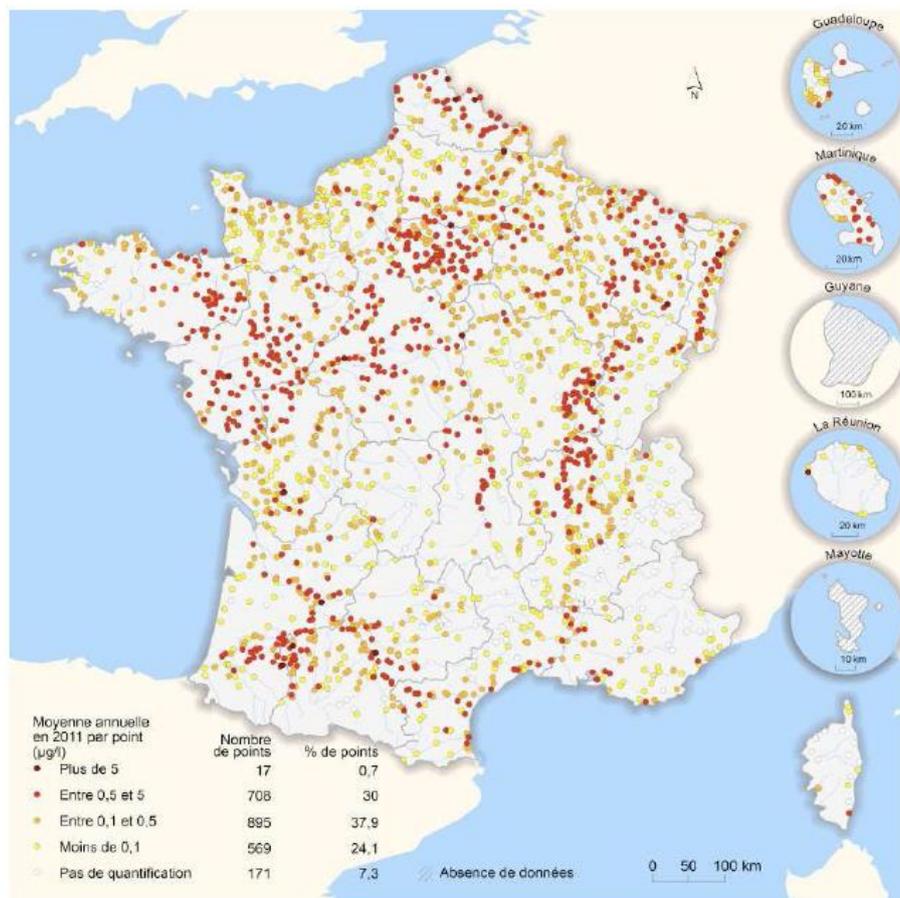


Figure 19: Concentration totale moyenne en pesticides en 2011 (d'après le rapport 2013 du service de l'observation et des statistiques, SOeS 2013)

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

La Figure 20 présente les 15 pesticides les plus quantifiés dans les cours d'eau français en 2011. Ces composés sont en majorité des herbicides ou des produits de dégradation. L'AMPA, métabolite du glyphosate, occupe la première place du classement, juste devant sa molécule mère. L'atrazine prouve sa forte persistance dans le milieu et sa lente dégradation depuis son interdiction en 2003. Il semble cependant nécessaire de mentionner une décroissance de sa concentration dans les eaux de surface qui peut être corrélée à l'augmentation des concentrations de son métabolite, la déséthyl atrazine. Le diuron, malgré son interdiction d'usage entrée en vigueur en 2008, est toujours quantifié dans les cours d'eau.

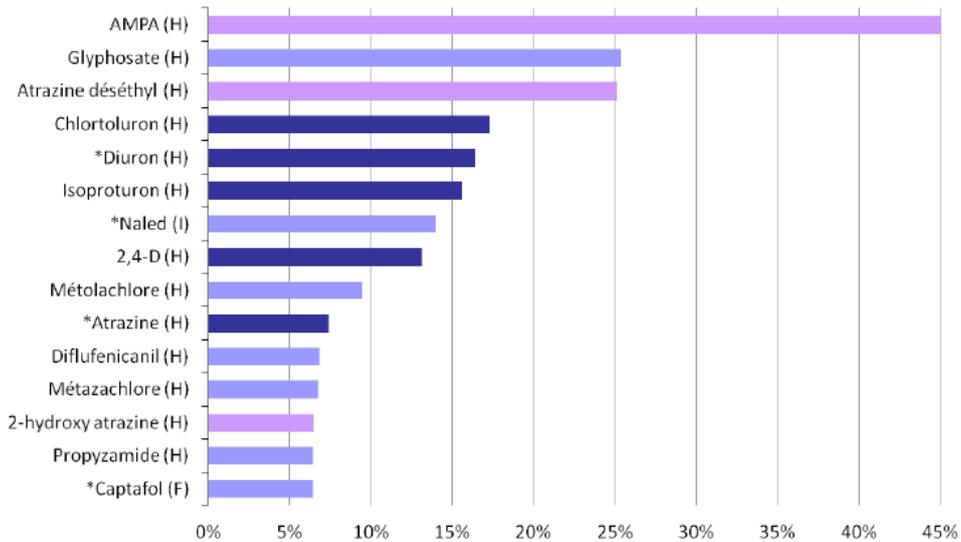


Figure 20: Les pesticides les plus quantifiés en France métropolitaine en 2011 (d'après le rapport 2013 du service de l'observation et des statistiques, SOeS 2013) (* molécules interdites, en violet : métabolites, en bleu foncé : molécules dotées de Normes de Qualité Environnementales (NEQ) ; (H) : herbicide ; (F): fongicide)

A l'échelle Européenne, Loos et al (2009) ont réalisé une étude de grande ampleur portant sur plus de 100 rivières dans 27 pays différents. Les auteurs ont mis en évidence une contamination généralisée des principaux cours d'eau d'Europe par les pesticides, du Portugal à la Turquie. Le diuron apparaît comme l'un des pesticides les plus fréquemment détectés. Les auteurs rapportent une concentration maximale de 864 ng/L et une concentration moyenne équivalente à 41 ng/L. Notons que cette valeur moyenne reste cependant inférieure à la norme de qualité environnementale fixée par la DCE (0,2 µg/L). Le diuron a également été quantifié dans des sédiments marins : Balakrishnan (2012) et al. rapportent des concentrations comprises entre 0,01 et 0,09 g/g (poids humide).

Bien qu'intégrer à la campagne exceptionnelle de la surveillance des eaux superficielles en 2012, réalisée dans le cadre du programme d'activité AQUAREF, le spinosad reste un pesticide peu étudié. A notre connaissance, il n'existe pas de donnée relative à sa présence dans les eaux de surface.

4.4. Devenir des pesticides d'intérêt dans les organismes aquatiques

Dans une étude récente, Franco-Barríos et al (2014) relatent des concentrations de diuron dans les tissus musculaires de mulets cabot (*Mugil cephalus*) collectés sur les côtes des Iles Canaries équivalente à 1,41 ng/g. Les auteurs soulignent cependant la non-détection de ce pesticide dans les extraits de foie de l'espèce investiguée, témoignant d'une différence de répartition tissulaire. Les résultats publiés par Miranda et al (Roche Randi 2008 939-949) relatifs à la bioaccumulation de pesticides chlorés et de PCB chez le poisson d'eau douce *Hoplias malabaricus* indiquent que parmi les 19 substances recherchées le diuron et son métabolite principal (3,4 Dichloroaniline) présentent les concentrations les plus importantes, à la fois dans les tissus musculaires et dans le foie. Notons également que la 3,4-Dichloroaniline était la molécule la plus concentrée dans les extraits de foie, atteignant jusqu'à 1500 ng/g (poids sec) et dont la fréquence de détection avoisinait les 60% et 30% dans le foie et les muscles, respectivement.

Contrairement au diuron et ses métabolites, le devenir du spinosad dans les organismes aquatiques est encore mal connu. Aucune donnée n'a été recensée dans la littérature.

4.5. Toxicité et effets des pesticides d'intérêt

Pour les organismes aquatiques, le diuron apparaît comme modérément toxique pour les poissons et légèrement toxique pour les invertébrés. Les valeurs de CL50 (48h) sont comprises entre 4,3 et 42 mg/L pour les poissons et entre 1 et 2,5 mg/L pour les invertébrés (Giacomazzi et cochet, 2004). La CL50 (96h) est équivalente à 3,5 mg/L pour la truite arc-en-ciel. La toxicité du diuron a été étudiée chez de nombreux organismes tels que les vers, les escargots, les grenouilles ou encore les poissons rouges. Pour les vers (*Lumbriculus variegatus*) et les escargots (*Physa gyrina*), aucune CL50 n'a pu être déterminée mais des effets sur le poids et la croissance ont été observés à des concentrations d'exposition comprise entre 29,1 et 15,3 mg/L (Nebeker and Schuytéma, 1998). Chez les grenouilles, le diuron engendre des effets sur la survie, la croissance mais également des malformations. Cependant, notons que les concentrations utilisées pour cette étude étaient bien supérieures aux concentrations environnementales (Schuytéma nebeker 1998). Pour le poisson rouge, l'exposition à faible concentration (5 µg/L) pendant 24 h induit une variété de modifications de comportement importantes (Saglio et trijasse, 1998). Comme cela a été précédemment mentionné, en milieu naturel, le diuron est soumis à des phénomènes de dégradation biotique et abiotique qui conduisent majoritairement à la formation de 3,4-dichloroaniline (Gatidou 2003). Ce métabolite est considéré comme hautement toxique. Ses effets toxiques et génotoxiques ont notamment été prouvés chez la larve d'insecte *Chironomus riparius* (osano et al, 2002).

Le spinosad est un insecticide d'origine naturel utilisé comme larvicide, il apparaît donc comme hautement toxique pour la larve de moustique *Chironomus riparius* (Williams 2003, Biondi 2012). Son mode d'action principale affecte les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine dans le système nerveux. Les organismes exposés au spinosad montrent généralement des contractions musculaires découlant de l'activation continue des neurones moteurs. Ces contractions prolongées conduisent à la paralysie totale puis à la mort des organismes exposés. En terme de toxicité aiguë, le spinosad est

légèrement toxique pour la daphnie, la crevette tigrée et la truite arc en ciel, modérément toxique pour le crapet arlequin et le méné à tête de boule mais très toxique pour l'huitre (agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 2001). A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées au potentiel toxique de ce composé sur les organismes aquatiques non cibles. Stark and Bank (2003) ont cependant montré qu'une exposition au spinosad engendrait des effets létaux et sublétaux (réduction du nombre de descendants par femelle survivante) chez la daphnie. Une exposition, même à faible concentration, provoque une diminution de la reproduction chez cette espèce.

4.6. Aspects législatifs et réglementaires

Depuis le début des années 80, l'Union Européenne a progressivement encadré l'utilisation des pesticides par diverses réglementations visant à réduire les impacts sur l'environnement et les risques liés à la santé humaine. La directive 91/414/CE adoptée en 1991, par le conseil européen, vise à évaluer les risques pour la santé et l'environnement des pesticides utilisés en agriculture afin d'optimiser la protection de l'homme et des milieux. Parmi les mesures adoptées figure l'évolution européenne des substances actives, ainsi qu'une revue d'ensemble des substances actives existant sur le marché en 1993. Ce programme organisé en phases successives a notamment entraîné le retrait d'un certain nombre de substances actives. Parmi les exemples les plus marquants, on peut citer le retrait en 1998 du lindane utilisé en traitement de sol contre les ravageurs souterrains, et plus récemment celui du diuron (2008) en raison de la présence de résidus dans les eaux souterraines et superficielles.

A l'échelle nationale et européenne, l'usage des produits phytosanitaires est également réglementé par les AMM. La législation européenne (1107/2009/CE) entrée en vigueur le 14 juin 2011, met en place une procédure stricte permettant l'évaluation des risques des produits phytosanitaires. Ce règlement a pour but de garantir une protection élevée vis-à-vis de la santé humaine et animale, mais aussi de l'environnement, tout en préservant la compétitivité agricole de l'Union Européenne. Les dossiers d'AMM doivent contenir une évaluation des risques toxicologiques et écotoxicologiques et apporter la preuve de l'efficacité du produit soumis à homologation, en conditions réelles d'utilisation. Ils doivent également mentionner les risques liés aux métabolites (ou produits de dégradation) du produit, sa composition exacte, son incidence sur la santé humaine (effets indésirables) ainsi que son devenir dans l'environnement (persistance, bioaccumulation, capacité de dispersion dans les différents compartiments environnementaux). Après expertise scientifique du dossier, l'agence française de sécurité alimentaire (EFSA) rend un avis favorable lorsque « la substance ne présente pas d'effet nocif inacceptable pour la santé humaine et l'environnement ». La commission européenne procède ensuite à l'examen du dossier et autorise ou non la mise sur le marché du produit. Notons que les AMM sont délivrées pour une durée de 10 ans, au-delà de cette période une réévaluation du produit doit être effectuée. En France, les AMM sont délivrées par le ministère de l'agriculture après examen du dossier réalisé par l'ANSES. Un produit phytosanitaire ne peut recevoir une AMM en France si celui-ci n'a pas reçu au préalable une AMM au niveau européen.

Au regard de la protection des milieux aquatiques, l'établissement de la DCE a permis de renforcer la politique globale de l'eau en terme de protection des ressources et des écosystèmes. Parmi les substances dites prioritaires, pour lesquelles des mesures doivent être effectuées afin de réduire leurs rejets et leurs émissions dans l'environnement, on dénombre 16 pesticides parmi lesquels figure le diuron. La norme de qualité environnementale moyenne annuelle de cet herbicide a été fixée à 0,2 µg/L pour les eaux de surface. La concentration maximale à ne pas dépasser, garantissant le bon état chimique d'un cours d'eau est quant à elle équivalente à 1,8 µg/L.

Partie B: Evaluation de la qualité des milieux aquatiques: du prélèvement ponctuel au biomonitoring

L'évaluation de la qualité des milieux aquatiques nécessite un réseau de surveillance efficace. Afin de répondre aux objectifs ambitieux énoncés par la DCE, la mise en œuvre de techniques analytiques performantes, capables de détecter et de quantifier des micropolluants à des concentrations à l'état de traces voire d'ultra-traces, s'affiche aujourd'hui comme une nécessité. Cependant, l'efficacité, la faisabilité et la pertinence des méthodes d'échantillonnage ne peuvent être négligées. En effet, l'échantillonnage est souvent la principale source de dispersion des résultats analytiques (Ort et al, 2010), conduisant à des écarts de mesure importants. L'étape d'échantillonnage s'avère donc essentielle pour garantir la fiabilité des résultats obtenus. Cette synthèse bibliographique permettra de référencer les différentes méthodes d'échantillonnage utilisées pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques, tout en considérant les avantages et les inconvénients de chacune d'entre elles.

1. Les échantillonnages actifs

L'échantillonnage actif ponctuel est sans aucun doute la méthode la plus largement utilisée pour le suivi de la qualité des milieux aquatiques, principalement en raison de sa rapidité et de sa simplicité de mise en œuvre. Les prélèvements ponctuels se font généralement sur quelques litres d'eau à un moment bien précis. Ce type d'échantillonnage est donc souvent considéré comme une simple « photographie » à un instant donné de la qualité de l'eau. Cette « photographie » ne peut être représentative de l'état de contamination d'un milieu hétérogène soumis à des variabilités spatiales et temporelles. Afin de ne pas manquer des pics de contamination éventuels et de caractériser plus efficacement le flux de polluants émis sur une période, il est possible d'utiliser des préleveurs automatiques dont l'échantillonnage peut être asservi au temps (prélèvement d'un échantillon de volume V toutes les heures par exemple), au volume passé (l'intervalle entre chaque prélèvement est ajusté en fonction du débit afin de maintenir un volume échantillonné fixe), ou au débit (le volume échantillonné est ajusté en fonction du débit, mais l'intervalle de temps entre chaque prélèvement est fixe). Ces techniques de prélèvement, couramment utilisées dans les STEP (margot et al) ont l'avantage d'offrir une mesure moyenne de la concentration de polluants dans le milieu sur une période donnée, intégrant les pics potentiels de contamination. Cependant, ce type d'échantillonnage actif à pas de temps resserré engendre un nombre d'échantillons important, ce qui

augmente les coûts d'analyse associés. Par conséquent, il semble difficilement envisageable de mettre en œuvre de telles méthodologies dans le cadre de programmes de surveillance à long terme.

2. Les échantillonnages passifs

Depuis de nombreuses années, des travaux de recherche ont été menés afin de développer des méthodes d'échantillonnage alternatives permettant de pallier aux limitations des prélèvements ponctuels. L'échantillonnage passif s'affiche aujourd'hui comme un outil prometteur. Les premières études par échantillonnage passif dans le milieu aquatique datent des années 70. Les premiers échantillonneurs utilisés peuvent être assimilés à des poches de dialyse remplies d'eau ultra pure permettant d'échantillonner les éléments traces présents dans le milieu (Benes et Steinnes 1974, Hesslein, 1976). Ils étaient conçus pour atteindre rapidement l'état d'équilibre, de sorte que la concentration mesurée dans l'eau pure en fin d'exposition soit identique à la concentration dans le milieu. Ces premiers échantillonneurs n'étaient donc pas pensés pour accumuler les polluants mais servaient essentiellement à mesurer la fraction dissoute des éléments traces sans altérer la matrice d'origine. Il faut attendre une dizaine d'années pour voir apparaître les premiers échantillonneurs capables d'accumuler les micropolluants (Södergren, 1987) grâce au remplacement de l'eau ultra pure des poches de dialyse par un solvant organique. Depuis, de nombreux échantillonneurs passifs, adaptés à l'analyse de diverses familles de polluants organiques et inorganiques ont été développés : Semi permeable membrane devices (SPMD) (Huckins, 1990), Diffuse gradient in thin film (DGT) (Davison et Zhang, 1994), Chemcatcher (Kingston et al, 2000), Low density Polyethylene (LDPE) (Müller, 2001), Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) (Alvarez et al, 2004), Membrane Enclosed Silicon Rubber (MESCO) (Paschke, 2006) ou encore Silicon Rubber (SR) (Rusina, 2010).

D'une manière générale, un échantillonneur passif est constitué d'une phase réceptrice (liquide ou solide) présentant une affinité plus ou moins grande pour les molécules d'intérêt emprisonnée dans une membrane. Les polluants présents dans la phase dissoute du milieu diffusent à travers la couche d'eau statique (couche limite ou interface eau/membrane) entourant l'échantillonneur. La membrane sert généralement de protection de la phase réceptrice, mais peut être responsable de la sélectivité de l'échantillonneur passif, soit par la taille des pores, soit par ses interactions avec les composés. Une fois la membrane traversée, les composés sont solubilisés (phase liquide) ou adsorbés (phase solide) sur la phase réceptrice. L'ensemble du processus repose sur l'existence d'un gradient de concentration entre le milieu échantillonné et les différents compartiments de l'échantillonneur, ce qui rend possible le transfert des molécules par simple diffusion, sans apport d'une source d'énergie supplémentaire. L'échantillonneur est ainsi simplement disposé dans le milieu aqueux où il va accumuler les polluants et les retenir sur l'ensemble de la durée d'exposition. Sa capacité à concentrer les composés sur une période de temps relativement longue permet de s'affranchir des prélèvements ponctuels, tout en permettant la détection de polluants présents dans le milieu à des concentrations parfois inférieures aux limites de détection analytiques associées aux prélèvements ponctuels. Un rappel théorique concernant les modes de fonctionnement et d'utilisation des échantillonneurs passifs est détaillé en Annexe 5.

Les échantillonneurs passifs, combinant échantillonnage, sélectivité pour un ou plusieurs composés et pré-concentration simplifient les opérations à effectuer sur le site d'échantillonnage. Il existe aujourd'hui plusieurs phases réceptrices permettant l'échantillonnage d'une large gamme de composés. L'échantillonnage passif offre une meilleure représentativité temporelle, une mise en œuvre simple et des coûts d'analyse équivalents par rapport aux prélèvements ponctuels. L'information fournie peut être assimilée à celle d'un échantillonnage continu et constant (Ort, 2010). Cette technique présente aussi l'avantage d'offrir une mesure moyenne de la concentration en polluants dans le milieu, intégrant les pics potentiels de contamination. La dynamique de pollution n'est cependant pas prise en compte. L'échantillonnage passif n'est donc pas compatible avec la notion de concentration maximale annuelle (NQE-CMA) énoncée par la DCE, mais cadre parfaitement avec celle de concentration moyenne annuelle (NQE-MA). Bien que les techniques de correction des variabilités environnementales soient en plein essor, la calibration de tels échantillonneurs reste encore aujourd'hui leur principal inconvénient.

Afin de satisfaire aux nouvelles exigences de surveillance des systèmes aquatiques, il est apparu nécessaire de développer des outils qui soient représentatifs de l'exposition réelle dans le milieu. De ce constat est né le concept du biomonitoring. En effet, quoi de plus intégratif que les organismes vivants peuplant nos écosystèmes aquatiques ?

3. Le biomonitoring

3.1. Définition

Le biomonitoring, signifiant surveillance biologique, est généralement défini comme « l'utilisation systématique des organismes vivants ou de leurs réponses pour déterminer l'état ou les changements de l'environnement » (rosenberg, D.M 1998, Oertel N. 2003). Il existe plusieurs techniques de biomonitoring actuellement employées pour la surveillance des écosystèmes aquatiques. La sélection d'une technique appropriée dépend des objectifs du programme mais également des ressources disponibles. Ainsi plusieurs critères de biosurveillance peuvent être recensés comprenant par exemple le suivi d'indices biotiques ou de traits biologiques chez une ou plusieurs espèces préalablement sélectionnées et qualifiées d'espèces sentinelles. La bioaccumulation et la toxicité des contaminants au regard de l'espèce indicatrice restent également une composante importante des programmes de biomonitoring.

3.2. Les techniques de biomonitoring

Il existe actuellement deux stratégies de biomonitoring : une approche dite passive et une approche dite active. Les approches passives s'appuient sur des organismes autochtones (Goldberg 1975) alors que les approches actives s'appuient sur des organismes transplantés à partir d'un site de référence (Andral 2004), on parle alors de procédés de « caging ».

Les approches passives ont été les premières à émerger, en grande partie grâce à la mise en œuvre de projet de surveillance de la contamination des milieux marins (claisse, 1992, amiard 1999,

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

goldberg 1975). Le célèbre programme de surveillance « Mussel Watch » (1976) représente l'application la plus ancienne de biomonitoring passif et fonctionne encore aujourd'hui dans les eaux côtières américaines et dans la région des Grand Lacs. Le programme couvre 300 sites côtiers et permet la surveillance de plus de 100 contaminants organiques et inorganiques (HAP, PCB, DDT, OTC, pesticides organochlorés...) grâce à l'analyse de sédiments et de tissus biotiques. Il est basé sur la collecte annuelle de populations naturelles de bivalves (moules ou huitres) constituées d'une grande variété d'espèces (*Mytilus*, *Crassostrea virginica* et *Dreissena*), permettant ainsi d'assurer une couverture à l'échelle nationale. Ces approches passives bénéficient aujourd'hui d'une vaste expérience, s'appuyant sur plus de 20 ans de recherche et sur de nombreux projets nationaux et régionaux (claisse, 1992, amiard 1999, goldberg 1975, borja 2008).

A l'inverse des milieux marins, les milieux aquatiques d'eau douce (rivières, fleuves, lacs...) présentent une situation beaucoup plus complexe. Cette complexité est notamment liée à:

- la grande variété des hydrosystèmes rencontrés (forte variabilité dans les caractéristiques, tant au niveau de taille que des paramètres physico-chimiques)
- au grand nombre d'espèces aquatiques (difficulté à choisir un nombre limité d'espèces indicatrices, géographiquement représentatives et réparties sur l'ensemble du territoire)
- au grand nombre de stations d'échantillonnage à surveiller

La mise en place de programmes de biomonitoring fiables à grande échelle, est donc plus complexe à établir au sein des écosystèmes aquatiques d'eau douce. Cependant, malgré cette complexité accrue, de nombreux programmes de biomonitoring passif ont vu le jour en Europe (Belpaire, 2008 a et b, Corvi 2005, SIPEL). En France, le "plan national PCB" est un programme axé sur la santé publique déployé entre 2008 et 2010. Il a été conçu pour renforcer le suivi de la contamination des milieux aquatiques et des produits de la pêche, afin d'adopter des mesures de gestion des risques appropriées. Les dioxines, les furanes, les PCB de type dioxine ainsi que le mercure ont été étudiés. Le cadre du projet comprenait des plans d'échantillonnage sur plusieurs espèces de poissons à travers plus de 300 sites.

Même si les approches passives se sont révélées utiles pour la surveillance de la contamination des milieux aquatiques au regard de nombreux métaux et polluants organiques, elles souffrent de deux inconvénients majeurs: elles dépendent de la présence effective de l'organisme choisi sur les sites échantillonnés et de plusieurs facteurs incluant la variabilité, l'âge et la taille des organismes échantillonnés. Ces facteurs confondants peuvent entraver l'interprétation précise des résultats (Table 27).

Les méthodes actives, fondées sur la transplantation d'organismes, ont été développées plus récemment dans le but de pallier à ces limitations. En effet, elles peuvent être appliquées même si les sites d'étude sont dépourvus d'organismes autochtones. Elles permettent de réduire la variabilité biologique en utilisant des organismes recueillis auprès de la même population et de contrôler la durée d'exposition.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

Au contraire des milieux marins, les approches de biomonitoring actif au sein des écosystèmes aquatiques d'eau douce n'incluent que très peu d'études à grande échelle. Bien qu'il existe de nombreux projets scientifiques basés sur l'encagement d'organismes, la plupart ont mis l'accent sur l'étude de l'impact de la contamination ponctuelle sur diverses réponses biologiques ou marqueurs biochimiques. La grande majorité de la littérature scientifique provient d'études réalisées en Europe. Les organismes alors utilisés couvrent les 3 principaux niveaux trophiques avec une large diversité d'espèces pour chaque niveau.

Les méthodes et les procédures utilisées pour ces approches varient encore largement entre les études, en termes de temps d'exposition, d'espèces échantillonnées et du nombre d'organismes utilisés. Bien que cette disparité reflète un intérêt récent pour les méthodes de biosurveillance actives, elle reflète également le manque de données nécessaires à la normalisation de telles approches. Comme indiqué précédemment, les approches de biomonitoring actif sont en mesure d'intégrer certains facteurs biotiques qui peuvent influencer l'accumulation de contaminants dans les organismes et, par conséquent, impacter l'interprétation des résultats. Cependant, l'impact des facteurs environnementaux (par exemple la température ou la quantité de nourriture disponible) ne peut être contrôlé, alors que ceux-ci vont influencer les conditions physiologiques des organismes au cours de l'exposition et donc les niveaux de polluants accumulés. Par conséquent, il est essentiel de proposer des méthodes permettant d'évaluer et de minimiser l'impact de ces facteurs confondants. Ainsi, des études réalisées en laboratoire où le contrôle de facteurs abiotiques est une évidence, permettraient d'apporter des réponses aux questions restées jusque-là en suspens. A notre connaissance, aucune étude de biomonitoring réalisée simultanément sur le terrain et en laboratoire n'a encore été mise en œuvre.

	Biomonitoring passif	Biomonitoring actif
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> Echantillonnage simple Mesure sur du long terme Largement utilisé Existence de directives (en particulier pour le milieu marin) 	<ul style="list-style-type: none"> Nombre limité d'espèces Choix du site d'exposition Contrôle de la durée d'exposition Contrôle de paramètres biotiques (poids, âge, sexe...) Choix du nombre et de l'origine des organismes Répétable Coût et durée de l'expérimentation prévisible
Limitations	<ul style="list-style-type: none"> Dépend de la distribution géographique des espèces Mobilité des espèces Variabilité du nombre et de l'espèce des organismes d'un site à l'autre 	<ul style="list-style-type: none"> Ne convient pas pour toutes les espèces Systèmes de caging pouvant avoir une influence sur l'exposition des organismes et/ou sur leurs réponses biologiques Accès à la nourriture parfois affecté

	Temps d'exposition inconnu Variabilité saisonnière Variabilité des facteurs biotiques (sexe, âge, poids) qui peuvent fausser l'interprétation	Aucune méthodologie standardisée pour les milieux d'eau douce Pas d'utilisation à grande échelle pour les milieux d'eau douce
--	---	--

Table 27: Avantages et limitation des approches passive et actives de biomonitoring (d'après Besse et al 2012)

3.3. Les espèces sentinelles : définition et critères de sélection

La surveillance biologique de l'environnement repose sur l'utilisation d'outils appropriés qualifiés d'indicateurs biologiques ou d'espèces sentinelles. De nombreuses définitions des indicateurs biologiques sont disponibles dans la littérature; on retiendra ici que ce sont " des espèces ou associations d'espèces capables par leur comportement général (disparition, augmentation ou variation densitaire) de rendre compte de l'évolution générale d'un milieu" (ministère de l'Environnement, comité scientifique Faune et Flore, 1978). Un système d'animaux sentinelles est défini comme un dispositif destiné à collecter, systématiquement et régulièrement, des données sur des organismes exposés à la pollution environnementale; ces données sont ensuite analysées pour identifier les dangers potentiels pour la santé de l'homme et de l'environnement » (selon le *National Research Council*, 1991). Les notions d'espèce sentinelle et d'espèce bio-indicatrice sont très proches. Il existe cependant une différence d'échelle. Avec une espèce bio-indicatrice, le seul critère retenu pour l'évaluation de la qualité du milieu est la plus ou moins grande abondance d'individus, alors que l'espèce sentinelle fait appel à la variation de paramètres au niveau organique, tissulaire, cellulaire ou moléculaire de l'individu. Il existe également une différence d'objectifs : l'espèce sentinelle est spécifiquement mise en place pour informer sur la pollution environnementale, alors que l'espèce bio-indicatrice est destinée à donner une idée de la qualité écologique du milieu et à fournir des éléments typologiques pour classer des écosystèmes. Deux types d'informations sont recherchés à partir des dispositifs d'espèces sentinelles : la présence de polluants dans les tissus, qui renseigne sur la qualité du milieu et la biodisponibilité des polluants pour les organismes, et la présence de signe de toxicité (disparition, augmentation ou variation densitaire, maladie, dysfonctionnement organiques...) qui renseigne sur le danger d'être exposé à ce milieu.

La dose interne (concentration du polluant dans les tissus de l'animal), par comparaison avec les concentrations environnementales, permet d'estimer la biodisponibilité et les capacités de bioconcentration des polluants. Les travaux relatés dans la littérature portent principalement sur l'analyse de métaux (Zn, Hg, Cd, Cu, Pb, Cr, Ni...), d'HAP et de composés organochlorés.

Un programme d'espèces sentinelles incorpore également le suivi de paramètres physiologiques par mesure de la mortalité, de la taille des individus, du poids, du pourcentage de matières sèches et de graisses. Des études de séquences comportementales sont aussi envisageables, des enregistrements de l'activité locomotrice ou le relevé de la période d'activité des animaux peuvent servir à révéler des pathologies latentes. Des critères écologiques, comme les fluctuations démographiques peuvent

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

aussi faire partie intégrante d'un système d'espèces sentinelles. Enfin, les diverses altérations moléculaires et cellulaires, générées par les polluants et qui sont à l'origine des effets toxiques ultimes constituent un élément central dans l'évaluation de la toxicité et présente un intérêt tout particulier comme indicateur de risque.

Toute sélection d'espèces sentinelles doit pouvoir se justifier par un lien reconnu avec la structure ou le fonctionnement d'un écosystème afin de déterminer, grâce à l'analyse chimique, l'état de santé et l'évolution de l'écosystème en question.

Historiquement, les espèces sentinelles ont été choisies plus pour des raisons pratiques (faisabilité d'élevage en laboratoire et d'échantillonnage) que pour leurs pertinences écologiques. Aujourd'hui, une espèce sentinelle doit répondre aux attentes d'une liste non exhaustive mise en évidence par Rivière (1993) et Lagadic et al en 1997 :

- Critères techniques :
 - L'espèce doit être facilement identifiable et transportable. Ainsi, des échantillons des populations locales pourront être capturés rapidement et en quantité suffisante.
 - L'espèce doit être de taille suffisante pour permettre la pratique de mesures de concentration en polluants, ou d'examen biologiques et biochimiques
- Critères méthodologiques :
 - L'espèce doit être sensible aux polluants considérés
 - Des tests doivent être réalisables à tous les stades du cycle de vie de l'organisme
 - Il est nécessaire de disposer d'organismes témoins, c'est un élément fondamental du dispositif car ces organismes doivent être non pollués, ou du moins présenter des niveaux de pollution suffisamment bas pour être considérés comme négligeables. Ils peuvent être prélevés dans des zones non polluées, ou maintenus au laboratoire dans des conditions semi-naturelles.
 - L'existence d'autres études sur la même espèce est un plus.
- Critères écologiques :
 - Il est recommandé que l'espèce ait un rôle significatif dans le fonctionnement des écosystèmes, dans les cycles biogéochimiques (dégradation de la matière organique, oxygénation) ou qu'elle soit une espèce clé du réseau trophique (proie, activité de prédation)
 - La densité de population de l'espèce doit être suffisante pour permettre des prélèvements qui ne modifient pas la structure ou l'importance numérique des populations. Il est donc préférable que l'espèce soit ubiquiste, largement distribuée dans les zones d'intérêt et résidant exclusivement ou très majoritairement dans cette zone.
 - Le fait qu'elle soit représentative de différents phylums et qu'elle présente un intérêt économique sont des atouts supplémentaires.

Si cette approche multicritères est indispensable, elle peut être confortée par la notion d'espèce « clef » qui se révélera être un critère majeur pour valider le choix des espèces.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

Une espèce « clef » peut être définie comme une espèce dont la disparition affecterait de manière très importante le fonctionnement de l'écosystème en bouleversant les équilibres biologiques. Une espèce « clef » peut aussi être une espèce à la base de la pyramide trophique. Ainsi, même si cette espèce peut être considérée comme une espèce sentinelle, c'est à dire sensible à certains polluants, son importance est à prendre en considération, car la diminution de son abondance peut perturber tout un écosystème. Il est donc impératif de prendre les mesures nécessaires pour que l'écosystème et la biodiversité n'en soient pas affectés.

A la difficulté de choisir une espèce sentinelle pertinente, s'ajoutent les difficultés de la prise en compte de diversité des espèces. Afin de limiter les erreurs d'interprétation en se basant exclusivement sur une espèce, il convient de se poser la question s'il est possible d'utiliser plusieurs espèces dont les stratégies d'alimentation et l'habitat sont différents. Dans le but de répondre à cette interrogation, il est possible de mettre en place une approche multi spécifique (Galloway et al. 2004) où les espèces sont sélectionnées sur la diversité et la complémentarité de leurs biotopes ainsi que sur leur stratégie alimentaire (filtreurs, détritivores, brouteurs, prédateurs). Dans le cadre de ces travaux, le choix de plusieurs espèces est motivé par la volonté de représenter une certaine diversité phylogénétique. Il serait ainsi possible d'évaluer si différentes espèces peuvent présenter des réponses comparables et/ou complémentaires.

3.4. Les espèces sentinelles d'intérêt

3.4.1. *Gammarus fossarum*

a) Classification

L'espèce *Gammarus fossarum* est également connu sous les noms de *Gammarus delebecquei* ou *Gammarus pulex fossarum* (Pacaud, 1945 ; Pacaud 1952). Sa systématique est détaillée dans la table ci-dessous :

Embranchement	Arthropode
Super-classe	Crustacé
Classe	Malacostracé
Sous-classe	Eumalacostracé
Super-ordre	Péracaride
Ordre	Amphipode
Sous-ordre	Gammaridae
Genre	Gammarus
Espèce	Fossarum (Koch,1836)

Table 28: Systématique de *G. fossarum* (Martin et Davis, 2001)

b) Répartition géographique

Parmi les crustacés amphipodes, les Gammaridae sont les espèces les plus représentées et les plus largement répandues. On compte plus de 4500 espèces différentes. Ils sont présents dans le milieu marin, dulçaquicole et terrestre. Le genre *Gammarus* est très largement présent dans l'hémisphère nord avec plus d'une centaine d'espèces dont la plupart sont dulçaquicoles (Barnard et Barnard, 1983 ; Karaman et Pinkster, 1987, Zivic et Markovic, 2007). L'espèce *Gammarus fossarum* (Koch, 1836) est elle-même largement représentée sur une partie du continent européen. Leur aire de répartition s'étend au Sud, des Pyrénées à la Grèce et au Nord jusqu'à la Pologne incluant l'Europe Centrale, dont une large part du territoire français (Figure 21).



Figure 21: Répartition géographique de *Gammarus fossarum* en Europe (Barnard et Barnard, 1983)

c) Ecologie et biologie

Les gammares vivent en populations de forte densité pouvant atteindre plusieurs milliers d'organisme au mètre carré (Felten, 2003). Ils peuvent s'adapter à des conditions environnementales variées (ruisseaux de plaine ou de montagne) mais ils occupent principalement les ruisseaux et les sources de moyenne montagne, peu profonds, oligotrophes et caractérisés par un fort courant et de fortes teneurs en oxygène (Roux, 1982 ; Barnard et Barnard, 1983, Tachet et al 2000). Un environnement tel que celui-ci est nécessaire à leur développement et à leur survie. En effet, les facteurs abiotiques tels que la température, l'oxygène, le pH et la pollution jouent un rôle important dans la distribution de cette espèce. La température de l'eau doit être comprise entre 0°C et 25°C, la température létale étant située entre 28°C et 32°C (Wijnhoven et Al, 2003). Une concentration relativement élevée en oxygène dissous est nécessaire à la survie de cette espèce (Maltby 1995), ainsi qu'une teneur correcte en calcium, élément indispensable à la croissance de ces crustacés (Peeters et Gardeniers, 1998). Les gammares affectionnent les substrats grossiers tels que les galets ou les graviers et les substrats organiques comme les végétaux rivulaires et la végétation morte. Ils sont souvent associés aux amas de matière organique, aux mousses ou aux racines. Leur habitat leur fournit ainsi un apport de matière organique d'origine animal et végétal dont ils se nourrissent mais

également un abri contre les prédateurs. Ils affichent un large répertoire trophique. Etant herbivores, détritivores et carnivores, leur régime alimentaire est composé de feuille mortes, de biofilms, de chironomidés, de petits isopodes voire même de poissons morts (MacNeil et al 1997). De surcroit, le cannibalisme n'est pas rare chez les amphipodes. Principalement déchetueur et se nourrissant préférentiellement de matériel détritique, le gammare est aussi une proie privilégiée pour de nombreuses espèces (macro invertébrés, amphibiens, oiseaux...) et plus particulièrement pour les poissons (MacNeil et al 2002). En effet, des gammares ont été retrouvés dans les contenus stomacaux de la plupart des espèces de poissons d'eau douce cohabitant avec cette espèce : anguille, vairon, saumon, gardon, goujon. Le gammare se présente donc comme un organisme essentiel au bon fonctionnement écologique des rivières puisqu'il joue un rôle clé dans la décomposition et l'incorporation du matériel organique terrestre au réseau trophique aquatique et dans la redistribution de la matière et de l'énergie (Maltby et Crane, 1994 ; Forrow et Maltby, 2000).

d) Anatomie et morphologie

Les Gammaridae sont des amphipodes aquatiques qui se distinguent par un corps à symétrie bilatérale et aplati latéralement. Le corps du gammare peut atteindre environ 20 mm à l'état adulte et est caractérisé par une convexité dorsale régulière. Il est divisé en 4 régions distinctes : le prosoma (céphalon), le mesosoma (thorax), le metasoma et l'urosoma (abdomen) (Figure 22)

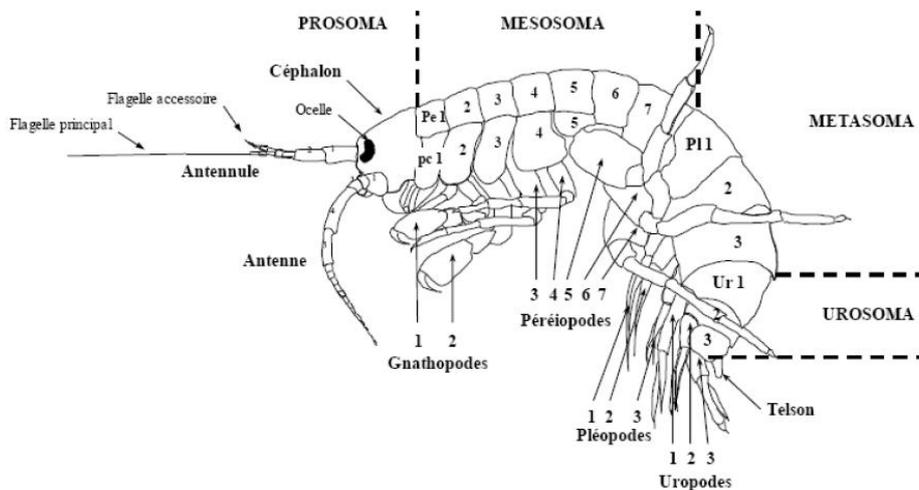


Figure 22: Vue latérale d'un Gammaridae (d'après Roux, 1970 ; Chevreux et Fage, 1970)

e) Croissance

Le gammare est un organisme à croissance discontinue par mues successives. Sa durée de vie est relativement courte et semble être limitée à deux ans (Tachet et Al, 2000). Les nouveaux nés deviennent matures après un nombre déterminé de mues (10 mues pour *G. pulex*). La rapidité de succession de celles-ci est dépendante de la température et du sexe, les mâles ayant des phases inter-mues plus longues que les femelles (Welton et Clarke 1980).

f) Reproduction

La reproduction des *Gammarus fossarum* a lieu plusieurs fois dans l'année. Il s'agit d'une espèce itéropare, à reproduction sexuée. Le cycle de reproduction des gammarus est continu, mais relativement complexe. La reproduction atteint un maximum en avril-mai lors de la fin de la phase de diapause mais un fort ralentissement est observable en période hivernale. Une première génération de nouveaux nés voit le jour de mars à juin et une partie de la cohorte atteint sa maturité à la fin de l'été. Les adultes qui ont donné naissance à cette nouvelle génération meurent progressivement. Une seconde génération voit le jour grâce aux individus nés en début d'été et arrivés à maturité. Les individus de la première génération qui ont survécu passent l'hiver en diapause tandis que la nouvelle génération croît lentement durant l'hiver (Adam, 2008).

3.4.2. *Potamopyrgus antipodarum*

a) Classification

L'espèce *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1843) est autrement connue sous le nom de *Potamopyrgus jenkinsi*. Jusqu'au milieu des années 1990, *Potamopyrgus antipodarum* faisait partie de la sous classe des Prosobranches. Cependant, de récentes études moléculaires ont conduit à modifier la phylogénie des gastéropodes (Ponder et Lindberg, 1997). A l'heure actuelle, celle-ci est encore en pleine évolution et des modifications sont régulièrement observées. Sa systématique est détaillée dans la table ci-dessous :

Embranchement	Mollusque
Super-classe	Gastéropode
Classe	Caenogastropoda
Sous-classe	Péracaride
Super-ordre	Littorinimorpha
Ordre	Rissooidea
Sous-ordre	Hydrobiidae
Genre	Potamopyrgus
Espèce	Antipodarum (Gray,1843)

Table 29: Systématique de *P. antiporum* (Pnder et Lindberg, 1997 ; Gust, 2010)

b) Répartition Géographique

Potamopyrgus antipodarum est une espèce invasive originaire de Nouvelle Zélande (Alonso et Castro-Diez, 2008). Elle a ensuite colonisé l'Europe (Winterbourn, 1970 ; Roth, 1987) où elle aurait été introduite de manière accidentelle par les ballasts de bateaux, l'Australie (ponder, 1988) ou encore l'Amérique du Nord (Jacobsen et Forbes, 1997, Zaranko et al, 1997 ; Gangloff, 1998). Cette

espèce peut être aujourd'hui qualifiée de cosmopolite car elle est désormais présente sur une grande partie du globe.

a) Ecologie et biologie

Les mollusques *Potamopyrgus antipodarum* vivent en population de forte densité pouvant atteindre plusieurs centaines de milliers d'individus par mètre carré (Mouthon, 1982 ; Schreiber et al, 1998 ; Kerans et al 2005). Une fois introduite, les populations connaissent généralement un accroissement important et colonisent principalement les rivières de plaine, les ruisseaux rocheux, les criques, les fossés, les lacs, les estuaires ou les étangs. Cependant, cette espèce ne semble pas être en mesure de coloniser des masses d'eau temporaires (Winterbourn, 1970). Les gastéropodes *Potamopyrgus antipodarum* affectionnent particulièrement les fonds vaseux, les substrats sableux ou pierreux ou encore la végétation aquatique (Michaut, 1968). Leur régime alimentaire est relativement large. Ce sont des brouteurs racleurs de dépôts organiques fins qui affectionnent les diatomées (Dorgelo et Leonards, 2001). Ils sont principalement détritivores, mais se nourrissent également d'algues et de débris de macrophytes (Mouthon, 1982). L'hibernation de ces mollusques s'effectue dans la vase et se produit en automne où de véritables migrations vers les zones de sédimentation ont lieu. Ainsi le régime alimentaire de ces gastéropodes est alterné suivant les saisons : ils se nourrissent pendant l'été d'algues filamenteuses ou unicellulaires alors que durant la saison froide ils ingèrent uniquement des détritus.

Les mollusques *Potamopyrgus antipodarum* peuvent s'adapter à une salinité de 12 à 32‰ (Winterbourn, 1970). Cependant, l'augmentation de la salinité engendre une augmentation de la mortalité qui n'est pas observée chez les autres espèces de la même famille (Hylleberg et Siegismund, 1987). Ils sont également capables de vivre dans des eaux dont la température peut atteindre 32°C (Roth, 1987, Dorgelo, 1988). En revanche, ils supportent très mal les basses températures comparativement aux autres *hydrobidae*. De plus, certains auteurs les considèrent très tolérants aux pollutions biodégradables (Mouthon et Dubois, 2001).

Ces mollusques se déplacent généralement diagonalement dans le sens du courant (Haynes et al, 1985), à une vitesse de 3 cm/min. Ils sont donc rhéotactiques. Ils sont la proie de nombreuses espèces de poissons (truite, brème, gardon) et de certains oiseaux plongeurs (Mouthon, 1967 ; Dorgelo, 1987) qui sont les principaux responsables de leur dispersion (Mouthon, 1982). Le transport de ces mollusques peut également avoir lieu par dérive et semble être possible après passage dans le tube digestif du prédateur. Par exemple, les organismes demeurant dans le jabot de l'oiseau auraient, après régurgitation éventuelle de celui-ci de bonne chance de survie. Ils survivent également bien au passage dans le tube digestif des poissons (Haynes et al, 1985).

b) Anatomie et morphologie

Le mollusque *Potamopyrgus antipodarum* est facilement identifiable par sa coquille dextrale, fine et solide (Zaranko et al, 1997). Elle est conique, de couleur brun et/ou jaune, formé de tours convexes ou arrondis (Michaut, 1968). L'ouverture est elliptique et large, avec une marge concave et

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

columnaire. Elle mesure de 0,5 à 12 mm de longueur maximale et comporte jusqu'à 8 tours chez les individus de grande taille. Chez les adultes, la coquille possède des ornements divers qui pourraient être dus à la composition du milieu de vie (Michaut, 1968). En revanche, chez les juvéniles, la coquille est semi-transparente et ne possède aucun ornement.

c) Reproduction

Potamopyrgus antipodarum est une espèce itéropare (Calow, 1978), sa reproduction ayant lieu plusieurs fois dans l'année. Elle est dépendante des facteurs environnementaux comme la photopériode ou la température (Sternberg et al., 2010 ; Gust et al. 2011). Ce gastéropode est ovovivipare et parthénogénétique, lui conférant un atout essentiel pour son caractère invasif (Robson, 1926). En effet, dans les zones où il est invasif, les populations sont exclusivement constituées de femelles (Ponder, 1988 ; Schreiber et al, 1998 ; Gerard et Dussart, 2003). En Nouvelle Zélande, la présence de mâles permet une reproduction sexuée. Selon Schreiber et al. (1998), la persistance de mâles semble due à la coévolution entre *Potamopyrgus antipodarum* et ses parasites Trématodes.

La ponte est continue mais le cycle de reproduction de l'espèce présente un pic de juillet à novembre (Gust et al. 2011).

d) Croissance

La qualité de la nourriture est un facteur environnemental clef influençant considérablement la croissance. En effet, la qualité et la quantité de nourriture impactent directement les taux de croissance (Dorgelo et al, 1995, Dorgelo et Leonards, 2001) qui varient entre 0,010 et 0,047 mm/j à 15°C.

3.4.3. *Chironomus riparius*

a) Classification

L'espèce *Chironomus riparius* appartient à l'ordre des diptères. Il s'agit d'un chironomidé non piqueur présentant deux stades aquatiques lors de son développement (larve et nymphe) et un stade adulte aérien de courte durée. Sa systématique est présentée dans la Table 30.

Embranchement	Arthropode
Sous embranchement	Hexapode
Classe	Insecte
Sous-classe	Pterygota
Ordre	Diptère
Sous-ordre	Nématocera
Famille	Chironomidae

Genre	Chironomus
Espèce	riparius (Meigen, 1854)

Table 30: Systématique de *Chironomus riparius*

b) Ecologie et biologie

Chironomus riparius est une espèce holarctique que l'on retrouve en Amérique du Nord, en Argentine ainsi que dans de nombreux pays européens (Townes, 1945 ; Curry, 1962 ; Credland, 1973, Rasmussen, 1984). Les larves tubicoles se trouvent fréquemment dans les lacs, les étangs et les cours d'eau eutrophes. Ils vivent également dans les habitats littoraux à fonds boueux (Rasmussen, 1984). Ce sont principalement des limivores qui se nourrissent de couches superficielles de sédiment. Cette espèce est tolérante à l'eutrophisation et est considérée comme un indicateur ubiquiste de pollution organique (Townes, 1945 ; Gower et Buckland, 1978). Elle possède une grande tolérance à la granulométrie des sédiments, aux variabilités de température (de 0°C à 33°C), de pH (5 à 9) et s'adapte parfaitement à des milieux pauvres en oxygène dissous (1 mg/L ASTM 1991, ASTM, 1995).

Le cycle biologique est principalement rythmé par les variations saisonnières de température et la disponibilité d'éléments nutritifs (Ristola et al, 1999). Cette espèce peut être univoltine (une génération par an) ou multivoltine (plusieurs générations par an) en fonction de son aire de répartition géographique. La durée des différentes phases du cycle de vie est extrêmement bien maîtrisée en laboratoire, sous conditions contrôlées (AFNOR, 2010). Le cycle de vie se déroule en 4 étapes : l'œuf, la larve, la nymphe et l'imago (Figure 23). Les 3 premiers stades sont aquatiques et l'imago est aérien.

- Les œufs

Les œufs sont pondus en eaux douces et forment une masse gélatineuse pouvant contenir jusqu'à 600 œufs. Ils sont fixés aux macrophytes. L'éclosion survient 2 à 6 jours après la ponte et peut être température-dépendante (Curry 1962)

- La larve

La phase larvaire se déroule en 4 stades distincts, différenciables par la taille de la capsule céphalique (Day et al ; 1994). Cette capsule grandit rapidement lors de la mue larvaire, mais cesse de grandir en période d'inter-mues. La couleur du corps évolue du blanc laiteux au rouge vif avec l'acquisition de l'hémoglobine et permet ainsi de distinguer facilement les différents stades larvaires. Les antennes, les mandibules, 3 segments thoraciques et 9 segments abdominaux sont observables dès le premier stade larvaire. Le dimorphisme sexuel est visible à partir du quatrième stade larvaire, les mâles pesant en moyenne 30% de moins que les femelles. Les larves de premier stade sont planctoniques et se nourrissent de la masse nutritive qui entourait les œufs. Les larves de stades 2 à 4 vivent dans la couche superficielle des sédiments, à l'intérieur de fourreaux formés de sédiments fins et de couche de détritus (Rasmussen 1984). Les larves s'observent d'avril à octobre, date à laquelle elles entrent en diapause hivernale (Goddeeris et al. 2001). La diapause permet de synchroniser le cycle de vie des

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

organismes nés durant l'été. La croissance larvaire terminée, les chironomes se métamorphosent à la surface de l'eau (Benoit et al, 1997)

- La nymphe

La nymphe possède des organes respiratoires thoraciques qui apparaissent comme une touffe de filament blanc situés derrière la tête. Des organes natatoires ainsi que des étuis pour les futures ailes, pattes et yeux sont alors observables. (Townsend 1981)

- L'imago

L'émergence des nymphes en imagos est bimodale, plus précoce chez le mâle que chez la femelle où le processus d'émergence est très rapide (quelques minutes). Les imagos survivent 4 à 11 jours, pendant lesquels ils se dispersent et se reproduisent. Contrairement aux mâles, les femelles ne se reproduisent qu'une fois et meurent (Downe, 1997).

L'imago ressemble aux moustiques mais est dépourvu d'appareil piqueur. On observe un fort dimorphisme sexuel. Les mâles se distinguent des femelles par leurs antennes plumeuses et leur mince abdomen, qui portent à son extrémité postérieure une paire de pinces génitales (Townsend et al 1981). La femelle, plus foncée et également deux fois plus grosse que le mâle.

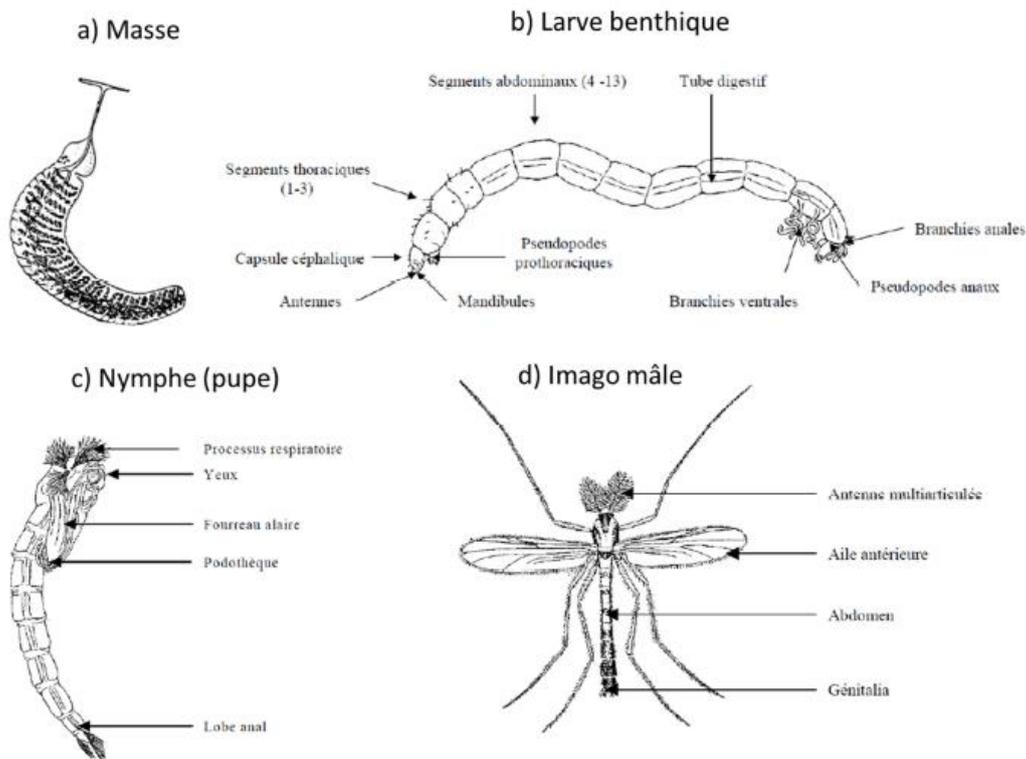


Figure 23: Description des différents stades de développement du chironome: *C. riparius* (Meigen 1804)(AFNOR, 2010; Durand, 2012; Tachet et al., 2000))

3.5. Principaux avantages et limites d'utilisation des espèces sentinelles choisies

Les gammarus, dont *Gammarus fossarum* sont considérés comme de bons indicateurs de la qualité des milieux aquatiques dulçaquicoles en raison de leur grande sensibilité à une large gamme de contaminants environnementaux (Table 31). A ce titre, ils ont déjà été utilisés pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques lors d'expérimentations *in situ* et en laboratoire (Xuereb 2007, Coulaud 2011). Le genre *Gammarus* est d'ores et déjà utilisé pour le développement de biomarqueurs qui mesurent l'impact des contaminations aux niveaux sub-individuels, de bioessais au niveau individuel (test d'alimentation, de croissance, de reproduction), d'études populationnelles (modification de densité) ou des mesures de bioaccumulation, notamment de métaux ou composés organiques (plénet, 1999 ; Fialkowski 2003, Ashauer, 2010) et plus récemment de composés pharmaceutiques (publi Jeanne).

Parmi les macro-invertébrés benthiques, *Chironomus riparius* est une espèce modèle communément utilisée en écotoxicologie. En effet, son ubiquité et son abondance ainsi que son rôle clef dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques lui confèrent son statut d'espèce sentinelle. Son contact direct avec le sédiment lors de la phase de développement larvaire fait de lui une espèce clef pour évaluer la toxicité des sédiments, son utilisation est d'ailleurs préconisée par l'OCDE. Enfin, son cycle de vie, d'une durée totale de 20 à 30 jours à 21°C permet l'étude de scénarios d'exposition chronique d'une ou plusieurs génération(s), sur une période relativement courte.

Espèce sentinelle	Avantages	Limites	Références bibliographiques Normes
<i>Chironomus riparius</i>	Résistant à la contamination Mode d'alimentation varié Ubiquiste Cycle biologique court et bien décrit Elevage courant en laboratoire Pertinence écologique : espèce fourrage Suivi aisé des traits biologiques (survie, croissance, émergence)	Peu sensible aux toxiques (sauf perturbateurs endocriniens et pesticides)	OCDE 233, 2010 AFNOR, 2010 OCDE 218, 2004 Péry et al.
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Résistant aux variations des conditions expérimentales <i>in situ</i> Elevage possible en laboratoire Suivi aisé des traits biologiques (survie, croissance, reproduction) Sensible aux rejets urbains et industriels	Disponibilité saisonnière limitée (sauf élevage) Cycle individuel de la reproduction non contrôlé impliquant le besoin d'un nombre d'individus important	Gust 2014 Gust 2011 Gust 2010 OCDE 233, 2010 Gust 2009 Matthiessen 2008 Duft 2007

<i>Gammarus fossarum</i>	Bonne sensibilité à certains contaminants (métaux, insecticides, médicaments)	Sensibilité à certains facteurs environnementaux (choc thermique, taux d'oxygène)	Coulaud 2012
	Ubiquiste		Geffard 2010
	Pertinence écologique : espèce fourrage		Debourge-Geffard 2009
	Suivi aisé des traits biologiques (survie, comportement, reproduction)		Roman 2007
			Besse 2013
			Publi Jeanne

Table 31: Synthèse des principaux avantages et limites d'utilisation des modèles biologiques choisies-références bibliographique et normes présentant l'utilisation de ces modèles en écotoxicologie

Partie C : Extraction et analyse des composés d'intérêts dans les matrices biotiques

La détermination des contaminants émergents dans le biote est une tâche difficile et un défi analytique majeur en raison de la complexité de ces matrices, mais également de la très faible teneur à laquelle les composés sont présents. Cependant, examiner la contamination du biote est en passe de devenir une problématique des plus importantes car elle reflète le transfert de la pollution le long de la chaîne alimentaire et fournit des éléments de contexte permettant de comprendre et de quantifier les effets d'une telle pollution sur les organismes et leurs communautés.

L'analyse du biote est nettement plus ambitieuse que l'analyse du sol ou de l'eau. Des méthodes d'analyses assurant une mesure précise des analytes d'intérêts doivent être développées. Une méthode idéale pour l'analyse des contaminants émergents dans le biote doit être sensible, sélective, précise, peu coûteuse et applicable à un large éventail de polluants. Cette partie met l'accent sur les techniques analytiques actuellement utilisées pour l'analyse de polluants émergents dans les différentes matrices biotiques.

1. Les techniques d'extraction

Les méthodes d'extraction des polluants émergents à partir de matrices biotiques sont semblables à celles classiquement utilisées pour l'extraction des composés organiques présents dans les matrices solides. L'extraction par Soxhlet, longue et coûteuse, a longtemps été la technique d'extraction privilégiée, elle est aujourd'hui suppléée par des méthodes d'extraction plus rapides et automatisables (extraction par ultrasons, extraction par micro-ondes, extraction sous fluide pressurisé (PLE/ASE), extraction sous fluide super critique). Ces nouvelles techniques sont peu consommatrices de solvant, mais restent tout de même très énergivores et représentent un investissement non négligeable. L'extraction/partition à l'acétonitrile assistée par des sels montre un intérêt particulier de par sa rapidité et sa simplicité. Développée initialement pour l'analyse de pesticides dans des matrices principalement alimentaires, cette méthode d'extraction, plus connue commercialement sous le nom de QuEChERS pour « Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe » a été appliquée avec succès à des matrices biotiques (poissons, moules...), pour l'extraction d'une large gamme de composés (pesticides, médicaments, filtres UV, HAP)(Jia, 2011 ; Groz, 2014, Numez,

2015). Son utilisation repose sur l'utilisation d'un solvant organique miscible à l'eau. L'ajout de sels tampon permet d'une part d'induire un effet « salting out » qui engendre la séparation des phases aqueuses et organiques, et d'autre part d'assurer la stabilité des analytes pH-dépendants. Cette méthode, rapide et efficace, a rapidement été standardisée aux USA (AOAC Official Method 2007.01) et en Europe (EN 15662 2008-11) pour l'extraction de pesticides dans des matrices alimentaires. Les protocoles proposés par ces deux normes sont proches. Il existe cependant une différence relative à la nature des sels utilisés. La méthode AOAC emploie un mélange de sels dits acétate (acétate de sodium et sulfate de magnésium anhydre) alors que la méthode EN préconise l'emploi de sels dits citrates (citrates de sodium, chlorure de sodium, citrate de disodium sesquihydraté et sulfate de magnésium anhydre). Les méthodes normées introduisent une étape de purification sur phase dispersive (dSPE). En plus des phases PSA (silice greffée amine primaire et secondaire) et PSA/C18, les fournisseurs proposent aujourd'hui une large gamme de phase dispersive (florisil, noir de carbone, zirconium...). La Table 32 présente quelques exemples de techniques d'extraction couramment utilisées pour les matrices biotiques. Les rendements d'extraction des polluants ciblés pour ces études, ainsi que les prises d'essai initiales y sont également reportés.

Technique utilisée	Matrice	Analytes ciblées	Prise d'essai (g)	Rendement d'extraction (min-max) (%)	Référence
QuEChERS	Moules	Médicaments	1	35-77	Nunez 2015
	Poissons	Pesticides	3	70-120	Molina-ruiz, 2014
		Pesticides	2	75,8-89,4	Jia, 2011
		PFOA/PFOS	7,5	86-107	Lacina,2011
Extraction sous fluide pressurisé	Poissons	Médicaments	1	29-98	Huerta, 2013
		PFOA/PFOS	2	85-101	Llorca,2009
	Moules	BPA, alkylphénols	0,5	80-107	Salgueiro-Gonzales, 2012
Extraction assistée par ultrasons	Calamars, poissons	Filtre UV	2-4	70-120	Peng, Jin, 2015
Extraction par microonde et extraction liquide/liquide assisté par des sels	Poissons	Hormones stéroïdienne	3	75,3-95,4	Whang, zhou, Chen, 2012

Table 32: Exemples de méthodes d'extraction de polluants émergents dans des matrices biotiques

Au regard de la littérature et des exemples présentés dans la Table 32, il semble évident que les méthodes d'extraction des polluants organiques accumulés dans le biote utilisent généralement des prises d'essai supérieures à 1 g. Bien que la taille des échantillons utilisés en écotoxicologie (embryons de poissons, organes, micro-organismes...) soit parfois de faible taille, peu de méthodes d'extraction ont été adaptées à des échelles si petites. Récemment, Sorensen et al (2015) ont publié une review mettant en évidence les progrès de la miniaturisation des techniques d'extraction des

matrices biotiques : bien que des efforts considérables aient été consentis pour diminuer les quantités de prise d'essai, les techniques développées restent cependant principalement concentrées sur l'extraction de polluants prioritaires (HAP, PCB). La miniaturisation des techniques d'extraction du biote, au regard des polluants émergents, restent donc un véritable challenge analytique.

2. Analyse des composés d'intérêts : séparation et détection

Au regard du faible niveau de contamination des échantillons environnementaux, mais également de leur complexité, les techniques analytiques utilisées doivent être particulièrement sensibles et sélectives. La littérature rapporte principalement l'utilisation de techniques séparatives telles que la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie liquide (LC), couplées à divers systèmes de détection (détection par des systèmes optiques ou détection par spectrométrie de masse simple ou en tandem).

2.1. Séparation des composés d'intérêts

En fonction des propriétés physico-chimiques des composés, la chromatographie en phase gazeuse ou la chromatographie en phase liquide pourront être utilisées. Même si certains polluants retenus pour notre étude (BPA, alkylphénols, hormones stéroïdiennes) sont parfois analysés en GC [ref], cette technique n'est pas adaptée à la majorité des composés d'intérêts qui sont pour la plupart thermolabiles et peu volatils. Ainsi, seule l'utilisation de la chromatographie liquide sera détaillée dans ce chapitre.

La chromatographie en phase liquide est une méthode séparative basée sur l'interaction tri-phasique entre le composé d'intérêt, une phase solide dite stationnaire et une phase mobile. Les contaminants retenus pour cette étude ayant un caractère peu polaire, leur séparation est généralement réalisée en chromatographie dite de phase inverse. Dans ce cas, la phase stationnaire contenue dans la colonne chromatographique est une phase apolaire et les composés sont élués en changeant les propriétés de la phase mobile par modification du pourcentage de solvant organique.

Une synthèse bibliographique des conditions d'éluion des composés d'intérêts par chromatographie liquide est présentée dans la Table 33. Ce tableau présente une étude comparative des conditions analytiques couramment utilisées et représentatives des méthodes disponibles dans la littérature.

Table 33:

Les principaux critères étudiés pour optimiser la séparation chromatographique sont le solvant d'élution, les solutions tampons utilisées dans les phases mobiles, les phases stationnaires mises en œuvre ainsi que les systèmes de détection utilisés. Au regard ce tableau, on constate que la majorité des molécules retenues pour cette études sont séparées sur des colonnes en phase inverse majoritairement greffées C18. Cette phase stationnaire apparait donc comme le compromis idéal du fait de sa compatibilité avec des composés présentant de larges gammes de polarité. Il faudra cependant prendre garde à sélectionner une colonne avec « end-capping » afin de limiter les interactions avec les silanols résiduels et d'améliorer la rétention des composés les plus polaires. Les deux solvants d'élution principalement utilisées lors de séparation en phase inverse sont le méthanol et l'acétonitrile. Bien que le méthanol possède une force éluante plus faible que l'acétonitrile, la viscosité du mélange eau/méthanol est plus importante que celle du mélange eau/acétonitrile, il s'agit donc de trouver un compromis idéal entre séparation et contre pression.

Des acides (formique ou acétique) et des sels (acétate d'ammonium) sont couramment ajoutés aux phases mobiles. L'ajout d'acide modifie le pH, ce qui influe sur la forme des molécules en fonction de leur pKa (Dolan, 2006). La stabilisation des molécules sous une de leur forme permet ainsi de rendre les analyses plus reproductibles. En plus d'influer sur la séparation chromatographique, l'ajout d'acide, en favorisant la forme protonée des molécules, permet de favoriser leur ionisation en spectrométrie de masse, particulièrement en mode positif. L'acétate d'ammonium sert, quant à lui, de tampon permettant de stabiliser le pH des phases mobiles (Dolan, 2006), il peut également être utilisé pour améliorer la détection de certaines molécules en favorisant la formation d'adduits.

2.2. Détection des composés d'intérêt

De nombreuses méthodes sont décrites dans la littérature pour la détection des composés d'intérêts, cependant la détection par des systèmes optiques de type UV (simple longueur d'onde), DAD (Diode Array Detector – multiple longueurs d'ondes) ou FLD (Fluorescence detector), ou la détection par spectrométrie de masse simple ou en tandem apparaissent majoritaires, lors de couplage avec la chromatographie liquide. La Table 34 offre une vue globale des différents systèmes de détection en terme de cout, de gamme dynamique, de limite de détection et d'universalité.

Détecteur	Coût	Gamme dynamique de linéarité	Limite de détection (g)	Universalité
UV	Faible	10^4	10^{-11}	Moyenne
DAD	Moyen	10^4	10^{-11}	Moyenne
FLD	Faible	10^5	10^{-14}	Faible
MS	Elevé	$10^3 - 10^4$	$10^{-15} - 10^{-18}$	Elevée

Table 34: Comparaison des différents systèmes de détection utilisés en couplage avec la chromatographie liquide pour la détection des composés retenus pour cette étude

Les détecteurs UV simples ou à multiple longueurs d'ondes, ainsi que les détecteurs FLD permettent d'obtenir des détections très sensibles avec des gammes de linéarité très étendues, tout ceci à moindre coût d'investissement, d'utilisation et d'entretien. Cependant, bien que présentant un coup

d'investissement bien plus important, la spectrométrie de masse offre l'avantage d'être universelle et beaucoup plus sélective. Elle permet en effet d'apporter des informations structurales qui permettent d'identifier les composés de façon bien plus sûre qu'un détecteur UV.

2.2.1. Détection par des systèmes optiques

Quelques rares études utilisent des détecteurs optiques de type UV ou FLD pour la détection et la quantification de certains composés d'intérêt de ce projet. Cependant, des étapes d'extraction et de pré-concentration très importantes sont requises pour atteindre les niveaux de concentration environnementale et ainsi obtenir des limites de détection satisfaisantes. A titre d'exemple, Liu et al (2012) rapportent une méthode simple et rapide, combinant une extraction de type PLE et une analyse par HPLC-UV pour la détermination d'antibiotiques dans des tissus de poissons et de crevette. Les auteurs obtiennent des limites de détection comprise entre 5 et 10 µg/kg. Plus récemment, Rodriguez-Gonzales et al, ont développé une méthode basée sur la technique de dispersion de la matrice sur phase solide (de l'anglais Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)) pour l'extraction de pesticides dans des moules. L'analyse, réalisée par HPLC-DAD, permet d'obtenir des limites de détection comprises entre 36 et 68 µg/kg.

2.2.2. Détection par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est un outil de détection offrant une grande sélectivité ainsi qu'une très bonne sensibilité pour une large gamme de composés. Elle est de ce fait devenue incontournable en analyse environnementale, et plus particulièrement pour l'analyse des matrices biotiques.

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet l'identification et la quantification de composés organiques sur la base de la détermination de leurs masses moléculaires. Elle est fondée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation ou dans une cellule de collision, en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z).

Un spectromètre de masse est principalement constitué de 4 éléments : une source d'ionisation, un analyseur, un détecteur et un enregistreur.

a) Les sources d'ions

La source d'ionisation, premier élément constitutif d'un spectromètre de masse, permet d'ioniser les substances à analyser. Il en existe aujourd'hui une grande variété. Une des caractéristiques les plus importantes de ces différents types de sources réside dans l'énergie interne transférée pendant le processus d'ionisation. Certaines techniques d'ionisation sont très énergétiques et occasionnent une fragmentation intense de la molécule ionisée. D'autres techniques sont plus douces et produisent majoritairement des espèces moléculaires. Une autre caractéristique importante des sources d'ionisation réside dans la nature physico-chimique de l'analyte qu'elles peuvent ioniser. A titre d'exemple, l'impact électronique et l'ionisation chimique sont seulement appropriés à l'ionisation en phase gazeuse. Ces techniques sont donc uniquement adaptées aux composés volatils et thermiquement stables. Pour les composés non volatils et thermolabiles, les ions doivent être

directement extraits de la phase condensée à la phase gazeuse. Ces sources d'ionisation directes existent sous deux formes, suivant que l'analyte se trouve en phase liquide ou en phase solide. Dans le cas des sources d'ions en phase liquide, couramment utilisées lors de couplage avec la chromatographie liquide, la solution contenant l'analyte est introduite dans le spectromètre de masse par nébulisation, sous forme de gouttelettes par l'intermédiaire de plusieurs systèmes de pompage qui permettent de maintenir un vide adéquat. Le thermospray, l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et l'électrospray correspondent à ce type de source d'ionisation. Par souci de simplification nous détaillerons ici uniquement le principe de l'ionisation par électrospray, qui sera la technique de choix pour notre étude.

L'électrospray est une source d'ionisation à pression atmosphérique inventée et utilisée dès la fin des années 80 [ref]. Bien que d'autres sources puissent être utilisées pour un couplage avec la chromatographie liquide (APCI et APPI (photo-ionisation à pression atmosphérique)), les propriétés physico-chimiques des molécules retenues pour cette étude semblent indiquer un potentiel d'ionisation préférentiel en électrospray (Figure 24), ce qui a pu être confirmé par la littérature.

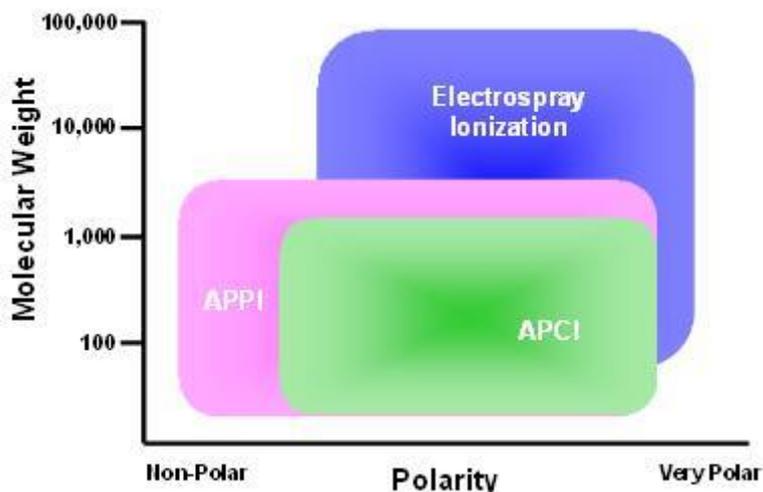


Figure 24: Critères de sélection d'une source d'ionisation à pression atmosphérique en fonction des propriétés physico-chimique (polarité et masse molaire) des composés à analyser

Ce procédé repose sur l'introduction de l'échantillon liquide dans un capillaire de silice très fin (aiguille de spray) soumis à une différence de potentiel élevé (positif ou négatif selon le mode d'ionisation). L'action combinée de ce champ électrique et d'un courant d'azote entraîne la formation d'un nébulisat caractérisé par la présence de gouttelettes chargées positivement ou négativement. Ces gouttelettes vont s'accumuler à l'extrémité de l'aiguille et former un cône allongé en raison de l'attraction induite par la présence d'une contre électrode. Ce cône est communément nommé cône de Taylor. La solution va alors se disperser en formant de fines gouttelettes (spray). L'action d'un gaz (N_2) chauffé à haute température va permettre l'évaporation du solvant. Progressivement, la taille des gouttelettes chargées va diminuer et lorsque la densité de charge deviendra trop importante, des gouttelettes plus petites vont être formées par explosion coulombienne. A l'issue de ces cascades d'explosions et grâce à des mécanismes de désolvatation et

d'évaporation encore mal connus fondamentalement, des ions en phase gazeuse sont alors émis (Figure 25). Cette technique d'ionisation douce permet de générer des ions moléculaires résultant majoritairement de la protonation ou de la déprotonation des molécules présentes dans l'échantillon. On observe également la formation de dimères, d'ions multi chargés ou encore d'ions qualifiés d'adduits (ce sont des ions résultant de la perte ou de l'addition d'atomes ou de groupement d'atomes chargés Na^+ , K^+ , NH_4^+ ...).

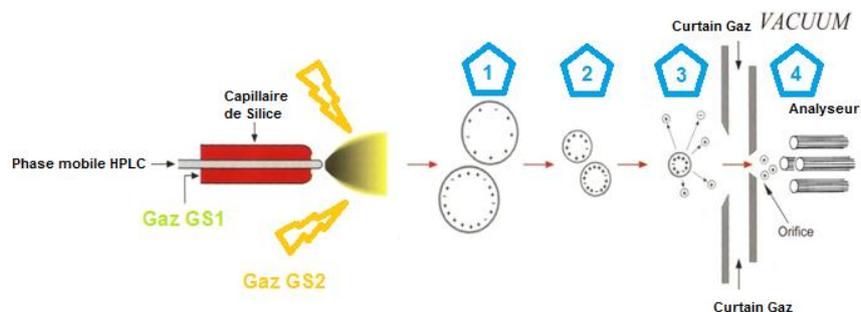


Figure 25: Source d'ionisation ESI et phénomènes menant à l'ionisation des composés (1 : Nébulisation ; 2 : Désolvatation et évaporation ; 3 : Explosion coulombienne ; 4 : Ionisation)

L'inconvénient majeur de la source électrospray réside dans les phénomènes d'effets de matrice. En effet, cette source d'ionisation peut conduire à des suppressions (ou exaltations) d'ionisation dues à la présence de composés interférents présents dans la matrice. L'effet de matrice peut conduire à une quantification erronée en sous estimant ou en surestimant les concentrations réellement présentes dans l'échantillon. Il peut également mener à l'identification de faux positifs. L'étalonnage externe ne permettant pas de s'affranchir de ce phénomène, des méthodes de calibration alternatives ont été développées afin de compenser cet effet.

b) Les analyseurs

Après avoir introduit les ions dans le spectromètre, ceux-ci sont séparés en fonction de leur masse, qu'il faudra simultanément déterminer. Tout comme il existe une grande variété de sources, il existe de nombreux analyseurs. Les analyseurs à balayage (scanning) détectent les ions successivement au cours du temps. Ils sont soit à aimant, avec un tube de vide ne permettant que le passage des ions d'une même masse à un temps donné, ou encore de type quadripolaire. Par contre, d'autres analyseurs permettent la détection simultanée de tous les ions comme l'analyseur magnétique dispersif, l'analyseur à temps de vol (ToF), la trappe d'ions (IT) et l'analyseur à résonance cyclotronique d'ions (ICR).

Certains spectromètres de masse combinent différents types d'analyseurs comme un analyseur à quadripôle, un analyseur à trappe d'ion, un analyseur à résonance cyclotronique d'ions ou encore un analyseur à temps de vol. Dans ce cas, ils sont qualifiés d'instruments hybrides. Le but de ces spectromètres de masse hybrides est de combiner les forces de chaque analyseur tout en évitant la combinaison de leurs faiblesses. Leur configuration est décrite par les analyseurs qui les composent dans l'ordre dans lequel ils sont traversés par le faisceau d'ions. Bien qu'aujourd'hui presque toutes les combinaisons possibles de deux types d'analyseurs différents aient été rapportées et soient

disponibles en version commerciale, dans un souci de simplification, seuls les analyseurs utilisés dans le cadre de ces travaux seront décrits dans ce manuscrit.

i. Le spectromètre de masse hybride QqToF

Le spectromètre de masse QqToF peut être schématisé d'une manière simple comme l'addition d'un quadripôle Q1, d'une cellule de collision q2 et d'un analyseur à temps de vol (ToF).

En mode simple MS, le quadripôle Q1 travaille en mode « radiofréquence simple » de sorte qu'il agit simplement comme un guide d'ion, alors que l'analyseur à temps de vol (ToF) discrimine les ions (m/z) en fonction de leurs vitesses de déplacement à l'intérieur du tube de vol. L'intervalle de temps nécessaire aux ions pour parcourir le tube de vol et atteindre le détecteur est appelé « temps de vol ». Le temps de vol (t) est proportionnel à la racine carrée du rapport m/z et dépend également de deux paramètres fixes et connus : la longueur (d) et la tension d'accélération appliquée à l'entrée de celui-ci (U) :

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

Équation 1: Equation reliant le rapport m/z au temps de vol d'un ion

Les spectres résultants de l'utilisation du spectromètre de masse QqToF en mode MS tirent bénéfice de la haute résolution et de l'exactitude en masse des instruments TOF. Ils bénéficient également de leur capacité à enregistrer simultanément tous les ions produits sans recourir à un balayage. Dans ce mode, le quadripôle q2 travaille également en mode « radiofréquence simple » mais à la différence du quadripôle Q1, il peut travailler en présence d'un gaz de collision à une pression de plusieurs millitours. Cependant, tous les paramètres sont réglés de manière à maintenir l'énergie de collision à très faible valeur pour éviter toute fragmentation. La présence de ce gaz va cependant permettre le refroidissement conditionnel des ions transmis. En effet, si le quadripôle permet de focaliser la trajectoire des ions vers son axe central, les collisions des ions avec les molécules du gaz ambiant conduisent à la perte graduelle de leur énergie cinétique, avec comme conséquence, l'atténuation du mouvement radial et axial de ces ions. Le refroidissement collisionnel permet donc non seulement une focalisation spatiale en réduisant le diamètre du faisceau d'ions, mais également un contrôle de la distribution des vitesses des ions qui proviennent de la source en réduisant leurs vitesses. En conséquence, tous les ions sont reconditionnés de telle manière qu'après ré-accélération quand ils entrent dans l'analyseur à temps de vol, toute anomalie est éliminée pour donner un faisceau d'ions focalisé et présentant une distribution en énergie cinétique proche du niveau thermique. La sensibilité et la résolution de ce type de spectromètre tirent bénéfice de ce type de refroidissement collisionnel supplémentaire dans la cellule de collision en permettant à l'analyseur ToF d'atteindre une plus haute résolution et une sensibilité plus élevée. Cet appareillage est de ce fait couramment employé lors d'analyses holistiques.

En mode MS/MS, le quadripôle Q1 travaille comme un filtre de masse permettant la sélection des ions précurseurs. Ces ions sont alors accélérés avant d'entrer dans le second quadripôle, utilisé

comme cellule de collision, où ils sont fragmentés efficacement. Les ions fragments obtenus et les ions parents suivants sont refroidis et focalisés comme décrit ci-dessus avant d'être analysés par l'analyseur ToF.

ii. *Le spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôle*

Bien que la littérature rapporte des travaux relatifs à l'analyse de micropolluants dans des matrices environnementales par spectrométrie de masse simple, la spectrométrie de masse en tandem reste le mode de détection majoritaire. Les appareils permettant la spectrométrie de masse en tandem sont aujourd'hui courants. Ils combinent plusieurs analyseurs en série et permettent l'obtention d'un spectre de masse résultant de la fragmentation d'un ion sélectionné dans le premier analyseur. Parmi les spectromètres de masse en tandem, le triple quadripôle est l'analyseur le plus couramment utilisé pour l'analyse ciblée de molécules de faible masse moléculaire (< 1000 Da) dans de nombreuses matrices environnementales en raison de sa sensibilité mais surtout de sa sélectivité. Un triple quadripôle résulte de l'association en série de deux analyseurs quadripolaires (Q1 et Q3), séparés par une cellule de collision qui est en fait un quadripôle plus court (Q2). Un quadripôle est constitué de quatre électrodes hyperboliques métalliques et parallèles. Elles sont raccordées électriquement deux à deux et soumises à un potentiel composé d'une tension continue U et d'une tension alternative V. Les deux tensions sont à l'origine de la formation du champ quadripolaire entre les deux électrodes de même potentiel. Ainsi, les ions formés dans la source sont accélérés et focalisés avant leur entrée dans l'analyseur, puis subissent l'effet du champ quadripolaire. Dans ce quadripôle, suivant les valeurs de tension du champ, seuls les ions ayant des trajectoires stables seront détectés (ion en résonance) ; les autres, instables, termineront leur course dans les barres hyperboliques (ions en non résonance), se déchargeront et seront entraînés par un système de pompage qui les éliminera. La stabilité de la trajectoire d'un ion est dépendante de sa masse et de sa charge. Afin de détecter chaque ion formé dans la source, les tensions U et V sont augmentées de manière à obtenir un rapport U/V constant. Il est alors possible de séparer les ions d'un mélange complexe en fonction de leur rapport m/z puisqu'il est possible de balayer toute une gamme de masse en variant les tensions U et V. Finalement, l'analyseur quadripolaire utilise la stabilité des trajectoires des ions pour séparer les ions selon leur rapport m/z.

Travailler avec un spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôle permet de travailler soit en MS simple, soit en mode MS/MS. Dans le cas d'une analyse en mode MS simple, aucune tension alternative n'est appliquée sur le troisième quadripôle : cela a pour conséquence directe de le rendre « transparent » comme la cellule de collision. Deux modes d'analyses sont possibles : le mode balayage (full scan) où tous les ions formés sont observés et le mode d'acquisition d'un rapport m/z donné (SIM, Simple Ion Monitoring) où certains ions formés sont sélectionnés.

A l'opposé, dans la configuration en tandem, les quadripôles (Q1 et Q3) sont « activés » et la cellule de collision est remplie de gaz inerte afin de fragmenter les ions sélectionnés par le premier analyseur. Par ailleurs, l'analyse en tandem peut être menée selon différents modes de fonctionnement selon l'information recherchée. En effet, le premier et le troisième quadripôle

fonctionnent comme des filtres de masse qui laissent passer selon le mode utilisé tous les ions ou certains ions présélectionnés. On distingue alors le mode balayage des ions fragments (« Product Ion Scan »), le mode balayage des ions précurseurs (« Precursor Ion Scan »), le mode perte de neutre (« Neutral Loss »), et le mode de balayage de plusieurs transitions (« MRM, Multiple Reaction Monitoring »).

Le mode d'acquisition sélectionné dans le cadre de ces travaux est le mode MRM car il s'agit du mode de choix pour la quantification pour deux raisons. La première raison est la sélectivité : en effet, ce mode assure une double sélectivité puisque nous sélectionnons à la fois l'ion parent et les ions fils, encore appelés ions produits. Le passage de l'ion parent à l'ion fils est appelé transition MRM. Ce mode permet de suivre précisément et simultanément les transitions MRM de plusieurs ions parents. Le principe de ce mode est représenté dans la Figure 26.

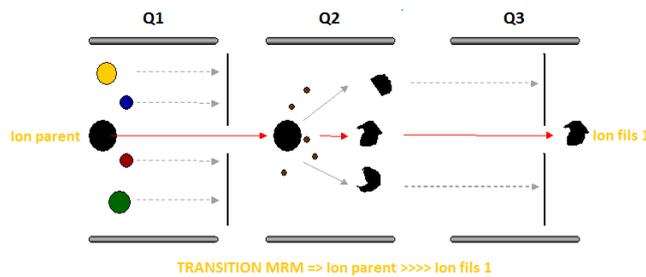


Figure 26: Principe de fonctionnement d'un analyseur triple quadripôle utilisé en mode MRM

La seconde raison qui rend l'utilisation du mode MRM intéressante est la sensibilité améliorée par rapport à tous les autres modes de fonctionnement.

Finalement, en raison de la sélectivité et de la sensibilité requise dans le cadre de ce projet, un analyseur de type triple quadripôle en mode MRM sera utilisé pour détecter et quantifier les polluants d'intérêts pouvant être bioaccumulés par les invertébrés benthiques.

c) Les détecteurs

Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse doit être détecté et transformé en un signal utilisable. Pour ce faire, il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Cette détection fait appel à la charge, à la masse et à la vitesse des ions. A l'exception du cas particulier de la résonance cyclotronique d'ions, les types de détecteurs actuels sont basés sur la détection d'un courant d'ions (cylindre de Faraday) ou sur la génération d'un courant électrique suite à la collision de l'ion avec une surface (multiplicateur d'électrons ou de photons). La plaque photographique et le cylindre de Faraday permettent une mesure directe des charges arrivant au détecteur tandis que les détecteurs multiplicateurs d'électrons ou de photons permettent l'augmentation de l'intensité du signal détecté. Ces détecteurs sont efficaces pour la plupart des applications en spectrométrie de masse. Pourtant, si un détecteur doit idéalement être exempt de tout effet de discrimination particulier, l'efficacité de la plupart de ces détecteurs décroît lorsque la masse moléculaire de l'ion augmente. Cela entraîne de sévères limitations lors de la détection d'ions de hautes masses moléculaires et peut compromettre une analyse quantitative des

données obtenues. Les avancées instrumentales au niveau des sources d'ionisation et des analyseurs de masse qui permettent l'étude de molécules de masses de plus en plus importantes rendent obligatoire le développement de nouveaux détecteurs plus performants qui pallient à ces limitations. Ces détecteurs tels que les détecteurs à induction ou les détecteurs cryogéniques sont basés sur des principes physiques différents de ceux utilisés pour les détecteurs précédemment cités et présentent une efficacité indépendante de la masse et de la vitesse de l'ion détecté.

Partie D : Vers la miniaturisation des systèmes d'analyses : principe et application de la nanochromatographie

La miniaturisation des systèmes d'analyses représente l'une des tendances actuelles des sciences et des technologies modernes. Elle fournit non seulement un certain nombre d'avantages par rapport aux techniques analytiques qualifiées de classiques mais elle rassemble des verrous techniques qui concentrent l'attention de nombreuses communautés scientifiques depuis plus de 20 ans. Des efforts considérables ont été fournis de manière à miniaturiser les systèmes de chromatographie liquide classiques, notamment grâce à la mise en œuvre d'études théoriques, technologiques et méthodologiques qui ont permis d'améliorer l'efficacité de séparation, de réduire le temps d'analyse et d'optimiser la génération de faibles débits. Parmi les techniques chromatographiques miniaturisées, la nanochromatographie liquide (NanoLC) a su s'imposer comme une technique séparative complémentaire et compétitive des systèmes de chromatographie liquide classiques en fournissant un grand nombre d'applications dans des domaines divers et variés.

L'objectif de cette synthèse bibliographique est donc de fournir une enquête actualisée et critique des différentes applications de la NanoLC et de mettre en exergue le potentiel de cette technique séparative pour résoudre les défis analytiques insufflés par les problématiques environnementales.

1. Historique et définition de la nanochromatographie

1.1. Historique de la miniaturisation des systèmes d'analyse

La séparation, l'identification et la quantification d'une large gamme de composés dans des matrices environnementales et/ou biologiques sont considérées depuis quelques années comme le cheval de bataille de nombreux chercheurs et industriels. Pour résoudre ces défis analytiques, les techniques d'analyses modernes se doivent d'atteindre des limites de détection toujours plus basses sans pour autant négliger la sélectivité et la rapidité de l'analyse. La réalisation de tels objectifs est parfois compliquée par la nécessité de réduire les coûts d'analyse, de diminuer les quantités de produits chimiques utilisées et de s'adapter à la taille des échantillons disponibles. La miniaturisation des techniques d'analyse s'impose aujourd'hui comme la clé de voute de la chimie analytique moderne. Ce concept est souvent associé à l'exécution du processus d'analyse à petite échelle. Différents termes ont été utilisés pour représenter cette idée : « micro ou nano systèmes séparatifs », « lab on chip » (laboratoire sur puce) ou encore « microsystème analytique intégré pour l'analyse totale » (μ TAS). Manz et al.(2002) mettent en évidence les différentes périodes relatives à l'évolution de

microsystèmes analytiques. Basée sur cette source et complétée par les récents développements, la Figure 27 représente de manière schématique l'histoire de la miniaturisation des techniques analytiques. Les étapes les plus représentatives sont brièvement décrites ci-dessous.

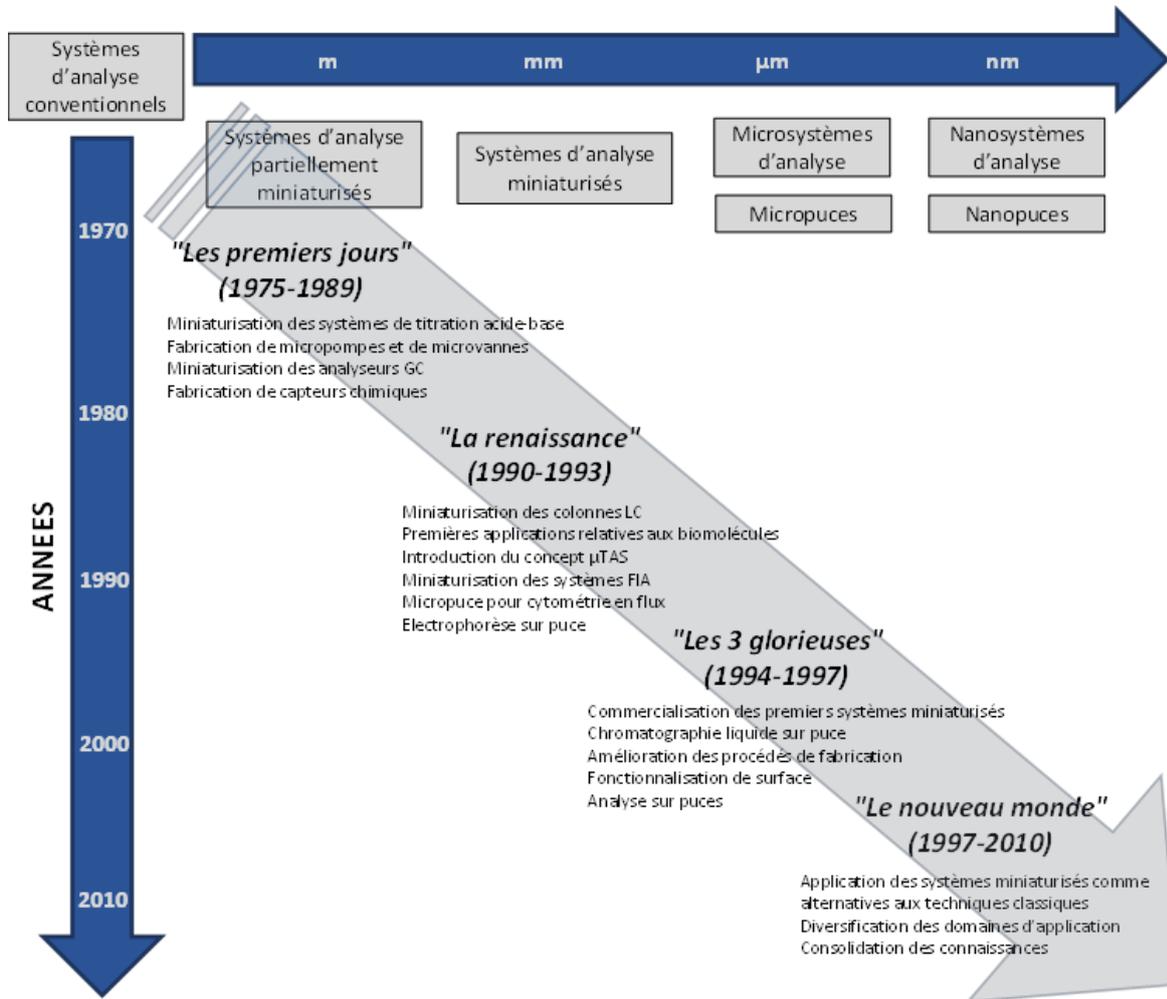


Figure 27: Historique de la miniaturisation des systèmes d'analyse d'après Manz et al.

La première période (1975-1989) a été caractérisée par des travaux relatifs à la miniaturisation de composants, tels que les microsystèmes de pompage, les micro-vannes ou encore les capteurs chimiques. L'intégration de ces microcomposants à base de silicium a notamment permis la fabrication de deux instruments remarquables. Le premier était un analyseur miniaturisé de chromatographie en phase gazeuse et le second un microsystème de titrage acide-base coulométrique basé sur l'utilisation d'un capteur sensible au pH. En 1988, Karlson et Novotny introduisent le terme nanochromatographie liquide et relatent pour la première fois l'utilisation d'une colonne capillaire de très faible diamètre interne (44µm).

La seconde période (1990-1993) est marquée par l'avènement de nombreux microanalyseurs basés sur l'utilisation de colonnes chromatographiques miniaturisées. Manz et al. posent alors le concept de µTAS dans lequel les analyseurs, généralement constitués de puces de silicium, incorporent les étapes de prétraitement de l'échantillon, de séparation et de détection. Selon les auteurs, l'objectif principal de cette approche miniaturisée était d'améliorer les performances analytiques des capteurs

existants, en raison des mauvais résultats en termes de sélectivité et de durée de vie de ceux-ci, et non de réduire la taille des systèmes analytiques. Ces travaux novateurs ont toutefois permis de mettre en exergue les avantages de la miniaturisation, notamment en ce qui concerne les faibles consommations de réactifs et de phases mobiles. Cependant, les systèmes de pompage classiques disponibles au début des années 90 ont montré des problèmes relatifs aux transports de la phase mobile dans des capillaires de l'ordre de 1 à 20 μm de diamètre interne, engendrant des contre-pressions importantes. Ainsi, des efforts considérables ont été faits pour développer des nouveaux systèmes de pompage et d'injection.

Une augmentation importante du nombre de publications liées à la miniaturisation des systèmes d'analyses a eu lieu entre 1994 et 1997. Une grande variété d'analyses sur puce ont été recensées, notamment due à la commercialisation de différents systèmes miniaturisés. La modification de surfaces chimiques ainsi que la fonctionnalisation de celles-ci ouvrent alors des possibilités intéressantes pour la miniaturisation de colonne chromatographique. En outre, durant cette période, des contributions significatives ont été apportées quant à la micro-fabrication de différents modes de séparation et de différents systèmes de détection, permettant de nouvelles applications qui restent cependant principalement axées sur la biologie.

Les 15 dernières années peuvent être considérées comme une période de consolidation relative à l'évolution des systèmes miniaturisés, qui sont aujourd'hui envisagés comme des alternatives analytiques potentiels. Le nombre et la variété des publications témoignent de cet engouement, bien que dans de nombreux cas, ces systèmes soient utilisés principalement en recherche, avec une mise en œuvre limitée dans les laboratoires de routine. Alors que les technologies de micro-fabrication, et en particulier la conception et la production de systèmes micro-fluidiques, constituent l'un des jalons de la miniaturisation analytique, les développements importants relatifs aux dispositifs de contrôles de flux (micro-pompes et micro-vannes), les connectiques et les interfaces, ainsi que les techniques de fonctionnalisation de surface, jouent encore un rôle clé sur la scène de la miniaturisation. Les champs d'application des microsystèmes d'analyses ont été clairement élargis, avec un impact particulier dans le domaine de la bioanalyse. Ainsi, de nombreuses utilisations sont aujourd'hui dédiées à l'analyse de protéines et de peptides, à la séparation d'ADN ou au diagnostic clinique. Une hausse des publications liées au domaine de l'environnement peut également être observée. Quelques exemples seront mentionnés dans le chapitre suivant de ce manuscrit.

1.2. Définition de la nanochromatographie

Bien qu'encore aujourd'hui aucune définition officielle de la nanochromatographie n'ait encore été proposée, il a souvent été mentionné (5,3) que lorsque la séparation chromatographique est effectuée à partir de colonnes capillaires dont le diamètre interne est compris entre 10 et 100 μm , la technique porte le nom de nanochromatographie liquide. Lorsque les colonnes utilisées présentent un diamètre interne plus important, compris entre 100 μm et 500 μm , on parle de chromatographie liquide capillaire (CLC). Certains auteurs présentent la nano-LC comme un système chromatographique possédant un débit de phase mobile de l'ordre du nL/min [ref]. Iram et al., dans

leur ouvrage dédié à l'analyse par NanoLC, ajoutent l'aspect de la détection aux définitions déjà proposées dans la littérature. Ils définissent ainsi la NanoLC comme « une technique séparative permettant l'analyse d'échantillon disponible en quantité infime, impliquant l'utilisation de colonne chromatographique de faible diamètre interne, la génération de nano débit et nécessitant une détection de l'ordre du ng/ml ».

2. Aspects théoriques de la nanochromatographie liquide

La réduction du diamètre interne d'une colonne séparative engendre la diminution du phénomène de dilution chromatographique, il en résulte donc une augmentation de la concentration de l'échantillon injecté sur le système chromatographique. Le phénomène de dilution chromatographique (D) d'un échantillon donné, lorsque celui-ci est injecté sur un système LC est exprimé par l'équation suivante :

$$D = \frac{C_0}{C_{max}} = \frac{\varepsilon \pi r^2 (1+k) \sqrt{2\pi LH}}{V_{inj}}$$

Équation 2: Phénomène de dilution chromatographique (D)

Où C_0 est la concentration initiale d'un composé dans un échantillon (avant l'injection dans le système chromatographique) ; C_{max} est la concentration finale du composé dans le système chromatographique (correspondant au maximum du pic chromatographique) ; ε est la porosité de la colonne ; r est le rayon de la colonne ; k est le facteur de rétention ; L est la longueur de la colonne ; H est la hauteur de plateau théorique et V_{inj} est le volume d'échantillon injecté.

D'après cette équation, D augmente proportionnellement avec le carré du rayon de la colonne et avec la racine carrée de la longueur de la colonne. Ainsi, la réduction du diamètre interne de la colonne permet de réduire considérablement le facteur de dilution, ce qui augmente la concentration dans le pic élué.

Bien que cette formule doive être appliquée en conditions d'élution isocratique, les résultats sont souvent extrapolés aux conditions d'élution en gradient. Dans des conditions d'élution en gradient, la dilution est partiellement compensée par l'augmentation de la force éluante de la phase mobile au cours du temps. Cependant, le gain de sensibilité engendré par cet effet est bien plus faible que celui obtenu en diminuant le diamètre interne de la colonne. Le gain de sensibilité (f) résultant de l'utilisation d'une colonne séparative de faible diamètre interne peut être approximé par la relation suivante :

$$f = \frac{d_1^2}{d_2^2} ; d_1 > d_2$$

Équation 3: Gain de sensibilité (f) résultants de l'utilisation d'une colonne de faible diamètre interne

Où d_1 et d_2 représentent respectivement les diamètres internes des colonnes séparatives utilisées en chromatographie liquide conventionnelle et en nanochromatographie.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

Par conséquent, lorsque l'on passe d'une colonne chromatographique de 4,6 mm de diamètre interne à une colonne capillaire de 75 µm de diamètre interne, le gain de sensibilité théorique devrait avoisiner les 4000. Cependant, une telle augmentation de sensibilité ne peut pas réellement être atteinte en raison des conséquences pratiques qu'engendre la réduction du diamètre interne de la colonne sur l'ensemble du système chromatographique.

L'utilisation de colonnes séparatives de faible diamètre interne implique nécessairement une diminution du débit optimal (D_{opt}). Celui-ci peut être exprimé par l'équation suivante :

$$D_{opt} = u_{opt} \pi \frac{d_i^2}{4} \varepsilon$$

Équation 4: Débit optimal (D_{opt})

Où u_{opt} représente la vitesse linéaire optimale, d_i le diamètre interne de la colonne chromatographique et ε la porosité de la colonne.

Ainsi, pour une vitesse optimale typique de 0,1 cm/s, qui correspond à un D_{opt} de 0.7 mL/min pour une colonne de 4,6 mm de diamètre interne et de porosité 0,7, une diminution du d_i de 4,6 mm à 100 µm (facteur 46) conduit à un débit optimal de 330 nL/min. Cette forte diminution du débit en nano-LC est intéressante lorsque celle-ci est couplée à un spectromètre de masse à source électrospray (ESI). En effet, il a été montré que la diminution du débit augmente fortement le rendement d'ionisation dans la source, ce qui contribue donc à augmenter la sensibilité [66].

La réduction du diamètre interne d'une colonne séparative est la première des nombreuses étapes critiques de la miniaturisation des systèmes de chromatographie liquide. En effet, les volumes extra colonne qui sont à l'origine de l'élargissement des pics chromatographiques doivent être réduits en conséquence pour préserver les performances optimales du système.

La présence excessive de volumes extra colonne entraîne une dégradation considérable de l'efficacité de séparation et par conséquent, une perte importante de sensibilité. La contribution des volumes extra colonne dans l'élargissement des pics chromatographiques doit être négligeable par rapport à l'élargissement des pics provoqué par le processus de séparation sur la colonne de séparation. En général, une réduction de 5 à 10% de la performance chromatographique est considérée comme acceptable [ref].

L'équation d'Aris-Taylor décrit la contribution d'un certain nombre de paramètres chromatographiques sur la dispersion d'une bande de soluté dans un tube cylindrique (σ^2) :

$$\sigma^2 = \frac{\pi d^4 L_{ext} u_{ext}}{96 D_m}$$

Équation 5: Equation d'Aris-Taylor

Où d et L_{ext} représentent le diamètre et la longueur des capillaires de connexion ; D_m le coefficient de diffusion moléculaire et u_{ext} la vitesse linéaire de la phase mobile.

Par conséquent, les tubes de connexion doivent être le plus court et surtout aussi étroit que possible pour minimiser l'élargissement des pics engendré par les volumes extra colonne. Ils ne doivent cependant pas engendrer une contre pression trop importante. Pour un système de NanoLC classique, utilisant des colonnes séparatives de 75 μm de diamètre interne et des débits avoisinant les 300 nL/min, le meilleur compromis se trouve généralement en utilisant des tubes de connexion de 10 à 20 μm de diamètre interne. Les capillaires en silice fondue sont souvent utilisés comme connectiques en raison de leur grand nombre d'avantages : ils peuvent être facilement coupés à la longueur souhaitée et sont disponibles commercialement dans une large gamme de diamètres internes compatibles avec les systèmes NanoLC.

Etablir des connexions avec des capillaires de silice fondue peut être un véritable défi pour les utilisateurs non expérimentés. Cette étape est souvent considérée comme la partie la plus délicate de la mise en œuvre d'un système NanoLC. Traditionnellement, les capillaires de silice fondue sont connectés grâce à des unions classiques utilisant des manchons le plus souvent en téflon, des férules et des écrous à sertir. Cependant, si le capillaire n'est pas correctement positionné, des volumes morts seront introduits, conduisant à des phénomènes de dispersion. L'élimination des volumes morts est donc la clé du succès lors d'une analyse par nanoLC. Plusieurs nouveaux types de connexions ont été introduits récemment sur le marché permettant des connexions rapides et garanties sans volume mort. Leur résistivité étant évaluée à 1000 bars, ils sont donc compatibles avec des systèmes de haute pression.

La miniaturisation d'un système LC implique que tous les composants du système soient à échelle réduite. Atteindre des débits de l'ordre de la centaine de nL/min et des gradients reproductibles exige des approches dédiées qui peuvent être divisés en 3 catégories : les split dits passifs, les split dits actifs et les systèmes sans division de débit.

Les premières générations de systèmes NanoLC étaient fondées sur des pompes LC conventionnelles équipées de diviseurs de débit passifs (split passif). Dans ce cas, un séparateur de débit répartit le débit de phase mobile entre la colonne séparative et un réducteur de débit. La différence d'écoulement de la phase mobile à travers la ligne de restitution d'une part et à travers la colonne d'autre part détermine le ratio de split. En conséquence, ce ratio de split peut varier au cours d'une élution par gradient ou lorsque la résistance à l'écoulement augmente du côté de la colonne séparative, par exemple en raison de l'obstruction partielle de celle-ci. Ces systèmes sont simples et relativement peu coûteux mais compromettent la stabilité et la précision du flux.

Pour surmonter ces problèmes, des systèmes de split actifs intégrant des systèmes d'évaluation de flux ont été développés. Ils ont permis d'améliorer la stabilité de l'écoulement de la phase mobile garantissant ainsi une meilleure reproductibilité que les systèmes de split passifs. Cependant, la majorité de la phase mobile est également envoyée à la poubelle.

Idéalement, le débit ne doit pas être séparé mais doit être fourni directement par la pompe comme dans le cas des systèmes LC classiques. Ces systèmes NanoLC sont souvent appelés « direct flow » ou « splitless systems ». Ils peuvent être classés selon deux catégories : les systèmes « solvant refill » et

les systèmes à flux continu et sont disponibles auprès de la plupart des fournisseurs de HPLC. Généralement, ces nouveaux systèmes sont également capables de fonctionner à des pressions pouvant atteindre celles des systèmes UHPLC. Tandis que les systèmes UHPLC conventionnels sont principalement utilisés pour augmenter les débits d'analyse, leur utilisation en NanoLC vise essentiellement à améliorer l'efficacité de séparation à travers l'utilisation de colonnes capillaires de très faible granulométrie (1-2 μ m).

Les systèmes « solvant refill » offrent des débits de l'ordre de la dizaine de nL/min au μ L/min en utilisant des pompes qui sont assimilables à des seringues à commandes pneumatiques. Elles permettent de pomper la phase mobile afin que celle-ci soit contenue dans une chambre de mélange ou dans une boucle. Elles sont équipées d'un système de valves qui basculent entre la phase d'aspiration et la phase d'écoulement. Par conséquent, l'écoulement à travers la colonne de séparation est donc à l'arrêt lors de la phase d'aspiration. Des algorithmes de contrôle très poussés veillent à ce que l'impact de l'interruption de l'écoulement soit réduit au maximum.

Les pompes à flux continu sont quant à elles beaucoup plus conventionnelles et possèdent deux pistons par canal. L'un des pistons fournit le débit sélectionné pendant que l'autre recharge, évitant ainsi les fluctuations de débit. Ces pompes permettent de fournir des débits très faibles et reproductibles en contrôlant de manière très précise le mouvement des pistons. Ce type de système de pompage possède une gamme de débit étendu pouvant atteindre la centaine de μ L/min. Ces pompes de dernière génération présentent un grand intérêt dans de nombreux domaines investiguant des matrices complexes car elles offrent la puissance et la flexibilité nécessaires pour effectuer les séparations les plus complexes.

L'introduction de l'échantillon dans un système NanoLC présente lui aussi ses propres défis. Typiquement, si le diamètre interne d'une colonne chromatographique diminue, il en va de même pour le volume maximal injectable (V_{max}) :

$$V_{max} = C d_i^2 \frac{L(1+k)}{\sqrt{N}}$$

Équation 6: Volume maximal injectable (V_{max}) sur une colonne LC

Où C est la concentration totale de l'échantillon ; d_i le diamètre interne de la colonne ; L la longueur de la colonne ; k le facteur de rétention ; et N le nombre de plateaux théoriques

Si le volume injecté est trop élevé, cela entraîne un élargissement des pics et donc une perte de sensibilité et de sélectivité. Pour éviter ces élargissements, les volumes injectés sur des colonnes capillaires de 75 μ m de diamètre interne et 15 cm de longueur dépassent rarement la dizaine de nanolitres. Ce faible volume injecté peut donc entraîner un problème de sensibilité si la teneur en composé recherché n'est pas suffisamment élevée. Des configurations d'injection directe, comme il en existe en LC classique sont cependant utilisées en NanoLC. L'échantillon étant directement injecté sur la colonne séparative, il existe un risque minime de perte d'information, ce qui rend cette technique très populaire dans certains laboratoires notamment dédiés à l'analyse protéomique. Les inconvénients majeurs de ce système d'injection sont l'absence de protection de la colonne

chromatographique qui peut être accidentellement obstruée lors de l'injection d'échantillons complexes et la faible capacité de chargement (V_{\max} faible).

Différentes alternatives peuvent être mises en œuvre pour pallier à ces inconvénients comme la pré-concentration hors ligne de l'échantillon, l'injection d'un large volume d'échantillon directement sur la colonne de séparation en utilisant des conditions d'injection spécifiques (technique dite de « on-focussing ») et la pré-concentration en ligne utilisant une colonne de chargement (technique dite de « trapping »).

La pré-concentration hors ligne peut être effectuée en réduisant le volume de l'échantillon par évaporation ou par lyophilisation. Une étape de purification avancée, de dessalage ou de filtration de l'extrait est alors primordiale de manière à éviter l'obstruction de la colonne séparative.

En variante, il a été montré que des volumes d'échantillons plus importants (1-5 μL) peuvent être chargés directement sur les colonnes de nano LC en un temps acceptable en utilisant des débits plus élevés lors de l'injection. Le délai de gradient, provoqué par une boucle d'injection de volume plus important, peut être minimisé en contournant la boucle une fois l'échantillon chargé. Cette approche nécessite de nombreux ajustements : la force éluante du solvant d'injection ainsi que celle de la phase mobile de début de gradient doivent être suffisamment faibles afin que les analytes puissent être focalisés en tête de colonne avant d'être élués, évitant ainsi l'élargissement des pics chromatographiques.

Cependant, le chargement d'échantillons très complexes directement sur la colonne nanoLC peut engendrer l'obstruction de celle-ci. Ainsi, l'utilisation d'une colonne de chargement dans une configuration de pré-concentration en ligne corrige les limitations liées à l'injection directe. Dans une telle configuration de chargement, des volumes relativement importants, pouvant aller jusqu'à 100 μL [ref], sont injectés sur une colonne de chargement en utilisant des débits de chargement plus élevés (10-50 $\mu\text{L}/\text{min}$) que ceux utilisés lors de la phase d'éluion. Les colonnes de chargement possèdent des diamètres internes plus importants que ceux des colonnes séparatives (typiquement 300 μm), mais sont généralement très courtes. Elles permettent le dessalage de l'échantillon et l'élimination d'autres composés hydrophiles, assurant ainsi une protection efficace de la colonne séparative contre le colmatage.

On dénombre deux configurations permettant de réaliser cette pré-concentration en ligne : la configuration dite de colonne ventilée et la configuration par commutation de colonne.

Dans la configuration dite de colonne ventilée, une vanne de commutation est placée à l'extérieur du flux de l'échantillon et détermine le sens de l'écoulement. Pendant la phase de chargement, l'éluant est dirigé vers un réservoir poubelle ; par conséquent, aucun flux ne passera dans la colonne de séparation. Lorsque la vanne change de position, le flux est ensuite dirigé sur la colonne séparative pour éluer les analytes. Cette configuration a été utilisée sur des systèmes de split passif dans lesquels la vanne de commutation permettait également de réaliser la division de débit. Bien que les configurations de colonne ventilée aient l'avantage de n'utiliser qu'une seule pompe, le flux est interrompu lors de la commutation de la vanne. Lors d'un couplage NanoLC-MS, cette interruption

de flux peut altérer la durée de vie de l'aiguille du spray de la source NanoESI. Aujourd'hui, des algorithmes de contrôle peuvent être utilisés pour optimiser les flux et les gradients pour de meilleures performances.

Les configurations de commutation de colonne nécessitent généralement deux pompes : la pompe de chargement et la pompe d'élution générant des nano-débits, ainsi qu'une colonne de chargement montée sur une vanne de commutation. L'échantillon est injecté et concentré sur la colonne de chargement à l'aide de la pompe de chargement à un débit relativement élevé. Le flux est en outre dirigé vers un réservoir poubelle permettant ainsi le dessalage de l'échantillon. Lors de cette phase de chargement, la pompe « nano » est directement en ligne avec la colonne de séparation. Lorsque la vanne commute, la colonne de chargement et la colonne séparative sont placées en ligne permettant ainsi d'éluer les analytes de la colonne de chargement et de les séparer dans la colonne capillaire. Le chargement est effectué avec une pompe dédiée, ce qui permet une plage de débit plus large, améliorant ainsi le lavage de l'échantillon pendant la phase de chargement. En outre, l'écoulement à travers la colonne de séparation et l'interface MS n'est jamais interrompu ce qui améliore la stabilité du signal MS.

Afin d'évaluer au mieux la configuration à utiliser lors d'une étude, il convient de garder à l'esprit les avantages et les inconvénients de chacune d'entre elles (Table 35).

Configuration d'injection	Avantages	Inconvénients
Injection directe	Simple Robuste Aucune perte d'information	Volume d'injection limité Aucune purification de l'échantillon Aucune protection de la colonne séparative
Configuration de colonne ventilée	Volume d'injection important Purification de l'échantillon Protection de la colonne séparative	Interruption de débit Importante contre pression Robustesse limitée Perte d'information possible lors de l'étape de chargement
Configuration de commutation de colonne	Volume d'injection important Purification de l'échantillon Protection de la colonne séparative Faibles volumes morts	Perte d'information possible lors de l'étape de chargement

Table 35: Comparaison des différentes configurations d'injection les plus couramment rencontrées en NanoLC

3. Le couplage nanochromatographie liquide – spectrométrie de masse (NanoLC-MS)

Le niveau d'information structurale et la sensibilité des systèmes de détection par spectrométrie de masse ont rendu ces systèmes incontournables. Le couplage des systèmes chromatographiques de type NanoLC avec des spectromètres de masse requiert cependant l'utilisation d'interfaces adaptées à de très faibles débits. Développée comme une technique hors ligne par Wilm et Mann, la source

d'ionisation nanoélectrospray (NanoESI) est aujourd'hui reconnue comme une interface idéale permettant d'améliorer la sensibilité intrinsèque des systèmes NanoLC. Cependant, il est nécessaire d'obtenir un spray stable tout en maintenant l'efficacité de séparation. Les aiguilles de spray typiquement utilisées en NanoESI sont fabriquées à partir de capillaires de silice qui ne conduisent pas l'électricité. La méthode la plus simple et la plus économique permettant d'appliquer une tension se fait par une jonction liquide dans laquelle une électrode est en contact avec la phase mobile. Une alternative à la jonction liquide peut être apportée en utilisant un capillaire de silice fondue recouvert d'un métal conducteur (l'or par exemple). Cette solution offre l'avantage d'éliminer la connexion utilisée dans la jonction liquide. Cependant, les revêtements métalliques peuvent se détériorer rapidement suite à une décharge électrique. Un développement relativement récent dans le domaine de la NanoLC-MS est l'introduction de connexions intégrées pour les systèmes NanoESI permettant de réduire les volumes extra colonne. L'intégration de tous les composants limite la flexibilité de l'installation ce qui la rend apte à l'analyse de routine, et confère au système une robustesse accrue.

L'augmentation des rendements d'ionisation lors de l'utilisation de source nanoélectrospray a été constatée par de nombreux auteurs, cependant

4. Applications

Depuis son avènement, la nanochromatographie liquide a été utilisée pour la séparation d'une large gamme de composés dans des domaines très variés tels que l'analyse protéomique, pharmacologique ou encore toxicologique.

Le domaine de la protéomique reste cependant le domaine majeur d'applicabilité de cette technique séparative. En effet, celle-ci est couramment utilisée pour la cartographie de peptides, le séquençage ou la détermination de modification post-traductionnelle de protéines. Dans ce domaine d'application, le choix de la nanochromatographie est surtout motivé par la faible quantité d'échantillon disponible, en particulier lorsque les travaux sont réalisés avec des cellules souches. Dans ce cas, il est d'une importance capitale de maximiser le nombre d'identifications de peptides par analyse. A titre d'exemple, Ivanov et al. [155] ont exploré le potentiel de la nanochromatographie et l'utilisation de colonnes capillaires monolithiques pour l'analyse de mélanges de peptides obtenus par digestion tryptique. Les auteurs ont ainsi pu observer un important gain de sensibilité par rapport à un système d'analyse conventionnel. Yin et al ont présenté un dispositif de nanochromatographie couplée à la spectrométrie de masse intégrant une colonne d'enrichissement, une colonne de séparation (75 μm d.i) et une aiguille de nanospray pour l'analyse de peptides. Ce dispositif a été utilisé pour la séparation de protéines digérées (BSA) et permet d'atteindre des valeurs de limite de détection dans la gamme du subfemtomole. Les auteurs mettent en évidence la stabilité et la robustesse du nano-electrospray généré par ce type de système.

La séparation de composés chiraux est un sujet grandissant de recherche en chimie analytique, particulièrement dans le domaine pharmaceutique ou dans le domaine biomédical où la bioactivité

de nombreuses molécules est liée à leur chiralité. La première séparation chirale par nanochromatographie a été réalisée par Schurig et al. Les auteurs ont ensuite apporté des modifications à leur phase stationnaire dans le but d'améliorer ces performances. Depuis, de nombreuses phases stationnaires chirales ont été développées et leur application en NanoLC s'est étendue à divers domaines d'applications.

Bien que l'HPLC soit l'une des principales techniques d'analyse des polluants dans les matrices environnementales, très peu de travaux portent sur l'application de la NanoLC pour ce type d'analyses [4, 38, 47, 127, 131, 140, 141, 148]. En référence à des applications environnementales, Cappiello et al. [47] ont décrit l'utilisation d'un nouveau générateur de gradient NanoLC pour l'analyse de polluants environnementaux tels que les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les hormones. Comme il a été précédemment indiqué, les gradients de nano débit basés sur la technique de Splitflow ne sont pas toujours idéaux pour leur utilisation avec des systèmes de détection MS. Pour cette raison, les auteurs ont utilisé un générateur de débit à double scission. Ils rapportent une bonne stabilité du signal, ainsi que de faibles limites de détection pour la majorité des composés étudiés. Lors d'une étude plus tardive, les auteurs du même groupe rapportent l'analyse de 29 perturbateurs endocriniens par NanoLC-MS en utilisant une colonne C18 de 75 µm de diamètre interne. La méthode a été appliquée à la détermination de ces composés dans des échantillons d'eau de mer. Les valeurs de LODs variaient entre 0,4 et 118,7 ng/L. Le Bisphénol A et le nonylphénol ont ainsi pu être identifiés et quantifiés. Rosales-Conrado et al. [127] ont proposé la séparation énantiomérique de plusieurs herbicides (mécoprop, dichlorprop et fénoprop) par NanoLC. De tels travaux ont également été proposés par Fanali et al. Ruppén Cañas et al ont évalué la présence d'une toxine (yessotoxine) dans le phytoplancton marin par NanoLC couplée à un spectromètre de masse hybride (QqToF) en utilisant une interface de type nanoélectrospray. Les auteurs rapportent une limite de détection avoisinant les 0,5 pg. Plus récemment, David et al, ont démontré le potentiel du couplage NanoLC-NanoESI-TOF pour le profilage métabolique de plasma de poisson. Les auteurs rapportent des limites de détection inférieures au ng/ml pour de nombreux médicaments et métabolites reconnus comme polluants environnementaux.

Partie E : Performances analytiques et validation de méthodes quantitatives

1. Critères d'identification des composés : sélectivité et spécificité

L'identification et la quantification des composés lors d'une analyse par HPLC-MS/MS en mode MRM doivent être assurées selon différents critères. Les normes européennes recommandent l'utilisation d'un minimum de trois points d'identification. Nous avons donc fait le choix dans le cadre de ces travaux de thèse d'identifier chaque composé par:

- Leur temps de rétention (Tr)
- Deux transitions MRM (T1 et T2)
- Le rapport des aires des deux transitions (T1/T2) [13V].

Par ordre de priorité, le premier critère d'identification est le temps de rétention fourni par le système chromatographique. Une tolérance de 2,5 % est tolérée en HPLC-MS/MS entre le temps de rétention du composé dans le standard de référence et celui dans l'échantillon analysé.

Ensuite, les transitions MRM T1 et T2 correspondent au deuxième critère d'identification. La transition MRM T1 est associée à la transition ion parent et ion fils la plus intense, elle est alors utilisée pour la quantification du composé dans l'échantillon. La transition MRM T2 est associée à la transition ion parent et ion fils la deuxième plus intense, elle est employée pour confirmer l'identification du composé dans l'échantillon.

Et enfin, le troisième et dernier critère d'identification des composés dans un échantillon est le rapport de l'aire de la transition T1 sur l'aire de la transition T2 (T1/T2). La tolérance sur ce rapport est fonction de l'intensité relative du pic chromatographique détecté dans l'échantillon [VALIDATION_5_JCA]. Ainsi, la gamme de tolérance entre le rapport mesuré dans l'échantillon et celui mesuré dans la standard analytique du composé peut être comprise entre 20 et 50 % [13V].

Chaque composé sera formellement identifié et quantifié dans le cadre de ces travaux grâce aux 3 points d'identification, la sélectivité étant définie comme la capacité à identifier sans ambiguïté et à quantifier un composé d'intérêt dans un mélange complexe sans interférence de la part des composés présents dans la matrice, des impuretés ou encore des produits de dégradation [12V, 15V, 16V], ainsi que la spécificité, associée à 100 % de la sélectivité seront également assurées [3V, 15V, 16V].

2. Précision

La précision d'une méthode correspond à l'étroitesse de l'accord entre les valeurs obtenues selon plusieurs mesures répétées dans des conditions d'expériences établies. Elle est ainsi assimilée à l'erreur aléatoire ou au degré de dispersion [JCB 877 (2099) 2224-2234]. La précision, associée à un coefficient de variation (CV) exprimé en pourcentage, peut être évaluée selon 3 critères : la répétabilité, la précision intermédiaire et la reproductibilité. La différence entre ces 3 critères correspond au nombre de facteurs qui varient entre chaque analyse [15V].

Ainsi, la répétabilité, encore appelée la précision intra jour est obtenue en analysant des répliquats d'échantillon de même concentration, préparés indépendamment un jour donné par le même manipulateur, avec le même équipement, analysés sur le même appareil de mesure, dans les mêmes conditions analytiques, et dans un même laboratoire [12V].

La précision intermédiaire, encore appelée précision inter-jour, est obtenue en injectant des répliquats d'échantillon de même concentration préparés dans des conditions d'expérience différentes de celles qui ont permis d'évaluer la précision intra-jour [12V]. Il en résulte alors qu'au moins une des conditions d'extraction et/ou d'analyse s'en trouvent modifiées. Ainsi, le jour de l'analyse, le manipulateur, le stock de solution standard, le lot de solvant, l'appareil de mesure, le matériel d'extraction peuvent être différents.

Et enfin, la reproductibilité de la méthode peut être déterminée si plusieurs laboratoires participent à l'étude et s'ils peuvent mettre en place la méthode. La reproductibilité correspond alors à l'étroitesse de l'accord entre les valeurs obtenues dans les différents laboratoires participant à l'étude [12V]. Ce niveau de précision ne sera pas déterminé dans le cadre de ces travaux.

3. Justesse

La justesse est associée à l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur réelle conventionnelle ou comme une valeur de référence acceptée et la valeur mesurée expérimentalement qui correspond à la valeur moyenne obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois [12V, 16V]. La justesse peut être exprimée comme un recouvrement (Cf.4.5) ou comme la différence entre la valeur de concentration déterminée via l'équation de la droite de régression et la valeur de concentration vraie (théorique) en pourcentage. La justesse caractérise alors l'erreur systématique d'une mesure expérimentale par rapport à la valeur vraie.

Selon la directive ICH, la justesse de la méthode doit être évaluée en utilisant au minimum 3 niveaux de concentration, et pour chaque niveau de concentration, 3 mesures de la variable dépendante doivent être effectuées [3V, 14V, 15V]. Au final, un minimum de 9 mesures (= 3 niveaux de concentrations X 3 répliques d'extraction) est requis pour évaluer la justesse.

4. Robustesse

La robustesse est associée à la capacité de la méthode analytique à ne pas être affectée par des variations minimales pouvant provenir de la variabilité de certains paramètres expérimentaux tels que le pH de la phase mobile ou encore la qualité du lot de solvant utilisé [16V]. La robustesse fournit en fait une indication de la fiabilité de la méthode analytique durant une utilisation normale sur le long terme [12V].

5. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est associé au rapport entre la concentration quantifiée à l'aide d'une calibration et la concentration théorique de dopage. La décision de la commission européenne spécifie que les rendements doivent être déterminés à l'aide d'une matrice dite blanche, c'est-à-dire exempte de composés d'intérêt. Or, dans la pratique, il est difficile d'obtenir une matrice blanche non contaminée en composés d'intérêt ; les matrices d'études contiennent souvent les molécules à des concentrations plus ou moins fortes. Dans ce sens, une matrice de référence doit alors être employée pour procéder à l'étape de la validation et à l'analyse des échantillons réels. Cette matrice de référence correspond alors à une matrice dont les concentrations en composés d'intérêt auront été déterminées au préalable, notamment par la méthode des ajouts dosés.

Le rendement d'extraction est calculé en comparant des répliques d'échantillons de matrice dopés avant la procédure d'extraction à des répliques d'échantillons dits blancs, c'est-à-dire non dopés en

composés d'intérêt initialement, extraits selon la même procédure d'extraction que les échantillons dopés avant extraction, puis dopés à la concentration visée après extraction et juste avant l'étape d'évaporation à sec. Le rendement d'extraction se calcule alors en faisant le rapport des aires des échantillons dopés avant extraction sur celles des échantillons dopés après extraction. Les rendements d'extractions, exprimés en pourcentage, sont alors validés s'ils sont compris entre 70 et 120 %. Si ce n'est pas le cas, les rendements d'extractions sont validés si la précision intra-jour associé au niveau considéré est inférieure à 20 % [13V]. Il est préférable d'estimer les rendements d'extraction sur plusieurs niveaux de concentration.

6. Effets de matrice

Quel que soit le domaine analytique, toute technique d'analyse peut être sujette à des effets de matrice. [12EA]. Lors de l'utilisation d'un couplage LC-ESI-MS, l'évaluation de tels effets est indispensable en raison de la concentration-dépendance des sources électrospray. Les effets matrices se manifestent soit par une diminution, soit par une augmentation du signal analytique des composés dans la matrice par rapport aux composés dans le solvant: il s'agit respectivement, d'effets matrice inhibiteurs et stimulateurs. L'effet de matrice résulte en fait de l'extraction de composés de la matrice et/ou de la coélution de composants de la matrice avec des composés d'intérêt [8V, 9V]. Par conséquent, la matrice influe positivement ou négativement sur l'ionisation de chaque molécule. Les effets matrices peuvent être réduits en procédant à une étape d'extraction efficace et sélective, à une étape de purification supplémentaire [3EA], à une étape de dilution et/ou peuvent être corrigés par l'utilisation de standard interne [2EA, 13EA, 12EA].

Evaluer l'effet matrice permet de garantir l'exactitude, la sélectivité, et la fiabilité d'une méthode d'analyse. La détermination des effets matrices est essentielle, nécessaire et recommandée afin de valider une méthode [1EA, 15EA]. Plusieurs approches peuvent être employées pour évaluer les effets matrices [16EA], mais les deux stratégies les plus utilisées correspondent à celle proposée par Matuszewski [1EA], et celle conseillée par Vieno et al. [17EA]. Quelle que soit la stratégie choisie, l'effet matrice (EM) se calcule en comparant les réponses des échantillons dopés après extraction ($A_{\text{Echantillon dopés après extraction}}$) à celles obtenues dans le solvant à la même concentration ($A_{\text{Standard dopé}}$) selon l'équation suivante :

$$EM (\%) = \left(\frac{A_{\text{Echantillon dopé après extraction}}}{A_{\text{Standard dopé}}} - 1 \right) \times 100$$

Équation 7 : Evaluation des effets de matrice (EM)

Cependant, dans l'approche proposée par Vieno et al., une autre donnée intervient dans l'équation de détermination de l'effet matrice. En effet, lorsque les composés d'intérêts sont déjà présents dans la matrice d'étude, il est important de considérer un échantillon blanc (A_{Blanc}), c'est-à-dire un échantillon extrait mais non dopé. Les effets matrice sont alors calculés selon l'équation suivante :

$$EM (\%) = \left(\frac{A_{\text{Echantillon dopé après extraction}} - A_{\text{Blanc}}}{A_{\text{Standard dopé}}} - 1 \right) \times 100$$

Équation 8: Evaluation des effets de matrice dans le cas d'une matrice non-blanche

7. Limites de détection et de quantification

Quel que soit le domaine d'application (alimentaire, environnemental, pharmaceutique, médical...), les limites de détection et de quantification constituent deux critères d'analyse fondamentaux qui doivent être validés. Ils démontrent les performances, la puissance et les limites de la méthode mise au point.

La limite de détection (LOD) est définie comme étant la plus faible concentration du composé d'intérêt pouvant être détectée mais non quantifiée comme une valeur exacte [12V, 3V], et la limite de quantification (LOQ) est associée à la plus petite concentration en molécules cibles pouvant être détectée et quantifiée [12V, 16V].

Une définition rigoureuse, fondée sur des critères statistiques, est attribuée à chacun des termes. En effet, une incertitude de mesure est associée à chaque critère [10V]. Ainsi, les LOD et LOQ sont données pour un niveau de confiance égal à 95 % et 99 %, respectivement [3V, 4V, 11V]. Dans le domaine de l'analyse chimique et dans la pratique, plusieurs approches existent pour évaluer ces deux valeurs [1V]. C'est pourquoi Jérôme Vial et Alain Jardy caractérisent la détermination des LOD et des LOQ comme un point ambiguë [1V]. Ainsi, les LOD et LOQ peuvent être déterminées de quatre manières différentes [5V, 12V].

La première approche consiste à évaluer visuellement à partir de quel niveau de concentration l'opérateur pense pouvoir confirmer la présence ou certifier la concentration [12V]. Cette manière de déterminer les valeurs de LOD et LOQ est donc très subjective puisqu'elle dépend de l'opérateur.

La seconde approche est basée sur la dispersion des paramètres de régression linéaire obtenus lors de la calibration [1V, 12V]. Ainsi, si la relation de réponse est de type linéaire ($y = ax + b$), alors la LOD et la LOQ sont obtenues selon les équations suivantes :

$$LOD = \frac{3\sigma_b}{a} \quad \text{et} \quad LOQ = \frac{10\sigma_b}{a}$$

Équation 9: Détermination de la LOD et de la LOQ basée sur la dispersion des paramètres de régression linéaire

Où σ_b est l'écart type de l'ordonnée à l'origine et a la pente de la droite de calibration

La troisième approche, qui est aussi la plus courante, est basée sur l'évaluation de la dispersion de l'amplitude du bruit de fond moyen au temps de rétention du composé, et sur le signal détecté dans un échantillon faiblement concentré. En outre, comme indiqué par Stöckl et al. [4V], la détermination des LOD et LOQ d'une méthode est basée sur « k » fois l'écart type du bruit (σ_{Bruit}) [3V]. Les valeurs de 3 et 10 sont généralement attribuées à « k » pour la LOD et la LOQ, respectivement [3V, 4V]. Cela conduit à alors définir un rapport Signal sur Bruit au temps de rétention du composé. Ainsi, la LOD et la LOQ seront obtenues selon les équations suivantes :

$$LOD = 3\sigma_{\text{Bruit}} \quad \text{et} \quad LOQ = 10\sigma_{\text{Bruit}}$$

Équation 10: Evaluation de la LOD et de la LOQ basé sur l'évaluation de la dispersion de l'amplitude du bruit

La quatrième approche permettant de déterminer les LOD et LOQ dérive de la troisième approche, et est basée sur la détermination du blanc de méthode [12V]. Cette approche est notamment mise en place lorsque la matrice de départ contient les composés d'intérêts. Ainsi, la LOD et la LOQ seront obtenues selon les équations suivantes :

$$A_{Standard \text{ à la LOD}} = A_{Blanc} + 3\sigma_{Blanc} \text{ et } A_{Standard \text{ à la LOQ}} = A_{Blanc} + 10\sigma_{Blanc}$$

Équation 11: Evaluation de la LOD et de la LOQ dans le cas d'une matrice non-blanche

Où σ_{blanc} est l'écart type du blanc et A_{Blanc} est la moyenne de l'aire du signal du blanc, $A_{Standard \text{ à la LOD}}$ est l'aire du standard à la LOD et $A_{Standard \text{ à la LOQ}}$ est l'aire du standard à la LOQ

Pour finir, il a déjà été démontré que les valeurs numériques obtenues pour les LOD et LOQ selon les différentes manières de les déterminer sont très disparates : il convient donc de choisir la manière de les définir au cas par cas [1V].

8. Evaluation du modèle de régression

Dans la plupart des travaux, l'étude de la relation de réponse liant la réponse analytique (Aire) à la concentration d'un composé dans un échantillon se limite à l'étude du coefficient de détermination R^2 [4V]. Or, le coefficient de détermination R^2 dépend de la gamme de concentration choisie : sa valeur est donc faussée par les valeurs des hautes concentrations [4V]. Ce critère à lui seul ne permet pas de valider un modèle de régression, il permet seulement d'évaluer visuellement si le modèle de régression choisi permet de décrire de manière optimale les données obtenues. Afin de valider le modèle de régression présélectionné grâce à l'évaluation visuelle (valeur du R^2), il est recommandé de procéder à une analyse statistique des données [15V].

La gamme dynamique de concentration correspond à l'intervalle entre la plus petite et la plus haute des concentrations d'un composé d'intérêt dans un échantillon pour lequel il a été démontré que la méthode d'analyse présente un niveau approprié de précision, de justesse, et sur lequel la relation de réponse liant la réponse analytique de la méthode à la concentration a été vérifiée et validée [12V]. Cette gamme dynamique doit être convenablement choisie avant de procéder à l'étape de validation. La gamme dynamique doit en fait être construite de manière à être cohérente avec l'application visée.

Certaines directives demandent à ce que la relation de réponse soit étudiée entre 50 et 150 % de la concentration cible, alors que d'autres exigent qu'elle soit étudiée entre 70 et 130 %, voire entre 80 et 120 % selon le composé analysé [12V]. Mais, ces directives ne peuvent s'appliquer que dans le cas où peu de composés sont analysés simultanément, et lorsque les concentrations dans les échantillons réels sont approximativement connues. La stratégie de ces directives ne peut donc pas être appliquée à des méthodes d'analyse multi-résidus car les gammes de concentrations ciblées des composés d'intérêt sont très différentes, leurs sensibilités sont très disparates et leurs occurrences

dans les matrices d'études sont inconnues. Mais, quelle que soit la directive suivie pour valider une méthode, elles s'entendent toutes sur le fait qu'un nombre minimum de 5 niveaux de concentration est requis pour évaluer la relation de réponse [12V,14V, 4V].

De plus, il est conseillé d'évaluer la relation de réponse sur trois jours et d'effectuer par conséquent trois séries indépendantes de ces 5 niveaux de concentrations et ce, à raison d'une série par jour [14V]. Pour finir, il est suggéré de préparer chaque niveau de concentration en duplicats voire plus afin d'obtenir une courbe de calibration optimale.

La fonction de réponse choisie est validée si une approche statistique, et plus précisément de type Fisher, est effectuée et validée. Cette approche consiste à calculer la valeur de Fisher de régression associée aux données de calibration notée $F_{\text{expérimental}}$, et à la comparer à une valeur de Fisher tabulée notée $F_{\text{tabulé}}$ [Démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique]. La relation de réponse est alors validée si $F_{\text{expérimental}}$ est inférieure à $F_{\text{tabulée}}$, et donc si le ratio du test de Fisher qui est égal à $F_{\text{expérimental}}$ divisée par $F_{\text{tabulé}}$ est inférieur à 1.

La valeur de $F_{\text{expérimental}}$ est obtenue en divisant la variance relative à l'erreur due au modèle de régression choisi notée σ_{tof}^2 par la variance relative à l'erreur analytique ou encore l'erreur expérimentale notée σ_{ε}^2 :

$$F_{\text{expérimental}} = \frac{\sigma_{\text{tof}}^2}{\sigma_{\varepsilon}^2}$$

Équation 12: Calcul de la valeur de Fisher de régression associée aux données de calibration ($F_{\text{expérimental}}$)

Chacune de ces variances se calcule en divisant la somme des carrés des écarts notée SS, par les degrés de libertés associés notés ddl :

$$\sigma_i^2 = \frac{SS_i}{ddl_i}$$

Équation 13: Calcul de la variance relative à l'erreur analytique ou à l'erreur due au modèle de régression dans le cas du test de Fisher

Les valeurs des sommes des carrés des écarts associées à l'erreur due au modèle de régression et à l'erreur analytique sont calculées à partir de l'équation suivante :

$$SS_{\text{tof}} = \sum_{i=1}^n (\bar{y}_i - \widehat{y}_i)^2 \quad \text{et} \quad SS_{\varepsilon} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^p (y_{i,j} - \bar{y}_i)$$

Équation 14: Calcul des sommes des carrés des écarts associées à l'erreur due au modèle de régression (SS_{tof}) et à l'erreur analytique (SS_{ε})

Où n est le nombre de niveaux de concentration de la droite de calibration ; p le nombre d'échantillons indépendants de chaque niveau i ; $y_{i,j}$ est associée à la réponse du niveau de concentration i, et du réplicat j sachant que $i \in [1,n]$ et $j \in [1,p]$, \bar{y}_i est la valeur moyenne de la

réponse obtenue pour les p réplicats du niveau i ; et enfin \hat{y}_i est la valeur de régression donnée par l'équation de régression de type linéaire ou quadratique pour le niveau de concentration i .

Les degrés de libertés (ddl), associés à chacune des deux variances selon que le modèle de régression soit linéaire ou quadratique, sont fournis dans la Table 36, dans lequel n est le nombre de niveaux de concentration de la droite de calibration et p le nombre d'échantillons indépendants de chaque niveau.

	Modèle de régression	
	Linéaire	Quadratique
σ^2_{lof}	ddl _{lof} = $n - 2$	ddl _{lof} = $n - 3$
σ^2_{ε}	ddl _{ε} = $n(p - 1)$	ddl _{ε} = $n(p - 1)$

Table 36: Détermination des degrés de libertés des variances permettant de calculer le Fisher expérimental selon un modèle de régression linéaire ou quadratique

La valeur de $F_{\text{tabulé}}$ à laquelle est comparée $F_{\text{expérimental}}$ est obtenue dans les tables de Fisher avec une incertitude de 5 %, et pour des degrés de liberté égaux à ceux indiqués dans la Table 36, à savoir $n-2$ (linéaire) ou $n-3$ (quadratique), et $n*(p-1)$. Cette valeur, notée comme telle $F_{\text{tabulé}}(0,05 ; n-2 \text{ ou } n-3 ; n*(p-1))$, peut être calculée avec la fonction « INVERSE.LOI.F » dans Excel. Finalement, les deux valeurs de Fisher nécessaires à la détermination du ratio de Fisher sont obtenues soit par calcul, soit par des tables théoriques : elles permettent alors d'évaluer si le modèle de régression sélectionné est validé.

Partie F : Analyses non-ciblées et approches métabolomiques

L'analyse compréhensive (non-ciblée) de matrices complexes est aujourd'hui reconnue comme une stratégie indispensable dans de nombreux aspects des sciences de la vie, et plus particulièrement dans la recherche environnementale. Obtenir des informations précises sur la composition chimique d'extraits naturels complexes, qui sont principalement obtenues à partir de plantes, de microorganismes ou bien d'échantillons tissulaires est une tâche qui s'avère difficile et qui nécessite des méthodes d'analyses à haut débit. A cet égard, la mise en œuvre de techniques chromatographiques couplées à des systèmes de détection résolutifs et sensibles, mais également l'amélioration des techniques d'extraction et de traitement de données ont permis de faire des progrès significatifs, au cours de la dernière décennie. La combinaison de tels outils joue un rôle majeur dans la compréhension du devenir des polluants dans les systèmes aquatiques, et permet de mettre en évidence les impacts d'une telle pollution sur les organismes vivants.

1. Définition

La métabolomique est définie comme une approche non sélective permettant l'identification et la quantification non exhaustive de l'ensemble des métabolites d'un système biologique complexe (Fiehn, 2001). Le terme « métabolite » se réfère à des composés de faible poids moléculaire (<1000 Da) qui sont soit essentiels au maintien de la vie d'un organisme, on parle alors de métabolites

primaires, soit non-essentiels mais nécessaires pour la survie dans un environnement donné, on parle alors de métabolites secondaires. Les métabolites primaires comprennent des acides aminés, des lipides et des glucides, ceux sont généralement des molécules endogènes. Les métabolites secondaires sont liés à des mécanismes de défense et de signalisation. Ils comprennent des polyphénols, des alcaloïdes, des terpènes ou encore des hormones. Parmi les métabolites secondaires, on peut également citer les métabolites de xénobiotiques qui sont des composés exogènes.

Le profilage des différents constituants d'un mélange complexe peut être réalisé à différents niveaux tels que l'obtention d'empreintes métaboliques, le profilage métabolique ou le screening de métabolites. Il existe cependant une différence entre ces trois approches qui se situe notamment au niveau des objectifs.

L'empreinte métabolique permet une classification rapide des échantillons. Cette stratégie à haut débit ne permet pas d'identifier et de quantifier un grand nombre de métabolites. Des analyses statistiques multivariées sont généralement employées pour déterminer les différences et classer les échantillons. Le but de ce procédé n'est pas d'identifier chaque métabolite en particulier, mais de comparer des motifs ou des « empreintes » de métabolites qui peuvent être variables dans un système biologique donné. Cette stratégie est généralement utilisée comme une approche génératrice d'hypothèses.

Le profilage métabolique se concentre, quant à lui, sur l'analyse d'un grand groupe de métabolites qui ne sont pas nécessairement liés à une voie métabolique spécifique mais qui appartiennent à une même classe de composés. Dans la plupart des cas, le profilage métabolique suit des hypothèses spécifiques et présente donc un caractère plus ciblé que la stratégie précédemment définie. Par conséquent, cette approche requiert des méthodes d'analyse plus spécifiques, développées pour la détermination des analytes appartenant au groupe étudié. Le profilage métabolique est l'approche la plus ancienne et la mieux établie, elle est considérée comme le précurseur de la métabolomique.

Le screening de métabolites correspond à l'analyse de métabolites qui sont liés à une voie métabolique particulière. Le but de cette stratégie est d'observer les modifications métaboliques spécifiques qui peuvent être liés à une hypothèse particulière.

2. Le workflow métabolomique

La métabolomique vise à obtenir de nouvelles connaissances sur les processus et les voies biochimiques. Ces connaissances peuvent ensuite être reliées à des niveaux inférieurs (ADN, ARN, protéines) ou à des niveaux d'organisation plus élevé (physiologie, phénotype...). La métabolomique vise donc à répondre à des problématiques diverses et variées, qu'il est indispensable de formuler au départ d'une étude, afin de choisir au mieux la stratégie à appliquer. Les réponses aux questions seront ainsi le résultat d'une succession d'actions distinctes caractérisées par le « workflow métabolomique » (Figure 28). La problématique, la conception du design expérimental, la collecte et

l'analyse de données, ainsi que l'interprétation biologique des résultats sont les facteurs clés de ce workflow.

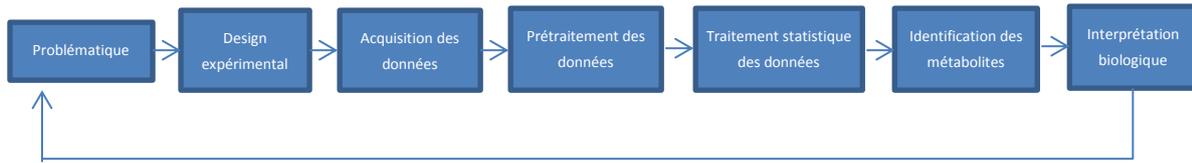


Figure 28: Schéma du workflow métabolomique

2.1. La problématique et la conception du design expérimental

Lors d'études métabolomiques, les principales problématiques de recherche se résument à l'estimation des effets de différents traitements suivant une ou plusieurs interventions expérimentales, ou bien à l'estimation des différences existant entre des groupes ayant fait l'objet d'études observationnelles. La variation des profils métaboliques est provoquée d'une part par les effets de l'intervention ou par les différences induites par les conditions de l'étude observationnelle, et d'autre part par les facteurs de bruit et de biais. La conception d'un design expérimental adapté permet de réduire l'influence des facteurs confondants : le but étant d'extraire un maximum d'informations à partir d'une étude pertinente, en tenant compte de l'influence des facteurs de variabilité. Quelques questions pertinentes doivent nécessairement être formulées lors de la conception d'un design expérimental métabolomique :

- Combien de fois et quand dois-je échantillonner ?
- Combien de sujets (ou objets) ai-je besoin pour cela ?
- Combien de réplicats doivent être inclus pour chacune de ces situations ?

Pour le cas univarié (par exemple une seule caractéristique) et sous hypothèse d'un modèle linéaire classique, des théories statistiques sur la conception expérimentale optimale et sur la détermination de la taille de l'échantillon sont disponibles. Toutefois, pour les études métabolomiques, nous sommes confrontés à des complexités qui rendent la théorie standard pour la conception expérimentale et la détermination de la taille de l'échantillon inappropriée :

- L'effet d'intérêt est souvent exprimé dans une fonction inconnue d'un ensemble multivarié, au sein duquel il existe des corrélations.
- Il existe des complexités spatio-temporelles (multiples compartiments, décalage entre les caractéristiques observées)
- Il existe des différences inter-sujets qui peuvent être importantes mais qui peuvent également être sources d'intérêt (par exemple dans le contexte d'une étude de traitement personnalisé)

La détermination de la taille de l'échantillothèque (nombre d'échantillon) est basé sur le concept d'analyse de puissance. La puissance est la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle d'absence de

différences étant donnée l'ampleur d'une différence de traitements due à la variation instrumentale et biologique. Les derniers types de variations concernent le bruit, elles peuvent être réduites en utilisant un échantillon de grande taille ou un plan d'étude dédié (par exemple un « cross over design »), ce qui permettra d'augmenter la puissance.

Lorsque la taille de l'échantillon est insuffisante, il est nécessaire d'apporter une attention toute particulière à l'interprétation des données afin de limiter les conclusions qui s'avèreraient être trop hâtive.

2.2. L'acquisition des données métabolomiques

L'acquisition des données métabolomiques ne se résume pas simplement à la mesure analytique, elle comprend également le conditionnement et le prétraitement des échantillons. Pour faciliter l'interprétation des résultats, l'acquisition des données doit minimiser au maximum les variations induites par la manipulation de l'échantillon ou par la mesure analytique. Lors d'échantillonnages physiques, qui impliquent le prélèvement, la manipulation et le stockage des échantillons, l'opérateur se doit de prendre en considération les potentielles sources de variation induites par de telles opérations. Par exemple, il est nécessaire de limiter les cycles de congélation-décongélation. Une attention toute particulière doit être portée sur la reproductibilité des étapes de manipulation d'échantillons au regard des différents échantillons qui seront analysés ensemble.

De la même manière, la variabilité introduite par le procédé analytique de mesure ainsi que ces sources doivent être identifiées et maîtrisées, dans la mesure du possible. La littérature mentionne un nombre limité de stratégies permettant de contrôler et de corriger les variabilités de mesure liées à l'analyse. Van Der Kloet et al décrivent une stratégie basée sur la mise en place de contrôles qualité (QC) visant à réduire la taille des erreurs analytiques. Cette approche est basée sur l'utilisation d'un pool d'échantillon en combinaison avec un design de mesure optimal (plusieurs QC par séquence d'acquisition).

Elaborer des stratégies de mesure fiables apparaît donc comme un des grands défis du workflow métabolomique. Une bonne conception de la mesure est un aspect important, non seulement au niveau du contrôle et de la correction des variabilités analytiques, mais également au niveau des questions biologiques qui doivent être résolues de la manière la plus efficace possible, tout en tenant compte des restrictions de mesure (taille maximale du lot, nombre de répétition de mesures, nombre de QC...). Une bonne conception de mesure réduit l'influence de la variabilité instrumentale et biologique, ce qui augmente la pertinence et la fiabilité de l'analyse.

Dans le domaine de l'environnement, la taille du métabolome (intégralité des métabolites primaires et secondaires d'un organisme donné) est très difficile à estimer car elle est fortement tributaire de l'organisme spécifique à l'étude. Certains rapports ont estimé que 15 000 composés distincts pouvaient être présents au sein d'une espèce végétale donnée (D'auria, 2005 ; Dixon, 2001). Cette diversité chimique met en évidence la grande variabilité des propriétés physico-chimiques des composés intrinsèques à l'organisme étudié, ce qui rend leur séparation, leur détection et leur

identification simultanée extrêmement difficile. Par conséquent, une seule technique d'analyse ne suffit pas pour une analyse complète d'un métabolome complexe, l'utilisation de plusieurs technologies s'avère indispensable.

3. Plateformes analytiques et stratégies d'identification de métabolites

La métabolomique requière des systèmes de détection sensibles et résolutifs, permettant d'identifier les métabolites sur la base de leur masse exacte ou de leur structure chimique. Ainsi, la spectrométrie de masse simple ou en tandem, couplée ou non à des techniques séparatives, ainsi que la résonance magnétique nucléaire (RMN) sont les techniques les plus couramment employées.

La RMN est une technique simple et reproductible qui ne nécessite pas de préparation d'échantillon particulière. Dans le cas de l'acquisition en RMN du proton, cette approche présente une capacité haut débit et les spectres peuvent être acquis en quelques dizaines de scans, cela est toutefois dépendant de la sensibilité de l'instrument utilisé et de la quantité d'échantillon disponible. La combinaison des déplacements chimiques, du couplage spin-spin et de l'intensité des pics fournit des informations structurelles importantes permettant l'identification des composés d'intérêt (Pauli, 2014). Les analyses RMN peuvent également fournir des informations quantitatives puisque l'intensité du signal du proton est proportionnelle à la concentration molaire des métabolites (Wishart, 2008 ; Bohni, 2013). Grâce à des expériences de RMN 2D, des informations complémentaires concernant les connectivités atomiques des métabolites dans un mélange complexe peuvent également être obtenues (Al-Massarani 2012). Les déplacements chimiques étant hautement reproductibles, la comparaison des déplacements chimiques de RMN H1 avec ceux rapportés dans les bases de données permet d'identifier les métabolites sans ambiguïté, à condition que les protocoles standards de préparation d'échantillons soient utilisés. Bien que cette technique soit largement utilisée pour le profilage des fluides biologiques, des protocoles standards sont également utilisés pour le profilage de matrices environnementales, ce qui a conduit à de nombreuses applications. La RMN apparaît donc comme un outil très utile pour l'élucidation de la structure des métabolites qui ne peuvent être dérépliqués par les méthodes de profilage en spectrométrie de masse. Il existe cependant des travaux mentionnant le couplage de la chromatographie liquide avec la RMN qui permettent de décomplexifier les spectres et de faciliter l'interprétation (Bohni, 2014).

Les extraits obtenus à partir de matrices environnementales ou biologiques peuvent avoir des compositions complexes. La séparation chromatographique des métabolites, sur la base de leurs différences de propriétés physico-chimiques semble donc nécessaire afin d'améliorer leur détection. La chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été reconnue depuis le début des années 80 comme la technique la plus polyvalente pour la séparation de mélange complexe. Le développement de phases stationnaires variées permet aujourd'hui de réaliser la séparation de presque tous les types de métabolites. Cependant, ces séparations sont généralement effectuées en utilisant des colonnes en phase inverse (C18) avec des gradients eau/acétonitrile ou eau/méthanol.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

Pour améliorer l'efficacité de séparation, divers modificateurs ou tampons peuvent être ajoutés à la phase mobile. Ils permettent d'améliorer la sélectivité de séparation ou la sensibilité de détection.

Lors d'études métabolomiques, il est nécessaire d'obtenir une résolution chromatographique élevée afin de déconvoluer un métabolite de la matrice complexe à laquelle il est associé. La réduction de la taille des particules du support chromatographique permet d'améliorer l'efficacité de séparation et de réduire le temps d'analyse (Knox, 1977). Cependant, les contre-pressions générées par ce type de colonne sont importantes et nécessitent une instrumentation dédiée qui résiste à des pressions supérieures à 400 bars. Avec l'introduction des systèmes ultra haute performance, l'utilisation de colonnes chromatographiques possédant des particules de très petite taille (<2 μ m) est aujourd'hui très largement employée en métabolomique.

En plus des techniques de chromatographie liquide, d'autres procédés de séparation peuvent être utilisés en métabolomique. La chromatographie en phase gazeuse joue un rôle important à la fois pour l'analyse des métabolites volatils mais également pour l'analyse des métabolites primaires (Wiklund, 2008). Les métabolites primaires étant généralement peu volatils, il est nécessaire d'ajouter une étape de dérivation qui permettra leur analyse par GC. Dans une certaine mesure, l'électrophorèse capillaire (CE) peut également être utilisée, en particulier pour les métabolites chargés (Bonvin, 2012).

Grâce à sa haute sensibilité, la détection MS est couramment utilisée pour le profilage d'échantillon complexe. Des spectromètres de masse à faible résolution ont été initialement utilisés pour l'identification de métabolites. Le succès est en grande partie basé sur l'existence de bases de données locales. Historiquement, ces premières bases de données ont été développées pour des systèmes d'ionisation à impact électronique (EI) car ces techniques permettent d'obtenir des modèles spectraux reproductibles d'un spectromètre à un autre. Plus récemment, l'utilisation d'instrument haute et ultra haute résolution a considérablement amélioré les procédures d'élucidation, permettant l'utilisation de base de données génériques grâce à des recherches basées sur la formule moléculaire (ou formule brute).

Dans la plupart des applications LC-HRMS, les métabolites sont ionisés en utilisant une technique d'ionisation douce, l'ESI. En comparaison avec l'EI, l'ESI a l'avantage de produire majoritairement des ions moléculaires qui apparaissent sous la forme d'adduits simples ou multiples. Une fois que l'ion moléculaire est soigneusement sélectionné, la formule moléculaire (FM) peut être déterminée sur la base de la précision de la masse et de la correspondance du profil isotopique. Toutefois, la détermination de la FM définitive reste une tâche difficile même si la précision sur la masse est inférieure à 1 ppm. Ceci est particulièrement vrai pour les composés ayant une masse molaire importante (>500Da). Pour réduire le nombre de FM possibles, différents filtres heuristiques peuvent être appliqués (restriction sur le nombre et la nature des éléments, ratio hydrogène carbone, règle de l'azote...). Sur la base des FMs putatives, l'identification des métabolites peut être réalisée en utilisant diverses bases de données. Cependant, cette stratégie conduit généralement à de multiples identités supposées pour chaque composé détecté.

Pour améliorer l'annotation, des informations supplémentaires sont nécessaires. L'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution en tandem (HR-MS/MS) peut contribuer à identifier de manière plus les métabolites.

Le motif de fragmentation obtenu par HR-MS/MS présente des avantages importants par rapport aux mesures de la masse nominale. Il peut être utilisé pour réduire le nombre de FM sur la base de l'identité des fragments. Ce processus est efficace pour l'attribution sans ambiguïté de la FM, même s'il est généralement insuffisant pour l'identification de tous les composés présents dans un extrait. Ainsi, la principale stratégie pour l'identification automatique basée sur l'acquisition de spectres MSⁿ consiste à comparer les spectres de fragmentation de certains pics chromatographiques à ceux présents dans une base de données. Cependant, cette approche est spécifique à l'instrument utilisé, il est donc préférable que la base de données soit construite par l'utilisateur lui-même, en fonction de son propre ensemble de standards disponibles. Cette approche améliore la confiance de l'identification, mais souffre du manque de reproductibilité des spectres de fragmentation acquis sur différentes plateformes MS. En outre, les bases de données ne contiennent pas une liste exhaustive des métabolites secondaires. Pour surmonter ce problème, les approches fondées sur la simulation des différents spectres de fragmentation ont été appliquées avec succès, on parle alors d'approches *in silico*. La simulation contribue à la discrimination entre plusieurs structures potentielles. Avec certains types de composés, tels que les lipides, il est possible de simuler de grandes bibliothèques de spectres de fragmentation qui peuvent être utilisées en tant que base de données. L'émergence des spectromètres de masse hybrides (Linear-Ion-Trap-Orbitrap, Q-ToF, Q-Exactive) a favorisé le développement de stratégies d'acquisition automatique de données dans le mode MS/MS, permettant de maximiser les capacités de débit et d'augmenter l'information obtenue à partir d'une seule analyse. Parmi les nombreuses approches, la DDA (acquisition de données dépendantes) et la DIA (acquisition de données indépendantes) sont les plus utilisées. Lors d'une approche par DDA, les spectres MS/MS sont acquis en fonction des critères choisis (seuil d'intensité, charge des composés détectés, liste dynamique d'exclusion...). Cette approche est généralement basée sur une analyse en full scan, afin de s'assurer que le processus ne soit pas discriminant. Elle permet notamment la sélection systématique de l'ion le plus intense du spectre MS simple, la fragmentation de celui-ci et l'acquisition des spectres MS/MS. La même approche peut alors être étendue aux deuxième et troisième ions les plus abondants. Bien que bénéfique, cette approche est limitée par la fréquence d'acquisition du spectromètre utilisé. En effet, seulement plusieurs centaines d'espèces moléculaires contenues dans une analyse complète peuvent être fragmentées, compromettant ainsi l'acquisition MS/MS des analytes les moins abondants. Contrairement à la DDA, la DIA n'est pas biaisée par la détection des ions les plus abondants de l'analyse par full scan car il n'y a pas d'étape de sélection préalable avant la fragmentation, ce qui se traduit par l'acquisition MS/MS de tous les ions présents, à tout moment de la séparation chromatographique. A ce jour, ces stratégies d'acquisition ont été principalement appliquées à la protéomique. Toutefois, leurs nombreux avantages pourraient être bénéfiques aux problématiques environnementales.

Toutes ces approches entraînent une réduction importante du nombre d'annotations possibles pour un métabolite donné. Toutefois, l'identification complète et sans ambiguïté d'un composé, en utilisant des méthodes MS génériques et sans avoir accès à une base de données MS/MS dédiée à l'appareillage, reste inaccessible à l'heure actuelle. Ainsi, les données complètes nécessaires pour l'annotation restent en débat. Dans un effort d'harmonisation, la communauté scientifique a mis en place un consensus général stipulant les critères d'identification d'un composé : « Les auteurs doivent clairement différencier et communiquer le niveau d'identification de rigueur pour tous les métabolites signalés en se basant sur un système à 4 niveaux allant du niveau 1 (composé identifié), aux niveaux 2 et 3 (composés annoté (appartenance à une classe de composés, par exemple)) et au niveau 4 (métabolites non identifiés ou non classés qui peuvent néanmoins être différenciés sur la base de données spectrales). L'utilisation systématique de ces niveaux d'identification est essentielle de manière à ne pas alter la qualité des données publiées.

4. Stratégie d'analyse de données métabolomiques de type LC-MS

Les données métabolomiques acquises sur une plateforme de type MS (infusion directe) sont caractérisées par la valeur du ratio masse sur charge (m/z), correspondant à la masse mono isotopique de l'ion détecté, et par l'intensité du signal mesuré (I). Contrairement aux données de type MS, l'acquisition des données LC-MS s'effectuent sur deux dimensions : la dimension massique (m/z) et la dimension temporelle, correspondant au temps de rétention de l'analyte sur la colonne chromatographique (t_r). Elles sont donc caractérisées par 3 paramètres : m/z , t_r et I .

La mise en place d'une stratégie métabolomique par LC-MS engendre une quantité de données importante. Les outils statistiques et mathématiques apparaissent donc indispensables à l'interprétation de ces données.

L'analyse de données métabolomiques comporte 2 grandes étapes : le prétraitement des données brutes et le traitement mathématique et/ou statistique de données.

4.1. Le prétraitement des données métabolomiques

L'analyse d'un échantillon sur une plateforme de type LC-MS conduit à un fichier contenant les valeurs m/z détectées, les temps de rétention et les intensités associées. L'étape de prétraitement des données a pour objectif d'organiser les données brutes présentes sur le fichier d'acquisition, notamment grâce à la création d'une « matrice de données », qui permettra de réaliser des traitements statistiques et mathématiques. Cette première étape permet également de simplifier l'information en supprimant certains éléments de bruit. Elle engendre cependant une transformation des données brutes (calibration, filtration du bruit, regroupement des données) qui n'est pas sans incidence sur les résultats finaux (Hendriks, 2011).

L'étape de prétraitement des données brutes comporte 2 sous-étapes indispensables : la détection des caractéristiques spectrales et chromatographiques (pics) et l'alignement des pics, ainsi que 2 sous-étapes facultatives : la normalisation et le scaling.

a) La détection des caractéristiques spectrales et chromatographiques

Cette étape consiste à appliquer des algorithmes de détection des pics, de filtration du bruit spectral, de calibration, ou encore d'intégration de l'aire des pics. Elle est appliquée individuellement à chaque échantillon et permet de transformer les données fournies par le détecteur en une matrice regroupant les valeurs de m/z , t_r , et I .

b) L'alignement des pics

Cette étape permet de créer une base commune à tous les échantillons d'une même séquence d'analyses en faisant correspondre les couples $(m/z, t_r)$ détectés à l'étape précédente. Les algorithmes utilisés tiennent compte des tolérances sur la mesure de la valeur de m/z , mais également des éventuelles dérives survenues dans la dimension temporelle (dérive des temps de rétention due à l'encrassement de la colonne, aux variabilités de pH des phases mobiles...)

c) La normalisation

La normalisation permet de corriger les intensités relatives des pics en multipliant chaque ligne de la matrice de données par un facteur de correction. Elle entraîne donc des modifications au niveau quantitatif et peut changer radicalement le profil d'intensité du signal au regard des différents échantillons. La normalisation peut être liée à la nature de l'échantillon. Elle permet dans ce cas de corriger les variabilités d'ordre biologique (densité, contenu, en matière solide, dilution...), mais elle peut également être d'ordre analytique. Dans ce second cas, elle est utilisée pour pallier aux éventuelles dérives du détecteur ou pour corriger les erreurs systématiques introduites au niveau de la préparation d'échantillon.

d) Le scaling (mise à l'échelle)

Les méthodes de scaling sont utilisées afin d'uniformiser les variances de chaque couple $(m/z, t_r)$ en multipliant chaque colonne de la matrice de données par un facteur d'échelle. Le scaling entraîne une modification des intensités, mais contrairement à la normalisation, le profil d'intensité du signal reste inchangé au regard des différents échantillons. Pour chaque signal détecté, la variance (S^2) permet de caractériser la dispersion des échantillons par rapport à la moyenne. Elle peut être calculée de la manière suivante :

$$S^2 = \sum_{i=1}^n \frac{n_i \times (I_i - \bar{I})^2}{n}$$

Équation 15: Calcul de la variance associée à la dispersion des échantillons par rapport à la moyenne

Où n_i correspond au nombre de réplicats pour l'échantillon i ; n au nombre total d'échantillons ; I_i à l'intensité moyenne du signal pour l'échantillon i et \bar{I} à l'intensité du signal.

La variance est donc dépendante de l'intensité du signal. Une discrimination est alors induite entre les pics les moins intenses et les pics les plus intenses. Il existe plusieurs méthodes de scaling dont les

deux plus connues sont l'Unit Variance (UV) et le Pareto. La normalisation UV divise chaque intensité par l'écart type alors que la normalisation Pareto divise chaque intensité par la racine carrée de l'écart type.

4.2. Le traitement statistique et mathématique des données métabolomiques

a) Les différents outils statistiques et mathématiques utilisés en métabolomique

En métabolomique, les outils statistiques et mathématiques permettent de simplifier, de résumer et de mettre en évidence l'information contenue dans les spectres et les chromatogrammes. L'utilisation de tels outils s'avèrent indispensable pour décrire les données, classifier et discriminer les échantillons, mais également pour cibler les signaux discriminants qui pourront être considérés comme des biomarqueurs potentiels. L'analyse statistique et mathématique des données métabolomiques repose sur l'utilisation de la matrice de données issue du prétraitement. Elle regroupe trois types d'information : les observations, les variables dépendantes et les variables indépendantes. La notion d'observation fait référence à l'échantillon (ou à l'individu). Dans le cas d'une analyse par LC-MS, les variables indépendantes correspondent aux couples (m/z , tr), alors que les variables dépendantes correspondent à des caractéristiques connues de l'échantillon ou de l'individu (appartenance à un groupe, population...). La dimension de la matrice de données ($m \times n$) est déterminée par le nombre d'observations (m) et de variables indépendantes (n).

Les méthodes statistiques pour l'analyse de données métabolomiques peuvent être classées selon 3 critères :

- Leur caractère non-supervisé ou supervisé

Les méthodes non-supervisées sont des méthodes exploratoires et descriptives qui permettent de mettre en évidence les relations entre les variables indépendantes. En revanche, les méthodes supervisées sont utilisées pour établir des relations entre les variables dépendantes et les variables indépendantes. Elles sont souvent utilisées pour la construction de modèles dans le but de classer les échantillons.

- Leur caractère uni- ou multivarié

Les méthodes univariées consistent à étudier une seule variable sans tenir compte des autres, alors que les méthodes multivariées considèrent plusieurs variables pour tenter de mettre en évidence d'éventuelles corrélations.

- Le type de relation entre les variables

Les outils de traitement de données peuvent être linéaires ou non-linéaires en fonction de la relation entre les variables indépendantes et les variables dépendantes.

La relation entre les différents types de variables et les outils chimiométriques disponibles sont nombreuses, cependant les 3 cas les plus courants sont :

- Un seul groupe et plusieurs variables indépendantes mesurées sur chaque observation

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

Dans ce cas, il existe trois façons de traiter les données. La première concerne le test d'hypothèse sur les moyennes, les corrélations entre les variables, ou encore le calcul des variances. Chaque variable peut ainsi faire l'objet de tests statistiques. La seconde consiste à réduire la complexité des données en cherchant des combinaisons linéaires qui résument au mieux les données initiales, on peut ainsi utiliser l'analyse en composante principale (ACP). Enfin, une analyse de type factorielle peut être utilisée pour exprimer les variables originales en fonction d'un jeu de variables plus réduit tout en tenant compte des corrélations existantes entre elles. (Rencher 2012)

- Un seul groupe et deux ensembles de variables mesurées

Dans ce cas, l'Analyse Canonique des Corrélations peut être utilisée pour déterminer le nombre, le degré et la nature des relations existantes entre les deux ensembles de variables. La construction de modèles mathématiques utilisant des méthodes de régression multiple multivariée permettent également de prédire un ensemble à partir d'un autre. L'analyse canonique a pour cas particuliers la régression multiple (si l'un des deux groupes consiste en une seule variable numérique) et l'analyse discriminante (si la variable à expliquer est nominale).

- Deux ou plusieurs groupes et plusieurs variables mesurées

Il s'agit du cas le plus souvent rencontré en métabolomique et correspond aux cas présentés dans cette étude. Il fait intervenir les cas de discrimination et de classification. Les moyennes de chaque variable peuvent être comparées grâce à l'Analyse de la Variance univariée ou multivariée (ANOVA/MANOVA). L'ACP peut être utilisée pour trouver les combinaisons linéaires des variables initiales qui correspondent aux directions de variance maximale. Des combinaisons linéaires des variables originales sont également utilisées pour séparer (discriminer) au maximum les groupes (Analyse discriminante-Régression partielle des moindres carrés, PLS-DA).

Le tableau ci-dessous résume les principaux outils statistiques utilisés en métabolomique. Les méthodes utilisées lors de cette étude apparaissent en rouge et seront explicitées dans le paragraphe suivant.

Méthode	Objectifs	Linéaire/Non-linéaire	Univariée/Multivariée
Méthodes non-supervisées			
Analyse en Composantes Principales	Description de données / Analyse exploratoire	Linéaire	Multivariée
Analyse canonique de corrélation	Relations entre deux ensembles multivariés	Linéaire	Multivariée
Cartes auto-adaptives	Identification des clusters / Identification des tendances	Non-linéaire	Multivariée
Réseau de neurones	Classification	Non-linéaire	Multivariée
Méthodes supervisée			
Tests univariés paramétriques (ANOVA)	Identification de signaux discriminants	-	Univariée
Soft independent	Classification	Linéaire	Multivariée

modeling of class analogy (SIMCA)			
Analyse discriminante linéaire (LDA)	Identification de signaux discriminants / Classification	Linéaire	Multivariée
Régression (RLM, PLS, OPLS)	Identification de signaux discriminants / Classification	Linéaire	Multivariée
La machine à vecteurs de support	Classification	Linéaire ou Non-linéaire	Multivariée
Réseau de neurones	Classification	Non-linéaire	Multivariée

Table 37: Les méthodes statistiques les plus utilisées en métabolomiques (en rouge, les méthodes utilisées durant ces travaux de thèse)

b) L'analyse en composantes principales (ACP)

i. Généralité sur l'ACP

Développée en 1901 par Karl Pearson, l'ACP est la plus connue des méthodes d'analyse multivariées. Cette méthode non paramétrique est couramment utilisée pour simplifier des ensembles de données multivariés. L'ACP est une méthode linéaire et non supervisée, permettant de mettre en évidence les relations linéaires entre les variables indépendantes, sans prendre en compte les variables dépendantes. Ainsi elle fait partie des méthodes exploratoires, qui ont pour vocation de décrire les données.

ii. Principe de l'ACP

L'ACP a pour objectif de réduire la dimension de la matrice de données de manière à mettre en évidence les principaux axes de variances contenus dans les données. Cette méthode réduit la dimensionnalité de cet ensemble multivarié en transformant les m dimensions initiales correspondant à n variables en k dimensions orthogonales indépendantes. Les nouvelles dimensions ainsi obtenues correspondent à des combinaisons linéaires des variables d'origine. Ces combinaisons linéaires, appelées composantes principales, résument la variance contenue dans les données. En conséquence, la première composante correspond à la direction de plus grande variance, la deuxième composante est associée à la deuxième direction de plus grande variance, et ainsi de suite. Les observations, qui dans le cas des études métabolomiques correspondent aux échantillons, sont par la suite projetées dans l'espace décrit par les nouvelles dimensions. De par son algorithmes, l'ACP repose sur le calcul de la matrice de covariance des données initiales, elle est de ce fait très sensible aux unités de mesure variables. Par conséquent, la normalisation mathématique des données est souvent utilisée comme étape de prétraitement.

Les ensembles multivariés ont des caractéristiques différentes en fonction du domaine d'origine. A titre d'exemple, les données métabolomiques sont caractérisées par des valeurs manquantes (valeurs « zéro ») et un nombre de variables mesurées significativement plus grand que le nombre d'entités. Pour pallier à ces problèmes, il existe aujourd'hui plusieurs façons mathématiques de

procéder à une ACP dont celle utilisée dans l'algorithme NIPALS (Non Linear Iteratif Partial Least Squares) qui pourra par la suite servir à faire une modélisation avec des variables dépendantes. Ce dernier est une adaptation qui prend en compte la particularité des données métabolomiques. Selon cet algorithme, les composantes principales ne sont pas calculées simultanément, mais individuellement, de façon itérative, ce qui apporte un gain de temps considérable. D'autres méthodes (multi-linear PCA, Sparse PCA, non-linear PCA, weighted-PCA) ont été développées pour répondre à des besoins spécifiques. Ainsi, weighted PCA apporte une solution dans le cas où l'élimination des échantillons aberrants n'est pas évidente alors que la méthode sparse-PCA facilite l'interprétation des résultats en limitant le nombre de variables pouvant être utilisé pour la construction des composantes principales.

iii. *Interprétation de l'ACP*

Les résultats de l'ACP sont généralement exprimés en termes de « scores », de « loadings » et de « pourcentage de variance » pour chaque composante retenue. Les scores se présentent sous la forme de graphique 2D ou 3D et correspondent aux coordonnées des observations dans le nouveau système orthogonal (Figure 29). Les loadings font référence aux variables et correspondent à la distribution de chaque variable dans la construction de nouvelles composantes.

	Groupe	(m/z, tr) ₁	(m/z, tr) ₂	...	(m/z, tr) _p
Echantillon 1	A	l_{11}	l_{12}	...	l_{1p}
Echantillon 2	B	l_{21}	l_{22}	...	l_{2p}
...
Echantillon m	A	l_{m1}	l_{m2}	...	l_{mp}

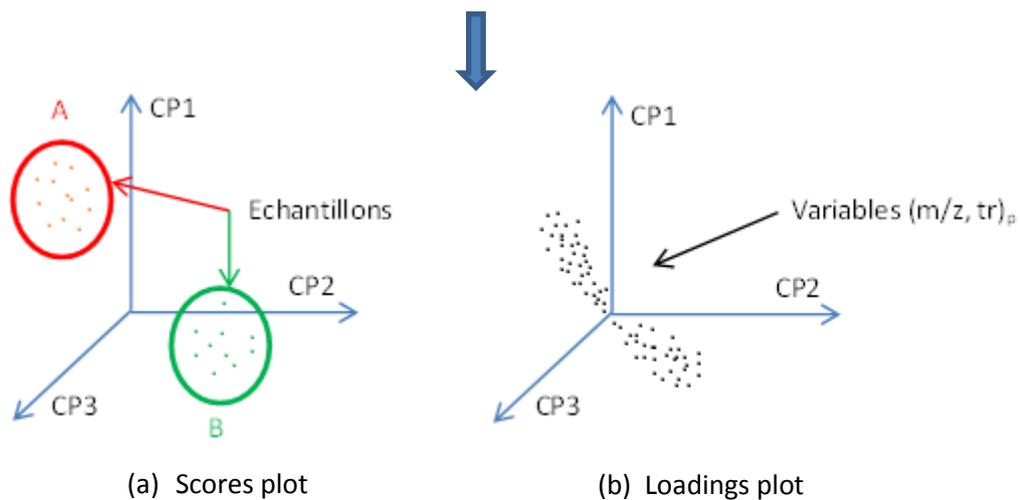


Figure 29: Analyse en Composantes Principales : (a) scores et (b) loadings plots

c) Analyse de variance (ANOVA)

i. *Généralités*

L'analyse de variance (ANOVA) est une méthode statistique univariée utilisée afin de tester si plusieurs échantillons sont issus d'une même population. Considérée comme une généralisation du test de student (t-test), l'ANOVA vérifie si deux ou plusieurs groupes d'échantillons sont statistiquement différents sur la base d'une variable catégorielle. Dans le cas des études métabolomiques, l'ANOVA est utilisée pour tester individuellement le pouvoir discriminant de chaque variable indépendante mesurée. Contrairement à l'ACP, l'ANOVA fait partie des méthodes supervisée et fait appel à l'information concernant l'appartenance des échantillons aux différents groupes. Elle est donc utilisée dans l'objectif de discriminer les échantillons.

ii. *Principe de l'ANOVA*

Dans le cas des études métabolomiques, l'hypothèse (H_0) testée par l'analyse de variance se traduit par :

H_0 = « Les échantillons appartiennent de la même population (au même groupe) », ou en d'autres termes H_0 = « La variable x ne permet pas de discriminer les différents groupes considérés »

Afin d'infirmer cette hypothèse et donc de mettre en évidence les variables discriminantes, l'ANOVA utilise le principe de la décomposition de la variance totale. Tout d'abord, les deux composantes de la variance totale (la variance inter-groupe et la variance intra-groupe) sont calculées séparément. Ensuite le rapport (F) de ces deux types de variance est comparé à une valeur de seuil ($F_{\text{tabulé}}$) dépendant du risque choisi et des degrés de liberté associés à chacune des deux variances considérées :

$$F = \frac{\text{Variance}_{\text{intra-groupes}}}{\text{Variance}_{\text{inter-groupes}}}$$

Équation 16: Calcul du rapport F dans le cas de l'ANOVA

Si le rapport F est statistiquement différent de la valeur seuil, alors on peut conclure que les deux groupes n'appartiennent pas à la même population, la variable considérée permet donc de discriminer les deux groupes.

L'utilisation de l'ANOVA implique le choix du niveau de risque qui correspond à la probabilité que l'hypothèse présentée auparavant soit infirmée. Lors d'études métabolomiques, ce seuil est habituellement fixé à 0,05 ou 0,01, ce qui correspond respectivement à 5% et 1% de chance que le résultat soit le fruit du hasard.

L'ANOVA, bien que très utilisée dans les études métabolomiques, présente néanmoins quelques limitations. Premièrement, l'ANOVA est un test paramétrique qui sous-entend que chacune des variables considérées est distribuée selon une loi statistique bien définie. Dans le cas de l'ANOVA, il s'agit de la loi normale. La normalité des données n'est pas toujours vérifiée, et dans certains cas, le

nombre d'échantillons est insuffisant pour que le test soit concluant. L'utilisation de l'ANOVA soulève également la question des comparaisons multiples. Comme décrit précédemment, la probabilité que le résultat de ce test statistique soit uniquement dû au hasard est régie par la valeur p ($p=0,05$ ou $p=0,01$). Or, lors d'études métabolomique, l'évaluation successive de centaines, voire de milliers de variables doit être considérée. Au regard de la littérature, la probabilité de trouver au moins une variable discriminante, mais que le résultat soit entièrement le fruit du hasard, ne correspond plus à p mais à $p_{multiple}$:

$$p_{multiple} = 1 - (1 - p)^n$$

Où n correspond au nombre de variable testées

Cette nouvelle valeur de probabilité étant dans la plupart des cas non-négligeable, des méthodes de correction s'impose afin de diminuer les risques. A titre d'exemple, Bonferroni suggère une limitation du risque par une diminution considérable du niveau de risque accepté de p à p/n . Le nouveau seuil proposé étant plus strict, cette méthode contrôle efficacement la probabilité d'avoir des faux positifs. En contrepartie, la correction de Bonferroni augmente la possibilité d'avoir de faux négatifs. La méthode d'estimation du taux de fausses découvertes (FDR) estime la proportion de faux positifs attendus sur la totalité des résultats positifs. La proportion de faux positifs se traduit par la valeur $-q$ qui est estimée graphiquement à partir de la valeur seuil p et de la distribution des valeurs $-q$ dans l'ensemble des données.

L'outil statistique ANOVA peut être utilisé seul, ou en association avec d'autres méthodes statistiques. Bien que très controversée, il convient de mentionner l'utilisation de l'ANOVA en tant que filtre avant l'ACP permettant de renforcer l'effet visuel. Il existe également d'extensions multivariées telles que l'analyse de variance multivariée (MANOVA) et l'analyse de variance en composantes simultanée (ASCA) qui peut être utilisée en métabolomique pour pallier aux problèmes de multicollinéarité des données.

5. La métabolomique et les problématiques environnementales

La métabolomique environnementale est souvent définie comme l'application de stratégies holistiques permettant de caractériser les interactions entre les organismes vivants et leur environnement. Une définition plus détaillée a cependant été formulée par Morrison et al. 2007. Les auteurs mentionnent alors la possibilité de caractériser le métabolome d'organismes directement prélevés sur le terrain ou bien celui d'organismes élevés en laboratoire où les expériences doivent alors imiter les scénarios rencontrés dans l'environnement naturel. Les approches métabolomiques offrent alors plusieurs avantages permettant d'étudier les interactions organismes-environnement de manière à caractériser les fonctions et la santé des organismes au niveau moléculaire. La métabolomique pourrait ainsi trouver un nombre important d'application dans les sciences de l'environnement, allant de la compréhension des réponses des organismes aux facteurs de stress abiotiques à celles dues aux pollutions anthropiques. Depuis le début du siècle, cette approche a connu une croissance exponentielle, résultant ainsi d'un nombre important de publications

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

scientifiques. Lin et al (2006) ont ainsi publié une review relatant les études environnementales relatives au développement de biomarqueurs et à l'évaluation du risque d'exposition à des substances potentiellement toxiques. Viant et al. 2007 ont décrit l'application de cette approche pour étudier les organismes aquatiques, y compris les défis liés à la variabilité de la mesure et à l'importance du génotype et du phénotype de l'espèce considérée. Plus récemment, Bundy et al 2009 ont réalisé un examen actuel des applications de la métabolomique dans le domaine environnemental fournissant ainsi une évaluation critique de cette technique et offrant de précieuses recommandations quant à sa mise en œuvre. En 2013, Viant et al. ont publié la première review relative à la métabolomique environnementale basée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse. Les auteurs ont ainsi articulés leur article autour des différentes techniques couramment utilisées : infusion directe, GC-MS ou encore LC-MS. Chaque section commence par une brève introduction de la méthode analytique, de ces avantages et de ces limitations liés au contexte de la recherche environnementale. Chaque propos est alors illustré par des exemples. La review met ainsi en évidence le chemin qu'il reste à parcourir, notamment en termes de traitement de données et d'identification de métabolites. Cette synthèse nous permet notamment de mettre en exergue l'absence d'étude métabolomique basée sur la spectrométrie de masse relative aux espèces retenues dans le cadre de ces travaux.

*Chapitre 2:
Matériels
&
Méthodes*

Introduction

L'objectif de ce chapitre est de présenter les conditions analytiques optimums comprenant les étapes d'extraction et d'analyse des échantillons, ainsi que l'appareillage utilisé pour l'obtention des résultats qui seront présentés dans les autres chapitres de ce manuscrit.

La première partie de ce chapitre sera consacré aux protocoles de prélèvement, d'élevage et de maintien au laboratoire des espèces sentinelles retenues pour cette étude, utilisées à la fois pour le développement des méthodes analytiques mais également pour la réalisation des tests d'exposition en laboratoire et sur le terrain.

La seconde partie de ce chapitre sera dédiée au matériel commun utilisé pour les analyses ciblées et non ciblées. Les standards analytiques des composés étudiés, les solvants et les réactifs chimiques utilisés lors de ces travaux, mais aussi le système de séparation NanoLC couplé à la spectrométrie de masse en tandem ainsi qu'à la spectrométrie de masse haute résolution seront ainsi précisés.

La troisième partie de ce chapitre décrira les méthodes d'extraction et d'analyses mises en œuvre pour les différentes matrices biotiques étudiées (*Potamopyrgus antipodarum*, *Gammarus fossarum* et *Chironomus riparius*), ainsi que les moyens nécessaires à la qualification des performances analytiques des méthodes développées pour l'étude de la bioaccumulation de 35 polluants émergents.

La quatrième partie exposera les conditions analytiques optimums relatives à l'étude des cinétiques d'accumulation de trois traceurs de pollution anthropique (Carbamazépine, oxazépam et testostérone) chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* par extraction de type micro-QuEChERS et analyse NanoLC-MRM³.

La cinquième partie présentera la stratégie analytique mise en œuvre lors des approches métabolomiques. Les conditions d'analyse optimums par NanoLC-HRMS et NanoLC-HRMS/MS, ainsi que la stratégie de traitement des données brutes seront détaillées.

Enfin, la sixième et dernière partie de ce chapitre sera consacré à la présentation des différents sites d'études relatifs à l'exposition des organismes sentinelles. Les différentes approches d'exposition seront ainsi explicitées.

Partie A : Les organismes sentinelles : prélèvement, élevage et maintien en laboratoire

1. *Gammarus fossarum*

Les crustacés *Gammarus fossarum* ont été collectés dans la rivière Bourbre, à proximité de la Tour du Pin (Région Rhône-Alpes). Cette zone de la rivière est reconnue d'une part comme étant non polluée par les contaminants recherchés et d'autre part pour abriter des gammares en grande densité. Les

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

organismes sont prélevés par agitation de la litière et du substrat de la rivière. L'agitation provoque la fuite des organismes qui sont alors entraînés par le courant dans un troubleau placé en aval (maille : 630 µm). Le prélèvement issu du troubleau est ensuite tamisé ; les individus passés entre les mailles du tamis (2 à 2,5 mm) sont ainsi récupérés (Figure 30). Les organismes sont alors triés et les espèces rares et protégés sont remises à l'eau. Les gammares sont ensuite transportés au laboratoire dans des glacières pour limiter les variations thermiques.

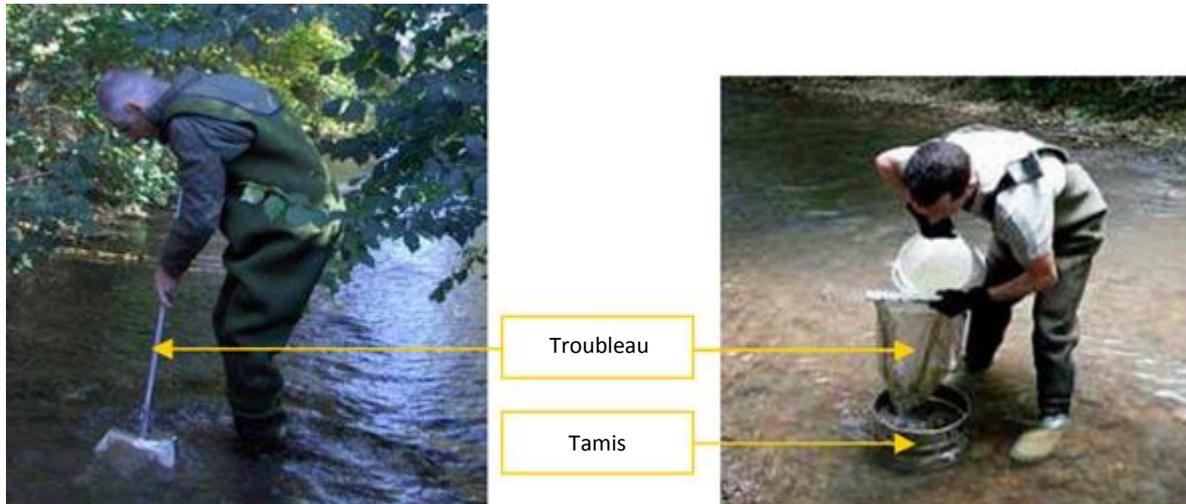


Figure 30: Prélèvement au troubleau et tamisage des crustacés (Source: Laboratoire d'écotoxicologie, IRSTEA)

Une fois au laboratoire, les crustacés sont de nouveau triés afin de ne conserver que l'espèce d'intérêt. Les gammares adultes sont ensuite placés dans des aquariums de 25 litres contenant de l'eau du site de prélèvement. Le tout est maintenu dans un bain-marie thermorégulé à $12 \pm 1^\circ\text{C}$. Un système de goutte à goutte permet de remplacer progressivement l'eau du site par de l'eau issue du pompage directe de la nappe phréatique, appelée eau de FOS, à $300 \mu\text{S}/\text{cm}$. Chaque aquarium est muni d'un système de bullage qui permet de maintenir le taux d'oxygène dissous à saturation (Figure 31). La photopériode est contrôlée, avec 16 heures de lumière s'une intensité d'environ 750 lux, pour 8 heures d'obscurité.

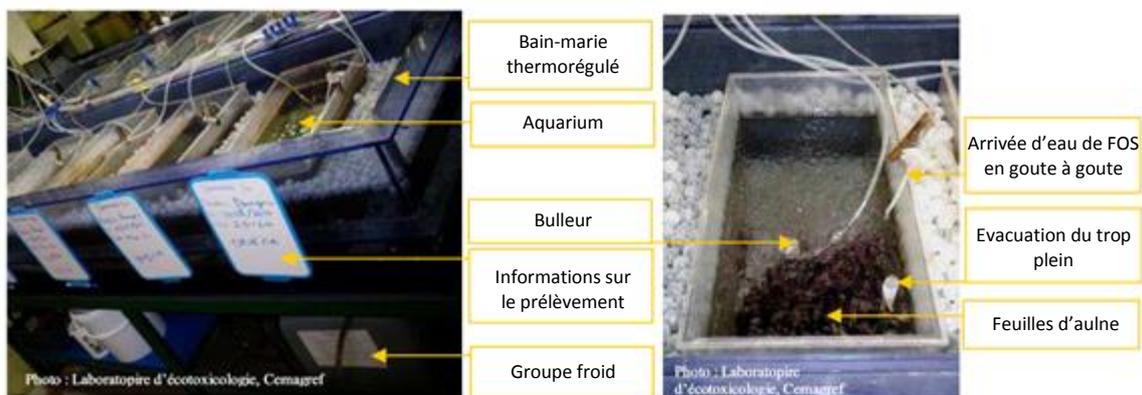


Figure 31: Système de stabulation des gammares au laboratoire IRSTEA

Les gammars prélevés sont acclimatés au minimum pendant deux semaines au laboratoire avant leur utilisation pour les tests d'exposition ou bien pour les tests relatifs au développement des méthodes d'analyses. Pendant cette période, ils sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) et des oligochètes séchés, utilisés comme compléments alimentaires (*Turbiflex turbiflex*). Les feuilles d'aulnes sont récoltées en automne dans une région forestière en amont du cours d'eau peu soumises aux pressions anthropiques, puis séchées. Avant chaque utilisation, elles sont conditionnées pendant une semaine dans de l'eau de FOS afin de les réhydrater. Ce processus permet également le développement de biofilms qui augmentent leur appétence.

Dans ces conditions, et après deux semaines de stabulation en laboratoire, les femelles porteuses d'embryons prêts à éclore lors du prélèvement, ont relâché des juvéniles dans les aquariums, ce qui permet d'établir des cultures à long termes.

2. *Chironomus riparius*

Les larves d'insecte *Chironomus riparius* sont issues de culture à long terme réalisées au laboratoire IRSTEA dont le protocole d'élevage est décrit par la norme AFNOR (2010). Les organismes sont élevés dans des aquariums de 25 litres contenant de l'eau de FOS à 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ renouvelée continuellement par un système de goutte à goutte et maintenus à $21\pm 1^\circ\text{C}$ grâce à un système de bain-marie thermostaté. Un système de bullage permet de maintenir le taux d'oxygène dissous à saturation. Une couche d'environ deux centimètres de sable de Fontainebleau[®] (120-250 μm) placée au fond des aquariums permet aux larves de construire leurs fourreaux (Figure 32). La photopériode est contrôlée (16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité). Les organismes sont nourris *ad libitum* avec une solution de Tetramin[®] (Tetrawerke, Melle, Allemagne). Ces conditions permettent le déroulement d'un cycle de vie complet et multi-générationnel.

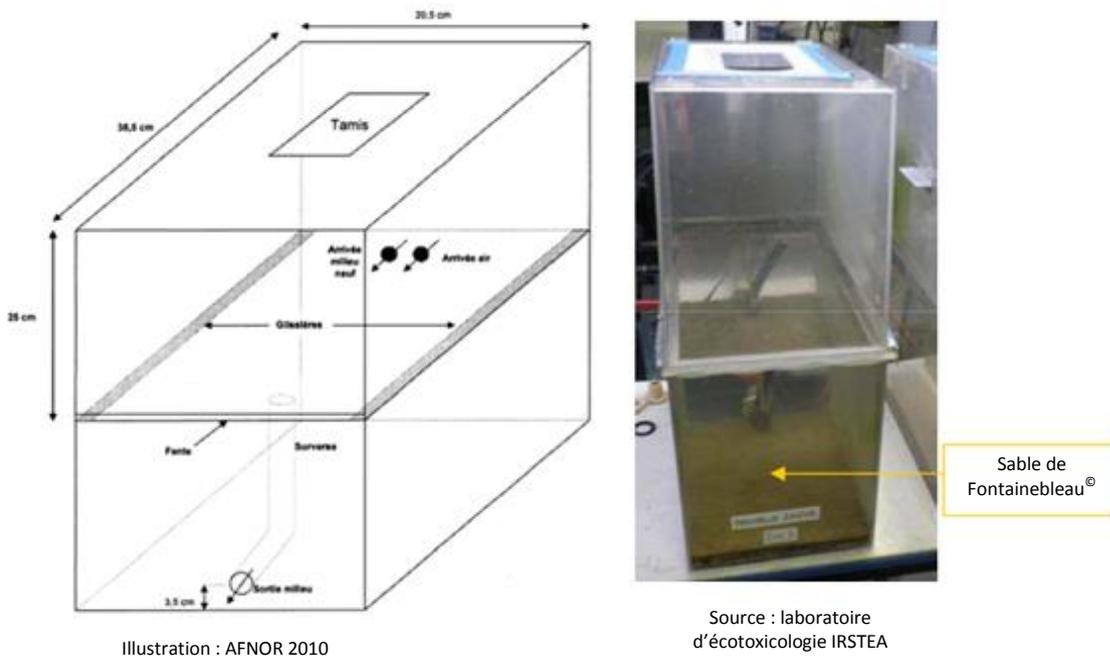


Figure 32: Système d'élevage des chironomes en laboratoire

3. *Potamopyrgus antipodarum*

Les gastropodes *Potamopyrgus antipodarum* sont collectés dans le fleuve Rhône (France). De nombreuses espèces de mollusques vivent sur ce site situé entre deux barrages, la zone de prélèvement forme une étendue lenticule ayant permis le dépôt d'un substrat sédimentaire idéal pour ces organismes dont certaines populations sont suivies depuis de nombreuses années (Mouthon, 2001 et 2011). La matrice sédimentaire du Rhône est prélevée avec un troubleau (maille de 630 μm), puis tamisée à 0,5 mm afin d'extraire les organismes. Un premier tri grossier permet d'éliminer du prélèvement les organismes protégés, les débris végétaux et minéraux. Le prélèvement est ensuite ramené au laboratoire où un nouveau tri est effectué afin de ne conserver que les espèces d'intérêts. Les escargots sont ensuite placés dans des aquariums de 25 litres contenant de l'eau également prélevé sur le site. Celle-ci sera progressivement par l'eau de FOS à 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ grâce à un système de goutte à goutte. Les aquariums sont maintenus à $21\pm 1^\circ\text{C}$ par un bain-marie thermorégulé. Un système de bullage permet de maintenir le taux d'oxygène dissous à saturation. La photopériode artificielle est de 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité. Les organismes sont nourris *ad libitum* avec une solution à 4 g/L de Tetramin[®] (Tetrawerke, Melle, Allemagne), complétée par des épinards.

Partie B : Appareillages et matériels

1. Les standards analytiques et les réactifs chimiques

La plupart des standards analytiques des composés étudiés dans ces travaux ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Falavier, France). Pour ces derniers, le numéro CAS, la pureté et le non commercial sont présentés dans l'annexe X.

Chaque solution de standard analytique est stockée dans un contenant en verre fermé hermétiquement grâce à un bouchon à vis afin d'éviter toute contamination. La solution standard de 4MBC est quant à elle stockée dans un contenant en verre ambré recouvert de papier d'aluminium afin d'éviter l'altération de la substance par les rayonnements UV. Toutes les substances sont dissoutes dans du méthanol distillé à environ 200 mg/L. Les solutions de standard analytiques de calibration sont alors préparées par dilution des solutions individuelles puis stockées à -20°C .

Les tampons utilisés pour les phases mobiles, à savoir l'acide formique pour LC-MS (AF, pureté $\geq 98\%$; CAS : 64-18-6), l'acide acétique pour LC-MS (AC, pureté $\geq 98\%$; CAS : 64-19-7) et l'acétate d'ammonium pour LC-MS (AcAm, pureté $\geq 98\%$, CAS : 631-61-8) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

Le cluster de formiate de sodium utilisé pour la calibration externe du spectromètre de masse haute résolution a été préparé en mélangeant 10 ml d'hydroxyde de sodium à 0,1M (NaOH, Sigma-Aldrich, pureté $\geq 99\%$) à une solution d'eau ultra pure et d'isopropanol (50/50) contenant 10 μL d'acide formique. La concentration finale de la solution de calibrant étant équivalente à 10 mM de NaOH.

Bien que les tests d'extraction de type QuEChERS aient été effectués par fractionnement des kits de sels tampon commercialisés par la société Agilent Technologies (Massy, France) (tampon acétate : 6 g

MgSO₄ et 1,5 g Acétate de sodium ; tampon citrate : 4 g MgSO₄, 1 g Chlorure de Sodium, 1 g Citrate de sodium et 0,5 g de citrate de disodium sesquihydraté), la validation des méthodes analytiques ainsi que l'analyse des échantillons réels ont été réalisées à partir de sels tampon de type citrate, contenant 308 mg de MgSO₄, 77 mg de NaCl, 77 mg de citrate de sodium et 38,5 mg de citrate de disodium sesquihydraté (pH = 5 à 5,5), fabriqués et conditionnés à façon par la société Agilent Technologies suite à un partenariat avec le laboratoire. Les différentes phases dSPE testées sont toutes fournies dans des tubes de 15 ou 12 mL. La dSPE PSA provient de chez EuroClean et contient 900 mg de MgSO₄ et 150 mg de silice greffée PSA. La dSPE PSA/C18 provient de Agilent et contient 900 mg de MgSO₄, 150 mg de silice greffée PSA et 150 mg de silice greffée C18. La dSPE Z-sep provient de Sigma-Aldrich et contient 900 mg de MgSO₄ et 300 mg de silice greffée avec des groupements zirconium. Afin d'optimiser les quantités utilisées pour les méthodes de purification miniaturisées, les kits détaillés ci-dessus ont été fractionnés.

2. Les solvants

Les solvants méthanol (MeOH), acétonitrile (ACN), isopropanol (IPrOH) et hexane (Hex) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Seuls des solvants de qualité Chromasolv LC-MS ont été utilisés, excepté pour l'hexane, pour lequel la qualité PESTANAL a été préférée.

L'eau utilisée pour l'ensemble du protocole analytique (extraction et analyse) est une eau ultra pure issue d'un système de filtration Millipore de type DirectQ UV 3. Ce système est équipé d'une cartouche de purification EDS-Pack remplie de 50 g de charbon actif spécialement conçue pour les analyses de perturbateurs endocriniens, en plus du filtre à 0,22 µm couramment utilisé.

Enfin, pour les analyses de type ciblées décrites dans le troisième chapitre de ce manuscrit, l'ensemble des solvants utilisés (sauf l'hexane), ainsi que l'eau obtenue via le système de filtration ont été distillés afin de limiter les sources de contamination. Le protocole de distillation utilisé est présenté ci-dessous (Figure 33).



Figure 33: Montage de distillation réel et utilisé dans la cadre de ces travaux

Le ballon est rempli de solvant à purifier (Eau, MeOH, ACN...). Une précaution est à prendre. En effet, en chauffant, le volume de solvant peut augmenter, on parle alors de dilatation, il est donc capital de ne pas remplir complètement le ballon. Quelques morceaux de pierre ponce sont placés dans le ballon afin de réguler l'ébullition. Le ballon est ensuite placé à l'extrémité basse de la colonne vigreux, puis maintenu par une pince à potence. Le chauffe ballon disposé sur un élévateur est placé contre le ballon : un contact parfait entre le chauffe-ballon et le ballon doit être fait afin d'assurer un chauffage uniforme et optimum.

Le réfrigérant est ensuite alimenté en eau par le bas, l'évacuation se faisant par le haut. Ceci permet de remplir correctement le réfrigérant, et permet une meilleure condensation des vapeurs car l'eau froide rentre en contact avec la portion chaude des vapeurs. Le distillat purifié est récupéré dans l'ampoule à décanter.

- Pour distiller du MeOH et de l'ACN: Le thermostat du chauffe ballon est placé sur la puissance 8 pendant 15 min, puis abaissé à la puissance 3 jusqu'à la fin de la distillation. La puissance 8 permet d'initier et d'accélérer l'ébullition du MeOH, et la puissance 3 permet d'obtenir une distillation goutte à goutte, nécessaire à une meilleure purification.
- Pour distiller de l'eau : Le thermostat du chauffe ballon est placé sur la puissance 10 pendant 30 min, puis abaissé à la puissance 8 jusqu'à la fin de la distillation. La puissance 10 permet d'accélérer l'ébullition de l'eau, et la puissance 8 permet d'obtenir une distillation goutte à goutte, nécessaire pour une meilleure purification. L'eau ayant une température d'ébullition plus élevée que le MeOH et l'ACN, il est nécessaire de chauffer plus. Une fois la distillation de l'eau terminée, il faut distiller de l'acétone afin de sécher le dispositif de distillation.

Quel que soit le solvant distillé, il est important de jeter les premières fractions de distillat appelées fractions de tête, afin de s'assurer que le distillat récupéré pour les extractions et les analyses soit suffisamment pur. Cela permet également d'éliminer les éventuels contaminants restants de la précédente distillation. Enfin, il est nécessaire d'arrêter la distillation avant que les fractions dites lourdes ne soient distillées.

3. Appareillages utilisés

Les analyses ciblées de type NanoLC-MS/MS et NanoLC-MS/MS/MS ont été réalisées sur une chaîne Ultimate 3000 NanoLC de marque Thermofisher® (Villebon sur Yvette, France) couplée à un 5500 QTRAP, spectromètre de masse hybride quadripôle/trappe ionique linéaire (ABSciex, Foster City, CA, USA), équipé d'une source nanoélectrospray (NanoSpray II, ABSciex), alors que l'approche métabolomique a été effectuée sur une plateforme NanoLC couplée à un QqTOF, spectromètre de masse hybride quadripôle/temps de vol (Bruker Daltonic, Allemagne) équipé d'une source nanoélectrospray (CaptiveSpray, Bruker) (Figure 34).

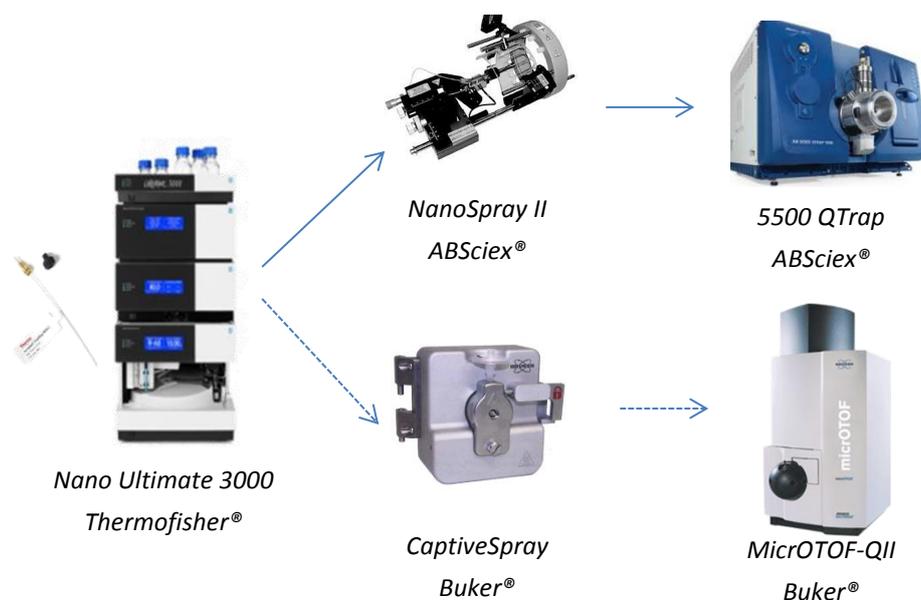


Figure 34: Plateformes analytiques utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse (flèches pleines : analyses ciblées ; flèches pointillées : analyses non ciblées)

3.1. Appareillage dédié à la nanochromatographie en phase liquide (NanoLC)

Lors de ces travaux de thèse, toutes les séparations chromatographiques ont été réalisées par nanochromatographie liquide à l'aide d'une chaîne Ultimate 3000 NanoLC de marque Thermofisher® supportant jusqu'à 500 bar de contre-pression. La configuration instrumentale est telle qu'elle permet de travailler via un système de pré-concentration en ligne par commutation de colonne. Ce dispositif permet ainsi d'augmenter la quantité d'échantillon injectable. La pré-concentration en ligne par commutation de colonnes repose sur l'utilisation d'un système

bidimensionnel comprenant une première colonne de chargement, qui permet de pré-concentrer les composés, et une seconde colonne de nanochromatographie, qui permet de séparer les analytes.

Le système chromatographique est composé des modules suivant :

- Un passeur d'échantillon réfrigéré équipé d'une vanne d'injection 6 voies
- Un détecteur UV à longueur d'onde variable
- Deux pompes tertiaires équipées de dégazeurs et de sélecteurs de solvant. La première, appelée loading pompe permet d'atteindre des débits de l'ordre du $\mu\text{L}/\text{min}$ alors que la seconde, appelée micro-pompe, équipée d'un gestionnaire de flux (flow manager) permet d'obtenir des débits de l'ordre du nL/min .
- Un gestionnaire de flux, équipé d'un diviseur de débit avec contrôle de flux intégré garantit des débits constant de l'ordre du nL/min . La vitesse d'écoulement n'est ni influencée par les variations de contre-pressions engendrées par la colonne analytique, ni par la température ou la viscosité des solvants. Le répartiteur d'écoulement est équipé de deux résistances fluidiques qui divisent le débit de la pompe. Afin d'assurer une chute de pression identique pour les deux résistances, les sorties du diviseur d'écoulement sont reliées par un bras transversal avec débitmètre intégré. Un contrôleur ajuste le débit de déséquilibre à une valeur très faible, proche de zéro afin de rincer le bras transversal avec du solvant frais en permanence. Pour ce faire, la voie d'écoulement du solvant vers un réservoir poubelle comporte une vanne réglable qui s'ajuste en fonction de la pression en tête de colonne (Figure 35). Ce dispositif permet de créer de faibles débits constants sur la base du rapport de division (ratio de split) et du débit de la pompe, indépendamment de la composition du solvant et de la pression de la colonne.

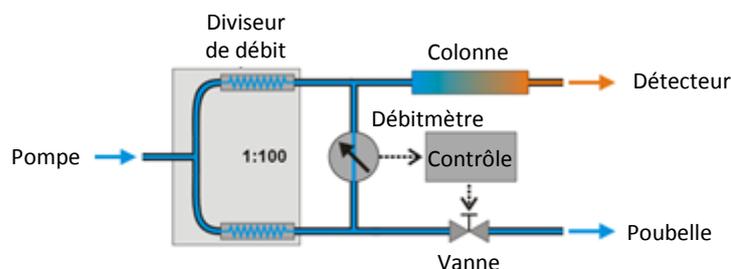


Figure 35: Principe de fonctionnement du diviseur de flux avec contrôle

Le module « gestionnaire de flux » fait également office de four à colonne. Il est ainsi muni d'une vanne 10 voies sur laquelle sont connectées la colonne de séparation, ainsi que la cartouche de chargement (Figure 36).

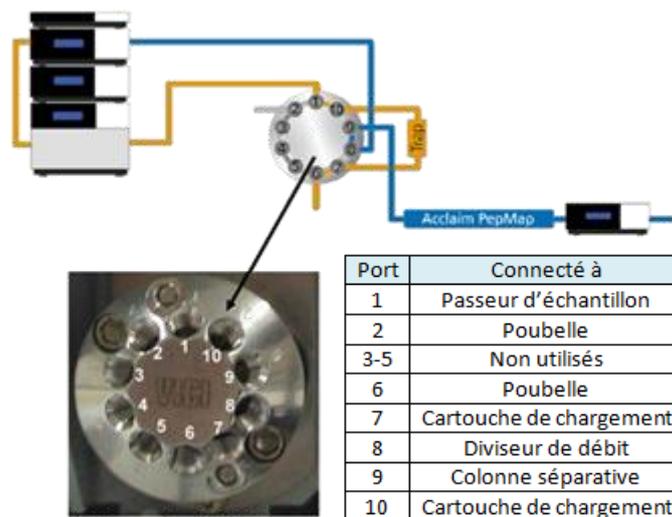


Figure 36: Exemple de configuration de la vanne 10 voies mise en jeu lors l'utilisation du système de pré-concentration en ligne par commutation de colonnes

Le gestionnaire de flux contient des circuits électroniques de pointe qui peuvent maintenir la température choisie avec une précision de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, tout en réduisant le temps nécessaire pour équilibrer la température de la colonne et du solvant. En effet, les éléments Peltier contenus dans le module permettent de chauffer, mais également de refroidir les colonnes. L'échangeur de chaleur situé à l'intérieur du four à colonne contribue également à amener l'air et tous les composants du module à la température de consigne, y compris le diviseur de débit et la vanne de commutation de colonnes. Ces procédures veillent ainsi à ce que la température des colonnes et du solvant soit constante sur toute la durée de l'analyse. De cette manière, la séparation analytique est toujours effectuée à la même température, ce qui, par conséquent minimise les variations de temps de rétention.

Dans cette configuration, l'échantillon est tout d'abord injecté sur la cartouche de chargement et pré-concentré grâce au flux de phase mobile délivré par la loading pompe. Après une durée qui doit être optimisée par l'opérateur, la vanne 10 voies commute, permettant ainsi aux deux colonnes d'être reliées l'une à l'autre. Une fois la vanne commutée, le système de colonnes en série n'est plus qu'alimenté par la micro-pompe, la loading pompe reste tout de même en fonctionnement mais la phase mobile est directement dirigée vers un réservoir poubelle. La phase mobile délivrée par la micro-pompe permet ainsi d'éluer les composés piégés dans la colonne de chargement et de les séparer sur la seconde colonne capillaire. Notons que l'étape d'élution des composés piégés dans la cartouche est communément réalisée en « back-flush » : le sens de circulation de la phase mobile lors de l'étape d'élution étant inversé par rapport à celui du chargement.

Comme toutes techniques de chromatographie en phase liquide, la séparation nanochromatographique est basée sur le mécanisme de distribution des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile. Deux effets antagonistes peuvent alors se produire : soit un effet d'entraînement exercé par la phase mobile, soit un effet de rétention exercé par la phase stationnaire. Par conséquent, le choix de la phase stationnaire est crucial : la séparation des

composés est dépendante de leurs propriétés physico-chimique telles que l'hydrophobicité ou l'existence de liaisons π - π . La phase stationnaire doit donc être choisie en fonction des interactions que l'on souhaite mettre en œuvre. Dans le cadre de ces travaux, la séparation des composés d'intérêts est réalisée sur une colonne capillaire C18 Acclaim PepMap 100 (15cm*75 μ m, 3 μ m, 100Å) commercialisée par la société Thermofisher ©, les interactions mises en jeu pour la séparation des composés sont donc de type hydrophobes. La cartouche de chargement utilisée pour chacune des méthodes d'analyses développées est également de type C18 Acclaim PepMap 100, cependant sa géométrie est différente : 5mm de longueur, 300 μ m de diamètre interne et 5 μ m de granulométrie.

Les conditions de pré-concentration en ligne, ainsi que les gradients de séparation utilisés pour les différentes méthodes d'analyses développées dans le cadre de ces travaux de thèse seront précisés dans les chapitres suivants.

3.2. Appareillages dédiés à la détection par spectrométrie de masse

3.2.1. Le cas des analyses ciblées

Dans le cadre de ces travaux de thèse, la détection des composés ciblés a été réalisée par spectrométrie de masse en mode MS/MS ou bien MS/MS/MS, selon l'étude considérée, à l'aide d'un spectromètre de masse hybride de type 5500 QTrap (ABSciex) équipé d'une source nanoélectrospray (NanoSpray II, ABSciex).

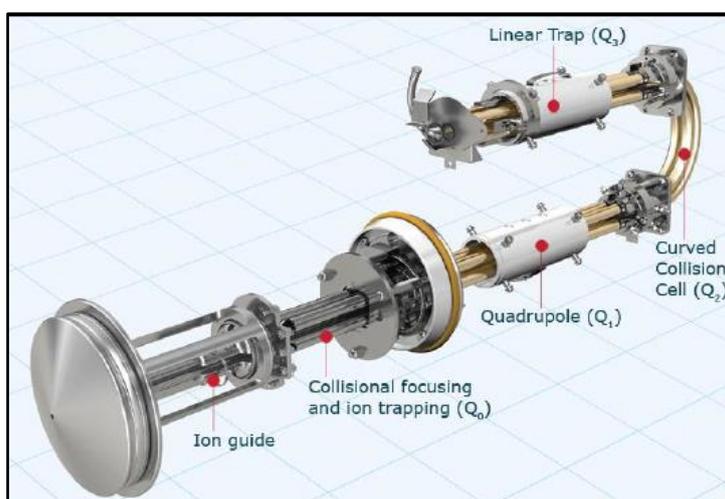


Figure 37: Schéma descriptif du rail analytique du spectromètre de masse 5500 QTrap (fourni par le constructeur ABSciex)

Ce type d'instruments a l'avantage de posséder de larges gammes dynamiques pour la quantification (supérieure à 10^5), de posséder une sensibilité importante et une grande robustesse d'analyse. Grâce à ce spectromètre de masse hybride triple quadripôle/trappe ionique linéaire, il est possible de réaliser des analyses spécifiques, sélectives et sensibles, en utilisant cet analyseur comme un triple quadripôle ou bien en utilisant la fonctionnalité de la trappe ionique. Ainsi, ce spectromètre de masse peut être utilisé selon différents modes de détection. Deux modes d'utilisation ont été mis en œuvre dans le cadre de ces travaux de thèse :

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

- Le mode MRM, pour l'étude de la bioaccumulation de 35 polluants émergents chez des invertébrés benthiques
- Le mode MRM³ pour l'étude des cinétiques d'accumulation de trois traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum*

En mode MRM (Multiple Reaction Monitoring), le principe de fonctionnement de l'analyseur 5500 QTrap sera similaire à celui d'un triple quadripôle classique. Après transmission des ions au premier quadripôle analytique (Q1), celui-ci va isoler l'ion précurseur (ion parent) d'après son rapport masse / charge, et le transmettre à la cellule de collision (Q2). Par collision avec un gaz neutre (typiquement de l'azote), des ions fragments (ions fils) vont être produits, caractéristiques du contaminant suivi. Le troisième quadripôle (Q3) va alors isoler l'ion fragment retenu et le transmettre au détecteur pour produire un signal. Le passage de l'ion parent à l'ion fils est appelé transition MRM. Chaque substance, étant fragmentée en deux ions fils au minimum, est alors caractérisée par deux transitions MRM. La première transition mettant en jeu l'ion fils le plus intense est utilisée pour la quantification des analytes (Transition de quantification, T1) alors que la seconde transition établie à partir du second ion fils le plus intense est employée comme transition de confirmation (Transition de confirmation, T2). Ce mode permet alors de gagner en sélectivité car chaque substance est caractérisée par deux ions fils (Ions fils 1 et Ion fils 2), soient deux transitions MRM (T1 et T2), et par le rapport des aires des deux ions fils (T1/T2). L'utilisation d'appareils hybrides QTrap, permet cependant de piéger des ions fragments de première génération pour les fragmenter de nouveau. Il a ainsi été démontré (Fortin et al) qu'il était possible d'utiliser un nouveau mode de détection qui a été baptisé MRM³. Par rapport au mode MRM classique, le mode MRM³ consiste à rajouter une étape de fragmentation, ce qui rend la détection encore plus caractéristique de la molécule ciblée. La fragmentation a lieu dans le troisième quadripôle qui est utilisée comme une trappe linéaire (Figure 37), l'ion fils de première génération donne ainsi lieu à un ou plusieurs ions sous-produit. Ainsi, en mode MRM³, le signal mesuré correspondra à la transition ion parent/ion fils/ion sous-produit. Dans cette étude seront désignés « ions fils » ceux obtenus après fragmentation du précurseur (mode MRM), et « ions sous-produits » ceux obtenu après fragmentation de l'ion produit.

L'optimisation des paramètres de détection, que ce soit pour le mode MRM ou MRM³, a été réalisée par infusion. Cette étape consiste à injecter à l'aide d'un pousse-seringue, un flux continu de l'échantillon. L'échantillon injecté correspond à une dilution de la solution mère de chaque composé pur dans un mélange eau/solvant organique (50/50). Cette étape permet de déterminer les valeurs optimales des tensions à appliquer dans les éléments constitutifs du détecteur afin de fragmenter l'ion précurseur et de détecter les ions fils résultant de la fragmentation. Seule l'énergie d'excitation relative à la fragmentation de l'ion fils de première génération en MRM³ a été optimisée manuellement.

Ainsi, le logiciel Analyst 1.6 optimise les valeurs des tensions correspondant aux différents potentiels nécessaire aux entrées et sorties des ions choisis dans les différents éléments constitutifs du spectromètre de masse, à savoir : le DP (Declustering Potential), l'EP (Entrance Potential), le CEP (collision Cell Entrance Potential), et le CXP (collision Cell Exit Potential). Au sein de la cellule de

collision, le logiciel optimise ensuite l'énergie de collision CE (Collision Energy) nécessaire à la fragmentation des ions sélectionnés et piégés dans le premier quadripôle (Q1). Les ions issus de cette fragmentation, appelés « ions fils », sont piégés dans le troisième quadripôle (Q3), et sont spécifiques de la molécule parent isolée dans le premier quadripôle. L'énergie d'excitation (AF2) nécessaire à la fragmentation de l'ion fils de première génération est en dernier lieu optimisée manuellement pour la détection en mode MRM³.

Les paramètres d'ionisation ont ensuite été optimisés par injection de standard analytique en balayant une gamme de valeurs du paramètre à optimiser pour assurer une ionisation satisfaisante. Les valeurs opérationnelles des paramètres de la source à optimiser sont fournies par le fournisseur du détecteur. De ce fait, les valeurs testées lors de cette étape d'optimisation étaient situées dans les gammes dynamiques conseillées par le constructeur. Ainsi, les paramètres d'ionisation qui ont été optimisés sont : la tension appliquée au capillaire (ion spray voltage (IS)), la température de la source (TEM), la valeur du débit du gaz rideau au niveau de l'orifice d'entrée des ions (CUR), la pression du gaz de nébulisation (GS1 et GS2), ainsi que les différentes positions de la source.

Les paramètres de détection et d'ionisation des composés d'intérêt sont précisées dans la partie « V-Méthode d'analyses » de ce chapitre.

3.2.2. Le cas des analyses non ciblées

Dans le cadre des approches métabolomiques mises en œuvre au cours de ces travaux de thèse, la détection a été réalisée par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) en mode MS ou MS/MS à l'aide d'un spectromètre de masse hybride de type QqToF (quadripôle/temps de vol) (MicroTOF-QII, Bruker Daltonics[®]) équipé d'une source nanoélectrospray (CaptiveSpray, Bruker Daltonics[®]).

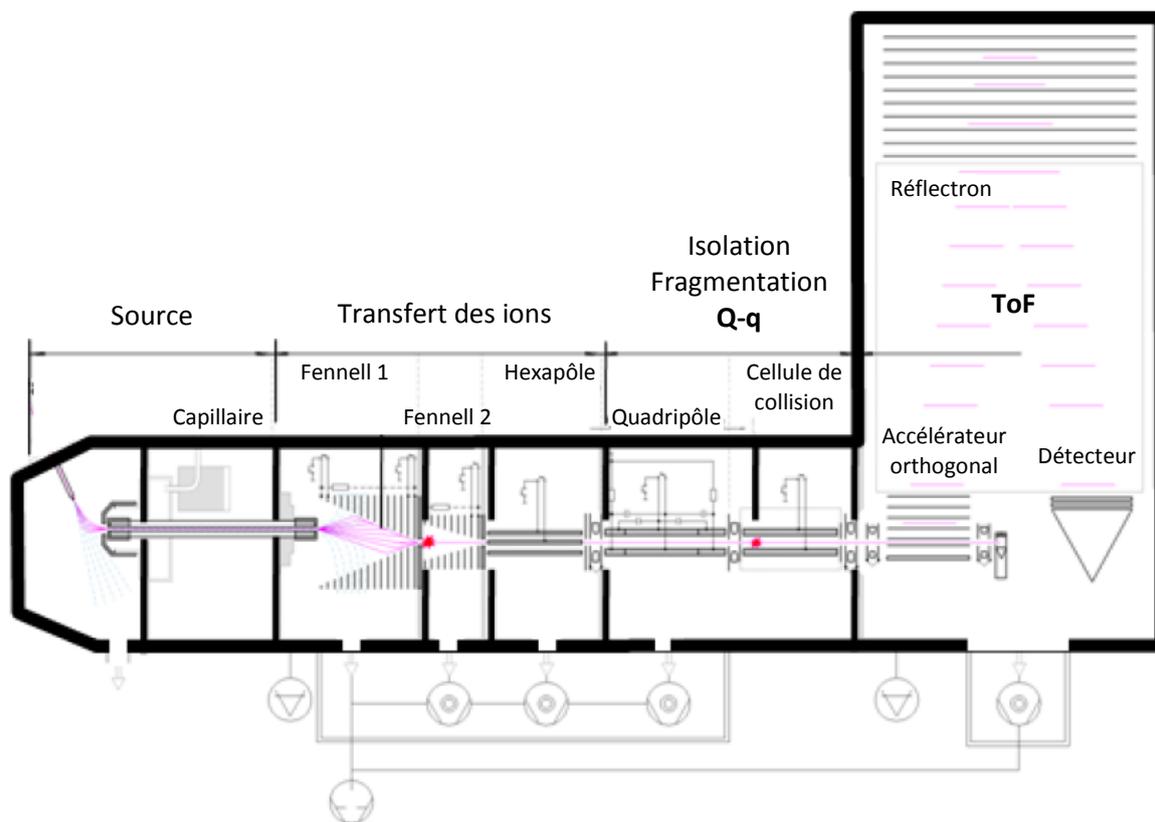


Figure 38: Schéma constitutif du MicOTOF-QII®

Le micOTOF-QII utilise plusieurs guides d'ions, également appelés lignes de transfert (Figure 38). Les fennels et l'hexapôle sont utilisés pour guider les ions issus du processus d'ionisation par électrospray de la sortie du capillaire à l'analyseur, en passant par plusieurs étapes de vide. Schématiquement, une ligne de transfert agit comme un tube pour particule chargées, permettant de conserver les molécules chargées tout en éliminant les molécules neutres et les gaz. Par conséquent, les ions sont amenés dans l'analyseur avec une efficacité de transmission élevée alors que les molécules neutres sont éliminées par le système de pompage.

Les fennels sont semblables à des anneaux empilés les uns dans les autres de telle sorte que le profil intérieur de l'assemblage soit semblable à celui d'un entonnoir. La tension appliquée sur les fennels génère un potentiel efficace qui limite le faisceau d'ions à l'intérieur de l'entonnoir. A ce stade, un hexapôle est utilisé pour le transport et la focalisation des ions. La tension appliquée génère un potentiel effectif augmentant radialement, de sorte que les ions soient focalisés sur l'axe hexapolaire et terminent leur course sur une lentille de focalisation. Pour éviter les interférences et réduire le temps de retard entre les spectres MS et MS/MS, la transmission des ions doit être bloquée entre deux spectres. Par conséquent, une forte tension dite tension de bloc est appliquée. Lors de la collecte des ions, la tension de la lentille est ajustée pour maximiser la transmission des ions. La lentille de focalisation fournit ainsi une forme de faisceau adapté pour transférer les ions jusqu'au quadripôle. Les tensions appliquées au niveau des fennels et de l'hexapôle doivent être optimisées en fonction des applications recherchées, on parle alors de l'optimisation des paramètres de transfert.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

Le quadripôle est le premier analyseur de masse constituant le spectromètre hybride micOTOF-QII. Il est utilisé comme un filtre de masse pour isoler une masse spécifique ou bien une certaine plage de masse définie. Pour l'analyse en mode simple MS, le pouvoir de filtration du quadripôle peut être désactivé. Dans ce cas, il fonctionne comme une ligne de transfert supplémentaire. Le quadripôle se compose de trois segments quadripolaires. Le segment du milieu est la partie dédiée au filtre de masse alors que les segments extérieurs optimisent l'efficacité du transfert des ions lorsque l'analyseur est utilisé comme filtre de masse. La même tension est appliquée à tous les segments. Pour réaliser une filtration de masse, la tension du segment du milieu est superposée avec une tension continue asymétrique.

Les masses isolées dans le quadripôle peuvent ensuite être fragmentées dans la cellule de collision où elles subissent une dissociation induite par collision (CID). Pour ce faire, un gaz de collision neutre, typiquement de l'azote, est introduit dans la cellule de collision (10^{-2} mbar). Une lentille de focalisation est nécessaire pour focaliser le faisceau d'ions sur la petite ouverture d'entrée située face à la cellule de collision. Pour obtenir une efficacité optimale de fragmentation, l'énergie de collision peut être ajustée en augmentant les tensions appliquées devant la cellule de collision. En raison de la forte pression à l'intérieur de la cellule de collision, les ions perdent leur énergie et sont ainsi concentrés sur l'axe de la cellule de collision. Au cours de la fragmentation des ions précurseurs, les tensions appliquées à la lentille située à l'extrémité de la cellule de collision sont configurées pour bloquer la transmission des ions vers le second analyseur à temps de vol. Cela favorise ainsi l'accumulation des ions fragments. Après un intervalle de temps réglable, la tension est ajustée pour transférer les ions accumulés vers le second analyseur. Le « Transfert time » définit le début de l'intervalle de temps et le « Pre Pulse Storage Time » la fin de l'intervalle de temps. Les deux sont rapportés à la prochaine impulsion TOF et limite la plage de masse transférée. Un temps de transfert plus élevé donnera une limite supérieure plus élevée de masse transférée alors qu'une faible valeur de « Pre Pulse Storage Time » permettra de réduire la limite inférieure de masse transféré. La lentille de transfert et la lentille d'entrée de l'accélérateur orthogonale fonctionnent ensemble pour générer une forme de faisceau parallèle approprié à l'étape d'accélération.

Dans le micOTOF-QII, la phase d'accélération fonctionne en mode pulsé. L'accélérateur orthogonale (pusher...) est constitué d'un réseau d'électrodes montées les unes au-dessus des autres qui permettent d'accélérer les ions vers le réflectron. Il s'agit d'un processus en deux étapes ; si les électrodes sont au potentiel de terre, le flux entrant remplit cette région de l'analyseur avec des ions. Les ions qui sont passés en dehors de la région de pulsation ne sont pas disponibles pour l'analyse en TOF. Avant que les ions ne quittent la région de pulsation, des tensions appropriées sont appliquées aux électrodes d'accélération. Le paquet d'ions est ainsi forcé de passer à travers les fentes situées sur les électrodes et se dirige donc vers l'analyseur. Ce processus (remplissage, vidage, accélération) peut être répété jusqu'à 20000 fois par seconde. A l'issue de la phase d'accélération, les ions passent dans une région dite de dérive, exempt de champ électrostatique, dans laquelle ils sont séparés en fonction de leur rapport m/z . Le temps de vol, en combinaison la tension d'accélération et la longueur de la zone de migration, permet la détermination de la valeur m/z des ions.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

En raison des différences de vitesses et de positions des ions avant la phase d'accélération, de légères différences d'énergies cinétiques peuvent être observées. Ainsi, l'objectif principal du réflectron est de normaliser ces différences d'énergie et donc d'améliorer la résolution. Les ions de même masse, mais d'énergies cinétiques différentes pénètrent dans le domaine du réflectron à des profondeurs différentes, ce qui compense leur variabilité d'énergie.

Enfin, un détecteur convertit le faisceau d'ion en un signal électrique. Dans le cas du spectromètre de masse microTOF-QII, il s'agit d'une plaque à microcanaux (MCP pour microchannel plate). Une plaque à microcanaux est un assemblage de noyau solide avec des millions de petits pores ($\varnothing=5-10\ \mu\text{m}$, $l=0,5-0,8\ \text{mm}$), revêtus intérieurement d'un film semi-conducteur. Ces pores sont appelés microcanaux. Chacun d'entre eux fonctionne comme un multiplicateur d'électrons, indépendamment les uns des autres. L'ensemble de ces canaux sont reliés électriquement (en parallèle), ce qui maximise le rendement d'électron. En fonctionnement normal, une différence de tension pouvant aller jusqu'à 1000 V est appliquée à travers le microcanal. Il en résulte une circulation de courant à travers la couche semi-conductrice, fournissant ainsi les électrons nécessaires au processus de multiplication progressive. Ce détecteur MCP est efficace pour la détection des signaux d'entrée sur une large gamme dynamique, les effets de saturation sont ainsi réduits au minimum. Les détecteurs MCP délivrent une tension de sortie avec un temps de montée ($< 1\ \text{ns}$) jusqu'à 10 fois plus rapide que celui d'autres détecteurs tels que les channeltrons, améliorant ainsi le temps de réponse du détecteur et permettant d'éviter la détérioration de la résolution maximale.

Au regard du mode de fonctionnement du microTOF-QII, celui-ci peut être utilisé comme un simple spectromètre de masse haute résolution, dans ce cas seul l'analyseur à temps de vol est utilisé, le quadripôle et la cellule de collision sont alors considérés comme une ligne de transfert supplémentaire, ou bien comme un spectromètre de masse hybride haute résolution. Dans ce second cas, la réalisation d'analyses MS/MS permet d'obtenir des spectres de fragmentation donnant ainsi accès à des informations structurales sur les molécules présentes dans l'échantillon. La combinaison d'une grande précision sur la masse des ions précurseurs et des ions fils, ainsi que l'interprétation des spectres de fragmentation conduit à faciliter l'annotation des composés détectés.

Dans le cadre des approches métabolomiques mise en œuvre lors de ces travaux de thèse, plusieurs méthodes d'analyse ont été développées. Celles-ci sont fonction de la gamme de masse balayée et du mode de détection utilisé (MS ou MS/MS). Les paramètres de transferts ont été optimisés par infusion d'un cluster de formate de sodium, contenant une large distribution de masse, semblable à celle recherchée pour nos études holistiques. Les paramètres d'ionisation et de détection propres à chacune des méthodes utilisées lors de ces travaux seront présentés dans la partie D de ce chapitre.

Partie C : Méthodes d'analyses relatives à l'étude de la bioaccumulation de 35 polluants émergents chez trois invertébrés benthiques

1. Préparation d'échantillon

1.1. Prétraitement de l'échantillon

Après prélèvement, les organismes sentinelles à analyser sont immédiatement rincer à l'eau ultra-pure afin de retirer les contaminants potentiellement présents sur leur surface dermique et qui ne seraient pas représentatifs d'une réel bioaccumulation intra-tissulaire. Les invertébrés sont ensuite pesés individuellement dans un tube à centrifuger de 2 ml, congelés dans un bain d'azote liquide puis lyophilisés. Cette étape de déshydratation est notamment nécessaire pour l'extraction de type QuEChERS, le mélange de sels contient en effet une quantité précise de sulfate de magnésium permettant de favoriser le partitionnement. Grâce à l'utilisation d'un échantillon sec, la quantité d'eau ajoutée pour l'extraction et le partitionnement seront ainsi constants pour toutes les analyses. Notons également que ce procédé permet de faciliter le broyage de l'invertébré à analyser, la déshydratation permettant de rendre l'individu plus friable. Après l'étape de lyophilisation, les tubes à centrifuger sont fermés hermétiquement grâce à un bouchon à vis, puis placés au congélateur à -20°C avant analyse.

Afin de réaliser les tests nécessaires au développement de la méthode d'extraction, un pool d'individus a été réalisé pour chacune des espèces investiguées. Près de 200 organismes issus de la stabulation réalisée en laboratoire (IRSTEA) ont ainsi été prélevés, rincés, congelés à l'azote liquide, lyophilisés, broyés, puis conservé au congélateur à -20°C. Ce pool d'individus pourra ainsi être aliquoté lors de l'optimisation des méthodes d'extraction et d'analyse. Il sera également utilisé pour réaliser les gammes d'étalonnage au cours du protocole de calibration par Matrix Matched.

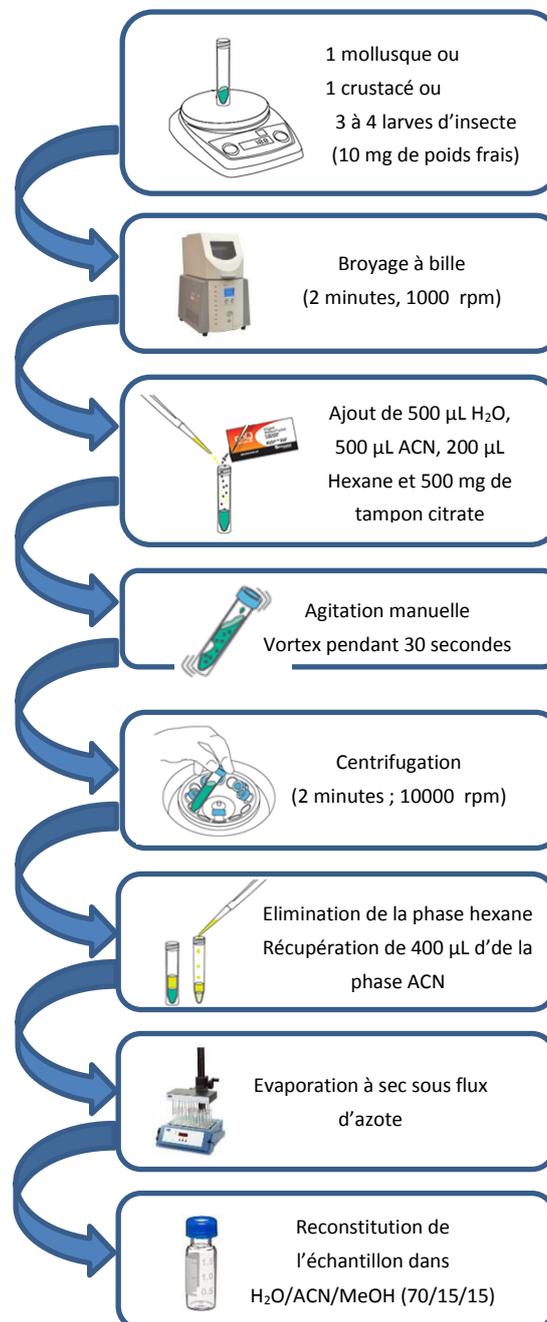
1.2. Extraction de type micro-QuEChERS

Dans le cadre de cette étude, l'extraction de type micro-QuEChERS mise en œuvre est identique quel que soit l'espèce sentinelle investiguée.

Les échantillons prétraités sont tout d'abord broyés à l'aide d'un broyeur à bille (GenoGrinder[®], SPEX SamplePrep, Stanmore, Royaume-Unis). Ainsi, deux billes en acier inoxydable sont ajoutées à chaque tube à centrifuger directement après leur sortie du congélateur. Ils sont ensuite placés sur le portoir adapté du GenoGrinder[®] et broyés pendant 2 minutes à 1000 rpm. A l'issue de cette étape de broyage, 25 µL de méthanol distillé sont ajouté au broyat, vortéxé pendant 30 seconde puis évaporé sous flux d'azote. Cette manipulation permet de reproduire l'étape de dopage de la matrice blanche permettant la réalisation de la calibration par Matrix Matched (Cf.). Ainsi, si l'ajout de méthanol avait un quelconque impact sur la nature de l'échantillon (précipitation des protéines par exemple), celui-ci serait identique pour les échantillons comme pour les points de la droite d'étalonnage.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

A l'issue de cette première étape, 500 μL d'acétonitrile distillée, 500 μL d'eau distillée, 200 μL d'hexane et 500 mg de tampon citrate sont ajoutés au broyat. Le mélange est alors vigoureusement agité manuellement afin d'éviter l'agrégation des sels. L'ajout du sel tampon au mélange de solvant étant très exothermique, il est nécessaire de dégazer plusieurs fois le mélange en ouvrant légèrement le tube à centrifuger afin d'éviter les fuites. Le mélange est ensuite vortexé pendant 30 secondes puis centrifugé pendant 2 minutes à 10000 rpm. L'étape de centrifugation induit la séparation des phases. L'hexane, constituant la phase supérieure en raison de la faible densité de ce solvant, est alors éliminé. 400 μL d'acétonitrile sont ensuite récupérés puis évaporés à sec sous flux d'azote. L'échantillon est finalement reconstitué dans 60 μL d'un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{MeOH}$ (70/15/15) réalisé avec des solvants préalablement distillés avant d'être injecté sur la plateforme d'analyse NanoLC-MS/MS. La figure suivante résume de manière schématique le protocole d'extraction final mise en œuvre pour extraire les molécules d'intérêts chez les 3 invertébrés benthiques retenus pour cette étude.



2. Analyses NanoLC-MS/MS

2.1. Pré-concentration en ligne et séparation des composés d'intérêts par NanoLC

La pré-concentration en ligne des composés ciblés pour cette étude a été réalisée sur une colonne de chargement Acclaim PepMap 100 (5mm * 300 µm ; 5 µm ; 100Å) commercialisée par la société Thermofisher. L'étape de piégeage des analytes étant fonction de l'espèce considérée et du mode d'ionisation sélectionnés, 3 méthodes de pré-concentration en ligne ont été développées. La composition des phases mobiles, le débit et le temps de chargement sont spécifiés pour chacune d'entre elles dans la Table 38.

	Débit de chargement (µL/min)		Composition de la phase mobile de chargement		Durée de chargement (min)	
	ESI+	ESI-	ESI+	ESI-	ESI+	ESI-
Chironomus riparius	20		H ₂ O :ACN :MeOH (90 :5 :5)	H ₂ O :ACN :MeOH* (96 :2 :2) + 0,1 mM d'acétate d'ammonium	3,25	3,5
Gammarus fossarum			H ₂ O :ACN :MeOH (96 :2 :2)		4,75	
Potamopyrgus antipodarum						

* Mélange réalisé à partir de solvants distillés

Table 38: Conditions optimales de pré-concentration en ligne pour chaque espèce sentinelle et chaque mode d'ionisation

Le volume d'injection a été fixé à 1 µL, la température du passeur d'échantillon à 5°C, et celle du four colonne à 40°C, et ce quel que soit le mode d'ionisation ou l'espèce considérée.

Quelques soit le mode d'ionisation utilisé, le débit a été fixé à 300 nL/min. L'élution des composés d'intérêts est réalisée avec un gradient d'élution multilinéaire, suivi d'un pallier isocratique à la composition maximale en phase organique. Les gradients d'élution utilisés en mode d'ionisation positif et négatif sont indépendants de l'espèce considérée. Ils sont représentés par les Figure 40 et 41. La phase aqueuse utilisée pour séparer les composés s'ionisant positivement est préparée en ajoutant 0,1 % en volume d'acide formique dans de l'eau ultra pure. La phase organique est quant à elle constitué d'un mélange ACN/MeOH/H₂O (45/45/10) également acidifié avec 0,1% en volume d'acide formique. Pour la séparation en mode négatif, les phases mobiles sont réalisées à partir de solvants distillés, nécessaire à la diminution des sources de contamination. La phase aqueuse est préparée par ajout d'acétate d'ammonium (0,1 mmol/L) dans de l'eau ultra pure distillée. La phase mobile organique est un mélange ACN/MeOH/H₂O (45/45/10) également tamponnée à 0,1 mmol/L d'acétate d'ammonium.

Temps (minutes)	% Phase aqueuse	% Phase organique
0	50	50
4,25	45,4	54,6
26,25	31	69
36,25	22	78
39,25	0	100
64,25	0	100

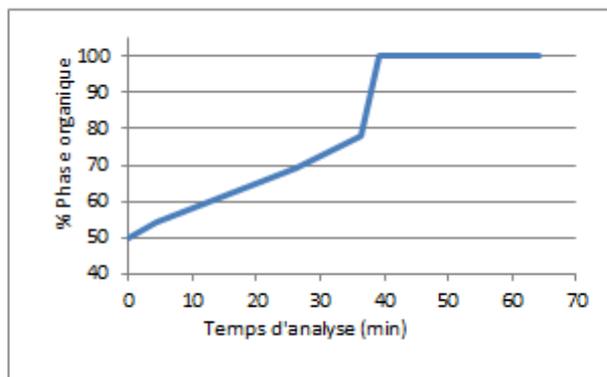


Figure 40: Gradient d'élution pour le mode d'ionisation positif

Temps (minutes)	% Phase aqueuse	% Phase organique
0	50	50
13,25	34,7	65,3
19,25	20	80
32,25	0	100
57,25	0	100

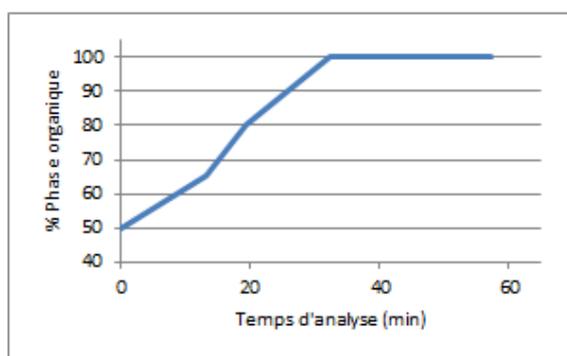


Figure 41: Gradient d'élution pour le mode d'ionisation positif

A la fin du programme d'élution, une période de rééquilibrage de la colonne à la composition initiale du gradient (20 minutes) est nécessaire afin d'obtenir des temps de rétention répétables d'une injection à l'autre. Notons également que la fin du gradient s'accompagne du switch de la vanne 10 voies, ce qui permet d'isoler la colonne de chargement et la colonne séparative l'une de l'autre. La cartouche de chargement est alors elle aussi rééquilibrée dans les conditions initiales de pré-concentration en ligne précédemment précisées (Table 38).

2.2. Détection des composés d'intérêts

Les paramètres d'ionisation et de détection de chaque composé d'intérêt ont été déterminés pour chacun des modes d'ionisation, positif et négatif. Les transitions MRM caractéristiques de chaque substance ainsi que les paramètres de détection associés sont présentés dans la Table 39.

Mode	Analytes	Ion parent (m/z)	Ion fils (mz)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	Ratio T1/T2
ESI +	4Hydroxytamoxifène	388.1	72	156	39	10	2.9
		388.1	48	156	89	8	
	4-Méthylbenzylidène camphre	255.0	105	111	43	10	1.2
		255.0	77	111	81	12	
	Amitriptyline	278.0	91	106	35	10	1.3

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

		278.0	117	106	31	10	
Aténolol		267.0	145.1	136	37	12	1.4
		267.0	74	136	31	12	
Béazafibrate		362.0	139	101	35	12	1.4
		362.0	316.1	101	21	14	
Carbamazépine		236.9	194.1	91	29	10	3.1
		236.9	193.1	91	47	10	
Cyclophosphamide		260.8	140	106	31	12	2.1
		260.8	233.1	106	23	12	
Desloratadine		310.9	259.1	136	31	10	2.3
		310.9	258.2	136	53	22	
Diclofénac		295.9	214	71	49	18	1.2
		295.9	250	71	17	10	
Diuron		234.8	72	101	37	12	3.2
		234.8	46.1	101	27	8	
Econazole		380.9	125	136	37	12	3.9
		380.9	89	136	99	14	
Kétoprofène		254.9	77	111	61	12	1.2
		254.9	105	111	33	12	
Lévonorgestrel		313.0	91	131	67	14	1.1
		313.0	77	131	93	12	
Lidocaïne		335.0	86	46	23	10	4.5
		335.0	58	46	51	10	
Mifépristone		430.1	372.2	166	31	16	1.1
		430.1	134.1	166	39	12	
Nicardipine		480.1	315.1	121	33	14	1.2
		480.1	91	121	77	10	
Norethindrone		299.0	109	136	39	10	1.2
		299.0	77	136	91	12	
Oxazépam		286.9	241.1	101	31	12	1.6
		286.9	269	101	23	16	
Pantoprazole		383.9	138	51	43	12	1.1
		383.9	200	51	17	10	
Prednisolone		361.0	343.1	81	15	16	2.2
		361.0	147	81	33	12	
Ritonavir		721.2	140	91	85	16	1.2
		721.2	296.1	91	27	14	
Roxithromycine		837.4	679.5	111	31	26	1.4
		837.4	158.1	111	43	12	
Spinosad		732.3	142.1	141	37	12	4.4
		732.3	98.1	141	95	14	
Tamoxifène		372.1	72.1	131	33	12	3

		372.1	44	131	87	8	
	Testostérone	289.0	97	141	31	12	1.1
		289.0	109	141	35	10	
ESI –	Bisphénol A	226.9	133	-115	-34	-9	7.3
		226.9	116.9	-115	-66	-11	
	17 α -Ethinylestradiol	295.1	144.9	-145	-54	-17	1.3
		295.1	142.9	-145	-76	-15	
	17 α -Estradiol	271.2	145	-90	-58	-23	1.3
		271.2	239.2	-90	-56	-5	
	17 β -Estradiol	271.2	145	-90	-58	-23	1.1
		271.2	183.2	-90	-56	-21	
	Estrone	268.9	145.1	-130	-50	-11	2.3
		268.9	159	-130	-48	-9	
	Ibuprofène	205.1	161	-40	-10	-21	16.1
		205.1	159.2	-40	-10	-21	
	PFOA	412.9	369.3	-55	-16	-7	2.1
		412.9	168.9	-55	-22	-25	
	PFOS	498.9	79.8	-55	-126	-3	4.1
		498.9	98.9	-55	-76	-5	
	4-ter-nonylphénol	219.2	133.1	-110	-44	-7	6.5
		219.2	116.9	-110	-82	-17	
Ter-octylphénol	205.2	133	-75	-30	-11	6.9	
	205.2	116.9	-75	-86	-13		

Table 39: Paramètres de détection des composés d'intérêts en nanoESI (ESI+ et ESI-) : transition MRM (Ion parent > Ion fils), rapport des transitions (T1/T2), et tensions associées aux transitions (DP, CE, CXP)

Les paramètres d'ionisation optimisés pour chacun des modes d'ionisation sont présentés et résumés dans le tableau suivant :

	ESI-	ESI+
IS (V)	-2800	4500
Gaz rideau (CUR (Psi))	8	10
Gaz de nébulisation (GS1 (Psi))	10	10
Température (°C)	250	225

Table 40: Paramètres d'ionisation NanoESI en mode positif et négatif

3. Plan de qualification des performances analytiques

La validation des méthodes d'analyses, ainsi que la détermination de leurs performances peuvent être réalisées en rationalisant le nombre d'expérimentations. Le protocole de validation mis en œuvre a été élaboré sur 3 jours de manière à déterminer l'intégralité des paramètres nécessaires à la validation d'une méthode selon les recommandations ICH, à savoir les précisions intra- et inter-jour,

les rendements d'extraction, le type de fonction réponse (linéarité ou quadraticité reliant la concentration de l'analyte à l'aire du pic chromatographique).

Les limites de quantification méthodologiques (LOQ), ainsi que les gammes dynamiques des composés étant très diverses, il a été nécessaire de constituer chaque niveau de concentration de la gamme dynamique en fonction de la LOQ de chaque molécule. La nature de la fonction réponse, entre la réponse analytique (Aire) et la concentration de l'analyte ciblé a donc été évaluée entre LOQ et 50LOQ. La gamme de concentration sélectionnée comprend 7 niveaux permettant d'obtenir un minimum de 5 à 6 points par molécule pour la validation statistique du modèle de régression. Ainsi, chaque jour, la gamme des 7 niveaux de concentration est extraite en dupliquas. Ces échantillons, correspondant à des aliquots de masse équivalente à un individu pour *P. antipodarum* et *G. fossarum* et à 4 individus pour *C. riparius*, réalisés à partir d'un pool d'organismes blancs, sont dopés à la concentration souhaitée avant extraction (Tableau X).

Afin de pouvoir calculer la précision intra-jour de la méthode avec un minimum de 3 points, un échantillon indépendant par jour à un des niveaux de concentration est ajouté. Nous sélectionnons donc un niveau de basse concentration, un niveau milieu de gamme et un niveau de haute concentration. Les niveaux ainsi sélectionnés sont précisés dans le tableau X illustrant le plan de validation. La précision intermédiaire (n=6) a quant à elle été calculée pour chaque niveau de concentration sélectionné sur les trois jours d'étude.

Les trois niveaux de concentration à partir desquels ont été évaluées les précisions de la méthode, ont également été utilisés pour déterminer les rendements d'extraction et les effets de matrice. Pour ce faire, il a été nécessaire de constituer 3 aliquots de matrice blanche, de les extraire puis de dopé l'extrait ainsi obtenu après extraction et juste avant évaporation. Les rendements d'extraction ont été calculés comme le rapport entre l'aire du composé étudié dans l'échantillon dopé avant extraction sur l'aire de l'échantillon dopé après extraction. Afin de déterminer les effets de matrice, pour chaque jour de validation des standards dans le solvant ont été préparés à la concentration investigués.

En résumé, le plan de validation mis en œuvre, comprenant un totale de 60 analyses

Partie D : Méthode d'analyse relative à l'étude des cinétiques d'accumulation de trois traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum*

1. Préparation d'échantillon

Le prétraitement des crustacés est identique à celui utilisé pour l'évaluation de la bioaccumulation des polluants émergents retenue pour la première étude (Cf. Partie B).

La préparation d'échantillon s'effectue selon une méthode de type QuEChERS, miniaturisée et développée dans le cadre de ces travaux de thèse. Celle-ci comprend une étape d'extraction liquide/liquide assistée par des sels, ainsi qu'une étape de purification sur phase dispersive (dSPE).

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

Après avoir ajouté deux billes en acier inoxydable dans les tubes de centrifugation de 2 mL contenant chacun un organisme lyophilisé, les organismes sont broyés à l'aide d'un Geno/Grinder® (SPEX SamplePrep, Stanmore, Royaumes-Unis) pendant 3 minutes à 1000 rpm. 25 µL de méthanol sont ensuite ajoutés au broyat. Après agitation, le méthanol est évaporé sous flux d'azote, puis 500 µL d'ACN et 500 µL d'eau ultra pure sont ajoutés. Les tubes sont alors vortexés 30 secondes. Après quoi, 500 mg de tampon citrate sont ajoutés. Afin d'éviter l'agglomération des sels au fond du tube, les échantillons sont immédiatement agités manuellement puis vortexés pendant 30 secondes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à température ambiante à 10000 tours/min pendant 2 minutes. L'ajout de sels et la centrifugation permettent la séparation de l'ACN (surnageant) et de l'eau en deux phases immiscibles. 400 µL de surnageant sont alors récupérés puis introduits dans des tubes de centrifugation de 2 mL contenant la phase dSPE préalablement pesée. Pour la méthode optimisée, 80 mg de phase dispersive PSA/C18 sont utilisés, soient 66,7 mg de MgSO₄, 13,3 mg de silice greffée PSA et 13,3 mg de silice greffée C18. Les tubes sont ensuite vortexés pendant 30 secondes puis de nouveau centrifugés à température ambiante à 10000 tours/min pendant 2 min. 200 µL de surnageant sont alors récupérés dans un vial puis évaporés à sec sous flux d'azote. Les extraits sont ensuite reconstitués dans 100 µL d'une solution H₂O/MeOH (90/10) avant d'être analysés par nanochromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode MRM³.

2. Analyse par NanoLC-MS/MS/MS

L'analyse des crustacés par nanoLC-MS/MS/MS est effectuées sur une chaîne de Nanochromatographie (Ultimate3000 ; Thermo Fisher®, Villebon sur Yvette, France) couplée à un spectromètre de masse hybride 5500QTRAP (ABSciex) équipé d'une source Nanospray II (AB Sciex®). Le contrôle de la plateforme analytique s'effectue grâce à deux logiciels : Chromeleon® pour la chaîne nanoLC et Analyst 1.6 pour le contrôle du spectromètre de masse, la collection et le traitement des données.

L'analyse chromatographique s'effectue en deux étapes :

- *La pré-concentration en ligne*: après l'injection les composés sont piégés sur une pré-colonne de phase inverse C18 PepMap 100 de Thermo Fisher® de 5 mm de longueur (L), 300 µm de diamètre interne (di), 5 µm de diamètre de particule (dp) et 100 Å de taille de pores (tp).
- *La séparation* des composés sur une colonne C18 Acclaim PepMap 100 de Thermo Fisher® (L = 15 cm ; di = 75 µm ; dp = 3 µm ; tp = 100 Å). Une seconde colonne de séparation ont été testée mais non retenue pour l'analyse : une colonne C18 Accucore de Thermo Fisher® (L = 15 cm ; di = 75 µm ; dp = 3 µm ; tp = 150 Å).

Dans les conditions optimales la température du four colonne est fixée à 45 °C. Le volume d'injection est de 1 µL et les composés sont piégés sur la pré-colonne pendant 3 min à un débit de 30 µL/min. La phase mobile de chargement est un mélange H₂O/MeOH 98/2 (v/v) acidifiée avec de l'acide acétique (0,05% en volume). La séparation s'effectue à un débit de 400 nL/min. Deux phases mobiles sont alors utilisées: la phase aqueuse composée d'eau ultra pure et d'acide acétique (0,05% en volume) et

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

la phase organique composée de MeOH et acidifiée à l'acide acétique. Le gradient d'élution utilisé est présenté dans la Table 41.

Temps (min)	Débit nano-pompe (nL/min)	% A	% B
0	400	65	35
10	400	50	50
17,5	400	20	80
18	400	5	95
27	400	5	95

Table 41: Gradient d'élution utilisée lors de la séparation des composés (A = H₂O + 0,05% acide acétique, B = MeOH + 0,05% acide acétique)

La détection par spectrométrie de masse s'effectue en mode MRM³ en utilisant la source nanoESI en mode d'ionisation positif. Les transitions MRM³ ainsi que les paramètres composés dépendants tels que le declustering potential (DP), l'énergie de collision (CE), l'énergie potentielle (EP), et l'énergie d'excitation (AF2) ont été déterminés par infusion d'une solution de standard individuel dans un mélange H₂O/MeOH (50/50) + 0,05% acide acétique à une concentration de 10 µg/L. Habituellement en mode MRM classique, deux transitions (ion parent/ion produit) sont utilisées : une pour la quantification et une pour la confirmation. En mode MRM³, une seule transition (ion parent/ion produit/ion sous-produit) suffit, à la fois pour la quantification et la confirmation, puisque la deuxième fragmentation apportée par ce mode est considérée comme équivalente à une deuxième transition MRM. Les différents paramètres optimisés sont présentés dans la Table 42.

	Ion précurseur (m/z)	Ion produit (m/z)	Ion sous-produit (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	AF2 (V)
Carbamazépine	237,3	194,1	179,0	126	10	29	0,11
Oxazépan	286,7	269,1	241,0	106	10	23	0,15
Testostérone	289,4	109,1	79,0	126	10	31	0,12

Table 42: Paramètres MRM³ : transitions, ions précurseurs, ions produits issus des deux fragmentations, declustering potential (DP), énergie potentielle (EP), énergie de collision (CE), énergie d'excitation (AF2)

Partie E : Approches métabolomiques

Les approches métabolomiques mises en œuvre au cours de ces travaux de thèse ont été réalisées à partir des invertébrés benthiques issus des tests d'exposition effectués dans le cadre du projet VERI (Cf. Partie F de ce chapitre).

1. Préparation d'échantillon

La préparation d'échantillons et le conditionnement de ceux-ci (stockage, cycles de congélation/décongélation) ayant un impact non négligeable sur la qualité des résultats issus des approches métabolomiques, il a été décidé dans le cadre de ces travaux de ne pas utiliser les extraits

d'invertébrés injectés lors de l'étude relative à la bioaccumulation des 35 polluants émergents sélectionnés lors des analyses de type ciblées. L'approche métabolomique a ainsi été réalisée à partir des organismes restant, pour lesquels les conditions de stockage et la durée de congélation étaient identiques. Les invertébrés ont été extraits selon le protocole micro-QuEChERS précédemment détaillée dans la partie B de ce chapitre. Seul l'étape de reconstitution de l'échantillon effectuée à l'issue de la procédure d'évaporation à sec a été modifiée. Les extraits sont alors reconstitués dans 200 μL d'un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{MeOH}$ (90/5/5). Pour l'espèce *Gammarus fossarum*, une dilution supplémentaire (facteur de dilution : 50) a été nécessaire pour l'analyse en mode d'ionisation négatif, le premier extrait s'avérant trop concentré et engendrant des phénomènes de saturation du détecteur pour certains signaux.

Un échantillon « contrôle qualité » (QC) a été préparé comme recommandé dans différents articles scientifiques faisant référence à des approches métabolomiques en mélangeant des volumes égaux (10 μL) de chacun des échantillons analysés (ref). Ce pool d'extraits contient tous les composés susceptibles d'être détectés, il est de ce fait considéré comme étant représentatif de l'ensemble des échantillons. L'échantillon QC a été principalement utilisé pour évaluer la qualité des données et pour surveiller l'état du couplage NanoLC-HRMS, c'est-à-dire les éventuelles dérives dans les directions m/z et temps de rétention. Ce QC a également été injectés successivement au début de chaque séquence d'acquisition afin de s'assurer de l'équilibre du système d'analyse (injecteur, colonne chromatographique, source d'ionisation et détecteur). La comparaison des trois premiers chromatogrammes montre des dérives importantes au niveau des temps de rétention ($>0,8$ min). Par conséquent un minimum de 3 injections semble nécessaire à la stabilisation du système.

2. Analyse par NanoLC-HRMS et NanoLC-HRMS/MS

Les analyses non ciblées ont été effectuées sur une chaîne de Nanochromatographie (Ultimate3000 ; Thermo Fisher®, Villebon sur Yvette, France) couplée à un spectromètre de masse hybride QqToF (MicroTOF-QII, Bruker Daltonic) équipé d'une source nanoESI (CaptiveSpray, Bruker Daltonic). Le contrôle de la plateforme analytique s'effectue grâce à deux logiciels : Chromeleon® pour la chaîne nanoLC et DataAnalysis pour le contrôle du spectromètre de masse, la collection et le traitement des données.

2.1. Pré-concentration en ligne et séparation nanochromatographique

Deux méthodes chromatographique, comprenant une étape de pré-concentration en ligne et une étape de séparation, ont été développées pour chacun des modes d'ionisation (positif et négatif). Les paramètres de pré-concentration et d'éluion sont identiques pour chacun des deux modes, seule la nature des phases mobiles diffère d'une méthode à l'autre.

La pré-concentration en ligne est effectuée sur une cartouche de chargement de phase inverse C18 PepMap 100 de Thermo Fisher® de 5 mm de longueur (L), 300 μm de diamètre interne (di), 5 μm de diamètre de particule (dp) et 100 Å de taille de pores (tp). La séparation des composés est quant à

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

elle réalisée sur une colonne C18 Acclaim PepMap 100 de Thermo Fisher® (L = 15 cm ; di = 75 µm ; dp = 3 µm ; tp = 100 Å).

Dans les conditions optimales, la température du four colonne est fixée à 40°C. Le volume d'injection est de 1 µL et les composés sont piégés sur la pré-colonne pendant 4 min à un débit de 20 µL/min. La phase mobile de chargement est un mélange H₂O/ACN/MeOH (98/1/1 (v/v)) acidifiée avec de l'acide acétique (0,05% en volume) dans le cas du mode d'ionisation négatif et avec 0,1% d'acide formique dans le cas du mode d'ionisation positif. La séparation s'effectue à un débit de 300 nL/min. Deux phases mobiles sont alors utilisées: la phase aqueuse composée d'eau ultra pure et d'acide acétique (0,05% en volume) pour le mode négatif et d'acide formique (0,1% en volume) pour le mode positif, et la phase organique composée d'un mélange ACN/MeOH/ACN (45/45/10) acidifiée à l'acide acétique pour le mode négatif et à l'acide formique pour le mode positif (0,05% en volume et 0,1% en volume, respectivement). Le gradient d'élution utilisé est présenté dans le Table 43.

Temps (min)	Débit nano-pompe (nL/min)	% phase aqueuse	% phase organique
0	3	90	10
3	400	65	35
13	400	50	50
20,5	400	20	80
21	400	5	95
30	400	5	95

Table 43: Gradient d'élution pour l'approche métabolomique

2.2. Détection par spectrométrie de masse haute résolution

Dans le cas des analyses NanoLC-HRMS, le spectromètre de masse micrOTOF-QII a été utilisé en mode ToF, le quadripôle étant, dans ce cas, un simple élément de transmission des ions.

Le spectromètre de masse a été calibré de manière externe avant chaque séquence d'analyses à l'aide d'un cluster de formiate de sodium. La même solution a été injectée au début de chaque analyse afin de corriger ultérieurement les éventuelles dérives de l'appareil.

Les spectres ont été acquis sur une gamme de masse comprise entre 50 et 1000 Da en mode positif et négatif à une vitesse d'acquisition de 1 spectre/seconde. L'ionisation a été effectuée dans les conditions suivantes :

- Pression du gaz de nébulisation : 0,6bar
- Débit du gaz de séchage : 4 L/min
- Température de la source : 180°C
- Tension du capillaire : -4500 V en mode positif et 3500 V en mode négatif

Les paramètres de transfert utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Paramètre	Valeur
RF Fennel 1	200 V

RF Fennel 2	200 V
Hexapôle	50 V
Transfert time	70 μ s
PrePulse storage time	1 μ s

Table 44: Paramètres de transfert utilisés pour la méthode NanoLC-HRMS en mode d'ionisation positif et négatif pour une gamme de masse comprise entre 50 et 1000 Da

Dans le cas des analyses NanoLC-HRMS/MS, l'intégralité des fonctionnalités du spectromètre de masse hybride micOTOF-QII ont été utilisées. Le quadripôle a été utilisé comme filtre d'ions qui ont ensuite été fragmentés dans la cellule de collision, analysés et détectés par l'analyseur à temps de vol. Les analyses ont été effectuées en mode Auto MS/MS. Ce mode d'acquisition permet à l'utilisateur de réaliser simultanément l'acquisition des spectres MS et celle des spectres MS/MS. Tous les ions présents dans l'échantillon et dont l'intensité dépasse le seuil limite fixé par l'opérateur sont isolés dans le quadripôle, puis fragmentés dans la cellule de collision. Le mode Auto MS/MS permet ainsi d'obtenir un maximum d'informations en une seule injection, minimisant ainsi le temps d'analyse. Plusieurs méthodes de détection mettant en jeu ce mode d'acquisition ont été développées pour chacun des modes d'ionisation (positif et négatif).

Les paramètres d'ionisation de la première et de la seconde méthodes sont identiques à ceux utilisés pour la méthode en mode HRMS simple. Les spectres ont ainsi été acquis sur une gamme de masse comprise entre 50 et 1000 Da en mode positif et négatif à une vitesse d'acquisition de 1 spectre/seconde. L'énergie de collision a été fixée à 25 eV pour la première méthode et 45 eV pour la seconde, et ce quel que soit le mode d'ionisation investigué.

Les paramètres de détection de la troisième et dernière méthode ont été optimisés de manière à favoriser la détection d'une gamme de masse plus restreinte (50-500 Da). Les paramètres de transferts ont ainsi été ajustés (Table 45). La vitesse d'acquisition de 1 spectre/seconde a été conservée et l'énergie de collision a été fixée à 25 eV.

Paramètre	Valeur
RF Fennel 1	200 V
RF Fennel 2	200 V
Hexapôle	80 V
Transfert time	30 μ s
PrePulse storage time	7 μ s

Table 45: Paramètres de transfert utilisés pour la méthode NanoLC-HRMS en mode d'ionisation positif et négatif pour une gamme de masse comprise entre 50 et 500 Da

3. Traitement des données brutes de type NanoLC-HRMS

3.1. Prétraitement des données

L'étape de prétraitement permet de préparer les données pour l'analyse chimométrique. Elle fait intervenir plusieurs algorithmes (MS PeakFinder, FindMolecularFeatures), chacun donnant accès à plusieurs paramètres présentés sur la Figure 42.

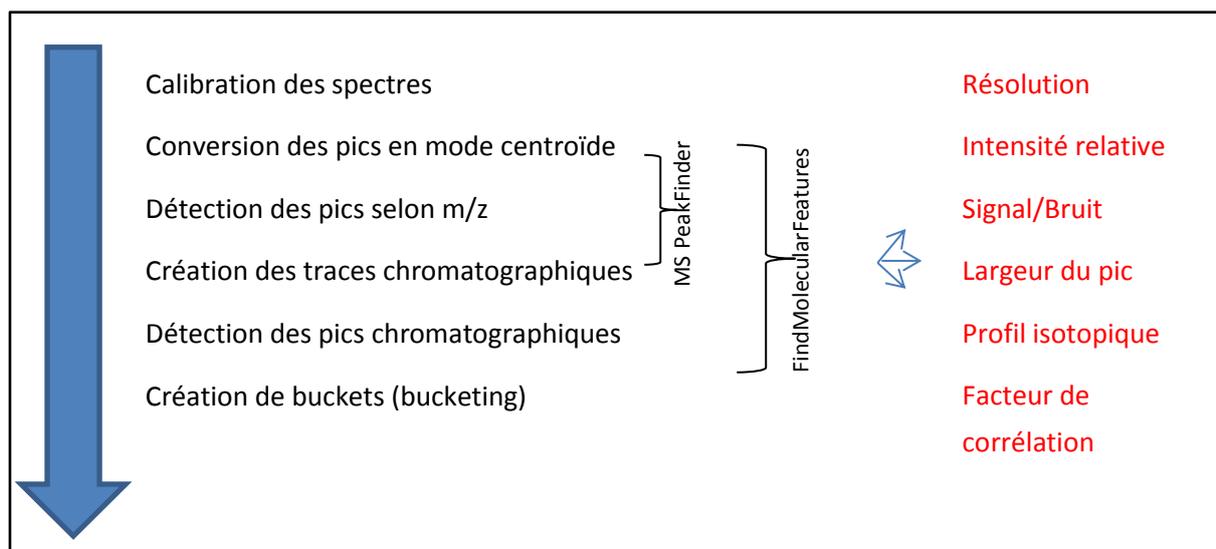


Figure 42: Processus de prétraitement des données brutes

Deux logiciels ont été utilisés pour le prétraitement des données brutes : DataAnalysis (version 4.0, Bruker Daltonic) et ProfileAnalysis (Version 2.0, Bruker Daltonic). Le premier logiciel est utilisé pour la calibration MS, la détection des pics et la génération des formules brutes alors que le second est employé pour l'alignement des temps de rétention et l'obtention de la matrice de données.

3.2. Détection des pics chromatographiques

La détection des pics chromatographique a été réalisée grâce à l'algorithme FindMolecularFeature. La première étape de cet algorithme comprend la transformation des profils m/z en mode centroïde. L'algorithme détecte ensuite les pics m/z en utilisant des paramètres définis avant et après acquisition (résolution, largeur du pic à mi-hauteur, rapport signal/bruit, intensité relative par rapport au pic principal de chaque spectre, intensité minimale absolue). La troisième étape correspond à la création des traces chromatographiques pour chaque pic m/z détecté. Enfin, la dernière étape fait appel à la détection des pics chromatographique. Trois paramètres contrôlent cette étape : le rapport signal/bruit, le coefficient de corrélation et la largeur du pic chromatographique.

Le choix des paramètres a été effectué en fonction des caractéristiques spectrales et chromatographiques des données. Les valeurs retenues sont données dans la Table 46.

Paramètres	Valeurs
------------	---------

Calibration (Internal)	Enhanced quadratic
Paramètres MSPeakFinder	
Resolving power	8000
Peak width at medium height	0,5 points
S/N threshold	3
Relative intensity threshold (base peak)	0,1%
Absolute intensity threshold	100 coups
Paramètres FindMoleculeFeatures	
S/N threshold	3
Correlation Coefficient threshold	0,7
Minimum Compound Length	5 spectres
Smoothing width	1
Paramètres Advanced bucketing	
Time	1,6 min
Mass	10 mDa

Table 46: Paramètres de prétraitement des données brutes, identification des pics spectraux et chromatographiques

3.3. Analyse par des approches chimiométriques et annotation des pics

Le traitement statistique des données a fait appel à deux méthodes mathématiques habituellement utilisées dans le cadre d'études métabolomiques : l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et l'Analyse de la variance ANOVA. Ces méthodes ont été appliquées grâce au logiciel ProfilAnalysis (Bruker Daltonic) qui fournit les résultats sous forme de graphique (Score Plot, Loading Plot).

L'annotation des pics a été effectuée par interrogation de différentes bases de données (ChemSpider, MassBank, HMDB) par rapport à la masse monoisotopique exacte et à la formule brute générée à partir de celle-ci à l'aide d'un outil d'interrogation développé au sein du laboratoire. L'annotation des composés a été vérifiée par rapport au profil isotopique, à l'écart entre la valeur m/z théorique et celle obtenue expérimentalement, et par une évaluation manuelle de la trace chromatographique (rapport signal/bruit, forme du pic). La comparaison des spectres MS/MS obtenus expérimentalement avec ceux disponibles sur les bases de données a également été réalisée dans le but de confirmer l'identification des composés détectés.

Partie F : Sites d'étude et stratégie d'exposition des organismes sentinelles

1. Le projet VERI

1.1. Le site d'étude

Sur proposition de la société Véolia Environnement Recherche et Innovation (VERI), la station d'épuration de l'Arbresle localisée sur le bassin versant Brévenne-Turdine a été retenue comme site atelier, du fait d'un ensemble de conditions favorables :

- sa proximité de Lyon (25 kms environ sur la commune de Nuelles) ;

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

- sa création récente (2010) lui conférant un système de traitement des eaux usées performant ;
- la possibilité d'installer un laboratoire de terrain ;
- l'accord des collectivités locales

1.1.1. Caractéristiques du bassin versant Brévenne-Turbine

Le bassin versant Brévenne-Turdine représente une superficie de 440 km² sur lesquels se répartissent 49 communes et environ 66 000 habitants (données 2009). L'occupation du sol est principalement de nature agricole, avec une zone amont relativement peu anthropisée (Figure 43). Les principales zones urbaines sont concentrées le long de la Turdine et de la Brévenne. Les pressions anthropiques recensées (Figure 44) sont liées aux activités agricoles, urbaines, industrielles et routières (SYRIBT, 2008). Elles conduisent au déclassement de la qualité d'une majeure partie des cours d'eau du bassin versant par le phosphore en période d'étiage, par les nitrates en période hivernale, et sont la cause d'une contamination importante des eaux superficielles en produits phytosanitaires (SYRIBT, 2008).

Les pressions agricoles sont principalement liées aux élevages bovins et ovins, à l'arboriculture et aux cultures fourragères. La surface agricole sur le bassin versant représente environ 400 km². Plus de 50% de la surface agricole utile est constituée de prairies, 10% de vergers, 5% de vignes et 5% de maïs fourrager. Ces activités sont source de contaminations en aminotriazole, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), glyphosate (et métabolite AMPA), diuron, atrazine et piperonyl butoxyde.

Les pressions urbaines sont intrinsèquement liées aux 3 agglomérations présentes sur le bassin versant, à savoir Tarare, Pontcharra et L'Arbresle.

Les principaux axes routiers RN7 et RD389 du bassin versant constituent 53,9 km de routes et sont à l'origine de contamination en zinc, cuivre, cadmium, hydrocarbures et HAP. Par ailleurs, la salaison des routes représente une source importante de sel. Par exemple, quelques 400 tonnes ont été déversées pendant l'hiver 2005-2006, ce qui génère une concentration en sel estimée à 9,5 mg/L en fermeture de bassin.

Enfin, plusieurs industries sont implantées sur le bassin, notamment des industries teinturières, une fabrique de tuiles, des entreprises de traitement de surface ou encore d'extraction de matériaux. On compte également une ancienne carrière à Saint Genis l'Argentière, une mine de pyrite de fer à Soucieux et une décharge à Tarare. Ces différentes activités industrielles sont à l'origine d'une contamination en divers métaux, hydrocarbures, solvants chlorés et dérivés du benzène.

Aucune information relative à la présence de polluants organiques émergents, tels que les substances pharmaceutiques, susceptibles d'être introduites dans le milieu via les rejets agricoles, urbains ou industriels n'étaient disponibles. L'étude réalisée a permis d'acquérir des informations nouvelles sur la présence de certaines de ces substances en amont et aval de la station étudiée sur la Brévenne.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

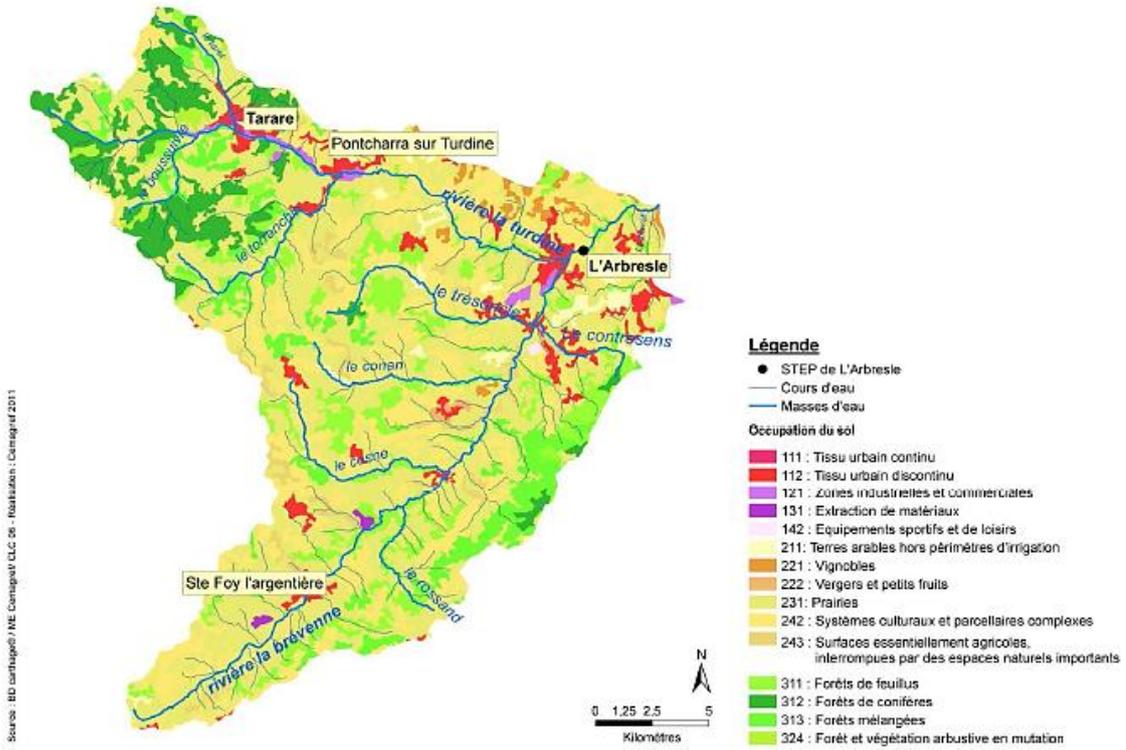


Figure 43: Occupation du sol du bassin versant Brévenne-Turbine

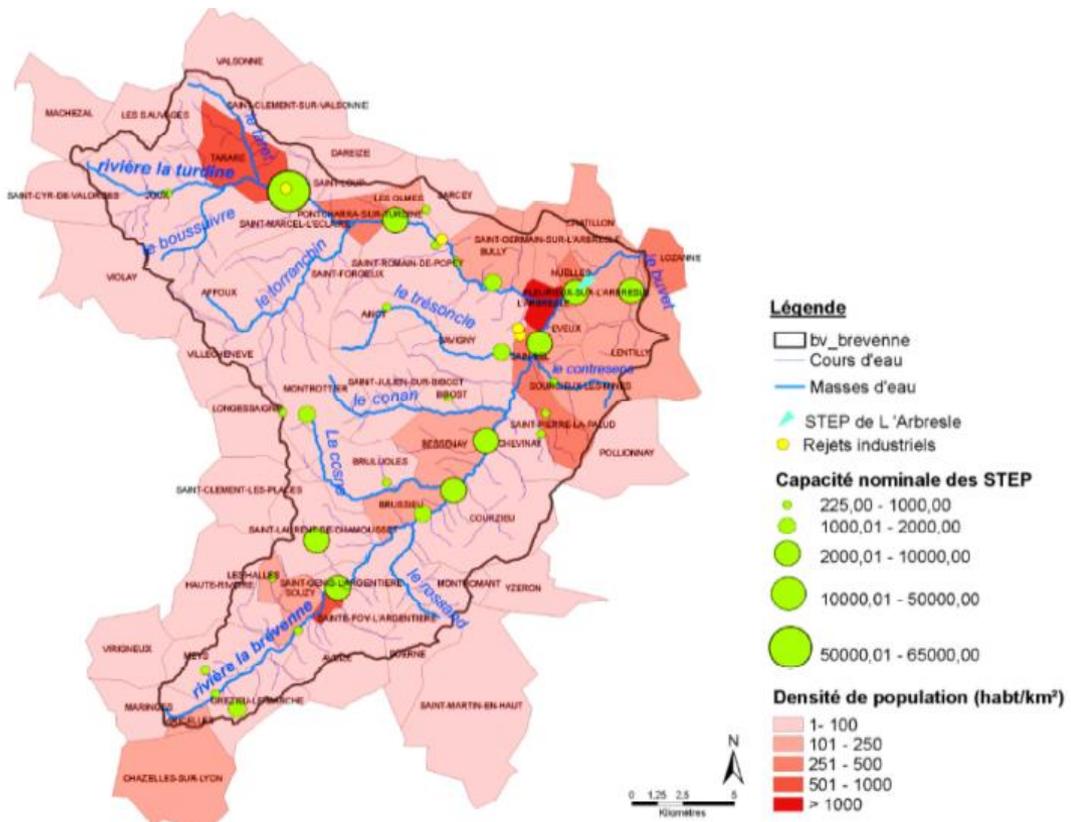


Figure 44: Principales pressions recensées sur le bassin versant de la Brévenne

1.1.2. Caractéristiques de la rivière Brévenne au niveau de la STEP de l'Arbresle

La Brévenne (affluent de l'Azergues et sous-affluent de la Saône) traverse les monts du Lyonnais en direction du nord-est. Son point de départ se situe à Viricelles, petite localité du département de la Loire. La Turdine est son principal affluent.



Figure 45: Photographie de la Brévenne au droit de la station d'épuration de l'Arbresle

Le régime hydrologique de la Brévenne est de type pluvial contrasté. Les observations du débit de la Brévenne de 1969 à 2008 à Saint-Bel, en amont de l'Arbresle mettent en évidence des fluctuations saisonnières assez importantes, qui se caractérise par des hautes eaux hivernales, un débit moyen également important à l'automne et au printemps, et un étiage estival très marqué (minimum de mi-juillet à mi-septembre). Ainsi, les saisons hivernale et printanière restent des périodes où la hauteur d'eau augmente fortement, le débit mensuel moyen variant de 1.84 à 2.44 m³/s (<http://hydro.eaufrance.fr/>). En été, le débit peut baisser jusqu'à 0.343 m³/s. Le module inter-annuel correspond à un débit spécifique de l'ordre de 1,54 m³/s soit 7 l/s/km², ce qui est une valeur relativement faible. Des crues sont observées de façon relativement fréquente avec des débits moyens variant d'un facteur 10 à 40 par rapport aux débits moyens les plus élevés relevés en automne-hiver (SYRIBT, 2008). Enfin, il est important de noter qu'au droit de la STEP de l'Arbresle, en fermeture de bassin, la Brévenne a collecté les rejets d'une trentaine de STEP situées en amont (Figure X).

1.1.3. Caractéristiques de la STEP de l'Arbresle

Construite en 2010, la nouvelle STEP de l'Arbresle comprend:

- Un poste de relèvement en entrée de station, équipée d'un dessableur statique. Il relève les eaux brutes vers les prétraitements surdimensionnés pour alimenter à la fois la filière de traitement complète mais également le bassin d'orage tampon (bassin de traitement des eaux excédentaires en temps de pluie) ;
- Un dispositif de pré-traitement, constitué de 2 dégrilleurs, un dessableur et un dégraisseur vers le biomaster, permet de prétraiter les eaux ;

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

- Un système hydraulique passif réparti vers le bassin d'aération les 278 m³/h et l'excédent vers le bassin d'orage tampon à concurrence de 400m³/h. En fonction de la pluviométrie, ce bassin d'orage équipé d'hydroéjecteur et de pompe relève l'effluent vers les prétraitements afin de suivre la file de traitement complète ;
- Un bassin d'aération à insufflation d'air surpressé par rampes constitue l'étape de traitement biologique ;
- Un traitement physico-chimique du phosphore vient compléter l'alternance anaérobie/aérobie ;
- Un clarificateur ;
- Un traitement tertiaire affine le traitement de l'eau ;

La capacité épuratoire DBO5 est de 827 kg/jour, environ 12400 équivalents habitant, et la capacité hydraulique est de 3898 m³/jour (SIABA, 2010). Actuellement, 4 communes (L'Arbresle, Eveux, Nuelles et Saint- Germain sur l'Arbresle), des canalisations d'eaux pluviales et plusieurs industries (Zone industrielle de Savigny, SMAD, COMELA) sont raccordées à cette STEP.

Sur le site de la STEP, VERI a installé un laboratoire de terrain, permettant la réalisation d'expérimentations contrôlées sur des invertébrés benthiques. Ces conditions expérimentales optimales ont ainsi permis d'exposer en continu les espèces modèles sélectionnées à l'effluent et à plusieurs dilutions, simultanément à des expérimentations de caging en amont et aval du rejet de la STEP.

1.2. Les systèmes expérimentaux mis en œuvre

Afin de répondre aux objectifs de l'étude, un schéma expérimental (Figure 46), reposant simultanément sur des expositions en laboratoire et des expositions (caging d'organismes) sur le terrain a été mis en œuvre. Ce schéma a été reproduit au cours des 2 campagnes de mesures réalisées en été et en automne 2012.

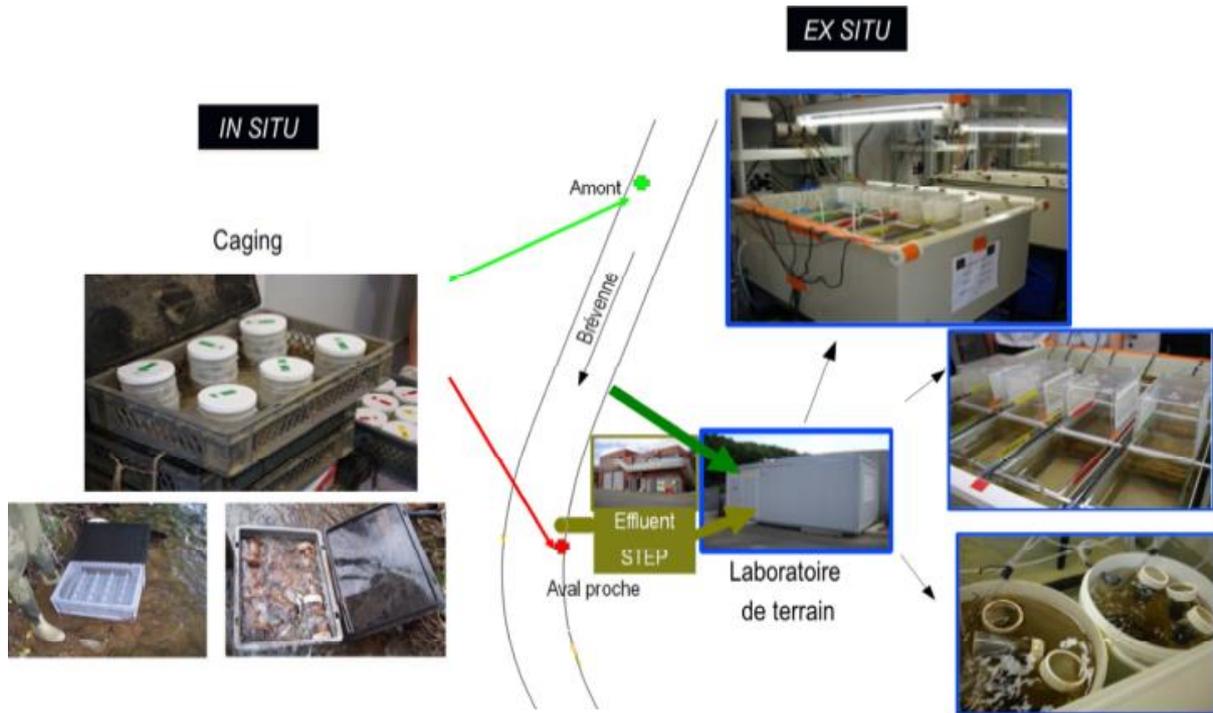


Figure 46: Synoptique de l'approche mise en œuvre pour l'évaluation de l'impact d'un rejet de STEP

1.2.1. Conditions d'exposition des organismes en laboratoire (approche ex situ)

Afin de représenter au mieux les conditions du milieu naturel, le choix des dilutions de l'effluent de STEP par l'eau de la rivière, prélevée à l'aide d'un pompage en amont de la station de traitement, a été déterminé sur la base du ratio entre le débit de rejet de la STEP et celui de la rivière au cours des années 2010 et 2011. Trois conditions d'exposition ont ainsi été retenues :

- 100% eau de la rivière (RIV) : condition comparable aux conditions d'exposition in situ, en amont du rejet de la STEP ;
- 50% d'effluent et 50% eau de rivière (E50) : condition majorant l'exposition des organismes au rejet de l'effluent de STEP ;
- Eau issue du laboratoire de l'élevage des organismes (FOS) : contrôle de la qualité des expérimentations de laboratoire.

La durée d'exposition des organismes a été fixée à 7 jours pour chaque campagne d'exposition.

Le laboratoire de terrain (Figure 47) est alimenté en continu par l'effluent de sortie de STEP et par l'eau de rivière pompée en amont du rejet de l'effluent. Des containers intermédiaires de stockage, avant distribution dans les systèmes d'exposition, permettent de réduire les risques d'interruption de pompage. Ce dispositif permet de réaliser des expositions à différentes dilutions de l'effluent, en conditions de température et de photopériode contrôlées.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

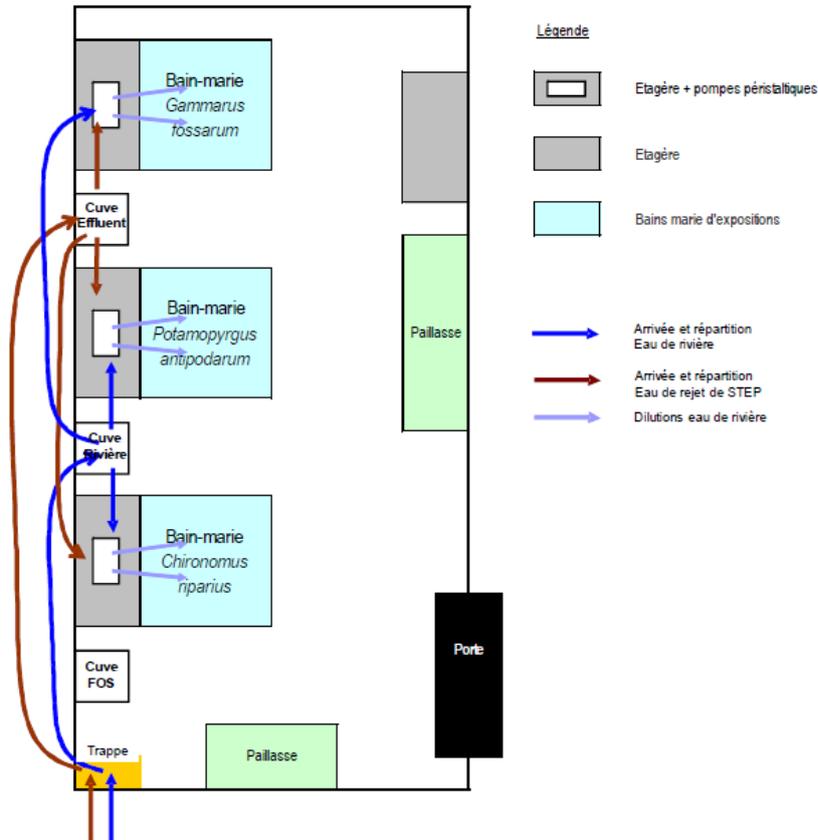


Figure 47: Schéma du laboratoire de terrain

Les bains marie d'exposition sont thermo régulés aux températures requises pour chacune des espèces, $12\pm 1^\circ\text{C}$ et $20\pm 1^\circ\text{C}$ pour le gammare, le chironome et le gastéropode respectivement. Des lots d'individus sont exposés dans des récipients adaptés, similaires à ceux mis en œuvre sur le terrain. Durant toute la durée de l'exposition, les organismes sont nourris *ad libitum* selon la procédure utilisée pour la stabulation et l'élevage des espèces en laboratoire.

1.2.2. Conditions d'exposition des organismes sur le terrain (approche in situ)

En vue de caractériser l'impact éventuel du rejet de STEP et pour comparer les réponses des organismes dans des conditions d'exposition de laboratoire ou de milieu, nous avons sélectionné deux stations pour réaliser l'encagement in situ:

- une première station en dehors de tout impact de systèmes de traitement des eaux usées, en amont du rejet de l'effluent et en amont du déversoir d'orage ;
- Une seconde proche du rejet de l'effluent ;

Cette approche permet d'étudier la bioaccumulation des organismes en conditions réelles, dans la rivière, de comparer sur l'eau amont les réponses entre exposition au laboratoire et *in situ*, et de rendre compte du gradient d'exposition chimique auquel sont soumis les organismes.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

Les expositions au laboratoire et sur le terrain sont calibrées de manière à fournir la quantité d'organismes nécessaires aux analyses chimiques en vue de la détection de « traceurs chimiques » de la contamination biodisponible issue du rejet.

Afin de déterminer les emplacements garantissant l'exposition au rejet des organismes engagés en aval du rejet, le panache de l'effluent de STEP a été préalablement étudié par traçage à la fluorescéine dans la rivière.

Lors de chaque campagne d'expérimentation, des organismes de taille, sexe et stade de développement connus ont été exposés sur le terrain dans des systèmes expérimentaux développés et utilisés depuis plusieurs années par le laboratoire IRSTEA. Les organismes ont été nourris pendant la durée de l'exposition. Deux types de systèmes d'exposition adaptés à l'espèce ont été mis en œuvre.

L'exposition des crustacés et des gastéropodes a été réalisée dans des récipients de 180ml en polypropylène (PP) dont le bouchon a été percé et le fond remplacé par un tamis (maille : 1 mm) (Figure 48A). Le système est fermé à l'aide d'un autre tamis (maille : 500 µm) fixé par le bouchon percé. Grâce aux tamis, les organismes sont en contact permanent avec l'eau du site étudié. Ceci permet également de maintenir un taux d'oxygène optimal dans le système.

L'exposition des chironomes est effectuée dans des pots de 1000 ml en PP dans lesquels ont été découpées deux fenêtres (Figure 48B). Celles-ci sont fermées au moyen d'un tamis (maille : 300 µm) fixé par du ruban adhésif, ce qui permet ici aussi la circulation de l'eau ainsi que le renouvellement de l'oxygène dans le système. La larve de chironome vivant dans le sédiment, le fond du système est recouvert par une couche de silice enrichie (solution de Tétramin[®], selon le protocole de la norme AFNOR XP T90-339-1) d'environ 2 cm d'épaisseur.

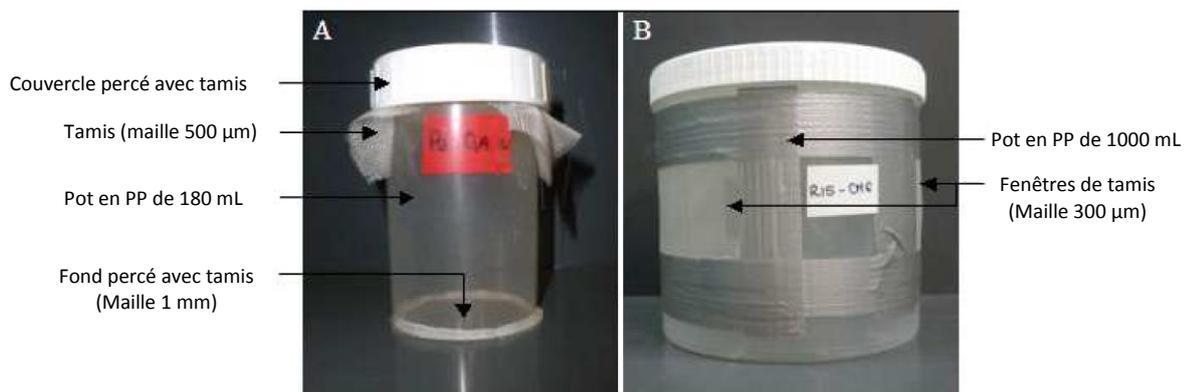


Figure 48: Systèmes d'exposition des crustacés ou gastéropodes (A) et des chironomes (B)

Les cages d'exposition sur le terrain sont présentées sur la Figure 49 (ici avec les systèmes pour les gammarès ou gastéropodes). Elles peuvent contenir 6 systèmes pour les chironomes ou 20 systèmes pour les gammarès et gastéropodes. Ceux-ci y sont fixés grâce à des colliers en polychlorure de vinyle (PVC).



Figure 49: Cage de terrain

2. L'observatoire SIPIBEL

2.1. Le site d'étude

Le site pilote de Bellecombe (SIBIBEL) constitue un bassin expérimental exceptionnel du fait de sa configuration physique, des acteurs mobilisés autour de ce projet et de leur capacité à mettre en œuvre de l'observation et de la recherche.

2.1.1. Historique

En 2009, le Syndicat Intercommunal de Bellecombe (SIB) (aujourd'hui Syndicat des Eaux des Rocailles et de Bellecombe) a décidé de programmer des travaux d'extension de sa station d'épuration en raison, notamment, de la construction d'un nouvel hôpital sur son territoire. Ainsi, un arrêté préfectoral relatif à l'autorisation de ces travaux, paru le 7 mai 2009, a imposé deux obligations réglementaires :

- pour l'exploitant : l'obligation de collecter et de traiter les eaux usées du futur hôpital sur une file biologique réservée, pour une durée minimale de 3 ans à compter de l'ouverture de l'établissement
- pour le centre hospitalier : l'obligation de réaliser une étude de caractérisation des effluents de l'hôpital avant sa mise en service, et à l'issue d'une période minimale de 3 ans après son ouverture

Cet arrêté a conduit le Syndicat de Bellecombe et le Centre Hospitalier Alpes Léman (CHAL) à envisager la mise en place d'un programme d'étude ambitieux permettant de répondre à ces obligations réglementaires. Le SIB a donc sollicité l'association GRAIE (Groupe de Recherche Rhône-Alpes sur les Infrastructures et l'Eau), expérimentée dans l'animation de dispositifs de recherche pluridisciplinaires, qui a su mobiliser un consortium de scientifiques spécialistes de cette thématique. Degrémont Suez, concepteur de la station a également pris part au projet dès sa construction.

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

Une première réunion en mars 2010, réunissant les membres fondateurs et les partenaires, a ainsi permis d'établir les bases de Sipibel (Site Pilote Bellecombe), projet ayant pour objectifs de réaliser l'étude de la caractérisation, de la traitabilité et des impacts d'un effluent hospitalier.

Afin de caractériser un état zéro, avant l'ouverture du centre hospitalier en février 2012, un protocole de suivi a été établi et mis en place en 2011.

L'observatoire fonctionne "en routine" depuis février 2012. Il est le support d'actions de recherche, dont ces travaux de thèse font partie intégrante.

2.1.2. Présentation

Le Centre Hospitalier Alpes-Léman (CHAL) mis en service en février 2012, est situé à proximité de la station d'assainissement de Bellecombe (commune de Scientrier en Haute-Savoie).

Le site complet comporte :

- un hôpital neuf avec un réseau de collecte distinct,
- une station d'épuration (STEP) dont une ligne de traitement peut être entièrement dédiée au programme d'étude sur plusieurs années,
- un rejet dans l'Arve, rivière qui alimente une partie des ressources en eau destinée à la consommation humaine du Genevois.



Figure 50: Vue aérienne du Site Pilote de Bellecombe

Actuellement, le Syndicat de Bellecombe gère 230 Km de réseaux et la station d'épuration mise en service en 1979. Avec une capacité de 5 400 équivalents habitants (EH), elle a été agrandie en 1995 pour porter sa capacité à 16 000 EH. En 2009, elle a fait l'objet d'une nouvelle extension à 32 000 EH. Ces travaux d'extension ont été en partie justifiés par la création du nouveau centre hospitalier. Le rejet de cet établissement de près de 500 lits a été estimé à 2 000 EH. Un réseau, distinct du réseau domestique existant à proximité du site de l'hôpital, a été construit de façon à acheminer ces effluents directement vers la STEP, séparément des effluents domestiques. Cet ensemble unique

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

permet de développer un programme d'étude particulièrement intéressant en réalisant des expériences pouvant à volonté mélanger ou non les effluents de l'hôpital avec ceux du réseau urbain.

Le traitement biologique des eaux peut donc s'effectuer sur trois filières :

- Filière 1 d'une capacité de 5 400 EH
- Filière 2 d'une capacité de 10 600 EH
- Filière 3 d'une capacité de 16 000 EH

Dans le cadre de cet observatoire, il a été prévu la possibilité de traiter les effluents hospitaliers, soit en commun avec les effluents domestiques en les mélangeant et en répartissant l'ensemble des effluents sur les trois filières, soit séparément en dédiant la filière 1 de 5 400 EH à ces effluents, et en envoyant les effluents urbains vers les filières 2 et 3 d'une capacité totale de 26 600 EH.

De même, l'atelier de déshydratation des boues par filtre à bandes, a été remplacé par un filtre presse, qui permettra un traitement séparé des boues en provenance des différentes filières de traitement des eaux, le filtre à bandes ayant été conservé en secours sur la filière « hôpital ».

Principal cours d'eau de la Haute-Savoie (département dont il draine environ 1/3 du territoire), l'Arve constitue le milieu récepteur des effluents de la STEP de Bellecombe. Cette rivière naît dans les alpages du col de Balme pour courir vers Genève rejoindre le Rhône à la sortie du lac Léman, 107 kilomètres plus loin. Elle croise sur son tracé une trentaine de rivières et torrent affluents, parmi lesquels l'Aveyron, le Bonnant, le Giffre ou encore le Menoge. L'Arve traverse une grande variété de paysages (gorges, cluses, zones humides), dans cette vallée qui porte son nom. La vallée de l'Arve est très fortement urbanisée (pôle urbains de Chamonix, Sallanches, Cluses, Bonneville, La Roche sur Foron, Annemasse/Genève), touristique (en particulier sur son cours supérieur) et très industrielle (pôle international de l'industrie du décolletage), témoignant ainsi des nombreuses pressions anthropiques auxquelles elle est soumise.

Le bassin versant de l'Arve peut être divisé en trois bassins de régimes hydrologiques différents.

Le haut bassin constitué par la vallée de Chamonix, des Contamines-Monjoie et de la Diosaz est caractéristique des torrents de régime glaciaire. Il s'agit de torrents issus du massif du Mont-Blanc et du massif des Aiguilles Rouges, dominé par la présence de nombreux glaciers de grande superficie. La présence des glaciers et les altitudes élevées ont deux conséquences essentielles :

- Elles permettent un apport d'eau non négligeable en période d'été dû à la fonte des neiges et des glaces pérennes
- Elles favorisent également un stockage des précipitations sous forme solide, ce qui a tendance à limiter la violence des crues. Cependant, le risque de débâcles glaciaires et de crues de fonte persiste tout de même

Les fortes crues locales sont de type orageux et surviennent en fin d'été (juillet à septembre)

Le bassin intermédiaire est représenté par la vallée alluviale de l'Arve entre Le Fayet et Bonneville et les vallées affluentes du Giffre, du Borne, ainsi que des multiples torrents qui parviennent

directement à l'Arve sur ce tronçon. Cette zone est exposée aux perturbations les plus fréquentes d'ouest (d'origine océanique), elle est par conséquent soumise à un régime pluvio-nival de forte intensité. Les précipitations y sont fortes et se traduisent par des débits très abondants, les crues qui en résultent se manifestent surtout au printemps (pluie et fonte) et dans une moindre mesure en fin d'été (orages).

Le relief du bassin aval de l'Arve et de son principal affluent le Menoge, constituent les premiers contreforts du massif alpin, peu abrité par le Jura des perturbations d'Ouest dominantes. Il reçoit à ce titre des précipitations pluviales importantes dont les maximas se situent entre l'automne et le printemps. Ce type de crue peut donc survenir en hiver. On note que le régime du bassin aval est à peu près inverse de celui du bassin amont : il en résulte pour l'ensemble du bassin un étalement des probabilités de crue, qui peuvent survenir en toutes saisons, même si les mois de juin-juillet-août puis octobre-novembre restent privilégiés. On souligne également que les crues de l'Arve sont très rapides : quelques heures à l'amont et moins d'une journée à l'aval.

Les campagnes de mesures mises en place sur l'observatoire SIPIBEL répondent aux objectifs de caractérisation des effluents, de leur traitabilité, de leur impact sur la qualité des milieux récepteurs et des risques potentiels pour la santé. La comparaison des effluents hospitaliers aux effluents urbains est au cœur du dispositif.

Des prélèvements et analyses sont réalisés sur différentes matrices (Figure 51):

- Les effluents urbains et les effluents hospitaliers sont gérés en parallèles sur deux files distinctes. Ils font l'objet d'analyses sur :
 - Les effluents en entrée de station d'épuration – « Eaux brutes » : les eaux filtrées et les particules
 - Les effluents en sortie de station d'épuration – « Eaux traitées »
 - Les boues activées
- 3 points sont suivis sur l'Arve : un point en amont, un point à l'aval immédiat des rejets de la station d'épuration (Arve aval 1) et un point plus éloigné (Arve aval 2).

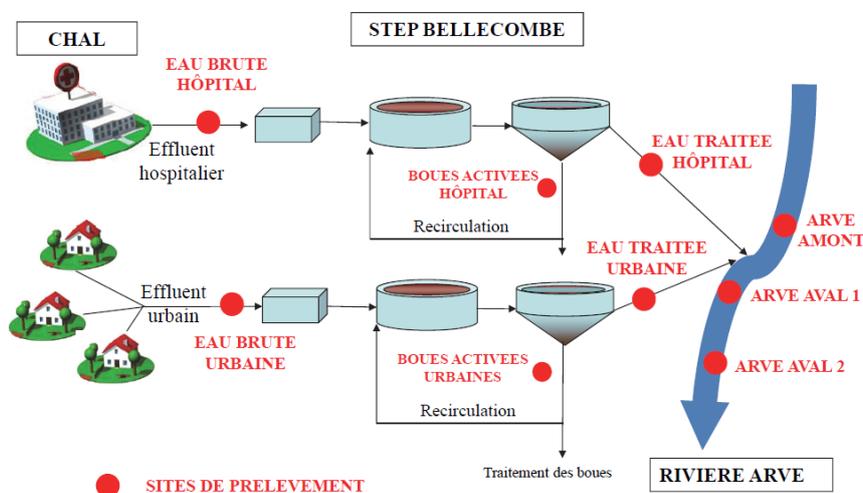


Figure 51: Site de prélèvement de l'observatoire SIPIBEL

Chapitre 2 : Matériels & Méthodes

L'ensemble des prélèvements sont effectués sur une durée de 24h (de 8h à 8h). Ils sont asservis (régulés) aux débits de la STEP ou de l'Arve, afin de constituer un échantillon représentatif des variations de débits importantes que connaissent la station et la rivière au cours d'une journée.

Cet observatoire ayant pour objectif de mettre en évidence la présence ou l'absence de polluants à l'état de traces, le protocole adopté (nettoyage des flacons, préleveurs utilisés...) tend à éviter toute contamination accidentelle des échantillons durant le prélèvement, qui pourrait fausser les résultats d'analyses. Des tests de « blancs de prélèvement » sont également effectués afin de contrôler régulièrement la fiabilité du protocole.

Les analyses de l'observatoire SIPIBEL portent sur les paramètres classiques, mais aussi sur des paramètres spécifiques aux activités de soin et sur des indicateurs permettant d'évaluer à terme les risques pour l'environnement et pour la santé.

Ils comportent :

- des indicateurs de qualité globale classiques (DCO, DBO, MES, COT ...),
- des micropolluants :
 - médicaments : sélectionnés en fonction de leur consommation, de leur risque potentiel pour l'environnement et la santé (bioaccumulation, effets toxiques mis en évidence), et des possibilités analytiques des laboratoires
 - détergents
 - Composés Organiques Volatils (COV)
 - halogènes organiques adsorbables (AOX)
 - métaux dont le gadolinium utilisé en milieu médical, etc.
- des paramètres microbiologiques :
 - les Intégrons de Multirésistance (IMs) : qui permettent d'évaluer la présence des bactéries multirésistantes aux antibiotiques dans les rejets et l'environnement
 - les *Pseudomonas aeruginosa*, pathogènes opportunistes, n'ont été suivis qu'après la mise en service du CHAL en février 2012
- des paramètres biologiques :
 - essais d'écotoxicité aigues et chroniques sur micro-crustacés et micro-algues
 - essais de génotoxicité : test d'Ames et essai des Comètes
 - mesure du potentiel de perturbation endocrinienne
 - indices biologiques de la qualité de la rivière : Indice Biologique Normal Globalisé (IBGN), Indice Biologique Diatomées (IBD)

Les résultats de ces analyses, réalisées par les différents laboratoires (académiques ou privés) sont concaténés sur une base de données accessible pour tous les partenaires du projet.

2.2. Condition d'exposition des mollusques *Potamopyrgus antipodarum*

Dans le cadre de cette étude seule l'espèce *Potamopyrgus antipodarum* a été considérée. Les mollusques ont été exposés dans le milieu récepteur des effluents de STEP constitué de la rivière Arve. Trois sites d'encagement ont été retenus pour ces travaux (Figure 51) :

- Le site Arve amont, situé en amont du rejet de STEP
- Le site Arve Aval 1, situé directement sous le rejet
- Le site Arve Aval 2, situé en aval plus éloigné du rejet

La durée d'exposition a été fixée à 42 jours compris sur la période du 5/09/2012 au 18/10/2012.

La procédure d'encagement des organismes utilisée dans le cadre de cette étude était similaire à celle présentée pour le projet VERI. Des sondes pH-métriques et conductimétriques ont été attachées aux dispositifs d'encagement de manière à pouvoir contrôler le pH et la conductimétrie du milieu pendant toute la durée de l'exposition. Contrairement aux études réalisées dans le cadre du projet VERI, les mollusques n'ont pas été nourris *ad libitum* par des solutions de tétramin ou par des épinards durant la période d'exposition. Une autre stratégie d'alimentation a donc été investiguée : deux mois avant le début des tests d'exposition, les dispositifs d'encagement ont été disposés dans la rivière sur chacun des 3 sites d'exposition de manière à ce qu'ils soient colonisés par des biofilms. Ceux-ci constitueront la source de nourriture des gastropodes pendant la période d'exposition. Cette stratégie d'alimentation avait par ailleurs déjà été décrite par Brown et al, 1980.

3. Le bassin de la Bourbre

3.1. Présentation du site d'étude

Les sites d'exposition relatifs à cette troisième étude se concentrent sur le bassin versant de la Bourbre situé en région Rhône-Alpes, et plus particulièrement dans le département de l'Isère (38).

Drainé depuis le début du siècle par divers canaux rejoignant la Bourbre ou ses affluents, ce bassin versant reste en grande partie marécageux, malgré un point culminant à 771 m. La faible pente présentée par les courbes hypsométriques vers les basses altitudes est caractéristique des bassins versants à vastes zones inondables.

La Bourbre est un affluent direct du Rhône qui prend sa source sur la commune de Burcin, à 495 mètres d'altitude. La longueur de son cours est de 72,2 km. Cette rivière de plaine a vu son lit fortement rectifié au fil des ans, pour l'utilisation de la force hydraulique, la valorisation des terres agricoles et l'urbanisation. Elle reçoit 3 principaux affluents en rive gauche à caractère torrentiel : l'Hien, l'Agny et le Bion. La Bourbre reçoit également en rive droite, les eaux du Canal du Catelan, émissaire creusé par l'homme pour drainer une vaste plaine marécageuse. L'ensemble de ces principaux cours d'eau forme un réseau hydrographique d'environ 150 km.

La Bourbre est une rivière de piémont abondante, alimentée par des précipitations abondantes. La lame d'eau écoulée dans son bassin versant est de 344 mm annuelle, ce qui est légèrement supérieur

à la moyenne d'ensemble de la France, mais nettement inférieure à la moyenne de la totalité du bassin du Rhône. La Bourbre présente des fluctuations de débit fortes à modérées, avec des périodes dites de hautes eaux, de décembre à mai inclus, portant les débits mensuels moyens de 8,84 à 10,2 m³/s (avec un maximum en février-mars), et des périodes dites de basses eaux, de juillet à septembre, avec un minimum mensuel de 3,80 m³/s au mois d'août. En période d'étiage, le volume consécutif minimal pour 3 jours peut chuter jusqu'à 1,4 m³, ce qui notons le reste tout de même abondant (source hydro géo). Les crues de la Bourbre ne sont pas rares, l'agglomération de Bourgoin-Jallieu a par ailleurs été touchée par des crues successives de 1988 à 1993, ce qui a conduit les autorités compétentes à entreprendre des travaux de renforcement des berges.

3.2. Condition d'exposition des mollusques *Potamopyrgus antipodarum*

Dans le cadre de cette dernière étude de terrain, 4 sites d'exposition localisés sur le bassin versant précédemment décrit ont été retenus. Ils sont répartis sur la Bourbre, ainsi que sur un de ses affluents, le Bion. Les deux premiers sites d'exposition sont situés en amont et en aval de la confluence de ces deux cours d'eau. Le troisième site d'encagement est localisé sur le Bion, en amont d'un rejet de station d'épuration ayant été rénovée peu de temps avant notre étude de terrain et possédant une capacité d'épuration de 78000 EH. Enfin, le dernier site d'exposition correspond à la confluence de la bourbe et du Bion (figure X).

Les mollusques *Potamopyrgus antipodarum* ont été engagés sur chacun de ces sites d'exposition selon la procédure précédemment décrite (cf. 2.). La durée d'exposition a été fixée à 42 jours, du 6 au 21 octobre 2009. Un thermomètre a été fixé aux dispositifs d'encagement de manière à suivre continuellement l'évolution de la température du milieu. Le pH et la conductimétrie ont été contrôlés une fois par semaine pendant toute la durée de l'exposition. Les gastropodes ont été nourris une fois par semaine à l'aide d'épinard directement introduit dans les cylindres d'exposition.

4. Etude des cinétiques d'accumulation de polluants émergents chez *Gammarus fossarum*

Contrairement aux études précédentes, les travaux réalisés dans le but d'étudier les cinétiques d'accumulation de trois traceurs de pollution anthropiques (carbamazépine, oxazépam et testostérone) chez *Gammarus fossarum* ont été effectués exclusivement en laboratoire.

4.1. Conditions d'exposition des crustacés *Gammarus fossarum*

Un protocole d'exposition sur 14 jours, auxquels s'ajoutent deux jours de dépuración a été mis en place au laboratoire d'écotoxicologie de l'IRSTEA. Les crustacés sont placés dans des béciers contenant 500 mL d'eau de FOS dopés en contaminants étudiés. Les solutions d'exposition sont préparées chaque jour à partir de solution mères méthanoliques. Les volumes de dilution ont été calculés de manière à ce que la solution ne contiennent que 0,1 % de méthanol (v/v), afin d'éviter les potentiels effets toxiques associés à ce solvant organique. Ces béciers sont placés dans un bain-marie thermostaté maintenu à 12°C. Quelques feuilles d'aulnes sont ajoutées à chaque bécier afin

de nourrir les gammares *ad libitum*. Quinze organismes par béccher sont introduits afin de compenser les risques de mortalité et de disposer d'au moins 10 individus à analyser par béccher. Les gammares étant très sensibles au niveau d'oxygène dissous de l'eau, celle-ci est renouvelée chaque jour avec de l'eau de FOS à 12 °C préalablement oxygénée pendant 24h et dopée en contaminant. Le renouvellement d'eau permet également de maintenir une concentration en polluant identique d'un jour à l'autre, en minimisant notamment les phénomènes d'absorption et de dégradation. Cela permet enfin de limiter le développement bactérien, grand consommateur, d'oxygène dans le béccher. Avant le début de l'exposition, l'eau dopée est analysée afin de connaître la concentration exacte présente dans les bécchers. Trois gammares non exposés sont également analysés de manière à s'assurer qu'il n'existe aucune contamination préalable. Afin de s'assurer des bonnes conditions d'exposition, chaque jour, les organismes sont comptés pour évaluer la mortalité. La température, la conductivité et le pH sont contrôlés avant et après renouvellement. Les prélèvements sont effectués à 12h, 24h, 48h, 3 jours, 7 jours, et 14 jours d'exposition. Au bout des 14 jours d'expositions, une partie des gammares restant est collectée pour être analysée, tandis que l'autre partie est mise dans des bécchers contenant de l'eau de forage non contaminée. Les crustacés sont alors prélevés à 24h et 48h après la fin de l'exposition de manière à pouvoir évaluer les cinétiques de dépuraton.

4.2. Dosage des contaminants dans les milieux d'exposition

L'eau de FOS dopée avec les contaminants étudiés est analysée selon une méthode déjà développée et validée par l'équipe TRACES. Celle-ci est effectuée par HPLC-MS/MS sur une plateforme Agilent 1290 couplée à un spectromètre de masse QTRAP3200 (ABSciex®), muni d'une source ESI (TurboSpray, ABSciex). La colonne utilisée est une Kinetex C18 de Phenomenex® (L = 5cm ; di = 2,1 mm ; dp = 2,6 µm). La phase mobile aqueuse est composée d'eau ultra pure acidifiée à 0,05% en volume d'acide acétique, la phase mobile organique est quant à elle composée de MeOH également acidifié avec 0,05% en volume d'acide acétique. La détection s'effectue en MRM. La quantification s'effectue avec la méthode des ajouts dosés. L'eau de forage est analysée une fois avant le début de l'exposition, puis après 24h d'exposition.

Chapitre 3:

*Développement et validation
de méthodologies analytiques
permettant la quantification
de polluants émergents chez
trois invertébrés benthiques
par MicroQuEChERS-
NanoLC-MS/MS*

Introduction

Le principal défi analytique de ces travaux de thèse consistait à mettre au point une méthode d'analyse permettant d'identifier, de caractériser et de quantifier une vaste gamme de polluants émergents, appartenant à diverses familles chimiques et présents à l'état de traces voire d'ultra-traces, dans des microorganismes aquatiques d'eau douce.

La recherche bibliographique présentée dans le premier chapitre de ce mémoire nous a permis de constater une utilisation majoritaire de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse des substances d'intérêts dans des matrices biotiques. Dans le cas de l'analyse de microorganismes, la recherche de sensibilité et l'utilisation des techniques d'extraction courantes, nécessitant des prises d'essai importantes, contraignent l'opérateur à utiliser un nombre important d'organismes, et ce pour chaque analyse. Les actions d'amélioration recherchées dans le cadre de ce projet visaient à développer une stratégie analytique permettant de miniaturiser l'intégralité du protocole analytique, de l'étape d'extraction en passant par l'étape d'analyse, de manière à transposer la méthode à l'échelle d'un microorganisme, ce qui ne représente qu'une dizaine de mg. A la réalisation de tels objectifs s'ajoutait également la nécessité d'obtenir une méthode d'analyse simple, rapide et robuste, et ce malgré l'hétérogénéité des propriétés physico-chimiques des molécules sélectionnées et de la complexité des matrices investiguées. Au regard de la littérature, la nanochromatographie liquide, particulièrement adaptée aux échantillons disponibles en quantité infime, s'est imposée comme une technique de choix. Bien que peu utilisée dans le domaine de l'analyse environnementale, cette technique séparative semble posséder toutes les caractéristiques nécessaires à la réalisation de nos objectifs. Ces travaux seront également pour nous l'occasion d'évaluer le potentiel d'une telle technique dans un domaine d'application où l'abaissement des limites de détection est aujourd'hui devenu primordial. Afin de bénéficier de la sensibilité et de la sélectivité requises pour ce type d'analyse, la nanochromatographie liquide a été couplée à un spectromètre de masse de type triple quadripôle, muni d'une interface nano-ESI, parfaitement adaptée aux faibles débits générés par le système séparatif, et permettant l'ionisation de l'intégralité des micropolluants sélectionnés.

Concernant l'étape d'extraction, nous avons envisagé de miniaturiser et d'optimiser une méthode rapide et simple à mettre en œuvre, connue sous le nom de méthode QuEChERS. Cette technique nous permettait de réaliser l'étape d'extraction à l'échelle d'un organisme, tout en diminuant considérablement les quantités de produits chimiques classiquement employées, promouvant ainsi une chimie plus verte.

Dans le cadre d'analyses chimiques quantitatives de micropolluants organiques dans des échantillons environnementaux, la méthodologie classiquement appliquée est divisée en quatre phases majeures:

- le prélèvement de l'échantillon,

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

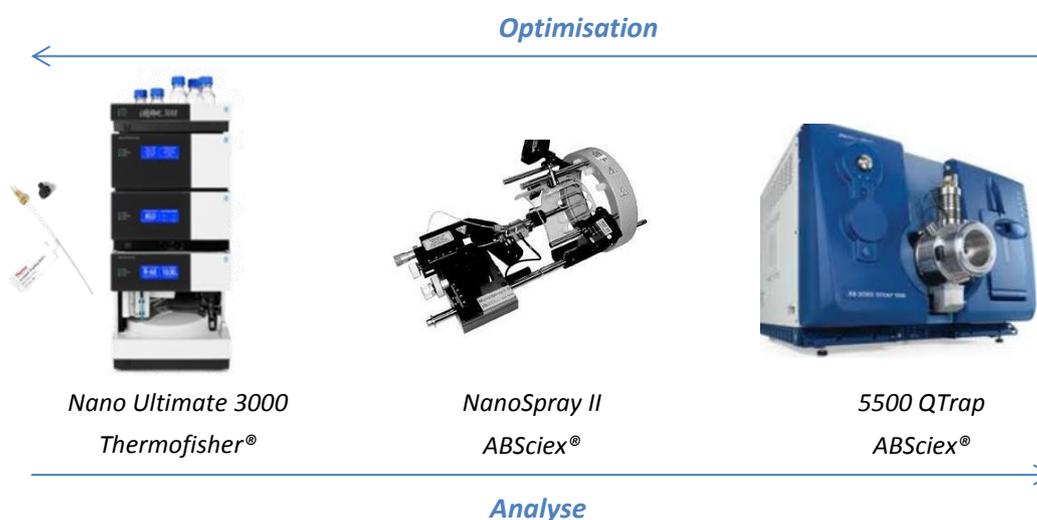
- l'extraction et la concentration des composés d'intérêts,
- l'analyse finale permettant la séparation, la détection et la quantification des analytes,
- la validation du protocole développé selon différents critères de qualité

La première partie de ce chapitre sera ainsi consacrée au développement et à l'optimisation de la méthode d'analyse par nanoLC-nanoESI-MS/MS destinée à l'étude de la bioaccumulation de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques. La seconde partie sera dédiée à la mise au point de la méthode d'extraction par micro-QuEChERS. Et enfin, la troisième partie présentera la validation du protocole analytique mis en place.

Partie A : Mise au point de la méthode d'analyse des substances d'intérêts par nanoLC-nanoESI-MS/MS

Développer une méthode analytique fiable par nanoLC-nanoESI-MS/MS possédant un haut degré de spécificité, de sélectivité et de sensibilité afin d'étudier la bioaccumulation de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques constituait le principal objectif de ces travaux. Pour ce faire, il a été essentiel d'établir une liste de substances d'intérêts : 35 micropolluants organiques, tous caractéristiques de rejets urbains et/ou industriels, ont ainsi été retenus, en raison de leur occurrence avérée dans les systèmes aquatiques, leur présence dans une ou plusieurs listes de priorisation et leur faisabilité d'analyse par LC-MS/MS. Cette liste inclue une grande majorité de résidus pharmaceutiques, mais également des hormones, des agents industriels et des pesticides. Il a donc été nécessaire d'optimiser successivement, et dans un ordre spécifique, les paramètres de chacun des modules constituant le système d'analyse afin d'atteindre la sensibilité nécessaire à l'analyse de polluants de caractéristiques physico-chimiques très différentes à des concentrations environnementales de l'ordre de la trace voir de l'ultra trace.

Bien que l'analyse commence par la séparation par nanoLC, suivie de l'ionisation par nanoESI, et se termine par la détection par MS/MS, l'optimisation doit être effectuée en sens inverse (Figure 52).



Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

Figure 52: Système NanoLC-NanoESI-MS/MS utilisé dans le cadre de ces travaux de thèse

Ainsi, dans un premier temps, les paramètres de détection de chacun des composés d'intérêts ont été déterminés. Dans un second temps, les paramètres d'ionisation ont été optimisés et en dernier lieu, les conditions chromatographiques optimales ont été établies.

1. Optimisation des paramètres de détection par spectrométrie de masse en tandem

Cette étape d'optimisation de la détection par spectrométrie de masse est une étape clé du développement des méthodes d'analyses dont les résultats et les performances sont en grande partie conditionnés par les choix faits lors de cette étape.

Pour chacune des substances retenues pour cette étude, trois solutions standards ont été préparées à 20 ppb dans un mélange H₂O/MeOH/ACN (50/25/25) à partir de solutions mères concentrées dans le méthanol. L'une des trois solutions reste non tamponnée, alors que la seconde est acidifiée avec de l'acide formique, et la troisième tamponnée avec de l'acétate d'ammonium. Les molécules ont été infusées individuellement de façon à identifier le mode d'ionisation préférentiel (positif : ESI+ ou négatif : ESI-), l'ion précurseur et les ions fragments (ions fils), ainsi que le modificateur organique permettant d'obtenir les meilleurs résultats. L'étape d'optimisation des paramètres de détection étant réalisée en mode automatique, les paramètres d'ionisation de la source nanoESI utilisée pour cette étape sont fixés par le constructeur (Table 47). Il conviendra de les optimiser dans un second temps.

	Mode négatif (ESI -)	Mode positif (ESI +)
Tension appliquée au capillaire IS (IonSpray) (V)	-1900	2400
Débit du gaz rideau au niveau de l'orifice d'entrée des ions (CUR) (Curtain gas) (Psi)	10	10
Débit du gaz appliqué sur le spray (GS1) (Gaz de nébulisation) (Psi)	12	8
Température (°C)	150	150

Table 47: Paramètres d'ionisation fixés par le constructeur pour l'étape d'optimisation des paramètres de détection en mode automatique

L'étape d'optimisation des paramètres de détection consiste à déterminer les valeurs des tensions correspondant aux différents potentiels nécessaires aux entrées et sorties des ions choisis dans les éléments constitutifs du spectromètre de masse (Figure 53), à savoir : le DP (Declustering Potential), l'EP (Entrance Potential), le CEP (collision Cell Entrance Potential) et le CXP (collision Cell Exit Potential) (Figure X). Au sein de la cellule de collision, l'énergie de collision CE (Collision Energy)

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

permettant de fragmenter les ions sélectionnés et piégés dans le premier quadripôle (Q1), nommés ions parents, est optimisée. Les ions issus de cette fragmentation, appelés « ions fils », sont piégés dans le troisième quadripôle (Q3), et sont spécifiques de la molécule parent isolée dans le premier quadripôle.

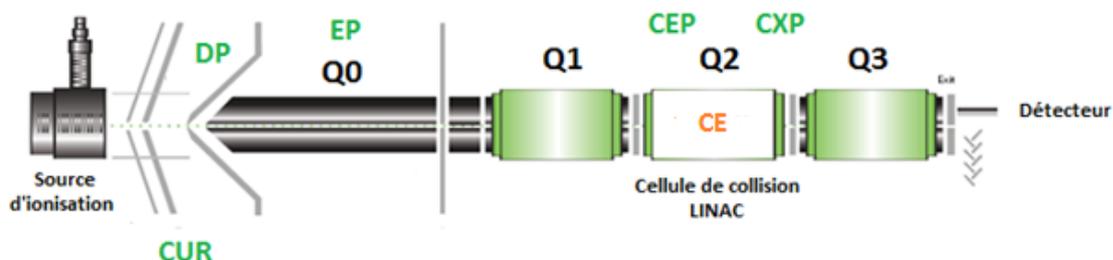


Figure 53: Paramètres optimisés de manière automatique par le logiciel

Ainsi, pour chaque composé, l'optimisation des paramètres de détection en mode automatique permet de déterminer les valeurs optimales des tensions à appliquer dans les éléments constitutifs de l'analyseur afin de fragmenter l'ion parent et de détecter les ions fils résultant de la fragmentation. Bien que cette étape d'optimisation puisse être réalisée en mode manuel, le mode automatique repose sur l'utilisation d'algorithmes qui font varier simultanément chacun des paramètres à optimiser. En mode manuel, l'opérateur est contraint d'utiliser une méthode itérative qui consiste à faire varier un paramètre alors que les autres sont fixés. Cette méthode ne prend donc pas en compte la possible dépendance des paramètres les uns vis-à-vis des autres. Par conséquent, le mode automatique présente l'avantage d'être bien plus rapide et bien plus fiable.

Afin d'assurer une identification et une caractérisation sans ambiguïté de chaque composé, les deux ions fils répondant le plus intensément et les plus spécifiques de chaque molécule ont été conservés. A titre d'exemple, les deux ions fils de m/z de 107 et de 149 du spectre de fragmentation de l'oxazépam (ion parent de 548,6) ont été retenus pour identifier, caractériser et quantifier cette molécule car ils correspondent aux ions fils les plus intenses (Figure X).

Le passage de l'ion parent à l'ion fils le plus intense correspond à la première transition MRM (T1) et sera utilisée pour la quantification des analytes. Le deuxième ion fils permet de suivre une seconde transition MRM (T2) qui sera quant à elle utilisée pour confirmer l'identité de l'analyte. Chaque substance étant caractérisée par deux ions fils (Ions fils 1 et Ion fils 2), soient deux transitions MRM (T1 et T2), ainsi que par le rapport des aires des deux ions fils (T1/T2), le mode MRM offre alors un gain de sélectivité considérable et permet de disposer du nombre de critères d'identification requis et imposée par les directives européennes [référence], concernant les performances des méthodes analytiques et l'interprétation de leurs résultats.

Les transitions caractéristiques de chaque substance ainsi que les tensions de declustering et de collision associées à chaque transition sont présentées dans la Table 48.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS- NanoLC-MS/MS

Mode	Analytes	Ion parent (m/z)	Ion fils (mz)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	Ratio T1/T2
ESI +	4HyTam	388.1	72	156	39	10	2.9
		388.1	48	156	89	8	
	4MBC	255.0	105	111	43	10	1.2
		255.0	77	111	81	12	
	Ami	278.0	91	106	35	10	1.3
		278.0	117	106	31	10	
	Ate	267.0	145.1	136	37	12	1.4
		267.0	74	136	31	12	
	Beza	362.0	139	101	35	12	1.4
		362.0	316.1	101	21	14	
	Carba	236.9	194.1	91	29	10	3.1
		236.9	193.1	91	47	10	
	Cyclo	260.8	140	106	31	12	2.1
		260.8	233.1	106	23	12	
	Deslo	310.9	259.1	136	31	10	2.3
		310.9	258.2	136	53	22	
	Diclo	295.9	214	71	49	18	1.2
		295.9	250	71	17	10	
	Diu	234.8	72	101	37	12	3.2
		234.8	46.1	101	27	8	
	Eco	380.9	125	136	37	12	3.9
		380.9	89	136	99	14	
	Keto	254.9	77	111	61	12	1.2
		254.9	105	111	33	12	
	Levo	313.0	91	131	67	14	1.1
		313.0	77	131	93	12	
	Lido	335.0	86	46	23	10	4.5
		335.0	58	46	51	10	
	Mife	430.1	372.2	166	31	16	1.1
		430.1	134.1	166	39	12	
Nicar	480.1	315.1	121	33	14	1.2	
	480.1	91	121	77	10		
Nore	299.0	109	136	39	10	1.2	
	299.0	77	136	91	12		
Oxa	286.9	241.1	101	31	12	1.6	
	286.9	269	101	23	16		
Panto	383.9	138	51	43	12	1.1	
	383.9	200	51	17	10		
Predn	361.0	343.1	81	15	16	2.2	
	361.0	147	81	33	12		

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

	Rito	721.2	140	91	85	16	1.2	
		721.2	296.1	91	27	14		
	Roxi	837.4	679.5	111	31	26	1.4	
		837.4	158.1	111	43	12		
	Spin	732.3	142.1	141	37	12	4.4	
		732.3	98.1	141	95	14		
	Tamox	372.1	72.1	131	33	12	3	
		372.1	44	131	87	8		
	Testo	289.0	97	141	31	12	1.1	
		289.0	109	141	35	10		
	ESI –	BPA	226.9	133	-115	-34	-9	7.3
			226.9	116.9	-115	-66	-11	
		EE2	295.1	144.9	-145	-54	-17	1.3
			295.1	142.9	-145	-76	-15	
αE2		271.2	145	-90	-58	-23	1.3	
		271.2	239.2	-90	-56	-5		
βE2		271.2	145	-90	-58	-23	1.1	
		271.2	183.2	-90	-56	-21		
E1		268.9	145.1	-130	-50	-11	2.3	
		268.9	159	-130	-48	-9		
Ibu		205.1	161	-40	-10	-21	16.1	
		205.1	159.2	-40	-10	-21		
PFOA		412.9	369.3	-55	-16	-7	2.1	
		412.9	168.9	-55	-22	-25		
PFOS		498.9	79.8	-55	-126	-3	4.1	
		498.9	98.9	-55	-76	-5		
tNP		219.2	133.1	-110	-44	-7	6.5	
		219.2	116.9	-110	-82	-17		
tOP		205.2	133	-75	-30	-11	6.9	
		205.2	116.9	-75	-86	-13		

Table 48: Paramètres de détection des composés d'intérêt (transitions MRM, rapport des transitions (ratio T1/T2) et tensions associés aux transitions (DP, CE et CXP)

Parmi les 35 molécules retenues pour cette étude, 25 présentent une ionisation préférentielle en mode positif et 10 en mode négatif. Il est important de souligner la spécificité et la sélectivité de chaque transition sélectionnée. Seuls le kétoprofène et la 4MBC présentent des transitions MRM communes. Cependant, ceci ne gêne en rien la caractérisation de ces 2 molécules. En effet, ayant des structures chimiques différentes, elles présenteront alors des temps de rétention différents. Il sera donc impossible d'assimiler une molécule à la place de l'autre. A l'inverse, αE2 et βE2 sont des isomères de position. Ces deux hormones stéroïdiennes présentent donc des transitions MRM identiques et des propriétés physico-chimiques semblables. Il conviendra donc d'apporter une

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

attention toute particulière à leur séparation chromatographique, de manière à pouvoir utiliser leur temps de rétention comme critère d'identification.

Quel que soit la substance infusée, il a été constaté que l'ajout de modificateurs tels que l'acide formique ou encore l'acétate d'ammonium était indispensable pour initier ou améliorer l'ionisation. L'exemple de l'oxazépam permet de mettre en évidence l'influence de l'ajout d'acide formique sur l'ionisation de cette substance pharmaceutique : l'intensité de l'ion parent semble en effet exacerbé en présence d'acide (figure X). Lors d'une ionisation en mode positif, l'ajout d'acide permet de favoriser la formation d'ions moléculaires $[M+H]^+$, ceci est d'autant plus important que certaines molécules retenues pour cette étude présentaient un ion parent majoritairement présent sous sa forme d'adduit $[M+Na]^+$, or il est très difficile de fragmenter ces adduits. Dans ces conditions, l'ajout d'acide est indispensable pour réaliser une détection en mode MRM. En mode négatif, il a été observé que l'ajout d'acétate d'ammonium permettait de stabiliser considérablement le signal, améliorant ainsi la répétabilité des analyses. Cependant, l'utilisation de sels en quantité trop importante pourrait engendrer l'obstruction de l'aiguille de spray. Une très faible quantité d'acétate d'ammonium sera dès lors utilisée dans le cadre de ces travaux (0,1 mM). Il semble également important de mentionner que si l'ajout d'acide ou de tampon permet d'améliorer l'ionisation des molécules, il permet également de stabiliser le pH des phases mobiles, évitant ainsi la dérive des temps de rétention au cours de longues séquences d'acquisition.

2. Optimisation de l'ionisation des composés par nanoESI

2.1. Assemblage et réglage de la source NanoSpray® II

La source NanoSpray® II est une source électrospray conçue par la société ABSciex®. Elle est spécifiquement utilisée comme interface pour le couplage de systèmes nanochromatographiques avec des spectromètres de masse de type 3200 Qtrap et 5500 Qtrap.

La « tête de source » (Figure 54) est l'élément principal de cette interface. Elle est constituée d'un union en acier inoxydable de très faible volume, maintenu dans un champ électrique dont la tension peut être portée de -4500V à 4500 V. L'application de ces très fortes tensions permet de s'affranchir de l'utilisation d'aiguille de spray recouvert de métal conducteur. En effets, le design de la NanoSpray II permet d'utiliser des aiguilles de spray dites « non-coated », c'est-à-dire uniquement constitué d'un capillaire de silice fondue. Elle dispose également d'une connexion permettant l'arrivé d'un gaz de nébulisation (GS1), ce qui améliore le processus d'ionisation et le transfert des ions.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

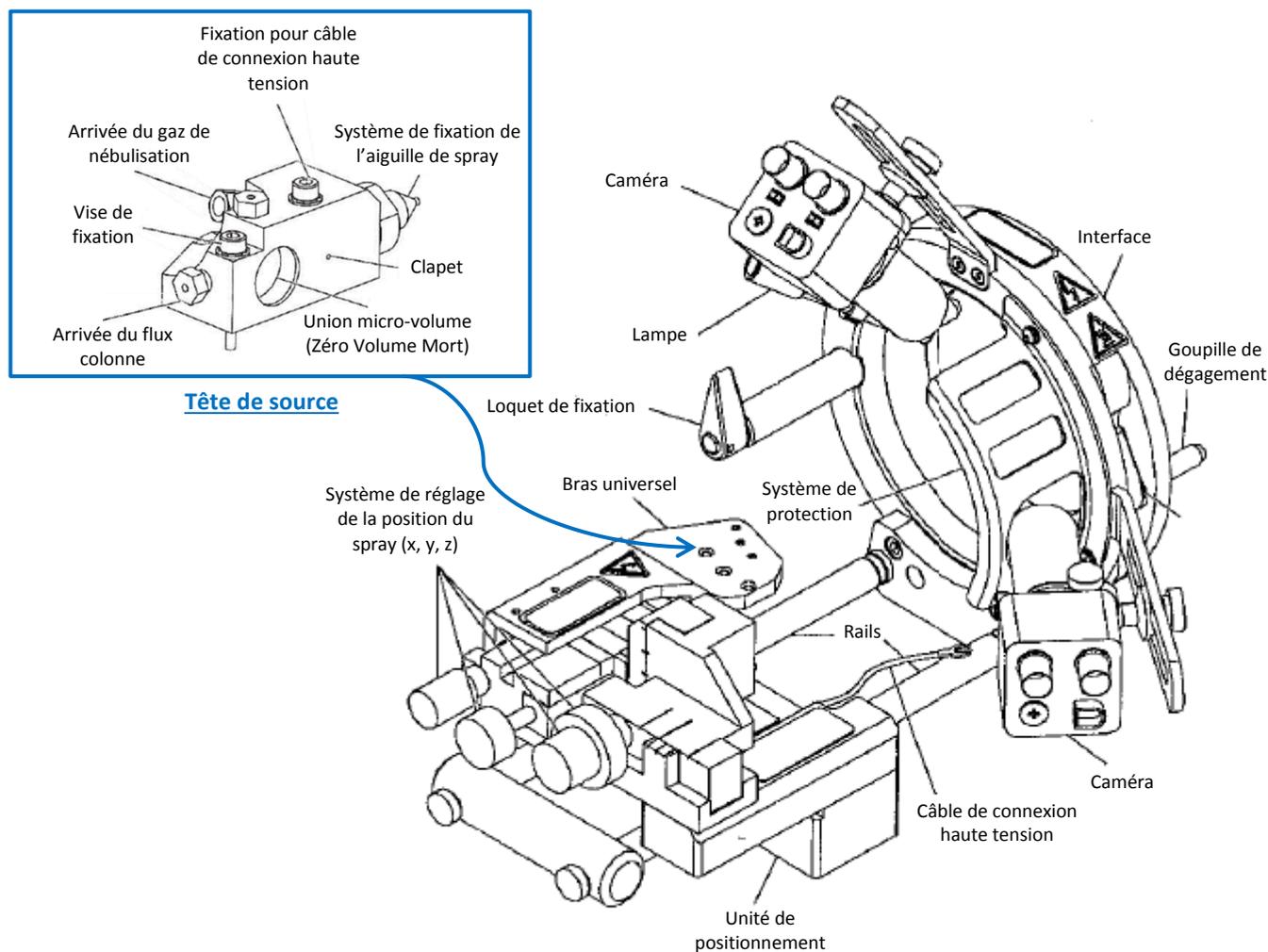


Figure 54: Schéma de la source NanoESI (NanoSpray II, ABSciex)

Le choix des connectiques, ainsi que celui de l'aiguille de spray sont des choix d'une importance capitale lors de la mise en place de cette interface nanospray. En effet, le diamètre interne (d.i) des capillaires utilisés pour connecter la sortie de la colonne chromatographique à la source est fonction du débit de travail. Pour un débit optimal de 300 nL/min, le constructeur recommande l'utilisation de capillaire de silice fondue de 20 µm d.i, permettant de limiter les phénomènes de dilution, ainsi que d'une aiguille de spray de 10µm d.i. La mise en place du dispositif requière un alignement parfait des différents éléments constitutifs de la tête de source : tous les capillaires doivent être rigoureusement coupés droit, et les férules doivent être suffisamment serties de manière à éviter les fuites. Une attention toute particulière doit cependant être apportée lors de l'assemblage final de la tête de source. En effet, un serrage excessif pourrait endommager les capillaires de silice fondue et ainsi perturber l'écoulement du spray. Une fois l'assemblage de la tête de source terminée, celle-ci peut être fixée sur le « bras universel » de l'interface. La position de la tête de source sur le support conditionne également les performances analytiques de la méthode. En effet, bien que la position verticale (face à l'orifice) permette d'obtenir une meilleure sensibilité, elle est cependant responsable d'un encrassement rapide de l'orifice, ainsi le positionnement en biais, décalée de 15 à

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGCxChERS-NanoLC-MS/MS

30° permet de s'affranchir de ce problème. Dans notre cas, nous avons fait le choix d'un compromis intermédiaire, entre sensibilité et robustesse, et placé la tête de source avec un angle de décalage de 15°. La position du spray par rapport à l'orifice peut ensuite être réglée de façon plus précise. En effet, le bras universel sur lequel est fixée la tête de source est lui-même disposé sur un système de rails qui permet, grâce à un système de molette, d'ajuster au millimètre près la position de l'aiguille par rapport à l'orifice.

Les conditions de réglage optimales doivent être déterminées à chaque changement d'aiguille. Cette étape est communément effectuée en réalisant une acquisition manuelle en mode scan selon les paramètres définis par le constructeur. Cette acquisition en temps réel permet de visualiser directement l'influence d'un changement de position du spray sur l'intensité du signal mesuré. L'objectif de cette étape de réglage est d'obtenir un spray stable, permettant de générer un signal intense, tout en minimisant au maximum le bruit de fond. A titre d'exemple, la Figure 55 présente une acquisition réalisée lors d'un changement d'aiguille et permet de mettre en évidence le gain de sensibilité obtenu par simple réglage de la position du spray.

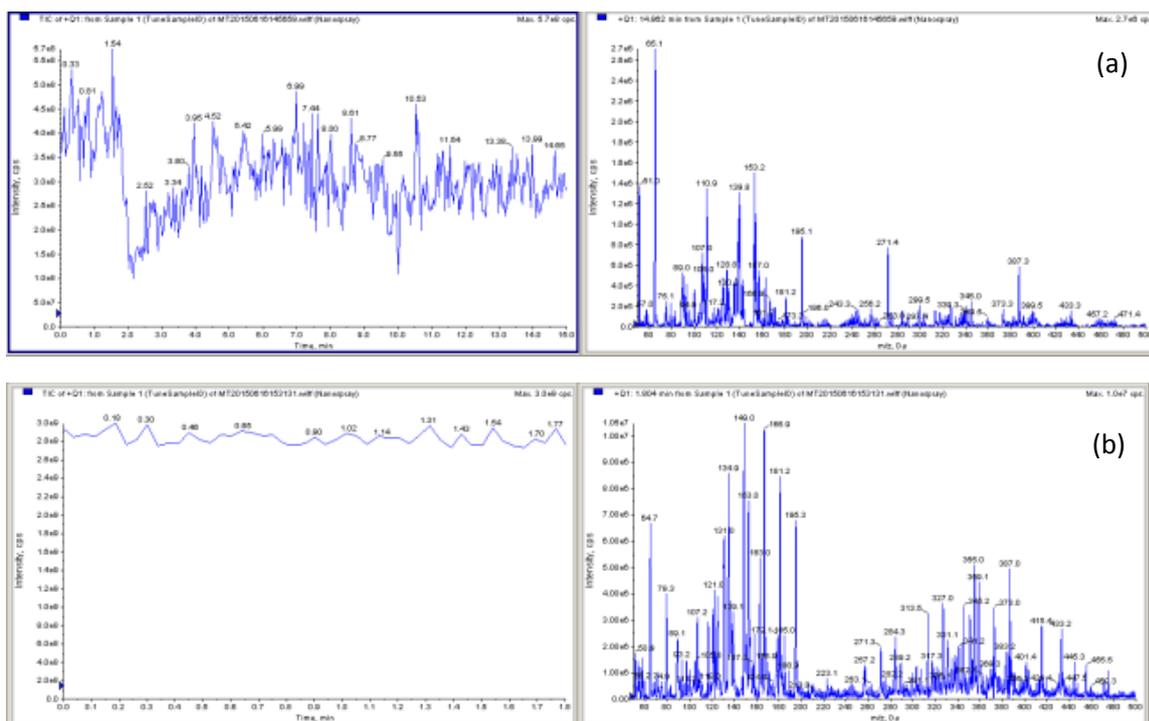


Figure 55: Acquisitions full scan MS obtenues sans réglage de la position du spray (a) et après réglage optimale (b)

L'utilisation des caméras fixées sur l'interface permet de visualiser le spray et de contrôler l'écoulement de celui-ci.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

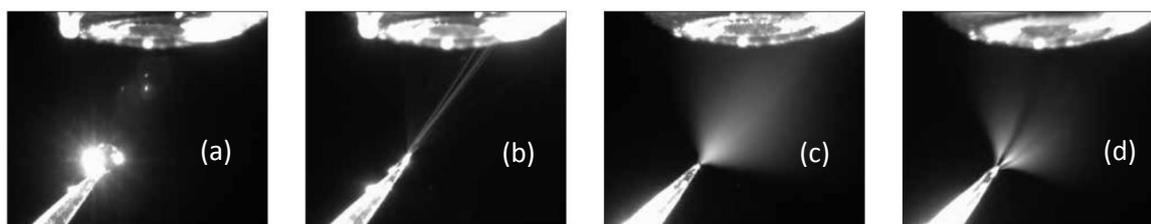


Figure 56: Photographies du spray obtenues en fonction de différents paramètres d'ionisation

La Figure 56 permet de mettre en exergue les différents sprays pouvant être obtenus avec la source NanoESI, la photographie (c) représente le spray idéal, souvent caractérisé de plume de spray.

L'optimisation des paramètres d'ionisation est habituellement réalisée par FIA (Flow Injection Analysis), ou encore par injection en flux continu. Ceci consiste à injecter, sans séparation préalable, une solution de standards dans un flux de phase mobile de composition constante, et ce à plusieurs reprises. Cette injection continue permet alors d'optimiser les paramètres d'ionisation en balayant une gamme de valeurs du paramètre à optimiser pour assurer une ionisation satisfaisante. Cependant, cette configuration ne prend pas en compte le changement de composition de la phase mobile qui a généralement lieu lors d'une séparation en mode gradient. Or, la composition de la phase mobile peut avoir un impact non négligeable sur l'ionisation des composés. Nous avons ainsi choisi d'optimiser les paramètres d'ionisation lors d'acquisitions chromatographiques pour lesquelles nous avons fait varier de manière itérative, la température de la source, la tension appliquée au capillaire, le débit du gaz rideau (CUR) et celui du gaz de nébulisation (GS1). Les valeurs opérationnelles des paramètres de source sont fournies par le constructeur. Elles sont présentées dans la Table 49. De ce fait, les valeurs testées lors de cette étape d'optimisation seront situées dans les gammes dynamiques conseillées par le fournisseur.

	ESI -	ESI +
IonSpray voltage (IS) (V)	-1000/-4500	1000/4500
Gaz de nébulisation (GS1) (Psi)	1/50	1/50
Gaz rideau (CUR) (Psi)	10/20	10/20
Température (T) (°C)	100/250	100/250

Table 49: Paramètres d'ionisation conseillés par le constructeur

2.2. Optimisation de la température de source

La température de la source est l'un des paramètres ayant le plus d'impact sur l'ionisation des composés, elle joue un rôle primordial dans le processus de désolvatation. Six températures ont été testées dans chacun des modes d'ionisation (positif et négatif), de la valeur la plus basse conseillée par le constructeur (100°C) jusqu'à la valeur la plus haute (250°C), par pas de 25°C.

En mode négatif, la réponse normalisée des 10 composés recherchés augmentent avec la température, exception faite du PFOA, pour lequel on observe une diminution de la réponse à 250°C.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

A titre d'exemple, les réponses de l'estrone et de l'éthinylestradiol augmentent d'un facteur 5 lorsque la température passe de 100°C à 250°C (Figure 57). Il est ainsi possible de conclure qu'une température basse n'assure pas une désolvatation suffisante du spray. Finalement, la température optimale en mode négatif a été fixée à 250°C.

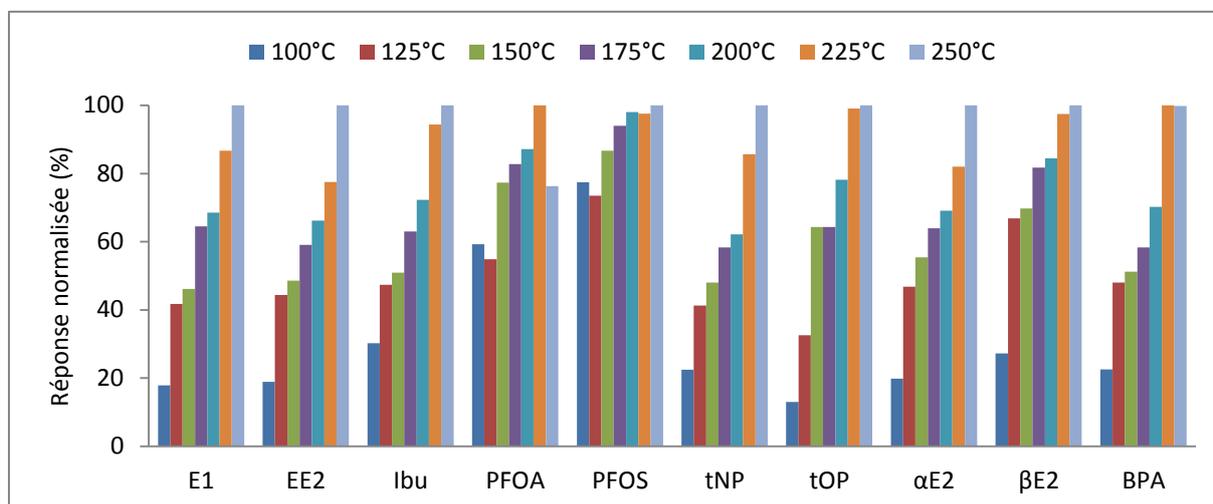


Figure 57: Impact de la température de la source sur l'ionisation des substances en mode ESI-

En mode positif, le constat est identique à celui fait en mode négatif ; les réponses normalisées des analytes augmentent de façon quasi linéaire avec la température (Figure 58). Cependant, peu de différence sont à noter entre 225°C et 250°C, en conséquence, la température optimale a été fixée à 225°C. En effet, l'utilisation de températures élevées engendre un vieillissement prématuré de l'aiguille, ainsi, s'il est possible de choisir une température plus faible, tout en conservant de bonne performance analytique, cela permettra d'augmenter la durée de vie de l'aiguille de spray.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS NanoLC-MS/MS

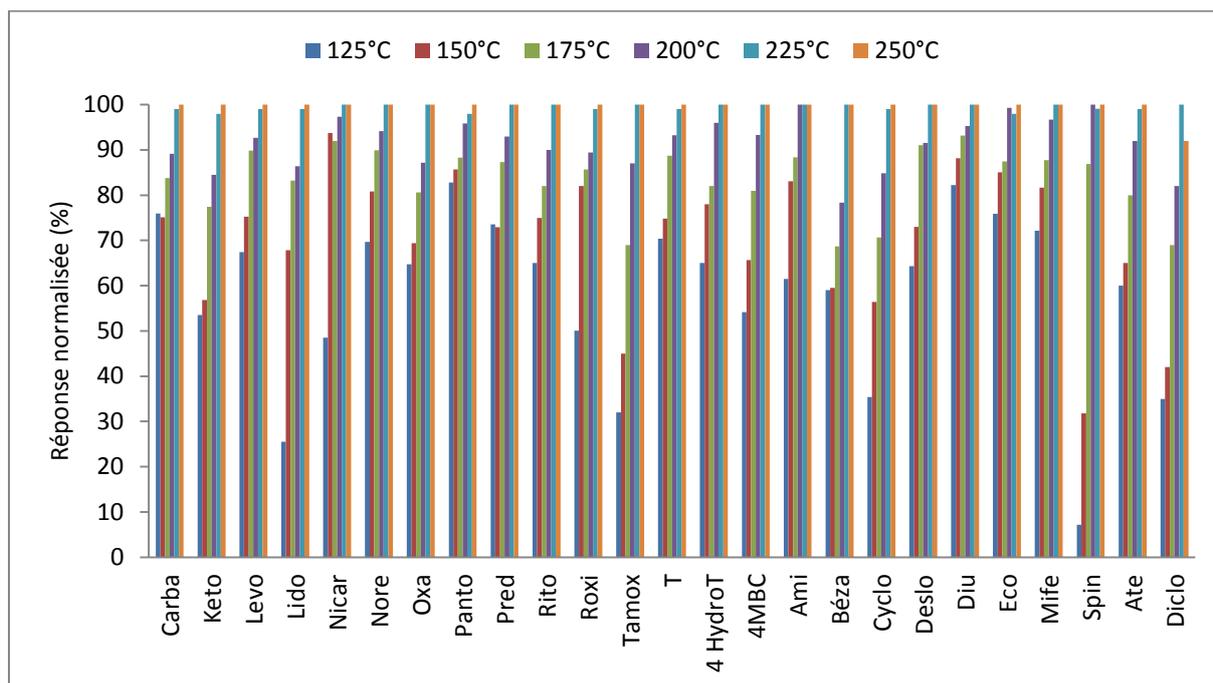


Figure 58: Impact de la température de la source sur l'ionisation des substances en mode ESI+

2.3. Optimisation de la tension appliquée au spray

Le second paramètre ayant la plus grande influence sur l'ionisation des substances correspond à la tension appliquée au capillaire. Ce champ électrique est à l'origine de la génération des microgouttelettes chargées qui composent le spray. Bien que le constructeur indique que l'interface nanospray puisse délivrer des tensions comprises entre -4500 et 4500 V, toutes les aiguilles de spray ne supportent pas des tensions si élevées, en effet pour les capillaires de spray de faible diamètre interne l'application d'un champ électrique trop intense peut générer des décharges de corona qui se produisent principalement en mode négatif et qui peuvent endommager l'aiguille. Ainsi, pour une aiguille de spray de diamètre interne 10 µm, il est conseillé de ne pas dépasser -3000 V en mode négatif. Au regard de ces recommandations, 6 valeurs de courants ont été appliquées de -2000 V à -3000 V pour le mode négatif et de 2000 V à 4500V pour le mode positif, par pas de 200 V.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

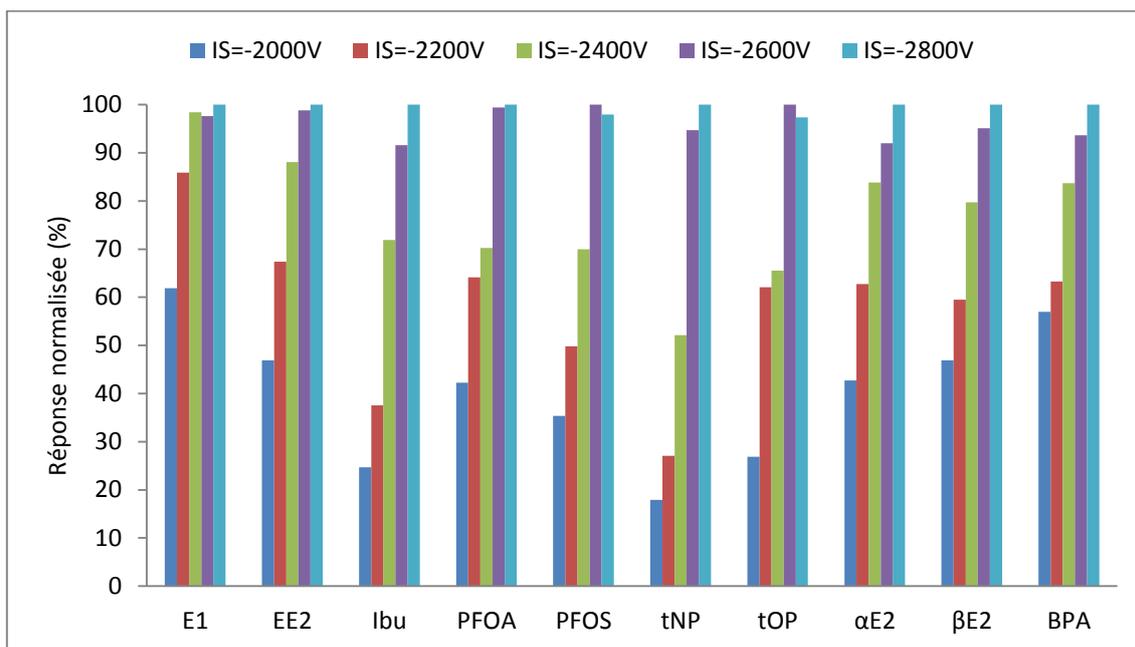


Figure 59: Impact de la tension appliquée au capillaire de spray sur l'ionisation des substances en mode ESI-

Concernant l'influence de la tension appliquée au capillaire de spray, des tendances identiques ont été constatées pour chacune des molécules et ce quel que soit le mode d'ionisation. En effet, l'ionisation des substances retenues pour cette étude augmente avec la valeur de la tension, un champ électrique trop faible n'assurant pas une ionisation chimique suffisante. A titre d'exemple, la réponse normalisée de l'ibuprofène augmente d'un facteur 5 lorsque la différence de potentiel passe de -2000 V à -2800 V (Figure 59). En mode négatif, les résultats de la séquence d'acquisition pour laquelle la tension du spray avait été fixée à -3000V ne peuvent être présentés dans ce manuscrit. Lors de cette acquisition, nous avons constaté un changement d'apparence de l'aiguille de spray. En effet, à l'extrémité de celle-ci, nous avons observé une lueur bleue, indiquant une décharge de corona. Nous avons ainsi conclu qu'une tension de -3000V s'avérait être trop élevée dans le cas de notre application et que la tension optimale était de -2800V. En mode positif, nous n'avons pas observé ce phénomène. La réponse de l'intégralité des composés recherchés présentait une augmentation similaire à celle observée pour le mode négatif, par conséquent, nous avons choisi d'appliquer la tension maximale autorisée (4500V) pour la suite de nos expérimentations.

2.4. Optimisation du gaz rideau (CUR) et du gaz de nébulisation (GS1)

Bien que l'optimisation de la pression du gaz de nébulisation permette d'améliorer l'ionisation des composés, elle a surtout pour objectif de stabiliser le signal. Le débit du gaz de nébulisation est habituellement très faible, bien que des débits plus importants soient généralement appliqués lors d'ionisation en mode négatif. La Figure 60 permet de mettre en évidence l'impact de ce gaz sur le processus d'ionisation, on constate alors qu'un débit trop important du gaz de nébulisation engendre une perte de signal considérable.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-ChE-MS-NanoLC-MS/MS

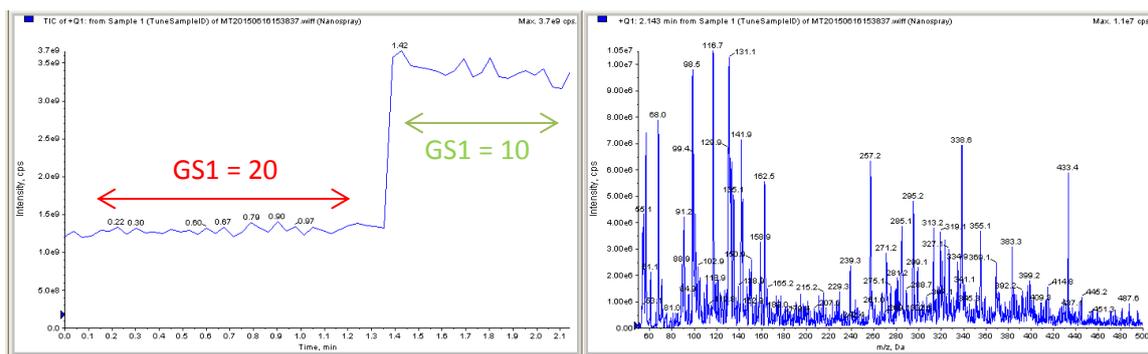


Figure 60: Influence de la pression du gaz de nébulisation sur le processus d'ionisation

Dans le cadre de notre étude, la pression de ce gaz a été fixée à 8 et 10 Psi pour les modes positif et négatif, respectivement. Le gaz rideau permet de faciliter le transport des ions de l'orifice au système de vide du spectromètre de masse. La pression de ce gaz a été fixée à 10 Psi pour chacun des modes.

En conclusion, les paramètres d'ionisation optimums pour chacun des modes d'ionisation sont résumés dans le tableau suivant :

	ESI -	ESI +
Température (°C)	250	225
IS (V)	-2800	2500
GS1 (Psi)	10	8
CUR (PSI)	10	10

Table 50: Conditions d'ionisation optimum pour chacun des modes d'ionisation

3. Optimisation des conditions chromatographiques

Comme discuté précédemment dans le chapitre consacré à l'état de l'art, l'utilisation de colonnes capillaires de faible diamètre interne ne permet l'injection que d'un très faible volume d'échantillon. Parmi les alternatives proposées dans la littérature pour pallier à cette limitation, l'utilisation d'un système de pré-concentration en ligne par commutation de colonne a été retenue pour cette étude. Par conséquent, l'optimisation des conditions chromatographiques a été effectuée en deux étapes : la première consiste à déterminer les conditions optimales de séparation (phase mobile, gradient d'élution), et la seconde permet de définir le meilleur compromis analytique permettant de pré-concentrer les analytes ciblés lors de ces travaux.

3.1. Optimisation de la séparation chromatographique

3.1.1. Choix de la phase stationnaire

La recherche bibliographique a permis de mettre en évidence l'utilisation courante de phases stationnaires de type phase inverse pour les analyses multi-résidus, et plus particulièrement celle des phases greffées C18, parfaitement adaptées aux molécules moyennement hydrophobes. Les objectifs de ces travaux de thèse étant centrés sur le caractère applicatif de la méthode d'analyse, nécessitant

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

l'investigation d'une large cohorte d'échantillons, notre choix s'est préférentiellement tourné vers des colonnes séparatives commerciales. En effet, bien que le « package » des colonnes capillaires soit une pratique courante chez les utilisateurs de nanoLC, il nécessite un travail fastidieux et de solides compétences en la matière. De plus, les colonnes « home-made » ne bénéficient pas toujours de la même robustesse et de la même répétabilité que les colonnes disponibles sur le marché. Ainsi, elles semblent peu adaptées à des études sur le long terme.

Parmi les fournisseurs spécialisés en chromatographie liquide, la société ThermoFisher® (anciennement Dionnex®) propose une large gamme de colonnes de nanochromatographie qui ont la particularité de posséder des connectiques parfaitement adaptées au système chromatographique utilisé dans le cadre de ces travaux. Ces connections, plus connues sous le nom de « NanoViper », permettent en effet de minimiser les volumes morts. Cette société dispose d'un vaste choix de colonnes capillaires greffées C18 de diamètre interne 75 μm (Table 51).

Longueur (mm)	Diamètre interne (μm)	Taille des particules (μm)	Porosité (\AA)
50	75	2	100
150	75	2	100
250	75	2	100
500	75	2	100
50	75	3	100
150	75	3	100
250	75	3	100
500	75	3	100
150	75	5	100
250	75	5	100
150	75	5	300

Table 51: Descriptif des colonnes de nanochromatographie greffées C18 disponible chez ThermoFisher®

Le choix du diamètre de pores (porosité) d'une colonne chromatographique dépend avant tout de la taille des molécules à analyser. Les petites molécules peuvent se diffuser rapidement à l'intérieur et à l'extérieur des remplissages de 80 à 120 \AA , alors que les peptides et les protéines ne le peuvent pas. C'est pourquoi il est recommandé d'utiliser des remplissages de 300 \AA comme standard pour les séparations isocratiques ou en gradient des peptides et des protéines. Dans le cadre de notre étude, les molécules étudiées ont un poids moléculaire relativement faible (<1000 Da), par conséquent nous avons fait le choix d'une nano colonne de porosité 100 \AA .

Le choix de la granulométrie standard des particules d'une colonne chromatographique doit être effectué en prenant en considération deux principaux aspects : l'efficacité de séparation et la contre pression. En effet, la diminution de la taille des particules permet d'augmenter l'efficacité de séparation et donc la résolution, cependant elle génère également plus de contre pression. Ainsi, les colonnes possédant des diamètres de particules de 2 μm doivent être utilisées sur des systèmes permettant de résister à de très fortes pressions (>800 bar). Au regard de la limitation de pression

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

du système nanochromatographique utilisé dans le cadre de notre étude (500 bar), nous avons fait le choix d'utiliser une colonne possédant des particules de 3 μ m, ce qui nous a semblé être le compromis idéal entre efficacité et contre pression.

Enfin, concernant la longueur de la colonne nous avons fait le choix de travailler avec une colonne de 15 cm. Une colonne de dimension supérieure nous aurait certes permis d'améliorer la séparation, mais elle aurait également engendrée plus de contre pression et augmentée la durée d'analyse.

En conclusion, la séparation chromatographique sera réalisée sur une colonne Acclaim PepMap 100 (75 μ m*15cm, 3 μ m, 100Å).

3.1.2. Choix de la phase mobile et optimisation des gradients d'élution

a) Choix des phases mobiles

Au regard de la littérature, le méthanol et l'acétonitrile semblent être les modificateurs organiques préférentiellement utilisés pour la séparation de composés moyennement hydrophobes en chromatographie de phase inverse sur une colonne C18. De ce fait, plusieurs programmes d'élution en gradient ont été testés avec des mélanges H₂O/ACN, H₂O/MeOH, ainsi qu'avec des mélanges tertiaires H₂O/ACN/MeOH, auxquels nous avons additionné différentes quantités d'acide formique pour la séparation en mode positif et 0,1 mM d'acétate d'ammonium pour la séparation en mode négatif, ces modificateurs s'étant avérés indispensables à l'ionisation des composés sélectionnés. Du fait de la limitation matérielle de l'appareillage utilisé, le débit a été fixé à 300 nL/min afin de ne pas dépasser 500 bars lors de l'élution. Pour les mêmes raisons, la température du four colonne a été fixée à 40°C afin de diminuer la viscosité de la phase mobile. Deux programmes d'élution ont ainsi été optimisés pour chacun des modes d'ionisation.

En ce qui concerne la séparation en mode négatif, il était nécessaire d'éviter la co-élution de α E2 et β E2 qui présentaient les mêmes transitions MRM. La séparation chromatographique de ces deux œstrogènes a pu être obtenue avec un gradient H₂O/ACN mais pas avec un mélange H₂O/MeOH. Cependant, puisque certains composés présentent une meilleure ionisation en présence de méthanol, nous avons choisi d'utiliser un mélange tertiaire ACN/MeOH/H₂O qui permettait également de séparer convenablement ces hormones stéroïdiennes.

En ce qui concerne le mode positif, nous avons tout d'abord envisagé d'effectuer la séparation avec du méthanol, moins coûteux et moins toxique que l'acétonitrile. Cependant, la contrepression engendrée par l'utilisation de ce solvant organique, et plus particulièrement celle générée par le mélange H₂O/MeOH en proportion 50/50, nous a contraints à utiliser un mélange tertiaire identique à celui investigué pour le mode négatif. Notons cependant que certains avantages, liés à l'ajout d'ACN, ont pu être observés: l'ACN permet d'une part de diminuer la viscosité de la phase mobile organique, et d'autre part de générer des pics chromatographiques plus fins. Ce tiers solvant organique possède en effet une force éluante plus importante que celle du méthanol, ce qui permet de focaliser d'avantage les substances ciblées dans la colonne. A titre d'exemple, la largeur a mis

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

hauteur du pic correspondant à l'oxazépam diminue de près de 40% lorsque l'élution est réalisée avec le mélange tertiaire, comparé à une élution avec du méthanol seul (Figure X). Nous avons également fait le choix d'acidifier chacune des phases mobiles (aqueuse et organique) en ajoutant dans chacune d'entre elles 0,1% d'acide formique. Le pH engendré par l'ajout de cette quantité d'acide (2,9) correspond aux spécifications de la colonne (2-7), et ne risque donc pas d'endommager celle-ci. Deux phases mobiles moins acides, correspondant à 0,1‰ et 0,5‰ ont cependant été testées. Bien que nous n'ayons constaté ni amélioration ni détérioration significative de la détection en spectrométrie de masse, nous avons pu mettre en évidence que la diminution du pH des phases mobiles engendrait une asymétrie de pic plus importante. Par conséquent les phases mobiles initialement sélectionnées à 0,1% en volume d'acide formique ont été conservés. Il semble important de préciser que dans un cas idéal, les molécules à séparer doivent être sous leur forme neutre, cependant au regard des différences de pKa des substances retenues pour cette étude nous ne pouvions en aucun cas remplir cette condition.

En conclusion, les séparations chromatographiques seront réalisées en utilisant les phases mobiles présentées dans le tableau ci-dessous.

	ESI -	ESI +
Phase mobile aqueuse (phase A)	H ₂ O + 0,1 mM d'acétate d'ammonium	H ₂ O + 0,1% d'acide formique
Phase mobile organique (phase B)	ACN/MeOH/H ₂ O (45/45/10) + 0,1 mM d'acétate d'ammonium	ACN/MeOH/H ₂ O (45/45/10) + 0,1% d'acide formique

Table 52: Phases mobile utilisées pour la séparation chromatographique en ESI+ et en ESI-

Notons que l'ajout de 10% d'eau au mélange ACN/MeOH composant les phases mobiles organiques permet à la fois de favoriser la dissolution de l'acétate d'ammonium, peu soluble dans les solvants organiques (dans le cas de la séparation en mode négatif), mais également d'éviter que la colonne chromatographique ne soit exposée à 100% de solvant organique, ce qui engendrerai notamment le repliement des chaînes C18 et donc le vieillissement prématuré de la phase stationnaire.

b) Optimisation du gradient d'élution

Compte tenu de la rétention des composés sur la colonne séparative, les tests préliminaires effectués afin de choisir les phases mobiles optimales avaient permis de conclure que les gradients d'élution devaient démarrer avec un pourcentage de solvant organique relativement élevé. Il a été déterminé que la composition de la phase mobile de départ devait contenir 50% de phase A et 50% de phase B, et ce pour chacun des modes d'ionisation. Cette composition a été choisie de manière à ce que le premier composé élué soit tout de même suffisamment retenu pour ne pas sortir au temps mort de la colonne. En effet, lors d'analyse d'échantillons complexes, si un composé est peu retenu sur la colonne séparative il risque d'être élué avec d'autres composés de la matrice également non retenus, ce qui pourrait considérablement impacter l'ionisation de la substance ciblée et donc dégrader la sensibilité de l'analyse. Ainsi, au regard de la séparation en mode positif, le premier

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroCuEChERS-NanoLC-MS/MS

composé élué, correspondant à l'aténolol, se caractérise par un temps de rétention de 14,9 min. En mode négatif, le BPA est quant à lui élué à 24,34 min (Figure 61). On constate alors que ces deux substances sont suffisamment éloignées du temps de délai, ceux-ci ne seront donc pas perturbés par les interférents matriciels non retenus.

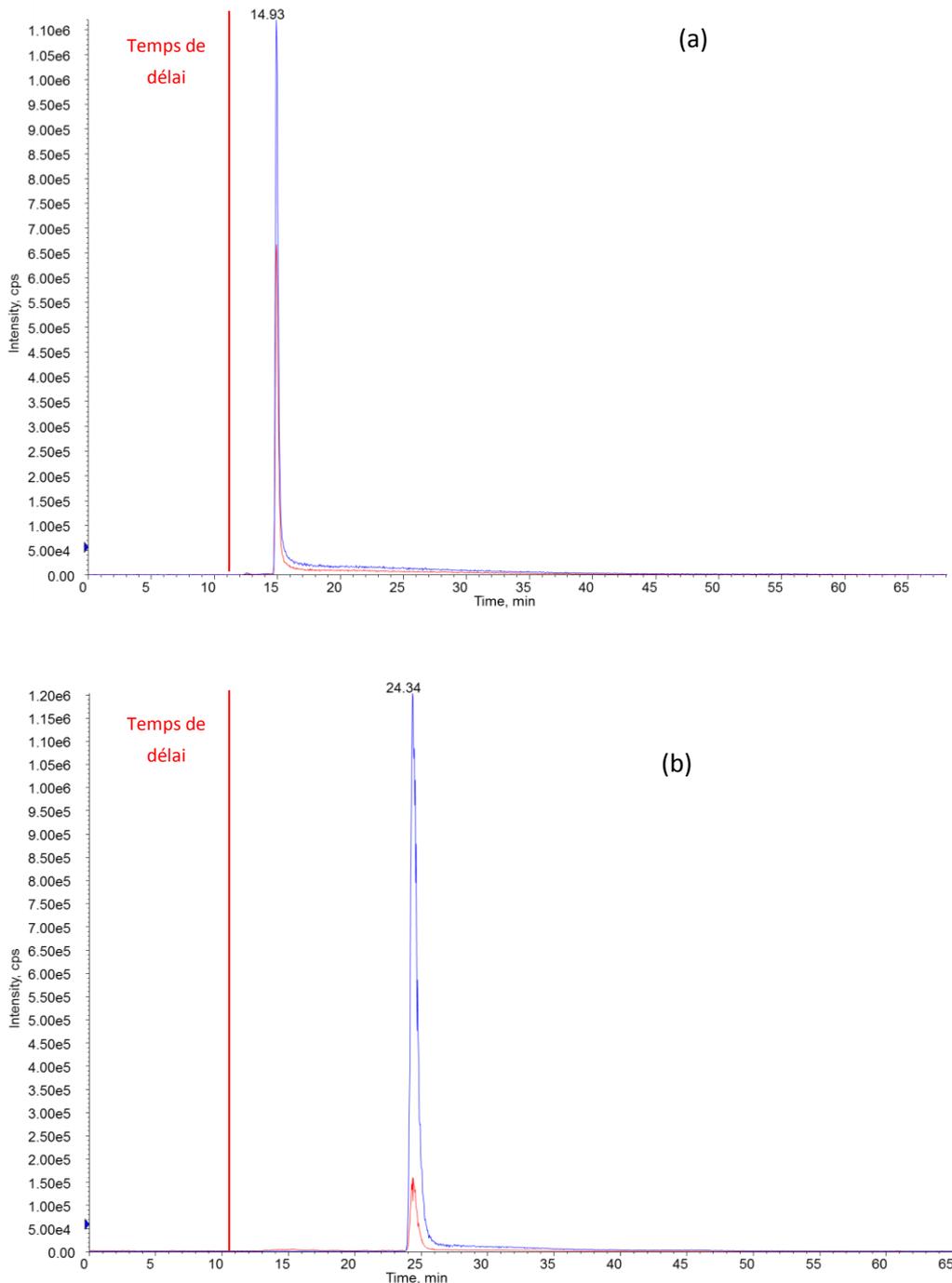
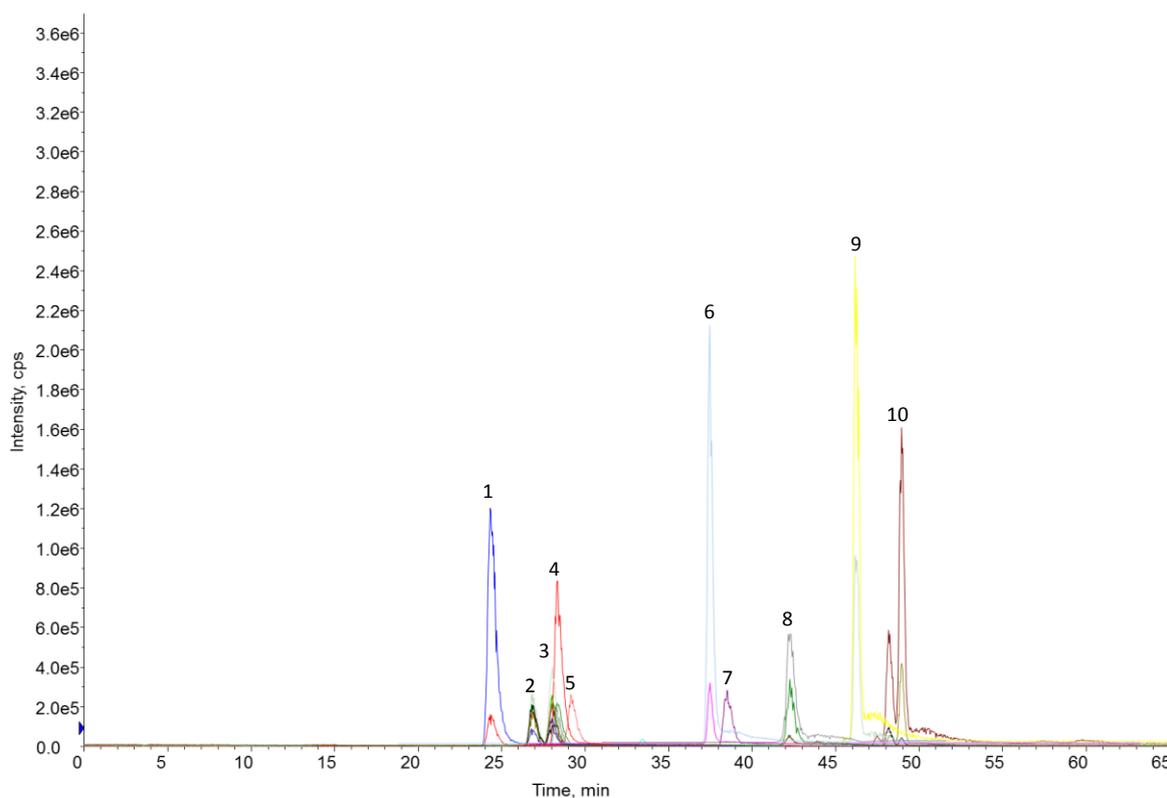


Figure 61: Temps de rétention du premier composé élué en mode positif (a) et en mode négatif (b)

*Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS
NanoLC-MS/MS*

Après avoir déterminé la composition idéale de départ de la phase mobile, la pente du gradient a pu être optimisée. Nous avons ainsi testé différents programmes d'élution. Dans un premier temps un gradient linéaire a été envisagé pour chacun des modes d'ionisation investigués.

En mode négatif, une pente d'élution permettant de passer de 50% à 100% de phase B a été investiguée. Nous avons ainsi pu constater une résolution suffisante entre les hormones α E2 et β E2. Cependant, les composés les plus apolaires présentaient des temps de rétention beaucoup trop élevés. Afin de réduire la durée de l'analyse, un gradient multilinéaire a été envisagé. Au regard de la largeur à mi hauteur, de l'asymétrie, de l'intensité des pics chromatographiques et de la résolution, nous avons pu déterminer le gradient optimale, celui-ci correspond à l'augmentation du pourcentage de phase B de 50% à 65,3% en 13,25 minutes, de 65,3% à 80% en 6 minutes, de 80% à 100% en 13 minutes et se termine par un palier isocratique à 100% de phase B pendant une durée de 25 minutes. Le chromatogramme présenté sur la Figure 62 met en évidence la séparation finale. On constate que nous avons réussi à séparer α E2 et β E2. Bien que nous ayons envisagé d'incrémenter des paliers isocratiques afin d'améliorer la résolution entre certains composés légèrement co-élus, nous avons abandonné cette alternative qui générait un élargissement et une asymétrie de pic trop important.



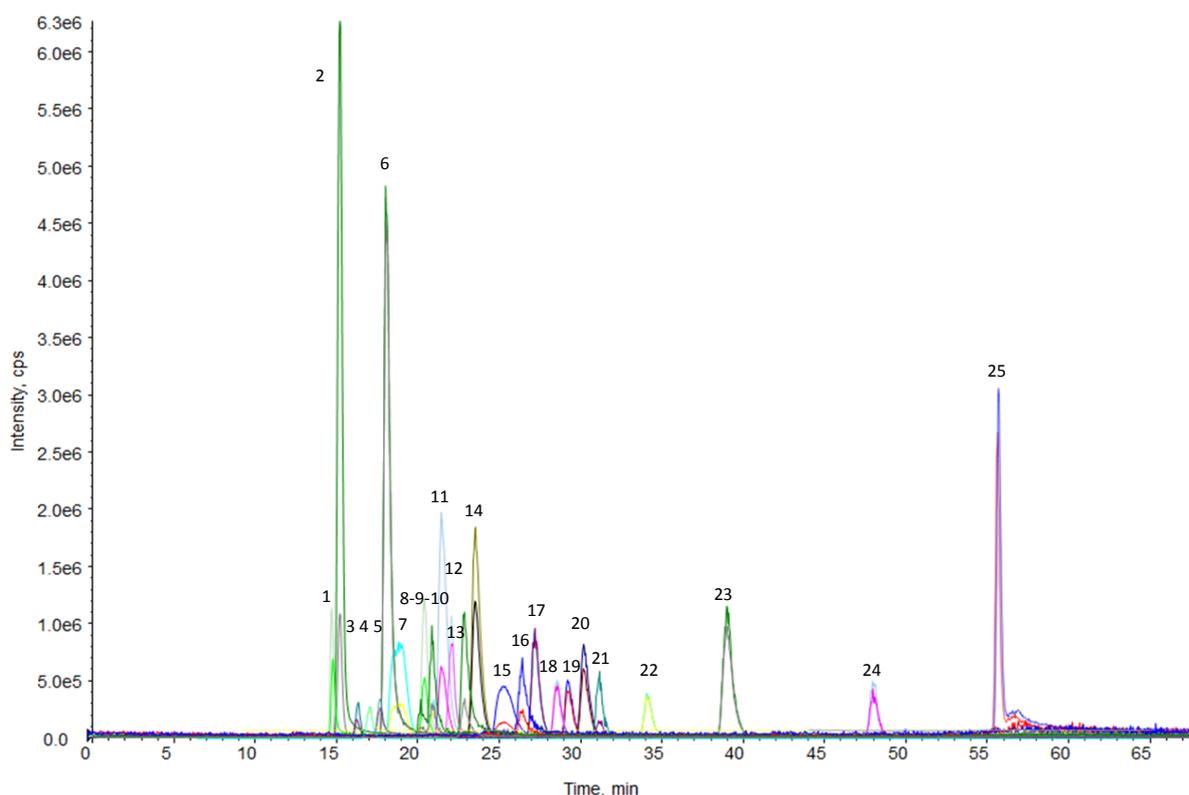
1	BPA	6	Ibu
2	β E2	7	tOP

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGCxChERS-NanoLC-MS/MS

3	αE2	8	tNP
4	E1	9	PFOA
5	EE2	10	PFOA

Figure 62: Séparation chromatographique obtenue avec le gradient optimal en mode négatif

L'optimisation du gradient d'éluion en mode positif a été réalisée selon la même logique. La composition de départ du gradient est de 50% de A et 50% de B. Le programme d'éluion se déroule de la façon de la façon suivante : une montée linéaire de 50 à 54,6% de phase mobile B en 4,25 minutes, suivie d'une seconde pente d'éluion permettant de passer de 54,6% à 69% de B en 13,25 minutes, d'une troisième montée linéaire de 69% à 78% de B en 10 minutes et enfin une augmentation de 78% à 100% de B en 13 minutes. La colonne est finalement maintenue à 100% de B pendant 25 minutes. La Figure 63 présente le chromatogramme obtenue à partie du gradient précédemment décrit.



1	Ate	8	Roxi	15	Diu	22	Lévo
2	Lido	9	Predni	16	Tam	23	Diclo
3	Deslo	10	4-HyTa	17	Kéto	24	Rito
4	Nicar	11	Mifé	18	Nore	25	4MBC
5	Ami	12	Carba	19	Testo		
6	Panto	13	Eco	20	Beza		

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

7	Cyclo	14	Oxa	21	Spin
---	-------	----	-----	----	------

Figure 63: Séparation chromatographique obtenue avec le gradient optimal en mode positif

3.2. La pré-concentration en ligne : Optimisation de l'étape de trapping

La pré-concentration en ligne par commutation de colonnes est une pratique courante en nanochromatographie liquide permettant d'augmenter la quantité d'échantillon injectable. Elle nécessite un appareillage dédié, ainsi qu'un protocole d'optimisation rigoureux.

a) Appareillage et design expérimental

La pré-concentration en ligne par commutation de colonnes repose sur l'utilisation d'un système bidimensionnel comprenant une première colonne de chargement, qui permet de pré-concentrer les composés, et une seconde colonne de nanochromatographie, qui permet de séparer les analytes. La colonne de chargement a la particularité d'être très courte (typiquement 5 mm à 1 cm), mais possède un diamètre interne plus important que celui des colonnes capillaires (300µm à 500 µm). Chacune de ces colonnes est fixée sur une vanne 10 voies (Figure 64).

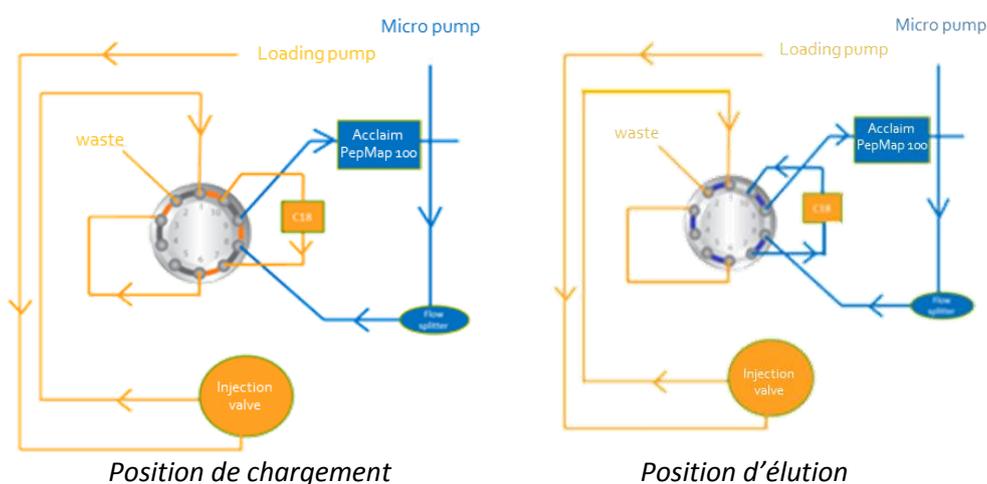


Figure 64: Schéma du système de pré-concentration en ligne par commutation de colonne

Dans un premier temps, la position de la vanne est telle que ces deux colonnes sont isolées l'une de l'autre. La cartouche de chargement est alors alimentée par un flux de phase mobile délivré par une pompe tertiaire, appelée « loading pompe ». La colonne capillaire est quant à elle alimentée en phase mobile par une seconde pompe tertiaire qui permet de générer des débits de l'ordre du nl/min, elle est ainsi appelée micro pompe. L'échantillon est injecté sur la cartouche de chargement et pré-concentré grâce au flux de phase mobile délivré par la loading pompe. Les débits utilisés lors de cette étape sont bien plus importants que ceux utilisés lors de la seconde étape de séparation, ils sont généralement de l'ordre de la dizaine à la centaine de µl/min. Après une durée qui doit être optimisée par l'opérateur, la vanne 10 voies commute, permettant ainsi aux deux colonnes d'être

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

reliées l'une à l'autre, on dit alors qu'elles sont en série. Une fois la vanne commutée, le système de colonnes en série n'est plus qu'alimenté par la micro-pompe, la loading pompe reste tout de même en fonctionnement mais la phase mobile est directement dirigée vers un réservoir poubelle. La phase mobile délivrée par la micro-pompe permet ainsi d'éluer les composés piégés dans la colonne de chargement et de les séparer sur la seconde colonne capillaire. Notons que l'étape d'élution des composés piégés dans la cartouche est communément réalisée en « back-flush » : le sens de circulation de la phase mobile lors de l'étape d'élution étant inversé par rapport à celui du chargement. Cette stratégie permet notamment de refocuser les analytes, permettant ainsi d'obtenir des pics chromatographiques plus fins (santos neto, 2005).

Au regard du mode de fonctionnement de la pré-concentration en ligne décrit ci-dessus, il semblait nécessaire de faire un focus sur les différents paramètres à ajuster afin de maximiser les performances de cette étape. L'optimisation de la phase de trapping est tout d'abord conditionnée par le choix de la phase stationnaire qui compose la cartouche de chargement. Dans notre cas, il était nécessaire de choisir une phase qui permettait à la fois de retenir les substances étudiées, mais également d'éliminer un maximum d'interférents matriciels. Au regard du caractère multi-résidus de la méthode et du caractère moyennement hydrophobe de la majorité des composés retenus pour cette étude, nous avons fait le choix d'utiliser une colonne de chargement possédant une phase silice greffée C18 avec des particules de 5 μ m, de 5mm de longueur et de 300 μ m de diamètre interne. Cette phase stationnaire retiendra les molécules ciblées, et permettra de dessaler les échantillons et d'éliminer les substances les plus polaires (i.e. sucres) qui ne seront pas retenues. Afin de piéger convenablement les substances d'intérêts, il est nécessaire d'utiliser un solvant de pré-concentration qui ne soit pas trop éluant. Rappelons que dans un premier temps la colonne de chargement n'est pas reliée à la colonne séparative, ainsi si le solvant de chargement présente une force éluante trop importante, les composés ne seront pas retenus sur la cartouche et donc directement envoyés à la poubelle. Cependant, le solvant de chargement doit tout de même contenir une faible proportion de solvant organique nécessaire au déploiement des chaînes C18, sans quoi aucune interaction n'est possible. Il est également indispensable d'optimiser le temps de chargement, celui-ci doit être suffisant pour pré-concentrer convenablement les analytes mais pas trop long, afin d'éviter l'élution des composés. Le solvant d'injection influence également la pré-concentration des analytes, tout comme dans le cas de la phase mobile, la force éluante de celui-ci peut améliorer ou détériorer les performances de la méthode. Bien que la littérature mentionne des volumes d'injections supérieurs au μ L pour ce type de configuration, compte tenu de la complexité des matrices investiguées, nous avons fait le choix de fixer le volume d'injection à 1 μ L. Etant très largement utilisé lors d'étude en nanochromatographie, le débit de chargement a également été fixé à 20 μ L/min.

Les essais préliminaires nous ont permis de mettre en évidence l'influence de la matrice sur l'étape de chargement : comparer à une injection dans le solvant, une injection d'extrait matriciel présentait un impact considérable sur les signaux mesurés. Nous avons en effet constaté des élargissements de pics, des inhibitions ou bien des exaltations de signal. Par conséquent nous avons choisi d'optimiser

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

l'étape de pré-concentration en ligne directement à partir d'un extrait dopé, et ce pour chacune des trois matrices investiguées.

En conclusion, nous avons optimisé les conditions de trapping, et plus particulièrement le temps de chargement, le solvant de chargement et le solvant d'injection pour chacun des trois invertébrés aquatiques retenus pour cette étude. Nous discuterons des différents résultats obtenus lors de cette phase d'optimisation dans les paragraphes suivants, en prenant notamment en compte l'intensité et l'aire des pics chromatographiques, ainsi que leur largeur, pouvant impacter la résolution.

Plusieurs solvants de chargement ont été testés pour chacun des modes d'ionisation, contenant différentes proportions de solvants organiques (H₂O/ACN/MeOH (98/1/1, 96/2/2 et 90/5/5)). Nous avons tout d'abord pu mettre en évidence que le solvant de chargement contenant seulement 2% en volume de solvant organique (98/2/2) ne permettait pas de piéger convenablement les molécules les plus hydrophobes (tamoxifène, spinosad, nicardipine, éconazole, PFOA, PFOS), et ce quel que soit l'espèce investiguée, le solvant d'injection et le temps de chargement. Il s'est en effet avéré que ces substances étaient beaucoup trop retenues sur la cartouche de chargement et n'étaient donc pas éluées dans la colonne capillaire lors de l'étape de séparation, engendrant des effets de carry over importants sur les analyses suivantes. Par conséquent, nous n'avons pas retenu cette composition de phase mobile, ni pour le mode positif, ni pour le mode négatif, et décidé d'augmenter le pourcentage de solvants organiques contenu dans le solvant de loading.

Au regard du mode positif, concernant les deux autres compositions de phase mobile investiguées, nous avons pu mettre en évidence des différences significatives au regard des différentes matrices étudiées. Bien que de manière générale, la phase mobile contenant 10% de solvant organique permette d'augmenter considérablement l'intensité et l'aire des pics chromatographiques correspondant aux substances les plus apolaires (Figure 65), et ce quel que soit l'espèce investiguée, nous avons pu constater que l'utilisation d'une telle phase mobile engendrait des élargissements de pics considérables pour certaines molécules, notamment dans le cas des extraits de crustacé et de mollusque (Figure 66).

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

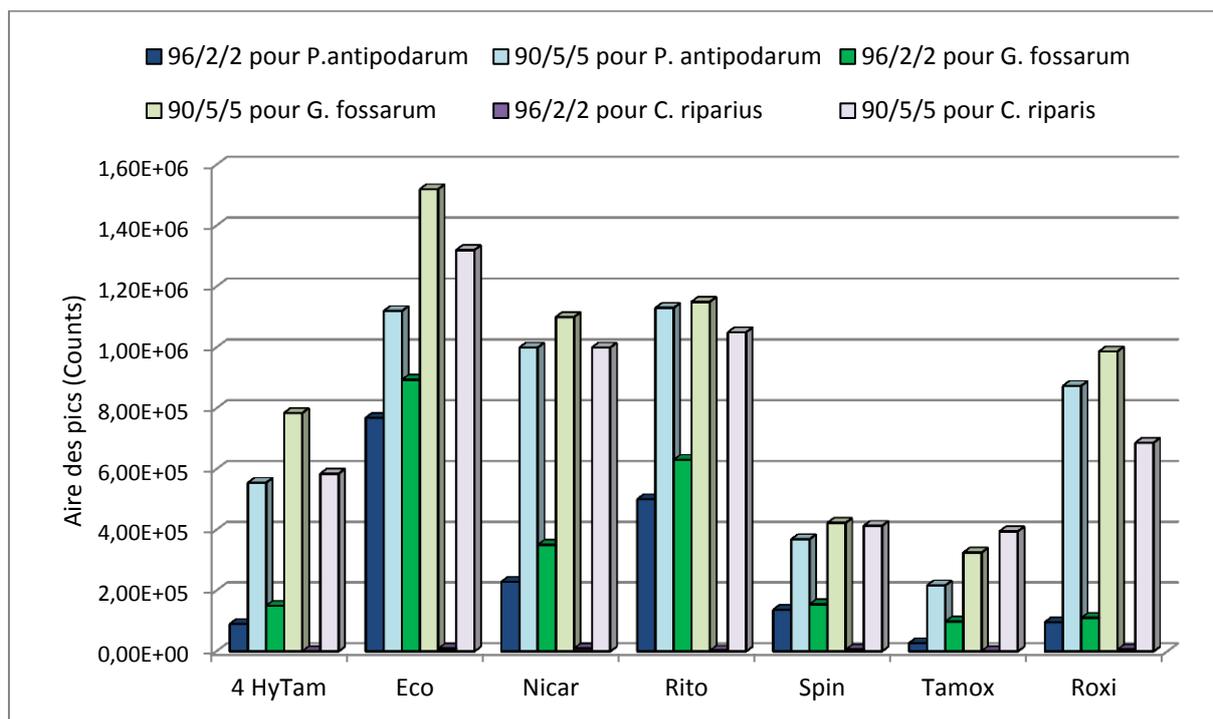


Figure 65: Influence de la composition du solvant de chargement au regard de l'aire des pic chromatographique correspondant aux substances les plus apolaires (en mode positif)

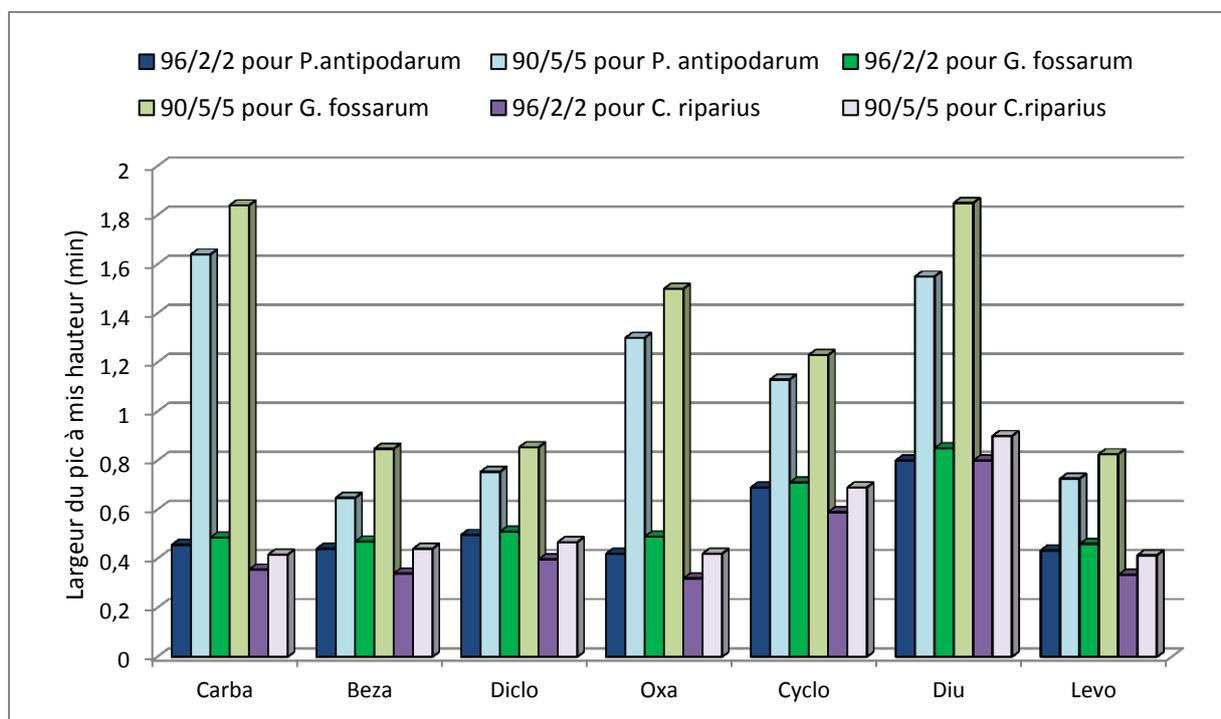


Figure 66: Largeur de pic à mis hauteur (minutes) pour quelques substances ciblées en fonction des différentes compositions de solvants de chargement (en mode positif)

On constate en effet que l'utilisation d'une phase mobile de chargement contenant 10% de solvant organique pour la pré-concentration des extraits de *Gammarus fossarum* et de *Potamopyrgus*

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

antipodarum entraîne une probable élution des substances faiblement à moyennement hydrophobes dans la colonne de chargement, ce qui a pour conséquence un élargissement des pics chromatographiques provoquant une perte de résolution et de sensibilité considérable. A l'inverse, chez *Chironomus riparius*, la matrice semble avoir moins d'impact sur l'étape de pré-concentration, si l'utilisation du mélange 90/5/5 engendre tout de même un élargissement des pics, celui reste négligeable puisqu'il ne détériore pas la résolution de manière significative. De plus, cette phase mobile permet de concentrer plus efficacement les molécules apolaires, qui présentent des aires de pic extrêmement faibles lorsque l'étape de piègeage est réalisée avec un solvant moins éluant (96/2/2).

La rétention des composés pouvant être pH-dépendante, nous avons ainsi ajouté 0,1% d'acide formique à chacune des compositions de solvant testées afin d'étudier l'influence du pH de la phase mobile de loading sur l'étape de pré-concentration en ligne. Cependant, ces essais se sont avérés non concluants. En effet, certains composés étaient de ce fait directement élués et donc non retenus dans la cartouche de chargement, ce fut notamment le cas de la lidocaïne. Par conséquent, nous avons décidé de ne pas acidifier la phase mobile de pré-concentration.

Par conséquent, la composition de solvant 90/5/5 (H₂O/MeOH/ACN) n'a été retenue que pour l'espèce *Chironomus riparius*. Les extraits de *Gammarus fossarum* et *Potamopyrgus antipodarum* seront quant à eux pré-concentrés grâce à la phase mobile de composition 96/2/2 (H₂O/MeOH/ACN).

La seconde étape de cette optimisation consistait à étudier l'impact du temps de chargement. Nous avons choisi de faire varier cette durée de 3 à 5 minutes par pas de 0,25.

Chez *chironomus riparius*, le solvant de pré-concentration étant plus éluant que pour les autres espèces, les durées de chargement supérieures à 3,25 minutes engendraient des pics très larges et dégradait ainsi la séparation chromatographique. Par conséquent, seuls les résultats relatifs à l'aire des pics obtenus avec des temps de chargement de 3 et 3,25 minutes seront présentés (figure X). Bien que ce laps de temps semble très court de prime abord, il a cependant beaucoup d'influence sur la réponse des composés les plus apolaires tels que le tamoxifène, la roxithromycine ou encore l'éconazole. Au regard de la Figure 67, on constate que le temps de chargement optimale correspond à une durée de 3,25 minutes.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

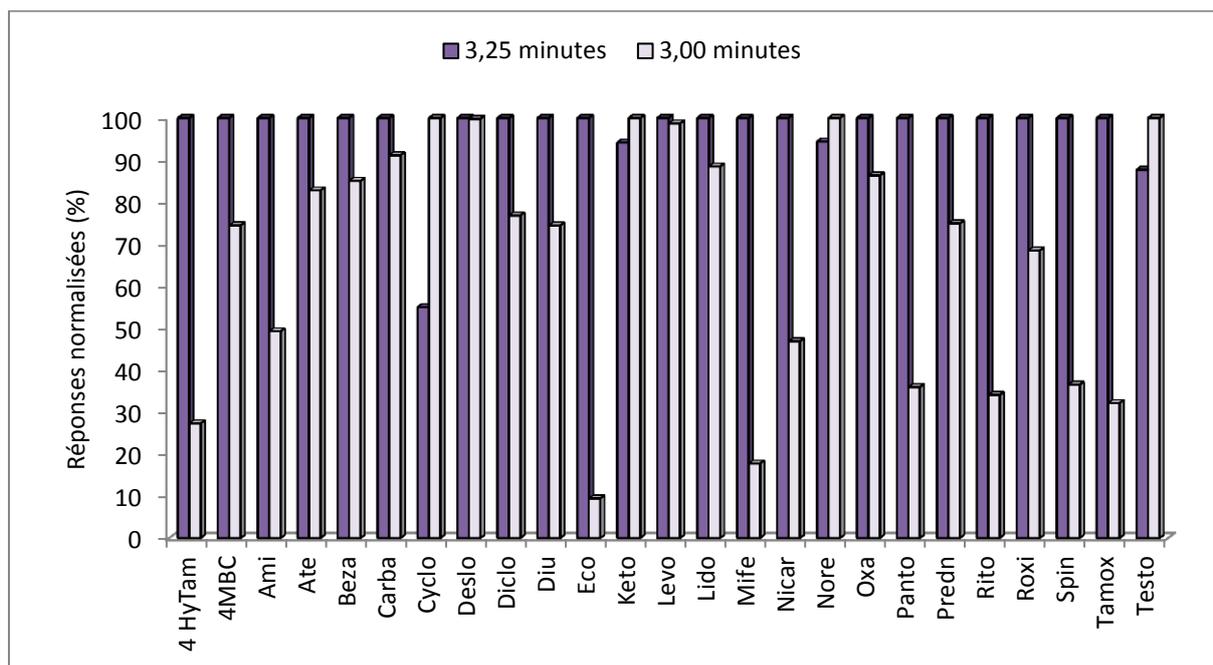


Figure 67: Influence du temps de chargement chez *Chironomus riparius* sur la réponse des analytes en mode positif

Au regard des deux autres espèces aquatiques choisies pour cette étude, le temps de chargement nécessaire était plus long que dans le cas précédent. Cette différence peut être attribuée à la force éluante de la phase mobile de chargement qui était plus élevée dans le cas de *Chironomus riparius*. Seule la durée de chargement correspondant à 5 minutes entravait la qualité de la séparation. Bien que nous ayons pu constater une légère augmentation de la largeur de certains pics en augmentant le temps de chargement, celle-ci permettait tout de même de conserver une résolution suffisante. Contrairement au cas de larve d'insecte, la condition optimale a été plus difficile à déterminer. Alors que l'augmentation du temps de chargement permet d'améliorer la réponse de certains composés, elle est cependant à l'origine de la diminution de la sensibilité pour certaines autres substances (Figure 68). En raison du caractère multi-résidus de la méthode, il nous était dans ce cas impossible de déterminer une condition qui soit idéale pour chacun des composés ciblés. Nous avons donc choisi la condition qui convenait au plus grand nombre de molécules, soit 4,75 minutes. Ce travail a également été réalisé chez *Potamopyrgus antipodarum*, pour lequel nous sommes arrivés à la même conclusion.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

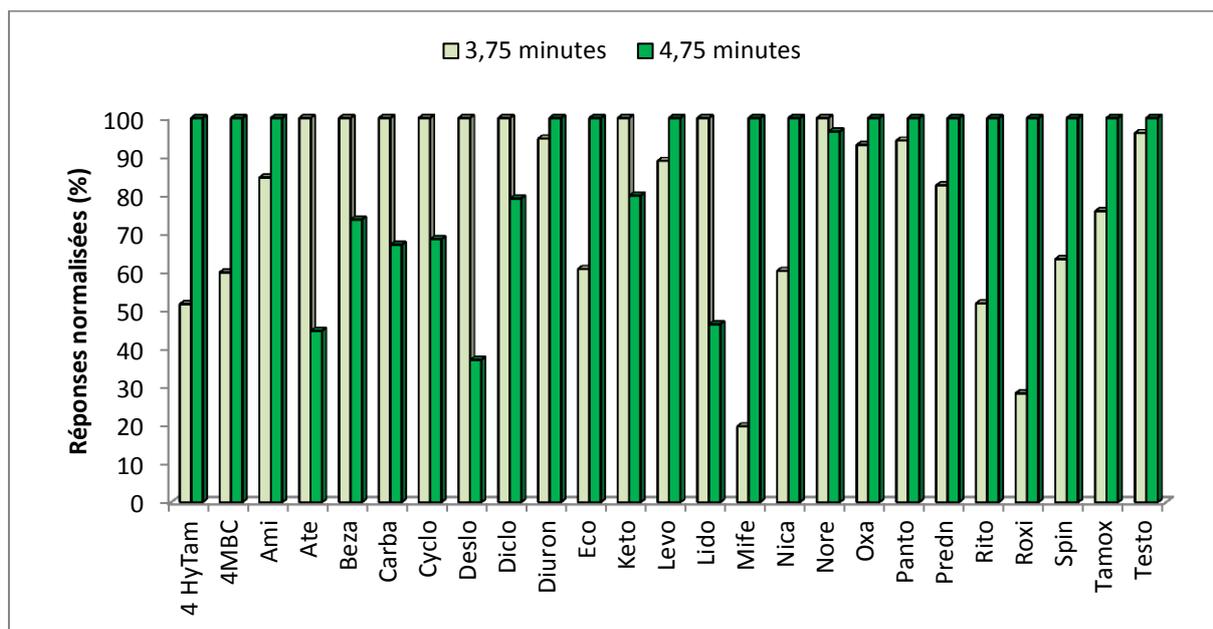


Figure 68: Influence du temps de chargement chez *Gammarus fossarum* sur la réponse des analytes en mode positif

Enfin, la composition du solvant d'injection a été optimisée. Nous avons testé différents solvants de reprise composés de H₂O/ACN/MeOH, en différentes proportions (80/10/10, 70/15/15 et 60/20/20). Tout comme dans le cas du solvant de chargement, la force éluante du solvant d'injection peut influencer la pré-concentration des analytes. La figure ci-dessous présente les résultats obtenus chez *Potamopyrgus antipodarum*.

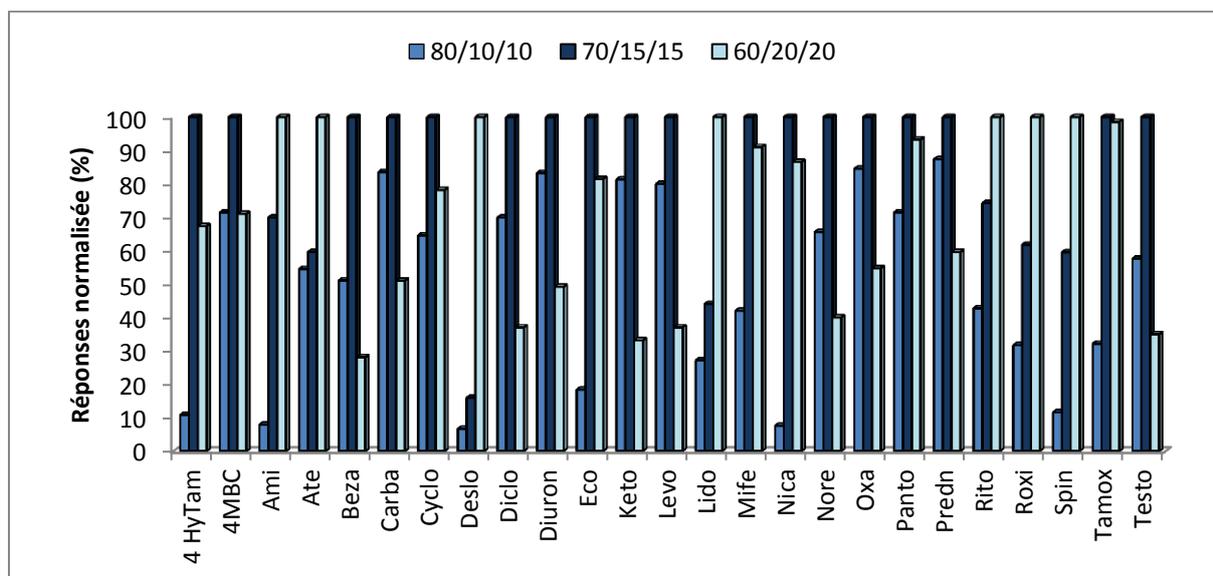


Figure 69: Influence du solvant d'injection sur la réponse des analytes en mode positif chez *Potamopyrgus antipodarum*

La composition du solvant d'injection correspondant à 70 %, 15 % et 15 % d'eau, d'acétonitrile et de méthanol respectivement, permet d'obtenir les meilleures réponses analytiques pour la majorité des

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

composés ciblés. La figure X permet de confirmer l'influence du solvant d'injection sur l'efficacité de l'étape de pré-concentration. A titre d'exemple, on constate que le spinosad, molécule fortement hydrophobe, présente de meilleures réponses analytiques lorsque le solvant d'injection est composé d'un fort pourcentage de solvant, mettant ainsi en exergue l'influence de la force éluante du solvant d'injection sur les molécules apolaires. A contrario, on constate que la réponse des molécules moyennement hydrophobes tels que la carbamazépine ou encore la testostérone, décroît lorsque le solvant d'injection est trop riche en solvant organique, ce qui laisse à penser que ces molécules pourraient être en partie éluées dans la cartouche de chargement.

Concernant l'optimisation des paramètres de pré-concentration en ligne pour la séparation en mode négatif, nous avons suivi le même raisonnement que pour le mode positif. Nous avons ainsi pu en tirer des conclusions similaires : une phase mobile de chargement, ainsi qu'un solvant de reprise plus riche en solvant organique permettaient de concentrer plus efficacement les composés les plus apolaires, notamment les alkylphénols et les perfluoroalkyls, mais entraînaient par ailleurs un élargissement de pic des substances moyennement hydrophobes (hormones stéroïdiennes). L'utilisation d'une phase de chargement tamponnée (0,1 mM d'acétate d'ammonium) permettait cependant de réduire l'asymétrie des pics (Figure 70).

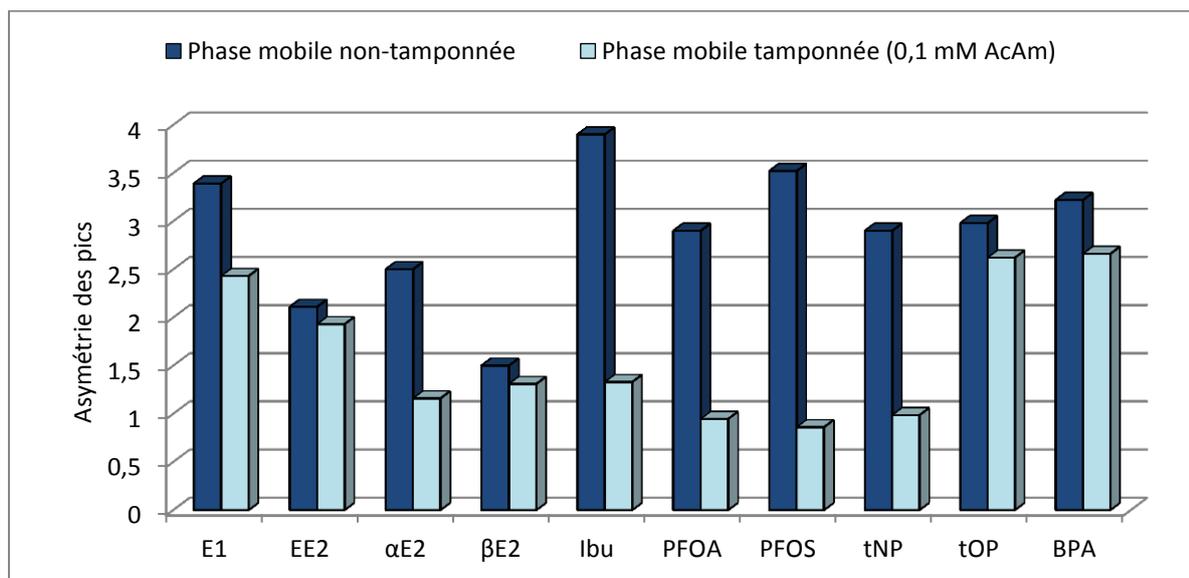


Figure 70: Asymétrie des composés détectés en nanoLC-MS/MS en mode ESI- selon la nature de la phase de chargement, tamponnée ou non (chez *P. antipodarum*)

En mode négatif, la pré-concentration en ligne s'est avérée moins matrice dépendante que dans le cas du mode positif. En effet, chacune des matrices investiguées présentait les mêmes paramètres optimaux. On note cependant que malgré l'utilisation d'une phase mobile de chargement faiblement éluante (96/2/2), ainsi que d'un solvant d'injection identique au mode positif (70/30), le temps de chargement était plus court (3,5 minutes). Une augmentation du temps de pré-concentration induisant une détérioration de la séparation entre les hormones stéroïdiennes (Figure 71).

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGCxChERS-NanoLC-MS/MS

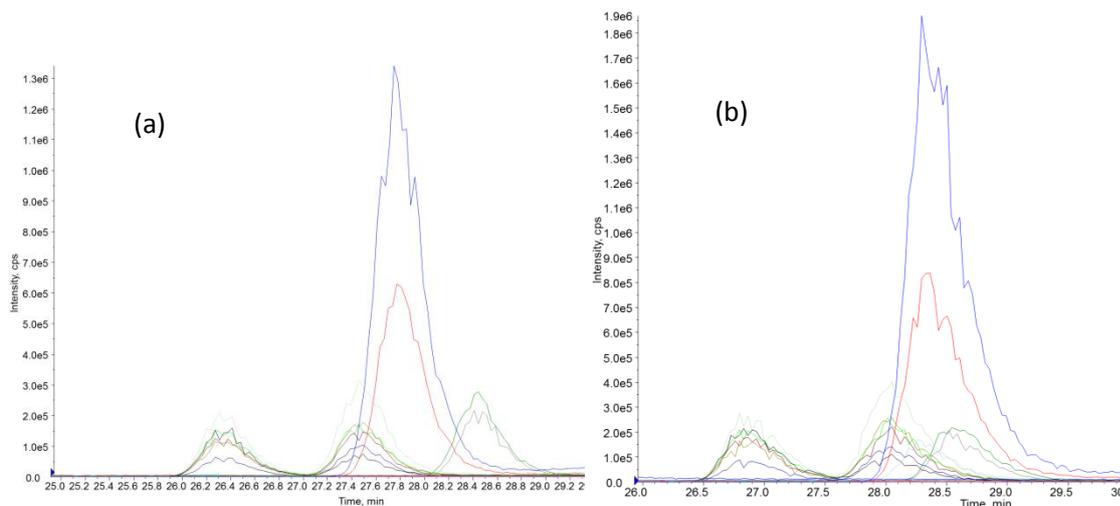


Figure 71: Séparation des hormones stéroïdiennes en fonction du temps de chargement (a) 3,5 minutes et (b) 4 minutes

En conclusion, les paramètres optimaux de pré-concentration en ligne pour chacun des deux modes d'ionisation sont résumés dans le tableau ci-dessous :

	Débit de chargement (μL/min)		Volume d'injection (μL)		Solvant d'injection (H ₂ O/MeOH/ACN)		Phase mobile de chargement (H ₂ O/MeOH/ACN)		Temps de chargement (minutes)	
	ESI+	ESI-	ESI+	ESI-	ESI+	ESI-	ESI+	ESI-	ESI+	ESI-
C. riparius	20		1		70/15/15		90/5/5		3,25	
G. fossarum							96/2/2 + 0,1 mM AcAm		3,5	
P. antipodarum							96/2/2		4,75	

Table 53: Paramètres optimaux de pré-concentration en ligne pour chaque espèce sentinelle

Bien que certaines hypothèses puissent être émises afin d'expliquer l'influence des différents paramètres testés sur l'étape de pré concentration en ligne, notamment celles permettant de corréler le caractère plus ou moins hydrophobe des molécules avec l'influence de la force éluante des solvants utilisés, il semble nécessaire de mentionner qu'il est impossible d'expliquer l'intégralité des phénomènes observés. En raison du système d'ionisation utilisé, il semble probable que l'exaltation ou l'inhibition des signaux observé lors de cette étape d'optimisation puissent également être influencée par les effets de matrice. En effet, chacun des tests relatés ci-dessus présentent des conditions de trapping différentes, qui impactent certes la pré-concentration des molécules ciblées, mais également celles des composés de la matrice. Par conséquent, chacun des tests présentent des effets de matrice différents qui jouent un rôle plus ou moins important sur l'intensité du signal

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

mesuré. En conclusion, les observations décrites dans les paragraphes précédents résultent de la combinaison entre efficacité de pré-concentration et effets de matrice.

Partie B : Optimisation de la préparation d'échantillon : mise au point de la méthode d'extraction par Micro-QuEChERS

Développer une méthode d'extraction dans une matrice complexe destinée à l'étude de composés présents à l'état de traces voire d'ultra traces reste encore aujourd'hui une étape critique de la mise au point de méthodes d'analyse. Une technique d'extraction doit conduire à l'extraction sélective des substances d'intérêt, tout en permettant de purifier et de concentrer l'échantillon. Le principal objectif de ces travaux consistait à miniaturiser l'étape d'extraction de manière à ce que celle-ci puisse être adaptée à la très faible masse des organismes sentinelles choisies pour cette étude. Idéalement, cette étape devra être réalisée en utilisant un seul organisme par extraction, ce qui nous permettra d'obtenir les premières données de bioaccumulation à l'échelle d'un individu pour les espèces sélectionnées. Bien que cet objectif puisse être réalisé pour le mollusque et le crustacé, dont la masse d'un individu est généralement de l'ordre de la dizaine de mg pour les organismes matures, il semble peu envisageable d'utiliser un seul organisme de *Chironomus riparius*, et ce pour deux raisons principales. Premièrement, la masse d'une larve d'insecte ne représente que 2 à 3 mg en poids frais, ce qui ne représentera qu'une quantité infime après lyophilisation, difficile à évaluer de façon précise par peser, a moins d'utiliser une microbalance. Deuxièmement, les larves étant variables en termes de poids et de taille, il nous aurait été impossible de calibrer nos expérimentations, ce qui est un véritable problème lors d'études quantitatives. Par conséquent, au regard de cette espèce, nous avons fait le choix de travailler sur un pool de 3 ou 4 d'organismes, ce qui correspond à environ 10 mg de matrice. L'étape d'extraction développée dans le cadre de ces travaux devra également permettre d'extraire l'ensemble des composés ciblés avec des rendements d'extraction suffisants, tout en limitant l'utilisation de solvant organique.

Au regard de la littérature et parmi les méthodes d'extraction couramment utilisées pour l'extraction de micropolluants dans des matrices biotiques, l'extraction de type QuEChERS présentait tous les avantages recherchés dans le cadre de ces travaux. Rapide, efficace et peu coûteuse, sa miniaturisation nous permettra de réaliser des analyses à haut débit, tout en limitant la quantité de produits chimiques.

Basée sur une extraction liquide/liquide assistée par des sels, l'efficacité de la méthode QuEChERS est en grande partie conditionnée par le choix du solvant d'extraction, la nature des sels et la quantité de chacun de ces réactifs. Ainsi, l'optimisation de chacun de ces paramètres a été effectuée pour chacune des matrices investiguées. Les matrices biotiques étant des matrices complexes, une étape de purification s'avère nécessaire afin de limiter la présence d'interférents matriciels qui pourraient altérer les performances de l'analyse. Lors de la mise en œuvre de la méthode QuEChERS,

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

l'étape de purification en généralement réalisée par dSPE, de ce fait nous étudierons l'efficacité de différentes phases dispersives (PSA et PSA/C18), au regard de la réponse analytique et des rendements d'extraction des molécules retenues pour cette étude.

Afin de réaliser les différents tests d'extraction et de purification, un pool d'une centaine d'organismes « blancs », élevés en laboratoire et jamais soumis à la pollution sera utilisé pour chacun des invertébrés étudiés. Préalablement lyophilisé et broyé, ce pool sera aliquoté de façon à ce que chaque aliquot soit représentatif de la masse d'un seul individu (pour *G. fossarum* et *P. antipodarum*) ou correspondent à 10 mg de poids frais pour *C. riparius*. Les prises d'essai seront ensuite dopées par immersion grâce à une solution de méthanol contenant l'intégralité des substances ciblées. Le dopage par immersion consiste à immergé totalement la matrice dans un solvant contenant les polluants. Le mélange sera ensuite homogénéisé puis séché sous flux d'azote. Cette technique permet de répartir les substances ciblées de façon homogène dans la matrice, de façon à simuler au mieux le cas des échantillons réels. Au regard des différences de sensibilité analytique des molécules choisies, il était nécessaire de choisir des concentrations de dopage qui permettraient d'obtenir des signaux d'intensité facilement mesurable sans pour autant qu'ils soient trop intense, ce qui ne serait pas représentatif des concentrations environnementales attendues, de ce fait toutes les molécules ne sont pas présentent en même concentration dans la solution de dopage. Ces concentrations de dopage ont été déterminées lors d'essai préliminaires et sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Composés	Concentration de dopage (ng.g ⁻¹ de poids frais)		
	<i>Gammarus fossarum</i>	<i>Chironomus riparius</i>	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>
4HyTa	500	500	500
4MBC	500	500	1000
Ami	50	10	50
Ate	500	2000	2000
Beza	10	10	10
Carba	10	10	10
Cyclo	1000	500	2000
Deslo	200	200	500
Diclo	50	50	200
Diu	50	50	200
Eco	500	200	1000
Keto	200	100	200
Levo	200	100	200
Lido	50	50	500
Mif	500	100	200
Nicar	100	10	100
Nore	500	100	500
Oxa	10	10	20
Panto	500	500	500

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

Predni	200	200	200
Rito	2000	200	2000
Roxy	50	10	100
Spin	2000	2000	2000
Tamo	2000	2000	2000
Testo	50	50	50
BPA	500	200	500
Ibu	200	100	50
PFOS	50	50	50
PFOA	50	50	50
EE2	500	500	500
αE2	500	500	500
βE2	500	500	500
E1	100	100	100
ToP	2000	2000	2000

Table 54: Concentration de dopage de chacune des matrices investiguées utilisées lors du développement et de l'optimisation de l'étape de préparation d'échantillon

1. Optimisation de l'étape d'extraction

1.1. Influence de la nature et de la concentration des sels

La méthode QuEChERS originale repose sur l'utilisation d'un solvant d'extraction miscible à l'eau, l'addition de sels est alors indispensable pour induire une séparation des phases. Historiquement, seuls NaCl et MgSO₄ étaient utilisés. Aujourd'hui, la littérature relate le plus souvent l'utilisation de sels tampons citrate ou acétate en référence aux deux protocoles normés existants. Par conséquent, l'efficacité obtenue avec chacun des mélanges tampons commerciales a été comparée. Afin de réaliser cette comparaison, nous avons utilisé l'ACN comme solvant d'extraction, en adéquation avec les protocoles AOAC et EN qui préconisent l'utilisation de ce solvant organique. La quantité d'ACN a été fixée à 500 µL, auxquels nous avons ajouté 500 µL d'eau de façon à obtenir un ratio eau/solvant égal à 1. La quantité de sel a été déterminée de façon à ce qu'elle soit proportionnelle à celle utilisée dans la méthode originale, soit 500 mg. Les résultats ainsi obtenus sont présentés dans les figures X,X et X.

Pour la plupart des composés, comparé au tampon acétate, le tampon citrate permet d'obtenir de meilleures réponses, en particulier pour le spinosad, la roxithromycine et le tamoxifène qui présentent des réponses deux à cinq fois supérieures avec le tampon citrate. Il semble cependant important de souligner que certains composés qui présentaient de meilleures réponses avec les sels citrates pour l'une des matrices d'intérêt, pouvaient présenter des réponses plus élevées avec les

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

sels acétates pour l'une des autres matrices investiguées. Ces observations permettent de confirmer que le choix des sels QuEChERS est non seulement composé dépendant, mais également matrice dépendant. Cette matrice dépendance a également été soulignée par Wiest et al et Giroud et al qui utilisent la méthode QuEChERS pour extraire les mêmes substances à partir de différentes matrices apicoles (abeilles, miel, pollen et pain d'abeille), en utilisant des sels différents en fonction de la matrice.

Dans notre cas, les sels tampons à base de citrate ont été choisis pour l'extraction des composés d'intérêts, et ce quel que soit la matrice investiguée.

Dans la méthode QuEChERS, la concentration en sel présente une forte influence sur la séparation des phases aqueuse et organique. De ce fait, l'influence de la concentration en sels citrates sur les performances du procédé d'extraction a été évaluée dans un intervalle compris entre 0,5 et 1,5 g/ml d'eau. La Figure 72 illustre les résultats obtenus pour quelques substances retenues pour cette étude.

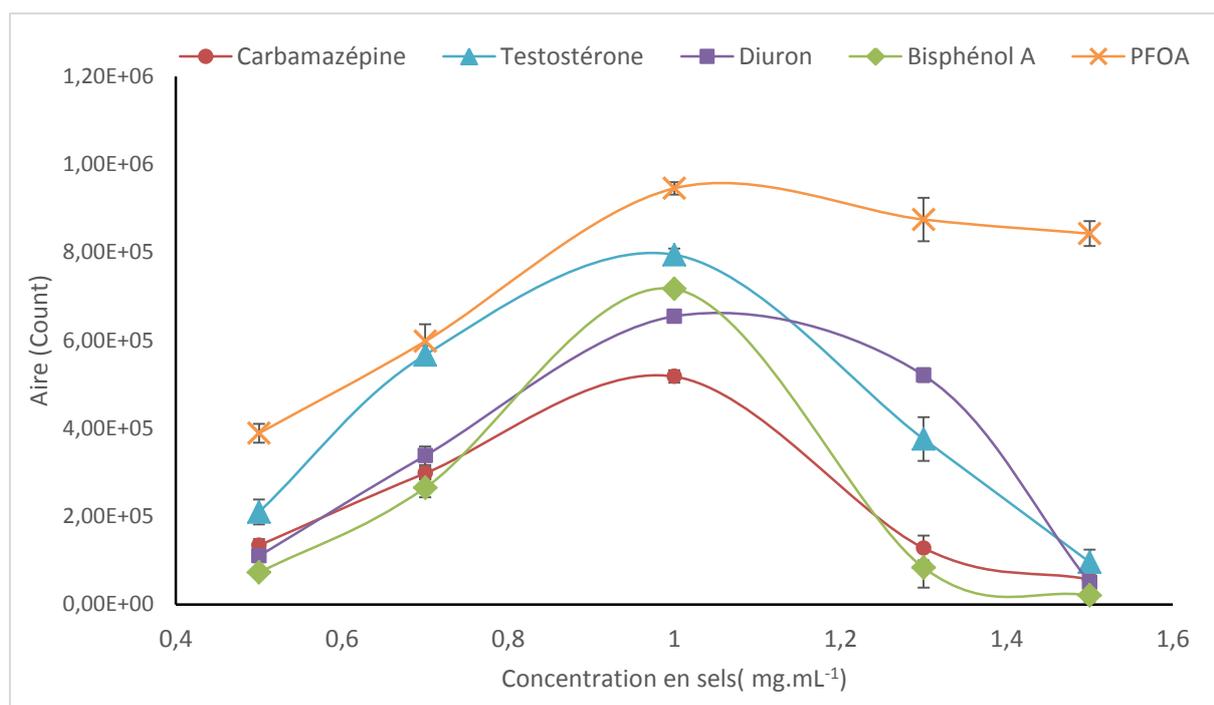


Figure 72: Influence de la concentration en sels citrates sur la réponse de certains analytes ciblés

Pour une gamme de concentration allant de 0,5 à 1 g/mL, les réponses analytiques augmentent, probablement en raison de l'augmentation de l'efficacité du procédé de salting out. Lorsque la concentration en sel dépasse 1 g/ml, la viscosité de la solution aqueuse est telle que les transferts de masse deviennent difficiles, ce qui engendre une diminution de l'efficacité d'extraction, conduisant à l'obtention de réponses analytiques plus faibles. Au-delà de 1,3 g/mL, la solution aqueuse semble

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

sursaturée. La concentration en sel équivalente à 1g/ml semble donc optimale, elle a de ce fait été retenue pour la suite de l'optimisation.

1.2. Influence de la nature et du volume du solvant d'extraction

L'extraction liquide/liquide est basée sur l'affinité des analytes à doser pour chacune des phases. Cette affinité est d'une part tributaire du composé lui-même (propriétés et caractéristiques physico-chimiques), d'autre part de la nature du solvant d'extraction, et finalement du volume de solvant utilisé pour l'extraction. Le choix d'un solvant d'extraction approprié s'affiche donc comme une étape critique de l'extraction QuEChERS. Ce solvant doit être polaire, miscible à l'eau et doit pouvoir être séparé de la phase aqueuse par addition de sels. Notons également qu'il est indispensable que les sels choisis pour réaliser le salting out, dans notre cas les sels de citrates, soient insolubles dans le solvant d'extraction. Au regard de ces recommandations, les deux solvants les plus couramment utilisés lors des extractions de type QuEChERS ont été testés, à savoir l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle. En outre, deux mélanges acétonitrile/isopropanol en proportion 90/10 et 70/30 ont également été testés. Le choix de ce mélange de solvant a été basé sur une étude antérieure menée dans notre laboratoire qui a démontré que ce mélange permettait d'améliorer la récupération des alkylphénols, molécules particulièrement complexes à extraire, notamment lors de méthodes multi-résidus. En outre, l'isopropanol peut dénaturer les protéines de la matrice, et de ce fait induire la libération des molécules cibles qui seraient associées à ces protéines (Jia, 2012). Les rendements d'extraction obtenus pour chaque solvant (ou mélange de solvants), avec des volumes compris dans une plage de 250 à 1000 μL ont été calculés pour chacune des matrices investiguées. Une série d'expériences a ainsi été effectuées pour chacune des espèces sentinelles en utilisant 500 μL d'eau, 500 mg de tampon citrate et les différentes proportions de solvant organique décrites ci-dessus.

En ce qui concerne l'influence du volume de solvant d'extraction, nous avons pu constater que lorsque l'on utilisait 250 μL de solvant, la délimitation entre les deux phases n'était pas clairement évidente, ce qui rendait la récupération de la phase supérieure extrêmement délicate, particulièrement dans le cas de *G. fossarum*, pour lequel une émulsion entre les deux phases a pu être observée. Cette émulsion pourrait être attribuée à la précipitation des protéines qui peut avoir lieu dans l'acétonitrile. En augmentant le volume de solvant de 250 μL à 500 μL , nous avons pu constater une amélioration des rendements d'extraction, et ce quel que soit la matrice étudiée. Pour des volumes de solvant supérieurs à 500 μL , les rendements d'extraction de la majorité des composés ne présentaient aucune différence significative, en comparaison à ceux obtenue avec un volume de 500 μL . Par conséquent nous avons choisi d'utiliser un volume de solvant équivalent à 500 μL pour l'extraction finale.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

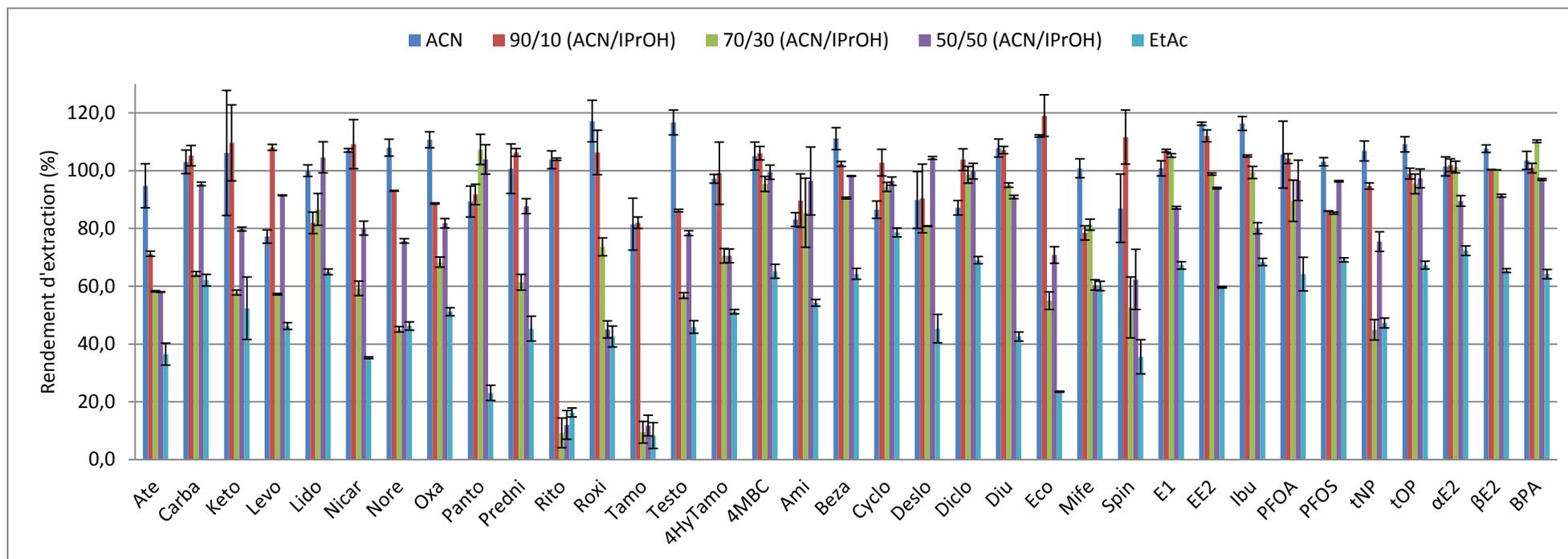


Figure 73: Rendements d'extraction obtenus avec différents solvants (ou mélanges de solvant) chez *Potamopyrgus antipodarum*

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

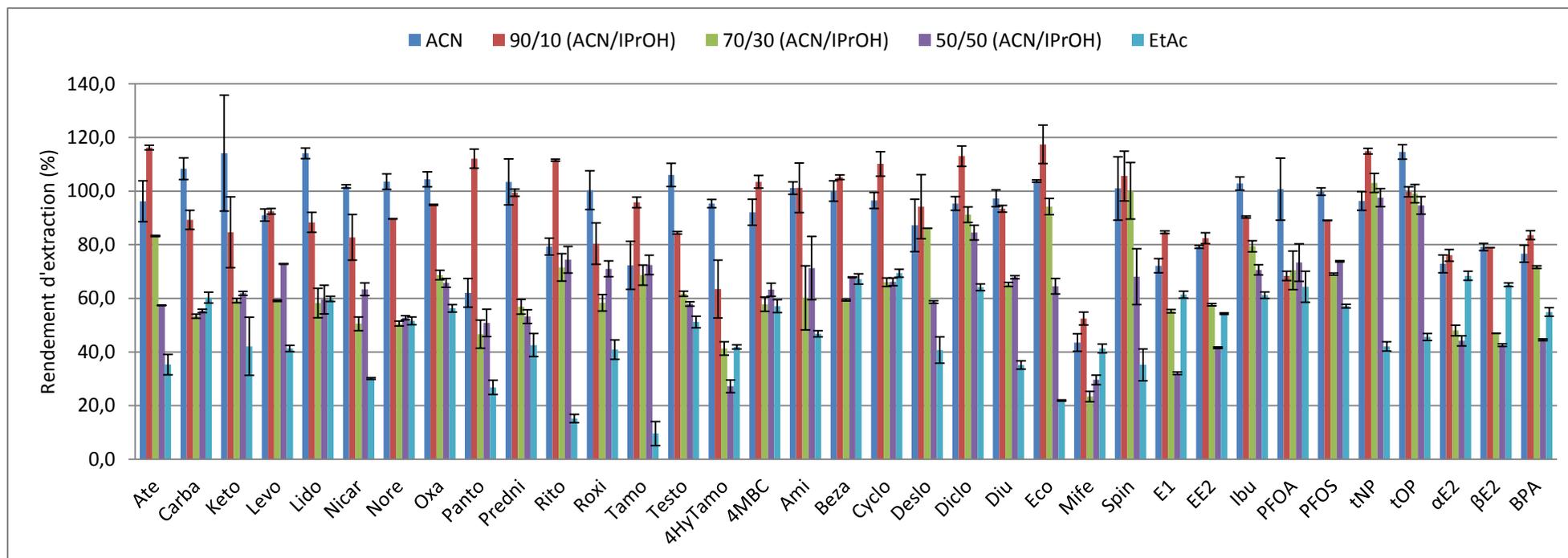


Figure 74: Rendements d'extraction obtenus avec différents solvants (ou mélanges de solvant) chez *Chironomus riparius*

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

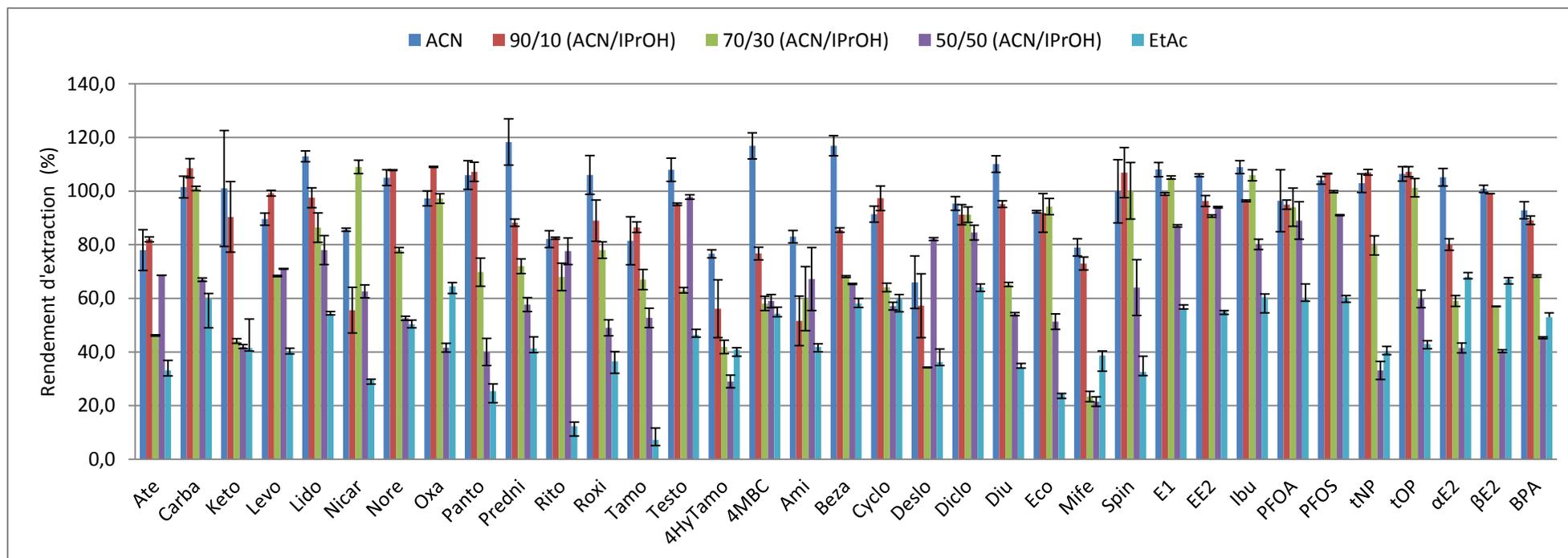


Figure 75: Rendements d'extraction obtenus avec différents solvants (ou mélanges de solvant) chez *Gammarus fossarum*

Comme observé sur les figures Figure 73Figure 74Figure 75, la méthode d'extraction basée sur l'utilisation de l'acétate d'éthyle présente des rendements d'extraction inférieure à 70% pour la plupart des molécules ciblées pour cette étude. De meilleurs rendements d'extraction ont cependant été obtenus en utilisant l'acétonitrile et le mélange ACN/iPrOH (90/10) comme solvant d'extraction. Néanmoins, nous avons choisi l'acétonitrile pour des raisons liées à l'étape de purification qui seront explicitées dans les paragraphes suivants. Au regard de la littérature, l'acétonitrile est le solvant le plus utilisé pour l'extraction de type QuEChERS.

2. Optimisation de l'étape de purification

En raison de la complexité des matrices d'intérêt, une étape de purification s'avérait nécessaire afin de limiter la présence de substances interférentes. Dans la méthode QuEChERS originale, cette étape est réalisée par dSPE. La phase dispersive doit retenir les composés co-extraits de la matrice et non les analytes ciblés. Par conséquent, pour évaluer l'efficacité de la purification par dSPE, deux sorbants commerciaux ont été testés : la PSA et le mélange PSA/C18. La phase dispersive type PSA est utilisée pour éliminer les acides organiques polaires et les sucres, tandis que le mélange PSA/C18 élimine principalement les composés non polaires tels que les lipides. En outre, une faible quantité de $MgSO_4$ est généralement ajoutée à chacun de ces sorbants afin d'éliminer l'excès d'eau et d'améliorer le partitionnement des analytes. La quantité de phase sorbante, ainsi que celle de $MgSO_4$ ont été déterminées au regard des deux protocoles normés qui préconisent l'utilisation de 200 mg de ce mélange par millilitre d'extrait. La comparaison des rendements d'extraction obtenus sans étape de purification et avec purification pour chacune des phases dSPE testées est présentée dans les Figure 76Figure 77Figure 78.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGCChERS-NanoLC-MS/MS

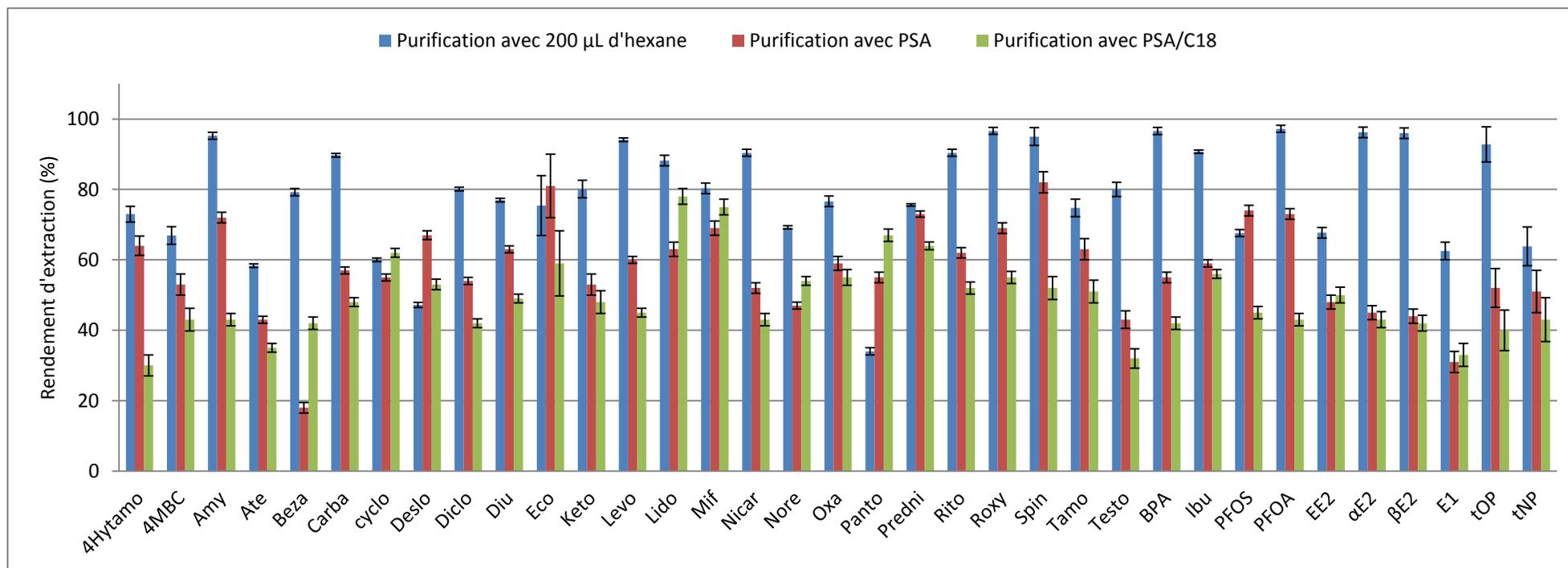


Figure 76: Rendements d'extraction obtenus avec différents protocoles de purification chez *Potamopyrgus antipodarum*

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS-NanoLC-MS/MS

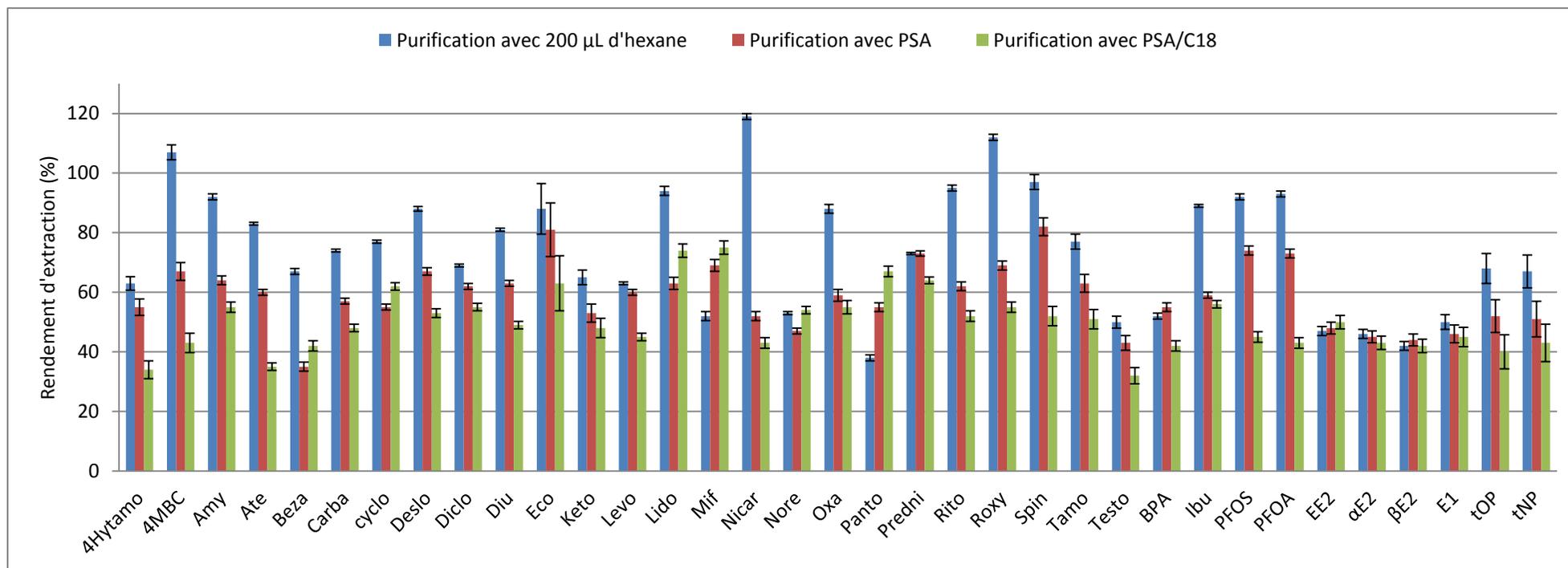


Figure 77: Rendements d'extraction obtenus avec différents protocole de purification chez *Chironomus riparius*

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

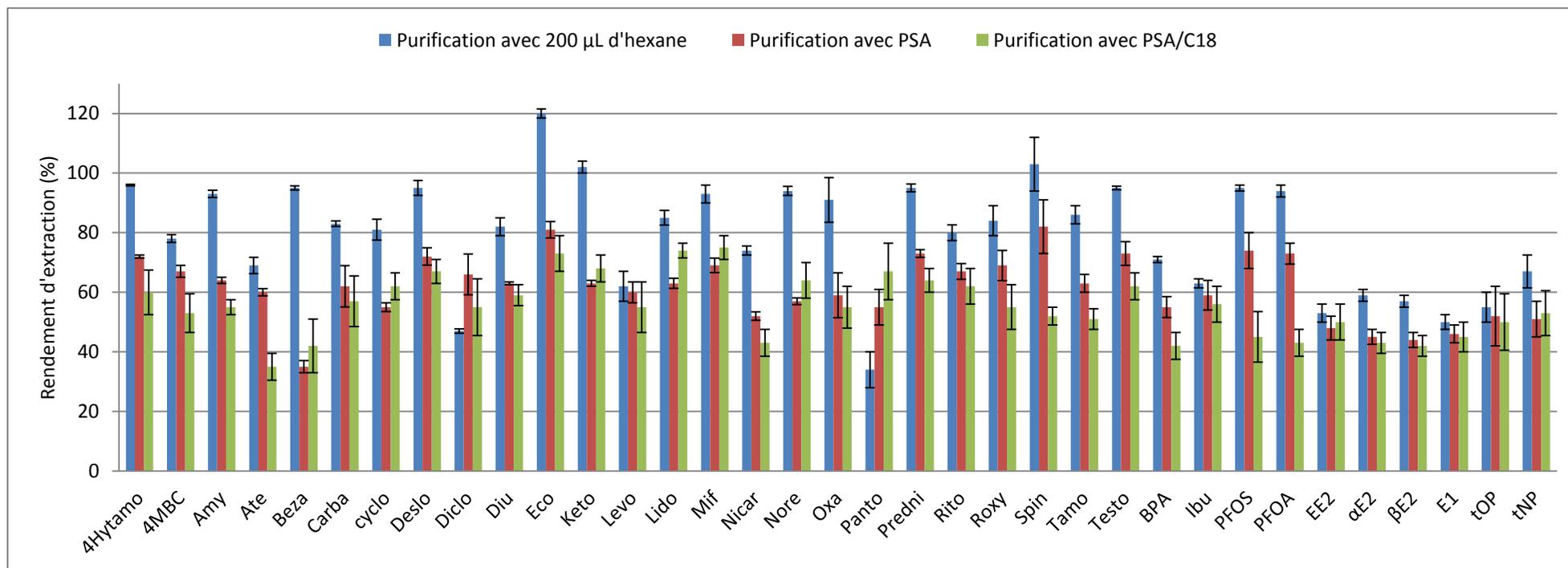


Figure 78: Rendements d'extraction obtenus avec différents protocole de purification chez *Gammarus fossarum*

Chapitre 3 : Développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

Comparé à l'extraction sans étape de purification, l'utilisation du mélange PSA/C18 diminue les rendements d'extraction d'un facteur deux pour plusieurs composés (E1, bézafibrate, testostérone, Norethindrone et lévonorgestrel). Les résultats obtenus en utilisant la phase de sorption de type PSA sont équivalents à ceux obtenus sans étape de purification, excepté pour le tamoxifène, le spinosad et l'éconazole. Pour ces derniers analytes, les meilleurs rendements d'extraction ont été obtenus sans phase de purification. Ces tests permettent de mettre en évidence que ni la PSA, ni le mélange PSA/C18 ne sont appropriés dans le cadre de notre étude. Cependant, plusieurs autres procédures de purification, non basées sur l'utilisation de la dSPE ont été rapportées dans la littérature. Parmi celles-ci, l'utilisation d'hexane est le plus populaire pour les matrices biologiques. En effet, il a été démontré que ce tiers solvant, non miscible à l'ACN, permettait d'éliminer les composés fortement hydrophobes et les acides gras co-extraits. Afin d'étudier l'efficacité de cette procédure de purification, plusieurs volumes d'hexane allant de 100 μ L à 400 μ L ont été ajoutés simultanément à l'ajout d'eau et d'acétonitrile nécessaire à l'extraction. Les bénéfices liés à l'ajout d'hexane ont été clairement observés lors des tests d'expérimentation : les extraits purifiés à l'hexane étaient moins visqueux et s'évaporaient plus rapidement. Pour des volumes allant de 200 μ L à 400 μ L, des réponses équivalentes ont été observées pour la plupart des composés, à l'exception des composés les plus lipophiles tels que le tamoxifène, l'éconazole, les spinosad ou encore les perfluoroalkyls. Pour ces substances à analyser, les réponses maximales ont été obtenues avec 200 μ L d'hexane et diminuaient lorsque le volume de ce tiers solvant augmentait. En outre, lorsque le volume d'hexane était inférieur à 200 μ L, la séparation entre les phases hexane et ACN n'était pas clairement visible. Par conséquent, la récupération de la phase organique extractante n'était que peu reproductible. Pour ces raisons, 200 μ L d'hexane ont été sélectionnés comme volume optimal pour l'étape de purification. Puisque l'isopropanol et l'hexane sont des solvants miscibles, il n'a pas été possible de réaliser l'étape d'extraction avec un mélange 90/10 (ACN/IPrOH) suivie d'une purification à l'hexane. Pour cette raison et selon les résultats concernant l'optimisation du solvant d'extraction présenté dans le paragraphe précédent, l'acétonitrile a été retenue comme solvant d'extraction.

Partie C : Considérations des sources de contamination et influence de la qualité des solvants

La contamination est un problème notoire lors de l'analyse des alkylphénols, du BPA et des perfluoroalkyls à des niveaux de l'ordre de l'ultra-trace (Salguiero-Gonzalez, 2012), rendant ainsi l'obtention de basses limites de détection compliquée, en raison de la présence de signaux indésirables intenses dans le « blanc ». En outre, ces contaminations peuvent engendrer une sous-estimation ou une surestimation des résultats analytiques, notamment lorsque les niveaux de blanc ne sont pas stables. Dans notre cas, l'analyse de blancs de procédure, c'est-à-dire l'analyse d'extraits obtenus à partir du pool d'organismes considérés comme exempts de toute pollution, a révélé la présence de BPA, tOP, tNP, PFOA et de PFOS. Trois principales hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette contamination :

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

- Ces substances ciblées sont naturellement présentes dans les matériaux utilisés tout au long du processus analytique (cônes de pipette, tubes à centrifuger, tubulures du système chromatographique...) et peuvent ainsi être relarguées.
- Les solvants peuvent être contaminés en raison de leurs nombreuses filtrations sur des filtres qui peuvent relargués des additifs plastiques.
- Ces contaminations peuvent provenir des organismes utilisés lors du développement de la méthode, qui seront par la suite utilisés pour réaliser la gamme de calibration, et qui ont pu bioaccumuler ces micropolluants au cours des cultures à long terme établies en laboratoire, notamment en raison de la présence de matières plastiques dans les aquariums (systèmes d'oxygénation par exemple)

Cette troisième source probable de contamination étant difficilement évitable, la première étape permettant de remédier au problème de contamination des blancs a consisté à recentrer notre attention sur la contamination des solvants. Nous avons ainsi investigué une technique de purification empirique: la distillation.

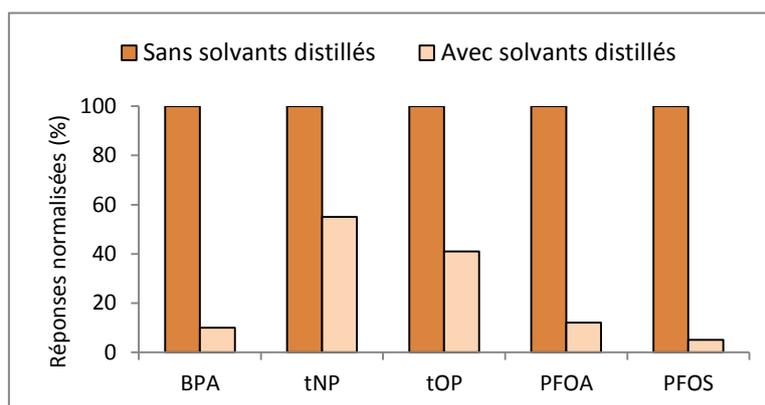


Figure 79: Comparaison de la réponse de certains composés d'intérêts obtenue avec et sans solvants distillés

Le suivi des contaminations de certains composés d'intérêt a permis de mettre en évidence l'influence de la distillation sur la qualité des solvants. En effet, d'après la Figure 79, nous pouvons noter l'impact et l'efficacité de la distillation sur la diminution des pollutions, puisque celles-ci sont réduites de moitié au minimum. L'impact de la distillation des solvants ne pouvant être négligé, le méthanol, l'acétonitrile et l'eau utilisés lors des étapes d'extractions et d'analyses seront donc distillés selon le protocole décrit en annexe. Malgré la procédure de distillation, les blancs de méthode obtenus ne sont pas totalement dépourvus de composés d'intérêt, cependant les contaminations sont constantes au cours du temps, et des lots de solvants utilisés: aucune variabilité de pollutions en composés d'intérêt n'a été constatée.

Partie D : Performances et validation de la méthode

La validation de méthode figure parmi les mesures universellement reconnues comme faisant nécessairement partie d'un système exhaustif d'assurance qualité dans le domaine de la chimie analytique. La validation de méthode s'affiche ainsi comme l'ultime composante d'un développement analytique permettant de garantir la fiabilité des données produites.

La fiabilité d'une méthode analytique quantitative est en partie conditionnée par le choix de la méthode de calibration. Comme discuté dans le chapitre consacré à l'état de l'art, les effets de matrices sont l'inconvénient majeur des couplages de type LC-MS. Par conséquent, il est indispensable de disposer d'une méthode de calibration permettant de prendre en compte et de corriger ces effets de matrices. Bien que la méthode des ajouts dosés soit considérée comme la stratégie la mieux adaptée pour la réalisation d'études quantitatives dans des matrices complexes, celle-ci étant très longue et coûteuse, elle est de ce fait peu utilisée dans le cas de cohortes importantes. L'utilisation de standard interne est également une pratique courante. Ajouté aux échantillons avant l'étape d'extraction, et présents dans les solutions standards d'étalonnage, les standards internes permettent à la fois de prendre en compte le taux de récupération des analytes à doser, mais également de compenser les effets de matrices. Afin de tenir compte de la suppression ou de l'exaltation de l'ionisation, le standard interne devrait idéalement co-éluer avec l'analyte considéré et posséder la même sensibilité que celui-ci. Ceci est généralement rendu possible grâce à l'utilisation de molécules marquées. Ces isotopes, utilisés comme standard interne, possèdent des structures analogues aux composés à doser mais des masses différentes, ce qui permet de les différencier les uns des autres en spectrométrie de masse. Notons cependant que l'intégralité des molécules ne peut être disponible commercialement sous une forme marquée, par conséquent, il de coutume d'utiliser des standards internes appartenant à la même la famille chimique que les analytes à doser. Néanmoins, ces standards internes peuvent donner lieu à des résultats trompeurs, surtout lorsque les temps de rétention du standard interne et du composés ciblé différent.

Dans le cadre de notre étude, l'ensemble des molécules n'étant pas disponibles sous leurs formes marquées, nous avons fait le choix d'une autre stratégie d'étalonnage : la calibration par « matrix matched », ou l'étalonnage dans la matrice. Cette approche, couramment utilisée dans le domaine de l'analyse environnementale, consiste à enrichir une matrice blanche similaire à celle des échantillons avec les analytes à doser à différents niveaux de concentration. Ces aliquots de matrice blanche dopée étant traités d'une manière similaire aux échantillons réels, la courbe d'étalonnage ainsi obtenue permet de compenser la perte due à la récupération des substances, ainsi que la suppression ou l'exaltation des phénomènes d'ionisation. Dans notre cas, une matrice blanche étant disponible en quantité suffisante pour chacune des espèces investiguées, cette méthode de calibration semblait être la plus appropriée.

Quel que soit la méthode de quantification choisie, celle-ci peut être sujette à des erreurs, l'un des objectifs de la validation est donc d'en vérifier l'exactitude. Etablir les performances analytiques de la

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

méthode globale, comprenant l'extraction et l'analyse par micro-QuEChERS-Nano-LC-Nano-ESI-MS/MS permettra ainsi d'évaluer la performance, la puissance et les limites de la méthode analytique mise au point.

1. Détermination des limites de détection et de quantification

La détermination des limites de détection et de quantification constitue la première étape permettant d'évaluer les performances analytiques de la méthode.

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées en utilisant l'amplitude du bruit d'un échantillon dit «blanc». Cette stratégie permettait notamment de prendre en considération les phénomènes de contamination, dont il a été question dans le chapitre précédent. Dans ce cas, l'échantillon blanc correspond à un extrait obtenu à partir du pool de matrice blanche non dopée en composés d'intérêts et analysé par nanoLC-MS/MS : on parle alors de blanc de procédure ou de blanc de méthode. L'intérêt de réduire les sources de pollutions en composés d'intérêts se justifie donc totalement puisque les LOD et les LOQ méthodologique sont fonction de l'amplitude du blanc de méthode.

Ainsi, 5 échantillons dits blancs ont été extraits puis injectés afin de déterminer la moyenne des mesures de blancs (A_{Blanc}), ainsi que l'écart type relatif à ces mesures (σ_{Blanc}). Parallèlement, des aliquots du pool de matrice blanche dopés en substances d'intérêts ont été préparés, extraits puis injectés. Ces échantillons constituent alors une gamme d'étalons au nombre de 5, extraits et analysés par deux fois. Les niveaux de concentration ont été choisis de manière à ce qu'ils encadrent les LOD et LOQ estimés lors d'essais préliminaires. Il semble nécessaire de souligner que ces limites de détection et de quantification ont été déterminées au regard de la transition la plus restrictive. Bien que la seconde transition MRM (T2) ne soit pas utilisée lors de la quantification, elle est indispensable à la confirmation de l'identité du composé recherché, par conséquent elle doit toujours être détectable, que ce soit à la limite de quantification ou à la limite de détection.

Les limites de détection et de quantification méthodologiques sont présentées dans la Table 55 pour chacune des espèces investiguées.

Classe	Composés	<i>Chironomus riparius</i>		<i>Potamopyrgus antipodarum</i>		<i>Gammarus fossarum</i>	
		LOD (ng/g poids frais)	LOQ (ng/g poids frais)	LOD (ng/g poids frais)	LOQ (ng/g poids frais)	LOD (ng/g poids frais)	LOQ (ng/g poids frais)
Substances pharmaceutiques	Amitryptiline		1,0		3,9		4,7
	Aténolol		79,8		321,8		15,4
	Bézafibrate		0,3		0,9		0,5
	Carbamazépine		0,5		1,0		0,5
	Cyclophosphamide		30,0		389,8		70,2
	Desloratadine		7,3		27,4		16,5
	Diclofénac		3,0		15,8		2,7
Econazole		9,0		51,2		31,9	

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

	Ibuprofène		8,0		4,8		15,9
	Kétoprofène		2,0		8,4		5,0
	Lidocaïne		3,0		34,1		2,0
	Nicardipine		0,7		3,9		4,8
	Oxazépam		0,5		1,8		0,5
	Pantoprazole		27,7		69,1		27,7
	Prednisolone		10,0		10,0		10,0
	Ritonavir		19,9		132,6		159,1
	Roxithromycine		1,0		8,1		4,9
	Tamoxifène		161,6		161,6		49,1
	4-Hydroxytamoxifène		20,1		29,8		32,1
Hormones stéroïdiennes	Estrone		2,5		10,2		6,1
	17 α -estradiol		12,6		50,2		29,8
	17 β -estradiol		12,6		49,7		29,6
	17 α -ethinylestradiol		12,4		51,5		51,5
	Lévonorgestrel		4,2		15,4		9,5
	Mifépristone		3,0		12,2		42,5
	Noréthindrone		4,2		15,8		21,4
	Testostérone		1,2		4,2		1,5
Perfluoroalkyls	PFOA		3,5		4,8		2,9
	PFOS		1,4		4,8		2,9
Alkylphénols	4-ter-nonylphénol		411,5		490,8		296,1
	Ter-octylphénol		117,2		459,8		275,8
Pesticides	Diuron		4,2		5,4		3,0
	Spinosad		260,0		260,0		156,0
Filtre UV	4-Methylbenzylidène camphre		28,8		116,1		36,2
Plastifiant	Bisphénol A		10,5		42,1		25,2

Table 55: Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) obtenues avec la méthode micro-QuEChERS-NanoLC-NanoESI-MS/MS pour les 3 invertébrés benthiques retenus pour cette étude

Bien qu'il soit compliqué de comparer les limites de quantification obtenues pour chacune des espèces étudiées, tant il existe des différences en termes de complexité de matrice, de masses de prise d'essai et de conditions de pré-concentration en ligne, il est toutefois possible de dégager une tendance générale. Globalement, les limites de quantification semblent meilleures chez *Chironomus riparius*, ceci peut être en partie attribué à une complexité moindre de la matrice qui a nécessité moins de compromis analytiques, spécialement lors de l'étape de pré-concentration en ligne. L'influence de cette étape est en effet clairement visible ici. A titre d'exemple, on constate que le ritonavir, substances très difficilement piégeable dans la cartouche de chargement avec un solvant de pré-concentration faiblement éluant, possède ainsi une limite de quantification 7 fois plus basse chez la larve d'insecte que chez les autres espèces étudiées.

Indépendamment de l'espèce considérée, on constate que les alkylphénols présentent de fortes limites de quantification. Malgré les efforts consentis pour diminuer les sources de contamination, ces composés sont tout de même présents dans le blanc, ce qui peut en partie expliquer de telles valeurs de LOQ. De plus, tout comme certaines autres petites molécules (i.e. bisphénol A et ibuprofène), les alkylphénols, constitués d'un noyau phénolique et d'une chaîne alkyl carbonée, ne se

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

fragmentent pas facilement dans la cellule de collision, donnant ainsi lieu à des signaux MRM relativement faibles et à des écarts d'intensité importants entre la transition 1 et la transition 2.

En dépit de la disparité des LOQs reportées dans le cadre de ces travaux, probablement due au caractère multi-résidus des méthodes développées, il est possible de noter les bonnes limites de quantification obtenues pour certaines molécules. En effet, de nombreuses substances pharmaceutiques présentent des LOQs inférieures au ng/g (i.e. carbamazépine, oxazépam) ou de l'ordre du ng/g (i.e. diclofénac, roxithromycine).

Au regard de la littérature, Martinez Bueno et al (2013) ont développé une méthode d'analyse de la carbamazépine et de ses métabolites dans des moules marines par extraction de type QuEChERS, suivie d'une analyse par HPLC-MS/MS. Les auteurs rapportent une limite de quantification de 0,5 ng/g pour la carbamazépine. Ce résultat nous permet de souligner que les méthodes développées lors de ces travaux de thèse permettent d'atteindre des LOQs similaires, tout en utilisant une prise d'essai 200 fois moins importante. Pojana et al (2007) relatent des limites de quantification chez la moule *Mytilus galloprovincialis* égales à 1,5 ng/g (poids sec), soit 0,3 ng/g (poids frais) (en supposant que la teneur en eau moyenne d'une moule soit d'environ 80%) pour E1, EE2 et β E2. À première vue, ces LOQs semblent être bien inférieures à celles déterminées en utilisant la méthode précédemment décrite. Cependant, les auteurs ont utilisé 5g de tissus de moules lyophilisés, soit 25 g en poids frais, ce qui représente une prise d'essai jusqu'à 2000 fois plus importante que celle utilisée dans notre cas. Par conséquent, le facteur de concentration est bien supérieur au nôtre. Plus récemment, Miller et al (2015), ont développé une analyse multi-résidus comprenant 29 substances pharmaceutiques chez *Gammarus pulex*. Les auteurs étudient ainsi la bioaccumulation de nombreuses molécules communes à notre étude tels que l'aténolol, la carbamazépine, le bézafibrate, l'ibuprofène, le diclofénac ou encore le kétoprofène. Bien que les auteurs utilisent 100 mg de prise d'essai, les limites de quantification rapportées sont toutes supérieures à celles déterminées dans le cadre de notre étude. Ces exemples confirment ainsi la légitimité de nos travaux : en dépit de la miniaturisation de la procédure analytique, les limites de quantification rapportées restent en adéquation avec celles présentées dans la littérature. Dans certains cas, il est même possible de noter une amélioration des performances analytiques.

2. Validation des méthodes analytiques

La validation des méthodes développées dans le cadre de ce projet, comprenant l'extraction de type Micro-QuEChERS et l'analyse par NanoLC-NanoESI-MS/MS a été réalisée selon le protocole détaillé dans le chapitre 2 (Matériel et méthode). Inspirée des recommandations ICH, le protocole de validation doit permettre de vérifier la spécificité, la sélectivité, la précision intra et inter jour, ainsi que la gamme dynamique de la méthode. La relation de réponse entre le signal analytique et la concentration de l'analyte considéré doit également être étudiée. Bien que les recommandations ICH

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

ne fassent pas référence à la manière d'y parvenir, le choix du modèle de régression (linéaire ou quadratique) sera dans notre cas validé statistiquement grâce au test de Fisher.

Le protocole de validation mis en place a été élaboré à l'aide de tests préliminaires ayant notamment permis la détermination des limites de quantification méthodologiques. Ces tests nous ont également permis d'estimer les gammes dynamiques de chaque composé, qui devront donc être validées. Les limites de quantification étant très disparates d'une substance à une autre, il a été nécessaire de constituer chaque niveau de concentration de la gamme dynamique en fonction de la LOQ propre à chaque molécule, ainsi le modèle de régression correspondant à la gamme dynamique sera évalué sur une plage allant de LOQ jusqu'à 50LOQ. Par ailleurs, un minimum de 5 niveaux de concentration étant indispensable au respect des recommandations ICH, différents niveaux de concentration, au nombre de 7, ont été définis pour cette validation. Ainsi, chaque jour de validation, deux gammes de calibration, composées des 7 niveaux de concentration sont extraites et analysées afin de valider le modèle de régression.

Les précisions intra et inter jour, les rendements d'extraction, ainsi que les effets de matrices ont été déterminés sur trois niveaux de concentration (bas, moyen et haut de gamme) choisis en fonction de la gamme dynamique de chaque composé : un niveau par jour de validation a été utilisé pour l'évaluation de ces critères. Pour cela il a été nécessaire d'ajouter un répliquats supplémentaire à un des niveaux, chaque jour de validation. Ainsi, la précision intra-jour est évaluée sur 3 échantillons indépendants. Le choix du niveau répliqué a été fait comme suit : le premier jour, le niveau bas, le second jour, le niveau moyen et le troisième jour le niveau haut. La précision inter-jour sera quant à elle évaluée à partir de 7 échantillons indépendants. Afin de déterminer les rendements d'extraction, trois aliquots du pool de matrice blanche ont été extraits puis dopés à la concentration visée après extraction. La concentration visée correspondant à celle du niveau à valider. De la même manière trois standards dans le solvant ont été préparé de façon à pouvoir calculer les effets de matrice.

La stratégie de validation mis en place permet donc de déterminer tous les critères mentionnés par les recommandations ICH. Ainsi, les résultats concernant l'évaluation du modèle de régression, reliant la concentration de l'analyte ciblée à la réponse analytique, les précisions intra-jour et inter-jour, les rendements d'extraction et les effets de matrices seront présentés et discutés dans les paragraphes suivants.

2.1. Sélectivité et spécificité des méthodes d'analyse

Afin de garantir la sélectivité et la spécificité des méthodes développées pour chacune des espèces considérées dans le cadre de ces travaux, nous avons fait le choix de caractériser chaque composé par trois points d'identification, à savoir le temps de rétention (t_r), deux transitions MRM (T_1 et T_2), ainsi que le rapport de ces deux transitions (T_1/T_2). De ce fait, nous nous sommes tout d'abord assuré, qu'au point le plus faible de la gamme dynamique, c'est-à-dire au point correspondant à la

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS-NanoLC-MS/MS

LOQ, les deux transitions MRM soient présentes avec un rapport S/B > 10 pour la T1 et avec un rapport S/B > 3 pour la T2. Nous avons également calculé le coefficient de variation relatif au temps de rétention. Celui-ci étant inférieur à 2,5% sur l'ensemble des séquences d'acquisition réalisées durant le protocole de validation, et ce malgré le changement des phases mobiles à chaque jour de validation, nous pouvons conclure à une bonne stabilité de la séparation chromatographique. Enfin, le coefficient de variation sur le rapport T1/T2 étant inférieur à 30% pour toutes les substances et pour toutes les matrices investiguées, la sélectivité et la spécificité des méthodes développées apparaissent donc comme satisfaisantes.

2.2. Validation du modèle de régression

Le modèle de régression a été validé statistiquement par comparaison de la valeur de Fisher calculée à partir des gammes de calibration avec la valeur tabulée disponible dans la table de Fisher. Ces données de validation sont présentées dans le tableau X, où sont notamment mentionnés la gamme dynamique validée et le coefficient de corrélation R^2 associé au modèle de régression choisi (linéaire ou quadratique).

En observant le tableau X, on constate que la quasi-totalité des molécules présentent un modèle de régression de type linéaire, et ce quel que soit la matrice investiguée. Seul le PFOA chez *Chironomus riparius* présente un modèle de régression quadratique. On note également que la majorité des substances étudiées présentent des ratios de Fisher permettant de valider la linéarité (ou la quadraticité) des composés sur le domaine précisé. Pour certaines molécules (en orange dans le tableau) ne passant pas le test de Fisher sur le domaine complet (LOQ-50LOQ), la gamme de calibration a été réduite de manière à valider la linéarité en obtenant un ratio de Fisher inférieur à 1 sur le nouveau domaine. Les valeurs de R^2 supérieures à 0,9113 calculées lors de la validation des méthodes mises en œuvre attestent également que le modèle choisi décrit correctement les données acquises.

Bien que l'utilisation de tests statistiques permettant de valider la relation de réponse soit une pratique devenue courante en chimie analytique, il est tout de même nécessaire d'apporter un regard critique vis-à-vis de cette approche. Dans le cas du test de Fisher, également appelé test du « lack of fit », il semble nécessaire de souligner que le ratio calculé ne doit pas être perçu comme une donnée quantitative, autrement dit ce n'est pas parce que ce ratio est proche de 0 que le modèle est plus fiable que lorsque cette valeur s'approche de 1. De façon simplifiée, le ratio de Fisher peut être décrit comme le ratio entre deux types d'erreurs : l'erreur due au modèle et l'erreur expérimentale. Ainsi, lorsque chacune des erreurs se compensent, le test de Fisher peut être validé, ce qui ne garantit pas pour autant la fiabilité des données quantitatives calculées à partir du modèle. L'exemple du pantoprazole, molécules dont la linéarité a pu être validée chez *Chironomus riparius* mais pas chez les deux autres espèces, permet d'illustrer ces propos.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

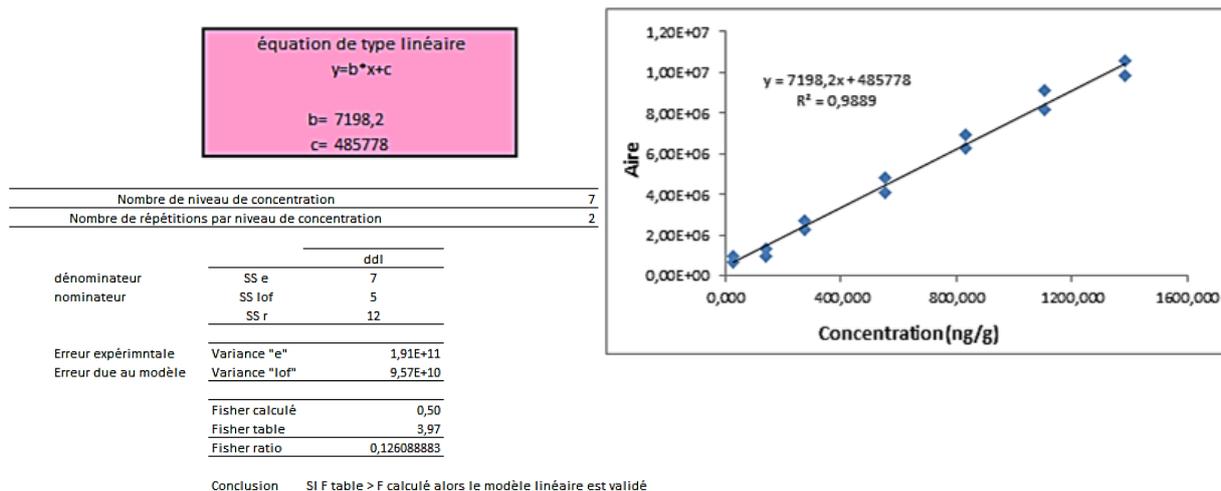


Figure 80: Données de validation du pantoprazole chez *Gammarus fossarum*

Les données obtenues le second jour de validation chez *Gammarus fossarum* laisse dans un premier présager que le modèle pourrait être validé : le ratio de Fisher étant très inférieur à 1 (Figure 80). Cependant, on constate une erreur expérimentale importante (écart de mesure important entre les échantillons indépendants correspondant à un même niveau de concentration), mais également une forte erreur due au modèle comme en témoigne les valeurs de précision calculées en chaque point de la droite de calibration, on constate en effets que celles-ci ne sont pas toujours comprises entre 80 et 120% comme l'exige les recommandations ICH (Table 56).

ETALON n°	concentration théorique (ng/g)	Aire 1	Aire 2	Aire moyenne	Aire prédite	Concentration 1 calculée (ng/g)	Accuracy 1 (%)	Concentration 2 calculée (ng/g)	Accuracy 2 (%)
LQ	27,6	991000	709000	850000	684781,2	70,2	253,9	31,0	112,2
5LQ	138,2	1350000	1000000	1175000	1480794,2	120,1	86,9	71,4	51,7
10LQ	276,5	2310000	2690000	2500000	2475810,4	253,4	91,7	306,2	110,8
20LQ	552,9	4080000	4810000	4445000	4465842,7	499,3	90,3	600,7	108,6
30LQ	829,4	6300000	6950000	6625000	6455875,1	807,7	97,4	898,0	108,3
40LQ	1105,9	9110000	8170000	8640000	8445907,5	1198,1	108,3	1067,5	96,5
50LQ	1382,3	10560000	9860000	10210000	10435939,8	1399,5	101,2	1302,3	94,2

Table 56: Données de validation du pantoprazole chez *Gammarus fossarum*

Au regard de ces observations, nous avons donc décidé de réaliser le test de Fisher uniquement lorsque la précision était comprise entre 80 et 120% en chaque point de la droite. Les molécules pour lesquelles ces conditions n'ont pas été remplies, ont été jugées non-validées. Par conséquent, lors de l'application de la méthode aux échantillons réels, si ces substances venaient à être détectées,

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS- NanoLC-MS/MS

aucunes données quantitatives ne seraient rendues, nous attesterons simplement de la présence ou de l'absence de ces composés.

En conclusion, au regard de la validation statistique du modèle de régression et de la précision obtenues grâce à celui-ci, 33 molécules ont été validées chez *Gammarus fossarum*, et 34 chez *Potamopyrgus antipodarum* et *Chironomus riparus*.

2.3. Précisions intra et inter-jour des méthodes mises en œuvre

Les précisions intra-jour et inter-jour calculées grâce aux données acquises lors du protocole de validation sont présentées dans les Table 57, Table 58 et Table 59. Les échantillons ayant été préparés indépendamment, la répétabilité calculée correspond donc bien à celle liée à la préparation d'échantillon et non à une répétabilité d'injection de l'appareillage. De la même manière, les standards ayant été préparés indépendamment chacun des trois jours de validation, la précision intermédiaire prend en compte la variabilité journalière de préparation des échantillons.

<i>Potamopyrgus antipodarum</i>							
Classe	Composés	Niveau bas		Niveau Moyen		Niveau haut	
		Precision intra-jour (CV %)	Precision inter-jour (CV %)	Precision intra-jour (CV %)	Precision inter-jour (CV %)	Precision intra-jour (CV %)	Precision inter-jour (CV %)
Substances pharmaceutiques	Amitryptiline	5,9	4,4	1,6	4,4	0,9	1,7
	Aténolol	3,2	17,8	2,7	3,8	0,4	4,7
	Bézafibrate	5,3	12,7	1,9	9,4	1,5	5,6
	Carbamazépine	13,8	15,1	14,4	11,0	2,5	5,6
	Cyclophosphamide	4,1	6,3	3,0	6,3	3,9	4,9
	Desloratadine	1,1	8,8	6,9	3,8	1,4	2,9
	Diclofénac	9,9	16,2	2,2	6,1	2,9	7,4
	Econazole	4,8	8,9	2,6	3,7	1,8	3,0
	Ibuprofène	1,2	9,8	3,4	2,6	13,9	1,3
	Kétoprofène	1,9	14,4	2,9	4,3	0,5	2,1
	Lidocaïne	3,7	13,7	2,8	6,3	1,3	2,2
	Nicardipine	2,3	8,8	1,0	6,5	2,1	4,3
	Oxazépam	14,7	22,2	9,9	18,7	11,0	12,7
	Pantoprazole	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	Prednisolone	2,4	8,6	7,5	8,8	1,1	2,0
	Ritonavir	4,8	17,1	3,4	10,4	6,3	6,6
	Roxithromycine	7,6	13,8	3,8	4,1	7,5	6,0
Tamoxifène	3,6	8,4	2,1	5,0	6,9	3,3	
4-Hydroxytamoxifène	0,3	15,5	5,4	7,4	14,6	10,6	
Hormones stéroïdiennes	Estrone	3,3	3,4	3,7	2,6	0,4	0,5
	17 α -estradiol	2,5	2,0	0,5	0,8	2,0	2,6
	17 β -estradiol	1,3	1,6	2,1	1,6	0,9	0,9
	17 α -éthinyloestradiol	5,1	5,9	3,6	2,6	1,2	1,5
	Lévonorgestrel	6,7	5,3	9,6	10,5	1,7	3,3
	Mifépristone	1,4	15,3	1,2	8,6	4,9	4,2
	Noréthindrone	1,8	11,6	4,5	6,5	1,1	1,1
Testostérone	1,0	9,9	5,2	8,7	3,4	3,0	
Perfluoroalkyls	PFOA	7,7	7,9	0,6	0,5	2,8	1,7
	PFOS	0,4	1,4	3,4	3,4	3,4	2,0
Alkylphénols	4-ter-nonylphénol	7,7	7,3	1,3	1,1	3,0	2,0
	Ter-octylphénol	6,3	4,9	1,8	1,4	1,0	0,7
Pesticides	Diuron	0,8	18,6	5,3	7,3	13,3	8,4
	Spinosad	1,1	14,3	3,7	10,6	1,2	7,6

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

Filtre UV	4-Methylbenzylidène camphre	2,8	4,7	5,1	9,8	7,1	5,8
Plastifiant	Bisphénol A	3,5	3,4	4,8	3,4	2,8	2,0

Table 57: Précisions intra et inter-jour obtenues lors du protocole de validation pour *Potamopyrgus antipodarum*

<i>Gammarus fossarum</i>							
Classe	Composés	Niveau bas		Niveau Moyen		Niveau haut	
		Precision intra-jour (CV %)	Precision inter-jour (CV %)	Precision intra-jour (CV %)	Precision inter-jour (CV %)	Precision intra-jour (CV %)	Precision inter-jour (CV %)
Substances pharmaceutiques	Amitryptiline	2,4	2,1	0,8	0,8	0,8	0,7
	Aténolol	5,5	4,6	0,7	0,6	1,0	0,1
	Bézafibrate	1,4	1,3	0,8	0,8	1,1	1,0
	Carbamazépine	1,8	1,9	1,1	0,8	0,3	0,5
	Cyclophosphamide	0,5	1,2	1,3	1,2	1,6	1,4
	Desloratadine	0,5	0,6	0,1	0,2	1,0	0,9
	Diclofénac	1,5	1,6	0,7	0,8	1,1	0,8
	Econazole	0,4	1,0	1,1	0,8	0,3	0,4
	Ibuprofène	0,5	1,0	1,6	1,5	0,6	1,1
	Kétoprofène	6,9	6,0	3,4	3,2	0,5	0,6
	Lidocaïne	9,0	7,7	0,6	0,7	1,8	1,7
	Nicardipine	5,9	4,4	0,4	0,5	1,1	1,2
	Oxazépam	5,7	5,3	2,0	1,8	1,4	1,2
	Pantoprazole	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	Prednisolone	2,0	2,9	0,6	0,9	0,7	1,1
	Ritonavir	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	Roxithromycine	4,1	3,1	3,5	3,2	0,9	0,9
Tamoxifène	1,6	2,5	3,3	2,5	0,8	1,5	
4-Hydroxytamoxifène	0,5	0,8	1,7	1,6	0,2	0,5	
Hormones stéroïdiennes	Estrone	5,5	4,4	1,4	1,5	1,7	1,3
	17 α -estradiol	1,7	1,3	1,5	1,6	1,3	1,2
	17 β -estradiol	4,6	4,2	1,1	1,0	1,5	1,3
	17 α -éthinyloestradiol	3,7	3,6	2,7	2,1	1,3	0,9
	Lévonorgestrel	10,1	9,2	1,5	1,4	1,0	0,9
	Mifépristone	2,3	2,1	1,0	0,9	1,1	1,0
	Noréthindrone	1,1	0,8	0,5	0,5	1,4	1,2
Testostérone	9,0	8,3	1,7	1,4	1,2	1,0	
Perfluoroalkyls	PFOA	1,5	2,1	2,9	2,5	0,2	0,3
	PFOS	1,6	2,6	1,3	1,0	0,8	0,8
Alkylphénols	4-ter-nonylphénol	2,9	9,6	5,9	4,2	7,8	2,9
	Ter-octylphénol	0,9	1,3	1,3	1,2	1,1	1,2
Pesticides	Diuron	1,1	1,2	0,5	0,4	2,1	1,9
	Spinosad	7,8	6,0	2,1	2,0	0,4	0,5
Filtre UV	4-Methylbenzylidène camphre	2,6	2,1	1,0	0,9	0,2	0,5
Plastifiant	Bisphénol A	6,6	5,4	1,1	1,0	2,6	2,2

Table 58: Précisions intra et inter-jour obtenues lors du protocole de validation pour *Gammarus fossarum*

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS

<i>Chironomus riparius</i>							
Classe	Composés	Niveau bas		Niveau Moyen		Niveau haut	
		Precision intra-jour (CV %)	Precision inter-jour (CV %)	Precision intra-jour (CV %)	Precision inter-jour (CV %)	Precision intra-jour (CV %)	Precision inter-jour (CV %)
Substances pharmaceutiques	Amitryptiline	3,3	3,0	4,6	4,7	1,8	1,7
	Aténolol	0,7	1,1	0,8	0,7	1,0	0,9
	Bézafibrate	1,4	1,4	2,3	2,1	1,2	1,1
	Carbamazépine	5,6	5,3	2,5	2,3	0,9	0,9
	Cyclophosphamide	0,8	1,0	1,8	1,3	0,5	0,5
	Desloratadine	0,4	1,0	1,4	1,2	0,4	0,2
	Diclofénac	0,4	1,1	0,5	0,5	0,3	1,2
	Econazole	2	5,1	2,6	1,7	1,8	2,9
	Ibuprofène	2,6	3,0	1,1	1,3	0,8	1,4
	Kétoprofène	2,1	3,8	0,5	0,5	0,8	0,6
	Lidocaïne	8,0	6,9	1,6	1,4	1,2	1,1
	Nicardipine	1,6	2,4	0,7	0,9	0,7	1,5
	Oxazépam	7,4	7,0	0,5	0,5	0,7	0,6
	Pantoprazole	3,1	5,4	0,6	0,5	0,5	0,5
	Prednisolone	2,7	3,3	0,3	0,9	1,0	1,3
	Ritonavir	10,8	9,5	1,0	0,9	0,7	0,7
Roxithromycine	11,4	10,5	2,9	2,5	0,8	0,8	
Tamoxifène	3,6	14,3	2,1	8,2	5,7	2,9	
4-Hydroxytamoxifène	12,8	11,7	1,8	1,6	2,8	2,1	
Hormones stéroïdiennes	Estrone	2,0	1,8	0,5	1,8	1,0	1,0
	17 α -estradiol	2,9	2,5	1,5	1,2	0,7	0,6
	17 β -estradiol	1,8	1,6	0,9	0,9	0,5	0,7
	17 α -ethinylestradiol	0,3	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4
	Lévonorgestrel	1,1	1,8	0,5	0,5	1,0	0,9
	Mifépristone	2,4	2,3	0,5	0,4	0,9	0,8
	Noréthindrone	1,5	1,4	1,4	1,9	1,3	1,1
Testostérone	6,8	6,2	2,5	6,2	0,5	0,4	
Perfluoroalkyls	PFOA	7,9	8,7	6,3	8,6	4,9	9,2
	PFOS	1,6	3,4	0,8	1,0	0,8	0,6
Alkylphénols	4-ter-nonylphénol	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	Ter-octylphénol	2,9	5,4	0,8	1,1	0,7	0,7
Pesticides	Diuron	1,6	2,2	1,3	1,2	0,2	0,2
	Spinosad	11,2	12,7	3,7	7,6	1,2	4,2
Filtre UV	4-Methylbenzylidène camphre	2	1,9	2,7	2,1	1,3	1,3
Plastifiant	Bisphénol A	0,5	1,4	1,3	1,0	0,5	0,4

Table 59: Précisions intra et inter-jour obtenues lors du protocole de validation pour *Chironomus riparius*

Au regard des tables présentées ci-dessus, les valeurs de répétabilité et de précision intermédiaire permettent de valider les méthodes développées avec des valeurs respectivement comprises entre 0,3 et 14,7% et entre 0,5 et 22,2 %. Les coefficients de variation associés aux précisions intra-jour et inter-jour étant respectivement inférieures à 20 et 30%, les données analytiques sont en accord avec les recommandations ICH.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

2.4. Rendements d'extraction

Tout comme les précisions intra et inter-jour, les rendements d'extraction ont été évalués sur 3 niveaux de concentration (bas, moyen et haut) lors du protocole de validation. La majorité des molécules retenues pour cette étude présentent des rendements d'extraction supérieures à 70%, et ce quel que soit la matrice investiguée. Seuls le pantoprazole et les hormones oestrogéniques possèdent des rendements plus faibles, compris entre 39 et 51% en fonction de la matrice. Cependant, comme les coefficients de variation associés à ces rendements sont inférieurs à 10%, la méthode peut être considérée comme fiable pour l'ensemble des substances ciblées. Afin de souligner la légitimité de nos travaux, les résultats présentés dans la Table 60, ont été comparés aux valeurs relatées par la littérature. Miller et al (2015) rapportent des rendements d'extraction obtenue par extraction liquide suivie d'une purification sur phase solide pour de nombreuses substances pharmaceutiques chez le gammar. Ces rendements sont globalement inférieurs à ceux obtenus par l'extraction de type micro-QuEChERS présentée dans ce manuscrit, exception faite du diclofénac pour lequel les auteurs relatent un rendement d'extraction supérieur à 90%. Martinez Bueno et al rapportent un rendement d'extraction de 68 % pour la carbamazépine dans les moules marines par extraction de type QuEChERS, par conséquent les résultats obtenus grâce à la version miniaturisée de cette technique d'extraction proposée ici semblent en adéquation avec les données de la littérature. En ce qui concerne les alkylphénols et le bisphénol A, Salgueiro-Gonzales et al ont rapporté des taux de recouvrement chez la moule marine compris entre 80 et 107% en utilisant une extraction sous fluides pressurisés. Les rendements d'extraction obtenus dans la présente étude sont globalement inférieurs à ceux mentionnés ci-dessus. Cependant, il semble important de souligner que les auteurs ont développé une méthode spécifique à ces composés, par conséquent il est délicat de comparer ces résultats avec les nôtres, obtenus avec une méthode multi résidus, qui a nécessairement exigé des compromis analytiques.

Classe	Composés	<i>Chironomus riparius</i>			<i>Gammarus fossarum</i>			<i>Potamopyrgus antipodarum</i>		
		Niveau bas	Niveau moyen	Niveau haut	Niveau bas	Niveau moyen	Niveau haut	Niveau bas	Niveau moyen	Niveau haut
Substance pharmaceutique	Amitryptiline	90,1	94,1	92,0	92,8	93,4	92,4	95,3	96,6	97,2
	Aténolol	82,7	81,8	83,2	69,1	71,3	71,9	58,4	58,1	60,6
	Bézafibrate	68,0	65,8	67,6	95,5	95,5	92,6	79,2	78,0	80,5
	Carbamazépine	74,9	73,6	75,2	83,3	85,8	84,1	89,7	88,5	87,9
	Cyclophosphamide	77,9	76,1	78,0	81,5	80,5	81,7	63,7	87,1	84,0
	Desloratadine	87,0	89,0	87,0	95,5	95,4	96,4	47,2	60,1	53,4
	Diclofénac	68,8	69,5	70,0	77,2	77,7	76,3	80,1	81,7	87,7
	Econazole	105,0	79,0	79,4	120,0	115,0	101,0	75,4	79,0	79,4
	Ibuprofène	89,8	89,2	88,4	63,0	63,7	63,4	90,7	91,7	86,0
	Kétoprofène	67,9	61,9	63,6	102,0	101,0	98,1	80,1	79,3	79,0
	Lidocaïne	91,9	94,6	96,9	84,6	89,0	87,8	88,2	79,5	79,7
	Nicardipine	117,0	121,0	119,0	73,7	75,7	73,5	90,4	97,8	96,4
Oxazépam	90,7	87,5	85,4	91,2	88,4	86,6	76,6	74,9	74,1	

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS-NanoLC-MS/MS

	Pantoprazole	38,8	38,9	37,6	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	Prednisolone	72,4	72,0	73,0	95,8	94,6	94,9	75,6	76,4	76,4
	Ritonavir	96,3	93,1	95,2	NV	NV	NV	60,4	60,7	63,2
	Roxithromycine	113,2	110,0	114,0	84,5	83,2	83,9	96,6	91,2	89,8
	Tamoxifène	74,7	79,8	80,2	85,9	83,7	85,6	74,8	79,8	79,5
	4-Hydroxytamoxifène	65,3	63,8	59,8	96,1	95,7	97,1	73,0	72,8	73,6
Hormone stéroïdienne	Estrone	50,8	50,4	50,3	50,1	52,5	52,5	62,5	63,5	67,1
	17 α -estradiol	46,1	45,1	45,5	59,2	60,3	59,5	96,2	96,0	95,1
	17 β -estradiol	41,9	40,1	42,0	57,0	58,4	59,5	56,0	56,7	56,7
	17 α -éthinyloestradiol	46,6	47,1	47,4	53,2	54,3	55,0	67,7	68,0	64,2
	Lévonorgestrel	62,3	63,1	62,2	87,4	87,3	85,5	94,1	95,0	94,6
	Mifépristone	53,4	51,2	51,4	93,4	95,6	94,7	80,3	87,3	82,0
	Noréthindrone	54,1	52,9	54,1	94,3	94,5	94,3	69,2	68,0	68,6
	Testostérone	48,0	51,1	52,0	94,5	92,0	91,7	80,0	80,9	80,6
Pesticides	Diuron	80,6	80,8	80,7	82,2	84,1	83,2	77,0	77,4	88,4
	Spinosad	95,0	102,0	94,0	103,0	104,0	103,0	95,0	102,0	94,0
Perfluoroalkyls	PFOS	92,0	92,3	92,6	94,9	94,3	93,7	67,6	68,3	70,6
	PFOA	107,0	104,0	109,0	93,6	92,7	93,2	97,2	98,1	92,3
Alkylphénols	Ter-octylphénol	67,3	66,8	68,7	55,0	54,9	55,0	62,8	65,6	63,6
	4-ter-nonylphénol	NV	NV	NV	58,7	60,6	59,7	63,8	65,8	63,3
Plastifiant	Bisphénol A	53,0	51,6	52,7	70,6	71,9	72,1	76,6	77,7	78,0
Filtre UV	4-Méthylbenzilidène camphre	101,0	109,0	111,0	78,0	78,8	79,8	66,9	68,5	69,5

Table 60: Rendements d'extraction obtenus lors du protocole de validation pour chacune des espèces investiguées

2.5. Evaluation des effets de matrice

L'effet de matrice est un paramètre spécifiquement lié à la spectrométrie de masse et plus particulièrement à l'interface d'ionisation. Ce phénomène a été rapporté pour la première fois par Kebarle et Tang (1993). Les auteurs ont ainsi démontré que le rendement d'ionisation par électrospray d'un composé donné diminuait lorsque la concentration d'autres électrolytes augmentait. Avec la généralisation des plateformes de type LC-MS pour l'analyse de traces, ce phénomène a gagné en importance au cours des dernières années, il est aujourd'hui en passe de devenir un paramètre fondamentale dans la validation de méthodes analytiques. Bien que peu de textes ne fassent référence à ces effets de matrice ou à la manière dont il faut les évaluer, les méthodes aujourd'hui disponibles dans littérature font la plupart du temps référence à ces phénomènes, ceci est particulièrement vrai dans le domaine de l'analyse environnementale, pour lequel les chercheurs sont confrontés à des matrices souvent très complexes.

A l'instar des rendements d'extraction, les effets de matrices ont été évalués pour chacune des matrices considérées à trois niveaux de concentration différents (bas, moyen et haut), en comparant

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS-NanoLC-MS/MS

les signaux de chaque composés ciblé dans la matrice avec ceux obtenus par injection d'un standard dans le solvant (Table 61).

Classe	Composés	<i>Chironomus riparius</i>			<i>Gammarus fossarum</i>			<i>Potamopyrgus antipodarum</i>		
		Niveau bas	Niveau moyen	Niveau haut	Niveau bas	Niveau moyen	Niveau haut	Niveau bas	Niveau moyen	Niveau haut
Substance pharmaceutique	Amitryptiline	-1.5	-2.7	-2.8	285.16	39.6	29.3	1.4	-0.5	1.8
	Aténolol	-7	-6.4	-4.6	6150	6525.4	6504.4	-61.1	-59.2	-62.7
	Bézafibrate	-43.1	-44.5	-45.8	-3.5	-3.7	-3.5	-5.5	-5.9	-4.3
	Carbamazépine	-69.3	-71.4	-72.2	-10.7	-9.5	-10.6	-18.4	-17.9	-16.1
	Cyclophosphamide	-57	-58.7	-57.2	-26.56	-25.5	-24.9	-52.8	-59.0	-56.7
	Desloratadine	-21	-21.4	-23.7	-36.9	-31.6	-34.1	-61.1	-58.2	-61.2
	Diclofénac	-85.2	-86.9	-86.2	-48.5	-55.2	-50.6	-37.2	-36.9	-31.3
	Econazole	338.1	617.9	1215.2	494.3	10352.7	15894.4	389.8	585.3	1342.9
	Ibuprofène	-65.9	-69.6	-66.4	-47.2	-49.7	-46.9	-8.4	-9.6	-7.9
	Kétoprofène	-50	-50.4	-51.9	-12.8	-12.3	-12.21	-1.8	-0.7	-1.2
	Lidocaïne	30.3	32.3	32.6	794.5	1745.2	1809.6	-42.6	-41.6	-37.4
	Nicardipine	225.1	615.7	919.6	1527.1	3322.1	5107.4	421.8	704.6	997.0
	Oxazépam	-66.3	-67.7	-68.7	-16.9	-16.5	-16.2	-4.8	-5.1	-4.5
	Pantoprazole	NV	NV	NV	NV	NV	NV	-59.1	-64.1	61.6
	Prednisolone	-64.1	-63.4	-62.9	-2.6	-2.1	-2.4	-2.9	-2.8	-2.2
	Ritonavir	656.2	623.3	608.1	ND	ND	ND	424.3	619.7	954.0
	Roxithromycine	1321.3	1619.8	1343.8	1611.1	2488.2	3440.9	1931.6	2356.9	3141.1
	Tamoxifène	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	4-Hydroxytamoxifène	1837.1	3979.5	6123.5	2595.6	44772.4	80364.0	1101.3	3412.8	5831.9
Hormone stéroïdienne	Estrone	-54.3	-55.9	-56.3	-50.1	-48.9	-48.6	-45.8	-45.8	-42.9
	17 α -estradiol	-55.2	-55.8	-55.4	-59.5	-60.4	-58.4	-50.6	-51.0	-55.6
	17 β -estradiol	-50.4	-52.6	-48.4	-60.8	-63.9	-61.3	-54.0	-48.2	-52.9
	17 α -éthylestradiol	-54.5	-55.2	-55.9	-63.9	-65.9	-64.4	-15.6	-13.8	-12.9
	Lévonorgestrel	-60.2	-62.7	-62.8	-29.0	-27.1	-26.5	-18.9	-20.3	-17.2
	Mifépristone	-5.6	-3.2	-5.0	1101.6	806,0	659.3	663.1	934.1	1356.2
	Noréthindrone	-67.1	-68.2	-69.4	-9.4	-11.7	-9.2	-3.3	-2.2	-2.9
	Testostérone	-65.1	-66.6	-66.5	-2.8	-3.2	-2.8	-8.5	-7.4	-6.8
Pesticides	Diuron	-72.1	-75.9	-74.6	-41.5	-39.6	-39.4	-32.3	-33.9	-34.9
	Spinosad	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Perfluoroalkyls	PFOS	-11.7	-12	-11.8	-31.6	-32.5	-32.3	-42.0	-41.1	-39.2
	PFOA	-32.8	-34.9	-35.0	-48.5	-47.5	-44.7	-9.4	-9.4	-8.1
Alkylphénols	Ter-octylphénol	151.3	246.5	353.6	-58.1	-62.1	-59.9	-78.1	-71.1	-66.7
	4-ter-nonylphénol	NV	NV	NV	-53.8	-67.3	-62.4	-49.6	-46.4	-44.9
Plastifiant	Bisphénol A	-51.7	-52.4	-54.5	-74.2	-78.6	-78.9	-51.1	-46.7	-48.1
Filtre UV	4-Méthylbenzilidène camphre	-22	-24.9	-25.5	1322.8	332.7	172.8	-40.4	-44.1	-43.1

Table 61: Evaluation des effets de matrices sur 3 niveaux de concentration pour chaque invertébré benthique

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus indiquent que le degré de suppression ou d'exaltation du signal varie en fonction de la matrice et du composé considéré. Dans de nombreux cas, et plus particulièrement lorsque une amélioration du signal a pu être observée, cette variabilité est également fonction de la concentration en analyte. Concernant l'inhibition de la réponse de l'analyte en présence de matrice, de nombreuses théories ont été proposées. La principale cause est attribuée à la présence de composés coélus qui perturbent le processus d'ionisation. Le mécanisme exact d'ionisation compétitif entre le composé d'intérêt et l'interfèrent matriciel reste cependant encore inconnu. Il est ainsi couramment admis que les effets de matrice sont générés dans la source d'ionisation, où les molécules sont désolvatées et chargées. Néanmoins, de par notre configuration analytique (pré-concentration en ligne-nanoLC-nanoESI-MS/MS), les mécanismes par lesquels sont générés les effets de matrice sont non seulement propre à la source d'ionisation, mais également dépendants de l'étape de pré-concentration. En effet, certains composés endogènes co-extraits peuvent améliorer le processus de piégeage. Par conséquent, de nombreuses substances ciblées présentent des effets de matrice positifs. Ceci est notamment le cas des molécules les plus hydrophobes qui sont à peine piégées sur la cartouche de pré-concentration. Ainsi, l'impact de la matrice sur l'étape de pré-concentration en ligne peut expliquer en partie pourquoi les effets matrices varient en fonction de la concentration de l'analyte. A titre d'exemple, le cas particulier de la nicardipine permet d'illustrer ce phénomène (figure X).

On constate en effet que la pente de la droite de calibration réalisée dans la matrice est bien plus importante que celle obtenue par injection de standards dans le solvant, témoignant ainsi d'une différence de sensibilité considérable. Cette méthodologie, basée sur la comparaison entre la pente d'une droite d'étalonnage préparée dans la matrice avec celle obtenue pour une calibration dans le solvant, est une approche alternative permettant d'évaluer la présence ou l'absence d'effets de matrice, proposée par Matuszewski et al. Lorsque les deux droites se superposent, il est possible de conclure à une absence d'effets de matrice, alors qu'une différence de pente révèle la présence d'un tel phénomène. Dans l'approche utilisée lors de ces travaux, le calcul des effets de matrice est fonction du rapport entre l'aire du composé dans la matrice et l'aire du composé dans le solvant, il apparaît clairement, aux vues de la figure X, que ce rapport n'est pas constant d'un niveau de concentration à un autre, en raison de l'importante différence de pente entre les deux droites de calibration. En outre, plusieurs effets de matrice n'ont pu être estimés (NE). Par exemple, en ce qui concerne le tamoxifène et le spinosad, les paramètres de pré-concentration sont tels qu'ils ne permettent pas de piéger ces substances lorsque celles-ci sont injectées dans le solvant. Par conséquent, ces composés ne sont pas détectés dans les solutions standards ($A_{\text{solvant}} = 0$).

Concernant les effets de matrice négatifs, témoignant d'une inhibition du signal due à la présence de composés co-extraits de la matrice, les résultats sont quelques peu surprenants. En effet, l'électrospray étant reconnu pour être concentration dépendant, les effets de matrices sont de manière générale toujours plus importants pour les faibles niveaux de concentration (Trufell, 2009 ; Ferrer, 2011). Dans notre cas, nous observons une certaine stabilité de ces phénomènes quel

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroQuEChERS-NanoLC-MS/MS

que soit la concentration de l'analyte. Bien que la littérature rapporte des études relatives à l'évaluation des effets de matrice en nanoélectrospray, ceux-ci sont généralement déterminés pour un seul niveau de concentration, ce qui ne nous permet aucune comparaison (Chen, 2004 JCB 205-2010, Moreno, anal chem 2015).

Au regard des médicaments à usage humain, les effets de matrice déterminés chez *Gammarus fossarum* sont significativement plus faibles que ceux évalués dans l'étude de Miller et al. Ces observations semblent donc en parfaite adéquation avec les données de la littérature qui mettent en évidence la capacité à réduire les effets de matrices des systèmes nanoelectrospray (Moreno, 2015 ; Chen 2004, JCB 205-210), mais également celle des systèmes chromatographiques bidimensionnels (Pascoe, 2001, anal chem). Le système de pré-concentration en ligne permettant, dans une certaine mesure, la purification de l'échantillon.

Par comparaison des 3 matrices d'intérêts, il apparait clairement que les analyses relatives à l'espèce *Chironomus riparius* sont sujettes à des effets de matrice inhibiteurs plus importants que dans le cas des deux autres organismes. La présence en quantité importante d'hémoglobine chez la larve d'insecte peut être une hypothèse permettant d'expliquer de telles différences. Toutefois, il semble nécessaire de souligner que les paramètres de pré-concentration sont différents pour cet invertébré, les effets de matrice globaux résultant de la combinaison de cette première étape et de l'altération des processus d'ionisation, la comparaison entre les trois méthodes développées s'avère délicate tant elle pourrait conduire à des conclusions spéculatives.

Conclusion

La stratégie analytique développée dans le cadre de ces travaux de thèse permet l'extraction simultanée de 35 polluants émergents chez trois invertébrés benthiques. La combinaison d'une extraction de type micro-QuEChERS, suivie d'une purification à l'hexane permet de réaliser un traitement de l'échantillon en une seule étape, réduisant ainsi le temps de préparation d'échantillon. La mise en œuvre d'un couplage NanoLC-MS/MS permet d'obtenir de basses limites de quantification, tout en préservant une bonne répétabilité et bonne précision, aboutissant ainsi à une validation réussie selon la méthodologie proposée par les directives ICH.

Au regard du choix du modèle de régression et de sa validation, le protocole de validation mis en place nous a permis d'apporter un regard critique sur l'utilisation de tests statistiques, ceux-ci devant être utilisés avec prudence, notamment en tenant compte de la distribution de chacune des erreurs (erreur due au modèle et erreur expérimentale) et de la précision obtenue grâce à ce modèle.

L'étude des effets de matrice nous a également permis d'entrevoir la complexité de ces phénomènes liés au design expérimental particulier utilisé lors de cette étude. Les contributions de l'étape de pré-concentration et du processus d'ionisation ont ainsi pu être mises en évidence, laissant entrevoir des perspectives de travail intéressantes qui pourraient contribuer à l'amélioration des connaissances sur ces systèmes encore très peu utilisés en analyse environnementale.

Chapitre 3 : développement et validation de méthodologies analytiques permettant la quantification de polluants émergents chez trois invertébrés benthiques par MicroGC-MS/MS-NanoLC-MS/MS

Les méthodes ainsi développées semblent donc suffisamment sensibles pour détecter un large panel de contaminants environnementaux chez les premiers maillons des chaînes trophique à l'échelle d'un seul individu, et ce pour deux des trois organismes choisis pour cette étude, offrant des rendements d'extraction élevés pour la quasi totalité des composés ciblés et des limites de quantification de l'ordre du ng/g. Les méthodes proposées pourront ainsi être appliquées à ces organismes aquatiques, utilisés comme indicateur de la qualité des systèmes aquatiques et fourniront donc les premières données de bioaccumulation à l'échelle d'un individu.

Chapitre 4 :

*Etude de la
bioaccumulation de
polluants émergents
chez les invertébrés
benthiques: vers
l'évaluation de l'impact
des activités
d'assainissement sur
les milieux aquatiques*

Introduction

La Directive Européenne cadre sur l'eau (DCE) a pour objectif d'établir une harmonisation des politiques de surveillance et de gestion de la ressource en eau à l'échelle Européenne. Elle demande notamment aux Etats membres de veiller à prévenir la détérioration, améliorer et restaurer l'état des masses d'eau de surface et des eaux souterraines, atteindre un bon état chimique et écologique de celles-ci, ainsi que réduire la pollution due aux rejets et aux émissions de substances dangereuses.

Dans ce contexte, les professionnels de la gestion de la ressource en eau et notamment les exploitants de stations d'épuration (STEP) ont un rôle à jouer, particulièrement dans la connaissance et le contrôle de l'impact des systèmes d'assainissement sur le milieu récepteur, le plus souvent les eaux de surface. Si la gestion des macropolluants (matière organique, matières en suspension, azote et phosphore) est bien réglementée et aujourd'hui bien maîtrisée en ce qui concerne les effluents de STEP (directive Eaux Résiduaires Urbaines), rien n'existe à l'heure actuelle comme cadre législatif pour la plupart des micropolluants dans ces effluents (détergents, pesticides, médicaments...).

Il est aujourd'hui avéré que les effluents de STEP contribuent à la pollution du milieu récepteur. Les systèmes de traitement des rejets urbains, si ils sont efficaces pour assurer l'abattement des macropolluants réglementés depuis longtemps (Demande Chimique en Oxygène –DCO- ; Matières en Suspension –MES- ; nutriments (N, P), ne le sont plus totalement face à la diversité des substances (détergents, solvants, pesticides, pharmaceutiques...). De ce fait, une partie de la pollution traitée par les stations d'épuration est déversée en aval. En particulier, la pollution des milieux récepteurs, liée à la consommation de produits d'hygiène personnelle et de substances pharmaceutiques en provenance des effluents urbains est aujourd'hui bien documentée. Récemment, dans le cadre de la directive sur les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau, parmi les 15 nouvelles substances ajoutées à la liste des substances prioritaires, 3 substances pharmaceutiques (le diclofénac, le 17 α -éthynylestradiol (EE2) et le 17 β -estradiol (E2)) font partie de la liste de molécules qui seront à surveiller et à documenter.

Au regard de la synthèse bibliographique présentée dans le premier chapitre de ce mémoire, et en adéquation avec l'un des enjeux environnementaux actuel qui concerne le développement de méthodologies de mesure et de suivi de la qualité des rejets des systèmes d'assainissement, il a été décidé de développer différentes études portant sur des cas concrets d'évaluation d'impact de STEP. Afin de rassembler un certain nombre d'informations concernant les stratégies de biomonitoring, tant en laboratoire que sur le terrain, les études se sont appuyées sur trois des approches proposées:

- d'une part des tests en laboratoire sur l'effluent traité de STEP (approche *ex situ*) ;
- d'autre part des tests réalisés directement sur le terrain, en amont et aval de la STEP (approche *in situ*) ;
- enfin des analyses chimiques multi-résidus sur les molécules sélectionnées dans différentes matrices, eau de rivière, effluent et organismes biologiques.

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

Cette combinaison d'approches doit permettre d'une part l'évaluation de la toxicité intrinsèque de l'effluent, d'autre part la mesure de l'exposition chimique associée au rejet de l'effluent, enfin la mesure de l'impact biologique des effluents de STEP dans un milieu récepteur donné. L'ensemble de ces informations permet de s'assurer de l'innocuité du rejet complexe issu de la STEP, et de prendre si nécessaire des mesures de précaution visant à limiter un danger toxique. Il permet également de mesurer un impact biologique réel sur les individus, dans le milieu récepteur concerné ainsi que l'exposition aux molécules biodisponibles. Ces données sont potentiellement utilisables dans une démarche d'évaluation du risque basée sur une méthode de type poids de l'évidence par exemple (WoE) (Chapman 2007).

Les travaux expérimentaux ont donné lieu à diverses campagnes d'exposition relatives au trois sites d'étude présentés dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Le présent chapitre propose une synthèse de l'ensemble des résultats concernant les données d'exposition chimique à partir des différentes matrices analysées (eau de rivière, effluent, biote). Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'IRSTEA dont les équipes d'écotoxicologues ont réalisé les mesures d'effets biologiques.

Partie A : Le site de la Bourbre

1. Objectifs et démarche

Au regard des procédures d'évaluation du risque environnementale, les effets sur les organismes biologiques peuplant nos écosystèmes aquatiques dépendent en partie de la concentration de substances toxiques actives présentes sur le site d'étude. Ainsi, les concentrations de polluants accumulés dans les organismes non-cibles peuvent fournir des informations précieuses permettant de comprendre la sensibilité toxicologique intrinsèque des espèces étudiées. Bien que des études récentes aient mis en évidence la bioaccumulation de polluants organiques dans des poissons sauvages, des algues et des invertébrés, aucun lien n'a jamais été fait entre la bioaccumulation de ces polluants et les effets biologiques chez les gastéropodes aquatiques d'eau douce lors d'étude de terrain. Dans ce contexte, l'objectif général de cette étude était d'évaluer la pertinence du mollusque *Potamopyrgus antipodarum* comme outil de biosurveillance permettant à la fois de surveiller la contamination chimique des systèmes aquatiques soumis à des pressions anthropiques et plus particulièrement aux effluents de STEP, mais également d'évaluer les effets toxiques associés à cette pollution (survie, reproduction, croissance). Afin de réaliser ces objectifs, les escargots ont été exposés directement dans le milieu aquatique par procédé de « caging » pendant 42 jours selon la procédure détaillée dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Les 35 polluants émergents sélectionnés dans le cadre de ces travaux de thèse ont été analysés chez les mollusques encagés. Certaines de ces molécules ont également été recherchées dans l'eau de la rivière grâce à une méthode développée au sein de notre laboratoire et couramment utilisée en analyse de routine. Enfin, les effets sur la reproduction des organismes adultes et sur la croissance des juvéniles ont été évalués par l'équipe d'écotoxicologues de l'IRSTEA, partenaire de ce projet. Au regard des objectifs de ces travaux de

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

thèse, centrés sur le développement de méthodologies analytiques permettant d'évaluer la bioaccumulation de polluants émergents et sur leurs applications, seuls les résultats relatifs aux analyses chimiques seront présentés et discutés.

2. Résultats

2.1. Conditions d'exposition

Au cours de la période d'exposition, le débit moyen de la rivière Bourbre était de 0,60 m³/s et le débit moyen de l'effluent de STEP de 0,16 m³/s, soit 27% du débit de la rivière. La température moyenne la plus élevée correspondait à celle mesurée sur le site de la Confluence (13,4°C), et la plus faible au site Bourbre Amont (11,1°C). Des températures intermédiaires ont été relevées pour les sites Bion amont et Bourbre aval (respectivement 12,7°C et 12,5°C). La conductivité variait de 590 à 805 µS/cm et était significativement plus élevée sur le site de la Confluence, en comparaison aux autres sites. Les concentrations ioniques dans l'eau échantillonnée ont permis de confirmer ces fortes valeurs de conductivité, avec notamment une importante présence de Cl⁻, Na⁺, K⁺ et NH₄⁺ après le rejet de STEP.

Les paramètres physico-chimiques relatifs à la période d'exposition sont résumés dans la Table 62.

Site	Température moyenne (°C)	Conductivité (µS/cm)	pH	Concentration ionique (mg/L)			
				NH ₄ ⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺
Bion	13,0±1,3	637±18	7,65±0,22	0,03±0,01	29,2±5,3	16,2±4,8	3,75±1,68
Bourbre Amont	11,5±2,2	592±23	7,87±0,21	0,08±0,1	27,3±1,5	14,4±1,0	2,68±0,20
Confluence	13,5±1,4	805±35	7,63±0,19	0,21±0,15	66,2±7,9	40,3±3,8	10,98±2,13
Bourbre Aval	12,7±1,8	659±96	7,75±0,23	0,13±0,08	38,7±14,3	21,4±9,5	6,18±2,89

Table 62: Paramètres physico-chimiques associés à chacune des sites d'études sur la durée de l'exposition

2.2. Analyses chimiques

2.2.1. Analyse de matrices aqueuse

Parmi les 15 contaminants émergents recherchés dans les matrices aqueuses, seuls le ter-octylphénol, le tamoxifène et βE2 n'ont jamais été quantifiés. Les autres polluants présentent globalement des concentrations de l'ordre du ng/L, et ce pour chacun des sites étudiés (Table 63). Les substances pharmaceutiques affichent une tendance claire, avec des concentrations significativement plus élevées sur les sites localisés en aval du rejet de STEP, et plus particulièrement sur le site de la Confluence. Les hormones stéroïdiennes telles que l'estrone et la testostérone, ou encore le filtre UV 4MBC présentent un profil de concentration similaire à celui des médicaments. Les dérivés phénoliques (Bisphénol A et ter-octylphénol) ont été détectés sur chaque site mais n'affiche cependant aucune tendance claire.

Classe	Composé	LOQ (ng/L)	Bion	Bourbre amont	Confluence	Bourbre aval

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

Substances pharmaceutiques	Bézafibrate	2,5	2,60±1,34	10,28±2,93	17,40±3,74	15,42±4,21
	Carbamazépine	2,5	4,08±1,41	13,30±3,57	36,53±13,26	27,50±7,22
	Diclofénac	1,0	2,04±0,36	13,43±6,72	42,35±17,74	28,00±7,12
	Kétoprofène	2,5	6,88±2,11	8,02±3,60	21,15±9,50	20,37±7,03
	Oxazépam	5,0	15,84±4,80	48,55±15,42	193,00±59,66	154,00±46,04
	Roxithromycine	5,0	<LOQ	15,65±30,83	21,42±21,42	154,00±46,04
	Tamoxifène	5,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Hormones stéroïdiennes	Estrone	2,0	<LOQ	<LOQ	3,73±0,78	2,90±0,30
	17β-estradiol	5,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Testostérone	2,5	<LOQ	<LOQ	17,05±5,84	8,25±3,34
Pesticide	Diuron	2,5	<LOQ	<LOQ	2,95±0,64	<LOQ
Alkylphénols	4-ter-nonylphénol	10,0	26,50±4,0	128,17±148,03	70,40±65,27	105,80±115,68
	Ter-octylphénol	10,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Filtre UV	4-Méthylbenzylidène camphre	5,0	<LOQ	5,16±5,24	21,57±10,39	14,55±6,88
Plastifiant	Bisphénol A	10,0	546,40±717,28	253,17±366,31	635,50±275,06	224,25±221,43

Table 63: Contamination chimique des échantillons d'eau collectés chaque semaine sur la période d'exposition pour les 4 sites étudiés (moyenne ± écart type)

2.2.2. Analyse des mollusques engagés

Classe	Composés	LOQ (ng/g)	Bion	Bourbre amont	Confluence	Bourbre aval
Substances pharmaceutiques	Carbamazépine	1,0	<LOQ	<LOQ	1,92±0,04	2,07±0,03
	Diclofénac	15,8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Ibuprofène	26,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Oxazépam	1,8	603,67±59,77	862,33±29,9	1336,7±92,91	2606,67±361,6
Hormones	Testostérone	4,2	6,68±3,69	5,67±4,24	11,77±3,78	15,71±3,45
Alkylphénols	4-ter-nonylphénol	490,0	<LOQ	<LOQ	717,66±24,42	687,33±85,62
	Ter-octylphénol	460,0	558,66±80,79	461,17±121,35	851,42±84,91	937,12±167,47
Perfluoroalkyls	PFOA	4,8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	PFOS	4,8	5,26±1,58	5,97±2,36	<LOQ	<LOQ
Plastifiant	Bisphénol A	42,1	<LOQ	<LOQ	45,78±9,32	92,67±24,3

Table 64: Contamination des mollusques engagés après 42 jours d'exposition

Plusieurs polluants organiques ont été quantifiés chez les mollusques engagé, et ce pour chacun des sites d'exposition étudiés. Les concentrations variaient du ng/g au µg/g, la concentration la plus élevée correspondant à l'oxazépam pour les organismes engagés sur les sites situés en aval du rejet de STEP (Table 64). D'un point de vue méthodologique, la quantification de l'oxazépam a nécessité une modification de la méthode analytique préalablement présenté dans le chapitre 3 de ce manuscrit. En effet, les concentrations étaient telles qu'elle ne pouvait être déterminées par la méthode de quantification validée, dont la gamme dynamique s'échelonnait de LOQ à 50LOQ. Afin de ne pas risquer de quantifier un échantillon en dehors des limites de linéarité du modèle de calibration, nous avons fait le choix de diluer les échantillons trop concentrés par un facteur 100 et de réaliser une quantification par étalonnage externe dans le solvant. Nous avons ainsi vérifié que les effets de matrice étaient négligeables pour des échantillons dilués par 100. Ceux-ci s'étant avérés être inférieures à 5%, notre démarche confirme la pertinence d'un étalonnage externe.

3. Discussion

3.1. Contamination du milieu récepteur

Au regard des eaux de surface correspondantes au système aquatique étudié, la contamination apparaît plus importante dans la zone la plus proche du rejet de STEP (Confluence) et a tendance à décroître pour l'aval plus lointain (Bourbre Aval). On note cependant une légère contamination de la rivière en amont de la STEP (Bion), probablement due à la présence de pressions anthropiques localisées plus en amont du site d'étude. Plusieurs substances pharmaceutiques ont été quantifiées dans les échantillons d'eau prélevés hebdomadairement de façon ponctuelle sur la période d'exposition. Parmi ces médicaments, la benzodiazépine oxazépam présente les plus fortes concentrations. Bien que peu d'études ne relatent le devenir de cette substance dans l'environnement, les données disponibles dans la littérature semblent suggérer qu'elle est très peu éliminée dans les stations de traitement des eaux usées (Wahlberg et al.2011), ce qui pourrait notamment expliquer les très fortes concentrations mesurées sur les sites situés en aval de la STEP (Confluence et Bourbre aval). Résistante à la photodégradation, cette molécule pourrait également être persistante dans l'environnement (calisto, 2011). De manière générale, les analyses d'eau permettent de mettre en évidence un apport de contamination lié au rejet de STEP, cohérente avec les concentrations mesurées dans de tels milieux récepteurs, et rapportées dans la littérature (loos, 2013). Cependant, pour certains polluants émergents, les profils de concentration ne semblent pas liés au rejet de l'effluent : le bisphénol A étant détecté en quantité importante en amont de la STEP (Bion). Pour le 4-ter-nonylphénol, le constat est similaire : les concentrations mesurées étant très variables d'un site à un autre, elles ne peuvent être corrélées à un quelconque impact lié à la STEP. Bien que les concentrations mesurées pour ces molécules soient du même ordre de grandeur que celle relevées dans la littérature (loos, 2013), les résultats variables obtenus dans le cadre de notre étude pourrait être attribuée à la stratégie d'échantillonnage mise en œuvre. En effet, les analyses d'eau n'ayant été réalisées qu'à titre comparatif, l'aspect pratique et économique a été privilégié. Par conséquent, nous nous sommes préférentiellement tournés vers un échantillonnage de type ponctuel. Trois échantillons d'eau ont été prélevés sur la durée totale de l'exposition et analysés. Les données présentées dans la Table 63 correspondent à la moyenne des mesures effectuées. L'écart type associé nous permet de mettre en évidence la très forte variabilité des concentrations mesurées, notamment pour le Bisphénol A et le 4-ter-nonylphénol. Bien que ces mesures ne permettent pas de caractériser la contamination du milieu de manière exhaustive et très représentative, elles seront toutefois très précieuses pour évaluer les capacités d'accumulation des mollusques utilisés comme espèces sentinelles.

3.2. Contamination des mollusques encagés

Les concentrations mesurées dans les organismes encagés mettent en évidence un apport de contamination dû au rejet de STEP, et ce pour toutes les molécules quantifiées. En effets, les organismes exposés sur les sites situés en aval du rejet présentent des concentrations intra-

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

tissulaires plus importantes que celles mesurées chez les mollusques encagés sur les sites en amont. Cependant, ces résultats sont quelque peu surprenants ; alors que les analyses d'eau semblaient indiquer que la contamination était plus importante en aval proche du rejet de STEP, c'est-à-dire sur le site de la Confluence, l'analyse du biote laisse à penser que cette contamination serait plus importante dans la zone avale plus lointaine (Bourbre Aval). Ceci est particulièrement vrai pour l'oxazépam et le Bisphénol A. Pour les autres contaminants quantifiés, la différence entre les deux sites localisés en aval du rejet doit être nuancée. En effets, bien que la valeur moyenne des concentrations soient plus importante pour les mollusques exposés sur le site Bourbre aval que pour les organismes encagés sur la zone Confluence, les écarts types associés à ces mesures indiquent que ces différences ne sont pas réellement significatives. Par conséquent, en considérant les écarts types, les concentrations mesurées pour chaque site aval sont relativement similaires pour les alkylphénols, la carbamazépine et la testostérone.

Les niveaux de concentrations de l'oxazépam mesurés chez les escargots exposés en aval du rejet sont étonnamment élevés. En dépit de son caractère hydrophile ($\log K_{ow}=2,3$), ces résultats montrent un comportement de bioaccumulation élevé, conduisant à des concentrations interne dans les mollusques équivalentes à environ 4 fois la dose thérapeutique définie chez l'homme. A notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur l'accumulation et les effets biologiques de cette substance pharmaceutique chez les invertébrés aquatiques. Les résultats présentés ici suggèrent que ce médicament mériterait une attention toute particulière, tant il pourrait contaminer la chaîne alimentaire.

Des perturbateurs endocriniens tels que le 4-ter-nonylphénol, le ter-octylphénol et le bisphénol A ont également été quantifiés à des concentrations élevées chez les escargots encagés en aval du rejet de STEP. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que le ter-octylphénol n'avait pas été quantifié dans l'eau. Les concentrations d'alkylphénols mesurées chez les gastropodes au cours de cette étude étant plus élevées que celles mesurées chez des poissons prélevés dans des systèmes aquatiques plus contaminés en alkylphénols (Lozano et al, 2012), ces résultats suggèrent des capacités de bioaccumulation plus importante chez *Potamopyrgus antipodarum*.

Au regard des perfluoroalkyls, dont les concentrations du PFOS sont étonnamment plus importantes chez les escargots exposés en amont du rejet, il apparait que les concentrations mesurées soient plus importantes que celles rapportées pour les gastéropodes (Loi et al, 2011), mais légèrement inférieures à celles mesurée dans les amphipodes autochtones sur le même site d'étude (Bertin, IRSTEA communication personnelle).

Concernant les concentrations de l'hormone stéroïdienne testostérone mesurées chez les mollusques encagés, les données acquises lors de ces travaux confirment les résultats obtenus dans une étude précédente sur le même site d'exposition (Gust et al. 2010), soulignant la capacité de bioaccumulation de *Potamopyrgus antipodarum*. Lors de notre étude, les équipes d'écotoxicologues de l'IRSTEA ont également réalisés des mesures de stéroïdes par radio immuno essai (RIA) en

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

utilisant la méthode précédemment décrite par Gust et al (2010). Les résultats obtenus par la méthode RIA indiquent des niveaux de testostérone compris entre 200 et 250 pg par individu pour les organismes exposés sur les sites avals et équivalent à 100 pg/ind pour les mollusques engagés en amont du rejet de STEP, indiquant un phénomène de bioaccumulation. Les résultats obtenus par nanoLC-MS/MS, ramenés à l'individu, sont du même ordre de grandeur, témoignant ainsi de l'excellente corrélation de ces deux méthodes et soulignant la légitimité de nos résultats. Bien que la méthode RIA ait pu mettre en évidence une corrélation entre la concentration d'estrone dans le milieu et la concentration de β E2 dans les organismes, déjà démontré par Gust et al, 2010), les limites de quantification obtenues pour les hormones oestrogéniques dans le cadre d'une analyse multi-résidus ne permettent pas de confirmer cette corrélation. Notons également que le niveau d'hormones accumulé et les effets reprotoxiques observés chez les organismes exposés au rejet de STEP étaient en parfait accord, suggérant une forte relation entre ces paramètres. La méthode analytique développée semble ainsi fournir les données nécessaires à la corrélation entre contamination chimique des organismes et effets toxiques.

4. Conclusions

Cette étude souligne la contamination de la rivière Bourbre par les activités anthropiques, l'impact des rejets de STEP, mais également l'utilité du gastéropode *Potamopyrgus antipodarum* pour la surveillance de la qualité des milieux aquatiques. En plus d'être l'une des espèces proposée par l'OCDE pour évaluer l'impact des perturbateurs endocriniens sur les invertébrés aquatiques, ce mollusque pourrait également être utilisé dans des conditions de terrain pour évaluer les effets reprotoxiques. Sa sensibilité vis-à-vis des substances pharmaceutiques met en évidence ses capacités d'accumulation élevées, notamment en ce qui concerne l'oxazépam qui pourrait être utilisé comme biomarqueur d'exposition. Cette étude souligne l'applicabilité de la méthode NanoLC-MS/MS développée dans le cadre de ces travaux, permettant d'évaluer la bioaccumulation de polluants émergents chez le mollusque *Potamopyrgus antipodarum*. Cette méthode, dont les données permettent de corréler les phénomènes de bioaccumulation aux effets biologiques associés à la pollution anthropique, s'affiche ainsi comme un outil précieux pour les écotoxicologues.

Partie B : L'observatoire SIPIBEL

1. Objectifs et démarches

Les effluents de station d'épuration sont une source majeure de pollution impactant directement les écosystèmes aquatiques. Bien que les activités hospitalières ne contribuent qu'à un faible pourcentage des rejets totaux, elles représentent une partie importante du problème lié au rejet de substances médicamenteuses dans l'environnement (Perrodin et al, 2013). Constituant la source d'un large éventail de substances actives potentiellement toxiques, les effluents hospitaliers concentrent aujourd'hui l'attention des autorités compétentes, mais également celles de la

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

communauté scientifique. L'évaluation des effets négatifs sur l'équilibre biologique des écosystèmes aquatiques, ainsi que la contribution des rejets hospitaliers à la pollution anthropique s'affiche aujourd'hui comme une priorité, pour laquelle des connaissances complémentaires doivent être développées.

Dans ce contexte, l'objectif de cette seconde étude consistait à évaluer la contamination de gastéropodes *Potamopyrgus antipodarum* engagés dans la rivière Arves, en amont et en aval du rejet de la station d'épuration de Bellecombe. Cette station d'épuration, dont le design est unique en France, a la particularité de posséder deux filiales de traitements des eaux usées, l'une étant destinée aux influents hospitaliers et l'autre aux influents urbains. Dans le cadre d'un arrêté préfectoral imposant le suivi de la contamination de chacun de ces effluents, de nombreuses campagnes de prélèvements et d'analyses ont été réalisées, donnant ainsi lieu à un grand nombre de données physico-chimiques. La comparaison de ces données, reflétant la contamination des effluents mais également celle du milieu récepteur (l'Arves), avec les concentrations de polluants accumulés chez les organismes engagés permettra, dans une moindre mesure, d'évaluer l'impact des effluents de station d'épuration. Les résultats obtenus seront ainsi comparés à ceux rapportés dans l'étude précédente, pour laquelle les paramètres expérimentaux (espèce sentinelle et durée d'exposition) étaient identiques à ceux de cette présente étude.

2. Résultats

2.1. Conditions d'expositions

Durant la période d'exposition (42 jours), le débit moyen de la rivière Arve était de 27,5 m³/s. Le débit de l'effluent urbain était environ 50 fois plus important que le débit de l'effluent hospitalier (Figure 81) ; l'effluent totale de la STEP ne contribuant qu'à 2% du débit de la rivière (Figure 82).

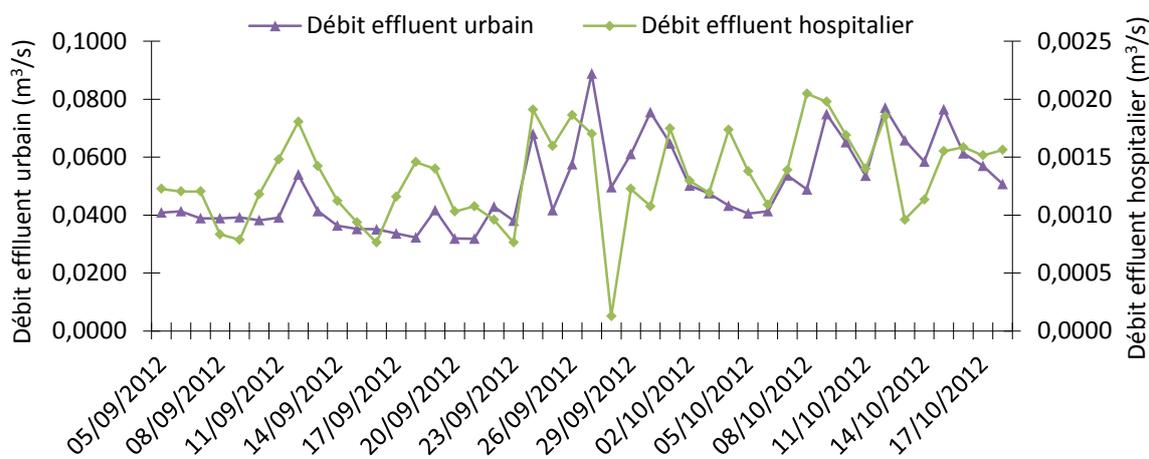


Figure 81: Débits des effluents urbains et hospitaliers (m³/s) pour la période d'exposition

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

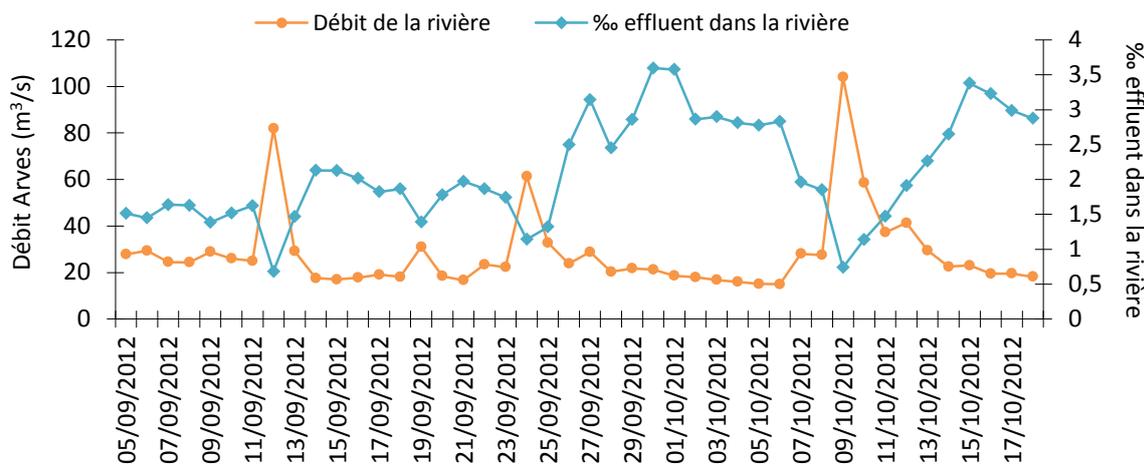


Figure 82: Débit de la rivière Arves (m³/s) sur la période d'exposition et contribution du rejet de STEP au débit de la rivière (%)

La température moyenne du milieu récepteur était très similaire pour chaque site d'exposition (amont, aval proche et aval lointain) et correspondait à une moyenne de 10,2 °C (Figure 83).

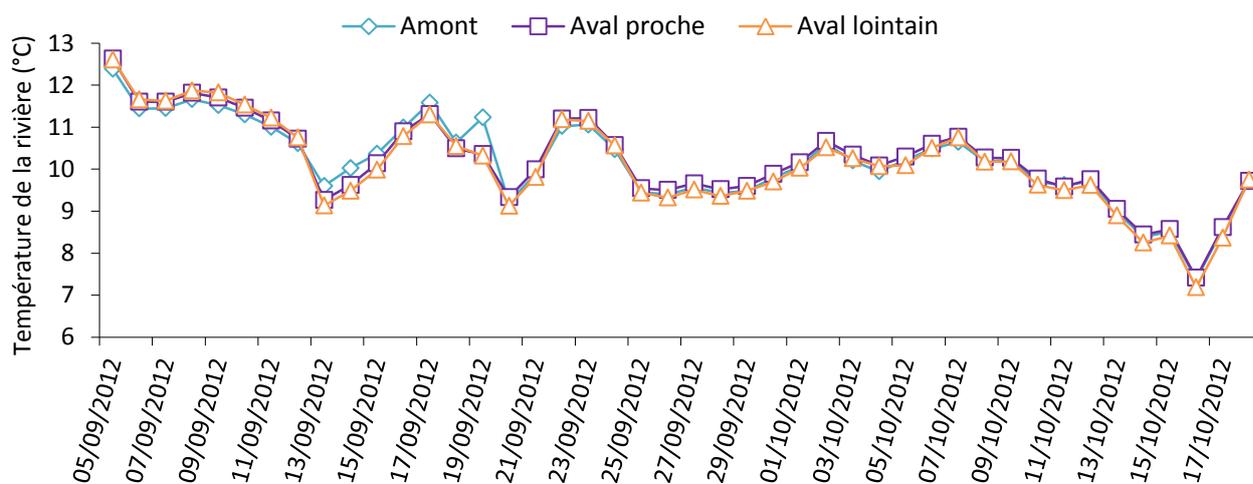


Figure 83: Température de la rivière Arves (°C) sur la durée de l'exposition pour chaque site d'engagement

De la même manière, aucune différence significative n'était à noter pour le pH et la conductivité, entre les différents sites (Table 65).

Site d'exposition	pH	Conductivité (µS/cm)
Amont	8,24±0,08	311±32
Aval proche	8,23±0,11	302±39
Aval lointain	8,23±0,5	310±31

Table 65: Caractéristiques physico-chimiques de l'Arves sur la période d'exposition

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

2.2. Analyses des matrices aqueuses

Parmi les 35 molécules sélectionnées dans le cadre de ces travaux de thèse, 7 sont communes à l'observatoire SIPIBEL. Nous possédons donc les données relatives à la contamination des effluents (hospitalier et urbains), ainsi que celles relatives à la contamination de la rivière Arves, et ce pour chaque site d'exposition (amont, aval proche et aval lointain). Les campagnes de prélèvement et d'analyse sont réalisées mensuellement grâce à un échantillonnage moyenné 24h et asservi au débit. Les résultats des analyses étant concaténés dans une base de données, nous avons pu avoir accès à l'intégralité des données relatives à la période d'exposition des mollusques (Table 66).

	Concentration (ng/L)						
	Aténolol	Carbamazépine	Diclofénac	Econazole	17 α -éthynylestradiol	Ibuprofène	Kétoprofène
Effluent hôpital	104,4 \pm 71,9	272,5 \pm 79,4	141,9 \pm 30,1	0,65 \pm 0,43	ND	100,3 \pm 52,7	15,0 \pm 5,3
Effluent urbain	365,8 \pm 97,6	238,0 \pm 72,5	390,8 \pm 91,6	0,9 \pm 0,4	ND	235,4 \pm 102,5	33,1 \pm 21,4
Arve Amont	13,0 \pm 5,4	4,4 \pm 3,6	11,0 \pm 6,3	0,8 \pm 0,4	ND	18,0 \pm 7,1	2,5 \pm 1,5
Arve Aval proche	20,0 \pm 5,5	13,3 \pm 4,9	18,9 \pm 6,9	0,8 \pm 0,4	ND	23,0 \pm 5,7	4,3 \pm 3,1
Arve Aval lointain	14,0 \pm 6,3	5,8 \pm 3,6	11,45 \pm 6,7	0,8 \pm 0,4	ND	21,0 \pm 3,9	2,3 \pm 1,3

Table 66: Contamination des matrices aqueuse (effluents et rivière) sur la période d'exposition des gastéropodes

2.3. Analyse des mollusques encagés

Classe	Composés	LOQ (ng/g)	Amont	Aval Proche	Aval lointain
Substances pharmaceutiques	Carbamazépine	1,0	<LOQ	7,42 \pm 2,15	8,14 \pm 3,45
	Oxazépam	1,8	165,33 \pm 26,45	902,0 \pm 86,19	1223,33 \pm 189,41
Hormones	Testostérone	4,2	<LOQ	4,38 \pm 0,91	<LOQ
Alkylphénols	4-ter-nonylphénol	490,0	<LOQ	717,67 \pm 124,42	687,33 \pm 185,63
	Ter-octylphénol	460,0	<LOQ	855,33 \pm 177,94	914,33 \pm 137,78
Perfluoroalkyls	PFOA	4,8	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	PFOS	4,8	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Plastifiant	Bisphénol A	42,1	<LOQ	51,43 \pm 8,45	91,67 \pm 12,45

Table 67: Contamination des mollusques encagés après 42 jours d'exposition pour chaque site investigué

Parmi les 35 molécules recherchées chez les mollusques encagés, huit ont été détectées et/ou quantifiées (Table 67). L'oxazépam présente la fréquence de quantification la plus importante, avec des concentrations pouvant atteindre le $\mu\text{g/g}$ pour les organismes exposés en aval lointain du rejet de STEP. Les alkylphénols ont également été bioaccumulés, avec des concentrations significativement plus élevées chez les gastéropodes exposés en aval du rejet, par rapport aux organismes encagés en amont. Les tendances d'accumulation du bisphénol A et de l'oxazépam sont

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

similaires, avec des concentrations pour le site situé immédiatement en aval du rejet (aval proche) plus faible que pour le site localisé en aval lointain.

3. Discussion

Pour la période d'exposition des organismes, on constate que les effluents hospitaliers étaient de manière générale moins concentrés en substances pharmaceutiques que les effluents urbains. Il semble cependant important de souligner que les médicaments suivis dans le cadre de l'observatoire SIPIBEL, ne sont pas des molécules spécifiques à des traitements hospitaliers et sont également très consommés par les particuliers, c'est notamment le cas des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Les concentrations mesurées dans l'effluent urbain sont quant à elles du même ordre de grandeur que celles reportés dans la littérature (Loos, 2013).

L'évaluation de la bioaccumulation chez *Potamopyrgus antipodarum* nous permet de confirmer les résultats obtenus lors de l'étude précédente. Bien que nous ne possédions pas les concentrations relatives à la contamination du milieu pour la benzodiazépine oxazépam, cette substance pharmaceutique semble très largement bioaccumulée par les mollusques d'intérêt, confirmant ainsi la nécessité d'évaluer les risques associés à la contamination de ces premiers maillons de la chaîne trophique. Notons également que le profil de bioaccumulation de l'oxazépam obtenu lors de ces expérimentations était similaire à celui observé dans l'étude précédente. En effet, les concentrations mesurées chez les mollusques engagés en aval proche du rejet de STEP étaient, dans les deux cas, moins importantes que celles mesurées chez les mollusques exposés plus en aval. Ces observations soulèvent des questions quant à la possible modification de la biodisponibilité des polluants en fonction de la dilution de l'effluent. Cette étude de terrain nous permet également de mettre en exergue la sensibilité de l'espèce *Potamopyrgus antipodarum* vis-à-vis des alkylphénols. Cependant, tout comme dans le cas de l'oxazépam, l'absence de donnée concernant leurs concentrations dans le milieu ne nous permet pas de calculer le facteur de bioaccumulation associé.

L'anticonvulsivant carbamazépine, uniquement quantifié chez les organismes exposés sur les sites localisés en aval du rejet deSTEP, nous permet de réaliser un comparatif avec l'étude précédente. On constate ainsi que les facteurs de bioconcentration associés à ce médicament, pour chacune des études, présentent des différences significatives (75 pour le site Bourbre Aval et 1403 pour le site aval lointain de l'observatoire SIPIBEL). L'hypothèse d'une co-exposition à une multitude de substances variable d'un site à un autre pourrait expliquer cette différence. En effet, pour chacune des études, la caractérisation du milieu récepteur, évaluée par analyse de type ciblées est loin d'être exhaustive. Or, il a été démontré que l'effet cocktail pouvait modifier le métabolisme des substances pharmaceutiques chez les organismes aquatiques. A titre d'exemple, Smith et al (2010) ont mis en évidence que le métabolisme hépatique de la fluoxétine chez la truite était limité par préexposition à la carbamazépine. Bien qu'il existe peu d'informations sur le métabolisme de produits chimiques organiques chez les invertébrés (Katagi, 2010), il a été montré que les phénomènes de biotransformations pouvait induire une modification des concentrations internes de xénobiotiques

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

(Ashauer et al., 2012). Cet exemple nous permet de mettre en évidence la complexité des phénomènes de bioaccumulation et de biotransformation qui rendent extrêmes complexes la comparaison des résultats obtenus lors d'études de terrain, d'un site à un autre.

4. Conclusions

Bien que l'objectif de cette étude, en comparaison avec les expérimentations de caging réalisées sur le site de la Bourbre dont les conditions d'exposition étaient similaires, était de mettre en exergue l'impact des effluents hospitaliers en termes d'apport de contaminants, au regard de la faible contamination des effluents hospitaliers et de l'importante dilution du rejet total de la STEP par la rivière, la contamination du milieu récepteur s'est avéré beaucoup plus faible que dans le cas de la Bourbre. Par conséquent, les résultats d'accumulation des mollusques engagés ne nous ont pas permis de mettre en évidence un impact significatif des effluents hospitaliers. La comparaison des données de bioaccumulation de la carbamazépine obtenus lors de ces deux premières études de terrain souligne la nécessité d'acquérir une compréhension avancée de la biotransformation des substances émergentes chez les invertébrés aquatique afin d'améliorer les évaluations de la bioaccumulation (Boxall, 2012). Cette seconde étude de cas nous a également permis de confirmer la sensibilité du mollusque *Potamopyrgus antipodarum* vis-à-vis de certains polluants, soulignant sa pertinence en tant qu'espèce sentinelle.

Partie B : Le projet VERI

1. Objectifs et démarche

Au milieu des années 70, Goldenberg et al ont suggéré pour la première fois l'utilisation du biote pour la surveillance des niveaux et des tendances de contamination chimique des eaux de surface. L'utilisation de ces matrices intégratives a par la suite été mise en œuvre dans plusieurs programmes de biosurveillance des eaux continentales et côtières, et est aujourd'hui recommandée par la DCE. De cette façon, le biote est maintenant reconnu comme une matrice alternative permettant des mesures de contaminants chimiques fiables. Les phénomènes de bioconcentration et de bioaccumulation fournissent des informations sur la fraction biodisponibles de contaminants dans les eaux réceptrices et permettent d'améliorer la compréhension de la sensibilité toxicologique intrinsèque aux espèces étudiées. Le biote fournit des mesures intégrées dans le temps au cours de la période d'exposition et reflète les tendances spéciales et temporelles de la pollution biodisponible.

L'utilisation des invertébrés benthiques dans les programmes de biosurveillance des masses d'eau douce, permettant également l'évaluation des risques écotoxicologiques, a augmenté de façon constante aux cours des dernières années. Le mollusque *Potamopyrgus antipodarum*, le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* et la larve d'insecte *Chironomus riparius* semblent ainsi s'afficher comme de potentielles espèces sentinelles en raison de leur pertinence tant sur le plan écologique

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

que méthodologique. Bien que de récentes études aient pu mettre en évidence leur sensibilité à divers polluants, aucune comparaison n'a été faite entre les capacités de bioaccumulation de ces trois organismes aquatiques.

Les études en laboratoire sont peu représentatives des situations réelles de terrain, où les organismes sont soumis aux variations de facteurs abiotiques, ainsi qu'à des mélanges de polluants complexes et variables, tant sur le plan spatiale que temporel. Par conséquent, la pertinence des expériences *in situ* a récemment été mise en évidence. Toutefois, si les avantages de ce type de démarche ont été largement détaillés dans la littérature, aucune méthodologie normalisée n'est à ce jour disponible, et peu d'études à grande échelle permettant d'évaluer l'impact des effluents de STEP n'ont été élaborées. Bien que les expérimentations dites de «caging» soient capables d'intégrer certains facteurs biotiques, dans la plus part des cas, l'impact des facteurs environnementaux (i.e. température ou quantité de nourriture disponible) ne peut être contrôlé. Cependant, ceux-ci peuvent influencer la physiologie des organismes engagés et par conséquent le niveau de polluants bioaccumulés.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était premièrement de souligner la possible contamination des invertébrés par des composés émergents déversés par les effluents des usines de traitement des eaux usées ; deuxièmement, de comparer la capacité de bioaccumulation des trois invertébrés benthique *Potamopyrgus antipodarum*, *Gammarus fossarum* et *Chironomus riparius* au regard des 35 polluants sélectionnés dans le cadre de ces travaux de thèse ; et troisièmement d'évaluer la pertinence et la complémentarité de ces trois espèces pour le suivi de la contamination des eaux de surface soumises à des pressions anthropiques, tels que les effluents de STEP. Le dernier objectif de cette étude consistait à évaluer la représentativité de l'approche de laboratoire par rapport aux expositions *in situ*, notamment en discutant de l'influence des conditions d'exposition à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats.

Afin de remplir les divers objectifs de cette étude, des organismes de *Potamopyrgus antipodarum*, *Gammarus fossarum* et *Chironomus riparius* ont été exposés *in situ* par procédé de «caging» pendant 7 jours en amont et en aval d'un rejet d'effluent de station d'épuration dans la rivière Brévenne, et ce pendant deux saisons (été et automne 2012). Parallèlement à ces expériences, un laboratoire de terrain a été mis en place permettant d'entreprendre des expositions *ex situ* en conditions contrôlées. Ces campagnes d'exposition saisonnières visaient à intégrer la variabilité des activités anthropiques, mais également les variations physico-chimiques de la rivière et des effluents de STEP (débit, température, matière en suspension) susceptibles d'être saison-dépendantes. La concentration des contaminants ciblés pour cette étude ont été mesurées dans l'eau de rivière, les effluents et les organismes aquatiques.

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

2. Résultats

2.1. Conditions d'exposition

Lors de cette étude, un effort a été mené pour prendre en compte la variabilité saisonnière des conditions du milieu récepteur susceptibles d'influer sur sa vulnérabilité et sur la sensibilité toxicologique des organismes exposés dans ce milieu (variabilité des conditions hydrologiques et variabilité des activités anthropiques). Les données disponibles sur l'année 2012, concernant les débits du cours d'eau et de l'effluent illustrent parfaitement cette variabilité des conditions du milieu (Figure 84). De même, une importante variabilité de la température dans le milieu récepteur au cours des périodes d'expérimentation a pu être constatée, variant entre 9 et 20°C en moyenne

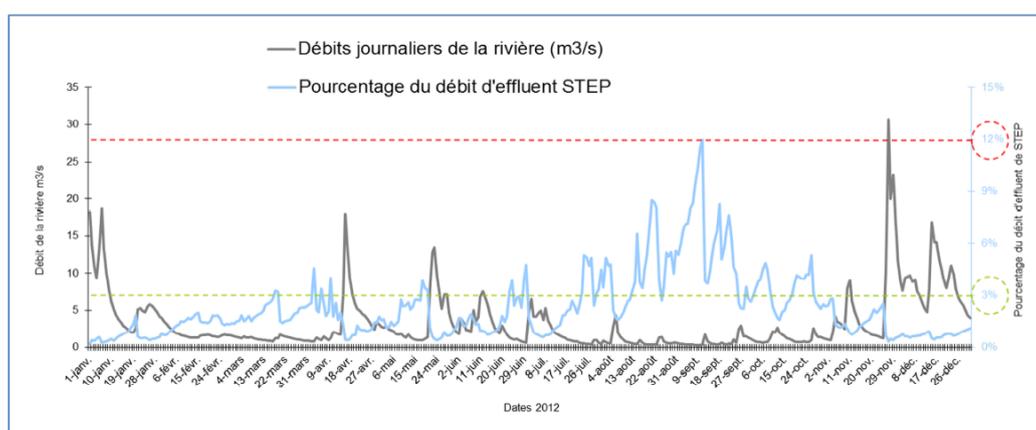


Figure 84: Débit de la Brévenne et pourcentage de l'effluent de STEP dans la rivière au cours des campagnes d'exposition de 2012

Au cours de la période d'exposition estivale, le débit moyen de la rivière était de 7902 m³/s, et le débit moyen de l'effluent de STEP était équivalent à 97 m³/s, ce qui représente 1,2% du débit de la rivière. La température mesurée variait de 17,9°C à 20,3°C sur la période d'exposition *in situ*.

Au cours de la période d'exposition automnale, le débit moyen de la Brévenne était de 23364 m³/s, et le débit moyen de l'effluent de STEP était de 173 m³/s, ce qui représente 0,7% du débit de la rivière, la température mesurée était significativement plus faible que celle relevée lors de la campagne d'été et variait de 8,6°C à 9,8°C.

Les paramètres physico-chimiques de la rivière et de l'effluent, pour chacune des campagnes d'exposition sont résumés dans la Table 68.

	pH		Conductivité (µS/cm)		Saturation en oxygène (%)		Matière en suspension (mg/L)	
	Rivière*	Effluent STEP	Rivière*	Effluent STEP	Rivière*	Effluent STEP	Rivière*	Effluent STEP
Eté	8,6±0,1	8,3±0,1	350±32	2201±244	70-90	70-90	ND	1,1
Automne	8,4±0,2	8,1±0,1	327±32	1932±482	70-90	70-90	ND	2,8

ND : Non déterminé

* En amont de la station d'épuration

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

Table 68: Paramètres physico-chimique de la Brévenne et de l'effluent de STEP pour chaque campagne d'exposition (été et automne)

Au regard des expérimentations en laboratoire, les conditions d'exposition sont présentées dans la Table 69. Globalement, la température d'exposition était de $12\pm 1^\circ\text{C}$ pour l'espèce *Gammarus fossarum* et de $20\pm 1^\circ\text{C}$ pour *Potamopyrgus antipodarum* et *Chironomus riparius*. La conductivité des milieux d'exposition variait d'environ $300\ \mu\text{S}/\text{cm}$ à $1800\ \mu\text{S}/\text{cm}$ et était significativement plus élevée pour le mélange E50 en comparaison aux autres milieux d'exposition. Aucune différence significative n'a été constatée entre les différentes campagnes d'expérimentation.

<i>Chironomus riparius</i>				
	Saturation O ₂ (%)	pH	Conductivité (μS/cm)	Température (°C)
FOS	79,8±4,2	8,0±0,3	302,3±6,2	20,2±0,2
RIV	83,0±3,3	8,2±0,2	345,3±14,7	20,4±0,3
E50	65,5±6,8	7,9±0,1	1136,8±218,1	20,5±0,3
<i>Gammarus fossarum</i>				
FOS	82,8±6,0	8,2±0,2	354,0±26,6	12,2±0,4
RIV	80,3±6,0	8,2±0,2	328,0±22,7	12,3±0,4
E50	76,3±4,3	8,2±0,1	1129,0±299,4	13,0±0,6
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>				
FOS	85,3±2,9	8,2±0,1	318,5±4,5	19,6±0,1
RIV	81,3±1,9	8,2±0,1	334,5±23,2	19,8±0,1
E50	72,5±7,3	8,0±0,1	1120,0±236,3	19,9±0,1

Table 69: Condition d'exposition ex situ pour chaque espèce sentinelle et chaque milieu d'exposition

2.2. Analyses chimiques

2.2.1. Analyse de l'eau de rivière et de l'effluent de station d'épuration

La société Véolia Environnement Recherche et Innovation, porteur de ce projet, n'ayant pas souhaité analyser l'intégralité des 35 molécules ciblées lors de ces travaux de thèse dans les matrices aqueuses (eau de rivière et effluent de STEP) pour des raisons budgétaires, seulement 19 d'entre elles ont été recherchées et quantifiées. Bien que les méthodes analytiques utilisées dans ce cas n'est pas été développées dans le cadre de ces travaux de thèses, elles sont couramment utilisées en routine dans notre laboratoire et ont fait l'objet d'un protocole de validation stricte.

Les concentrations moyennes des polluants mesurées dans l'eau de rivière et dans l'effluent de STEP sont reportées dans les Table 70Table 71, correspondant respectivement à chacune des campagnes d'exposition.

		Eté					
		Eau de rivière			Effluent de STEP		
		Lundi-Mardi	Mercredi-jeudi	Vendredi-dimanche	Lundi-Mardi	Mercredi-jeudi	Vendredi-dimanche
Composés ciblés	LOQ (ng/L)	Concentration (ng/L)					
Aténolol	4,0	8,09	8,28	9,12	442,50	516,00	497,50
Diuron	0,8	5,92	4,38	4,67	96,60	75,50	59,50
Bézafibrate	4,2	<LOQ	<LOQ	6,32	69,90	77,60	103,50
Carbamazépine	0,8	12,85	11,75	14,85	254,00	275,00	298,00

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

Oxazépam	7,8	28,10	38,35	53,00	1190,00	1500,00	1705,00
Testostérone	3,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Diclofénac	22,9	<LOQ	<LOQ	<LOQ	610,0	697,50	744,50
Lévonorgestrel	22,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Roxithromycine	0,04	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Estrone	2,8	4,0	8,0	6,0	8,9	9,0	10,0
17 α Estradiol	30,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
17 β Estradiol	30,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
17 α Ethinylestradiol	55,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ter-octylphénol	2000,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ter-nonylphénol	5000,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ibuprofène	57,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
PFOA		<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
PFOS	30,0	39,00	37,00	35,00	39,00	36,00	37,00

Table 70: Concentration des polluants ciblés dans l'eau de rivière et dans les effluents de STEP mesurées lors de la campagne d'été

		Automne					
		Eau de rivière			Effluent de STEP		
		Lundi-Mardi	Mercredi-jeudi	Vendredi-dimanche	Lundi-Mardi	Mercredi-jeudi	Vendredi-dimanche
Composés ciblés	LOQ (ng/L)	Concentration (ng/L)					
Aténolol	4,0	<LOQ	4,82	<LOQ	72,27	70,20	82,50
Diuron	0,8	3,04	25,15	16,07	21,36	22,11	36,03
Bézafibrate	4,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8,15	10,51	12,44
Carbamazépine	0,8	8,30	16,71	19,45	77,38	90,06	99,41
Oxazépam	7,8	9,30	9,44	12,35	149,71	152,18	154,12
Testostérone	3,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Diclofénac	22,9	<LOQ	32,4	30,12	326,77	447,43	450,79
Lévonorgestrel	22,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Roxithromycine	0,04	0,34	0,08	0,39	0,77	1,73	2,20
Estrone	2,8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
17 α Estradiol	30,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
17 β Estradiol	30,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
17 α Ethinylestradiol	55,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ter-octylphénol	2000,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ter-nonylphénol	5000,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ibuprofène	57,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
PFOA	30,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
PFOS	30,0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Table 71: Concentration des polluants ciblés dans l'eau de rivière et dans les effluents de STEP mesurées lors de la campagne d'automne

Globalement, parmi les 18 composés recherchés, 7 n'ont été quantifiés ni dans l'eau de rivière, ni dans les effluents de STEP (Lévonorgestrel, α E2, β E2, EE2, 4-ter-nonylphénol, ter-octylphénol et ibuprofène). En revanche, l'aténolol, le diuron, le bézafibrate, la carbamazépine, l'oxazépam et le diclofénac ont été systématiquement détectés, en amont de la station et dans l'effluent, avec des concentrations pouvant être très significatives, dans l'effluent et dans le milieu, comme pour l'oxazépam qui est un médicament mais également le métabolite final pour de nombreuses benzodiazépines de cette classe. Une tendance claire de la contamination par des substances pharmaceutiques est à souligner, les concentrations étant significativement plus élevées au cours de la campagne d'été, en particulier dans les effluents de STEP. Toutefois, bien que certaines contaminations épisodiques aient pu être mises en évidence pour le PFOS et l'estrone, aucune

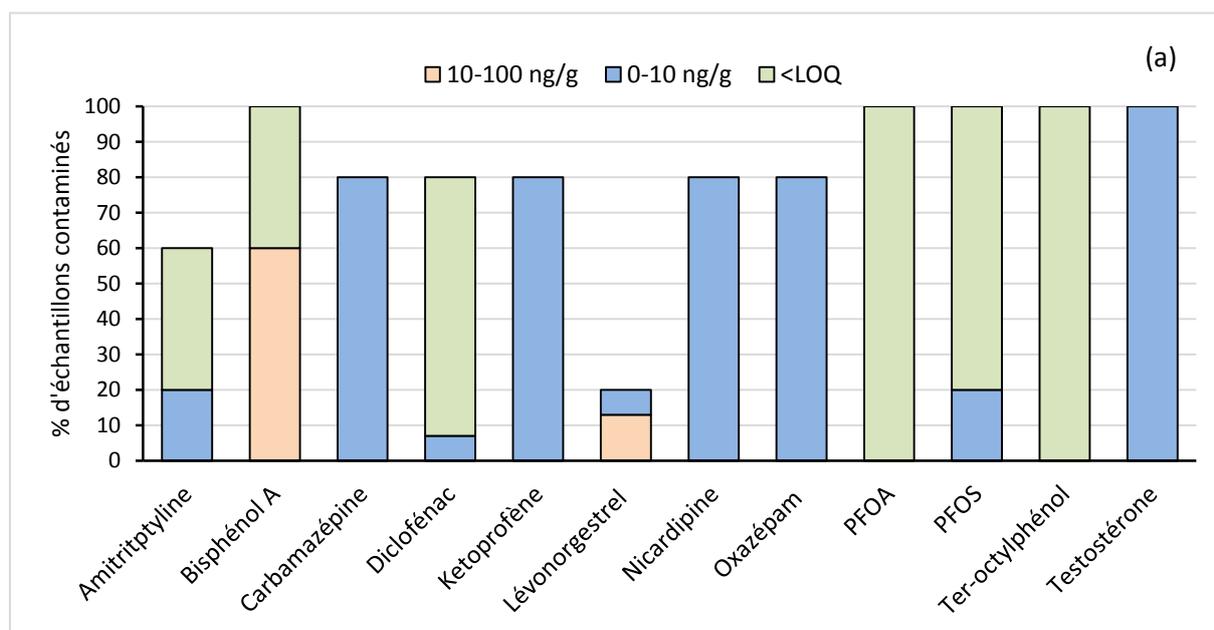
Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

tendance claire ne peut leur être attribuée, leurs concentrations étant similaires dans l'eau de rivière et dans l'effluent de STEP.

2.2.2. Analyse du biote

Les données concernant la contamination de chacune des espèces pour les deux campagnes d'exposition sont synthétisées en annexe (Tableau 35, Tableau 36, Tableau 37, Tableau 38, Tableau 39, Tableau 40). Afin de simplifier la lecture des tableaux, seules les molécules qui ont été détectées et/ou quantifiées y sont présentées. Les molécules non détectées ne sont pas reportées.

Dans un premier temps, une analyse globale des résultats, campagne par campagne, sur l'ensemble des réplicats, et sans tenir compte des différentes conditions d'exposition est présentée. Elle permet de mettre en évidence les composés détectés et quantifiés chez chacune des espèces sentinelles lors de chaque campagne d'expérimentation, et présente une vue globale, qualitative et quantitative, de la contamination mesurée pour chacune des espèces investiguées.



Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

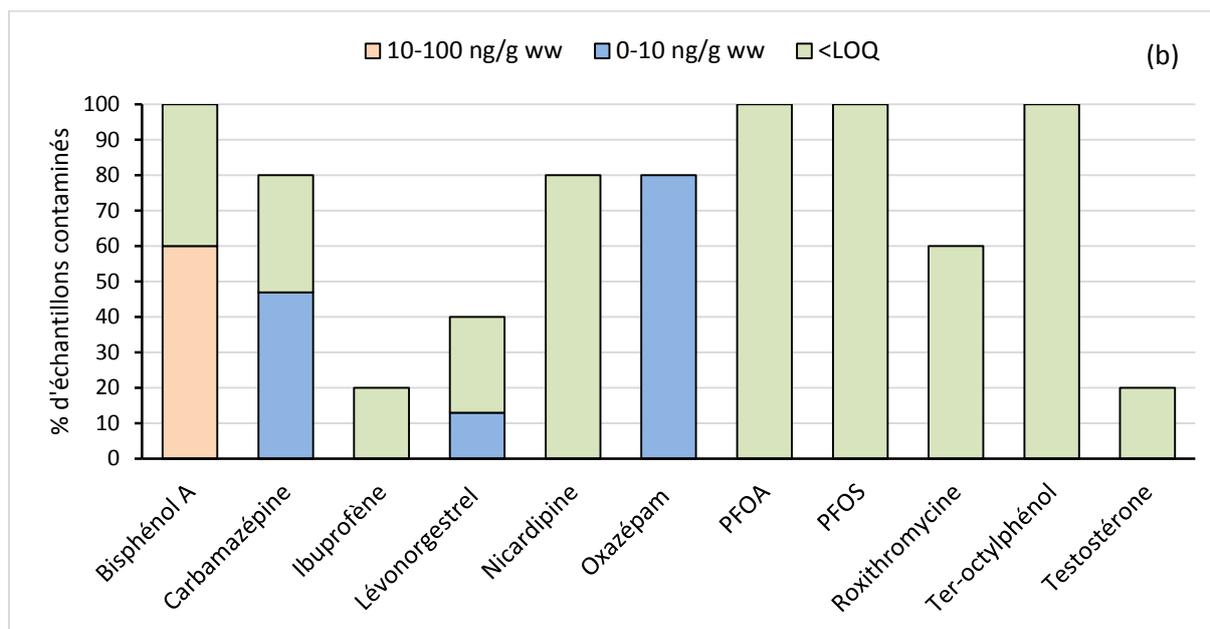
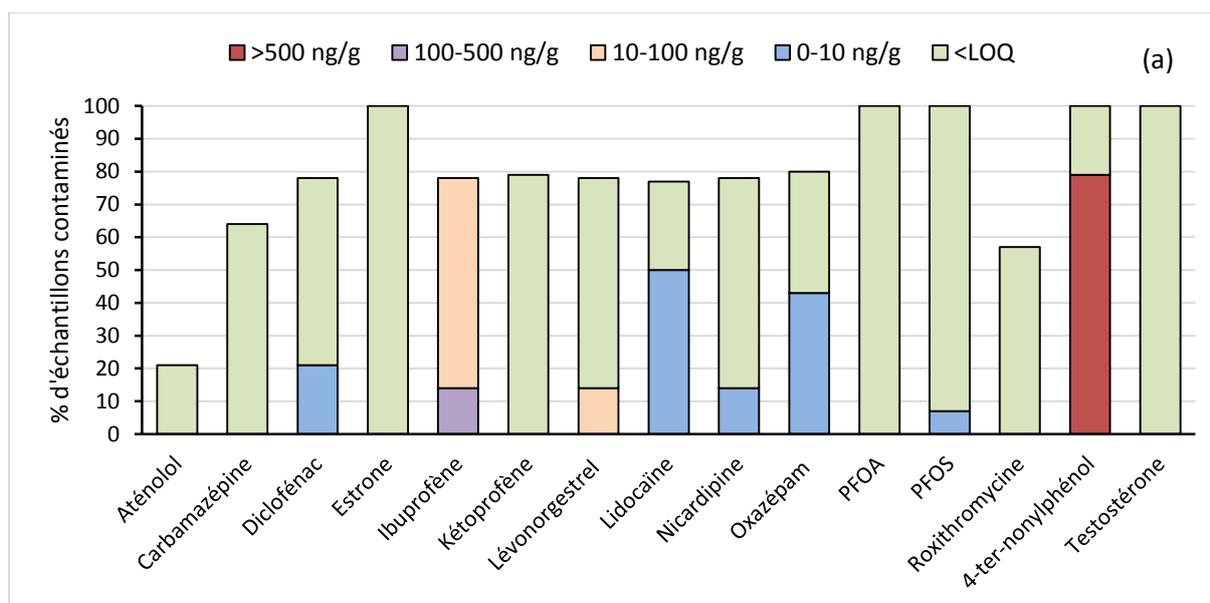


Figure 85: Contamination globale de *Chironomus riparius* en été (a) et en automne (b)

Chez *Chironomus riparius*, 12 composés ont été détectés et 10 ont été quantifiés lors de la campagne d'été (Figure 85 (a)), parmi lesquelles l'amitriptyline (antidépresseur) et la nicardipine (régulation cardiaque) rarement recherchées et priorisées par Jean et al. (2012) pour les rejets hospitaliers. En automne (Figure 85 (b)) 11 molécules ont été détectées et seulement 6 quantifiées. Globalement, la contamination apparaît moins importante en automne qu'en été. De plus, les composés détectés diffèrent selon la saison. Par exemple, le Kétoprofène (AINS), quantifié dans 80% des échantillons lors de la campagne estivale, n'a pas été détecté en automne.



Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

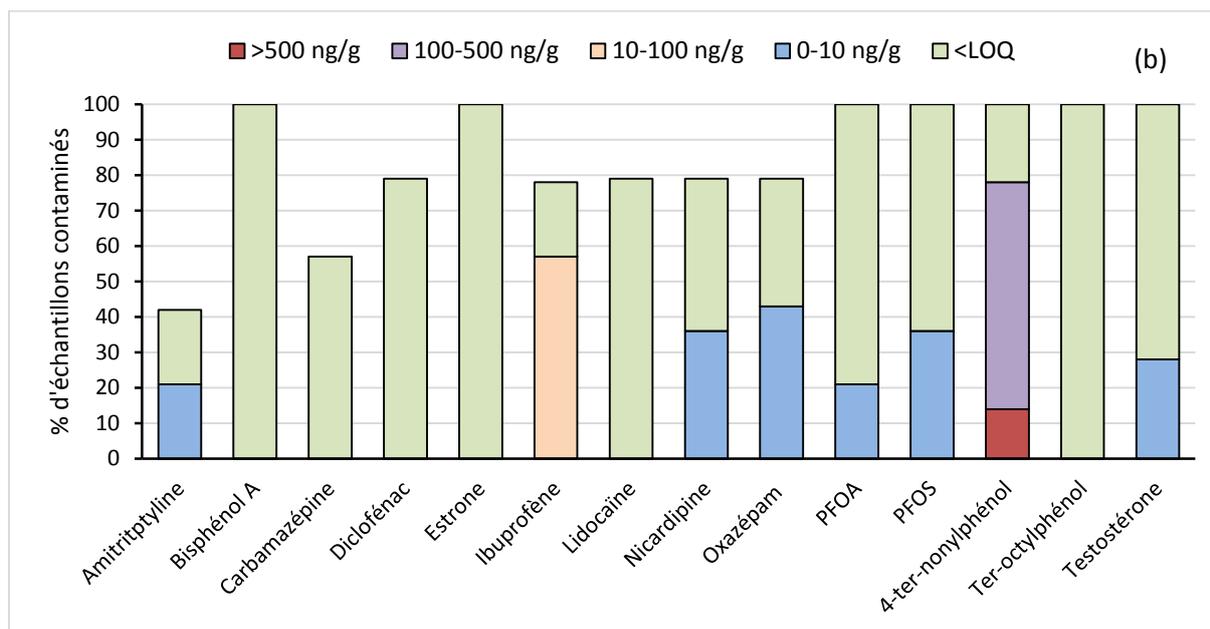
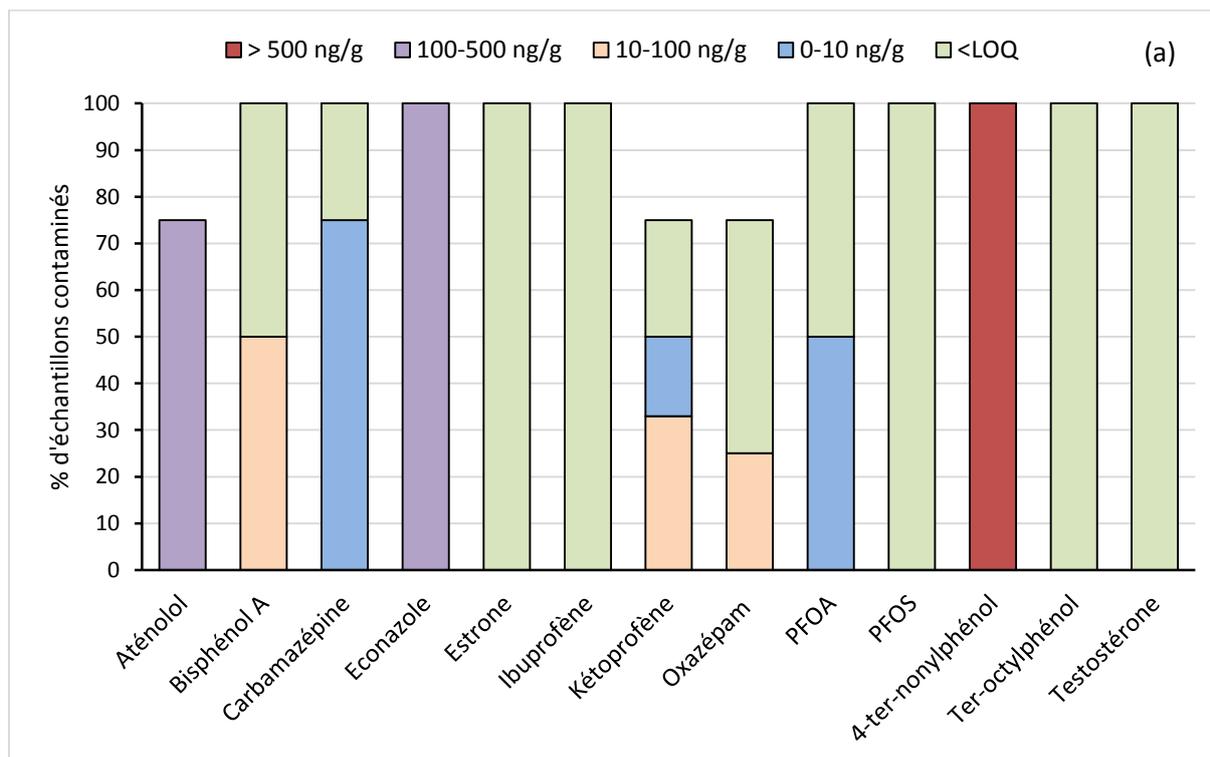


Figure 86: Contamination globale de *Gammarus fossarum* en été (a) et en automne (b)

Chez *Gammarus fossarum*, 15 composés ont été détectés et 8 quantifiés lors de la campagne d'été (Figure 86 (a)). Pour cette espèce, prélevée sur le terrain, on relève une contamination des contrôles par le 4-ter-nonylphénol (> LOQ) en automne. En automne (Figure 86 (b)), 14 ont été détectés et 8 ont également quantifiés. Comme pour le chironome, les composés détectés en été diffèrent de ceux détectés en automne. D'un point de vue quantitatif, nous ne pouvons, aux vues de ces simples histogrammes, suggérer une différence de contamination qui serait fonction de la saison.



Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

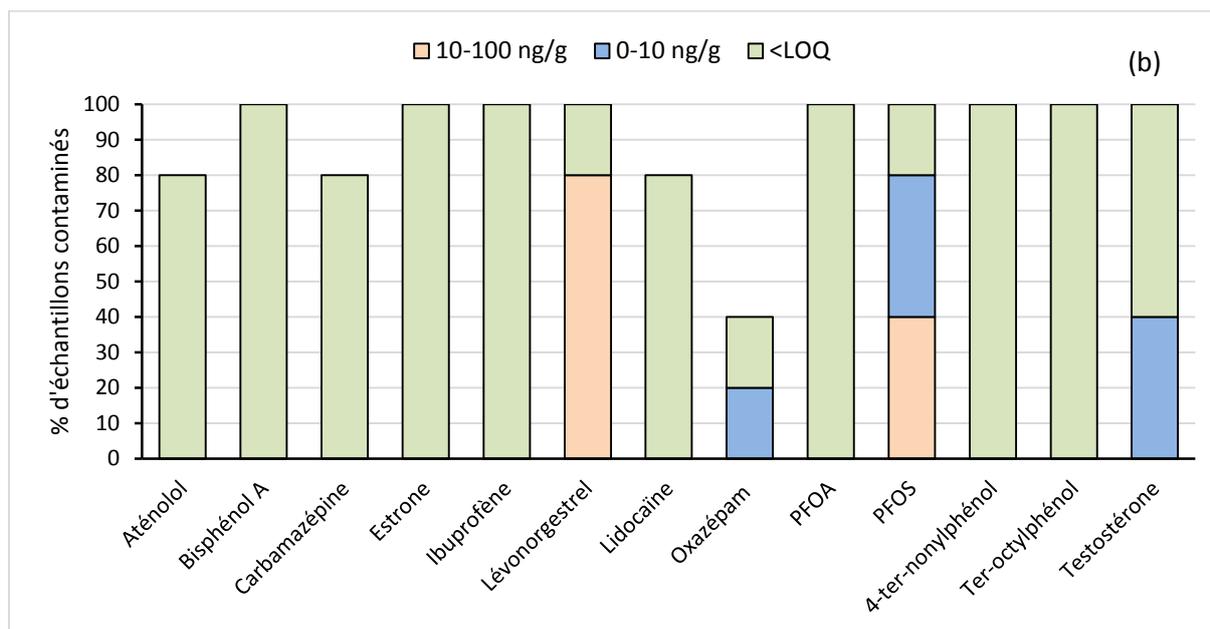


Figure 87: Contamination globale de *Potamopyrgus antipodarum* en été (a) et en automne (b)

Chez *Potamopyrgus antipodarum*, 13 composés ont été détectés en été comme en automne. En été 2 molécules sont significativement mesurées chez les organismes contrôles, l'éconazol et le 4-ter-nonylphénol. Huit substances ont été quantifiées en été (Figure 87 (a)), contre quatre seulement en automne (Figure 87 (b)). De plus, les gammes de concentration mesurées sont plus importantes en été qu'en automne. Ces résultats confirment donc les observations faites chez *Chironomus riparius*, indiquant une contamination quantitativement plus importante lors de la période estivale, cohérente avec les résultats des analyses dans l'eau et l'effluent. L'influence de la température d'exposition plus élevée en été est également un facteur de d'influence qu'il faudrait quantifier.

En conclusion, cette première évaluation des résultats de bioaccumulation chez les trois invertébrés benthiques choisis pour cette étude, conduit à mettre en évidence une différence significative de contamination, tant sur le plan qualitatif que quantitatif, cohérente avec la contamination des milieux selon la saison.

Indépendamment des échantillons, huit molécules sont détectés dans les trois espèces dont deux (oxazépam et PFOS) ont pu être quantifiées également chez les trois organismes. A l'inverse, certaines molécules, comme α E2, β E2, EE2, ou la prédnisolone n'ont jamais été détectées et/ou quantifiées selon les espèces.

3. Discussions

3.1. Contamination des effluents de STEP et du milieu récepteur

Bien que les objectifs de ces travaux ne soient pas centrés sur la caractérisation des effluents et du milieu récepteur, une comparaison des résultats obtenus avec les données disponibles dans la littérature s'avère nécessaire afin de souligner la légitimité de notre étude.

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

Globalement les valeurs mesurées dans la Brévenne sont inférieures, mais du même ordre de grandeur que les valeurs médianes mesurées dans des eaux de surface (Hughes et al., 2012, Luo et al. 2014), à l'exception de l'ibuprofène qui n'est pas détecté dans cette étude, ainsi que les surfactants mais pour lesquels la méthode multi-résidus mise en œuvre a conduit à des LOQ très élevées. Ces valeurs sont également cohérentes avec les mesures réalisées sur les deux sites d'étude précédemment évoqués.

Les concentrations des molécules, mesurées dans l'effluent, et pour lesquelles nous avons des informations sont également dans les gammes de celles disponibles dans la littérature (Besse et al. 2008 ; Ratola et al. 2012, Luo et al. 2014). Plusieurs substances pharmaceutiques ont ainsi été détectées et/ou quantifiées. Parmi celles-ci, l'oxazépam présente les concentrations les plus élevées, en particulier lors de la campagne d'exposition estivale ($>1 \mu\text{g/L}$). Cette molécule est à la fois un médicament actif spécifique mais également le métabolite de quatre autres benzodiazépines (nordazépam, prazépam, diazépam et clorzépate). En outre, l'oxazépam subit une glucuronidation directe dans le corps humain, il est donc majoritairement excrété sous sa forme conjuguée, qui peut subir un clivage ultérieur dans l'environnement et générer la molécule active (Besse, 2008). Des données récentes suggèrent que le taux d'abattement de ce composé dans les STEP est très faible (Wahlberg, 2011) ; une enquête auprès de plus de 90 stations d'épuration Européenne montre que l'oxazépam a été détecté dans plus de 90% des cas dans les effluents traités (Loos, 2013).

En comparaison aux produits pharmaceutiques, moins d'informations sont disponibles sur la présence de pesticides dans les effluents de STEP. Toutefois, les mesures de concentration relatives à la présence de diuron sont en adéquation avec les données publiées par De La Cruz et al. (2012).

3.2. Comparaison de la contamination des effluents de STEP, du milieu récepteur et des organismes

Parmi les 18 composés inclus à la fois dans la méthode d'analyse des matrices aqueuses et dans la méthode d'analyse multi-résidus des organismes aquatiques, seulement 9 ont été quantifiés dans les échantillons aqueux (eau de rivière et effluent de STEP), alors que 12 ont été quantifiés dans au moins une des espèces retenues pour cette étude.

La comparaison des concentrations des polluants émergents d'intérêt dans les effluents et le milieu récepteur, avec celles mesurées chez les organismes permet de mettre en évidence la présence de polluants biodisponibles dans le milieu. En effet, du fait de leur capacité de bioaccumulation, les espèces modèles sont une source d'informations supplémentaires qui peut permettre de pallier aux limites de l'analyse des eaux et des effluents. Ainsi, lors de la campagne d'automne, la roxithromycine (antibiotique) qui n'avait pas été détectée dans l'eau de rivière et dans l'effluent de STEP, a pu être détectée et quantifiée chez *Chironomus riparius* lors de la campagne d'exposition automnale. Le lévonogestrel (hormone), également non détecté dans les effluents et le milieu récepteur, a quant à lui été quantifié chez toutes les espèces sentinelles.

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

L'étude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les organismes modèles sur deux saisons, met en évidence à la fois la variabilité des réponses biologiques due à la variabilité de la contamination mais également aux conditions d'exposition (température, débit ...), sans qu'il soit vraiment possible de discriminer à ce stade l'importance de chacun de ces facteurs pour les trois espèces étudiées. Chez *Potamopyrgus antipodarum*, l'oxazépam est quantifié en forte concentration (~85ng/g) chez les organismes ayant été exposés au mélange effluent/eau de rivière (E50) en été. Ce résultat est en lien avec les mesures de concentration de ce médicament dans les effluents qui indiquent une forte augmentation de la concentration d'oxazépam dans les rejets de STEP lors de la période estivale (10 fois plus importante en été qu'en automne). Des tendances similaires sont détectables avec l'aténolol pour le gastéropode ou le diclofénac chez le gammare.

A contrario, certaines molécules comme le diuron (pesticide) et le bézafibrate (anti-cholestérol), détectées à la fois dans les effluents et le milieu récepteur, n'ont été détectées chez aucune des espèces modèles, pour aucune des conditions d'exposition. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : d'une part la bioconcentration de ces polluants n'est aujourd'hui pas confirmée et leur cinétique d'accumulation n'est pas connue pour les modèles biologiques étudiés. Par conséquent, les conditions d'exposition, et plus particulièrement la durée d'exposition, pourrait être insuffisante et ne permettrait pas de mettre en évidence un phénomène de bioaccumulation ; d'autre part il est possible que les organismes aient entièrement métabolisé la substance mère, qu'il est donc impossible de détecter par la stratégie analytique utilisée.

3.3. Comparaison des capacités d'accumulation des trois espèces considérées

Bien que les espèces choisies pour cette étude soient toutes considérées comme des organismes modèles en écotoxicologie, aucune enquête n'a été menée quant à leurs capacités de bioaccumulation potentiellement différentes d'une espèce à une autre. En effet, ces invertébrés appartiennent à différents taxons (mollusque, crustacé et larve) et présentent donc des modes de vie et des métabolismes différents. Par conséquent, leur sensibilité à la pollution, ainsi que les phénomènes d'absorption et de dépuración des contaminants peuvent varier d'une espèce à une autre. La compréhension de ces phénomènes et l'investigation des capacités de bioaccumulation de ces organismes semblent cependant indispensable à la mise en place de programme de biomonitoring et nécessite donc de développer des connaissances supplémentaires.

Dans le cas de cette étude, mollusques, crustacés et larves d'insecte ont été exposés simultanément *in situ* et *ex situ* pendant 7 jours. Par conséquent, pour un polluant donné, dans une même condition d'exposition et sur une même période d'exposition, il est possible de réaliser un comparatif entre les différentes espèces investiguées. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence des différences significatives en termes de capacité d'accumulation. A titre d'exemple, l'aténolol (β -bloquant) n'a été détecté que chez *Potamopyrgus antipodarum*. En outre, des différences inter-espèce, en particulier en ce qui concerne le niveau d'accumulation lié à certains composés ciblés peuvent être notées. En effet, l'ibuprofène (anti-inflammatoire) a été détecté en quantité 3 fois plus importante chez

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

Gammarus fossarum que chez les autres espèces. Concernant l'oxazépam, médicament psychotrope, le niveau d'accumulation était 30 fois plus élevé chez les mollusques exposés en laboratoire au mélange E50 que chez les autres espèces. La sensibilité de ce gastéropode à cette substance pharmaceutique peut ainsi être confirmée par l'étude précédente relative au site de la Bourbre. Notons cependant que les concentrations mesurées lors de cette étude sont très inférieures à celles mesurées pour l'étude précédemment évoquées. Cette différence peut être due à une contamination significativement plus faible pour le bassin Brévenne-Turbine comparé au site de la Bourbre, mais également à une différence de durée d'exposition (42 jours dans le cas de la Bourbre contre 7 jours pour la Brévenne).

Les différences de capacités de bioaccumulation mises en évidence dans cette étude doivent cependant être nuancées. D'une part, la bioconcentration des composés ciblés dans les 3 organismes étudiés est encore peu documentée dans la littérature, et les cinétiques d'accumulation restent à ce jour encore inconnues pour les modèles biologiques choisis. Seul Ashauer al.... Par conséquent, les conditions d'exposition, en particulier le niveau de contamination du site d'étude et le temps d'exposition peuvent être insuffisantes pour tirer une conclusion définitive quant à la capacité de bioaccumulation de ces trois espèces. D'autre part, il est possible que les organismes aient totalement métabolisé la molécule mère, qui ne peut donc plus être détectée par la méthode analytique mise en œuvre. D'autres chercheurs ont également documenté des différences relatives au degré d'absorption de médicaments chez différentes espèces aquatiques. Meredith-williams et al (2012) attribuent ces différences inter-espèces au mode de respiration, au comportement et au pH du système test. Par conséquent, la mesure de l'accumulation dépend des propriétés physico-chimiques de la substance étudiée et peut être influencée par l'espèce elle-même. Selon l'OCDE, le principal critère témoignant d'un potentiel de bioaccumulation se résume à un coefficient de partage octanol/eau supérieur à 3. Cependant, les résultats montrent que certaines molécules ciblées, tels que la lidocaïne, l'oxazépam ou encore la carbamazépine, sont bioaccumulées malgré leur caractère moyennement à fortement hydrophile.

Notre étude met ainsi en évidence la différence de capacité de bioaccumulation des trois invertébrés benthiques retenus pour ces travaux au regard des polluants émergents sélectionnés, et souligne l'intérêt d'utiliser une batterie d'organismes pour effectuer une biosurveillance fiable. Des connaissances supplémentaires sont toutefois nécessaires pour améliorer notre compréhension des diversités inter-espèce observées dans cette étude.

3.4. Impact des conditions d'exposition : *in situ* vs *ex situ*

L'influence des facteurs abiotiques ne peut être contrôlée lors des expositions *in situ*. Ces facteurs sont cependant soupçonnés de perturber la physiologie des organismes et donc d'influencer le niveau de contaminant accumulé. A titre d'exemple, l'effet de la température sur la physiologie et la bioaccumulation de bivalves est communément souligné dans la littérature (Minierr, 2006 ; Grossiaux, 1996). Compte tenu des conditions de cette étude, la mise en œuvre du laboratoire de

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

terrain vise à réaliser des expériences d'exposition dans des conditions de température contrôlées. En comparant les résultats des composés ciblés accumulés dans chaque espèce sentinelle obtenus au cours de la procédure de « caging » avec ceux mesurés lors des expositions *ex situ*, certains facteurs de confusion, comme la température, peuvent être mis en évidence.

Certaines données de bioaccumulation semblent suggérer que les conditions d'exposition en laboratoire ne reproduisent pas intégralement les conditions réelles d'expositions dans l'environnement aquatique. La concentration de l'ibuprofène chez *Gammarus fossarum* illustre cette différence. En effet, au cours de la campagne d'exposition estivale, les concentrations d'ibuprofène étaient trois fois plus élevées pour la condition *in situ* (en amont de la STEP) que pour la condition *ex situ* (100% eau de rivière RIV) (figure X). En outre, la comparaison des concentrations d'ibuprofène mesurées entre les organismes exposés au mélange E50 et les organismes exposés à l'eau de rivière (RIV) en conditions contrôlées permet de mettre évidence la contribution du rejet de STEP. Cette hypothèse n'a cependant pas été confirmée par l'approche *in situ* pour laquelle les concentrations d'ibuprofène chez les crustacés exposés en amont et en aval de la STEP étaient similaires. Néanmoins, notons que dans le cas de la procédure par caging l'effluent de STEP est bien plus dilué que dans le cas de l'exposition en laboratoire relative au milieu E50. Au cours de la campagne d'exposition automnale, les concentrations d'ibuprofène étaient trois fois plus élevées chez les organismes encagés en aval de la STEP que chez les organismes exposés en amont, confirmant ainsi un apport de contamination du au rejet de STEP. Toutefois, cette contribution n'était pas si évidente lors des expositions *ex situ*. En effet, même si cet anti-inflammatoire a été quantifié chez les crustacés exposés au mélange E50 et seulement détecté chez les organismes exposés en condition RIV, l'augmentation de la contamination des organismes semble moins importante que lors de l'approche *in situ*. Néanmoins, ces résultats sont cohérents avec les données précédemment mentionnées, obtenues lors de la campagne d'exposition estivale : l'ibuprofène est, de manière générale, toujours quantifié en quantité plus importante lors des expositions *in situ* en comparaison aux expérimentations conduites en laboratoire. Considérant les conditions d'exposition des gammaridés lors des différentes campagnes d'exposition, il est à noter que si la température était constante lors des expériences en laboratoire ($12 \pm 1,5$ °C), celle-ci était très variable selon les saisons dans le milieu récepteur ($17,9 \pm 1,1$ °C en été contre $9,8 \pm 2,4$ °C en automne). Notons cependant que les températures sur l'ensemble des expositions, *in situ* comme *ex situ*, étaient toutes comprises dans la plage de tolérance de *Gammarus fossarum* (de 0°C à 25°C, température optimale 12°C (Wijnhoven et al. 2003)). Bien que l'impact de la température sur l'accumulation des éléments traces comme les métaux soit relativement bien documenté dans la littérature (Pellet et al., 2009), son influence sur l'accumulation de substances organiques dans de tels organismes est encore peu étudiée à l'heure actuelle. Néanmoins, les résultats d'une étude de terrain sur la bioaccumulation de pesticides et de de PCB chez les gammares ont suggéré que l'influence de la température était négligeable au regard de la contamination au niveau tissulaire (Blais et al, 2003 ; Besse et al, 2013). Puisqu'aucune information sur l'impact de la température sur l'accumulation des substances pharmaceutiques n'est

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

à ce jour disponible, ce facteur abiotique confondant ne peut être totalement exclu et pourrait expliquer les différences de contamination observées entre les expériences *in situ* et *ex situ*.

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

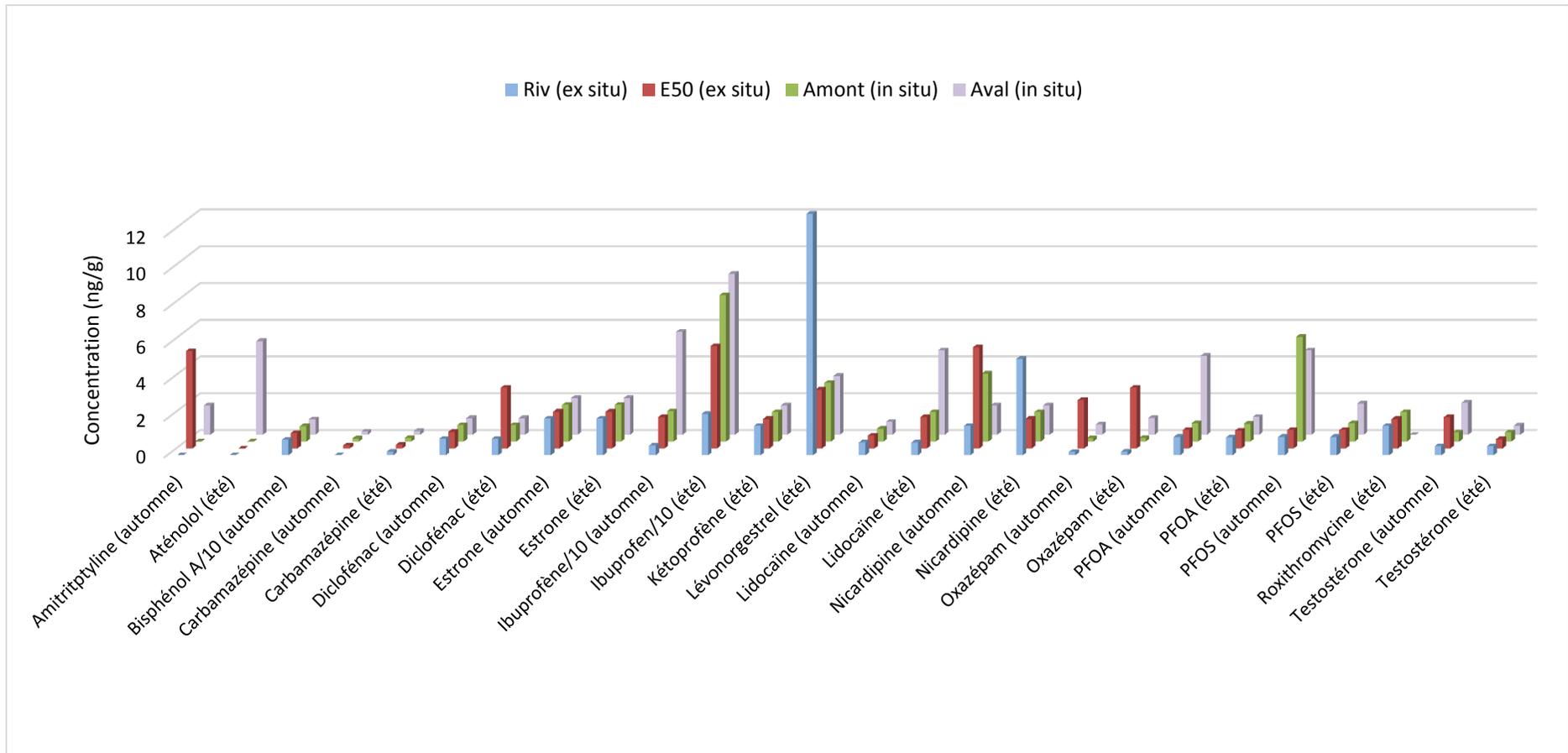


Figure 88: Comparaison des concentrations mesurées chez *Gammarus fossarum* en fonction des différentes conditions d'exposition pour chaque campagne d'expérimentation

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

Un autre facteur de confusion, lié à la conception et au design du laboratoire de terrain pourrait également expliquer les différences de contamination observées entre les expositions *ex situ* et *in situ*. Cette hypothèse fait référence à la présence de matière en suspension dans des proportions variables selon les conditions d'exposition. En effet, lors des expérimentations *in situ*, les matières en suspension sont naturellement présentes au sein du système aquatique étudié, et des phénomènes de remise en suspension peuvent même se produire lorsque le débit de la rivière est très important. Cependant la quantité de matière en suspension présente dans les milieux d'exposition en laboratoire est fortement réduite en raison du mode de fonctionnement du laboratoire de terrain. En effet, l'eau de la rivière, ainsi que l'effluent de STEP, sont préalablement pompés et stockés dans un réservoir intermédiaire avant d'être redistribués dans les systèmes d'exposition du laboratoire. Or des phénomènes de décantation peuvent avoir lieu dans le réservoir intermédiaire, par conséquent la totalité des matières en suspension n'est pas acheminée dans les aquariums. Toutefois, les matières en suspension pourraient être une source potentielle de contaminant en raison de l'affinité préférentielle de certains composés pour les phases particulaires. A titre d'exemple, Duan et al. (2013) ont étudié la distribution multi-phases de 5 substances pharmaceutiques dans un milieu aquatique soumis aux rejets de STEP. Les auteurs mettent en évidence que les médicaments à caractère acide, comme l'ibuprofène, le diclofénac ou encore le kétoprofène, sont dans un échantillon d'eau, principalement distribués dans la phase dissoute, suivi par les colloïdes, et finalement par les particules solides. Dans cette étude, 8% à 33% des produits pharmaceutiques étudiés sont liés aux phases particulaires. Ainsi, celle-ci peuvent être considérées comme un potentiel réservoir de contaminant dans l'environnement aquatique.

Dans notre cas, le lévonorgestrel (hormone) et la nicardipine (médicament anti-arythmique) ont été seulement quantifiés lors des expositions en laboratoire à l'eau de rivière. Cependant, les concentrations mesurées sont proche des limites de quantification, et ces molécules ont tout de même été détectées au cours des expériences *in situ*. Par conséquent, aucune conclusion quant à une potentielle différence de bioaccumulation relative aux conditions d'exposition ne peut être établie. Des observations similaires ont pu être constatées pour les perfluoroalkyls. Notons cependant que dans le cas du PFOS, et plus particulièrement pour la campagne d'automne, les différences entre les conditions d'exposition *in situ* et *ex situ* semblent légèrement plus significatives : ce contaminant ayant été détecté en quantité plus importante lors de l'approche *in situ*. Dans ce cas particulier, et plus particulièrement pour ce composé, la contribution des matières en suspension semblent être l'hypothèse la plus appropriée. Le PFOS possédant une forte affinité avec les phases solides.

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

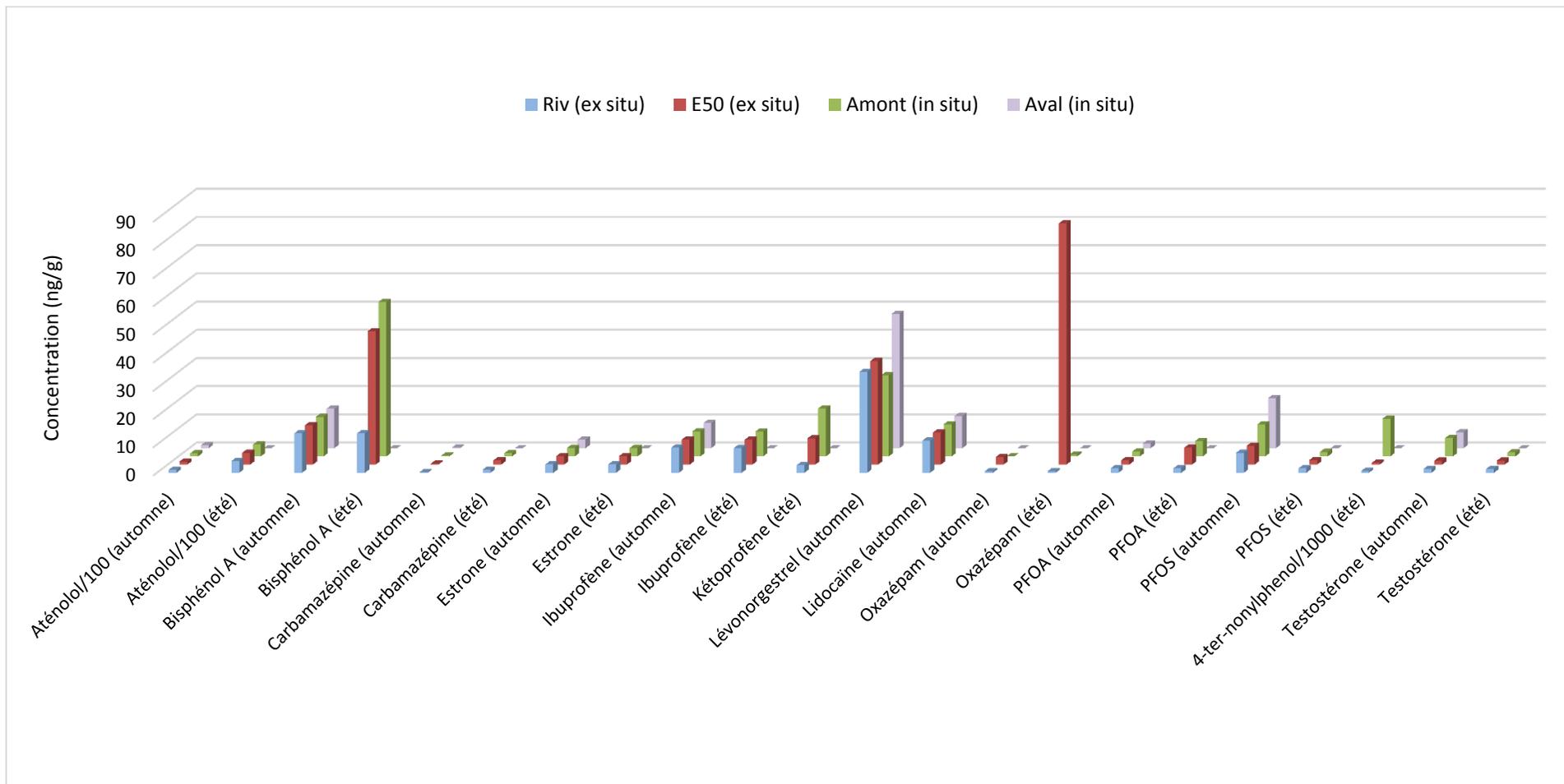


Figure 89: Comparaison des concentrations mesurées chez *Potamopyrgus antipodarum* en fonction des différentes conditions d'exposition pour chaque campagne d'expérimentation

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

Chez *Potamopyrgus antipodarum*, comme mentionné ci-dessus pour l'espèce *Gammarus fossarum*, les observations semblent confirmer que les conditions d'exposition en laboratoire ne reproduisent pas intégralement les conditions d'exposition environnementale (Figure 89). Lors de la campagne d'exposition automnale, le lévonorgestrel a été détecté en quantité une fois et demie plus importante chez les organismes engagés en aval de la station d'épuration que pour ceux exposés en amont. Ainsi, l'approche *in situ* conduit à soupçonner un apport de contamination provenant du rejet de STEP. Cependant, cette hypothèse n'a pas été confirmée par les expérimentations en laboratoire, où aucune différence significative n'a été observée entre les organismes exposés au mélange E50 et ceux exposés à l'eau de rivière (RIV). Pour le PFOS, les concentrations mesurées étaient également significativement différentes en fonction des conditions d'exposition, elles étaient en effet très nettement supérieures lors des expositions *in situ*. Ces observations sont donc cohérentes avec les résultats obtenus chez *Gammarus fossarum*. Certaines études récentes fournissent des données quant à la distribution des perfluoroalkyls au sein des écosystèmes aquatiques qui pourraient permettre d'expliquer en partie les résultats obtenus dans notre étude. Bien que le PFOA et le PFOS soient principalement transportés par la phase dissoute (97%) et peu présents dans la phase particulaire (3%) (Ahrens, 2011 et 2010), une teneur en matière organique plus élevée dans la fraction particulaire pourrait conduire à des concentrations plus élevées de perfluoroalkyls dans celle-ci, en raison de la bioaccumulation dans le plancton et des phénomènes d'adsorption sur la matière organique (Powley, 2009 ; Higgins et Luthy, 2006). En outre, Ahrens et al. (2011) ont montré que le PFOA pouvait facilement se désorber des sédiments, devenant ainsi biodisponible pour les organismes benthiques et conduisant à favoriser la bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire (Martin et al. 2004). Ces résultats témoignent ainsi de la complexité de la distribution des composés perfluorés au sein des matrices aqueuses, particulaires et sédimentaires, principalement contrôlée par les interactions avec le carbone organique. De tels phénomènes ne pouvant être reproduits à l'identique en laboratoire, les résultats de ces études pourraient expliquer les différences de bioaccumulation observées entre l'approche *in situ* et *ex situ*.

Contrairement aux expérimentations réalisées avec *Gammarus fossarum*, chez les gastéropodes, lors des expositions automnales, la température était significativement plus élevée en laboratoire que dans le milieu naturel, ce qui pourrait également expliquer les différences observées en termes de bioaccumulation entre les différentes approches d'exposition. Bien que l'influence de la température d'exposition sur l'accumulation de polluants émergents ne soit pas discutée dans la littérature, certains résultats ont indiqué que ce facteur abiotique pouvait avoir un effet significatif sur les réserves énergétiques de *Potamopyrgus antipodarum*, impactant ainsi le métabolisme des organismes (Gust et al, 2011). En outre, des différences relatives à la croissance des mollusques ont pu être observées, conduisant potentiellement à des phénomènes de dilution qui devront être confirmés. Lors de la campagne estivale, quelques différences de bioaccumulation ont également été rapportées, notamment pour le kétoprofène et les perfluoroalkyls, bien que les différences de température entre le laboratoire et le milieu naturel soient inférieures à celles mesurées en

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

automne. Toutefois, comme discuté précédemment, pour ces composés l'influence de la quantité de matière en suspension devrait être favorisée. L'interprétation des résultats relatifs à cette campagne est cependant très délicate compte tenu de l'absence de résultats concernant les organismes exposés en aval de la STEP. Les conditions météorologiques ne nous ayant pas permis de récupérer les organismes engagés.

Chez *Chironomus riparius*, en comparaison aux autres modèles biologiques retenus pour cette étude, de nombreux polluants ont été détectés en concentrations similaires, indépendamment des conditions d'exposition (*in situ* vs *ex situ*) (figure X). Ceci est particulièrement le cas pour la carbamazépine, l'oxazépam et la nicardipine. Ces résultats ont par ailleurs été confirmés pour chacune des campagnes de mesures. Certains composés présentent néanmoins des différences de concentration variables selon les conditions d'exposition (bisphénol A, lévonorgestrel, roxithromycine). La carbamazépine, dont la concentration dans l'eau de la Brévenne en amont du rejet a peu varié sur les 2 périodes d'expérimentations, $13,15 \pm 1,6$ ng/L en automne et $14,82 \pm 5,8$ ng/L en été (contrairement à la concentration dans l'effluent), permet de proposer une comparaison de l'influence relative de la température du milieu d'exposition chez le chironome. En été, avec des températures d'exposition plus élevées ($20,3+2,4$ contre $9,7 +1,1$ en automne), et une croissance similaire des organismes sur le terrain, la carbamazépine est quantifiée de manière significative chez les chironomes, contrairement aux expositions d'automne. Ces observations permettent donc de mettre en évidence l'influence de la température sur le niveau de contaminant accumulé. Cependant, celle-ci ne doit pas être extrapolée ou généralisée tant elle semble composé et espèce dépendante.

Dans l'ensemble, l'analyse des résultats relatifs à cette dernière étude révèle des différences de contamination qui semblent fonction à la fois des conditions d'exposition, mais également des espèces sentinelles et des molécules ciblées. Ces différences nous amènent à remettre en question la pertinence des méthodes de laboratoire pour évaluer avec précision le risque associé aux rejets de STEP, même lorsque l'effluent et l'eau du milieu récepteur sont pompés continuellement afin d'améliorer le réalisme de l'exposition. Cette double approche nous a cependant permis d'émettre des hypothèses quant à l'impact de facteurs confondants, comme la température ou la contribution des matières particulaires, qui laissent entrevoir de nombreuses perspectives de travail, nécessaire à la compréhension de ces phénomènes. L'utilisation d'un tel design expérimental a également permis de mettre en exergue la contribution spécifique de l'effluent de STEP à la contamination de la rivière, et ce pour certaines molécules comme l'oxazépam ou encore l'ibuprofène.

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

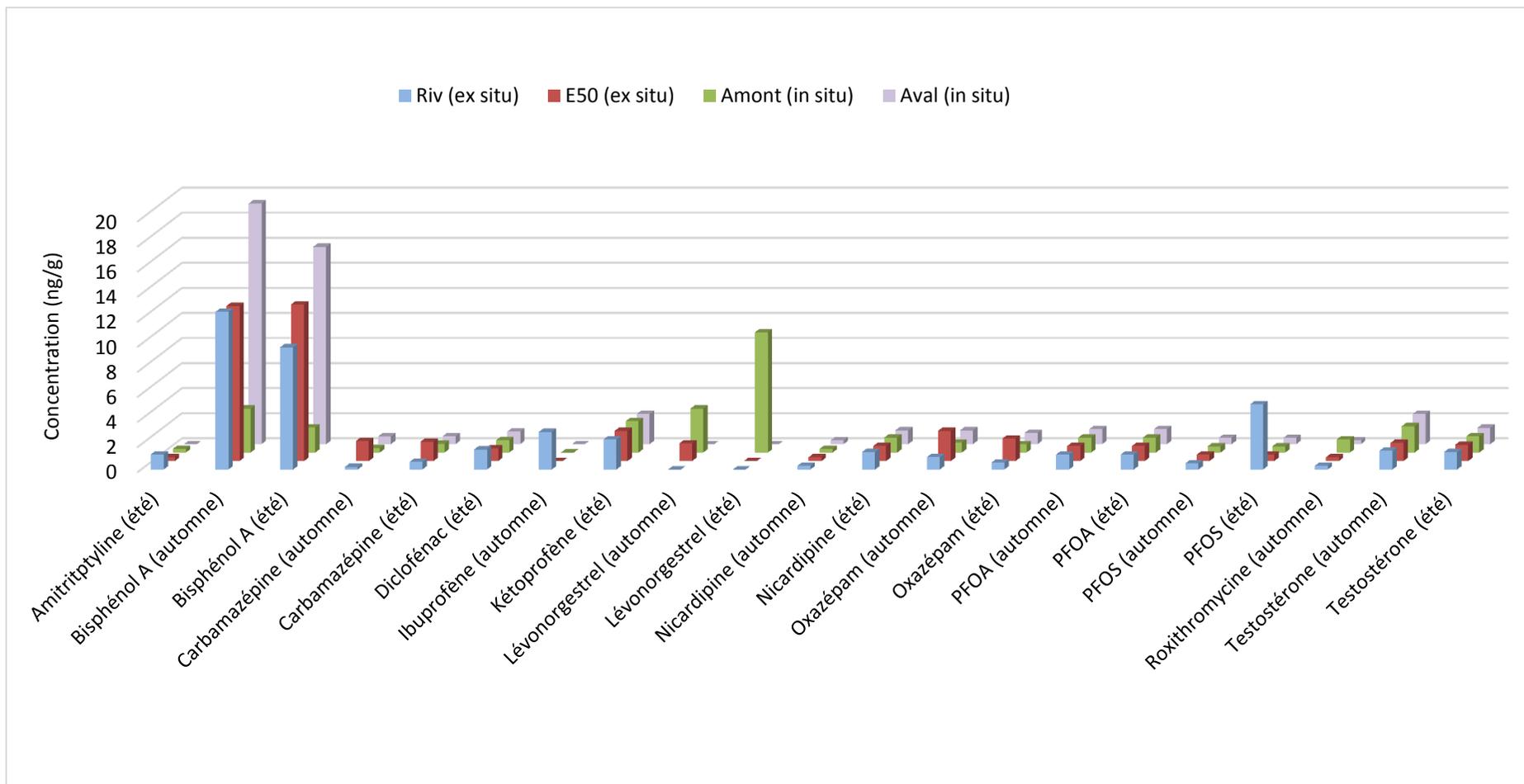


Figure 90: Comparaison des concentrations mesurées chez *Chironomus riparius* en fonction des différentes conditions d'exposition pour chaque campagne d'expérimentation

3.5. Proposition de potentiels traceurs chimiques d'exposition liés au rejet urbain

Bien que non quantifiable dans l'eau, certaines molécules peu métabolisables sont susceptibles de contaminer les organismes et la chaîne trophique. La possibilité de rendre compte de ce danger en analysant dans les organismes quelques molécules, peu métabolisées et spécifiques des rejets urbains est un élément important de surveillance de qualité des milieux et des dangers à long terme qui leur sont associés. Une faible métabolisation chez certaines espèces, une quantification aisée dans les matrices biologiques en lien avec la contamination de l'effluent, sont cependant des critères à considérer.

L'oxazépam (antidépresseur), déjà mesuré en quantité importante dans le milieu, a été détecté chez toutes les espèces sentinelles, il apparaît donc comme un bon candidat de traceur potentiel de rejets urbains. Chez les gastéropodes, après 7 jours d'exposition, il est quantifié en concentration significative chez les individus exposés à l'E50 en été et en automne. Néanmoins cet apport d'oxazépam du au rejet de STEP n'est cependant pas confirmé en aval in situ, en lien probable avec la dilution de l'effluent plus importante sur le terrain. Cependant, les concentrations mesurées dans les organismes, environ 30 fois plus importante en été qu'en automne sont cohérentes avec les concentrations d'oxazépam dans l'effluent (10 fois supérieures en été qu'en automne). Ce médicament est également quantifié chez *Chironomus riparius* pour chacune des campagnes investiguées. Comme précédemment, l'apport d'oxazépam par la STEP n'est pas toujours mis en évidence pour l'exposition in situ (les concentrations mesurées dans les organismes exposés en amont et en aval du rejet sont très peu différentes). Cependant, là encore, les tests d'exposition en laboratoire à la dilution 50% de l'effluent tendent à confirmer l'apport de la STEP. Enfin, chez *Gammarus fossarum*, l'oxazépam est également détecté chez les individus exposés en laboratoire et sur le terrain, et ce pour toutes les conditions d'exposition testées. La contribution du rejet de STEP est également confirmée pour chacune des expositions, notamment lors de la campagne d'été.

La carbamazépine (antiépileptique) apparaît également comme un potentiel traceur de pollution anthropique. Elle est systématiquement présente, parfois en concentrations élevées (0,5-0,9 µg/L) dans l'effluent, ainsi que dans le milieu récepteur. Bien qu'en concentration faible dans l'eau de rivière en été et automne (10-20 ng/L), elle est détectée chez toutes les espèces sentinelles. Les données disponibles sur le chironome conduisent à suspecter la contribution du rejet de STEP en apport de carbamazépine, en été comme en automne.

L'ibuprofène (AINS) est également un traceur de pollution qui confirme l'utilité et la complémentarité des modèles biologiques choisis pour cette étude. En effet, ce médicament a uniquement été quantifié chez *Gammarus fossarum*, ce qui nous permet de confirmer la présence de ce médicament dans le milieu d'exposition, alors que les analyses d'eau et d'effluent n'ont pas permis de quantifier la molécule. De plus, la contribution du rejet de station d'épuration est mise en évidence au laboratoire et ce pour chacune des campagnes menées. Elle est également confirmée par l'approche in situ pour la campagne d'automne.

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

En complément aux quatre molécules précédemment citées, potentiels traceurs de pollution anthropique, d'autres molécules ont été significativement mesurées. C'est notamment le cas du lévonorgestrel. Cette hormone mesurée en automne, en concentrations significatives et plus importantes chez les gastéropodes exposés en aval du rejet de STEP que chez les organismes exposés en amont, apparaît comme un traceur potentiel, alors que cette molécule n'est pas quantifiable dans le milieu ou l'effluent (concentration toujours <LOQ), ni en été ni en automne. Le lévonorgestrel a également été quantifié chez les deux autres espèces sentinelles, mais seulement lors de l'exposition dans l'eau de rivière amont, au laboratoire et sur le terrain pour le gammare et le chironome respectivement. D'autres molécules, apparaissent comme des traceurs potentiels de pollution anthropique. C'est notamment le cas de la testostérone et des composés perfluorés (PFOA, PFOS), mais pour lesquels nous n'avons pas de données quantitatives quant à leur présence dans le milieu récepteur et les effluents (concentrations mesurées souvent <LOQ pour les campagnes d'été et d'automne), et pour lesquels les concentrations mesurées dans les organismes sont souvent plus importantes lors des expositions in situ que lors des expositions en laboratoire.

4. Synthèse

Pour résumer l'importante quantité de données disponible suite à l'effort analytique consenti dans cette étude, les deux tableaux ci-dessous résument les principales informations à retenir. Ils présentent d'une part la complémentarité des matrices utiles à la détection des contaminants du milieu par des substances en très faibles concentrations (Table 72), d'autre part la complémentarité, en termes de capacité d'accumulation des organismes modèles utilisés (Table 73).

Classe	Composés	Eau de rivière (N=6)	Effluent de STEP (N=6)	Potamopyrgus antipodarum (N=21)	Gammarus fossarum (N=22)	Chironomus riparius (N=30)
Substances pharmaceutiques	Amitriptyline	NA	NA	0%	27%	30%
	Aténolol	67%	100%	43%	41%	0%
	Bézafibrate	100%	83%	0%	0%	0%
	Carbamazépine	100%	100%	43%	77%	63%
	Cyclophosphamide	NA	NA	0%	0%	0%
	Desloratadine	NA	NA	0%	0%	0%
	Diclofénac	83%	100%	0%	100%	70%
	Econazole	NA	NA	42%	0%	0%
	Ibuprofène	100%	100%	100%	86%	20%
	Kétoprofène	NA	NA	43%	50%	40%
	Lidocaïne	NA	NA	57%	32%	0%
	Nicardipine	NA	NA	0%	32%	40%
	Oxazépam	100%	100%	71%	54%	100%
	Pantoprazole	NA	NA	0%	NA	NA
	Prednisolone	NA	NA	0%	0%	0%
	Ritonavir	NA	NA	0%	0%	NA
	Roxithromycine	50%	50%	0%	36%	40%
	Tamoxifène	NA	NA	0%	0%	0%
4-Hydroxytamoxifène	NA	NA	0%	0%	0%	
Hormones	Estrone	50%	50%	100%	100%	0%
	17 α -estradiol	100%	100%	0%	0%	0%

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

	17β-estradiol	100%	100%	0%	0%	0%
	17α-éthynylestradiol	100%	100%	0%	0%	0%
	Lévonorgestrel	100%	100%	57%	50%	40%
	Mifépristone	NA	NA	0%	0%	0%
	Noréthindrone	NA	NA	0%	0%	0%
	Testostérone	100%	100%	100%	100%	100%
Perfluoroalkyls	PFOA	100%	100%	100%	100%	100%
	PFOS	50%	50%	57%	100%	100%
Alkylphénols	4-ter-nonylphénol	100%	100%	42%	77%	NA
	Ter-octylphénol	100%	100%	100%	100%	100%
Pesticides	Diuron	100%	100%	0%	0%	0%
	Spinosad	NA	NA	0%	0%	0%
Filtre UV	4-Methylbenzylidène camphre	NA	NA	0%	0%	0%
Plastifiant	Bisphénol A	NA	NA	100%	86%	20%

Molécule quantifiée ($[M] > \text{LOQ}$) dans plus de 30% des échantillons dans lesquels elle a été détectée (% d'échantillons quantifiés)

Molécules détectée mais non quantifiée ($\text{LOD} < [M] < \text{LOQ}$) dans plus de 30% des échantillons (% d'échantillons dans lesquels la molécule est détectée)

Molécule non détectée ($[M] < \text{LOD}$) dans plus de 70% des échantillons (% d'échantillons dans lesquels la molécule est tout de même détecté)

NA Molécule non analysée dans la matrice

Table 72: Comparaison des matrices, eau, effluent et biote pour la détection et la quantification de molécules organiques à l'état de traces

Compte tenu des performances des méthodes analytiques multi-résidus développées dans cette étude, selon les molécules, et pour des concentrations réalistes du milieu naturel, il apparaît que la recherche d'une contamination du milieu via le biote est plus performante que l'analyse dans l'eau ou l'effluent. C'est notamment le cas pour le lévonorgestrel, la testostérone, le 4-tert-nonylphénol ou l'ibuprofène. Les données non disponibles dans l'eau et l'effluent, empêchent néanmoins de conclure pour de nombreuses molécules.

Certaines molécules ne sont par contre détectées que dans l'eau ou l'effluent, et n'ont pas ou rarement été retrouvées dans les organismes, le bézafibrate, le diclofénac, le diuron, la roxythromycine et les hormones. Une trop faible durée d'exposition ou une forte métabolisation pourrait expliquer ce résultat. Pour lever ces hypothèses, il conviendrait de s'intéresser à la toxicinétique de ces molécules et la recherche d'éventuels métabolites.

Par ailleurs, nous pouvons comparer les facteurs d'accumulation (été et automne), calculables pour chacune des espèces exposées sur une même durée (7jours) et strictement dans les mêmes conditions, dans le milieu en amont de la station, et pour laquelle nous disposons d'analyses chimiques dans des échantillons prélevés sur la même période d'exposition. Lorsque la molécule est détectée mais sous la limite de quantification, cette dernière est utilisée. Seuls les résultats

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

concernant les molécules analysées à la fois dans les organismes et dans les matrices aqueuses seront présentés.

Classe	Composés	BCF Chironome		BCF Gammare		BCF Gastéropode	
		Eté	Automne	Eté	Automne	Eté	Automne
Substances pharmaceutiques	Aténolol	ND	ND	ND	ND	48725	ND
	Bézafibrate	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Carbamazépine	54	34	ND	ND	84	ND
	Diclofénac	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Ibuprofène	ND	ND	1398	289	ND	ND
	Oxazépam	17	80	ND	55	ND	ND
	Roxithromycine	ND	3925	ND	ND	ND	ND
Hormones	Estrone	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	17 α Ethinylestradiol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	α -Estradiol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	β -Estradiol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Lévonorgestrel	433	201	ND	ND	ND	1276
	Testostérone	380	594	ND	514	ND	1857
Perfluoroalkyls	PFOA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	PFOS	ND	ND	154	190	ND	380
Alkylphénols	4-ter-nonylphénol	ND	ND	ND	254	2683	ND
	Ter-octylphénol	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table 73: Comparaison des capacités de bioaccumulation des organismes sentinelles

Même si le BCF calculé, ne peut être assimilé à un facteur d'accumulation à l'équilibre, cette valeur permet de comparer l'intensité d'accumulation, dépendante de la molécule pour chacune des espèces sur une durée d'exposition équivalente.

Ces tableaux mettent en évidence la complémentarité des organismes, avec des caractéristiques d'accumulation des substances, dans les mêmes conditions d'exposition, différentes et parfois remarquables, qui restent cependant à confirmer, comme l'aténolol chez le gastéropode, la roxthromycine chez le chironome ou encore l'ibuprofène chez le gammare. Il est néanmoins impossible de conclure, en particulier en termes de concentration maximale accumulable et de facteur de bioconcentration entre les organismes, dans la mesure où nous ne disposons pas des cinétiques d'accumulation. Les données disponibles dans la première étude détaillée dans ce manuscrit et menée sur des gastéropodes exposés 42 jours dans le milieu (température comprise entre 10,2 et 16,9°C) permettent une première comparaison des BCFs pour quelques molécules. Ainsi l'oxazépam, détecté mais non quantifié chez le gastéropode en 7 jours, présente au contraire un BCF significatif (6922) après 42 jours d'exposition. Les BCFs de la carbamazépine compris entre 34 et 84 selon l'espèce considérée sont semblables à ceux mesurés chez *Potamopyrgus antipodarum* sur le site de la Bourbre mais sont nettement inférieurs à ceux calculés pour l'observatoire SIPIBEL.

5. Conclusion

Au regard de l'impact chimique et de l'accumulation dans les organismes retenus pour cette étude, les différences au laboratoire et sur le terrain entre les facteurs et processus physico-chimiques (par exemple température et MES) contrôlant la biodisponibilité des molécules conduisent à une variabilité plus importante entre les différentes situations de mesure. Néanmoins, la double approche d'exposition mise en oeuvre permet de mettre en évidence un impact du rejet, et ce

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de polluants émergents chez les invertébrés benthiques : vers l'évaluation de l'impact des activités d'assainissement sur les milieux aquatiques

malgré une contamination chimique déjà notable de la rivière. Plusieurs molécules émergentes, apparaissent ainsi comme d'intéressants traceurs à surveiller pour suivre la contamination biodisponible en lien avec la contamination urbaine.

En accord avec VERI, un des choix majeurs du design expérimental retenu a consisté à privilégier la répétition des mesures en fonction du temps sur un même rejet, plutôt qu'à diversifier les rejets, en particulier selon leur qualité présumée en termes de niveau et de diversité des xénobiotiques rejetés. L'effort réalisé a donc porté principalement sur la variabilité annuelle de la réponse de la batterie d'organismes, en laboratoire et sur le terrain. De ce fait, s'il est possible d'aborder l'importance des conditions du milieu sur la réponse biologique vis-à-vis du rejet, il n'est au contraire pas possible de statuer sur la sensibilité de la batterie sur un gradient de qualité de rejets de STEP, susceptibles de varier avec la performance du traitement. Pour aller plus loin, il serait nécessaire de comparer la performance de cette approche couplant chimie dans les organismes et biologie sur des rejets de qualité différente, mais également dans des milieux récepteurs de vulnérabilité différente (en termes d'espèces sensibles, de charge pré-existantes en polluants...), et peut être plus « sensible » que la Brévenne, déjà impactée par les pressions anthropiques.

Enfin, il reste nécessaire d'évaluer notre approche sur une échelle plus intégrative, en comparant notamment la réponse de cette batterie d'organismes à des indicateurs biocénotiques sur les communautés d'invertébrés benthiques autochtones.

Conclusion

Les 3 études présentées dans ce chapitre ont permis de mettre en évidence l'applicabilité des outils analytiques développés dans le cadre de ces travaux de thèse, fournissant ainsi les premières données de bioaccumulation à l'échelle d'un individu pour les invertébrés benthiques *Gammarus fossarum* et *Potamopyrgus antipodarum*. Elles mettent également en exergue la pertinence des modèles biologiques choisis pour ces études, en termes de sensibilité et de capacité d'accumulation, mais également de complémentarité. Les résultats obtenus soulignent l'existence de diversité de réponse inter-espèces qui semblent également fonction du site d'étude et des conditions d'exposition. Ces observations laissent à penser qu'il est nécessaire d'acquérir des connaissances supplémentaires sur les mécanismes de bioaccumulation et de biotransformation indispensables à l'interprétation des résultats. Dans ce contexte, une approche métabolomique, incluant une analyse globale (non-ciblée) des échantillons, s'impose comme une stratégie analytique appropriée qui permettra dans une moindre mesure de répondre aux questions restées jusque-là en suspens.

Chapitre 5:
Approches
métabolomiques

Introduction

La métabolomique est aujourd'hui reconnue comme une approche polyvalente largement utilisée par les milieux universitaires et industriels dans le domaine des sciences biologiques, médicales, toxicologiques ou encore nutritionnelles. Depuis le début des années 2000, le nombre d'études métabolomiques appliquées aux sciences de l'environnement est en constante évolution. Bien que la « métabolomique environnementale » puisse être considérée comme une stratégie holistique permettant d'étudier les organismes vivants dans leur milieu naturel et d'améliorer nos connaissances quant à l'impact de la qualité du milieu sur les écosystèmes, ce domaine est en fait beaucoup plus large que cela. Il comprend en effet l'application de la métabolomique à des domaines tels que l'écophysiologie, permettant de mettre l'accent sur la compréhension des réponses biochimiques des organismes relatives aux stress abiotiques et biotiques de leur environnement, de l'écotoxicologie et de l'évaluation des risques, qui implique généralement des tests de toxicité dans un environnement de laboratoire contrôlé. Les études métabolomiques permettent donc de sonder les interactions organismes-environnement dans le but de caractériser la fonction de l'organisme au niveau moléculaire et/ou d'informer sur la « santé de l'environnement ».

Basée sur l'utilisation d'un couplage NanoLC-HRMS, cette étude avait pour objectif premier de mettre en évidence l'applicabilité et la pertinence d'une telle plateforme analytique pour la réalisation d'études métabolomiques appliquées au domaine de l'environnement. A partir de l'échantillonnage disponible grâce à la mise œuvre du projet VERI (Cf. Chapitre 2), le second objectif de cette étude était centré sur l'évaluation des diversités de réponse inter-espèces et inter-approches d'exposition. Ainsi, les invertébrés aquatiques retenus pour cette étude, (*Gammarus fossarum*, *Potamopyrgus antipodarum* et *Chironomus riparius*) exposés en laboratoire et sur le terrain à des effluents de STEP, ont été analysés par NanoLC-QqToF. Cette stratégie d'analyse non-ciblée avait pour but de cartographier les organismes au niveau moléculaire. La réalisation d'un tel objectif impliquait notamment le développement de méthodes analytiques robustes, mais également la mise en œuvre d'outils statistiques permettant de traiter et d'interpréter les données acquises. La première partie de ce chapitre sera ainsi consacrée à la mise en place de la stratégie expérimentale, incluant la préparation d'échantillon et l'optimisation des conditions NanoLC-HRMS. La seconde partie de ce chapitre sera, quant à elle, dédiée à la stratégie de traitement des données obtenues sur une plateforme hybride NanoLC-NanoESI-QqToF. Une attention toute particulière sera portée sur la nécessité d'adapter les outils de traitement de données, l'importance de la qualité des données et la complexité inhérente aux études de matrices biotiques. Le travail présenté ci-dessous ouvrira donc une discussion sur le choix des méthodes statistiques et les différentes stratégies de validation des résultats permettant de sélectionner les signaux discriminants (potentiels biomarqueurs) et/ou de classer les échantillons selon leur origine, nature, conditions d'exposition... Bien que l'objectif de cette étude soit principalement axé sur l'obtention d'empreintes et sur le profilage des échantillons, une stratégie d'identification des potentiels biomarqueurs mises en évidence par le traitement statistique des données sera détaillée.

Partie A : Optimisation des conditions expérimentales

Les études métabolomiques sont des approches globales qui étudient l'ensemble des métabolites. L'objectif est de mettre en évidence des centaines voire des milliers de composés ayant des propriétés physico-chimiques très variées et des gammes de concentration très différentes. Par conséquent, le choix des conditions expérimentales doit permettre:

- La mise en évidence du plus grand nombre de signaux possible
- L'obtention d'empreintes moléculaires répétables en termes de temps de rétention (t_r), mesure de la masse exacte monoisotopique (m/z) et intensité.

Outre la qualité des empreintes moléculaires, les conditions expérimentales ont une incidence sur la durée de l'analyse et donc sur le nombre d'échantillons pouvant être analysés. Un compromis s'impose alors entre la qualité des empreintes et la durée de l'analyse, notamment dans le cas de cohortes d'échantillons importantes.

Ainsi, le choix des conditions de détection, des conditions chromatographiques et la préparation des échantillons seront discutés dans les paragraphes suivants.

1. Conditions de détection

Les conditions de détection optimisées lors de ces travaux concernent principalement les paramètres d'ionisation, à savoir : la température de désolvatation ($^{\circ}\text{C}$) et le débit de gaz de nébulisation (L/h). Les empreintes moléculaires obtenues montrent que le nombre de signaux détectés varie proportionnellement avec la température. Contrairement aux sources ESI classiques pour lesquelles le débit du gaz de désolvatation peut affecter la stabilité du signal, l'ionisation des composés réalisée avec la source NanoESI CaptiveSpray[®] n'est pas impactée par ce phénomène. Ceci est dû à la géométrie de la source, pour laquelle le gaz de nébulisation n'est pas en contact direct avec l'échantillon. Celui-ci est en effet dirigé autour de la chambre de nébulisation, il est donc uniquement utilisé pour homogénéiser la température de la source. Une faible valeur de 4 L/h (contre 500 L/h utilisé en ESI classique) a été choisie pour le gaz de désolvatation et la température a été fixée à 180 $^{\circ}\text{C}$.

Contrairement à la source NanoESI utilisée pour les analyses de type ciblé, la position de l'aiguille de spray ne peut être pas ajustée dans le cas de la CaptiveSpray. Celui-ci est placé face à l'orifice d'entrée dans le spectromètre de masse.

Les paramètres de transfert propres à la détection par temps de vol n'ont pas été optimisés dans le cadre de ces travaux. Nous avons fait le choix d'utiliser une méthode fournie par le constructeur et permettant la détection d'une gamme de masse comprise entre 50 et 1000 Da. Notons cependant qu'une méthode adaptée à la détection d'une faible gamme de masse (50-500 Da) a été optimisée par infusion d'un cluster de formate de sodium. Un temps de transfert plus élevé donne une limite supérieure plus élevée de masse transférée alors qu'une faible valeur de « Pre Pulse Storage Time » permet de réduire la limite inférieure de masse transférée.

2. Conditions chromatographiques

2.1. Séparation nanochromatographique

Peu d'études métabolomiques ont été réalisées par nanochromatographie liquide (David *et al.*, 2014). Par conséquent le choix des conditions chromatographiques a été réalisé par rapport à une étude bibliographique relative aux méthodes d'analyse non ciblées appliquées au domaine de l'environnement et effectuées sur des plateformes de type HPLC-MS (Toyo'oka *et al.*, 2008; Viant et Sommer, 2013). Dans le cadre des approches globales, la littérature montre que le choix des paramètres chromatographiques est généralement fait par comparaison visuelle des différents chromatogrammes obtenus, ou bien sur la base du nombre de signaux détectés. En métabolomique, la qualité de la séparation est difficile à évaluer, le nombre de composés étant très important. Il semble également nécessaire de souligner que les conditions chromatographiques affecteront différemment l'élution des composés (rétention, résolution, largeur de pic...) en fonction de leurs propriétés physicochimiques. Enfin, notons que le nombre de signaux détectés n'est pas toujours synonyme du nombre de composés mis en évidence. Les signaux détectés peuvent en effet correspondre à des fragments, des adduits ou bien à du bruit expérimental.

La majorité des études métabolomiques sont développées sur des colonnes chromatographiques de type phase inverse C18, capables de retenir des composés moyennement polaires à apolaires. Des phases stationnaires possédant des mécanismes de rétention différents et visant à séparer des composés polaires à très polaires peuvent également être rencontrées (mécanisme d'interaction hydrophile (HILIC), mécanismes d'interaction de type zwitterionique...), mais leur utilisation reste plus restreinte.

La littérature met également en évidence une très grande variabilité des conditions chromatographiques utilisées. Pour une même colonne, certains paramètres tels que la pente du gradient peuvent varier de façon significative. Le débit de phase mobile est également très variable, même si celui-ci est avant tout dépendant de l'appareillage utilisé et de la géométrie de la colonne. Par conséquent, le choix des conditions chromatographiques semble surtout fonction des objectifs fixés lors de l'étude métabolomique. Les phases mobiles utilisées sont cependant moins disparates d'une étude à une autre. On rencontre le plus souvent des phases composées d'eau, de méthanol et d'acétonitrile, auxquelles des additifs sont couramment ajoutés pour favoriser la détection (acide formique, acide acétique, sels d'ammonium...).

Le gradient choisi dans le cadre de cette étude (temps de gradient de 70 min pour une colonne de longueur 15 cm) est un compromis entre le pouvoir séparatif et la durée raisonnable d'une analyse. Il permet l'obtention d'empreintes moléculaires répétables en termes de temps de rétention et intensité (Figure 91).

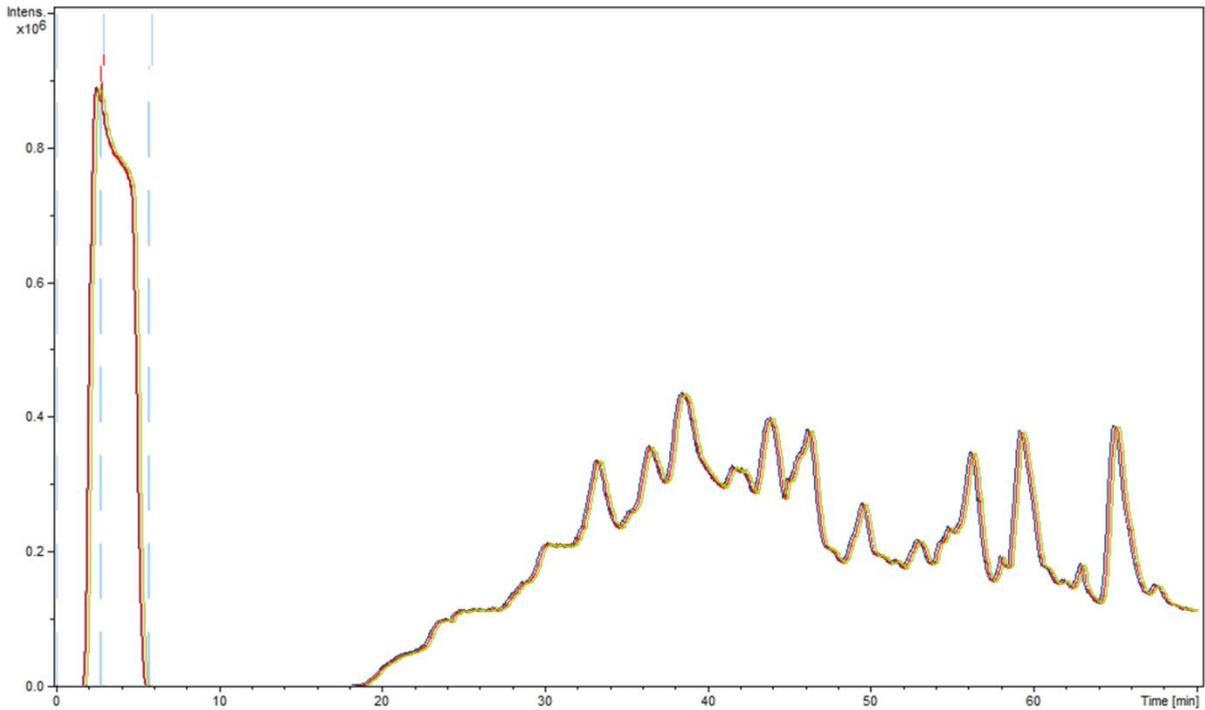


Figure 91: Total Ion chromatogram (TIC) de 3 échantillons de chironomes témoins

On note en effet une très bonne superposition des chromatogrammes obtenus pour trois injections d'extraits de chironomes témoins (organismes issus de l'élevage en laboratoire), le coefficient de variation étant inférieur à 1% sur le temps de rétention pour 6 signaux choisis au hasard sur toute la durée de l'analyse (Table 74).

		m/z (Da)	Temps de rétention (min)	Variation du temps de rétention (CV %)
Signal 1	Echantillon 1	415,2667	24,3	0,4
	Echantillon 2	415,2662	24,1	
	Echantillon 3	415,2665	24,2	
Signal 2	Echantillon 1	119,0856	33,4	0,5
	Echantillon 2	119,0852	33,2	
	Echantillon 3	119,0859	33,5	
Signal 3	Echantillon 1	661,4847	39,3	0,4
	Echantillon 2	661,4842	39,5	
	Echantillon 3	661,4840	39,2	
Signal 4	Echantillon 1	542,3192	49,6	0,3
	Echantillon 2	542,3197	49,5	
	Echantillon 3	542,3194	49,3	
Signal 5	Echantillon 1	256,2614	59,4	0,3
	Echantillon 2	256,2612	59,2	
	Echantillon 3	256,2610	59,1	
Signal 6	Echantillon 1	338,3393	65,1	0,3
	Echantillon 2	338,3399	65,2	
	Echantillon 3	338,3392	65,5	

Table 74: Répétabilité des temps de rétention pour 6 signaux choisis au hasard sur la durée de l'analyse

2.2. Condition de pré-concentration en ligne

La mise en œuvre de méthodologies analytiques de type ciblé décrites dans le chapitre 3 de ce manuscrit a permis d'obtenir des informations précieuses quant à l'influence de certains paramètres sur l'efficacité de la pré-concentration en ligne. Ainsi, la force éluante du solvant de chargement, celle du solvant d'injection, ainsi que le temps de chargement se sont avérés particulièrement importants dans le processus de piégeage des composés sur la cartouche de chargement. Tout comme dans le cas de l'optimisation de la séparation chromatographique, l'optimisation des conditions de pré-concentration en ligne a été effectuée de manière à obtenir des empreintes moléculaires répétables et de façon à maximiser le nombre de signaux détectés. Dans le cas des analyses ciblées, les composés recherchés étaient globalement de nature moyennement hydrophobe à fortement hydrophobe. Par conséquent, la force éluante du solvant d'injection et du solvant de chargement devait être suffisamment importante pour faciliter la pré-concentration en ligne de tels composés, et ainsi obtenir des limites de quantification les plus faibles possibles. A l'inverse, dans le cadre des approches métabolomiques, les conditions de pré-concentration en ligne doivent être adaptées au plus grand nombre de composés et couvrir une gamme de polarité la plus large possible. Ainsi, le solvant d'injection et le solvant de chargement doivent être suffisamment éluants pour pré-concentrer les composés les plus apolaires, mais pas trop tout de même, sans quoi les composés polaires seraient directement élués dans la cartouche de chargement, engendrant ainsi une perte d'information non négligeable. De la même façon, la durée de chargement doit être optimisée. A la difficulté d'optimiser les conditions de pré-concentration en ligne s'ajoutent la complexité et la diversité des matrices retenues pour cette étude. Comme discuté dans le chapitre 3 de ce manuscrit, l'étape de pré-concentration en ligne s'avère être matrice dépendante. Or, dans le cadre des approches métabolomiques, celle-ci doit être identique d'une espèce à une autre, le but étant de comparer la réponse de trois invertébrés aquatiques. Les extraits doivent donc être analysés selon la même méthode chromatographique.

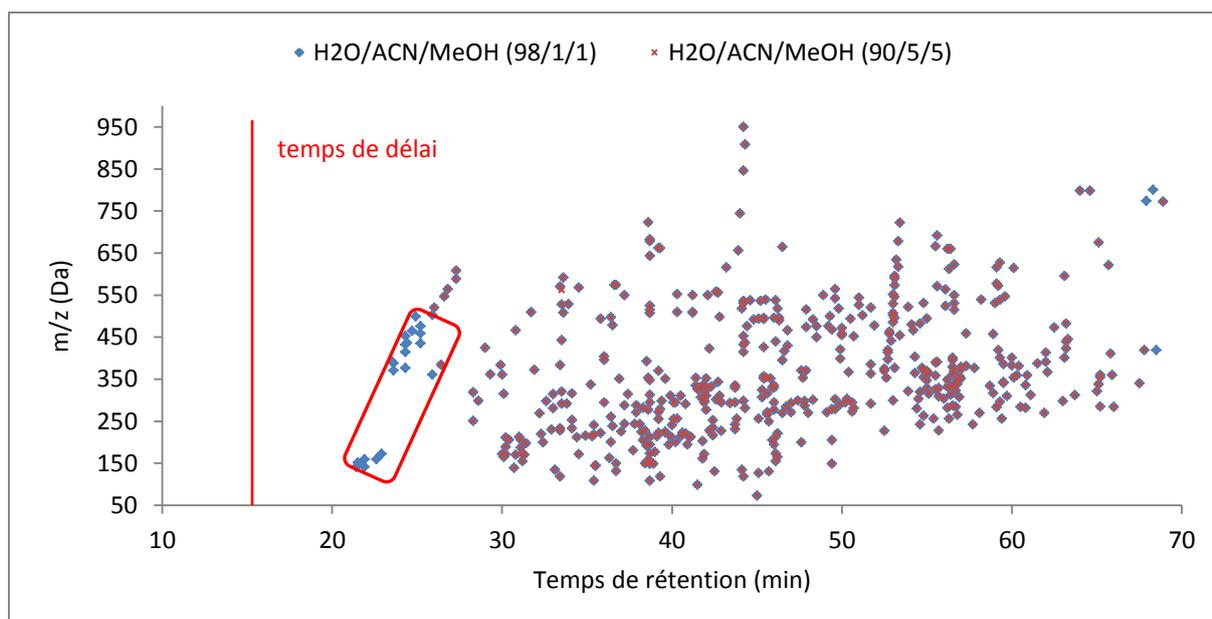


Figure 92: Cartographie des signaux détectés (m/z ;tr) en fonction de la composition du solvant de chargement chez *Gammarus fossarum*

La Figure 92 illustre l'influence de la composition du solvant de chargement sur la détection des composés présents dans un extrait de crustacé témoin. On note alors qu'en augmentant le pourcentage de solvant organique dans la phase mobile de chargement, et donc la force éluante de celle-ci, les composés les plus polaires, présentant les temps de rétention les plus faibles, ne sont plus retenus sur la cartouche de chargement et ne sont donc plus détectés (encadré rouge sur la Figure 92). Des observations similaires ont pu être faites chez le mollusque *Potamopyrgus antipodarum*. Notons également que l'utilisation d'une phase mobile de chargement riche en solvant organique entraînait la saturation de signaux correspondant à des composés de nature plus hydrophobe, engendrant une altération de la précision de mesure sur la masse exacte monoisotopique de ces composés, mais également des substances co-éluées avec ceux-ci, probablement due à l'augmentation des phénomènes de compétition d'ionisation ou de la focalisation du détecteur sur les ions les plus intenses. Il semble nécessaire de souligner que ces phénomènes, incluant la non détection des composés les plus polaires et la saturation des composés apolaires lors de l'augmentation de la force éluante du solvant de chargement, étaient nettement moins marqués chez la larve d'insecte *Chironomus riparius*. Ces observations sont donc en totale adéquation avec celles faites lors de l'optimisation de la méthode d'analyse ciblée, pour laquelle les extraits de chironomes nécessitaient un solvant de chargement plus éluant que pour les deux autres espèces. Malgré l'utilisation d'une phase mobile de chargement ne contenant que 2% en volume de solvant organique, indispensable à la pré-concentration en ligne des extraits de gastéropodes et de crustacés, les composés hydrophobes présents dans les extraits de larve d'insecte sont tout de même détectés avec un rapport signal sur bruit supérieur à 10, ce qui est suffisant pour obtenir une bonne précision en masse, ainsi qu'une définition correcte du massif isotopique, indispensable à l'annotation d'un composé.

L'optimisation du solvant d'injection a elle aussi nécessité des compromis analytiques. A l'instar de la composition du solvant de chargement, la composition du solvant d'injection présente une influence sur l'efficacité de l'étape de pré-concentration en ligne. Un solvant d'injection contenant plus de 10% en volume de solvant organique engendrait une élution des composés les plus polaires dans la cartouche de chargement et une pré-concentration trop importante des composés les plus hydrophobes, particulièrement chez *Gammarus fossarum* et *Potamopyrgus antipodarum*. Afin d'éviter les phénomènes de saturation de signal et de perte d'information liée aux composés les moins retenus, nous avons choisi d'utiliser un solvant de reprise composé d'eau, d'acétonitrile et de méthanol, en proportion 90/5/5.

Après avoir optimisé la composition du solvant d'injection et du solvant de chargement, l'influence du temps de chargement a été investiguée. Les empreintes moléculaires relatives à chacune des espèces étudiées ont été comparées pour plusieurs durées de chargement (3, 4 et 5 minutes), et ce pour chacun des modes d'ionisation (positif et négatif).

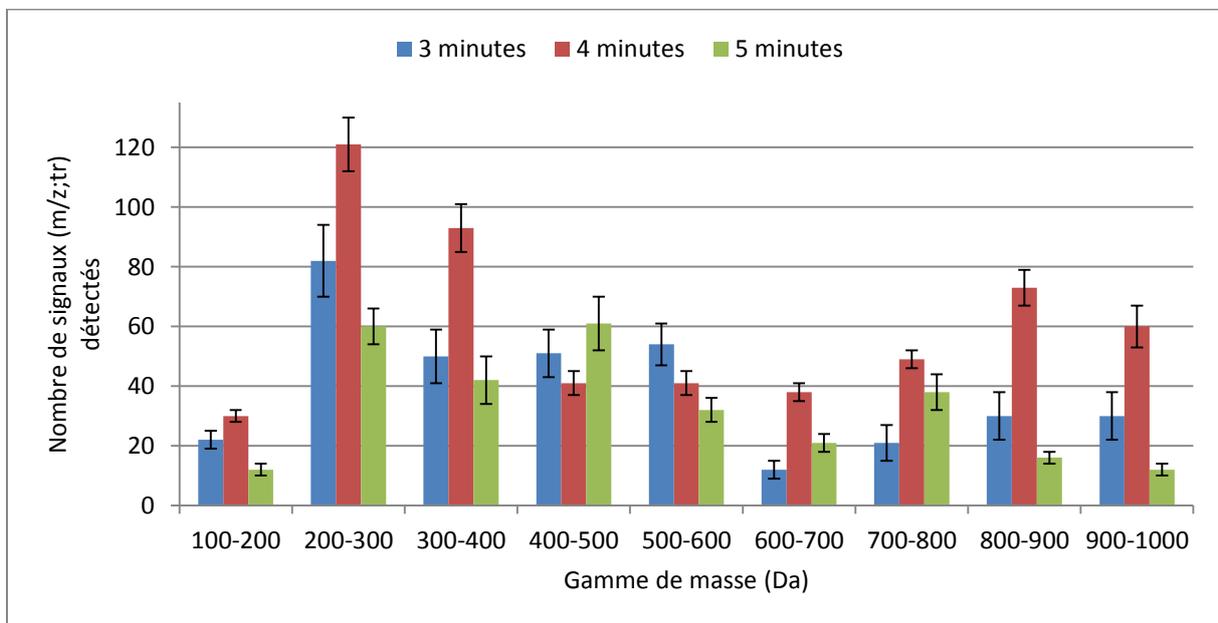


Figure 93: Impact de la durée de chargement sur le nombre de composés détectés chez *Potamopyrgus antipodarum* (mode d'ionisation ESI-)

La Figure 93 illustre le nombre de composés (m/z ; tr) détectés en fonction des différentes durées de pré-concentration testées chez le gastropode en mode d'ionisation négatif. Nous remarquons ainsi que des temps de chargement de 3 et 5 minutes entraînent une diminution du nombre de signaux détectés par rapport à une pré-concentration en ligne de 4 minutes. Cette diminution dépend de la gamme de masse considérée et varie entre 26 % (pour la gamme de 100 à 200 Da) et 80% pour la gamme de 900 à 1000 Da. Contrairement à l'optimisation des solvants de chargement et d'injection, l'optimisation de la durée de pré-concentration n'a nécessité que peu de compromis analytiques. En effet, quels que soient l'espèce considérée ou le mode d'ionisation utilisé, une durée de chargement équivalente à 4 minutes présentait toujours un nombre de signaux détectés maximal.

En conclusion, au regard des 3 matrices étudiées, pour lesquelles l'approche métabolomique aura pour but de comparer leurs signatures chimiques, et des deux modes d'ionisation utilisés (positif et négatif), la durée de pré-concentration a été fixée à 4 minutes, la composition du solvant d'injection sera la suivante : H₂O/ACN/MeOH (90/5/5). Enfin, le solvant de chargement sera, quant à lui, également composé d'eau, de méthanol et d'acétonitrile en proportion 98/1/1.

3. Comparaison des différents protocoles de préparation d'échantillon

De par son caractère plus ou moins sélectif, la préparation d'échantillon présente un impact non négligeable sur la partie du métabolome qui pourra être détectée et étudiée par la suite. De manière générale, en accord avec le caractère global des approches métabolomiques, les méthodes de préparation d'échantillon doivent être rapides et simples à mettre en œuvre. Ces protocoles doivent en effet être adaptés à l'analyse d'un nombre important d'échantillons et développés de manière à éviter ou limiter l'introduction de biais. Pour des échantillons liquides, la littérature relate le plus souvent des méthodes génériques, incluant centrifugation, précipitation, dilution ou encore filtration, qui permettent de conserver un maximum d'informations. Cependant, dans le cas d'échantillons solides tels que les matrices biotiques, la tâche s'avère plus délicate. En effet, les protocoles de préparation d'échantillons communément utilisés pour ce type d'échantillon et précédemment détaillés dans le chapitre 1 de ce manuscrit sont souvent caractérisés par une spécificité élevée. Ainsi, à moins de combiner plusieurs extractions, il n'est pas possible de conserver l'intégralité du métabolome. Cette approche par combinaison de différents protocoles de préparation d'échantillon n'a cependant pas été retenue pour cette étude, en raison d'une échantillothèque limitée.

Lors de la mise en œuvre de l'approche métabolomique, nous avons tout d'abord envisagé d'utiliser les échantillons ayant été extraits par Micro-QuEChERS, analysés selon la méthode multi-résidus, puis congelés à -20°C après analyse. Afin d'évaluer l'impact de la congélation sur la signature chimique des échantillons, nous avons décongelé les extraits témoins utilisés pour l'analyse de type ciblée et nous les avons comparés à des extraits fraîchement préparés. Les extraits qualifiés de frais correspondent à des échantillons d'organismes témoins restant de l'étude relative au projet VERI, extraits selon le protocole Micro-QuEChERS détaillé dans le chapitre 3 de ce manuscrit puis directement analysés par NanoLC-HRMS (sans cycle de congélation/décongélation).

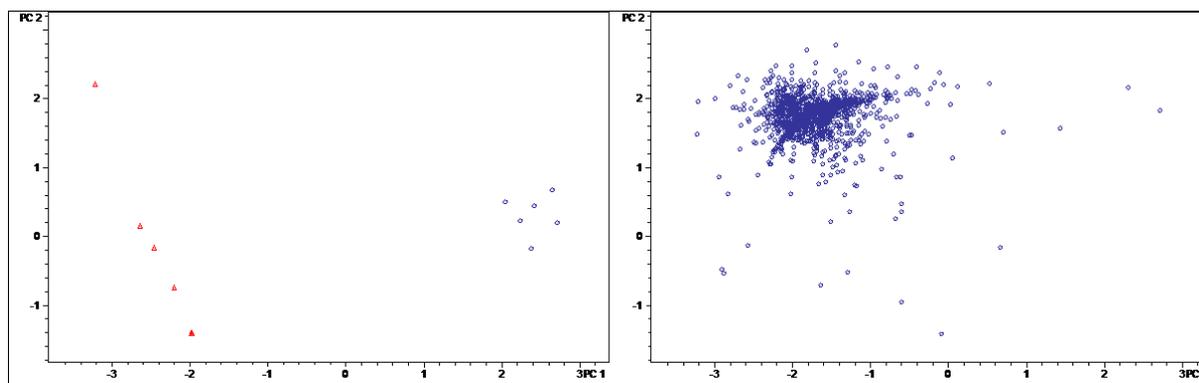


Figure 94: Analyse en Composantes principales (ACP) : impact de la congélation et du traitement de l'échantillon (à gauche scores plot ; à droite loadings plot) (rond : échantillons frais ; triangle : échantillons décongelés) (PC1: 53,2% et PC2: 15%)

Malgré l'aspect similaire des chromatogrammes obtenus pour chaque protocole (avec ou sans congélation), l'ACP représentée sur la Figure 94 met en évidence l'impact du cycle de congélation/décongélation sur les empreintes métaboliques obtenues. Les échantillons sont en effet regroupés selon le protocole de préparation de l'échantillon ce qui indique un impact significatif de l'étape de congélation. Au regard de ces observations et de façon à ne pas biaiser les résultats de l'approche métabolomique, nous avons fait le choix de ne pas utiliser les extraits congelés, mais de réaliser de nouvelles extractions à partir des organismes restant des expositions effectuées dans le cadre du projet VERI.

Les invertébrés aquatiques ont ainsi été extraits selon le protocole Micro-QuEChERS détaillé dans le chapitre 3 de ce manuscrit. Cette méthodologie inclut une étape de purification par un tiers solvant : l'hexane. Dans le cadre de cette approche métabolomique, il a été décidé de conserver à la fois la phase extractante composée d'acétonitrile, mais également la troisième phase constituée d'hexane. Celle-ci a été récupérée, évaporée à sec sous flux d'azote puis reconstituée avant injection sur la plateforme NanoLC-HRMS. Ces expérimentations avaient pour but d'évaluer si la phase hexanoïque pouvait contenir une partie du métabolome qui ne serait pas accessible par simple injection de la phase acétonitrile. A titre d'exemple, pour l'espèce *Potamopyrgus antipodarum* en mode d'ionisation négatif, 429 signaux caractérisés par leur couple (m/z ; tr) ont été détectés dans la phase hexanoïque contre 1256 dans la phase acétonitrile. Il semble cependant nécessaire de souligner que la majorité des composés (92%) présents dans la phase hexanoïque ont également été détectés dans la phase acétonitrile. Ces signaux majoritairement annotés comme étant des acides gras ou des phospholipides présentent cependant des profils d'intensité différents suivant qu'ils soient détectés dans la phase hexane ou dans la phase acétonitrile. Bien que globalement leur intensité soit plus importante dans la phase hexanoïque, ils sont tout de même détectés avec un rapport signal sur bruit supérieur à 10 dans la phase acétonitrile, ce qui nous permet d'obtenir une précision suffisante sur la mesure de la masse exacte monoisotopique, ainsi qu'une bonne définition du profil isotopique.

Au regard du peu d'informations supplémentaires que nous apporterait l'analyse de la phase hexanoïque et de la consommation de temps qu'engendrerait la réalisation d'une double injection par échantillon, il a été décidé de réaliser l'approche métabolomique par unique injection de la phase acétonitrile.

Lors de l'approche ciblée, 400 μL de la phase acétonitrile étaient récupérés, évaporés à sec sous flux d'azote, puis reconstitués dans 60 μL de solvant d'injection. Ce protocole met ainsi en jeu un facteur de concentration de l'échantillon trop important pour l'analyse globale, engendrant des phénomènes de saturation du détecteur pour de nombreux signaux. Par conséquent, nous avons envisagé de modifier le volume de reprise. Nous avons donc reconstitué les extraits dans différents volumes de solvant de reprise compris entre 100 et 400 μL . Nous avons ainsi constaté qu'un volume de 100 μL ne permettait pas de s'affranchir des phénomènes de saturation, particulièrement importants en mode

d'ionisation négatif. A l'inverse, lorsque l'échantillon était reconstitué dans 300 ou 400 μL de solvant d'injection, une décroissance du nombre de signaux détectés a été observée, et ce quelle que soit l'espèce investiguée ou bien le mode d'ionisation utilisé. Par conséquent, il a été décidé de reconstituer l'échantillon dans 200 μL de solvant d'injection, qui s'avérait être le meilleur compromis analytique. Notons cependant que dans le cas du crustacé *Gammarus fossarum*, en mode d'ionisation négatif, certains signaux correspondant à des ratios masse sur charge (m/z) équivalent à 283,2632 Da et 255,2319 Da et respectivement annotés grâce à la base de données HMDB comme étant potentiellement l'acide stéarique et l'acide palmitique, présentaient toujours des phénomènes de saturation, engendrant ainsi une inhibition de signal des composés possédant des temps de rétention proche de ceux de ces deux substances. Seul un facteur de dilution de l'échantillon de 50 permettait de s'affranchir de la saturation de signal. Cependant, avec une telle dilution de l'extrait, seulement 30% des composés initialement détectés dans la phase acétonitrile étaient alors détectés dans l'échantillon dilué. Les deux acides gras responsables des phénomènes de saturation possédant des temps de rétention supérieures à 45 minutes, il a été décidé de réaliser une double injection des extraits de crustacé, l'une correspondant à l'échantillon reconstitué dans 200 μL de solvant d'injection et la seconde correspondant à une dilution par 50 de l'extrait précédemment mentionné. Ainsi, seule l'information contenue dans la première partie des chromatogrammes (temps de rétention inférieurs à 45 minutes) issus de la première injection sera extraite, alors que la seconde partie de l'information (temps de rétention supérieurs à 45 minutes) sera extraite de la seconde analyse. Les résultats seront ainsi concaténés afin de réaliser le traitement statistique des données.

4. Empreintes moléculaires obtenues dans les conditions optimales

L'optimisation des conditions analytiques a permis d'établir une stratégie d'analyse globale d'échantillons biotiques complexes. Dans la dimension m/z , une résolution moyenne de 7000 est atteinte, ce qui correspond à une différence de 0,05 Da pour une masse à 350 Da. Au regard de la complexité des spectres et des chromatogrammes obtenus, une étude détaillée et minutieuse de la matrice a été réalisée, et sera présentée dans les paragraphes suivants. Il s'agit d'une indication sur le type d'information contenue dans les données acquises. La distribution des signaux détectés en fonction du temps de rétention et de la gamme de masse sera ainsi examinée.

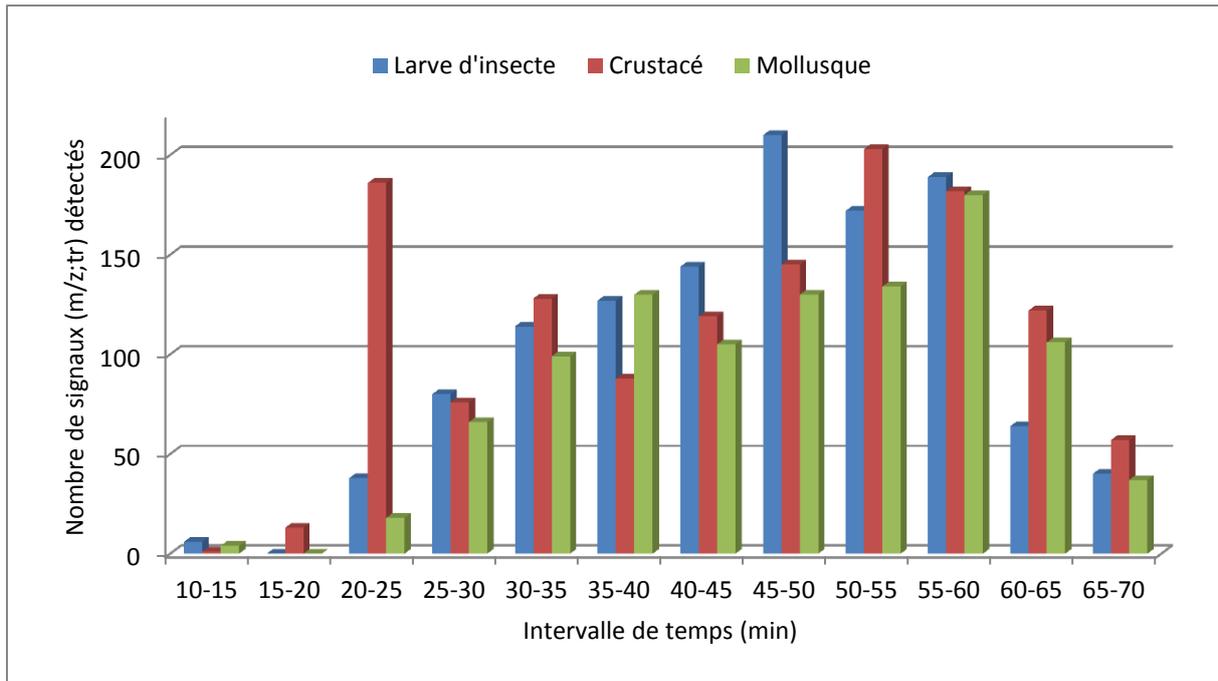


Figure 95: Etude des trois matrices investiguées : nombre de signaux détectés en fonction du temps de rétention

La représentation graphique du nombre de signaux détectés en fonction du temps de rétention (Figure 95) permet de mettre en évidence plusieurs régions chromatographiques. Il semble tout d'abord nécessaire de préciser qu'avec la configuration du couplage NanoLC-HRMS mise en œuvre dans le cadre de ces approches métabolomiques, le temps de délai est équivalent à 10 minutes. La première région chromatographique est comprise entre 10 et 30 minutes et correspond à des composés polaires à modérément polaires. Ceux-ci sont globalement peu nombreux, ce qui peut s'expliquer par la stratégie de pré-concentration en ligne utilisée lors de ces travaux, dont la phase stationnaire de la cartouche de chargement ne permet pas de retenir les composés les plus hydrophiles. Notons cependant que pour l'espèce *Gammarus fossarum*, l'intervalle de temps compris entre 20 et 25 minutes présente un nombre de signaux détectés bien plus important que pour les deux autres organismes étudiés, ce qui n'aurait pas été visible sans l'optimisation de l'étape de pré-concentration en ligne. La seconde région chromatographique s'étend de 30 à 50 minutes et correspond à des composés moyennement polaires à faiblement polaires. Elle comprend environ 50% de la totalité des signaux détectés, et ce quelle que soit l'espèce étudiée. Enfin la troisième et dernière région chromatographique, comprise entre 50 et 70 minutes correspond à des composés apolaires à fortement apolaires. Il est possible de souligner, qu'à l'exception de la zone comprise entre 20 et 25 minutes précédemment mentionnée, la distribution des signaux détectés en fonction du temps de rétention est relativement similaire pour les trois matrices étudiées.

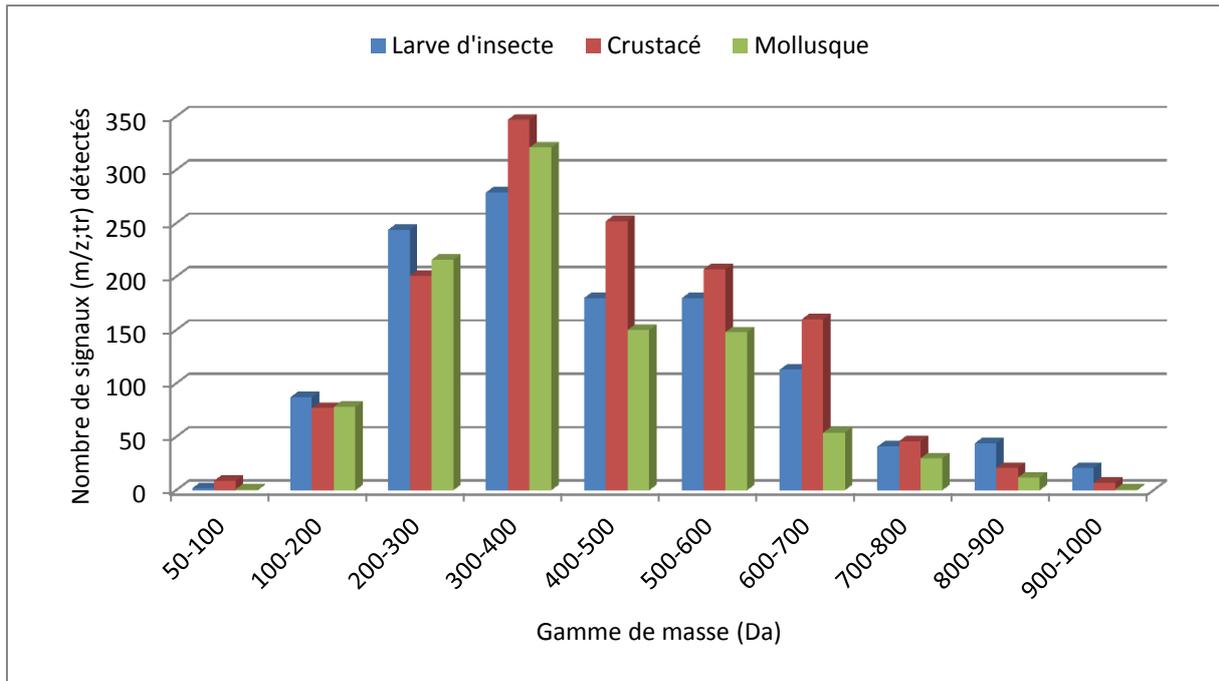


Figure 96: Etude des trois matrices investiguées : nombre de signaux détectés en fonction la gamme de masse

La Figure 96 illustre le nombre de signaux détectés en fonction de la gamme de masse. Nous remarquons ainsi que la majorité des composés se situent entre 200 et 600 Da et que les valeurs m/z élevées sont moins représentées. Si la distribution des signaux en fonction de la gamme de masse est similaire d'une espèce à une autre, il semble toutefois important de mentionner que le nombre de données répertorié sur ce graphique ne correspond pas nécessairement au nombre de substances détectées. En effet, les données brutes contiennent également des adduits, des fragments ou bien du bruit expérimental.

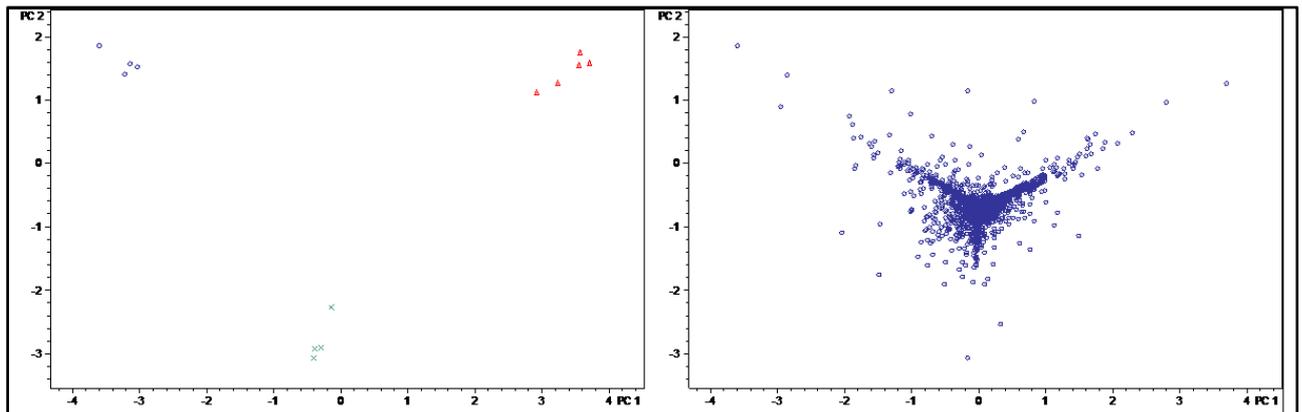


Figure 97: Représentation des échantillons témoins de crustacé (triangles rouges), de larve d'insecte (croix vertes) et de mollusque (ronds bleus) sur le score-plot (à gauche) et le loading-plot (à droite) issus de l'analyse en composantes principales (PC1 : 40% et PC2 : 23,1%)

Malgré la similitude des distributions des signaux détectés, tant en fonction des temps de rétention que de la gamme de masse, l'Analyse en Composantes Principales représentée sur la Figure 97 permet de mettre en évidence la diversité des matrices étudiées.

Partie B : Analyses des données métabolomiques

Les approches métabolomiques conduisent à des empreintes moléculaires très riches en information biologique et qui s'avèrent être d'une très grande valeur scientifique. Ces données sont extrêmement complexes aussi bien d'un point de vue biologique qu'analytique. Elles sont le résultat de toute modification souhaitée ou accidentelle subie par l'échantillon (réactions biochimiques naturelles ou induites par un facteur de stress, impact des conditions de stockage et de manipulation), mais également de tous les changements subis pendant l'acquisition et le traitement des données. Le traitement des données s'affiche ainsi comme une étape cruciale permettant une interprétation la plus juste possible des données.

Le travail présenté ci-dessous a pour objectif de détailler la stratégie de traitement des données obtenues sur une plateforme hybride NanoLC-HRMS et porte notre attention sur la nécessité d'adapter les outils de traitement statistique. Les données obtenues ont été décrites et analysées au moyen de méthodes mathématiques dans le but de classifier les échantillons selon leur provenance et de sélectionner les métabolites discriminants. L'interprétation des données métabolomiques doit ainsi permettre de mettre en évidence la signature métabolique induite par l'exposition aux rejets de STEP pour chacun des invertébrés aquatiques étudiés, en fonction des différentes conditions d'expositions (*in situ* et *ex situ*).

1. Prétraitement des données

L'étape de prétraitement des données brutes présente un impact très important sur la qualité des données. Ce sous chapitre a pour objectif d'illustrer par des exemples concrets les étapes principales du prétraitement des données, à savoir la calibration des spectres, le bucketing et l'alignement des spectres et des chromatogrammes.

1.1. Calibration des valeurs m/z enregistrées

La calibration des spectres est la première étape de transformation des données brutes. La calibration permet de corriger les éventuelles déviations survenues au cours de la mesure. La fréquence et le type de calibration dépendent de la technique utilisée, mais également de la stabilité de l'environnement de travail et notamment des changements de température qui engendre la dilatation du tube de vol et affecte la partie électronique du spectre de masse.

Il existe deux principaux types de calibration : la calibration externe et la calibration interne. La calibration externe est généralement effectuée de manière régulière, avant chaque séquence d'acquisition. A l'inverse, la calibration interne est réalisée après l'acquisition des données. Elle est utilisée pour augmenter la précision de la mesure et corrige les valeurs m/z par rapport à une liste de composés de référence présents dans chaque échantillon. On note également l'existence d'un autre type de calibration : la calibration externe proche. Celle-ci est effectuée par infusion d'un cluster au début de chaque analyse constituant une série de mesure. Bien que cette approche soit fastidieuse, car chaque spectre doit être calibré individuellement, elle reste néanmoins très adaptée aux

approches métabolomiques qui nécessitent l'analyse de longues séquences d'échantillons. En effet, celle-ci tient compte des variations imprévisibles qui pourraient avoir lieu au cours de la série d'acquisition.

L'efficacité de la calibration dépend de la gamme de masse choisie, du nombre de valeurs de référence et de la courbe de calibration. Loin d'être anodine, cette première étape impacte très fortement l'étape d'alignement des spectres et l'annotation des composés. Dans notre cas, la calibration des spectres a été effectuée à partir d'une solution de formiate de sodium contenant une distribution de masses comprises entre 100 et 1000 Da également appelées clusters. Afin d'évaluer l'efficacité de la stratégie de calibration mise en œuvre dans le cadre de ces travaux, les écarts par rapport à la masse monoisotopique exacte après calibration pour chaque cluster ont été calculés. Les résultats sont présentés dans la Table 75.

Clusters de formiate de sodium	Valeur de référence (Da)	Différence par rapport à la valeur de référence (ppm)
HCOO(NaCOOH) ₁	112,9856	0,6
HCOO(NaCOOH) ₂	180,9730	1,2
HCOO(NaCOOH) ₃	248,9604	0,9
HCOO(NaCOOH) ₄	316,9478	0,4
HCOO(NaCOOH) ₅	384,9553	0,5
HCOO(NaCOOH) ₆	452,9227	0,8
HCOO(NaCOOH) ₇	520,9101	1,3
HCOO(NaCOOH) ₈	588,8975	0,9
HCOO(NaCOOH) ₉	656,8850	1,8
HCOO(NaCOOH) ₁₀	724,8724	1,9
HCOO(NaCOOH) ₁₁	792,8598	0,9
HCOO(NaCOOH) ₁₂	860,8472	0,7
HCOO(NaCOOH) ₁₃	928,8347	1,6

Table 75: Efficacité de la calibration externe proche

La calibration externe proche conduit à des erreurs inférieures à 2 ppm et semble corriger d'avantage les valeurs inférieures à 500 Da.

1.2. Bucketing et alignement des signaux

L'étape dite de « bucketing » est indispensable à la réalisation d'analyses statistiques. Elle permet la création d'une matrice de données et a pour objectif de compresser les données en regroupant les pics ayant le même rapport m/z et le même temps de rétention à des valeurs de tolérance près qui doivent être fixées par l'opérateur. De façon schématique, le bucketing permet de découper les deux dimensions qui définissent les données (la dimension spectrale m/z et la dimension temporelle) en tranches d'une certaine taille appelées « buckets ».

La taille des buckets est fonction des caractéristiques spectrales et chromatographiques telles que la résolution des pics m/z, la largeur des pics chromatographiques ou encore de la dérive attendue dans les deux dimensions. La tolérance sur la valeur de m/z et la tolérance sur le temps de rétention jouent considérablement sur le nombre de signaux détectés et retenus pour l'analyse statistique. Un

bucket trop grand engendre alors une perte d'information car il correspond à plusieurs pics. En revanche, un bucket trop petit augmente la taille des fichiers et donc le temps de traitement des données, mais il peut également biaiser l'analyse statistique puisqu'un seul pic sera dispersé dans plusieurs buckets.

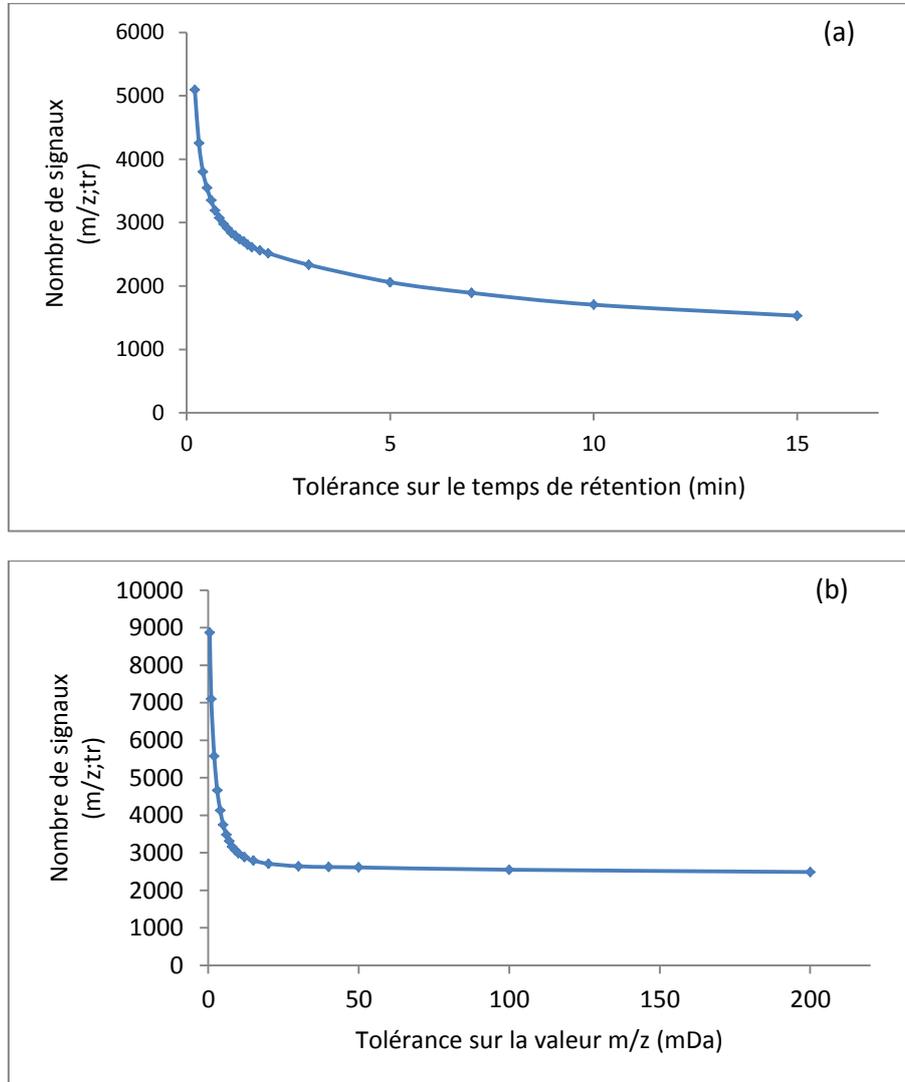


Figure 98: Evolution du nombre de signaux avec la tolérance sur le temps de rétention (a) et avec la tolérance sur la masse (b) lors de la formation de buckets

Ainsi, pour des tolérances sur le rapport m/z comprises entre 0,5 et 7 mDa, les variations relatives au nombre de signaux présents dans la matrice de données sont très importantes, indiquant ainsi une modification considérable des données brutes (Figure 98 (a)). On note en effet une réduction de la matrice de données d'environ 5000 signaux. De la même manière, le passage d'une tolérance de 0,2 à 1 minutes diminue le nombre de signaux d'environ 40% (Figure 98 (b)).

Afin d'estimer la taille du bucket dans la direction chromatographique, la répétabilité du temps de rétention et la largeur des pics ont été évaluées grâce à l'analyse de cinq composés communs à tous les échantillons et distribués sur toute la durée de la séparation chromatographique.

m/z (Da)	tr moyen (min)	Δtr (min)	Largeur du pic
------------	----------------	-------------------	----------------

			moyenne (min)
432,2759	23,3	0,1	0,9
150,0905	36,5	0,1	1,2
330,2606	46,0	0,2	1,1
496,3346	53,3	0,1	1,0
284.2920	65,9	0,2	1,3

Table 76: Evaluation des caractéristiques chromatographiques sur 5 signaux représentatifs (n=5)

Bien que les résultats présentés dans la Table 76 indiquent une très bonne répétabilité au niveau des temps de rétention, ils mettent également en évidence l'importante largeur des pics chromatographiques, très différente de celle couramment rencontrée en HPLC. Ainsi, lors de la génération des buckets, ce paramètre doit impérativement être pris en compte de manière à ce qu'un pic ne se retrouve pas scindé dans plusieurs buckets, ce qui affecterait le résultat des analyses statistiques. Notons cependant que le comportement chromatographique d'un nombre important de composés est difficilement prévisible en raison de la présence d'interférents et de la diversité des propriétés physico-chimiques des substances présentes dans l'échantillon (constante acido-basique, polarité, gamme de concentration). Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser une tolérance sur le temps de rétention de 1,6 minute, légèrement plus large que la largeur des pics chromatographiques mentionnés ci-dessus.

En ce qui concerne la taille du bucket dans la direction spectrale, nous avons fait le choix de nous positionner dans la partie linéaire de la courbe présentée sur la Figure 98(b). Nous avons ainsi choisi une valeur de Δm équivalente à 10 mDa, une valeur plus importante pourrait induire la fusion de plusieurs pics correspondant à des composés dont la masse monoisotopique est proche et qui seraient co-élus.

2. Traitement des données

2.1. Evaluation de la qualité des données à partir des échantillons QC

L'évaluation des échantillons QC constitue la première étape du traitement mathématique et statistique des données. Elle a pour objectif de mettre en évidence les éventuelles dérives survenues aux cours de la séquence d'acquisition principalement liées à la dégradation de la séparation, à la variation des temps de rétention et à la diminution progressive de la sensibilité. Ces phénomènes sont généralement induits par la dégradation des échantillons, la dégradation de la colonne chromatographique et l'encrassement progressif de l'appareillage. Ces effets peuvent affecter sérieusement les résultats issus du traitement statistique, conduisant à une mauvaise interprétation des résultats. Il est donc essentiel de mettre en évidence de tels effets et de repérer toute les variables (m/z ; t_r) qui leur sont associées.

La reproductibilité des analyses est tout d'abord évaluée par inspection visuelle de la superposition des chromatogrammes. L'Analyse en Composantes Principales peut également être utilisée. Dans notre cas, elle montre un groupe homogène et bien défini qui laisse à penser qu'aucun effet lié à l'ordre d'injection des échantillons n'est à recenser.

Chapitre 5 : Approches métabolomiques

Afin d'étudier de façon plus détaillée les échantillons QC, les coefficients de variation liés à l'intensité des signaux ont été calculés selon la formule :

$$CV (\%) = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}} \times 100$$

Équation 17: Calcul du coefficient de variation (CV %)

Malgré le groupe homogène formé par les échantillons QC sur l'ACP, l'évaluation des CV met en évidence des variations importantes au sein de ce groupe. La majorité des signaux détectés dans les échantillons QC présentent des CV supérieurs au seuil de 20% fixés par les normes de validation existantes pour les approches ciblées. En effet, seulement 29% des signaux détectés dans les échantillons QC ont des CV inférieures à 20% et 57% des CV inférieures à 35%. Il est également possible d'observer que la distribution de ces coefficients de variation est indépendante du rapport m/z et du temps de rétention. Ils sont en effet répartis sur l'ensemble de la gamme de masse et sur toute la durée du gradient chromatographique. Il convient de noter que la majorité des signaux présentant des coefficients de variation élevés (supérieurs à 35%) ont des intensités très faibles (inférieures à 1% de l'intensité maximale enregistrée), et ne sont de ce fait pas détectés dans l'ensemble des échantillons QC. Ces résultats pourraient notamment s'expliquer par l'absence de valeur d'intensité en raison de l'ionisation difficile et aléatoire de certains composés. L'importance des coefficients de variation associés à ces signaux n'est donc pas surprenante, puisque tout comme dans le cas des analyses de type ciblé, la répétabilité des signaux proche des limites de détection est souvent médiocre. Ainsi, afin d'examiner la qualité des QC sans être induit en erreur par la présence de ces signaux très faibles en intensité, nous avons décidé d'implémenter un filtre basé sur les rapports signal sur bruit. Le seuil a été fixé à 10. Après élimination des signaux dont les rapports signal sur bruit sont inférieurs à 10, on note que 65% des signaux restant présentent des CV inférieurs à 20% et 82% des CV inférieurs à 35%. Compte tenu de ces résultats, nous pouvons confirmer qu'il n'existe aucune dérive liée à l'ordre d'injection des échantillons.

Au regard du nombre d'échantillons impliqués dans cette approche métabolomique (72), il nous était impossible d'analyser simultanément, c'est-à-dire sur une même séquence d'acquisition l'intégralité des échantillons. Bien que les séquences aient été agencées de manière à pouvoir tirer des conclusions directes, à savoir la comparaison inter-espèce pour chacune des approches d'exposition, la comparaison inter-approche d'exposition (*in situ* vs *ex situ*) ainsi que la comparaison inter-campagne d'exposition (été vs automne) s'avérait délicate sans une évaluation détaillée des échantillons QC inter-séquence. Afin de justifier la légitimité d'une telle comparaison nous avons décidé d'implémenter des cartes de contrôle pour les échantillons QC. Pour ce faire, 10 échantillons QC ont été analysés. Nous avons alors retenu 10 signaux représentatifs de ces échantillons, s'échelonnant sur toute la gamme de masse, sur toute la durée de l'analyse et possédant des rapports signal sur bruit compris entre 12 et 89. A partir des données issues de l'analyse des QC, l'intensité cible, les limites supérieures et inférieures de surveillance (LSS, LIS) et les limites supérieures et inférieures de contrôle (LSC, LIC), correspondant à la moyenne ainsi qu'à 2 et 3 écarts-types respectivement ont été déterminées. Ces cinq valeurs sont ensuite saisies dans une fiche de

suivi de la carte de contrôle. Ainsi, pour chaque séquence d'acquisition, l'intensité des signaux précédemment mentionnés et détectés dans les échantillons QC est consignée dans cette fiche de suivi. Pour qu'une fiche de suivi soit valide, il faut deux répétitions minimum par séquence d'acquisition, ce qui dans notre cas est largement respecté puisque cinq échantillons QC sont analysés pour chaque séquence d'acquisition. Les valeurs d'intensité recensées doivent osciller autour de la valeur cible et être comprises entre LSS et LIS. Une tolérance de dépassement de ces limites a cependant été autorisée, à raison de cinq valeurs maximum sur l'intégralité des QC et une seule valeur par séquence d'acquisition. Un dépassement des LSC et LIC sera cependant considéré comme réhibitoire. Un exemple de construction de carte de contrôle est présenté en annexe X.

Grâce à la mise en œuvre de ces fiches de suivi, nous avons pu noter une très bonne répétabilité inter-séquence. Seul le signal correspondant au composé possédant le plus faible rapport signal sur bruit présentait des dépassements de la LIS qui se sont toutefois avérés être inférieurs à 5 fois.

2.2. Méthode de traitement de données non-supervisée : Analyse en Composantes Principales (ACP)

Dans le cadre de ces travaux, l'Analyse en Composantes Principales a été utilisée afin d'évaluer l'impact du scaling de type Pareto et Unit Variance (UV), et d'obtenir une vue d'ensemble des données multivariées issus de l'analyse des invertébrés aquatiques. L'ACP sera interprétée en terme de « scores plots » et « loadings plots » tels qu'ils sont indiqués dans le logiciel ProfilAnalysis.

2.2.1. Evaluation des scaling de type Pareto et Unit Variance (UV)

L'étude bibliographique présentée dans le chapitre 1 de ce manuscrit nous a permis de mettre en évidence l'impact non négligeable des méthodes de mise à l'échelle de données métabolomiques, plus connues sous le nom de scaling, sur les résultats d'une Analyse en Composante Principale (Hendriks *et al.*, 2011; van den Berg *et al.*, 2006). La participation des signaux caractérisés par leur couple (m/z ; tr) à la construction des composantes principales et leur interprétation sont fortement impactées par le type de normalisation choisi par l'opérateur. La méthode de scaling étant très fortement dépendante du type de données, deux stratégies couramment utilisées lors d'études métabolomiques ont été testées : le scaling de type Pareto et le scaling Unit Variance (UV).

Dans un premier temps, il est possible de constater que sans une mise à l'échelle adaptée, seules les variables dont l'intensité est supérieure à 90% de l'intensité maximale enregistrée contribuent de façon significative à la construction des composantes principales. Par conséquent, de nombreuses informations sont négligées. En revanche, en utilisant la stratégie Pareto, des variables de faibles intensités équivalentes à environ 10% de l'intensité maximale enregistrée contribuent de manière équivalente aux signaux de plus forte intensité. Cet effet de mise à l'échelle est encore plus marqué dans le cas du scaling de type UV qui entraîne une contribution quasi équivalente pour un nombre très important de signaux. L'impact dû au choix de la méthode de scaling est de ce fait fortement visible sur les « loadings plots » de l'ACP. Si nous reprenons l'ACP ayant permis de mettre en évidence la différence de signature chimique relative à chacune des espèces considérées présentée

Chapitre 5 : Approches métabolomiques

sur la Figure 97, il est possible, en faisant varier le type de scaling, d'illustrer les propos tenus ci-dessus (Figure 99).

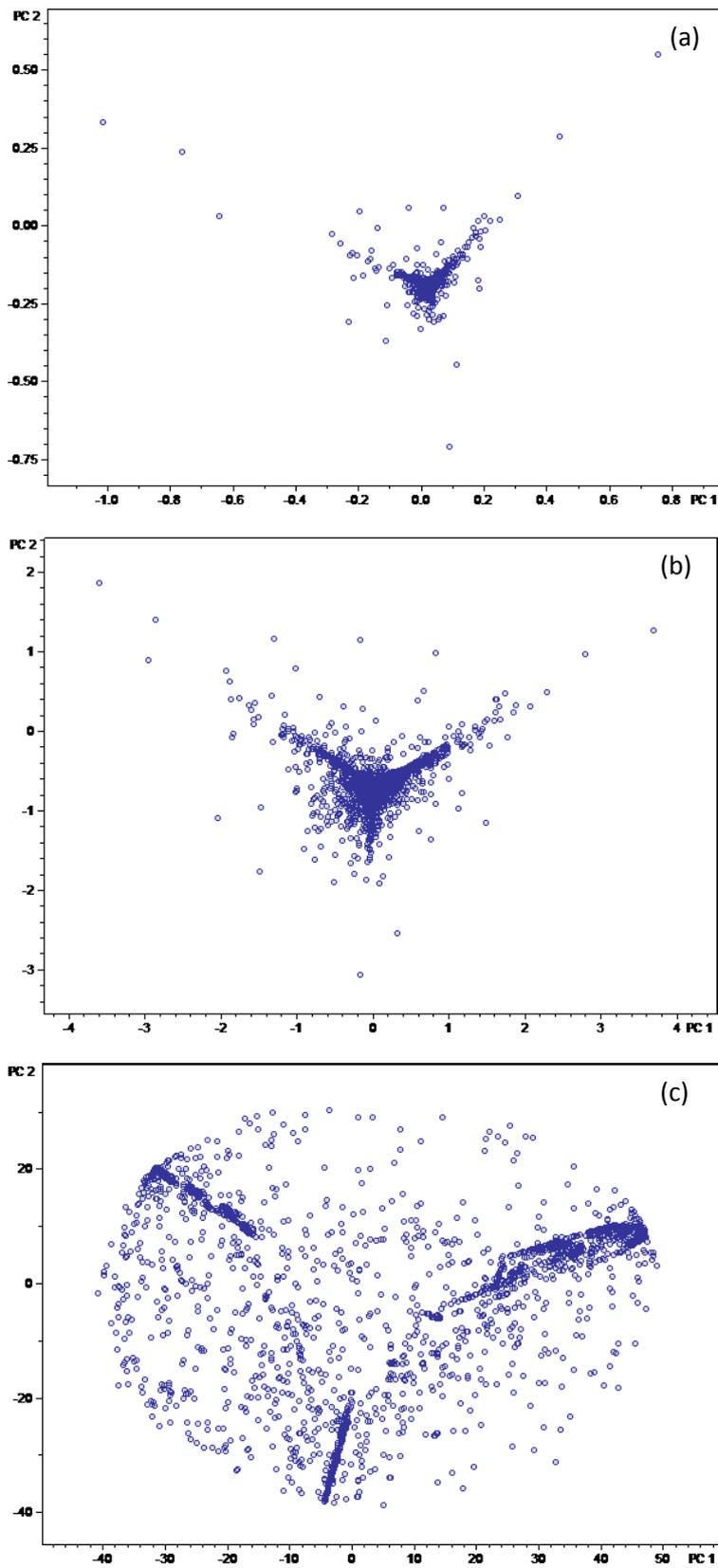


Figure 99: Loading plots issus de l'Analyse en Composantes Principales sans scaling (a), avec un scaling de type Pareto (b) et avec un scaling de type UV (c) (exemple réalisé sur les données utilisées pour la comparaison des espèces (Figure 97))

Compte tenu de ces résultats, le scaling de type Pareto a été retenu pour la suite de ces travaux. Il permet en effet une mise à l'échelle intermédiaire, tout en évitant de donner trop d'importance au bruit expérimental.

2.2.2. Application de l'Analyse en Composantes Principales aux invertébrés benthiques

Après l'application d'un scaling de type Pareto à l'ensemble des données, l'Analyse en Composantes Principales a été appliquée aux extraits d'invertébrés pour chacune des espèces considérées en fonction des différentes approches d'exposition (*ex situ* et *in situ*) et pour chacune des campagnes d'exposition.

La Figure 100 illustre les résultats obtenus pour l'espèce *Chironomus riparius* lors de la campagne d'exposition automnale.

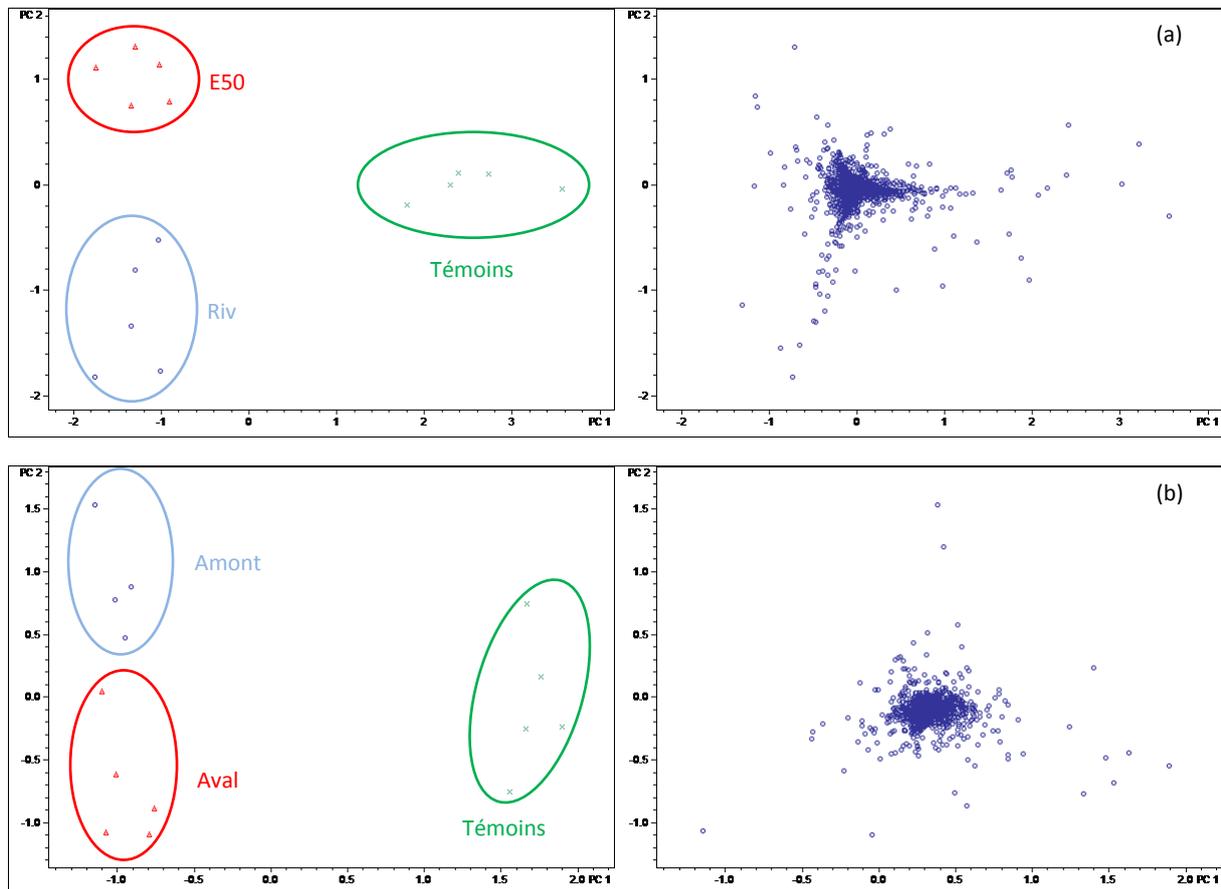


Figure 100: Analyses en Composantes Principales (à gauche scores plot ; à droite loadings plot)

(a) condition d'exposition *ex situ* (PC1: 41,1% ; PC2: 11,8%)

(b) conditions d'exposition *in situ* (PC1: 32,7% ; PC2: 15,4%)

Les score plots présentés sur la Figure 100 mettent en évidence une discrimination entre les trois groupes étudiés, et ce quelles que soit les conditions d'exposition. Les deux composantes principales

sélectionnées par le logiciel de traitement expliquent 52,9% et 48,1% de la variance totale pour les approches d'exposition *ex situ* et *in situ*, respectivement. Ces résultats semblent donc indiquer une différence de signature chimique des organismes aquatiques induite par la présence de pressions anthropiques.

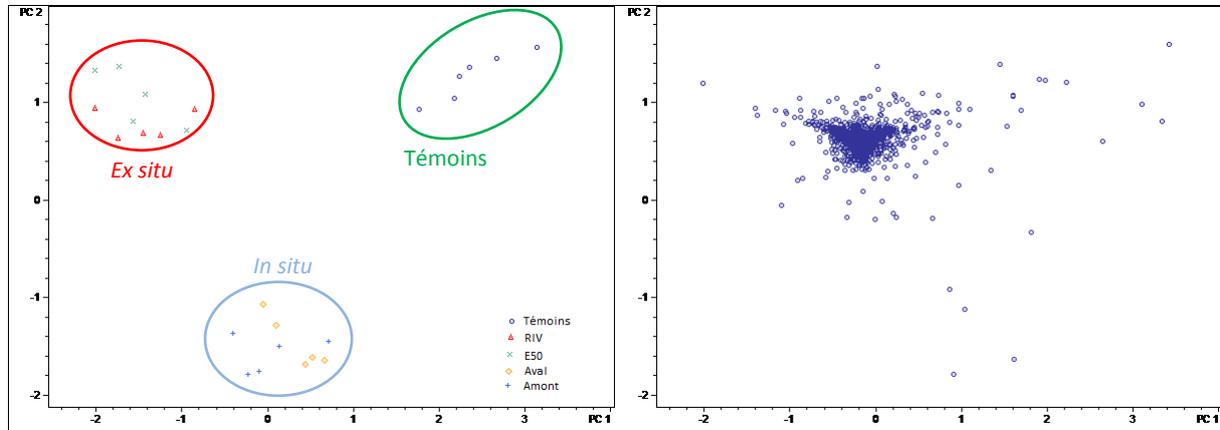


Figure 101: Analyse en Composantes Principales pour l'espèce *Chironomus riparius* lors de la campagne d'exposition automnale (à gauche scores plot ; à droite loadings plot) (PC1 : 25,7% ; PC2 : 19,1%)

L'Analyse en Composantes Principales présentée sur la Figure 101 permet de mettre en évidence une différence entre le métabolisme des organismes exposés en laboratoire et ceux engagés dans le milieu, lui-même différent de celui des organismes témoins. Bien que le milieu d'exposition des larves d'insecte engagées en amont de rejet de STEP soit identique à celui des organismes exposés en laboratoire selon la condition RIV (100% eau de rivière pompée en amont du rejet de STEP), les empreintes moléculaire obtenues sont différentes, les échantillons sont en effet séparés selon deux groupes distincts sur le score plot de l'ACP. Ces résultats semblent donc confirmer les hypothèses émises lors de l'interprétation des résultats relatifs aux analyses de type ciblé et démontrent un impact non négligeable des conditions d'exposition sur le métabolisme des larves d'insecte. Notons cependant que malgré la discrimination visible entre les organismes exposés et les organismes témoins, témoignant de l'impact de la contamination du milieu indépendamment de l'approche d'exposition, contrairement aux ACP présentées sur la Figure 100, cette dernière projection de données ne nous permet ni de mettre en évidence une différence entre les organismes exposés sur le terrain en amont de rejet de STEP et ceux engagés en aval, ni entre les invertébré exposés en laboratoire selon les conditions RIV et E50. Bien que les Composantes Principales choisies pour cette projection (PC1 et PC2) expliquent une part importante de la variance totale (44,8%), l'ACP doit être perçue comme une méthode observatoire. Ainsi, si l'on choisit un autre angle de projection, selon PC1 et PC3 par exemple, il est possible d'observer une discrimination supplémentaire entre les larves d'insecte exposées en laboratoire selon les conditions RIV et E50 selon la composante 3 (Figure 102). Bien que PC3 explique une variance plus faible que PC2, les informations contenues dans cette représentation peuvent toutefois s'avérer précieuses et ne doivent donc pas être négligées.

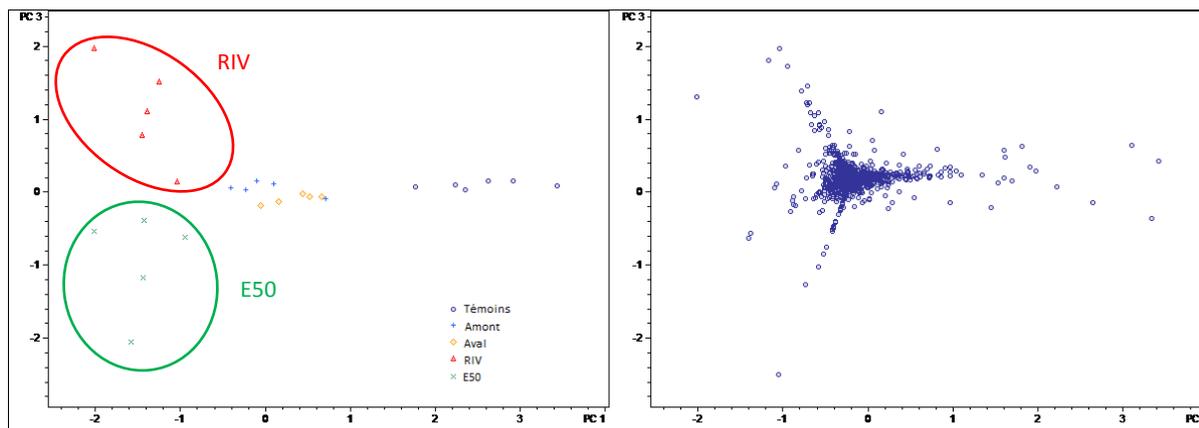


Figure 102: Analyse en Composantes Principales pour l'espèce *Chironomus riparius* lors de la campagne d'exposition automnale (à gauche scores plot ; à droite loadings plot) (PC1 : 25,7% ; PC3 : 8,1%)

Ces Analyses en Composantes Principales permettent ainsi d'avoir une vue d'ensemble de la complexité des données obtenues sur une plateforme de type NanoLC-HRMS et sur la difficulté à tirer des conclusions définitives. Or, c'est précisément cette difficulté, liée à un nombre d'échantillons trop faible par rapport au nombre de signaux considérés, qui fait de cette approche statistique un outil très controversé par les chercheurs en métabolomique et peu adapté à l'interprétation de manière complète des relations entre les échantillons et les variables (m/z ; tr) qui les décrivent. Ainsi, afin de compléter et de préciser l'interprétation des données acquises, nous avons décidé de faire appel à des outils mathématiques de type supervisé.

2.3. Méthode de traitement de données supervisée : Analyse de Variance (ANOVA)

Comme souligné dans le paragraphe précédent, le nombre de variables (m/z ; tr) impliquées dans une approche métabolomique est souvent plus important que le nombre d'échantillons disponibles, ce qui peut engendrer une instabilité des Analyses en Composantes Principales et donc fausser leur interprétation. Dans l'exemple présenté ci-dessus, le rapport entre le nombre d'échantillons et le nombre de signaux détectés était équivalent à $1/175$. A cette source d'erreur s'ajoute la complexité des échantillons biotiques pour lesquels les sources de variabilité sont nombreuses et dont l'influence ne peut être négligée. L'interprétation des score-plot et loadings plot issus de l'ACP n'est de ce fait pas toujours évidente.

Afin d'extraire l'information liée aux conditions d'exposition des organismes aquatiques, nous avons fait appel à une méthode d'analyse de données supervisée plus connue sous le nom d'Analyse de Variance ou ANOVA. Cette stratégie supervisée et univariée permet de mettre en évidence des signaux discriminants pouvant être considérés comme des biomarqueurs potentiels. Les échantillons sont alors décrits par les variables mesurées (m/z ; tr) et par une variable réponse lié à la nature de l'échantillon. Les résultats de l'ANOVA sont donnés sous forme d'une valeur p et conduisent à une sélection des variables. Ces valeurs correspondent à la probabilité que les différences observées entre les différents groupes d'échantillons soient uniquement le fruit du hasard. Ainsi, plus la valeur de p est faible, plus la probabilité de trouver un biomarqueur potentiel est élevée. Le pouvoir

discriminant de chaque variable est donc évalué de manière indépendante. Pour cette étude, le seuil de la valeur p a été fixé à 0,05 en accord avec la valeur trouvée dans la littérature (Hendriks *et al.*, 2011; Saccenti *et al.*, 2014).

Une probabilité p est une condition nécessaire, mais pas suffisante pour que le signal corresponde à un biomarqueur potentiel. En conséquence, toute décision doit être fondée sur l'évaluation minutieuse du profil d'intensité à travers les échantillons. Un exemple est présenté sur la Figure 103. Cette figure représente des variables (m/z ; tr) ayant des valeurs de p inférieures à 0,05, mais des profils et des intensités moyennes assez différents. La variable (a) représentée sur la Figure 103 a une intensité plus élevée dans les organismes exposés que dans les organismes témoins. A l'inverse, la variable (b) présente une intensité moyenne plus élevée dans le groupe des larves d'insecte issues du laboratoire (organismes témoins). Par conséquent, ces variables représentent des biomarqueurs putatifs. En revanche, le caractère discriminant de la variable (c) est plus difficilement interprétable. En effet, bien que l'intensité moyenne soit plus importante dans un des groupes, le profil d'intensité met en évidence d'importantes variations intra-groupe, ce qui rend l'interprétation délicate. Bien que l'évaluation des profils d'intensité soit un travail laborieux qui nécessite beaucoup de temps, elle reste néanmoins une étape nécessaire permettant de garantir la qualité des résultats.

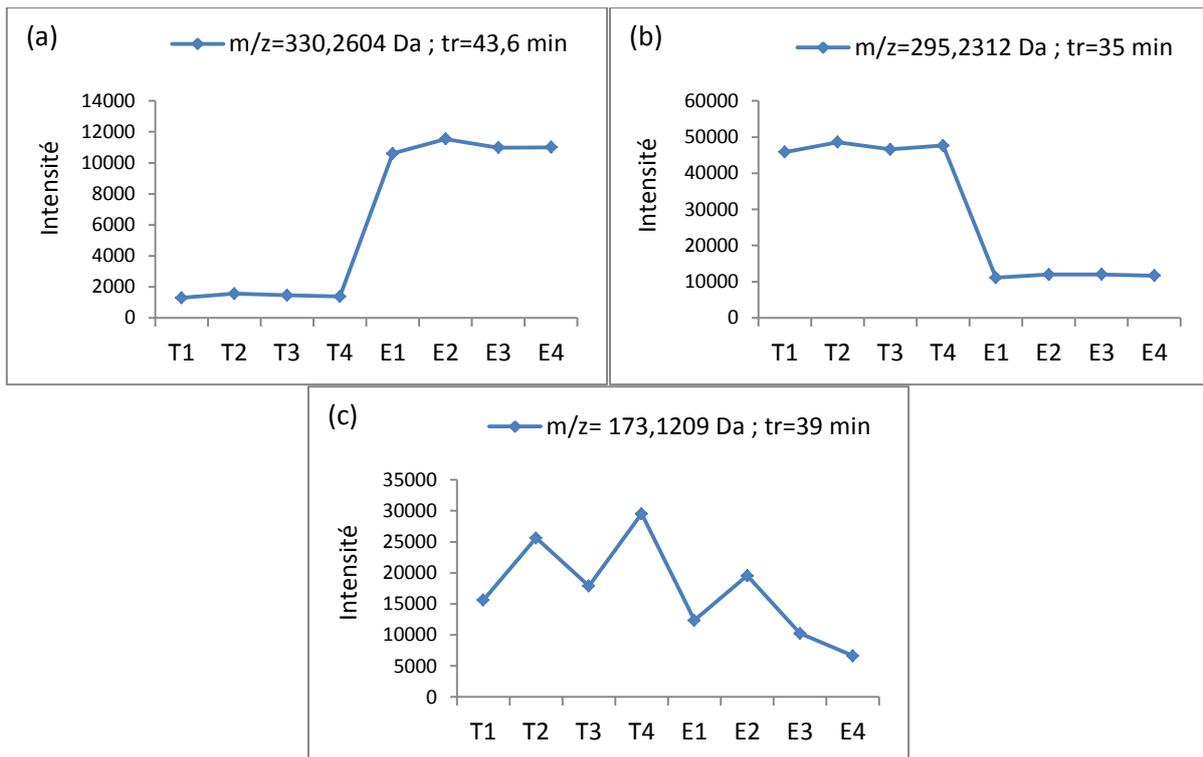


Figure 103: Etude des profils d'intensité (T = organismes témoins ; E = organismes exposés)

Selon la théorie de comparaisons multiples, la probabilité de trouver des différences significatives dues au hasard augmente avec le nombre de tests univariés réalisés. Afin de pallier à ce problème, plusieurs procédures de correction des valeurs de p ont été développées afin de prendre en compte le nombre de comparaisons effectuées (Broadhurst et Kell, 2006). Dans le cadre de ces travaux, deux stratégies ont été comparées : la correction de Bonferroni et la procédure intitulée False Discovery

Rate (FDR). La première stratégie modifie la valeur de p de façon à contrôler la probabilité d'avoir un ou plusieurs faux positifs alors que la seconde stratégie estime la proportion de faux positifs parmi tous les tests significatifs. La Table 77 met en évidence l'impact de ces méthodes sur le nombre de signaux discriminants. On note alors qu'en appliquant ces corrections, le nombre de valeurs p corrigées qui sont inférieures à 0,05 a été considérablement réduit. La procédure FDR s'affiche cependant comme étant moins drastique, et donc préférable dans le cadre d'une étude métabolomique à caractère exploratoire.

Nombre de signaux ayant une valeur de $p < 0,05$		
Sans correction	Après correction de la valeur p par l'approche FDR	Après correction de la valeur p par l'approche de Bonferroni
456	112	8

Table 77: Evaluation de deux stratégies de correction de la valeur de p dans le cas de comparaisons multiple

Partie C : Biomarqueurs putatifs et stratégies d'identification

1. Sélection des variables discriminantes

Basé sur les résultats du traitement statistique des données, les signaux discriminants ont été sélectionnés de la façon suivante :

- 1^{ère} étape : Sélection de toutes les variables ayant une valeur de p inférieure à 0,05 après application de l'ANOVA et de la procédure FDR
- 2^{ème} étape : Etude des loadings-plot issus de l'Analyse en Composantes Principales. Contrairement aux méthodes supervisées tels que la PLS-DA ou l'OPLS-DA, l'ACP est très peu utilisée pour mettre en évidence des signaux discriminants. Cependant, dans le cas d'une forte discrimination entre les différents groupes d'échantillons étudiés, l'étude des loadings-plot peut fournir des informations précieuses. En effet, les loadings-plot indiquent comment les composantes principales sont liées à chaque bucket. L'orientation des buckets sur les loadings plot correspond donc à la distribution des analyses sur les score-plot. Ainsi, les causes de séparation des différents groupes d'échantillons peuvent être analysées à partir des loadings plot. Les variables (m/z ; tr) situées au centre des loading-plot ne contribuent pas à la variance des composantes principales. A l'inverse, tous les signaux éloignés de la nuée centrale peuvent être considérés comme une cause de variation de l'ensemble de données. La direction des scores-plot et des loadings-plot étant reliée, il est possible d'attribuer le signal responsable de la variance à un des groupes d'échantillons. Ceci peut ensuite être vérifié en contrôlant le tracé chromatographique de l'ion extrait (EIC) dans les analyses relatives aux échantillons concernés.
- 3^{ème} étape : Etude des profils d'intensité à travers les différents groupes d'échantillons. Au regard du peu d'échantillons disponibles pour la réalisation de cette approche métabolomique et de l'étude des échantillons QC ayant montrée des variations importantes au sein de ce groupe, il a été décidé d'implémenter des filtres de sélection supplémentaires,

Chapitre 5 : Approches métabolomiques

basés sur les profils d'intensité des signaux au sein des échantillons. Seront donc considérés comme discriminantes les variables (m/z ; tr) répondant favorablement aux exigences fixées lors des étapes 1 et 2, pour lesquelles le signal est présent dans 100% des échantillons du ou des groupe(s) considéré(s) et dont le coefficient de variation intra-groupe n'excède pas 35%.

Pour chacune des espèces considérées lors cette étude, chacune des campagnes d'exposition, chacune des approches d'exposition et chacun des modes d'ionisation utilisés, les variables discriminantes ont été classées selon différentes catégories qui seront détaillées ci-dessous.

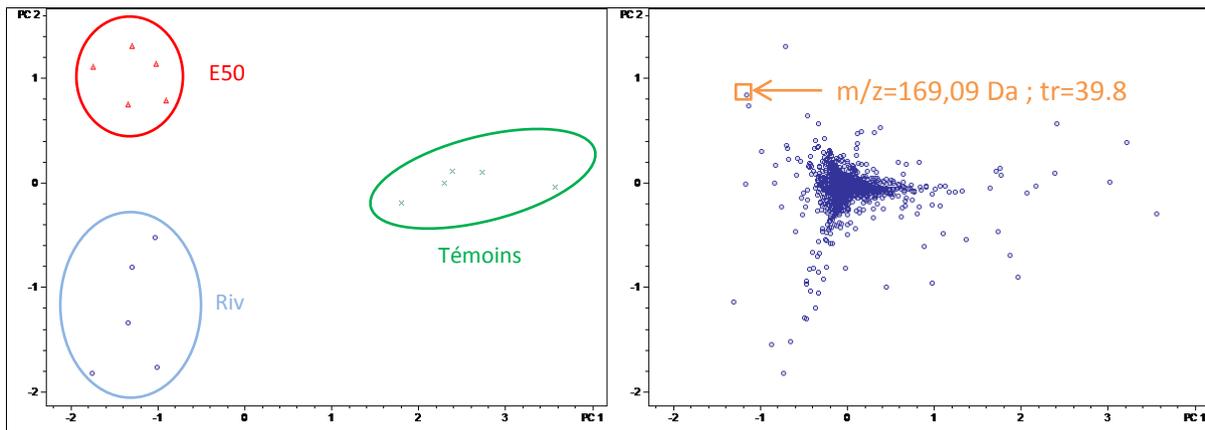
Pour l'approche d'exposition *ex situ*, six catégories ont été retenues. La première catégorie comprend des signaux (m/z ; tr) présents dans l'intégralité des échantillons mais pour lesquels il est possible de noter une différence d'intensité significative entre les organismes témoins et les organismes exposés. Deux cas peuvent alors être différenciés : soit la variable discriminante présente une intensité plus importante chez les organismes témoins, soit son intensité est plus importante chez les organismes exposés. Dans la suite de ce manuscrit, cette première catégorie sera désignée sous l'appellation « différence d'intensité ». La Figure 104 présente un exemple décrivant la procédure de sélection d'un biomarqueur putatif de cette première catégorie.

On note alors que les résultats de l'ANOVA indiquent une valeur de p inférieure au seuil de 0,05 fixé dans le cadre de cette étude. L'étude des loadings-plot permet de mettre en évidence la contribution de la variable sélectionnée à l'orientation des composantes principales. Puisque les loadings-plot permettent de visualiser les variables qui sont responsables de la distribution des échantillons sur le score-plot, nous pouvons relier la variable sélectionnée aux organismes exposés et plus particulièrement aux invertébrés exposés au mélange E50. Enfin, l'étude du profil d'intensité nous permet de confirmer le caractère discriminant du couple (m/z ; tr) sélectionné dont l'intensité est plus importante dans les organismes exposés (et plus particulièrement chez les invertébrés exposés au mélange E50) que chez les organismes témoins. Ces résultats confirment donc ceux de l'ACP. Les coefficients de variation intra-groupes étant inférieures à 35%, ce signal peut être considéré comme discriminant.

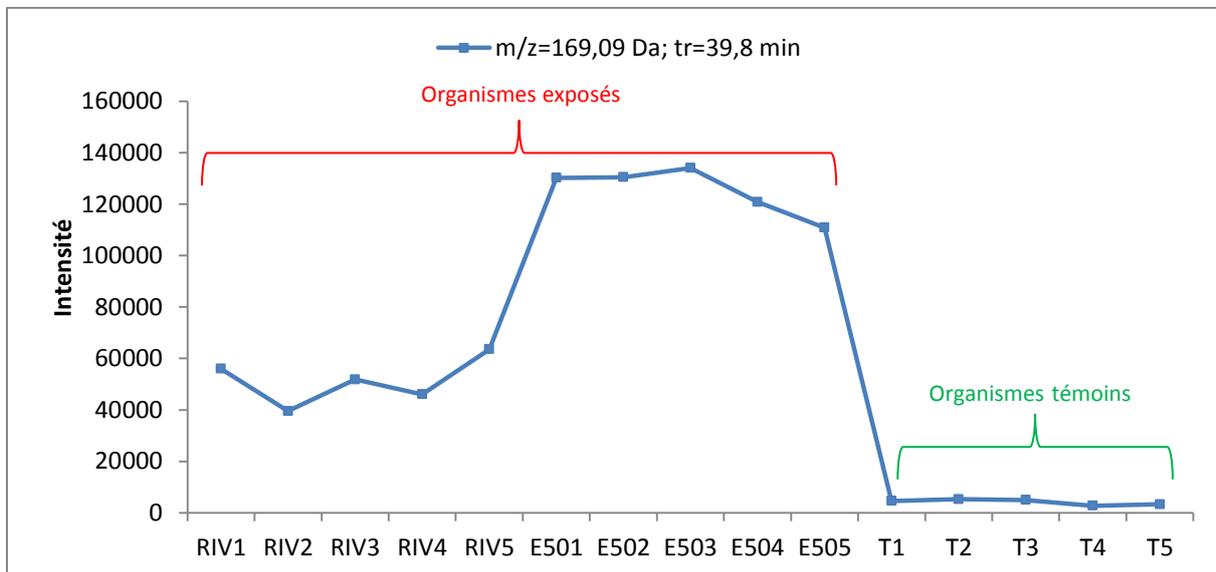
Etape 1 : Résultat de l'ANOVA

Résultats ANOVA (seuil 0,05%)	
Valeur de p sans correction	Valeur de P avec correction FDR
0,0008	0,0093

Etape 2 : Etude des loadings-plot



Etape 2 : Etude du profil d'intensité



Variance intra-groupe (CV %)		
RIV	E50	T
17,9	7,5	26,7

Figure 104: Exemple de sélection d'un biomarqueur putatif de première catégorie (« différence d'intensité »)

Chapitre 5 : Approches métabolomiques

La seconde catégorie fait appel aux signaux discriminants détectés uniquement chez les organismes témoins, alors que la troisième catégorie est liée aux variables discriminantes uniquement présentes chez les organismes exposés.

La quatrième catégorie comprend les signaux discriminants uniquement détectés chez les organismes exposés selon la condition RIV (100% eau de rivière pompée en amont du rejet de STEP). La cinquième catégorie est, quant à elle, liée aux variables uniquement présentes chez les invertébrés exposés au mélange E50 (50% eau de rivière et 50% eau de rivière).

La sixième et dernière catégorie fait référence aux signaux détectés à la fois chez les organismes témoins et chez les organismes exposés selon la condition RIV, mais pas chez les invertébrés exposés au mélange E50.

Pour l'approche d'exposition *in situ*, les catégories une, deux et trois sont identiques à celles décrites pour les expérimentations réalisées en laboratoire. La quatrième catégorie comprend les signaux discriminants uniquement détectés chez les organismes exposés en amont du rejet de STEP. La cinquième catégorie est, quant à elle, liée aux variables uniquement présentes chez les invertébrés engagés en aval du rejet. La sixième et dernière catégorie fait référence aux signaux détectés à la fois chez les organismes témoins et chez les organismes exposés en amont de la STEP, mais pas chez les invertébrés engagés en aval.

2. Etude des signaux discriminants

A partir de la stratégie détaillée dans le sous-chapitre précédent, de nombreux signaux discriminants pouvant être considérés comme des biomarqueurs putatifs ont pu être mis en évidence.

La Figure 105 illustre les résultats obtenus pour l'espèce *Chironomus riparius* lors de la campagne d'exposition automnale pour l'approche *in situ*. En mode d'ionisation négatif, 93 signaux détectés ont été jugés discriminants, ainsi que 143 en mode d'ionisation positif. Ces métabolites primaires ou secondaires correspondent à des molécules chargées ayant des poids moléculaires majoritairement compris entre 300 et 500 Da. Bien qu'une grande partie des variables discriminantes correspondent à des signaux détectés uniquement chez les organismes exposés, et ce indépendamment du site d'exposition, on note tout de même la présence de 16 signaux discriminants qui n'ont été détectés que chez les larves d'insecte engagées en aval du rejet de STEP. Ceux-ci pourraient ainsi correspondre à des biomarqueurs potentiels inhérents à l'impact des effluents de la station de traitement des eaux usées. Les résultats de l'approche *in situ* semblent donc indiquer une différence de métabolisme entre les organismes témoins et les organismes exposés. Notons cependant qu'avec cette unique d'approche d'exposition, le changement de métabolisme observé ne peut être attribué à l'unique contamination du milieu, les conditions d'exposition des organismes témoins, élevés en laboratoire, et celles des organismes engagés dans le milieu étant très différentes, l'influence des facteurs abiotiques tels que la température ne peut être écartée.

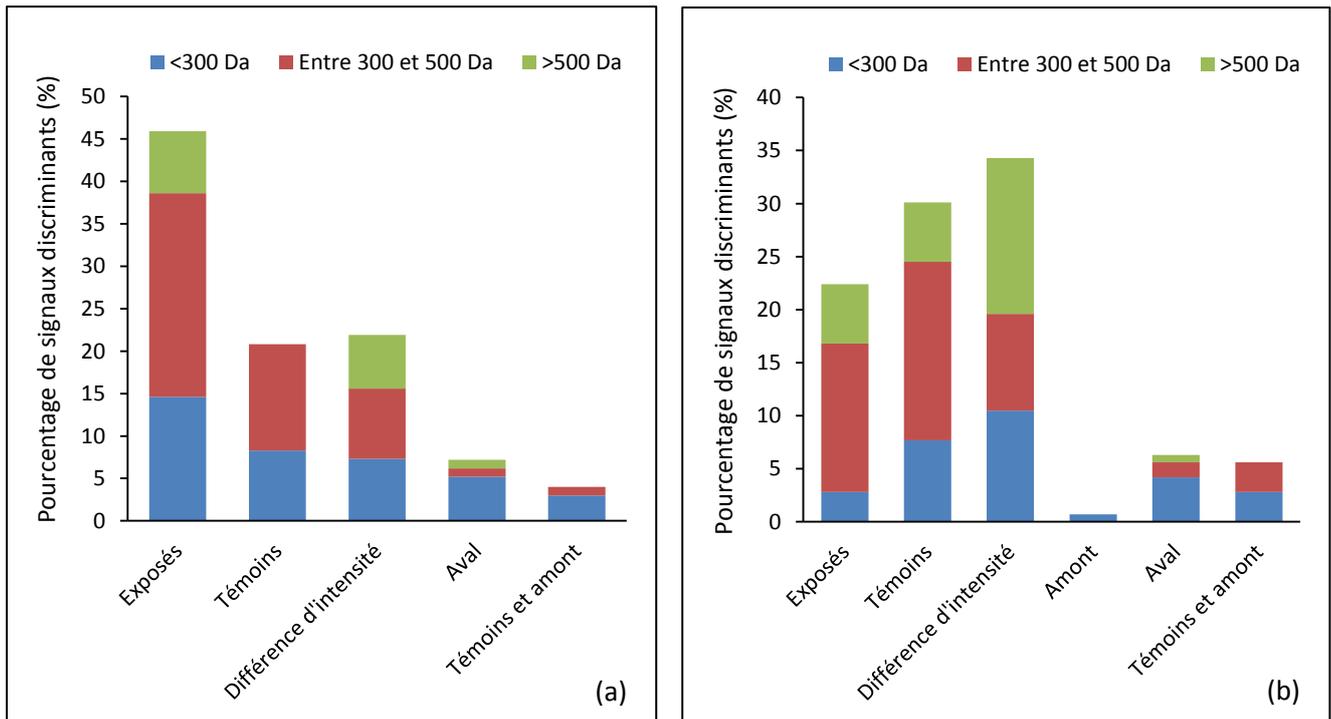


Figure 105: Répartition des signaux discriminants chez *Chironomus riparius* lors de la campagne d'exposition automnale (*in situ*) en fonction de la gamme de masse et de la catégorie à laquelle ils appartiennent ((a) en mode d'ionisation négatif ; (b) en mode d'ionisation positif)

Les résultats de l'approche *ex situ*, pour laquelle l'influence des facteurs abiotiques peut être écartée, semblent ainsi confirmer les hypothèses émises pour l'approche *in situ*. La contamination du milieu engendre une modification du métabolisme des larves d'insecte (Figure 106). Notons cependant que le nombre de signaux discriminants est plus important dans le cadre de l'approche *ex situ* (184 en mode d'ionisation positif et 142 en mode d'ionisation négatif) que pour l'approche d'exposition *in situ*. Par comparaison des deux approches d'exposition, il est également possible de souligner la différence de distribution des signaux discriminants en fonction de la gamme de masse et de la catégorie à laquelle ils appartiennent. A titre d'exemple, la Figure 107 présente une cartographie des variables discriminantes (m/z ; tr) détectées en mode d'ionisation négatif chez les organismes exposés pour chacune des approches d'exposition mises en œuvre dans le cadre de cette étude.

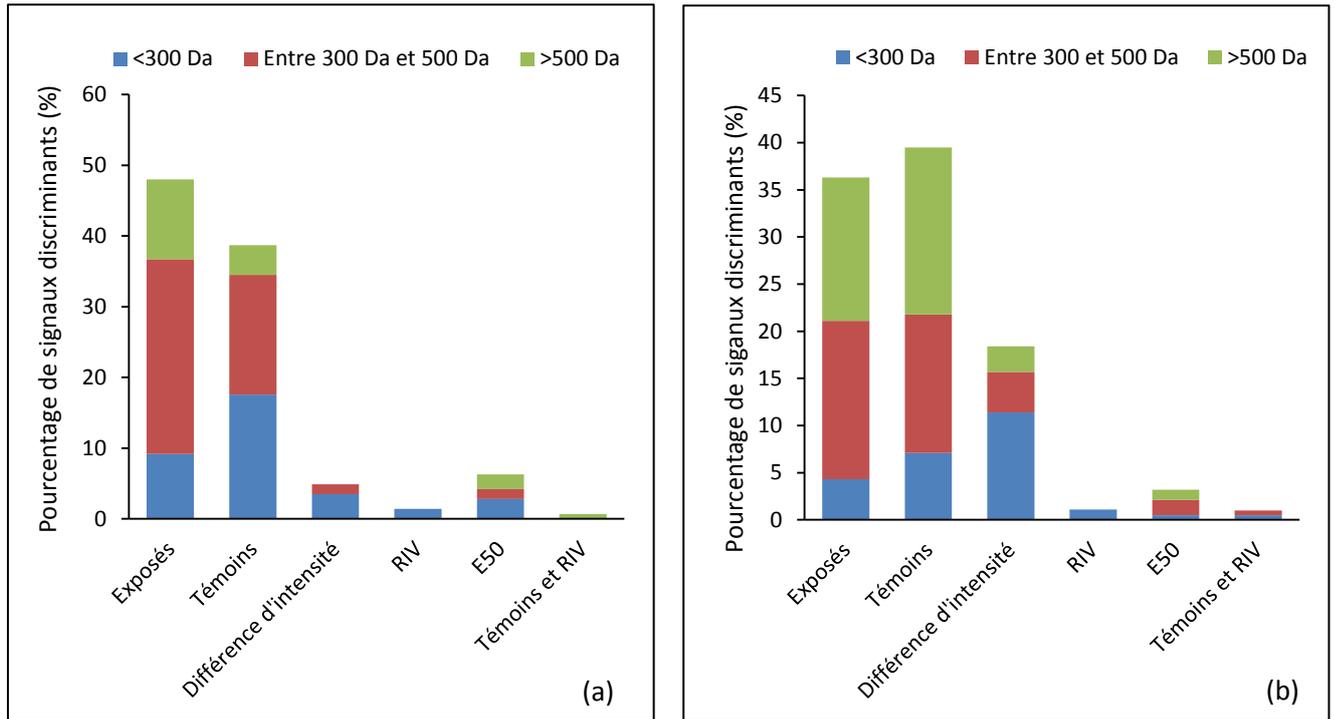


Figure 106: Répartition des signaux discriminants chez *Chironomus riparius* lors de la campagne d'exposition automnale (*ex situ*) en fonction de la gamme de masse et de la catégorie à laquelle ils appartiennent ((a) en mode d'ionisation négatif ; (b) en mode d'ionisation positif)

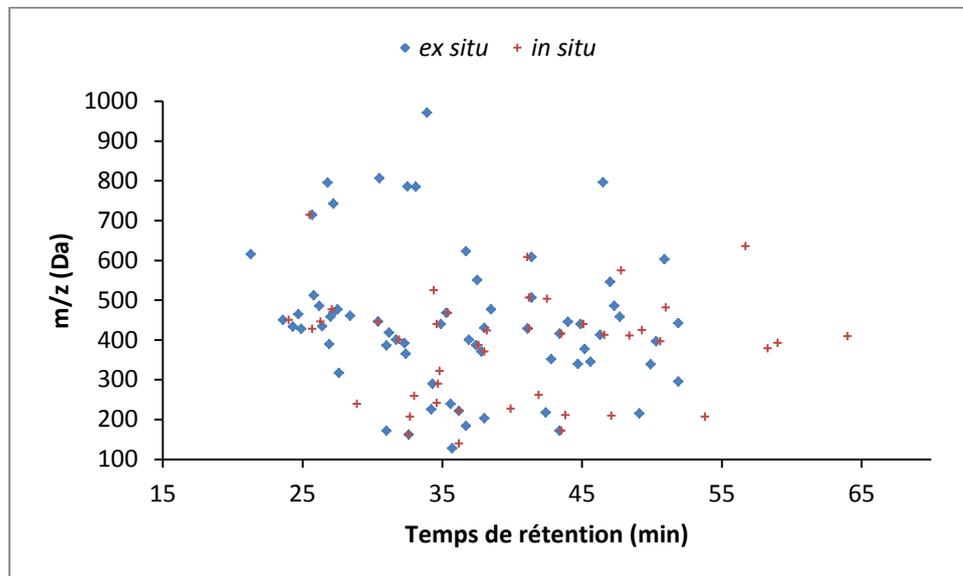


Figure 107: Cartographie des variables discriminantes (m/z ; tr) détectées en mode d'ionisation négatif chez les organismes *Chironomus riparius* exposés en automne selon les approches d'exposition *ex-* et *in situ*

Cette cartographie nous permet ainsi de mettre en évidence l'influence des conditions d'exposition sur le métabolisme des larves d'insecte.

Chapitre 5 : Approches métabolomiques

En plus de cette comparaison inter-approches d'exposition, l'échantillothèque disponible pour cette étude nous permettait de réaliser un comparatif des signatures chimiques en fonction des saisons. L'étude des variables discriminantes obtenues pour la saison estivale a, dans un premier temps, permis de confirmer les observations faites pour la campagne d'automne, à savoir que les conditions d'exposition et la contamination du milieu d'exposition engendrent une modification du métabolisme des larves de chironomes. Bien plus qu'une confirmation des résultats obtenus lors de la campagne d'exposition automnale, l'interprétation des résultats relatifs à la campagne d'été a permis de montrer une diversité de réponse qui s'avère être saison-dépendante. Malgré la similitude du nombre de signaux discriminants (environ 250 pour chacune des approches d'exposition) détectés pour chacune des campagnes d'exposition, il est possible de noter des différences relatives à la nature de ces variables. A titre d'exemple, parmi les signaux discriminants détectés uniquement chez les organismes encagés en aval du rejet de STEP lors de l'approche *in situ* en mode d'ionisation négatif, aucun d'entre eux n'est commun aux deux campagnes d'exposition.

Concernant le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*, le nombre de variables discriminantes est très inférieur à celui obtenu pour les larves de chironome. En effet, malgré une très bonne discrimination des différents groupes d'échantillons sur les scores-plot de l'ACP, l'examen visuel de ces signaux réalisé grâce à la génération de profils d'intensité a réduit le nombre de biomarqueurs potentiels de façon considérable (Table 78).

Nombre de signaux discriminants (m/z ; tr)			
Automne		Eté	
Ex situ	In situ	Ex situ	In situ
61	34	24	122

Table 78: Nombre de signaux discriminants (m/z ; tr) détectés chez *Gammarus fossarum* en fonction de chacune des approches d'exposition et chacune des campagnes d'expérimentation

Ce faible pourcentage de variables discriminantes peut s'expliquer par une variance intra-groupe plus importante que pour les larves d'insectes qui nous a contraint à éliminer de nombreux signaux. Contrairement à l'étude des chironomes, cette approche métabolomique a été réalisée à l'échelle d'un individu. La variance intra-groupe pourrait ainsi provenir d'une variabilité individuelle, que le faible nombre d'échantillons (5 par groupe) disponibles pour cette étude n'a pas pu estomper. Compte tenu de la disparité du nombre de variables discriminantes détectées pour chacune des approches et des campagnes d'exposition, il nous semble délicat de réaliser un comparatif de ces résultats.

Bien que l'approche métabolomique relative aux mollusques *Potamopyrgus antipodarum* ait été réalisée à l'échelle d'un individu, les résultats sont très différents de ceux obtenus pour les crustacés. En effet, l'étude des profils d'intensité a permis de mettre en évidence une faible variabilité individuelle : seulement 20% des signaux *a priori* discriminants ont été éliminés après détermination de la variance intra-groupe, contre plus de 50% pour les gammars. Notons cependant que le nombre de signaux discriminants reste inférieur à celui déterminé pour les chironomes. Nous avons

pu ainsi déterminer que la nature des signaux discriminants était différente en fonction de l'approche d'exposition. La comparaison des signatures chimiques en fonction des saisons n'a cependant pas pu être réalisée, et ce par manque d'échantillons relatifs à la campagne d'été. L'examen détaillé des variables discriminantes indique que la proportion de signaux relatifs à l'impact du rejet de STEP est plus importante chez les gastéropodes qu'elle ne l'était pour les autres espèces étudiées. En effet, 12% des variables discriminantes ont été détectées uniquement chez les escargots encagés en aval du rejet pour l'approche *in situ* et 29% des variables discriminantes correspondent à des signaux détectés chez les organismes exposés en laboratoire au mélange E50.

En conclusion, l'obtention d'empreintes moléculaires réalisées à partir des données acquises sur une plateforme de type NanoLC-QqToF et traitées grâce à des outils statistiques et mathématiques appropriés a permis de mettre en évidence des diversités de réponse métabolique inter-espèces qui sont également fonction des conditions d'expositions et de la saison. A titre comparatif, Hines *et al.* (2007) ont réalisé une étude visant à mettre en évidence les changements dans le métabolome d'organismes aquatiques à travers un cycle saisonnier complet. Basé sur la RMN, les auteurs ont recensé des changements cycliques importants pour de nombreux métabolites issus du métabolome tissulaire de la moule *M. edulis*, recueillie sur une période d'un an. Cette étude met en évidence l'importance de définir le métabolisme de base des organismes avant toute enquête sur l'effet des facteurs de stress anthropiques, par exemple. Il est donc nécessaire de faire preuve de prudence lorsque l'on compare des études les unes aux autres. Les différences d'empreintes moléculaires observées entre les différentes approches d'exposition (*in situ* vs *ex situ*) peuvent être hypothétiquement attribuées à la variation de certains paramètres comme la température du milieu ou bien la disponibilité en nourriture. Relativement peu d'études métabolomiques liées au stress thermique chez les organismes aquatiques ont été signalées. La réponse métabolique, l'induction de protéines de choc thermique (hsp), et le taux de croissance de la truite arc en ciel ont cependant été mesurés par Viant *et al.* (2003) à travers une exposition de 10 semaines à 15°C et 20°C. Des analyses par RMN ont ainsi révélé une corrélation positive entre l'induction de hsp et l'augmentation de la température. Des changements métaboliques relatifs à la diminution des niveaux métaboliques de phosphocréatine et de glycogène, liés au métabolisme énergétique, ont également été recensés. A notre connaissance, aucune étude n'a été dédiée à l'influence de la disponibilité des nutriments sur le métabolome des espèces aquatiques dans leur milieu naturel. Cependant, Rosenblum *et al.* (2005) ont étudié l'influence de la température et de la quantité de nourriture disponible sur l'état métabolique d'*Haliotis rufescens*, un coquillage d'une importance considérable en aquaculture. La limitation de nourriture a provoqué des changements métaboliques spectaculaires pour de nombreux métabolites. Les auteurs ont ainsi mis en évidence que les variations alimentaires et thermiques pouvaient conduire à d'importantes perturbations métaboliques. Les exemples issus de la littérature et cités ci-dessus semblent donc en adéquation avec les résultats obtenus lors de notre étude et pourraient justifier les différences d'empreintes moléculaires observées selon les deux approches d'exposition mises en œuvre dans le cadre de ces travaux de thèse.

3. Stratégies d'identification des variables discriminantes

L'identification de biomarqueurs est aujourd'hui reconnue comme le défi le plus important des sciences « omiques », et ce quel que soit le domaine d'application. Bien que les méthodes bioanalytiques et informatiques soient en perpétuelle évolution, l'identification du métabolome et l'annotation des métabolites restent encore des processus complexes et fastidieux.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'objectif des approches non ciblées mises en œuvre consistait principalement à réaliser une cartographie des signatures chimiques en fonction des espèces considérées et des conditions d'exposition. Celle-ci devait avant tout permettre de mettre en évidence les changements de métabolisme induits par la contamination des milieux aquatiques causée par diverses pressions anthropiques. Le but premier n'était donc pas d'identifier chacun des métabolites détectés. Cependant, au regard du nombre important de signaux discriminants mis en évidence grâce au traitement statistique des données, il a été décidé de mettre en œuvre différentes stratégies d'identification de ces composés. Ces stratégies d'annotation ont été appliquées à l'espèce *Chironomus riparius* pour laquelle nous disposons d'une échantillothèque suffisante permettant la réalisation d'analyses supplémentaires. Nous avons ainsi procédé à des analyses NanoLC-HRMS/MS rendues possibles par l'utilisation d'un spectromètre de masse hybride de type QqToF. L'obtention des spectres MS/MS fournit des informations structurales précieuses permettant d'affiner l'annotation d'un composé.

Basées sur les analyses NanoLC-HRMS et NanoLC-HRMS/MS, différents processus d'identification ont été utilisés. Dans un premiers temps, l'intégralité des variables discriminantes (m/z ; tr) a été soumise au logiciel MetaboTrack© développé au sein du laboratoire. Cet outil informatique permet l'interrogation de bases de données sur le critère de la masse exacte monoisotopique de l'ion parent en fonction des différents adduits possibles. Une tolérance de 5 ppm a été choisie pour cette annotation. La base de données HMDB a été utilisée pour l'annotation des signaux discriminants présents dans les échantillons témoins, RIV, E50, amont et aval, pour chacune des campagnes d'exposition. En plus de cette première annotation, une seconde interrogation a été effectuée en utilisant cette fois-ci la base de données DrugBank afin de mettre en évidence la présence de substances pharmaceutiques qui n'auraient pas été suivies lors des analyses ciblées.

Globalement, le nombre de correspondances (annotations) dépasse le nombre de valeurs m/z soumises. A titre d'exemple, pour l'échantillon de chironomes encagés en amont du rejet de STEP lors de la campagne d'automne, 73 annotations par la base de données HMDB ont été effectuées alors que seulement 53 variables avaient été soumises. Après un examen détaillé des résultats, on constate cependant que ces annotations ne concernent en réalité que 16 variables. Ainsi, pour une même masse monoisotopique, on compte jusqu'à 32 composés possibles possédant la même formule brute. Seulement 10% des valeurs sont attribués à des substances uniques.

Afin d'affiner l'identification des variables discriminantes annotées par interrogation des bases de données, nous avons procédé à une vérification du profil isotopique. Le logiciel DataAnalysis (Bruker Daltonics) évalue la correspondance du profil isotopique obtenu expérimentalement avec le profil

théorique de la molécule proposée par la base de données. Les résultats sont donnés sous la forme d'une valeur appelée mSigma. Lorsque cette valeur est inférieure à 30 (seuil fixé par le constructeur), les profils isotopiques sont considérés comme similaires. A titre d'exemple, la masse 386,1376 Da correspondant à l'adduit [M-H]⁻ détecté uniquement chez les organismes exposés avait été identifiée par la base de données HMDB comme pouvant être un métabolite du trazodone (antidépresseur): le 4-hydroxytrazodone. La vérification du profil isotopique nous a permis d'infirmer cette annotation, la valeur de mSigma étant égale à 110 (Figure 108). Le profil isotopique obtenu expérimentalement n'est en effet pas caractéristique d'une molécule contenant un atome de chlore.

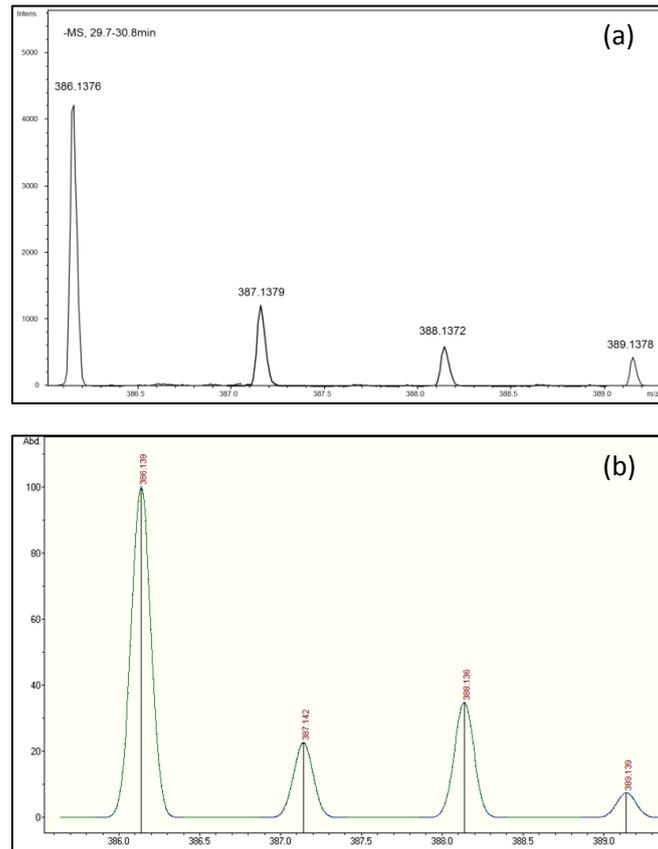


Figure 108: Profil isotopique expérimental de l'ion à 386,1376 Da (a) et profil isotopique théorique (b) de la molécule C₁₉H₂₁ClN₅O₂ correspondant à l'adduit [M-H]⁻ du 4-hydroxytrazodone

Bien que long et fastidieux, l'examen des profils isotopiques reste cependant une étape incontournable nous permettant de confirmer ou d'infirmer l'annotation d'un composé. Notons cependant que cette étude n'est pas toujours évidente, et ce pour deux raisons principales. La première concerne les signaux de faible intensité pour lesquels le profil isotopique n'est pas toujours défini alors que la seconde est liée à la présence d'interférents qui influent sur la définition du profil isotopique. Bien que la préparation d'échantillon et la séparation chromatographique jouent de manière considérable sur la présence ou l'absence d'interférents, nous avons pu constater que ces phénomènes étaient plus importants sur les signaux de faible ratio m/z. Afin de mieux comprendre ces phénomènes, nous nous sommes intéressés à la résolution de l'appareil sur la gamme de masse étudiée. Pour cela, nous avons étudié la distribution des clusters de formiate de sodium utilisés lors

de l'étape de calibration. La Figure 109 illustre la résolution du spectromètre de masse QqToF en fonction de la valeur de m/z . Les ions appartenant à la partie supérieure de la gamme de masse possèdent des différences de temps de vol plus importantes que les ions de faible ratio m/z et sont donc plus facilement séparables. Ainsi, nous avons pu observer des valeurs de résolution comprises entre 4500 et 8000 pour la gamme de masse variant de 50 à 1000 Da. Ceci correspond à des valeurs de $\Delta m/z$ comprises entre 20 et 120 mDa. La faible résolution de l'appareillage pour les ions de faible ratio m/z pourrait en partie expliquer la présence importante d'interférents pour ces ions.

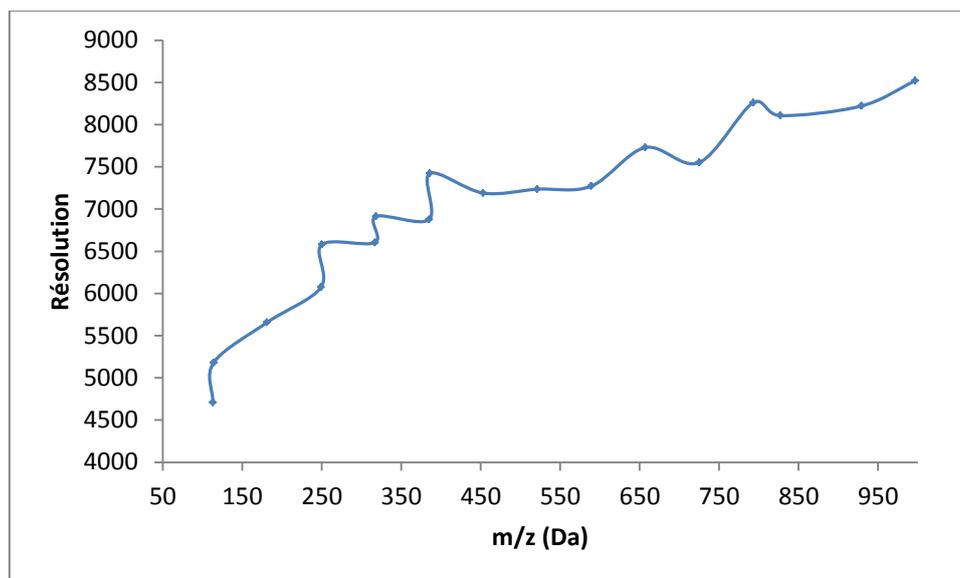


Figure 109: Evolution de la résolution spectrale en fonction de la valeur m/z

Afin de pallier au problème lié à la faible intensité des signaux discriminants de faible masse pour lesquels le massif isotopique n'était pas accessible, il a été décidé d'optimiser les paramètres de détection de manière à favoriser le transfert des ions de faible ratio m/z (50-500 Da). L'application d'une telle méthode de masse (Cf. Chapitre 2) a permis d'améliorer la sensibilité des ions de faible ratio m/z d'un facteur 2 à 10. La Figure 110 illustre l'exemple de l'ion 162,0555 Da détecté chez les organismes exposés pour lequel la première méthode de masse (50-1000 Da) ne permettait pas la détection du massif isotopique. La modification des paramètres de transfert engendre une augmentation de l'intensité de ce signal et permet d'obtenir le troisième pic du massif isotopique. Nous pouvons ainsi confirmer la formule brute obtenue suite à l'interrogation des bases de données ($C_9H_9NO_2$) (erreur sur la masse: 3 ppm et $mSigma$: 10).

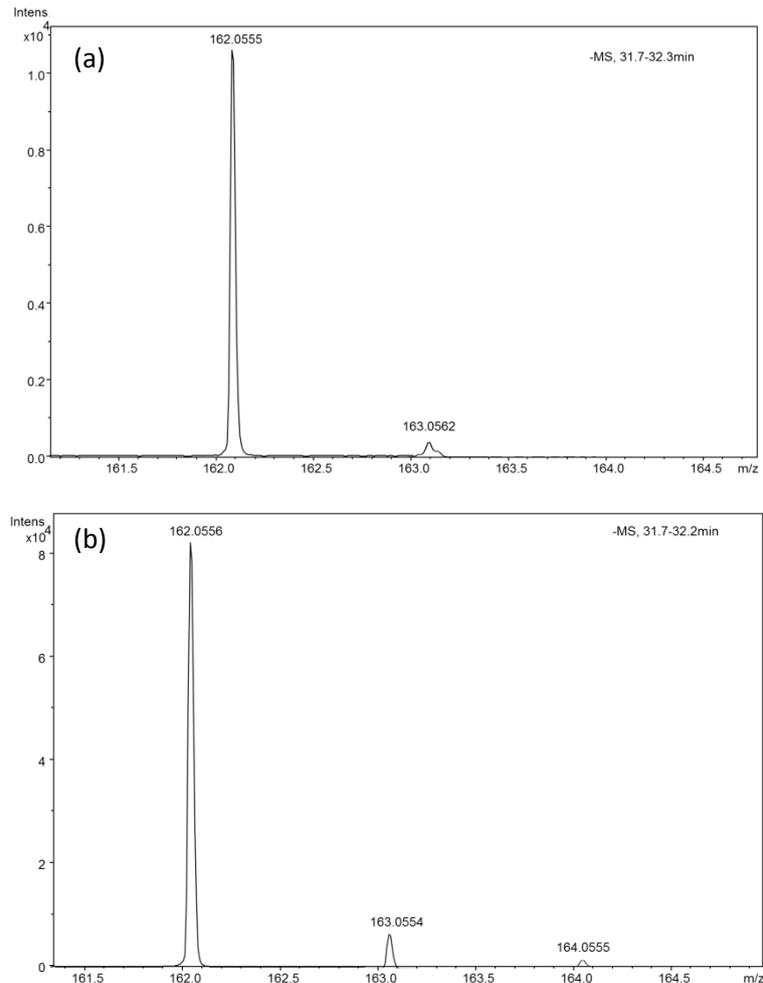


Figure 110: Massifs isotopiques de l'adduit [M-H]⁻ correspondant à m/z= 162,0555 Da avec la méthode de masse initiale (50-1000 Da) (a) et après modification des paramètres de transfert (b)

Bien que le critère de l'exactitude sur la masse monoisotopique et l'évaluation des massifs isotopiques aient permis de confirmer environ 50% des formules brutes fournies par l'interrogation des bases de données, ces critères restent insuffisants pour identifier de façon précise un composé. Des informations structurales s'avèrent ainsi nécessaires. Par conséquent, notre seconde stratégie d'identification fait intervenir les spectres MS/MS acquis par fragmentation automatique (Auto MS/MS) des ions ayant une intensité supérieure à 2000. Cette fragmentation a été réalisée en utilisant deux énergies de collision : 25 eV et 45 eV. Dans un premier temps, les spectres de fragmentation obtenus expérimentalement ont été comparés avec ceux disponibles dans les bases de données HMDB, DrugBank, MassBank et ChemSpider. Notons cependant que ces bases de données contiennent des spectres MS/MS acquis sur différents appareillages avec des énergies de collision pouvant être variables. Par conséquent, seule la similitude des fragments obtenus sur notre plateforme avec ceux référencés dans les spectres de la base de données sera examinée. L'intensité relative des différents ions étant fonction de l'appareillage et de l'énergie de collision utilisée, aucune comparaison supplémentaire n'est possible. Il semble également important de souligner que les bases de données utilisées ne sont pas exhaustives et contiennent encore très peu de spectres MS/MS. Ainsi, lorsque les spectres de fragmentation des biomarqueurs putatifs identifiés par

interrogation des bases de données HMDB et DrugBank sur les critères de la masse monoisotopique (erreur < 5 ppm) et de la correspondance du massif isotopique n'était disponibles sur aucune des bases de données spectrales précédemment mentionnées, il a été décidé d'utiliser le logiciel de fragmentation *in silico* MetFrag©. Cet outil informatique, disponible gratuitement sur internet, permet d'obtenir une liste de candidats potentiels référencés dans les bases de données KEGG, ChemSpider, et PubChem sur la base de la masse de l'ion précurseur. Ces différents candidats sont ensuite fragmentés *in silico*. Les masses des fragments ainsi générés sont comparées à celles obtenues expérimentalement et précédemment renseignées par l'opérateur. Cet outil informatique peut également être utilisé pour vérifier l'identification d'un unique composé en entrant l'identifiant de celui-ci lorsqu'il est référencé dans une des bases de données utilisée par MetFrag. Cela permet ainsi d'obtenir la structure des fragments.

A titre d'exemple, le signal correspondant à un rapport m/z de 295,2293 Da détecté à 51,4 minutes chez les chironomes exposés en laboratoire lors de la saison automnale, et dont le caractère discriminant peut être expliqué par une non détection dans les organismes témoins, a été annoté par la base de données HMDB comme étant l'adduit [M-H]⁻ de 5 biomarqueurs potentiels possédant tous la même formule brute : C₁₈H₃₂O₃. Parmi les composés proposés par le logiciel d'interrogation MetaboTrack figure l'acide 13-Hydroxyoctadecadiénoïque dont le spectre de fragmentation est disponible sur la base de données spectrale MassBank. La comparaison des spectres MS/MS obtenus sur notre plateforme avec ceux de la base de données spectrale MassBank met en évidence la correspondance de nombreux fragments (Figure 111 et Figure 112).

13-HODE; LC-ESI-QIT; MS2; CE:25 V; [M-H]⁻

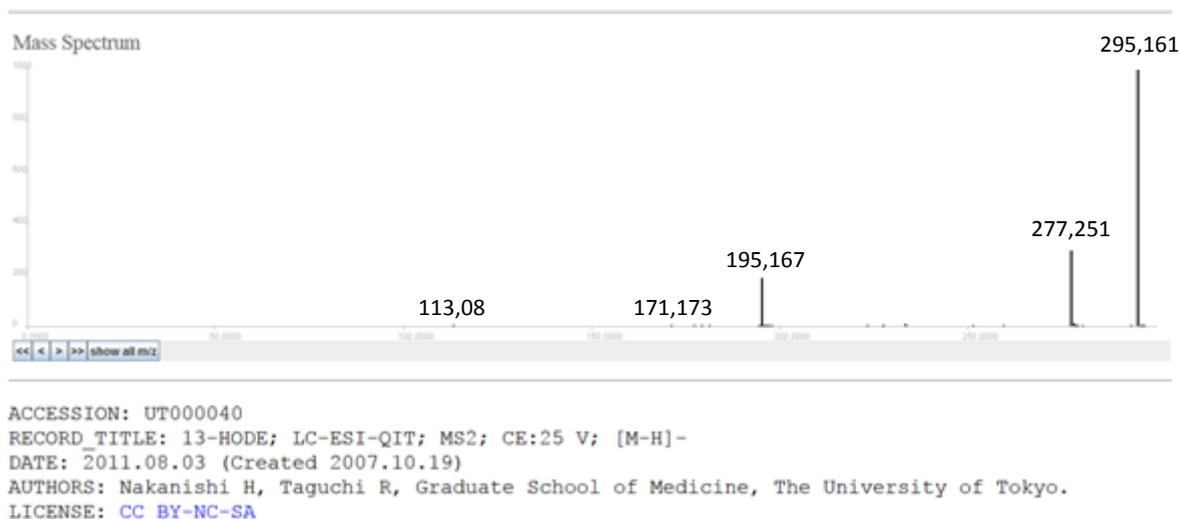


Figure 111: Spectre de fragmentation de l'acide 13-Hydroxyoctadecadiénoïque tiré de la base de données spectrale MassBank

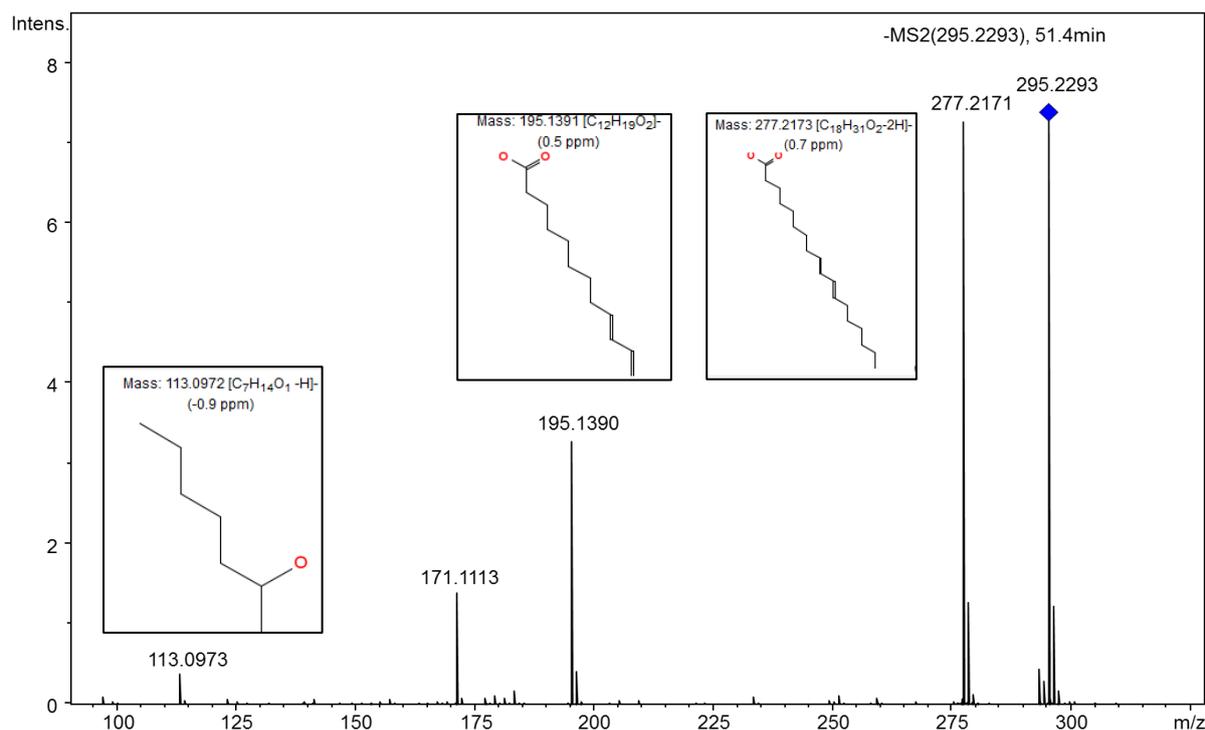


Figure 112: Spectre de fragmentation de la variable discriminante correspondant au couple $m/z=295,2293$ Da ; $t_r= 51,4$ min (ESI- ; énergie de collision : 25 eV) obtenu sur la plateforme NanoLC-QqToF et annotation des fragments par le logiciel de fragmentation *in silico* MetFrag

Malgré la correspondance des fragments observés sur les Figure 111 et 111, il est possible de noter une différence quant à la mesure de leur masse. Ceci peut être expliqué par le fait que les spectres disponibles dans la base de données spectrales MassBank ont été acquis sur un spectromètre de masse QTRAP, moins résolutif et doté d'une précision inférieure à celle du QqToF utilisé dans le cadre de ces travaux. L'utilisation du logiciel MetFrag a permis de confirmer notre hypothèse et d'obtenir des propositions de structure de certains fragments, avec une erreur inférieure à 1 ppm sur la masse monoisotopique exacte (Figure 112).

Le signal correspondant au rapport m/z 162,0555 Da uniquement détecté à 32,1 minutes chez les larves d'insecte exposées, et ce quelle que soit l'approche d'exposition (*in situ* ou *ex situ*) mais seulement lors de la campagne d'automne, a été annoté par la base de données HMDB comme étant l'adduit [M-H]⁻ de l'acide 4-(3-pyridyl)-3-butenoiq ou du 3-Methyldioxyindole. L'interrogation de la base de données DrugBank permet cependant une troisième annotation possible : la Phenyldehydroalanine. Ces trois composés présentent la même formule brute $C_9H_9NO_2$ et aucun spectre de fragmentation n'est disponible sur les bases de données spectrales. La Figure 113 illustre le spectre de fragmentation de ce biomarqueur putatif obtenu sur notre plateforme analytique.

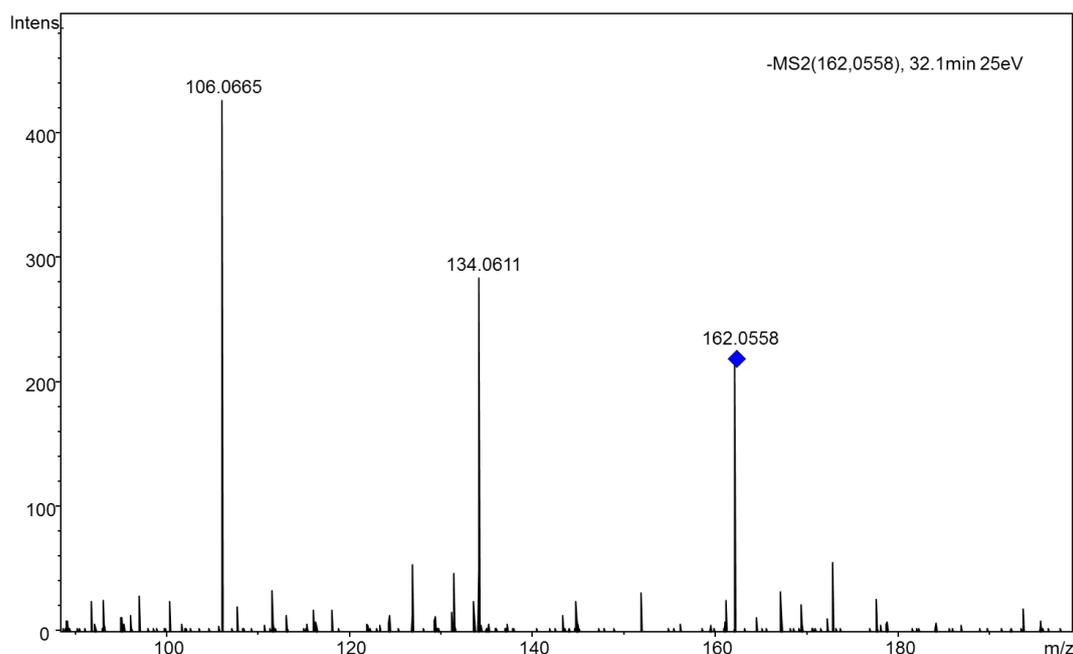


Figure 113: Spectre MS/MS de l'ion 162,0558 Da (énergie de collision : 25 eV)

Parmi les trois biomarqueurs potentiels annotés par interrogation des bases de données HMDB et DrugBank, l'utilisation du logiciel de fragmentation *in silico* permet de mettre en évidence que seul le 3-Methyldioxyindole présente un fragment possible à 134,0611 Da (Figure 114), les deux autres annotations possibles ne donnant aucune correspondance pour les fragments obtenus expérimentalement.

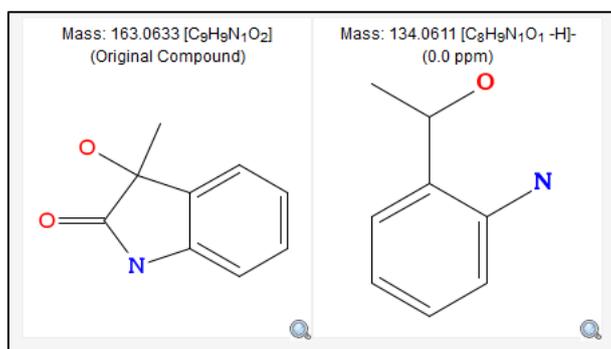


Figure 114: Fragmentation *in silico* du 3-Methyldioxyindole réalisée à l'aide du logiciel MetFrag

Notons cependant que cette étude de fragmentation *in silico* a été réalisée en utilisant uniquement les possibilités mises en évidence par le logiciel MetaboTrack[®]. Ainsi, si l'opération est renouvelée sans indiquer au logiciel MetFrag l'identité du composé précurseur, il est possible d'obtenir une proposition supplémentaire, le 4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone, pour lequel le fragment à 134,0611 Da obtenu expérimentalement correspond au fragment généré *in silico* (Figure 115).

Chapitre 5 : Approches métabolomiques

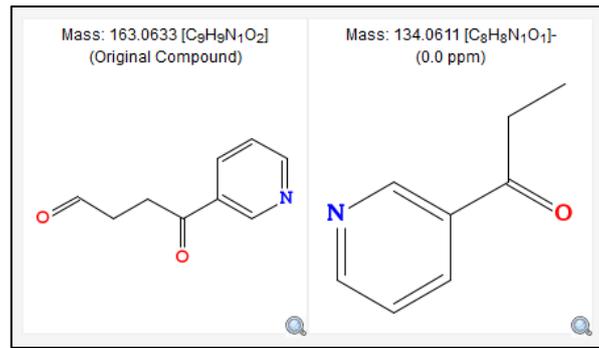


Figure 115: Fragmentation *in silico* du 4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone réalisée à partir du logiciel MetFrag

Le 4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone correspond à un métabolite de la nicotine induit par les cytochromes P450. La voie métabolique correspondante, disponible *via* KEEG est présentée ci-dessous.

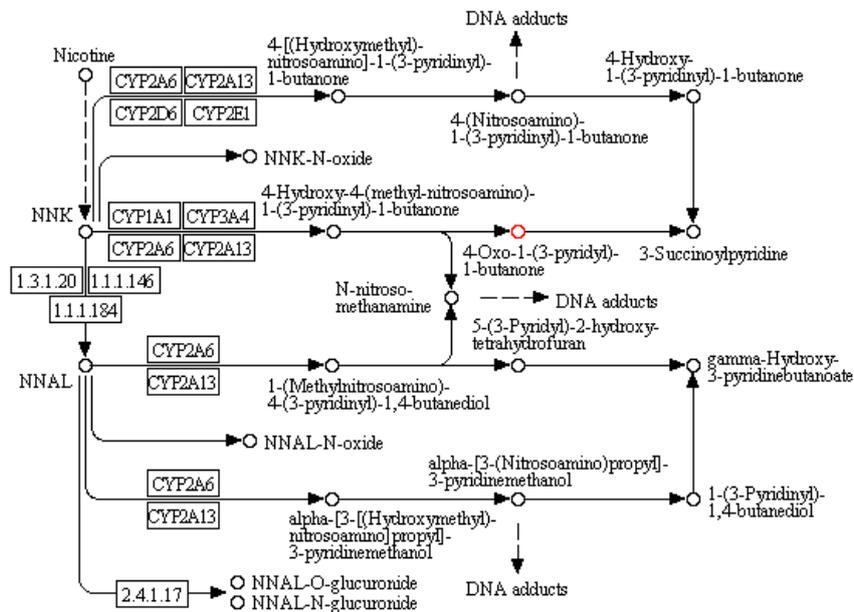


Figure 116: Métabolisme de la nicotine par le cytochrome P450 (source KEEG)

L'exemple relatif à l'annotation de cette variable discriminante met ainsi en évidence une des limitations liée à notre stratégie d'identification. La première étape de notre approche étant basée sur l'interrogation de seulement deux bases de données (HMDB et DrugBank), des possibilités supplémentaires, non recensées dans l'une ou l'autre de ces bases de données, peuvent alors être écartées. Le 4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone ne faisait en effet pas partie des annotations issues de la première étape de notre stratégie d'identification.

Cet exemple permet également d'ouvrir la discussion quant à l'utilisation de la fragmentation *in silico*. En effet, que ce soit le cas du 4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone ou du 3-Methyldioxyindole, seul le fragment à 134,0611 Da a pu être annoté par le logiciel MetFrag, la structure du fragment correspondant à 106,0665 Da reste, quant à elle, inconnue. La génération de la formule brute

associée à ce second fragment, réalisée à partir de l'outil SmartFormula (Bruker Daltonics), donne le résultat suivant $C_7H_8N^+$, avec une erreur sur la masse monoisotopique exacte de -2,6 ppm. Au regard de cette annotation, il est donc tout à fait envisageable que ce fragment appartienne à l'une ou l'autre des molécules précédemment mentionnées. Cependant, le logiciel MetFrag ne permet pas l'identification de sa structure. Notre hypothèse permettant d'expliquer ceci fait référence à l'incapacité du logiciel à prendre en compte les réarrangements possibles mais néanmoins mal connus.

Afin d'étayer nos propos, nous avons fait le choix de réaliser des tests de fragmentation sur une molécule bien connue, la testostérone, pour laquelle nous possédions un standard analytique pure (>99%) et dont l'annotation des fragments est disponible sur la base de données spectrales MassBank. L'ion précurseur, correspondant à l'adduit $[M+H]^+$, ainsi que l'intégralité des fragments obtenus ont été renseignés au logiciel MetFrag. Parmi les 6 fragments obtenus expérimentalement et présents dans les spectres de fragmentation disponibles sur MassBank, 4 d'entre eux sont annotés par la fragmentation *in silico* de la testostérone. D'autres molécules, différentes de la testostérone d'un point de vue structural et biologique possèdent alors un nombre de fragments annotés plus important avec une précision sur la masse des fragments inférieure à 5 ppm. Par conséquent, bien que ce logiciel soit un outil puissant permettant d'apporter une aide précieuse quant à l'identification de métabolites, sans l'utilisation d'un standard analytique permettant de discriminer les annotations possibles sur la base de leur temps de rétention ou bien sans recours à la viabilité biologique du potentiel biomarqueur, l'utilisation d'un logiciel de fragmentation *in silico* peut engendrer des erreurs. L'opérateur choisira nécessairement la molécule qui possède le score le plus important, à savoir le plus grand nombre de fragments annotés avec une erreur sur la masse la plus faible possible. Ainsi, la puissance des logiciels *in silico* ne peut être maximale que s'ils sont utilisés par des opérateurs avertis dont les compétences dépassent celles de la spectrométrie de masse, surtout lorsque le métabolome des espèces considérées n'est pas connu.

4. Biomarqueurs putatifs

La Table 79 résume le nombre de biomarqueurs putatifs issus de la première étape de notre stratégie d'identification présentée dans le sous chapitre précédent. Le nombre d'annotations issues de l'interrogation de la base de données HMDB concerne globalement 50% des variables discriminantes mises en évidence par le traitement statistique des données, indiquant ainsi une non-exhaustivité des bases de données utilisées.

	Eté				Automne			
	Ex situ		In situ		Ex situ		In situ	
	ESI -	ESI+						
Nombre de variables discriminantes	154	93	136	106	136	171	89	129
Nombre de biomarqueurs potentiels issus de l'interrogation de HMDB	545	396	362	693	187	409	208	120
Nombre de variables discriminantes concernées par cette annotation	52	53	52	59	35	64	34	27

Table 79: Nombre de variables discriminantes, de potentiels biomarqueurs issus de l'interrogation de la base de données HMDB et nombre de variables discriminantes concernées par cette annotation pour chaque campagne et chaque approche d'exposition, en mode d'ionisation positif et négatif

A titre d'exemple, parmi les 99 (35+64) variables discriminantes concernées par l'annotation de la base de données HMDB et détectées chez les organismes exposés en laboratoire lors de la campagne d'automne, 13 ont pu être identifiées de manière plus précise grâce à la stratégie mise en place au cours de ces travaux de thèse (Table 80). Ce nombre d'annotation limité, par rapport au nombre de variables discriminantes initialement mises en évidence par le traitement statistique des données, peut être en partie attribué à la faible intensité des signaux concernés pour lesquels le massif isotopique était rarement détecté et pour lesquels nous n'avons pas pu obtenir de spectre de fragmentation en raison d'un manque de sensibilité.

En l'absence de consensus sur ce qui constitue l'identification fiable d'un métabolite, Sumner et al. (2007) ont rapporté quatre niveaux d'annotation permettant de classer les composés selon les informations fournies pour leur caractérisation. Le niveau 1 concerne les composés « clairement identifiés » pour lesquels nous possédons deux types de données indépendantes et orthogonales qui sont identiques à celles d'un composé de référence. Dans le cas des plateformes de type LC-MSⁿ, ces données doivent inclure le temps de rétention, la masse exacte et l'annotation des fragments présents dans les spectres MSⁿ, ainsi que la similitude de ces paramètres avec ceux du standard de référence. Le niveau 2 concerne les composés « annotés putatifs ». En l'absence de standard analytique de référence, ces substances doivent être identifiées sur le critère de leur masse exacte monoisotopique et de leur similitude spectrale avec les spectres de substances pures disponibles dans les bibliothèques publiques ou commerciales. Le niveau 3 concerne les composés annotés putatifs dont la caractérisation permet de déterminer leur appartenance à une classe de composés. Leur annotation est basée sur leurs propriétés physico-chimiques et/ou sur leur similitude spectrale avec des composés connus appartenant à la même classe chimique. Enfin, le quatrième et dernier niveau concerne les composés inconnus. Bien que non identifiées ou non classées, ces substances peuvent néanmoins être différenciées sur la base de leur données spectrales.

Au regard de ces critères d'identification, nous avons fait le choix de présenter uniquement les métabolites identifiés dans le cadre de ces travaux comme pouvant être assimilés au niveau 2 (Table 80). L'identification de ces potentiels biomarqueurs concerne principalement des acides gras,

Chapitre 5 : Approches métabolomiques

indiquant ainsi une modification du métabolisme des lipides pouvant être corrélée à l'exposition aux effluents de STEP. Bien que l'étude du métabolisme des lipides soit plus du ressort de la lipidomique que de la métabolomique, celui-ci est encore très peu étudié dans le domaine des sciences environnementales. Notons également que l'identification de ces lipides est largement favorisée par la stratégie mise en œuvre, basée sur l'interrogation de la base de données HMDB qui présente en effet un nombre important de substances appartenant à cette classe chimique. L'objectif de cette étude étant principalement basé sur la mise en place d'une stratégie d'identification de biomarqueurs potentiels, la pertinence biologique de ces substances ne sera pas discutée dans ce manuscrit. Ces résultats pourront néanmoins être utilisés et interprétés ultérieurement en collaboration avec une équipe de biochimistes, et constitueront une première étape dans la détermination du métabolome de l'espèce *Chironomus riparius*, encore inconnu à ce jour.

Chapitre 5 : Approches métabolomiques

m/z (Da)	Tr (min)	Adduit	Formule brute du biomarqueur potentiel	Erreur par rapport à la masse exacte (ppm)	Correspondance du profil isotopique (mSigma)	Spectre de fragmentation sur la plateforme NanoLC-QqToF	Correspondance avec les spectres MS/MS sur Mass Bank	Utilisation de MetFrag	Potentiel identification du composé
199,1699	51,5	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	2,3	0,5	Oui	Oui	Annotation de l'unique fragment (erreur= -0,6 ppm)	Acide Laurique
221,1542	45,5	[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	2,4	12,3	Oui	Aucun spectre MS/MS disponible	Annotation d'un fragment sur 2 (erreur = 1 ppm)	Rishitin, Isokobusone, Kobusone
287,2215	44,1	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₃₂ O ₄	4,5	13,3	Oui	Aucun spectre MS/MS disponible	Annotation de 4 fragments sur 6 (erreur < 5ppm)	Acide 10,16-Dyhydroxyhexadecanoïque
282,2785	56,2	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₅ NO	2,3	7,5	Oui	Aucun spectre MS/MS disponible	Annotation d'un fragment sur 2 (erreur =1,1 ppm)	Oléamide
310,3095	59,8	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₉ NO	3,0	10,6	Oui	Oui	Aucun fragment annoté	1-hexadecanoylpyrrolidine
496,3378	53,6	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	2,6	1,08	Oui	Aucun spectre MS/MS disponible	Annotation de 2 fragments sur 3 (erreur < 5ppm)	LysoPC (16 :0)
661,4833	38,7	[M+Na] ⁺	C ₄₁ H ₆₆ O ₅	-4,6	26	Oui	Aucun spectre MS/MS disponible	Annotation de 3 fragments sur 4 (erreur < 5ppm)	Diglycérade (plusieurs possibilités)

Table 80: Annotations putatives des variables discriminantes

Chapitre 5 : Approches métabolomiques

m/z (Da)	Tr (min)	Adduit	Formule brute du biomarqueur potentiel	Erreur par rapport à la masse exacte (ppm)	Correspondance du profil isotopique (mSigma)	Spectre de fragmentation sur la plateforme NanoLC-QqToF	Correspondance avec les spectres MS/MS sur Mass Bank	Utilisation de MetFrag	Potentiel identification du composé
162,0556	32,4	[M-H] ⁻	C ₉ H ₉ NO ₂	-3,6	10	Oui	Aucun spectre MS/MS disponible	Annotation d'un fragment sur 2 (erreur =0,6 ppm)	3-Methyldioxyindole
171,1035	30,9	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₆ O ₃	-4,7	22	Oui	Aucun spectre MS/MS disponible	Annotation de l'unique fragment (erreur = 2,4ppm)	Acide 9-Oxononanoïque
295,2293	51,4	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	-4,8	3,2	Oui	Oui	Annotation de 3 fragments sur 4(erreur<5ppm)	Acide 13-Hydroxyoctadecadiénoïque
307,2278	52,9	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	-0,8	26,2	Oui	Aucun spectre MS/MS disponible	Annotation de 2 fragments sur 2 (erreur<5ppm)	5-Androstenetriol
409,3425	43,9	[M+Na] ⁺	C ₂₇ H ₄₆ O	-1,9	13,4	Oui	Oui	Annotation de 2 fragments sur 3 (erreur<5ppm)	Cholestérol
542,3229	49,6	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₄₈ NO ₇ P	2,2	2,4	Oui	Aucun spectre MS/MS disponible	Annotation d'un fragment sur 2 (erreur=-3,8ppm)	LysoPC(20 :5)

Table 80 suite : Annotations putatives des variables discriminantes

Bien que la majorité des biomarqueurs putatifs annotés dans le cadre de ces travaux de thèse puissent être considérés comme appartenant au niveau 2 d'identification proposé par Sumner *et al.* (2007), la stratégie mise en œuvre a également permis d'identifier des substances de niveaux 1. Ces composés ont majoritairement été annotés grâce à l'interrogation de la base de données DrugBank, et correspondent à des substances pharmaceutiques exclusivement exogènes. L'identité de ces composés a pu être confirmée par comparaison des données chromatographiques et spectrales de standards analytiques purs disponibles au laboratoire.

A titre d'exemple, le propranolol (bêta-bloquant) a été identifié chez les larves d'insecte encagées dans la rivière Brevènne lors de la campagne d'exposition estivale. L'adduit $[M+H]^+$ a été annoté avec une erreur de 1,2 ppm par rapport à la masse monoisotopique exacte. La correspondance des massifs isotopiques théoriques et expérimentaux était équivalente à $mSigma=5,3$. L'étude des spectres de fragmentation a permis de déterminer la structure de plusieurs fragments illustrés sur la Figure 117. Ces fragments étant identiques à ceux obtenus par fragmentation de la substance pure, l'identité de cette substance pharmaceutique a pu être confirmée.

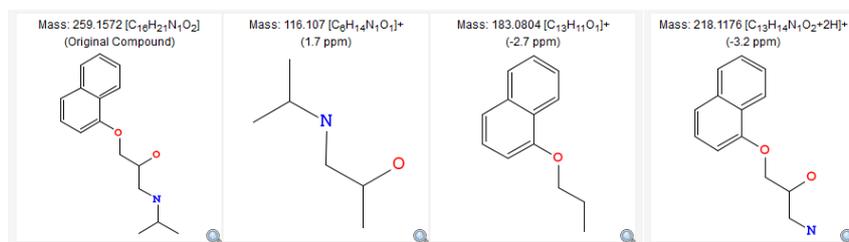


Figure 117: Annotation des ions produits obtenus par fragmentation de la variable discriminante correspondant au propranolol

De la même manière, l'hydroxyibuprofène, métabolite de phase I de l'AINS ibuprofène a pu être identifié chez les chironomes exposés en laboratoire lors de la campagne d'exposition automnale. Le spectre MS/MS présenté sur la Figure 118 fournit de précieuses informations structurales. L'utilisation du logiciel de fragmentation *in silico* MetFrag permet notamment d'annoter la majorité des fragments détectés et d'en déterminer la structure, confirmant ainsi l'identité du biomarqueur putatif.

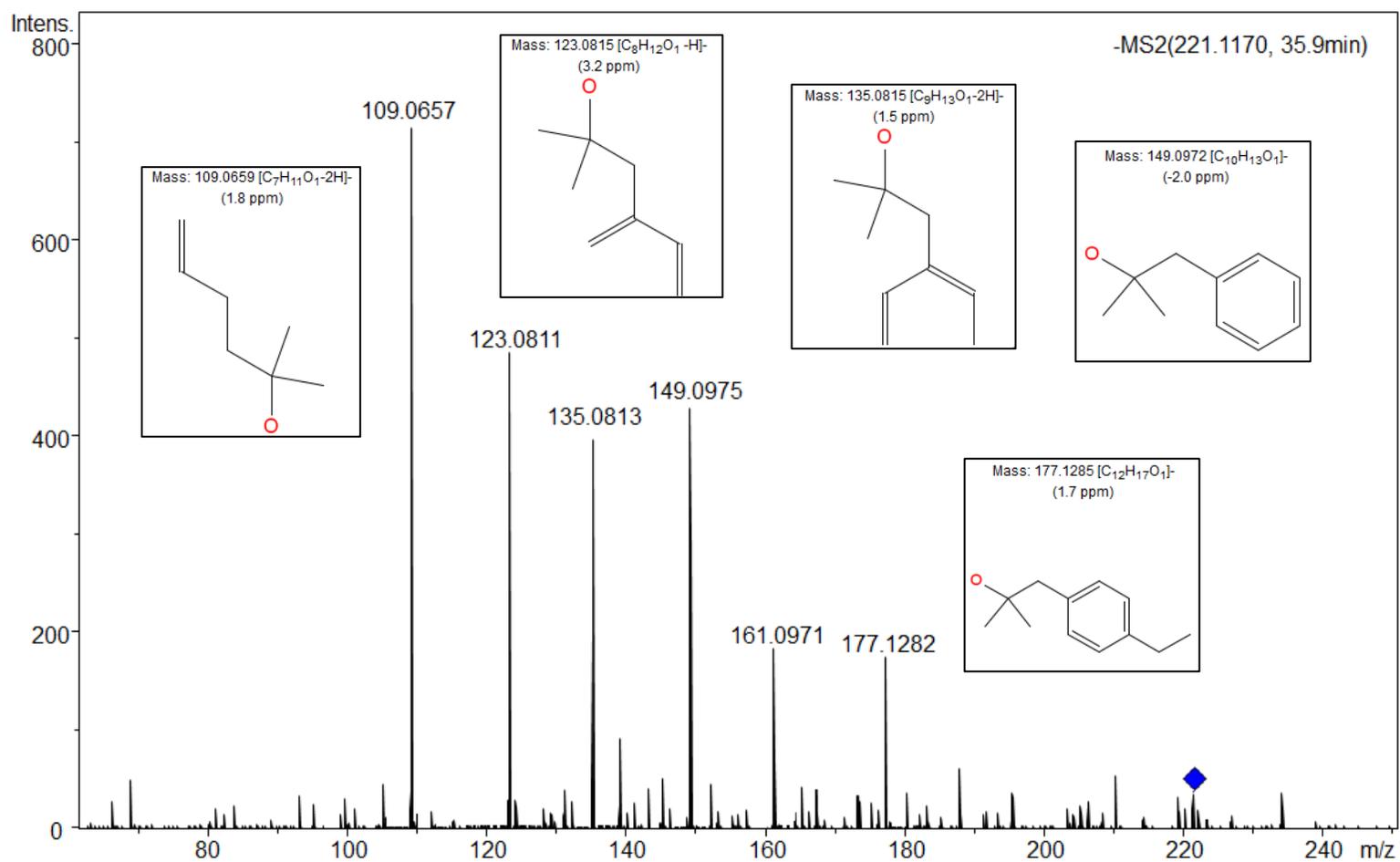


Figure 118: Spectre de fragmentation (Energie de collision = 25 eV) de la variable discriminante ($m/z = 221,1170$ Da ; $t_r = 35,9$ min) annoté comme étant l'un des isomères de l'hydroxybuprofène

Seul le fragment correspondant à un ratio m/z de 161,0971 n'a pas été annoté par le logiciel de fragmentation *in silico* comme pouvant provenir de l'hydroxyibuprofène. Notons cependant que ce fragment est caractéristique de l'ibuprofène, molécule mère du métabolite suspecté (Figure 119).

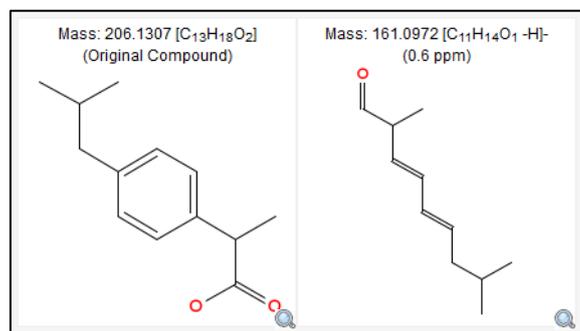


Figure 119: Fragmentation *in silico* de l'AINS ibuprofène mettant en évidence la structure du fragment 161,0971 Da

L'utilisation d'un standard analytique pur a permis de confirmer l'identification de ce biomarqueur potentiel grâce à la correspondance des temps de rétention et à la similitude des spectres de fragmentation. Il semble cependant nécessaire de souligner qu'il existe trois isomères de l'hydroxyibuprofène, dépendants de la position de la fonction $-OH$ sur la chaîne aliphatique. Dans notre cas, nous avons utilisé un standard analytique correspondant au 2-hydroxyibuprofène. Bien que les temps de rétention de ce métabolite soient identiques entre l'échantillon et le standard, nous ne pouvons confirmer la position du groupement hydroxy. Pour cela, il est nécessaire de posséder les standards analytiques correspondant à chacun des isomères et d'optimiser la séparation chromatographique afin de séparer chacun d'entre eux. Dans ce cas, il serait alors possible de discriminer les différents isomères les uns des autres sur la base de leur temps de rétention. Si cette opération s'avérait impossible, il serait alors envisager d'isoler le composé afin de réaliser des analyses structurales en utilisant la RMN par exemple.

Bien que dans le cadre de ces travaux de thèse nous ne puissions confirmer l'identité de tels ou tels isomères, l'annotation de ce métabolite comme étant l'un des isomères de l'hydroxyibuprofène reste néanmoins un résultat très intéressant. En effet, ce composé, dont le caractère discriminant avait été mis en évidence par l'analyse statistique des données, n'a été détecté que chez les organismes exposés en laboratoire lors de la campagne d'exposition automnale. L'étude des EIC a permis de confirmer sa non détection lors de l'approche d'exposition *in situ*. Ces observations semblent donc témoigner de la pertinence des résultats obtenus lors de la réalisation des analyses de type ciblé pour lesquels l'ibuprofène, molécule mère du métabolite annoté, n'avait également été détecté que lors des expositions en laboratoire. Ces résultats confirment donc l'impact des conditions d'exposition sur le métabolisme des larves d'insecte et souligne la complémentarité des approches mises en œuvre dans le cadre de ces travaux de thèse.

Conclusion

L'étude présentée dans ce chapitre montre l'applicabilité de la stratégie métabolomique à la discrimination et à la classification d'invertébrés benthiques exposés aux pressions anthropiques.

L'utilisation d'une plateforme analytique adaptée à l'analyse de matrices complexes et le choix de méthodes chimiométriques adaptées aux données acquises ont permis d'obtenir des empreintes moléculaires reproductibles, témoignant ainsi de la pertinence du couplage NanoLC-QqToF mis en œuvre lors de ces approches métabolomiques. Ces empreintes moléculaires ont mis en évidence une partie conséquente de l'information biologique contenue dans les échantillons biotiques. Plusieurs signaux discriminants ont ainsi été sélectionnés grâce à l'utilisation de méthodes statistiques et/ou mathématiques univariées et multivariées.

Dans le cadre de ces travaux, nous avons pu aborder les difficultés liées à l'étude d'échantillons biotiques en étudiant l'impact des conditions de stockage et de manipulation des échantillons sur la qualité des empreintes moléculaires.

Ces approches globales permettent de comprendre la structure des données de type « omiques » obtenues sur une plateforme NanoLC-HRMS ainsi que les principes théoriques des principaux outils mathématiques et statistiques visant à réduire la complexité des données et facilitant l'interprétation des résultats. Tout au long de cette étude, nous avons détaillé les étapes de transformations subies par les données brutes, de l'acquisition jusqu'à l'annotation des signaux en passant par différentes procédures de filtration de données et de sélection de variables. Une attention toute particulière a été portée sur la pertinence des modèles créés et plus précisément aux facteurs influençant leur interprétation.

Cette études a mis en évidence des empreintes moléculaires extrêmement riches en informations et très sensible à la nature des échantillons étudiés. L'impact de la contamination du milieu aquatique, ainsi que l'influence des conditions d'exposition sur le métabolisme des invertébrés benthiques étudiés ont en effet été mis en exergue. Il semble néanmoins nécessaire de confirmer les conclusions issues de cette première étude sur des cohortes d'organismes aquatiques plus importantes.

Enfin, ce chapitre a permis de mettre en œuvre une stratégie d'identification de potentiels biomarqueurs, mettant ainsi l'accent sur la difficulté d'annoter les signaux discriminants issus du traitement statistique des données. En effet, bien que les approches non-ciblées semblent être adaptées aux études du métabolome des invertébrés benthiques, nos résultats permettent d'ouvrir la discussion sur les difficultés liées à ces approches globales et de formuler quelques perspectives de travail. A ce jour, peu d'études métabolomiques appliquées à l'environnement ont permis d'identifier un grand nombre de métabolites. Il apparait donc nécessaire de développer des stratégies d'identification qui contribueront à la découverte de biomarqueurs et à l'identification de voies métabolomiques pouvant être modifiées en réponse à une perturbation biologique. Depuis plusieurs années, le challenge analytique lié à l'identification de métabolites a contribué à la mise en place de base de données telle que la HMDB, permettant de faciliter l'affectation des pics et contribuant à

Chapitre 5 : Approches métabolomiques

l'amélioration des connaissances. Toutefois, et sans surprise, les métabolites recensés dans cette base de données se concentrent sur des mammifères et en particulier sur la biologie humaine. La création de bibliothèques de métabolites réservés aux organismes non-mammifères apparaît donc comme nécessaire au développement de la métabolomique environnementale. La diversité des royaumes végétal et animal étant colossale, les ressources auront tout intérêt à se concentrer sur un nombre limité d'espèces sentinelles. Notons également que la majorité des études métabolomiques appliquées à l'environnement portent sur des métabolites polaires à moyennement polaires, peu d'entre elles mettent l'accent sur l'analyse des lipides. Néanmoins, il existe sans doute beaucoup de composés lipidiques inconnus et encore non caractérisés chez les invertébrés. Par conséquent, il est probable que dans un futur proche, l'analyse des lipides puisse jouer un rôle important dans la compréhension des changements associés aux stress environnementaux.

En conclusion, plusieurs étapes doivent être prises en compte afin de faire avancer la métabolomique environnementale. Ces étapes comprennent les questions liées à l'amélioration de la connaissance du métabolisme de base, à l'identification des métabolites et à une meilleure exploitation des ressources et du savoir. D'un point de vue technique, les chercheurs ont besoin d'être sélectifs dans le choix des outils analytiques et informatiques qui jouent un rôle prédominant dans l'interprétation des données.

Chapitre 6:

*Etude des cinétiques
d'accumulation et de
dépuraction de potentiels
traceurs de pollution
anthropique chez
Gammarus fossarum
par MicroQuEChERS-
NanoLC-MRM³*

Introduction

Les organismes aquatiques peuvent être exposés à une multitude de micropolluants organiques associés aux diverses activités humaines. Si l'exposition à ces produits chimiques pose un risque pour les espèces peuplant nos écosystèmes aquatiques, il est avant tout dépendant de la probabilité et de l'ampleur de l'exposition. Ainsi, la concentration et la durée de l'exposition au polluant, la sensibilité de l'organisme vis-à-vis du facteur de stress chimique, le mode d'action de la substance chimique sont des paramètres indispensables à l'évaluation des risques environnementaux.

Pour exercer un effet toxique sur l'organisme, le composé doit atteindre le site d'action toxique de l'organisme (Mccarty et Mackay, 1993). L'utilisation des concentrations internes de substances toxiques dans les organismes aquatiques réduit la variabilité de mesure de toxicité pour différents composés (Hendriks *et al.*, 2005). Ainsi, la concentration interne s'affiche aujourd'hui comme un meilleur indicateur de la dose biologiquement active que les concentrations d'exposition externes.

Les toxicocinétiques sont les processus qui décrivent l'évolution dans le temps de la concentration de substance toxique dans l'organisme et qui contribuent à la bioaccumulation. Les constantes de vitesse d'absorption et d'élimination varient en fonctions des organismes mais également en fonction des composés (Lotufo *et al.*, 2000; Nuutinen *et al.*, 2003). Une partie de cette variation peut être attribuée aux propriétés physico-chimiques de la molécule, ainsi qu'aux caractéristiques biologiques des organismes, telles que la teneur en lipide ou la taille. Cependant, des processus sous adjacents et encore mal connus peuvent affecter l'absorption et la sensibilité des espèces aux contaminants. A titre d'exemple, Rubach *et al.* (2011) ont suggéré que la reproduction, le type de respiration, d'alimentation ou d'habitat étaient des traits biologiques clés dans la détermination de la sensibilité des organismes aquatiques aux pesticides. L'effet cocktail est également un paramètre affectant ces processus biologiques. L'évaluation des cinétiques d'accumulation est d'une importance capitale dans la mesure où elle peut fournir une première étape dans la compréhension des mécanismes liés aux principaux défis actuels de l'écotoxicologie.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était de développer des outils analytiques permettant d'évaluer les cinétiques d'accumulation et de dépuration de 3 substances identifiées précédemment potentiels traceurs de pollution anthropique (carbamazépine, oxazépam et testostérone) chez *Gammarus fossarum*.

Partie A : Développement d'une méthode d'analyse par MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³

1. Introduction

Une quantification précise et fiable des concentrations internes de contaminants environnementaux dans les matrices biotiques est aujourd'hui nécessaire pour les phases d'évaluation des risques écotoxicologiques associés à cette pollution. Comme présenté dans le Chapitre 1 de ce manuscrit, la spectrométrie de masse en tandem apparaît aujourd'hui comme une technique de choix. L'appareil de prédilection utilisé pour les études quantitatives est le triple quadripôle, où le filtrage d'une masse en Q1 et d'une seconde masse en Q3, permet d'obtenir des méthodes spécifiques pour dépasser la complexité des mélanges étudiés. L'intérêt de la MRM pour la quantification absolue de polluants émergents a plusieurs fois été démontré non seulement pour des concentrations de l'ordre de la trace, mais également sur des concentrations proches de l'ultra-trace.

Cependant, sa spécificité s'avère parfois insuffisante dans le cas des matrices biotiques. Plus la matrice est chargée en composés, et plus il devient difficile d'obtenir une spécificité correcte. En effet, au sein d'un mélange si complexe, il est courant de rencontrer des composés possédant des masses relativement proches, qu'il va être difficile de distinguer sur un appareil dit basse résolution, comme c'est le cas du triple quadripôle. En effet, la résolution unitaire de ce type d'analyseur ne permet pas de distinguer 2 composés qui possèdent une différence de masse inférieure à 0.5 Da (0.35 Da pour les appareils les plus récents comme le QTRAP 5500 utilisé ici). Ainsi, malgré la double sélectivité utilisée, il est courant de voir un signal MRM interféré lors de l'analyse de polluants dans des matrices biotiques.

Plusieurs stratégies peuvent alors être mises en place pour contourner ce problème. La première est liée au système chromatographique, puisqu'en améliorant la séparation lors du gradient utilisé, il est parfois possible de s'affranchir de l'interférence. On voit ainsi apparaître des stratégies de gradients longs, notamment en nanochromatographie (Hsieh *et al.*, 2013), ou de séparation à partir de systèmes de chromatographie liquide bidimensionnelle (LC-2D) (Simon *et al.*, 2014). Cependant, cette optimisation n'est pas toujours possible en raison de l'importante hétérogénéité des contaminants présents en mélange, dont certains vont posséder des caractéristiques physico-chimique très proches. Une autre stratégie consiste à améliorer la préparation d'échantillon, afin d'éliminer l'interfèrent au sein du mélange, en fractionnant par exemple l'échantillon. Cependant, non seulement cette stratégie est parfois incompatible avec une approche multi-résidus, mais elle peut également se révéler très coûteuse et difficile à mettre en place pour de longues séries d'échantillons.

L'utilisation de la haute résolution pour des études quantitatives a récemment été possible, notamment grâce au développement de nouveaux appareils hybrides (Cortes-Francisco *et al.*, 2011). L'idée est ici de combiner des analyseurs de nature différente au sein d'un même appareil pour cumuler leurs avantages. Ainsi, un quadripôle, est généralement utilisé comme filtre sur les ions

précurseurs, avant de produire un spectre de fragmentation analysé par un analyseur haute résolution, tel que le ToF ou l'Orbitrap. En utilisant ce type d'analyseur, il est possible de distinguer 2 ions de masse proche.

D'autres stratégies, ne reposant pas sur des appareils haute résolution, ont également été proposées. La mobilité ionique, par l'intermédiaire de la section efficace, permet de façon simple d'augmenter la sélectivité de l'ion précurseur (Kolakowski et Mester, 2007). Enfin, une stratégie alternative, reposant sur une fragmentation supplémentaire de l'ion fragment primaire a été proposée pour l'analyse de protéines, appelée MRM³ (Fortin *et al.*, 2009) et présentée en Figure 120.

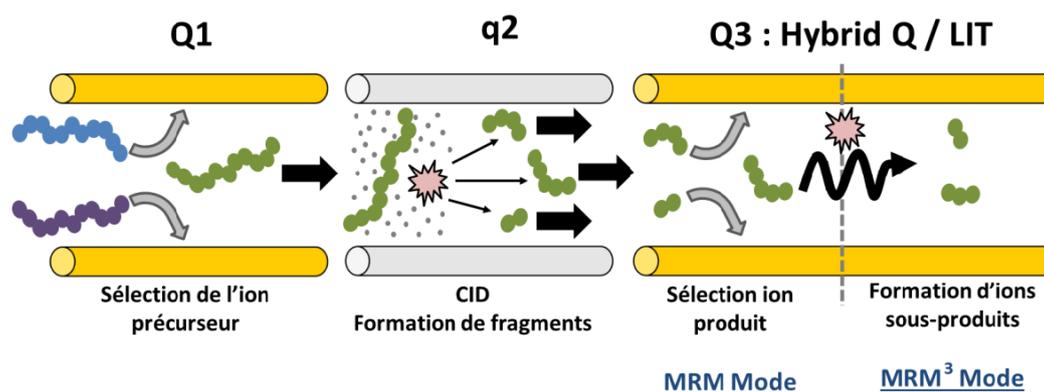


Figure 120: Principe de fonctionnement de la MRM³, réalisé sur un appareil de type QTrap

Reposant sur la combinaison d'un quadripôle et d'une trappe ionique linéaire (QTRAP), cette stratégie a démontré une augmentation significative de la spécificité, permettant d'atteindre une LOQ de 5 ng/mL pour l'antigène spécifique de la prostate (PSA) dans du sérum humain (Lemoine *et al.*, 2008). Des études récentes démontrent également l'apport de la MRM³ pour distinguer et quantifier différentes méthylarginines dans des levures ou des glycopeptides (Lakowski *et al.*, 2013). Bien que cette stratégie analytique semble avoir trouvé son applicabilité dans le domaine de la protéomique, elle n'a jusqu'à présent pas été utilisée pour l'analyse de petites molécules telles que les contaminants environnementaux. On note également l'absence de publication relative à l'utilisation d'un tel mode de détection en couplage avec la nanochromatographie liquide.

Le travail présenté ici s'intéresse à l'utilisation de la MRM³ pour quantifier 3 traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum*. Le 5500 QTRAP permettant de travailler à la fois en mode MRM et en mode MRM³ (Figure 120), les performances de ces modes de quantification seront comparées, et l'apport de la MRM³ dans le cadre de la quantification de polluants émergents en matrice complexe sera discuté. L'optimisation des paramètres nanochromatographiques, en configuration identique à celle présentée dans le chapitre 3 de ce manuscrit sera réalisée en deux étapes : (i) la pré-concentration en ligne sera optimisée selon la méthodologie des plans d'expériences qui nous permettra de mettre en exergue l'influence de chacun des paramètres investigués sur la réponse des analytes ciblés ; (ii) la séparation sera optimisée de manière à obtenir une résolution suffisante, indispensable à une détection par MRM³, tout en conservant une durée

*Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³*

d'analyse la plus courte possible. Enfin, la préparation d'échantillon sera similaire à celle proposée dans le chapitre 3 de ce manuscrit et basée sur la miniaturisation de la méthode QuEChERS. A l'inverse des méthodes précédemment développées pour lesquelles la purification sur phase dispersive ne permettait pas d'obtenir des résultats satisfaisants, cette technique de purification sera investiguée au regard d'une liste de molécules beaucoup plus réduite. La nature et la quantité d'adsorbant seront ainsi optimisées.

La méthode développée et validée, incluant extraction de type MicroQuEChERS et analyse par NanoLC-MRM³ sera finalement appliquée à l'échelle d'un individu à des organismes exposés en laboratoire et soumis à différentes concentrations de polluants en mélange. Les cinétiques d'accumulation et de dépuration seront suivies sur 14 et 2 jours respectivement. Dix individus seront analysés en chaque point de la cinétique, ce qui nous permettra d'évaluer les diversités de réponse interindividuelle.

2. Optimisation de la détection par MRM³

Comme pour le mode MRM classique, la détection par spectrométrie de masse en mode MRM³ nécessite d'être optimisée. Les premières étapes de la procédure sont identiques à celles de la MRM: une solution contenant les composés et un modificateur organique comme l'acide acétique ou l'acide formique qui permettent de favoriser leur ionisation en mode positif, sont infusés, c'est-à-dire introduits directement en continu dans le spectromètre de masse. Dans un premier temps, le declustering potential (DP), l'énergie potentielle (EP) et l'énergie de collision (CE) sont optimisées pour chacun des composés afin d'obtenir les meilleurs spectres de fragmentation MS/MS. La détermination des DP, EP et CE optimaux peut être réalisées de façon automatisée sur le 5500 QTRAP. A ce stade, le couple ion parent/ion produit constitue une transition MRM. L'ion produit est alors sélectionné, piégé et fragmenté dans la trappe linéaire. Une transition MRM³ est ainsi définie par le triplet Ion parent/Ion produit/Ion sous-produit.

Afin d'obtenir une telle transition, il est d'une importance capitale d'optimiser les paramètres spécifiques à la trappe, tels que :

- L'énergie d'excitation (AF2) qui va induire la fragmentation de l'ion produit dans la trappe et jouer de manière très sensible sur l'intensité des ions sous-produits.
- Le temps de piégeage de l'ion produit dans la trappe (Fill time (FT))
- La vitesse de balayage
- La taille du pas de balayage

L'énergie d'excitation (AF2) est un paramètre composé dépendant qui va induire la fragmentation de l'ion produit (ion de première génération) dans la trappe. Elle est assimilée à l'énergie d'entrée en résonance de l'ion produit, ce qui va induire sa fragmentation. C'est un paramètre extrêmement sensible qui nécessite une optimisation manuelle par infusion et requiert des pas de variation très resserrés. La Figure 121 illustre l'influence de cette énergie d'excitation sur l'intensité de l'ion sous-produit sélectionné pour la testostérone. Une très faible augmentation de l'AF2 permet d'atteindre

un maximum d'intensité qui va très rapidement décroître lorsque l'énergie d'excitation deviendra trop importante. Cette décroissance rapide peut être attribuée à la fragmentation de l'ion sous-produit.

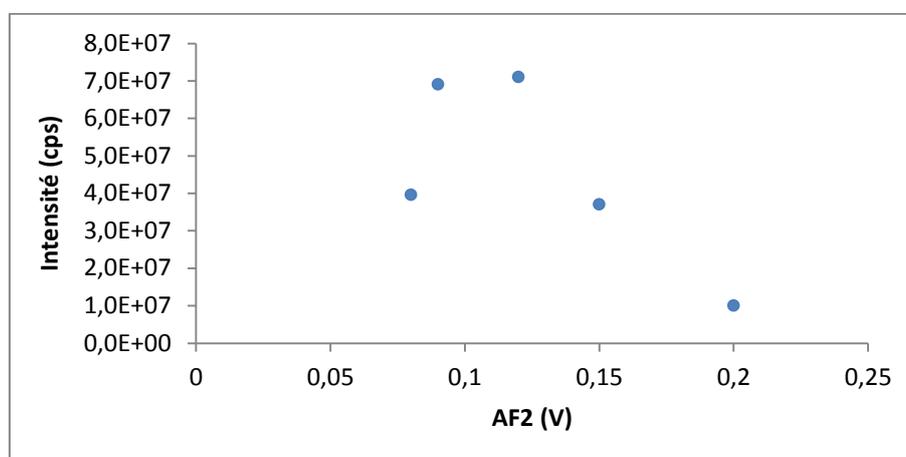


Figure 121: Influence de l'énergie d'excitation sur la fragmentation en MRM³ (Exemple de la transition 189,4/109,4/79,0 (m/z) de la testostérone)

Les spectres de fragmentation obtenus avec les paramètres optimaux (Table 81) pour chacun des composés ciblés lors de cette étude sont présentés dans la Figure 122. Les cercles verts correspondent aux ions de seconde génération retenus pour la reconstitution du signal MRM³ qui sera utilisé pour la quantification. Ils correspondent aux transitions 237,3/194,1/179,0 (m/z) pour la carbamazépine (Figure 122A), 286,7/269,1/241,0 (m/z) pour l'oxazépam (Figure 122B) et 189,4/109,1/79,0 (m/z) pour la testostérone (Figure 122C). Pour la testostérone, la fragmentation de l'ion 109,1 conduit également au fragment 81 (cerclé en rouge sur la Figure 122C) d'intensité légèrement inférieure à l'ion 79. Il aurait été possible d'utiliser ces deux fragments pour reconstituer le signal MRM³ final afin de gagner en sensibilité, ce qui est une pratique courante lors de l'utilisation d'un tel mode. Mais après des essais dans la matrice, il s'est avéré que ce fragment n'était pas spécifique de la testostérone. C'est pourquoi, seul l'ion 79 a été retenu.

	Ion précurseur (m/z)	Ion produit en Q2 (m/z) (Ion produit)	Ion produit en Q3 (m/z) (Ion sous-produit)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	AF2 (V)
Carbamazépine	237,3	194,1	179,0	126	10	29	0,11
Oxazépam	286,7	269,1	241,0	106	10	23	0,15
Testostérone	289,4	109,1	79,0	126	10	31	0,12

Table 81: Paramètres MRM³: transitions, ions précurseurs, ions produits issus des deux fragmentations, declustering potential (DP), énergie potentielle (EP), énergie de collision (CE), énergie d'excitation (AF2)

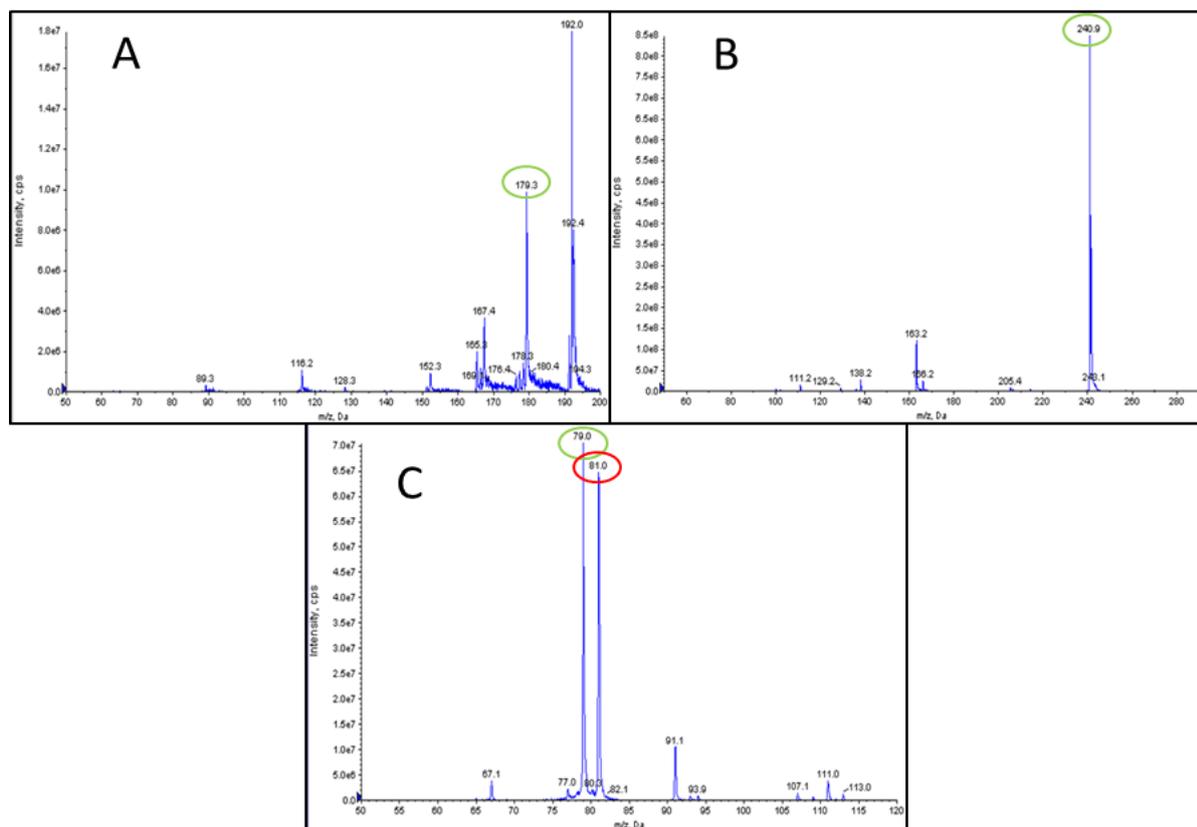


Figure 122: Spectres de fragmentation MS/MS/MS obtenus à partir des ions 237,3/194,1 de la carbamazépine (A), 286,7/269,1 de l'oxazépam (B) et 189,4/109,1 de la testostérone (C) dans les conditions optimales. Les fragments cerclés en vert sont ceux retenus pour la quantification en MRM³

Il existe deux possibilités permettant de régler le temps de piégeage de l'ion produit dans la trappe : celui-ci peut être fixe (FT) ou bien dynamique (DFT). Le mode dynamique ajuste automatiquement le temps de piégeage permettant de remplir le piège à ions sur la base du flux d'ions provenant de la source, alors que pour le mode fixe, la durée est la même quel que soit le nombre d'ions piégés. Lors de l'utilisation du mode MRM³ à des fins quantitatives, un FT fixe est souvent recommandé, et ce pour deux raisons principales. D'une part, lorsque le temps de piégeage de l'ion produit est fixe, le rapport cyclique est identique pour chaque analyse, ce qui garantit le même nombre de points par pic chromatographique, assurant ainsi une plus grande précision et une meilleure reproductibilité. D'autre part, lorsque l'on utilise un FT fixe, il est possible d'activer l'option « Q0 trapping ». Le Q0 est un quadripôle de faible longueur pour lequel il existe une seule radio fréquence. Par conséquent, celui-ci ne réalise aucune filtration des ions provenant de la source. Il est utilisé pour maximiser la transmission des ions. L'option « Q0 trapping » permet également d'augmenter la sensibilité et la durée de chargement de la trappe. En effet, en activant cette option, les ions issus du processus d'ionisation sont piégés dans la région Q0 tandis que les ions sélectionnés et fragmentés dans la trappe sont éjectés vers le détecteur, minimisant ainsi la perte d'information.

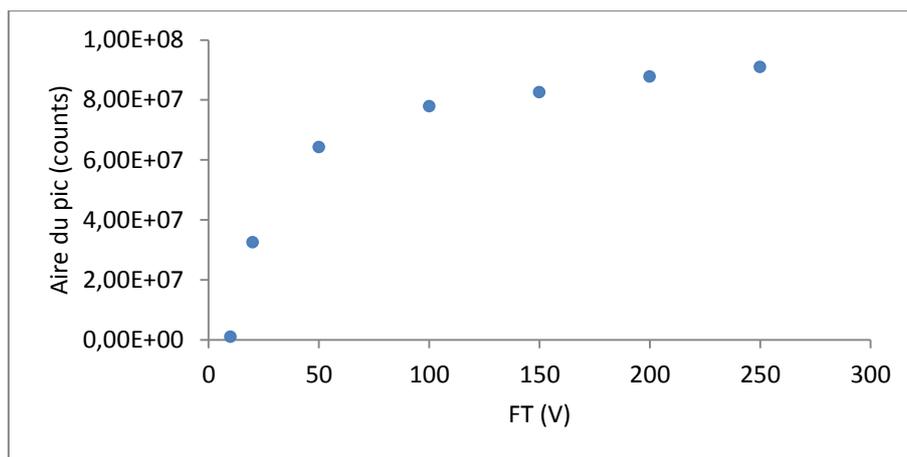


Figure 123: Aire du pic correspondant à l'oxazépam pour un extrait de *Gammarus fossarum* dopé à 30 ng/g en fonction du temps de piégeage dans la trappe (FT)

En faisant varier la valeur de FT tout en activant l'option Q0 trapping, nous avons pu constater que le signal augmentait lorsque FT augmentait, et ce jusqu'à saturation de la trappe (Figure 123). Cependant, en augmentant le temps de piégeage des ions, on augmente le temps de cycle, ce qui diminue le nombre de point par pic. Une exigence fondamentale pour caractériser un pic chromatographique est d'obtenir un nombre de points optimal, a minima compris entre 15 et 20 lors d'études quantitatives. La vitesse de balayage, ainsi que la gamme de masse scannée affectent également le temps de cycle. A titre d'exemple, à une vitesse de balayage de 1000 Da/s et pour une gamme de masse de 1 Da, le cycle total est de 354 ms pour un FT de 200 ms. Pour une même vitesse de balayage mais avec une gamme de masse correspondant à 500 Da, le nombre de points par pic diminue d'un facteur 2 environ, en raison d'un temps de cycle de 500 ms. Pour pallier à ce problème, plusieurs possibilités s'offrent à nous. Tout d'abord, il est possible d'augmenter la vitesse de balayage ce qui réduit considérablement le temps de cycle. Notons cependant que la vitesse de balayage influe également sur l'intensité du signal mesuré. Les signaux les plus intenses ont été obtenus avec une vitesse de balayage de 1000 Da/s. Ce résultat peut être expliqué par le fait qu'à 10000 ou 20000 Da/s, les ions n'ont pas le temps de se stabiliser et de se concentrer dans la trappe, ils sont donc perdus lors de l'éjection vers le détecteur. Dans notre cas, il ne semble donc pas envisageable de travailler à une vitesse de balayage supérieure à 1000 Da/s. Afin d'obtenir un temps de cycle satisfaisant, nous avons donc opté pour une seconde solution. Comme le chromatogramme d'ion est reconstruit à partir des ions sous-produits (ion de deuxième génération), un moyen simple pour augmenter le signal est de réduire la taille du pas de balayage. Ainsi pour une vitesse de balayage de 1000 Da/s, la surface du pic correspondant à l'oxazépam a été multipliée par 20 lors du changement de la taille du pas de balayage de 0,5 à 0,12 Da. Nous avons ensuite réduit la gamme de masse scannée, ce qui nous a permis de réduire le temps de cycle de façon spectaculaire. Finalement, les aires les plus importantes ont été obtenues avec une vitesse de balayage de 1000 Da/s et une taille de pas de 0,12 Da. Les fenêtres de scan ont été fixées à 20 Da pour les 3 molécules ciblées. Les paramètres optimaux nous permettent d'obtenir des temps de cycle de l'ordre de 400 ms, ce qui correspond à un minimum de 100 points par pics.

3. Optimisation de la pré-concentration en ligne

Au regard des résultats obtenus lors de l'optimisation des méthodes multi-résidus précédemment détaillée dans le chapitre 3 de ce manuscrit, il s'est avéré que l'étape de pré-concentration en ligne, permettant d'injecter un large volume d'échantillon sur le système nanochromatographique, était une étape complexe, matrice et composé dépendants. Plusieurs facteurs vont en effet influencer la rétention des composés ciblés sur la cartouche de chargement et donc la qualité du piégeage, mais certains d'entre eux vont aussi avoir un impact non négligeable sur la détection, puisque la pré-colonne de chargement apporte, dans une moindre mesure une étape de purification supplémentaire. Certains interférents seront plus ou moins retenus ou éliminés pendant cette étape, ce qui peut avoir une incidence sur le rendement d'ionisation en source nano-ESI, et donc sur l'intensité du signal mesuré. Bien que les caractéristiques de la cartouche de chargement utilisée lors de cette étude soient identiques à celles mise en œuvre lors du développement des méthodes analytiques relatives à notre première étude, il a été décidé d'optimiser l'étape de pré-concentration en ligne par la méthodologie des plans d'expériences.

3.1. Introduction aux plans d'expériences (d'après Jacques Goupy, 2013)

Les plans d'expériences sont aujourd'hui utilisés dans de nombreuses études de recherche et développement principalement liées aux domaines industriels. Leur utilisation vise à (i) déterminer des facteurs clés dans la conception d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé ; (ii) optimiser les réglages d'un procédé de fabrication ou d'un appareil de mesure ; (iii) prédire par modélisation le comportement d'un procédé. Le succès de la démarche originale des plans d'expériences réside dans la possibilité d'interprétation des résultats expérimentaux avec un effort minimal sur le plan expérimental: la minimisation du nombre d'expériences nécessaires permet un gain en temps et en coût non négligeable. Il faut néanmoins comprendre que les plans d'expériences ne sont pas un outil destiné *a priori* à la recherche fondamentale car ils ne permettent pas une explication du phénomène physico-chimique étudié. Dans notre cas, cette stratégie sera uniquement utilisée afin d'évaluer l'influence et l'interaction des paramètres expérimentaux sur la réponse des analytes, afin de déterminer le meilleur compromis analytique.

Les chercheurs sont souvent amenés à comprendre comment réagit un système en fonction des facteurs susceptibles de le modifier. Pour visualiser cette évolution, ils mesurent une réponse et vont ensuite tenter d'établir des relations de cause à effet entre les facteurs et les réponses (Figure 124). Parmi les facteurs, on distinguera :

- Les facteurs contrôlables qui dépendent directement du choix de l'opérateur (pression, température, matériau...)
- Les facteurs non contrôlables qui varient indépendamment du choix du technicien (conditions climatiques, environnement d'utilisation...)
- Les facteurs d'entrée dont on cherche à évaluer l'influence (débit, rendement, composition d'un mélange...)

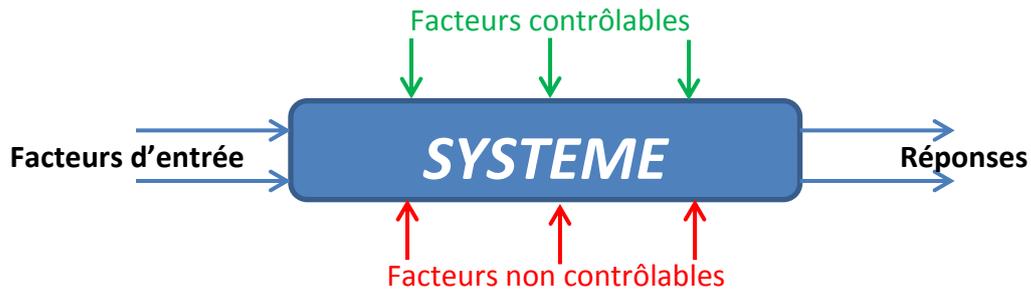


Figure 124: Diagramme simplifié des paramètres propres à un système selon le vocabulaire des plans d'expériences

Les facteurs étudiés dans un plan d'expériences sont bien entendu les facteurs d'entrée. Un facteur est une grandeur le plus souvent mesurable mais il peut s'agir d'une grandeur qualitative. La réponse fait référence à la grandeur mesurée à chaque expérimentation ; la méthodologie des plans d'expériences vise à déterminer quels facteurs l'influencent ou quelle est son évolution en fonction de ceux-ci. Une troisième notion importante est celle d'interaction entre deux facteurs d'entrée. On parle d'interaction entre deux facteurs A et B quand l'effet du facteur A sur la réponse va dépendre de la valeur du facteur B.

Bien que l'application d'une telle méthodologie soit simple à mettre en œuvre et ne nécessite que des connaissances de base en statistiques élémentaires, la phase de réflexion préliminaire est primordiale. A ce niveau, il est important de fixer l'objectif de l'étude de façon claire et précise, et de réunir les diverses connaissances relatives au sujet. Toutes les informations recensées seront essentielle pour les questions suivantes :

- Choix de la réponse la plus judicieuse
- Facteurs potentiellement influents
- Choix du domaine d'étude de ces facteurs
- Eventuelles interactions à rechercher
- Contrôle des facteurs non étudiés

La connaissance du sujet acquise auparavant est indispensable ; le résultat final peut être tronqué si un facteur oublié se trouve être un facteur d'influence. Une autre difficulté importante est liée à la détermination du domaine d'étude. Le domaine de variations des facteurs d'entrée étudiés doit permettre de couvrir le domaine réel d'utilisation de ces facteurs, mais pas plus. Ainsi, le domaine ne doit pas être trop large, mais à l'inverse pas trop étroit si on cherche à déterminer une influence possible. Dans ce dernier cas, des limites trop étroites risquent de noyer une influence ou un effet dans le bruit de l'erreur aléatoire due aux incertitudes de mesure.

Après avoir déterminé la liste des facteurs, leur domaine de variation, la liste des réponses et les objectifs attendus pour ces réponses, il est nécessaire d'établir la stratégie expérimentale qui conditionne les expériences à réaliser. Ce choix dépend avant tout du type de plan d'expérience choisi.

Il existe trois grandes familles de plans d'expériences :

- *Les plans de criblage* : dont l'objectif est de découvrir les facteurs les plus influents sur une réponse donnée en un minimum d'expériences.
- *Les plans de modélisation* : dont l'objectif est de trouver la relation mathématique qui lie les réponses mesurées aux variables associées au facteur soit via une démarche mathématique analytique ou purement matricielle. Les plans factoriels complets et fractionnaires (2 niveaux par facteurs avec modèle linéaire) ainsi que les plans pour surface de réponse (au moins 3 niveaux par facteur avec modèle du second degré) font partie de cette famille.
- *Les plans de mélange* : dont l'objectif est le même que pour le cas de la seconde famille mais où les facteurs ne sont pas indépendants et sont contraints (par exemple leur somme ou leur rapport doit être égal à une certaine constante)

Le principe global d'un plan d'expérience se base sur le fait que l'étude d'un phénomène peut, le plus souvent, être schématisé de la manière suivante : nous nous intéressons à une grandeur y qui dépend d'un nombre de facteur $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$. La modélisation mathématique consiste donc à trouver une fonction f telle que $y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_n)$.

Cette fonction doit prendre en compte l'influence de chaque facteur seul ou des facteurs combinés (interaction). Elle est donc déterministe (la réponse dépend uniquement des facteurs sans aucune incertitude possible, ce qui revient à ignorer les erreurs de mesure) et invariante (le comportement n'évolue pas au cours du temps).

Parmi les différents plans expérimentaux, les plans factoriels sont courants car ils sont simples à mettre en œuvre et ils permettent de mettre en évidence très rapidement l'existence d'interactions entre les facteurs. L'hypothèse de base est d'assigner à chaque facteur la valeur la plus basse de son domaine d'étude, notée -1 , et sa valeur la plus haute, notée $+1$. Ainsi, pour k facteurs, on se retrouve avec un ensemble de 2^k valeurs possibles. Les plans d'expériences dits factoriels utilisent tous le même modèle mathématique qui relie la réponse y aux facteurs $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$. Ce modèle théorique est postulé a priori. Il s'agit d'un modèle polynomiale:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n + \sum_{i,j=1}^n b_{ij}x_ix_j + \sum_{i,j,k=1}^n b_{ijk}x_ix_jx_k + \dots$$

Où a_0, a_1, \dots sont les coefficients du polynôme qui ne sont pas connus et qui doivent être calculés à partir des résultats expérimentaux. Les termes produits de type $a_{ij}x_ix_j$ correspondent aux interactions. Pour un plan factoriel à 3 facteurs X_1, X_2 et X_3 on obtient :

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

Bien que les plans factoriels complets soient des plans d'expériences permettant de déterminer tous les effets et toutes les interactions sans ambiguïté, ils présentent une limite essentielle : le nombre d'essais augmente très rapidement avec le nombre de facteurs. A titre d'exemple, on atteint déjà 128 expériences (2^7) pour 7 facteurs ce qui devient donc très vite difficile à réaliser dans la pratique.

*Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroGC&Ch&RS-NanoLC-MRM³*

Un dernier aspect relatif aux plans d'expériences factoriels mérite également d'être souligné. En effet, les modèles de plan d'expériences factoriels étudiés ne prennent pas en compte une « courbure » possible au centre du domaine mais considère uniquement un comportement linéaire. La validité du modèle mathématique du premier degré doit donc être vérifiée. Il est ainsi préconisé de toujours ajouter au moins un point expérimental au centre du domaine. La valeur de la réponse étudiée en ce point sera comparée à la valeur déduite des autres points expérimentaux grâce au modèle mathématique. Si les deux valeurs sont semblables, le modèle mathématique sera adopté, si elles ne le sont pas, nous devons rejeter ce modèle et compléter les résultats déjà obtenus par des expériences permettant de passer au second degré. Parmi les matrices d'expériences couramment utilisées pour pallier à ces problèmes, les matrices composites sont les plus populaires et seront mises en œuvre dans le cadre de notre étude.

3.2. Mise en œuvre du plan d'expérience

Au regard des connaissances acquises lors du développement des méthodes d'analyses multi-résidus, 4 facteurs d'entrée ont été retenus pour construire le plan d'expériences :

- X1 la composition en MeOH du solvant de reprise (%)
- X2 la composition en MeOH (%) dans la phase mobile de chargement
- X3 le temps de chargement (min)
- X4 le débit de chargement ($\mu\text{L}/\text{min}$)

La réponse suivie (Y) correspond à l'aire du pic chromatographique, et ce pour chaque composé ciblé. Les bornes du domaine expérimental ont été fixées comme suit :

Facteurs d'entrée	Valeur haute (+1)	Valeur basse (-1)
X1	50	10
X2	10	2
X3	5	3
X4	30	20

Table 82: Bornes du domaine expérimental pour chaque facteur d'entrée retenu pour la conception du plan d'expérience

La fonction réponse étant a priori non linéaire, nous avons fait le choix d'utiliser une matrice d'expériences permettant d'estimer un modèle du second degré, c'est-à-dire une matrice de type composite. Cette matrice est composée de plusieurs plans d'expériences associés, ce qui lui confère une propriété de séquentialité pour la stratégie expérimentale. Ainsi, il est possible de commencer par :

- Une étude factorielle avec des points au centre permettant de vérifier l'absence ou la présence de courbures
- Puis de compléter le modèle par des essais axiaux permettant de passer à un modèle du deuxième degré si nécessaire.

Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez Gammarus fossarum par MicroGC&Ch&RS-NanoLC-MRM³

La matrice composite choisie pour cette étude comprend 30 expériences (Table 83). Il s'agit d'une matrice composite face centrée (les points axiaux sont ramenés sur les faces du domaine expérimental) composée d'une matrice factorielle complète ($2^4=16$ expériences), de 6 répétitions du point au centre et de 8 points axiaux.

Composition en méthanol de l'échantillon (%)	Composition en méthanol de la phase mobile de chargement (%)	Temps de chargement (min)	Débit de chargement ($\mu\text{L}/\text{min}$)	X1 (%)	X2 (%)	X3 (min)	X4 ($\mu\text{L}/\text{min}$)
10	2	3	20	-1	-1	-1	-1
50	2	3	20	1	-1	-1	-1
10	10	3	20	-1	1	-1	-1
50	10	3	20	1	1	-1	-1
10	2	5	20	-1	-1	1	-1
50	2	5	20	1	-1	1	-1
10	10	5	20	-1	1	1	-1
50	10	5	20	1	1	1	-1
10	2	3	30	-1	-1	-1	1
50	2	3	30	1	-1	-1	1
10	10	3	30	-1	1	-1	1
50	10	3	30	1	1	-1	1
10	2	5	30	-1	-1	1	1
50	2	5	30	1	-1	1	1
10	10	5	30	-1	1	1	1
50	10	5	30	1	1	1	1
10	6	4	25	-1	0	0	0
50	6	4	25	1	0	0	0
30	2	4	25	0	-1	0	0
30	10	4	25	0	1	0	0
30	6	3	25	0	0	-1	0
30	6	5	25	0	0	1	0
30	6	4	20	0	0	0	-1
30	6	4	30	0	0	0	1
30	6	4	25	0	0	0	0
30	6	4	25	0	0	0	0
30	6	4	25	0	0	0	0
30	6	4	25	0	0	0	0
30	6	4	25	0	0	0	0
30	6	4	25	0	0	0	0
30	6	4	25	0	0	0	0
30	6	4	25	0	0	0	0

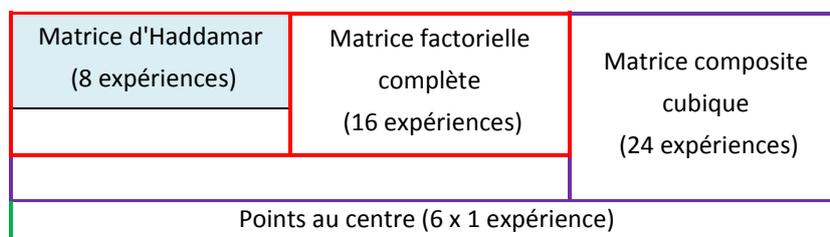


Table 83: Plan d'expérience et matrices associées pour l'optimisation de l'étape de pré-concentration en ligne

3.3. Interprétation des résultats liés au plan d'expériences

L'interprétation des résultats a été effectuée grâce au logiciel Nemrodw[®] dédié aux plans d'expériences. Dans un premier temps, les résultats ont permis de réaliser une étape de criblage, c'est-à-dire de déterminer les facteurs ayant le plus d'effet sur une réponse donnée. Ce criblage s'effectue grâce à une matrice d'Hadamard, dont la taille N est nécessairement un multiple de 4. Les matrices d'Hadamard sont des matrices optimales pour les plans d'expériences sans interaction. Pour étudier k facteurs, il faut obligatoirement au moins k+1 expériences. Pour 4 facteurs, on utilisera donc une matrice N = 8. Le détail de la matrice est présenté dans la Table 83. Les 8 expériences relatives à la matrice d'Hadamard sont comprises dans le plan factoriel complet. Ce type de plan permet d'avoir une première évaluation des influences des facteurs d'entrée sur la réponse expérimentale. L'utilisation de telles matrices postule un modèle linéaire de la forme :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_4 + b_4X_4$$

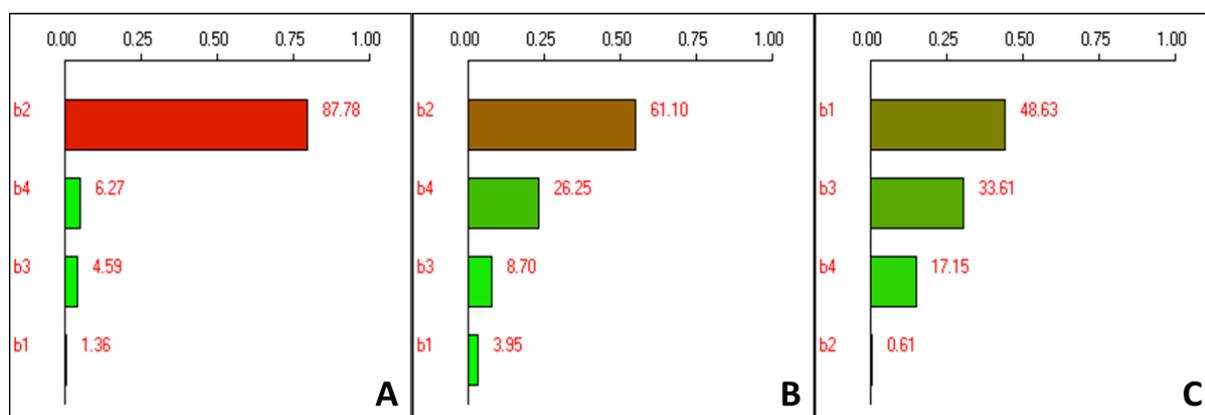


Figure 125: Diagramme des effets selon Pareto obtenus à partir de la matrice d'Hadamard. A = carbamazépine ; B = oxazépam ; C = testostérone (b1 : composition du solvant de reprise ; b2 : composition de la phase mobile de chargement ; b3 : temps de chargement ; b4 : débit de chargement)

Les poids de chaque facteur sur la réponse mesurée, correspondant à l'aire du pic chromatographique, sont présentés sous forme de diagrammes de Pareto qui représentent la participation d'un effet par rapport à l'ensemble des effets sous forme de pourcentage (Figure 125).

Les résultats montrent que le pourcentage de MeOH dans la phase mobile est le facteur ayant le plus de poids sur la réponse de la carbamazépine (Figure 125A) et de l'oxazépam (Figure 125B) avec respectivement 87,8 % et 61,1 % du total des effets. En revanche pour la testostérone (Figure 125C), celui-ci ne participe qu'à hauteur de 0,61 %, ce qui est inattendu étant donné que la composition de la phase mobile influe directement sur la rétention des composés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le modèle postulé ne prend pas en compte les interactions entre les facteurs. Pour prendre en compte ces interactions dans le modèle, il est nécessaire d'utiliser l'intégralité des expériences de la matrice factorielle complète.

*Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroGCxERS-NanoLC-MRM³*

En plus des expériences de la matrice factorielle, une expérience située au centre du domaine (niveau 0 en variable centrée réduite) a été effectuée 6 fois, permettant d'accéder à la variance expérimentale. Grâce à cette donnée, il est possible d'effectuer des analyses statistiques et de déterminer si les différents effets pèsent de manière significative sur la réponse. Les résultats sont présentés dans la Figure 126. Pour les trois composés, les résultats montrent que le pourcentage de MeOH est bien un des facteurs ayant le plus de poids sur la réponse, y compris pour la testostérone (Figure 126C).

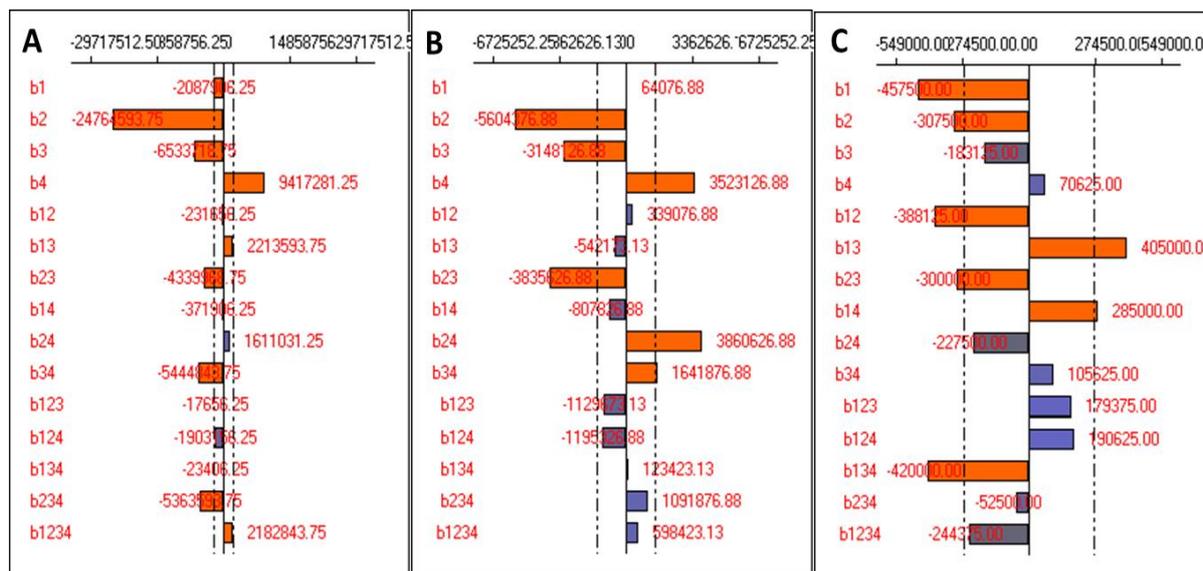


Figure 126: Etude graphique de tous les effets associés aux quatre facteurs sur l'aire des analytes. A = carbamazépine ; B = oxazéпам ; C = testostérone. Un effet contenu dans la zone délimitée par des pointillés n'est pas considéré comme significatif sur la réponse ($p < 0,05$) (b1 : composition du solvant de reprise ; b2 : composition de la phase mobile de chargement ; b3 : temps de chargement ; b4 : débit de chargement)

D'autre part, ces résultats témoignent du caractère très composé-dépendant de l'étape de pré-concentration en ligne. Ainsi, pour la carbamazépine (Figure 126A) et l'oxazéпам (Figure 126B), le pourcentage de MeOH dans le solvant de reprise n'a pas, ou très peu d'effet significatif sur la réponse, alors que pour la testostérone il représente le facteur ayant le plus de poids. Lorsque la composition en MeOH dans l'échantillon injecté passe de 10 à 50 %, l'aire du pic de la testostérone diminue fortement alors que ceux de la carbamazépine et de l'oxazéпам ne varient pas, ou très peu, de façon significative.

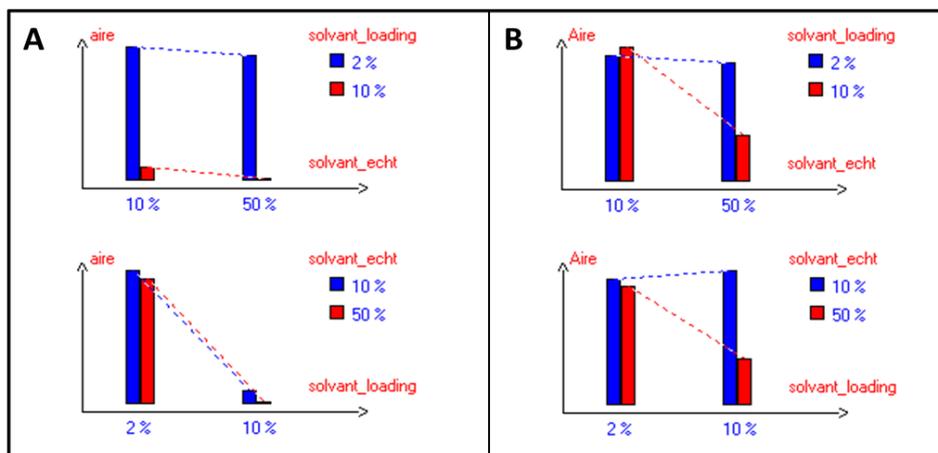


Figure 127: Etude graphique de l'interaction entre la composition en MeOH du solvant de reprise et la composition en solvant de la phase mobile de chargement (A = carbamazépine ; B = testostérone)

Un autre aspect du caractère composé-dépendant de la pré-concentration concerne l'effet synergique des facteurs entre eux. La Figure 127A montre que pour la carbamazépine, l'effet de l'augmentation du pourcentage de MeOH dans le solvant de reprise de 10 à 50% sur la réponse est exactement le même, que la phase mobile utilisée contiennent 2 ou 10 % de MeOH, et vice versa. Cela s'illustre par le parallélisme des lignes pointillées reliant les histogrammes en barre. Par contre, pour la testostérone (Figure 127B), l'effet du pourcentage de MeOH dans l'échantillon va dépendre de la composition en MeOH de phase mobile et vice versa (lignes pointillées séquentes).

D'autres synergies entre facteurs sont communes à plusieurs composés, comme celle entre le temps de chargement et le débit de chargement. Néanmoins, leurs effets peuvent être opposés. C'est le cas concernant la carbamazépine (Figure 128A) et l'oxazépam (Figure 128B). Pour la carbamazépine, l'augmentation du temps de chargement de 3 à 5 min diminuera beaucoup plus la réponse si le débit utilisé est de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ plutôt que 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. En revanche, la réponse avec un temps de chargement fixé à 3 minutes augmentera beaucoup plus avec un débit passant de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ par rapport à un temps de chargement de 5 minutes. Pour l'oxazépam, c'est exactement l'inverse qui se produit : diminution beaucoup moins importante lorsqu'on travaille à 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ et qu'on passe de 3 à 5 min de temps de chargement, et augmentation moins forte en se fixant à 3 minutes de temps de chargement plutôt qu'à 5 minutes.

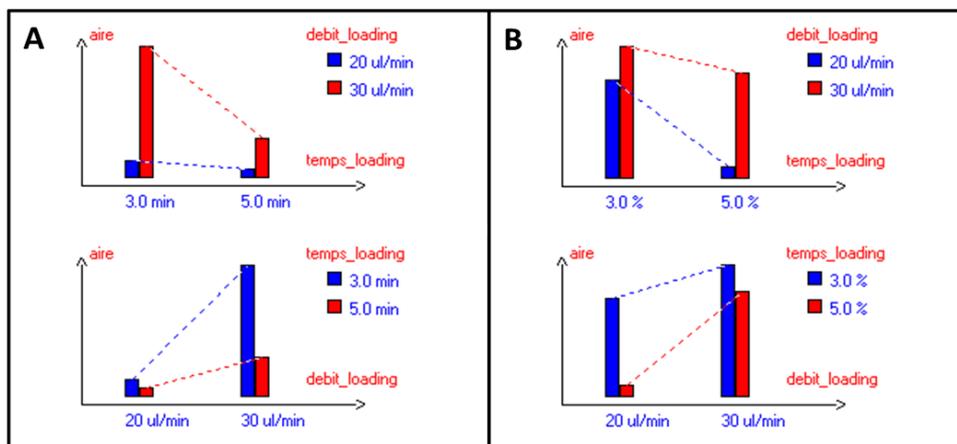


Figure 128: Etude graphique de l'interaction entre temps de chargement et débit de chargement (A = carbamazépine ; B = oxazépam)

Enfin, d'autres expériences ont été menées afin d'affiner encore plus le modèle. En effet, il peut y avoir des phénomènes de courbure à proximité des centres de domaines expérimentaux qui ne sont pas pris en compte par les modèles linéaires. Ces expériences complémentaires, ajoutées à celles de la matrice factorielle complète, permettent de constituer la matrice dite composite. Les expériences complémentaires ayant lieu aux extrémités et aux centres du domaine expérimentale, on parle de matrice composite cubique. L'interprétation est conduite en réunissant les deux plans : le plan factoriel initial et le plan complémentaire. Pour cette interprétation, contrairement au cas précédent, les points au centre ne sont plus des points de contrôle. Ils sont pris en compte dans le calcul des coefficients du modèle. Cette matrice permet d'établir un modèle quadratique et d'accéder aux surfaces de réponse, qui mettent en évidence les phénomènes de courbure.

L'analyse graphique des résidus nous a permis de mettre en évidence une distribution aléatoire, avec un équilibre entre les résidus négatifs et les résidus positifs (Figure 129). Les résidus ne représentent donc que l'erreur expérimentale puisqu'ils forment un nuage dispersé sans aucune structure apparente.

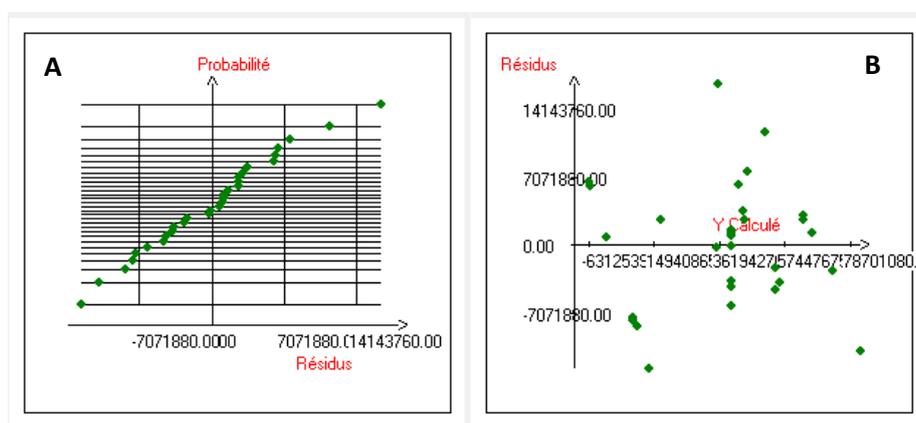


Figure 129: Etude graphique des résidus (A : droite de Henry et B : distribution des résidus en fonction de la valeur calculée de la réponse)

Le modèle correspondant à l'aire du pic chromatographique permet donc de tracer la surface de réponse correspondante, pour chaque composé ciblé (Figure 130). Ces surfaces peuvent être représentées en 3 dimensions ou bien projetées en 2 dimensions afin de visualiser les courbes d'iso-réponse qui se lisent de la même manière qu'une carte topographique : plus les courbes d'iso-réponse sont rapprochées, plus la pente de la courbure est élevée comme le montrent les figures XA et XD qui représentent la surface de réponse et les courbes d'iso-réponse de la carbamazépine pour un pourcentage de MeOH fixé à 10% dans le solvant de reprise et à 2% dans la phase mobile.

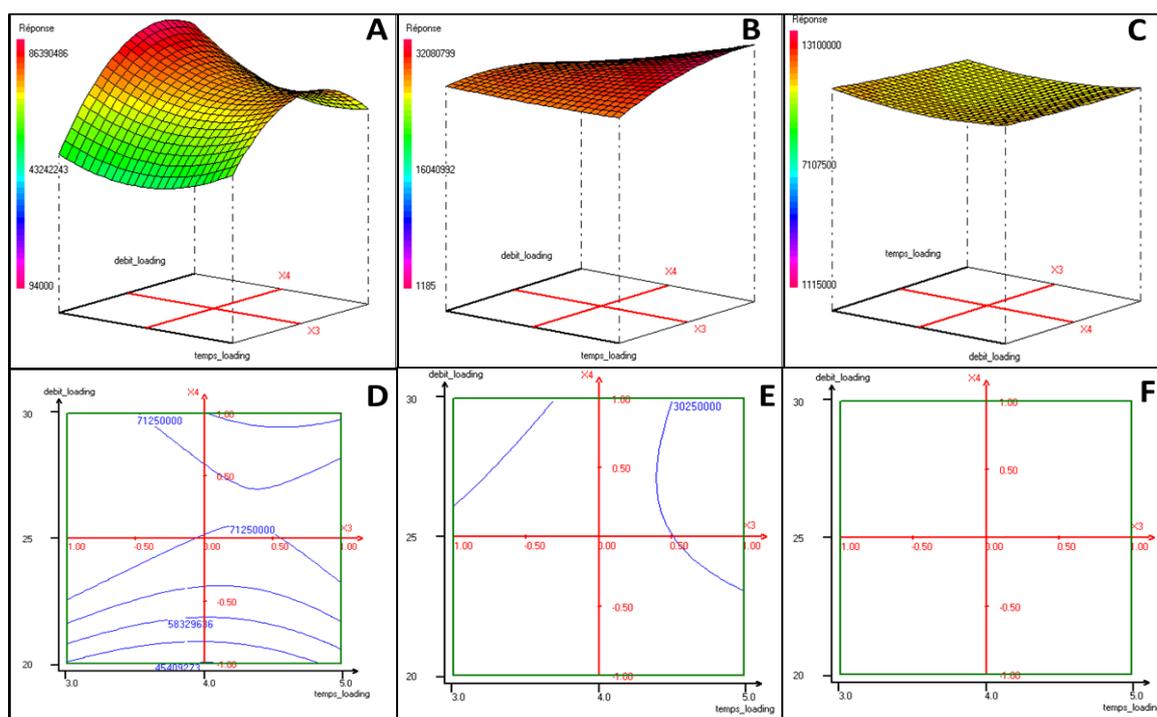


Figure 130: Surfaces de réponses et courbes d'isoresponses des analytes représentées en 3D (A, B, C) et en 2D (D, E, F) à composition en MeOH dans l'échantillon (10%) et dans la phase mobile de chargement (2%) fixés. A et D = carbamazépine ; B et E = oxazépam ; C et F = testostérone

Grâce à la modélisation mathématique des surfaces de réponses relatives à chacun des trois composés ciblés pour cette étude, nous avons pu déterminer les paramètres optimaux de pré-concentration en ligne. En fixant les compositions du solvant de reprise et du solvant de chargement à 10% et 2% de méthanol respectivement, on constate que les réponses relatives à l'oxazépam et à la testostérone ne sont que très peu dépendantes des autres facteurs d'entrée, à savoir le temps et le débit de chargement. Par conséquent, ceux-ci seront choisis au regard de la modélisation relative à la réponse de la carbamazépine, pour laquelle le modèle présente une courbure beaucoup plus importante. Ainsi, pour la suite des analyses, les conditions seront fixées comme suit :

% MeOH dans le solvant de reprise	% MeOH dans la phase mobile de chargement	Temps de chargement (min)	Débit de chargement (μL/min)
10	2	3	30

Table 84: Paramètres optimaux pour la pré-concentration en ligne déterminés grâce à la méthodologie des plans d'expériences

4. Optimisation de la séparation nanochromatographique

Au regard des objectifs de cette étude, la séparation nanochromatographique des composés ciblés devait répondre à plusieurs critères. Le premier était de pouvoir coupler la nanochromatographie à une détection par spectrométrie de masse en mode MRM³. Or, ce mode nécessite une meilleure séparation des composés qu'une détection en mode MRM, où il n'est pas toujours nécessaire d'obtenir une résolution élevée (>1) (la fréquence d'acquisition étant suffisamment élevée pour suivre plusieurs transitions de composés coélus). En mode MRM³, chaque expérience constitue une période d'acquisition. Or, le passage d'une période à une autre nécessite un certain temps pour être réalisé dans des conditions optimales : il est en effet nécessaire de vider la trappe entre chaque période afin d'éviter les phénomènes de saturation de celle-ci. De plus, la vitesse de balayage dans la trappe linéaire étant de 1000 Da/s, si l'on décide de suivre plusieurs transitions MRM³ simultanément, le nombre de points par pic sera inévitablement réduit pour chaque transition suivie, pouvant ainsi conduire à une quantification erronée. L'objectif était donc d'obtenir une séparation d'au moins 1 minute base à base entre chaque pic, et 2 minutes pic à pic. Etant donné la largeur des pics, proches de 1 minute, obtenus avec le montage utilisé, cela correspond à une résolution minimale de 2 :

$$R = \frac{2 \times (tr_2 - tr_1)}{(\omega_1 + \omega_2)}$$

Équation 18: Calcul de la résolution chromatographique

Où tr_1 et tr_2 correspondent aux temps de rétention, et ω_1 , ω_2 les largeurs des pics à la base.

Le second critère consistait à effectuer une séparation en 30 minutes maximum, permettant ainsi l'analyse d'une large cohorte d'échantillons.

Les différents tests de séparation ont été effectués avec une détection en UV à 241 nm, en raison de l'indisponibilité du spectromètre de masse durant la période de développement. Afin de diminuer au maximum la durée d'analyse, le débit initialement fixé à 300 nL/min pour les autres études a été augmenté à 400 nL/min. Pour compenser l'augmentation de contre-pression engendrée par l'augmentation du débit, la température du four colonne a été fixée à 45 °C, diminuant ainsi la viscosité des solvants.

Plusieurs programmes d'élution en gradient ont été testés sur une colonne C18 Acclaim Pep Map 100 (L = 15 cm ; di = 75 μ m ; dp = 3 μ m ; tp = 100 Å) avec des mélanges H₂O/MeOH, H₂O/ACN, ainsi qu'avec des mélanges tertiaires H₂O/MeOH/ACN acidifiés à 0,05% d'acide acétique en volume afin de favoriser l'ionisation des analytes ciblées. Les meilleurs résultats en terme de résolution ont été obtenus avec une phase mobile organique contenant uniquement du méthanol acidifiée. L'importante force éluante de l'ACN, par rapport au MeOH, ne permettait pas d'obtenir une résolution minimale de 2 entre la carbamazépine et l'oxazépam. Notons cependant que l'utilisation d'un tel solvant permettait d'obtenir des pic plus fins. Le gradient d'élution final est présenté dans la Table 85.

*Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroGC&Ch&RS-NanoLC-MRM³*

Temps (min)	Débit (nL/min)	% A	% B
0	400	65	35
10	400	50	50
17,5	400	20	80
20	400	5	95
27	400	5	95

A = H₂O + 0,05% acide acétique

B = MeOH + 0,05% acide acétique

Table 85: Gradient d'élution utilisé lors de la séparation des composés ciblés

Afin d'améliorer d'avantage la résolution chromatographique et d'affiner les pics, nous avons fait le choix de tester une seconde colonne. Il s'agissait d'une C18 Accucore commercialisée par Thermo Fisher® (L = 15 cm ; di = 75 µm ; dp = 3 µm ; tp = 150 Å). Contrairement à une colonne C18 classique où les particules sont entièrement poreuses, celle-ci utilise des particules dites à noyau dur, qui sont des particules contenant un noyau solide de silice non poreux recouvert en surface de silice poreuse. Ces phases stationnaires ont la particularité d'avoir une granulométrie plus uniforme que les colonnes constituées de particules entièrement poreuses.

La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) est généralement utilisée comme mesure de l'efficacité lorsque l'on compare plusieurs colonnes séparatives. Celle-ci est liée à la vitesse linéaire (u) à travers la colonne par l'équation de Van Deemter :

$$HEPT = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Équation 19: Equation de Van Deemter

Dans cette équation, A, B et C sont des constantes qui décrivent les contributions à la bande d'élargissement par la diffusion d'Eddy, la diffusion longitudinale et la résistance au transfert de masse, respectivement. L'élargissement de bande est la conséquence de plusieurs processus de transfert de masse qui se produisent lorsque l'analyte migre à travers la colonne. La constante A, relative à la diffusion d'Eddy, dépend de la taille des particules et de l'homogénéité du remplissage. La réduction de la taille des particules engendre la diminution du terme A et a donc pour conséquence l'augmentation de l'efficacité. La Figure 131 illustre l'effet de la distribution de la moyenne de la taille des particules sur l'homogénéité du remplissage d'une colonne, témoignant ainsi de son influence sur les phénomènes d'élargissement des pics. L'utilisation de particules à noyau dur permet donc d'obtenir des remplissages uniformes, ce qui minimise la contribution du facteur A, et améliore l'efficacité (Gritti, 2013).

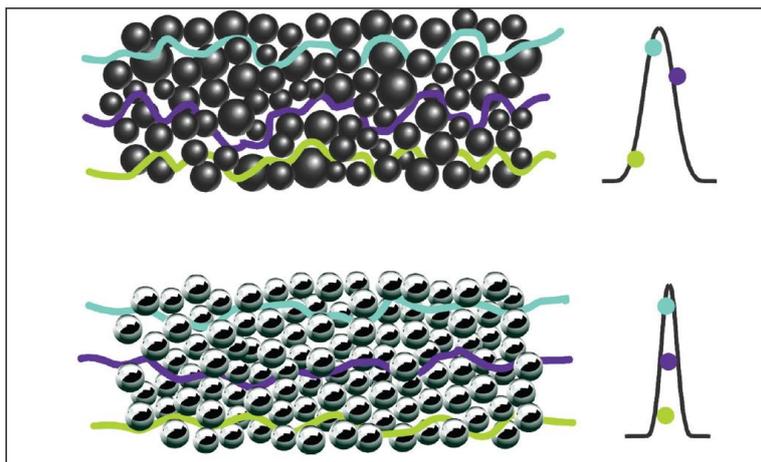


Figure 131: Effet de la distribution de la taille moyenne des particules sur l'homogénéité de remplissage et l'élargissement de bande au regard de la diffusion d'Eddy

Contrairement à la constante A, le terme C, relatif à la résistance au transfert de masse est proportionnel à la vitesse linéaire. Ce terme est lié à deux phénomènes : la résistance au transfert de masse dans la phase stationnaire et la résistance au transfert de masse dans la phase mobile. La première se produit lorsque l'analyte se diffuse à l'intérieur et à l'extérieur des pores des particules de phase stationnaire. Avec des particules à noyau dur, les chemins de diffusion des analytes sont limités par la profondeur de la couche poreuse extérieure. L'élargissement de bande est ainsi réduit. La résistance au transfert de masse dans la phase mobile est causée par le fait que la phase mobile circule dans les canaux entre les particules de la phase stationnaire, les molécules sont ainsi d'abord diffusées à travers le liquide avant d'atteindre la phase stationnaire. Cet effet est équivalent à la diffusion longitudinale. Cependant, alors que pour la diffusion longitudinale l'augmentation du débit permet de réduire l'élargissement des pics, dans le cas des particules totalement poreuses, cette action aura un effet néfaste sur l'homogénéité de l'écoulement dans la direction radiale. L'utilisation de particules à noyau dur permet de pallier à ces problèmes, elles permettent un trajet de diffusion plus uniforme, à la fois dans la phase mobile et dans la phase stationnaire réduisant ainsi la contribution des facteurs B et C (Gritti, 2010).

La colonne Accucore ayant des caractéristiques géométriques similaires à celles de la colonne C18 classique, elle a été testée dans les mêmes conditions chromatographiques que celle-ci (Table 85). La Figure 132 présente les chromatogrammes obtenus pour chacune des colonnes testées. Les temps de rétention, les largeurs de pic et la résolution obtenus sont présentés dans la Table 86.

*Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroGC&Ch&ERS-NanoLC-MRM³*

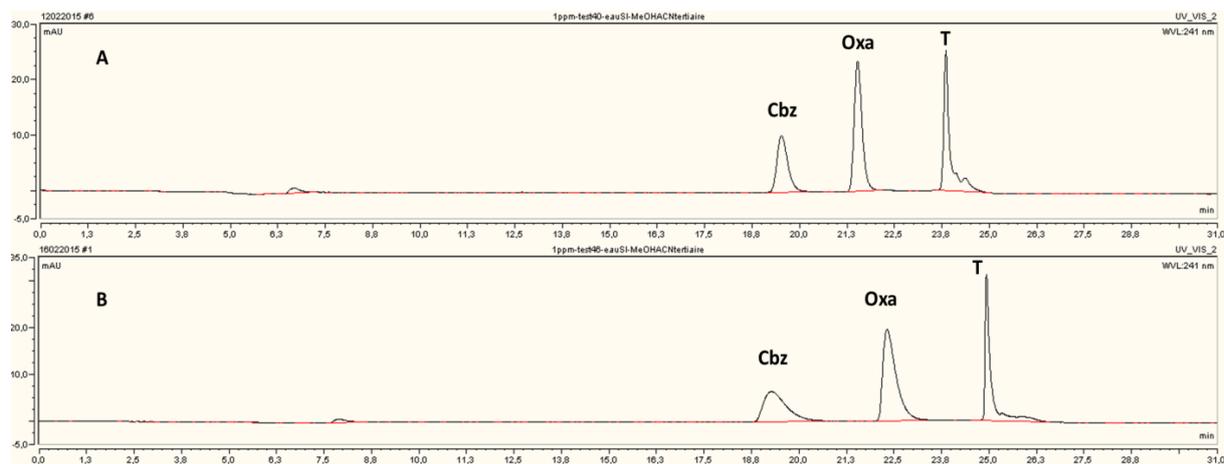


Figure 132: Chromatogramme A : séparation des composés sur la colonne C18 Acclaim Pep Map
Chromatogramme B : séparation des composés sur la colonne C18 Accucore de Thermo Fisher® (Cbz = carbamazépine, Oxa = oxazéпам, T = testostérone)

		Carbamazépine	Oxazéпам	Testostérone	Résolution entre le pic de la carbamazépine et celui de l'oxazéпам	Résolution entre le pic de l'oxazéпам et celui de la testostérone
C18 PePMap 100	temps de rétention (min)	19,13	21,53	23,96	3,20	2,56
	largeur base (min)	0,8	0,7	1,2		
C18 Accucore	temps de rétention (min)	19,28	22,32	24,93	2,25	1,93
	largeur base (min)	1,5	1,2	1,5		

Table 86: Temps de rétention, largeur à la base des pics et résolution sur les deux colonnes nanochromatographiques testées

Contrairement à ce qui était attendu, l'efficacité n'a pas été améliorée par l'utilisation de la colonne à noyau dur, elle a au contraire diminué : les pics se sont élargis, ce qui a donc nécessairement dégradé la résolution. Bien que ces résultats semblent contraires à la théorie des colonnes à noyau dur, des observations similaires ont été rapportées dans la littérature. Fekete *et al.*, (2011) et McCalley, *et al.*, (2010) ont ainsi démontré que la présence de volume extra-colonne pouvait diminuer l'efficacité des colonnes à noyau dur. Les auteurs soulignent que les effets préjudiciables des volumes morts instrumentaux augmentent à mesure que l'efficacité de la colonne augmente. Ils démontrent également que ces effets sont d'autant plus importants que le diamètre interne de la colonne est faible. Par conséquent, nous pouvons supposer que dans notre cas, l'élargissement des pics observés lors de l'utilisation de la colonne Accucore n'est pas du à la colonne elle-même, mais plutôt aux volumes extra-colonnes inhérents à notre système analytique. Par conséquent, nous avons fait le choix de réaliser la séparation chromatographique à l'aide d'une colonne C18 classique dans les conditions présentées dans la Table 85, celles-ci nous permettant d'obtenir une résolution suffisante pour la détection en mode MRM³.

5. Optimisation des étapes d'extraction et de purification

A l'instar de la méthode de préparation d'échantillon détaillée dans le chapitre 3 de ce manuscrit, l'objectif de cette étude était de mettre en place une technique d'extraction et de purification permettant de doser les analytes ciblés, à l'échelle d'un seul amphipode. Bien que la stratégie employée lors des premières études relatives à ces travaux de thèse ait été qualifiée de micro-QuEChERS en raison de la miniaturisation de l'étape d'extraction liquide/liquide assistée par des sels commune à la méthode QuEChERS originale, l'étape de purification différait quant à elle de l'utilisation traditionnelle de phase dispersive. L'objectif de cette étude est donc de miniaturiser l'étape de purification sur phase dispersive, en optimisant notamment la nature et la quantité d'adsorbant. La partie extraction ayant déjà été adaptée et optimisée pour l'analyse des composés ciblés chez le gammare, seule l'étape de purification a fait l'objet d'une optimisation dans cette partie.

Plusieurs types de phase dispersive ont donc été testés :

- La phase PSA (Primary Secondary Amine) dont les groupements amines retiennent les groupements carboxyles des acides gras par des interactions ioniques, lorsque le pH est adapté.
- La phase PSA/C18 qui permet en plus par rapport à la phase PSA de retenir des composés possédant des groupements apolaires.
- La phase Z-SEP qui contient des oxydes de zirconium. L'atome de zirconium agit comme un acide de Lewis et permet entre autre de retenir des composés contenant des doublets libres, comme les groupements phosphates des phospholipides. Cette dernière phase dispersive est à ce jour encore peu utilisée en raison de sa commercialisation très récente.

L'efficacité des phases dispersives précédemment évoquées a été évaluée grâce au calcul du rendement d'extraction.

Dans un premier temps, l'efficacité de chaque adsorbant a été évaluée à partir des masses recommandées pour une extraction utilisant 1 mL d'ACN, ramené aux 400 µL utilisée, soit :

- 60 mg MgSO₄ + 10 mg PSA greffé sur silice
- 60 mg MgSO₄ + 10 mg PSA greffé sur silice + 10 mg de C18 greffé sur silice
- 60 mg de MgSO₄ + 20 mg d'oxyde de zirconium greffé sur silice

Les échantillons ont été dopés avant et après extraction à une concentration de 50 ng/g de poids frais. Les rendements obtenus sont présentés dans la Figure 133.

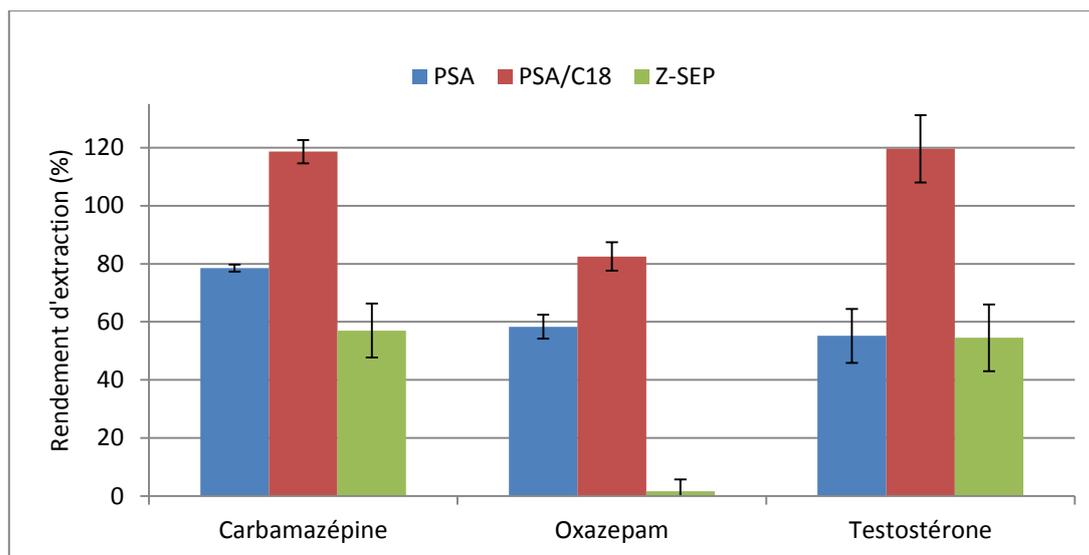


Figure 133: Rendements d'extraction moyens des composés ciblés (50 ng/g) après extraction et purification utilisant 3 types de phases dSPE différentes (n = 3)

Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant la phase PSA/C18 qui permet d'atteindre des taux de recouvrement supérieurs à 80% pour tous les composés ciblés. Pour la carbamazépine et l'oxazepam, les rendements d'extraction obtenus avec la PSA et la PSA/C18 sont similaires à ceux reportés dans d'autres études (Berlioz-Barbier *et al.*, 2015, 2014). En revanche, les résultats obtenus pour testostérone sont étonnants. Il s'agit en effet du composé le plus apolaire; théoriquement, il devrait donc être majoritairement retenu sur la phase PSA/C18 comparé à la phase PSA, comme cela a déjà été rapporté dans la littérature (Berlioz-Barbier *et al.*, 2014; Pouech *et al.*, 2012). Il nous semble ainsi possible d'envisager que ces différences soient liées à la masse d'adsorbant utilisée.

La phase dispersive Z-SEP conduit quant à elle à des rendements proches de ceux obtenus avec l'adsorbant de type PSA, et correspondent à ceux publiés par Martínez-Bueno *et al.* (2013) qui l'utilisent pour purifier un extrait de moules marines contenant des métabolites de la carbamazépine. Par contre, l'oxazepam avec un rendement d'environ 2% obtenu avec la Z-SEP est presque complètement retenu et éliminé par la phase dispersive. Il est possible qu'une forte interaction de type acide-base de Lewis ait lieu entre le groupement phénylique de l'oxazepam et les liaisons datives de l'atome de zirconium. Ce type d'interaction a en effet déjà été reporté dans la littérature concernant la séparation chromatographique d'isomères de butylbenzène sur une phase stationnaire à base de dioxyde de zirconium (Nawrocki *et al.*, 1993).

Au regard des résultats obtenus, la phase type PSA/C18 a été retenue pour la suite des analyses. Nous avons ensuite décidé d'évaluer l'influence de la quantité de phase dispersive sur le processus de purification. Ainsi, différentes masses d'adsorbant ont été testées :

- 40 mg (30 mg MgSO₄ + 5 mg PSA + 5 mg C18)
- 80 mg (60 mg MgSO₄ + 10 mg PSA + 10 mg C18)
- 120 mg (90 mg MgSO₄ + 15 mg PSA + 15 mg C18)

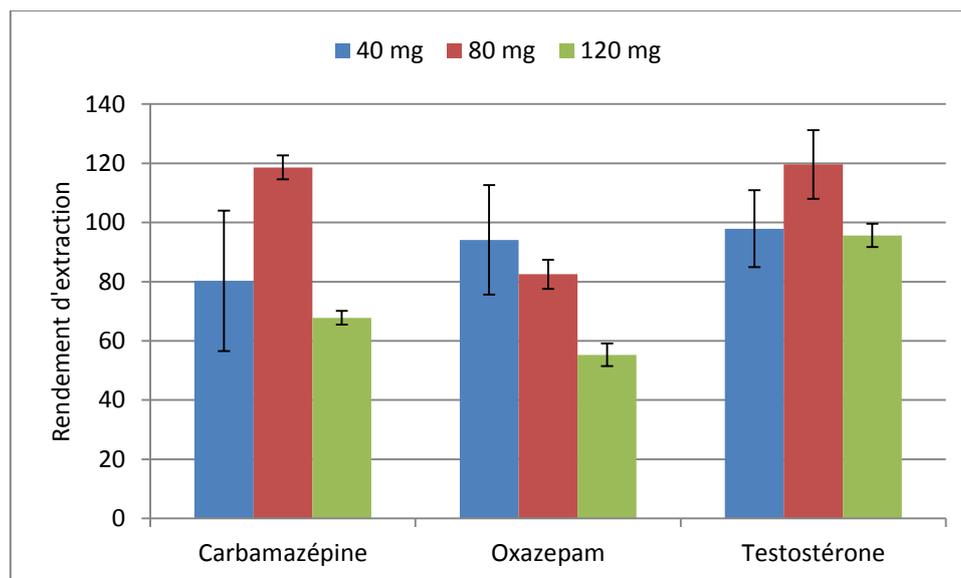


Figure 134: Rendements d'extraction moyens des composés ciblés (50 ng/g) après extraction et purification utilisant la phase PSA/C18 à 3 masses différentes (n = 3)

Les résultats indiquent que le rendement d'extraction de l'oxazepam diminue lorsque la quantité d'adsorbant augmente (Figure 134). Il est donc probable que cette benzodiazépine soit de plus en plus adsorbée et éliminée à mesure que la quantité d'adsorbant augmente. En revanche, pour la carbamazépine et la testostérone, aucune tendance claire ne peut être mise en évidence, indiquant la complexité des interactions mises en jeu ; le rendement maximal correspond à la masse moyenne en adsorbant. De manière générale, c'est la masse de 80 mg qui permet d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction avec le moins de variabilité pour les trois composés ciblés. C'est donc cette masse d'adsorbant qui a été retenue pour la suite de l'étude. Comparés à la littérature, les rendements d'extraction obtenus avec cette quantité de PSA/C18 pour la carbamazépine et l'oxazepam sont plus élevés que ceux obtenus dans les mêmes matrices par la méthode QuEChERS précédemment développée dans le cadre de ces travaux de thèse, ou bien avec une méthode d'extraction par liquide pulvérisé (Miller *et al.*, 2015) . Le rendement de la carbamazépine est également plus élevé avec la PSA/C18 que celui obtenu dans des échantillons plus gros comme les moules (Martínez-Bueno *et al.*, 2013). Pour la testostérone, les données sont peu nombreuses puisqu'elle a surtout été analysée par des techniques immunologiques (Bartsch *et al.*, 1980; Chen *et al.*, 2009) mais les rendements obtenus sont supérieurs à ceux obtenus dans des testicules de rats avec la PSA/C18 (Pouech *et al.*, 2012) Ces observations démontrent que la miniaturisation de la méthode QuEChERS, et plus particulièrement de l'étape de purification n'altère en rien l'efficacité du processus de préparation d'échantillon.

6. Détermination des limites de détection et de quantification méthodologiques

Afin d'étudier la sensibilité de la méthode Micro-QuEChERS-NanoLC-MRM³ mise en œuvre pour l'étude de l'accumulation de trois substances émergentes (carbamazépine, oxazépam et testostérone) chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*, les limites de détection et de quantification méthodologiques, ainsi que le modèle de régression reliant la concentration de l'analyte ciblé à l'aire du pic chromatographique ont été déterminés.

A l'instar de la méthode d'analyse permettant l'évaluation de la bioaccumulation de 35 polluants émergent chez les trois invertébrés sélectionnés pour cette étude, les limites de détection et de quantification méthodologiques ont été déterminées grâce à l'amplitude du bruit d'un échantillon dit « blanc ». L'échantillon dit blanc correspond à un échantillon de crustacé non dopé en composés d'intérêt, extrait selon le protocole Micro-QuEChERS précédemment détaillé, et analysé par NanoLC-MRM³. L'échantillon de crustacé utilisé correspond à un aliquot d'un pool de gammars constitué d'une centaine d'organismes issus des stabulations réalisées en laboratoire. La mise en œuvre d'une telle stratégie permet d'étudier la sensibilité de l'analyse sur une matrice représentative des échantillons réels.

Ainsi, cinq échantillons « blancs » ont été extraits puis injectés afin de déterminer la moyenne des mesures (A_{Blanc}), ainsi que l'écart-type associé à ces mesures (σ_{Blanc}). Parallèlement, des échantillons dopés en composés d'intérêt ont été préparés, extraits puis injectés. Ces échantillons constituent alors une gamme d'étalons au nombre de 10 dont les concentrations s'étendent de 0,2 ng/g à 30 ng/g. Chaque niveau de concentration a été dupliqué. Cette large gamme dynamique de concentration nous a permis de déterminer les LODs et les LOQs pour chacun des composés ciblés pour cette étude, ainsi que les modèles de régression (linéaire ou quadratique). La limite de détection est associée à l'étalon conduisant à un signal équivalent à $A_{\text{Blanc}} + 3\sigma_{\text{Blanc}}$, alors que la limite de quantification est obtenue pour l'étalon dont le signal vaut $A_{\text{Blanc}} + 10\sigma_{\text{Blanc}}$. Les LOD et les LOQ atteintes pour le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* sont présentées dans la Table 87.

	LOD (ng/g de poids frais)	LOQ (ng/g de poids frais)
Carbamazépine	0,3	0,7
Oxazépam	0,1	0,3
Testostérone	2,2	4,7

Table 87: Performances analytiques de la méthode MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³ (LOD et LOQ méthodologiques)

Nous pouvons constater que les limites de quantification méthodologiques sont de l'ordre du ng/g pour l'ensemble des composés ciblés pour cette étude. La carbamazépine et l'oxazépam présentent même des limites de quantification inférieures au ng/g. La LOQ correspondant à la testostérone est quant à elle légèrement supérieure. Ceci peut être expliqué par le choix de la transition MRM³ pour laquelle il a été difficile de trouver un fragment qui soit spécifique à la molécule recherchée. Notre choix s'est donc porté sur un fragment qui n'était pas nécessairement le plus intense.

*Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroGC&EChERS-NanoLC-MRM³*

La comparaison de ces limites de quantification avec celles précédemment obtenues pour la méthode d'analyse multi-résidus s'avère délicate tant les conditions d'extraction et d'analyses (pré-concentration en ligne, séparation et mode de détection) sont différentes d'une méthode à l'autre. Il a donc été décidé d'analyser les échantillons précédemment utilisés pour la détermination des limites de détection et de quantification en mode MRM, les conditions d'extraction, de pré-concentration en ligne et de séparation chromatographique ayant été conservées. Ces injections supplémentaires permettront de réaliser un comparatif des différents modes de détection, à savoir MRM et MRM³. Cette comparaison fera l'objet d'une discussion dans le paragraphe suivant de ce manuscrit.

7. Validation de la méthode d'analyse

7.1. Stratégie analytique

Le plan de validation mis en œuvre pour déterminer les différents critères nécessaires à la validation de la méthode a été réalisé sur une période de trois jours, selon un protocole identique à celui utilisé pour les méthodes multi-résidus (Cf. Chapitre 2). Les critères permettant d'évaluer la sélectivité et la spécificité de l'analyse ont cependant été modifiés en raison d'un mode de détection différent. Chaque composé devant être caractérisé par trois points d'identification au minimum, une transition MRM³, correspondant à un ion précurseur, un ion produit et un ion sous-produit, soit un total de 3 ions caractéristiques de la molécule, a été retenue pour chaque substance ciblée. Le temps de rétention de l'analyte a également été sélectionné comme critère d'identification de la molécule, le coefficient de variation (RSD %) devant être inférieur à 2,5%. Les limites de quantification évaluées lors des précédents tests ont permis de déterminer la gamme dynamique et donc les points de la droite de calibration. Il a été nécessaire de constituer chaque niveau de la gamme dynamique en fonction de la limite de quantification méthodologique propre à chaque molécule. Ainsi, il a été décidé de mettre en œuvre une stratégie identique à celle utilisée pour la validation des méthodes d'analyse multi résidus. Par conséquent, différents niveaux de concentration au nombre de sept, compris entre la LOQ et 50LOQ ont été définis dans le cadre de cette étude. Le minimum requis de cinq niveaux de concentrations imposé par les recommandations ICH est ainsi respecté. Chaque jour, la gamme comprenant les sept niveaux de concentration est extraite en duplicat afin d'évaluer et de valider la nature du modèle de régression reliant l'aire du pic chromatographique à la concentration de l'analyte. La relation de réponse, de type linéaire ou quadratique, est validée selon plusieurs critères : (i) par la valeur du coefficient de régression R^2 qui doit être supérieur à 0,99, (ii) par la valeur de l'exactitude déterminée en chaque point de la courbe qui doit être compris entre 80 et 120% de la valeur vraie, et enfin (iii) statistiquement par le test de Fisher.

Les précisions intra- et inter-jour ont été évaluées sur des échantillons indépendants, en répliquant un des niveaux de concentration de la gamme à chacun des jours de validation (niveau bas, niveau moyen et niveaux haut).

Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez Gammarus fossarum par MicroGCxChERS-NanoLC-MRM³

Les rendements d'extraction, ainsi que les effets de matrice ont été déterminés sur les mêmes niveaux de concentration qui ont permis d'évaluer la répétabilité de la méthode, en réalisant des extraction de matrice blanche (n=3) dont l'extrait sera dopé à la concentration à valider, et en effectuant l'injection de standards dans le solvant (n=3) à cette même concentration.

7.2. Résultats de la validation

Afin de garantir la sélectivité et la spécificité de la méthode développée dans le cadre de ce projet, nous avons fait le choix de caractériser chaque composé par une transition MRM³, ainsi que par le temps de rétention de l'analyte. L'analyse des échantillons « blanc » nous a permis de confirmer que chaque ion sous-produit utilisé pour la reconstitution du signal MRM³ était bien spécifique de la molécule considérée. Seul l'ion sous-produit équivalent à 81 m/z pour la testostérone apparaissait comme non spécifique puisque présent dans la matrice blanche, il n'a par conséquent pas été utilisé pour la quantification de cette hormone stéroïdienne. Le coefficient de variation associé à la dérive des temps de rétention étant au maximum égal à 1,9% sur l'ensemble des analyses effectuées dans le cadre du protocole de validation, il apparaît donc que l'ensemble des critères de spécificité et de sélectivité soit respecté, garantissant ainsi l'identification sans ambiguïté des substances ciblées pour cette étude.

Compte tenu de la complexité de la matrice biotique étudiée, un étalonnage dans la matrice, aussi appelé « Matrix Matched Calibration » a été mis en œuvre. La droite de calibration a été construite à partir d'échantillons blancs, dopés en substances à doser, extraits puis analysés. Dans ce sens, la quantification des composés ciblés est basée sur la relation entre la réponse analytique et la concentration, qui peut être de type linéaire ou bien quadratique. Dans le cadre de ces travaux, le modèle de régression le plus approprié s'est avéré être de type linéaire. Seule la droite de calibration relative à la testostérone présentait une rupture de pente et aurait par conséquent pu être validée selon un modèle quadratique. Cependant, aux vues des concentrations mesurées dans les échantillons réels correspondant aux précédentes études, plutôt situées en bas de gamme, nous avons fait le choix de réduire la gamme de calibration et de valider la relation de réponse selon un modèle de type linéaire de LOQ à 40LOQ. Les modèles de la carbamazépine et l'oxazépam ont, quant à eux, été validés sur toute la gamme dynamique, c'est-à-dire de LOQ à 50LOQ, selon un modèle de type linéaire. Pour chacun des jours de validation (n=3), l'exactitude en chaque point de la droite de calibration, calculée à partir du modèle linéaire précédemment déterminé, était comprise entre 80 et 120 %. Le test statistique de Fisher, considéré comme validé lorsque la valeur expérimentale ($F_{\text{calculé}}$) est inférieure à la valeur tabulée (F_{table}) pour un risque de 5%, a été validé avec succès pour l'ensemble des substances choisies pour cette étude, bien que les coefficients de régression (R^2) ne soient pas tous supérieurs à 0,99 (Table 88). Ces résultats permettent donc de confirmer les observations déjà disponibles dans la littérature, à savoir que le R^2 ne peut être considéré comme le seul garant de la qualité du modèle de régression choisi.

*Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³*

	F _{table}	Niveau Bas (Jour 1)			Niveau Moyen (Jour 2)			Niveau Haut (Jour3)		
		F _{expérimental}	R ²	Exactitude (min-max)	F _{expérimental}	R ²	Exactitude (min-max)	F _{expérimental}	R ²	Exactitude (min-max)
Carbamazépine	3,97	0,26	0,989	80-113	0,54	0,993	85-108	1,29	0,989	87-109
Oxazépam	3,97	0,17	0,987	90-105	0,38	0,994	81-104	1,91	0,992	80-108
Testostérone	4,53	1,97	0,990	88-106	0,77	0,994	84-112	0,17	0,992	82-106

Table 88: Paramètres permettant de valider le modèle de régression linéaire choisi pour cette étude

Les précisions intra et inter-jour ont permis d'évaluer la précision de la méthode développée, et sont présentées dans la Table 89.

	Précision intra-jour (RSD%)			Précision inter-jour (RSD%)		
	Niveau de concentration			Niveau de concentration		
	Bas	Moyen	Haut	Bas	Moyen	Haut
Carbamazépine	6,6	11,1	4,3	10,9	8,8	4,9
Oxazépam	6,1	6,7	2,5	9,2	3,2	5,3
Testostérone	7,7	6,1	7,3	9,7	7,1	5,5

Table 89: Précisions intra- et inter-jours déterminées sur trois niveaux de concentration dans le cadre de la validation de la méthode MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³ chez *Gammarus fossarum*

Les coefficients de variation associés aux précisions intra- et inter-jours étant respectivement inférieures à 20% et 30%, la méthode peut être considérée comme validée. Notons cependant que, de manière générale, les coefficients de variation associés à la précision de la méthode analytique sont plus importants que pour la méthode multi-résidus précédemment développée chez *Gammarus fossarum*. Bien que la stratégie analytique ait été quelques peu modifiée, cette différence peut être attribuée à l'utilisation du mode MRM³. En effet, malgré les avantages d'un tel mode de détection, il semble nécessaire de souligner que son utilisation nécessite une calibration de la trappe linéaire, et ce de manière quotidienne, celle-ci étant soumise à des dérives relativement fréquentes.

Les rendements d'extraction, ainsi que les effets de matrice obtenus dans le cadre du protocole de validation sont exposés dans la Table 90.

	Rendement d'extraction (%) (Moyenne ± écart type)			Effets de matrice (%) (Moyenne ± écart type)		
	Niveau Bas	Niveau Moyen	Niveau Haut	Niveau Bas	Niveau Moyen	Niveau Haut
Carbamazépine	101±11	110±12	96,5±4,2	-50,7±5,3	-51,8±6,8	-51,0±8,8
Oxazépam	88,4±4,6	95,3±6,2	96,9±2,4	-45,3±3,1	-47,1±2,6	-48,9±4,0
Testostérone	86,5±6,5	92,2±5,4	98,5±7,2	-50,6±1,5	-51,8±6,8	-50,5±7,7

Table 90: Rendements d'extraction et effets de matrice obtenus pour la méthode MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³

Les rendements d'extraction obtenus par la méthode miniaturisée de type QuEChERS, incluant l'étape d'extraction/partition assistée par des sels et l'étape de purification sur phase dispersive, sont globalement supérieurs à 90 %, et ce pour les trois molécules choisies pour cette étude. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Miller *et al.* (2015), et sont en parfaite adéquation avec les taux de recouvrement obtenus pour la méthode multi-résidus précédemment détaillée dans le chapitre 3 de ce manuscrit. Pour cette liste de molécules réduite, la miniaturisation et l'optimisation de l'étape de

*Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³*

purification sur phase dispersive, directement inspirée de la méthode QuEChERS initiale, semble avoir été réalisée avec succès, celle-ci n'entraînant aucune dégradation des performances analytiques de la méthode précédemment développée. Bien que les effets de matrices associés à cette stratégie analytique soient similaires à ceux rapportés dans la littérature pour l'extraction et l'analyse de substances pharmaceutiques dans des matrices biotiques ((Klosterhaus *et al.*, 2013; McEneff *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2015), ils sont très largement supérieurs à ceux mesurés pour la méthode multi-résidus. Plusieurs hypothèses permettant d'expliquer cette différence peuvent être formulées :

- Les conditions d'extractions et de pré-concentration en ligne étant différentes d'une méthode à l'autre, il est possible que celle-ci engendre une présence d'interférents plus importante ;
- Le gradient d'élution, plus court et plus rapide, pourrait être à l'origine de co-élutions plus importantes, ce qui conduirait à une diminution du processus d'ionisation et donc à une inhibition du signal mesuré ;

Cependant, malgré l'importance de ces effets de matrice, ceux-ci sont constants d'un niveau de concentration à un autre. Ces résultats, déjà observés lors du développement des méthodes multi-résidus, permettent donc de confirmer les hypothèses précédemment émises, à savoir l'existence d'effets synergiques entre pré-concentration en ligne et processus d'ionisation, qui impactent directement les effets de matrice.

8. Comparaison des modes de détection MRM et MRM³

Le travail présenté ci-dessus s'intéressait à l'utilisation de la MRM³ pour quantifier trois potentiels traceurs de pollution anthropique chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*. Aujourd'hui, seulement quelques études ont permis de mettre en évidence l'apport de la MRM³ pour améliorer la LOQ des peptides protéotypiques dans les échantillons complexes, tel que le plasma humain ou l'urine. Le 5500 QTRAP permettant de travailler à la fois en mode MRM et en mode MRM³, les performances de ces modes de quantification seront comparées, et l'apport de la MRM³ dans le cadre de la quantification de polluants émergents en matrice complexe sera discuté.

Afin de comparer les performances de ces deux modes de détection, des échantillons « blancs » dopés en concentration croissante de substances ciblées ont été extraits selon le protocole Micro-QuEChERS précédemment détaillé et analysés à la fois en mode MRM et MRM³. Les conditions nanochromatographiques utilisées, incluant l'étape de pré-concentration en ligne et l'étape de séparation, correspondent à celles présentées ci-dessus. Les transitions MRM, ainsi que les paramètres de détection associés sont identiques à ceux utilisés pour les méthodes multi-résidus.

8.1. Spécificité de détection du mode MRM par rapport au mode MRM³

La présence de nombreux interférents, liée à d'autres composés partageant des transitions MRM similaires ($\Delta m/z$ inférieur à 0.35) est un problème commun lors de l'utilisation du mode MRM au sein

de mélanges complexes. Ce phénomène est d'autant plus problématique lorsque les molécules ciblées sont présentes en faible concentration. Ainsi, il est nécessaire de suivre plusieurs transitions MRM, et de s'assurer que le ratio d'aire entre ces transitions reste constant pour identifier la présence éventuelle d'une interférence en matrice. De plus, un spectre MS² peut être nécessaire pour contrôler l'identité du composé sur le chromatogramme et s'assurer que le pic considéré ne correspond pas à un interférent.

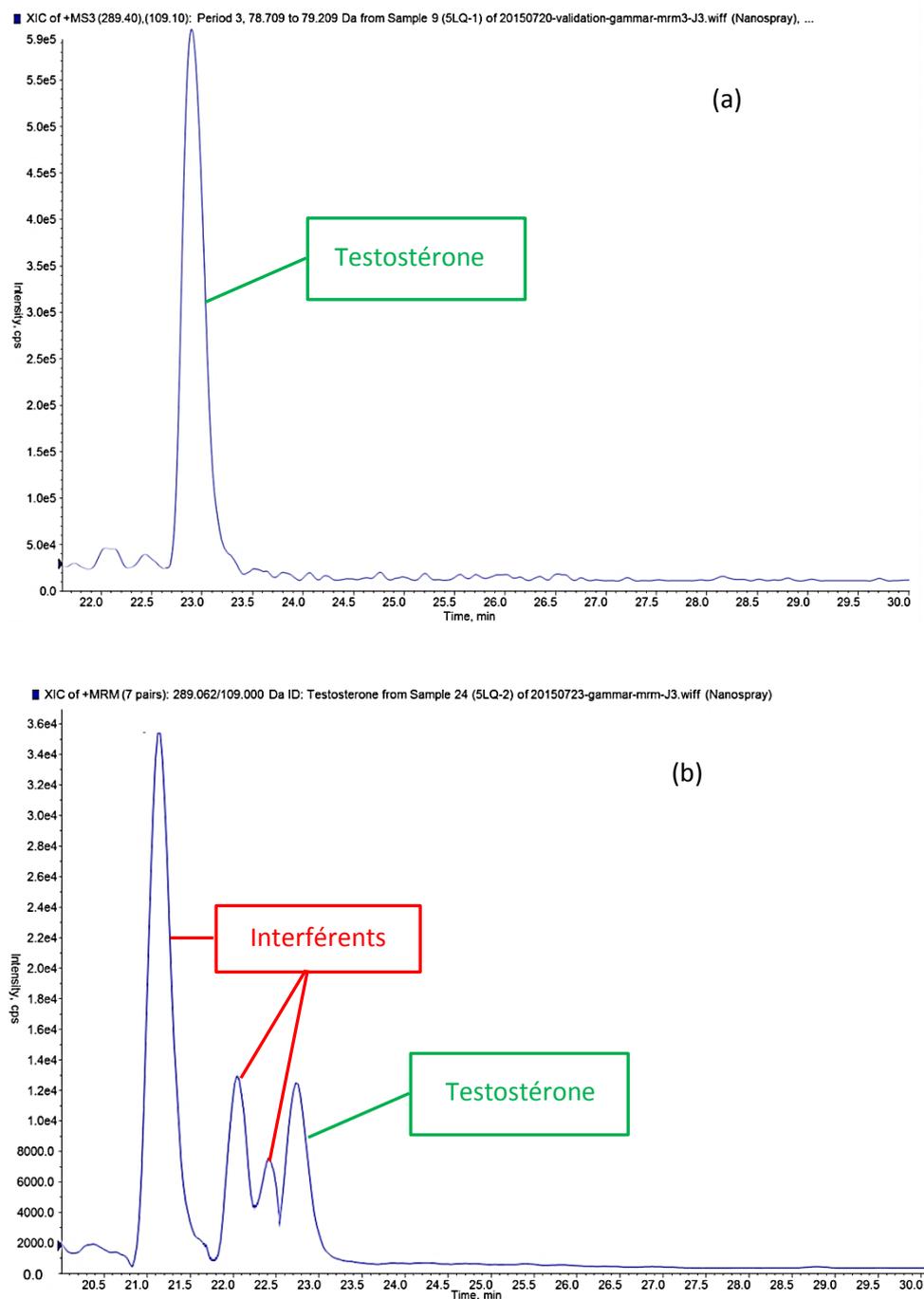


Figure 135: Illustration du gain en spécificité apporté par la MRM³, comparativement à celle observée en MRM (chromatogrammes reconstruits pour l'analyse MRM³ (a) et MRM (b) d'un extrait de Gammaré dopé à 20 ng/g (poids frais) de testostérone)

Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroGC&EChERS-NanoLC-MRM³

Un exemple typique de ce cas est présenté sur la Figure 135 (b), présentant le chromatogramme correspondant à l'extraction de la transition MRM la plus intense pour l'hormone stéroïdienne testostérone lorsque l'analyse est menée sur un échantillon de crustacé dopé à 20 ng/g (poids frais). Malgré toutes les précautions prises pour la sélection des transitions MRM obtenues d'après le spectre MS² après infusion de la molécule mère et leur optimisation, on peut observer un certain nombre d'interférents sur le chromatogramme reconstruit pour le signal du composé suivi. La présence de signaux d'intensité importante, très proches de la substance d'intérêt, engendre des problèmes pour réaliser une quantification efficace, en raison du manque de retour à la ligne de base pour le pic chromatographique.

A l'inverse, le chromatogramme reconstruit en MRM³ (Figure 135 (a)) à partir du signal de l'ion sous-produit MS³ le plus intense (289,4>109,1>79) se distingue par l'absence d'interférent autour du pic d'intérêt. Cet exemple illustre l'importante différence de spécificité entre les modes MRM et MRM³, qui peut être mise à profit pour quantifier efficacement un composé d'intérêt au sein d'un milieu complexe, comportant de nombreux interférents. En outre, il est intéressant de constater qu'en plus d'une spécificité accrue, le mode MRM³ permet d'obtenir des signaux bien plus intenses que pour le mode MRM, laissant présager un gain de sensibilité non négligeable.

8.2. Comparaison de la sensibilité d'analyse des modes MRM et MRM³

Afin d'évaluer l'impact de l'étape de fragmentation supplémentaire impliquée par le processus MRM³, vis-à-vis de la linéarité de la réponse et de l'amélioration des limites de quantification, des courbes de calibration ont été construites par dopage et extraction d'aliquots du pool de matrice blanche. Des blancs de matrice ont également été extraits puis analysés afin de déterminer les limites de quantification de la méthode MRM, en se basant sur l'amplitude du bruit des échantillons dits blancs (Table 91)

	LOD (ng/g poids frais)	LOQ (ng/g poids frais)
Carbamazépine	0,40	1,0
Oxazépan	0,35	1,0
Testostérone	3,9	10,2

Table 91: Limites de détection et de quantification obtenues en mode MRM

Ces résultats démontrent que la spécificité supplémentaire apportée par la MRM³ permet d'abaisser l'amplitude du bruit, permettant ainsi d'obtenir des LOQs jusqu'à trois fois plus basses pour les composés ciblés. Il semble également important de souligner que l'utilisation d'un tel mode de détection permet de s'affranchir d'une seconde transition. Or, en MRM, la LOQ est déterminée en fonction de la seconde transition (transition de confirmation) qui, bien que non utilisée pour la quantification doit être obligatoirement détectée à la LOQ. La seconde transition étant moins intense que la première, elle conduit généralement à des LOQ plus importantes.

Les courbes de calibration obtenues pour chacun des modes de détection et présentées selon un modèle de régression de type linéaire, sont illustrées sur les Figure 136 et Figure 137. Outre

Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration de potentiels traceurs de pollution anthropique chez Gammarus fossarum par MicroGC&ECh&EES-NanoLC-MRM³

l'amélioration des limites de quantification, on constate que la pente des droites de calibration relatives au mode MRM³ est bien plus importante que celle déterminée pour le mode MRM.

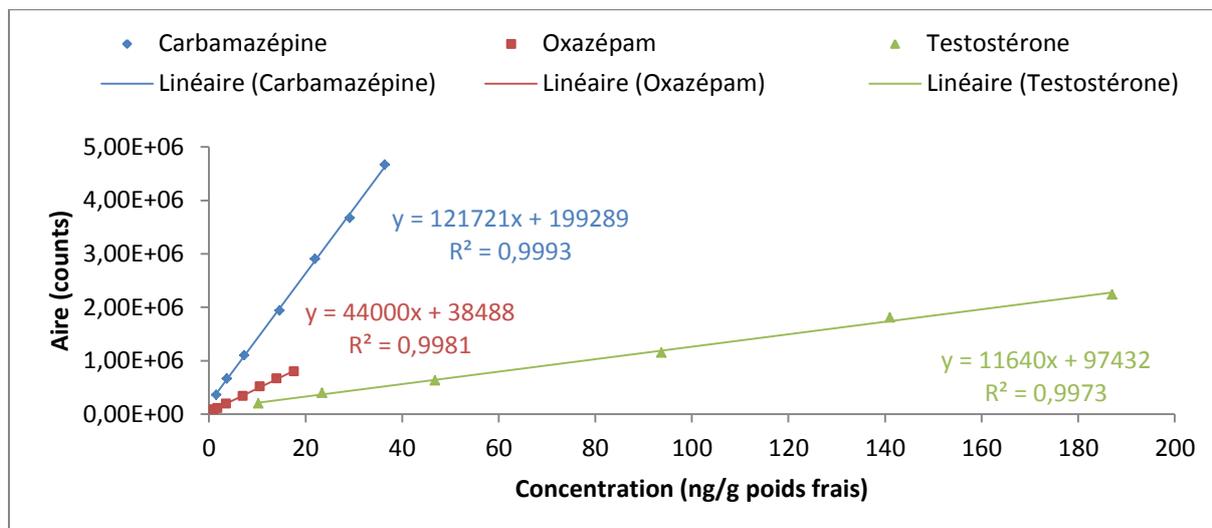


Figure 136: Droites de calibration de la carbamazépine, de l'oxazéпам et de la testostérone obtenues par MRM à partir de crustacés blancs, dopés puis extraits

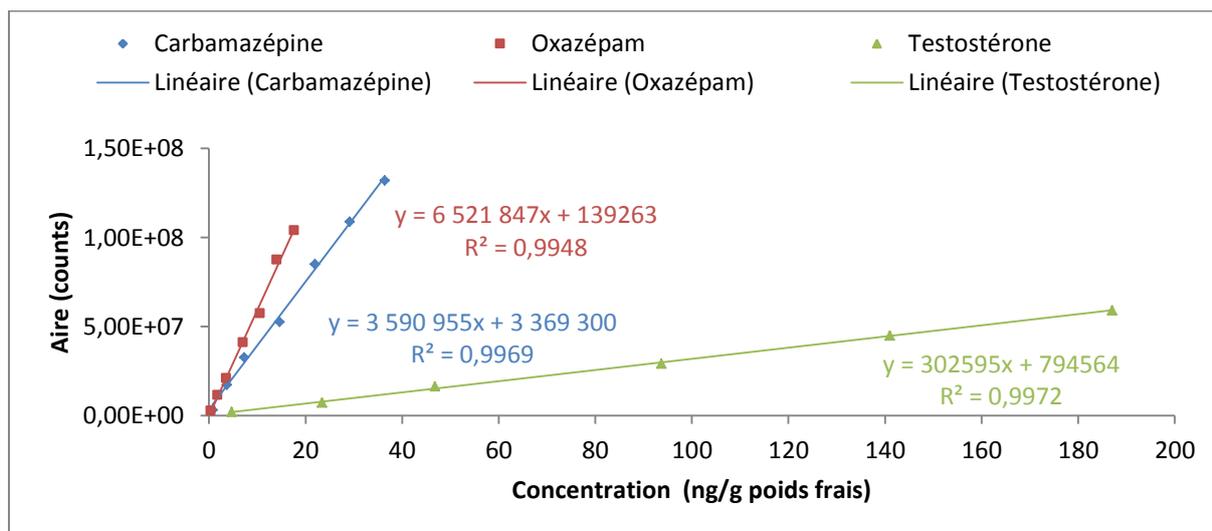


Figure 137: Droites de calibration de la carbamazépine, de l'oxazéпам et de la testostérone obtenues par MRM³ à partir de crustacés blancs, dopés puis extraits

La pente des droites de calibration permet de définir le coefficient de réponse des analytes, plus celle-ci est importante, meilleure sera la réponse du composé ciblé sur le système analytique considéré. Elle permet ainsi de refléter la sensibilité d'un système analytique vis-à-vis d'un composé donné. La sensibilité peut être définie comme la capacité de la méthode analytique à distinguer deux concentrations très proches l'une de l'autre. Par conséquent, au regard de la pente des droites de calibration, le mode MRM³ apparaît donc plus sensible que le mode MRM.

A travers l'étude de ces trois polluants émergents, la MRM³ apparaît comme une méthode particulièrement intéressante pour l'étude de mélanges biologiques complexes, permettant de

détecter et de quantifier les polluants d'intérêt faiblement concentrés, mais également de mettre en exergue une faible différence de concentration entre deux échantillons. L'utilisation d'un tel mode de détection pourra ainsi permettre de mettre en évidence des différences inter-individus et s'avère donc pertinente dans le cadre de nos travaux.

Partie B : Application à des échantillons réels : vers l'évaluation des cinétiques d'accumulation et de dépuraction

Le développement de la méthode analytique précédemment explicité avait pour but l'évaluation des cinétiques d'accumulation et de dépuraction de trois potentiels traceurs de pollution anthropiques, à savoir la carbamazépine, l'oxazépam et la testostérone, chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*. Ainsi, 80 organismes exposés au mélange de ces trois contaminants (200 ng/L) selon le protocole décrit dans le chapitre 2 de ce manuscrit, ont été analysés. Les cinétiques d'accumulation et de dépuraction ont été construites à partir des résultats d'analyse relatifs aux prélèvements des crustacés après 12 heures, 24 heures, 48 heures, 72 heures, 7 jours et 14 jours d'exposition, puis après 24 heures et 72 heures de dépuraction (Figure 139 et Figure 139). Notons que chaque prélèvement correspondait à un total de 10 organismes, ce qui nous permet d'évaluer la diversité interindividuelle.

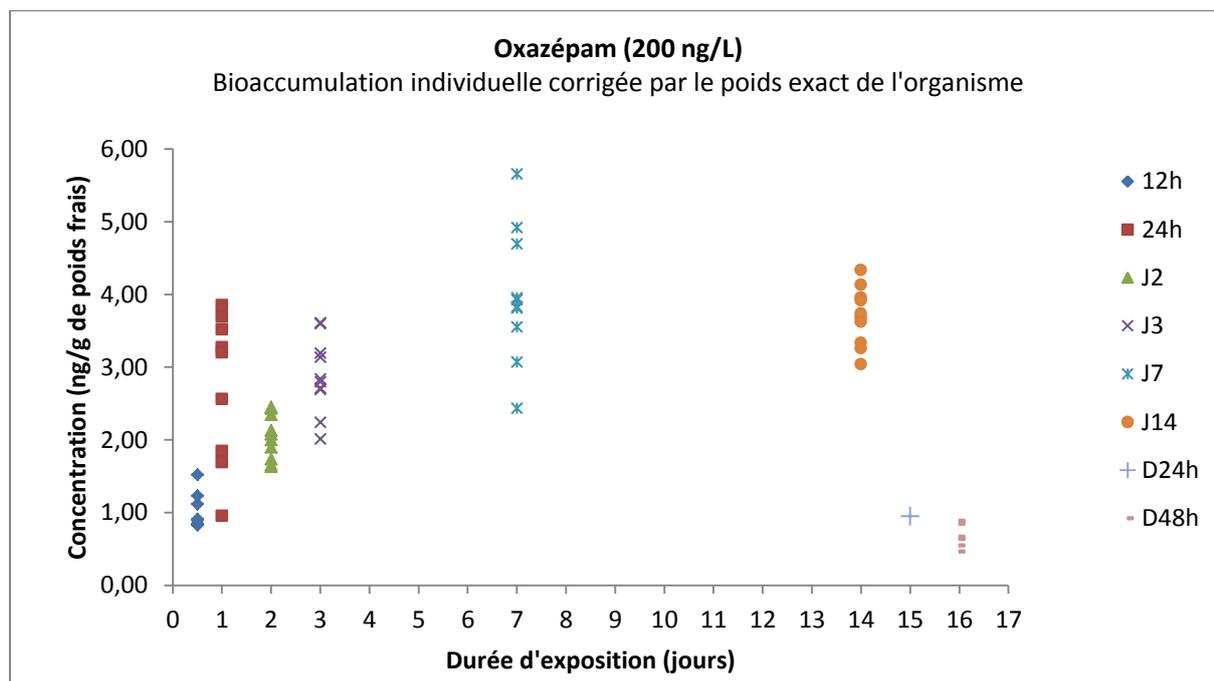


Figure 138: Bioconcentration individuelle de l'oxazépam chez *Gammarus fossarum* exposé pendant 14 jours à une concentration de 200 ng/L de contaminants recherchés. Les points D24h et D48h correspondent aux points de dépuraction

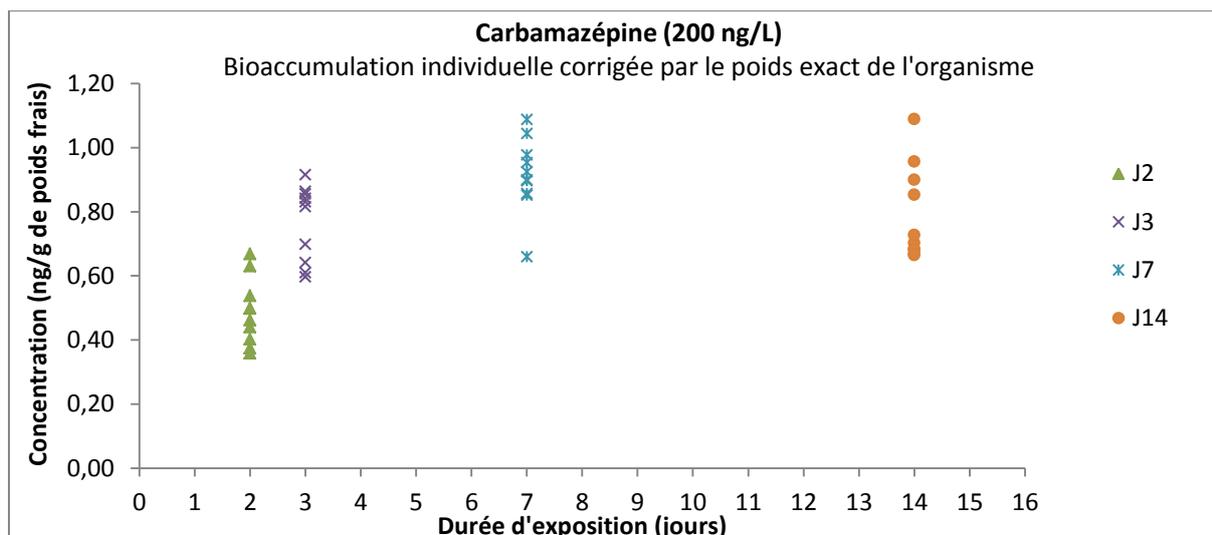


Figure 139: Bioconcentration individuelle de la carbamazépine chez *Gammarus fossarum* exposé pendant 14 jours à une concentration de 200 ng/L de contaminants recherchés.

Seule la courbe de bioconcentration de la testostérone n'a pas pu être déterminée puisque les concentrations mesurées se situaient en dessous de la LOQ.

En ce qui concerne la carbamazépine, les concentrations internes n'ont pu être quantifiées qu'à partir du deuxième jour, bien que les analytes soient détectés dès 12 heures. Les concentrations internes moyennes des organismes prélevés à J3, J7 et J14 sont identiques, ce qui signifie que le palier de bioconcentration est atteint entre le deuxième et troisième jour. Ces observations sont cohérentes avec les résultats obtenus par (Meredith-Williams *et al.*, 2012). Les points de dépuraction ont été détectés mais n'ont pu être quantifiés car inférieurs à la LOQ. Nous pouvons donc conclure que le gammare élimine très rapidement la carbamazépine lorsqu'il n'est plus exposé à ce contaminant. Les résultats de Meredith-Williams *et al.* (2012) montrent en revanche une dépuraction beaucoup plus lente que celle obtenue dans le cadre de notre étude. Ceci peut s'expliquer par la très forte concentration (environ 140 µg/L) auxquelles ont été exposés les gammares dans ces travaux. La quantité accumulée étant beaucoup plus importante, il est possible que celle-ci soit plus longue à être éliminée.

Pour l'oxazépam, le palier de bioconcentration est atteint plus tard, entre le 3ème et 7ème jour. Les concentrations internes mesurées sont supérieures à celles de la carbamazépine, ce qui indique que le gammare possède une capacité d'accumulation plus importante pour l'oxazépam. Là aussi, les résultats indiquent une dépuraction rapide puisqu'au bout de 24h, la concentration est inférieure à celle déterminée 24h après le début de l'exposition. Il n'existe à ma connaissance aucune publication présentant les résultats de courbe de bioconcentration pour l'oxazépam, il n'est donc pas possible de comparer les résultats obtenus.

A partir de ces résultats d'analyse, il est possible de calculer le facteur de bioconcentration (BCF), qui traduit la capacité d'une espèce à accumuler un composé chimique donné (Table 92).

Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuraction de potentiels traceurs de pollution anthropique chez Gammarus fossarum par MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³

	Concentration réelle moyenne dans l'eau ^d (ng/L)	Concentration dans l'organisme au pallier (ng/g de poids frais) ^c	BCF (L/kg) ^c
Carbamazépine	170,6	0,9 ^a ± 0,4	5,0 ^a ± 2,1
Oxazépam	171,7	3,8 ^b ± 2,1	22,4 ^b ± 12,4
Testostérone	197,5	<LOQ	ND

^a calculés sur J3, J7 et J14

^b calculés sur J7 et J14

^c moyenne ± 3*écart type

^d résultat d'analyse des milieux d'exposition

Table 92: Concentrations et facteurs de bioconcentration obtenus après une exposition de 14 jours à 200 ng/L des composés ciblés chez *Gammarus fossarum*

Pour la carbamazépine, les résultats sont proches de ceux obtenus dans diverses matrices biotiques (Zenker *et al.*, 2014) et se situent légèrement en dessous de ceux obtenus par Meredith-Williams *et al.* (2012), dont la moyenne se situe aux environs de 7. Encore une fois, cela peut s'expliquer par la très forte concentration d'exposition, presque 1000 fois plus élevée que dans notre cas et qui ne correspond pas à une concentration environnementale. L'effet de mélange induit par notre protocole d'exposition pourrait également expliquer cette différence. En effet, l'effet cocktail peut avoir une influence non négligeable sur les capacités d'accumulation d'un organisme donné. La littérature relate peu de résultats relatifs aux facteurs de bioconcentration de l'oxazépam chez les organismes aquatiques. A notre connaissance, aucun BCF n'a été déterminé chez des espèces proches du gammar. On trouve cependant quelques données chez des vertébrés comme les poissons (Brodin *et al.*, 2014; Fick *et al.*, 2010). Néanmoins, les valeurs de BCF calculées dans le cadre de notre étude se rapprochent de ceux obtenus par Meredith-Williams *et al.* (2012) pour le diazépam (37,5 L/kg), qui est un composé très proche chimiquement de l'oxazépam puisqu'ils font tous les deux partie de la famille des benzodiazépines. L'oxazépam fait d'ailleurs partie de la voie métabolique du diazépam et d'autres benzodiazépines (Besse et Garric, 2008).

Afin d'estimer les constantes de vitesse d'absorption et d'élimination, nous avons cherché à modéliser le modèle toxicocinétique à partir des concentrations internes mesurées pour chaque jour de prélèvement. Le modèle toxicocinétique est régi par une équation différentielle du premier ordre avec second membre (Ashauer *et al.*, 2010):

$$\frac{dC_{organisme}}{dt} = k_1 \times C_{eau}(t) - k_2 \times C_{organisme}(t)$$

Équation 20: Modèle toxicocinétique

Où t correspond au temps d'exposition, $C_{organisme}$ à la concentration interne du polluant dans l'organisme, C_{eau} à la concentration du polluant dans le milieu d'exposition, k_1 à la constante d'absorption et k_2 à la constante d'élimination.

*Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuraction de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³*

Comme C_{eau} est constante sur toute la durée de l'exposition, la solution de l'Équation 20 peut être exprimée de la manière suivante :

$$C_{organisme} = \frac{k_1}{k_2} \times C_{eau} \times (1 - e^{-k_2 t})$$

Équation 21: Solution de l'équation différentielle relative au modèle toxicocinétique

D'après la modélisation des données effectuée grâce au logiciel SciDAVis en utilisant l'algorithme Levenberg-Marquardt (Figure 140 et Figure 141), nous pouvons en déduire que les constantes d'absorption et d'élimination sont respectivement égales à 13,82 L/kg.jour et 0,64 L/kg.jour pour l'oxazépam, et 3,08 L/kg.jour et 0,62 L/kg.jour pour la carbamazépine. La bioaccumulation de l'oxazépam apparaît donc plus importante que celle de la carbamazépine. L'élimination est cependant identique et très rapide pour ces deux substances pharmaceutiques.

Lorsque la bioconcentration atteint son état d'équilibre, l'équation différentielle est égale à zéro, par conséquent $k_1 C_{eau} = k_2 C_{organisme}$, le BCF peut donc être calculé comme suit :

$$BCF = \frac{k_1}{k_2}$$

Équation 22: Calcul du BCF en fonction des constantes d'absorption et d'élimination

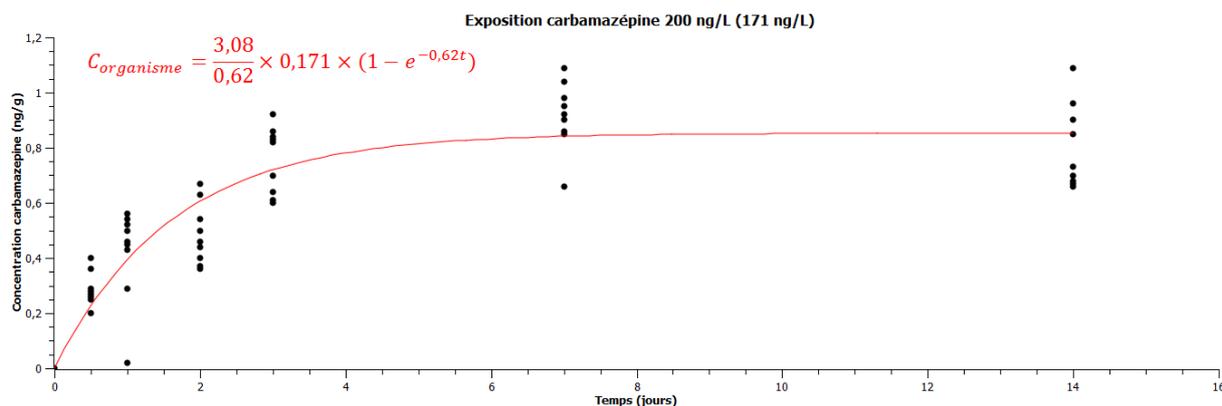


Figure 140: Modélisation des cinétiques d'accumulation de la carbamazépine chez *Gammarus fossarum*

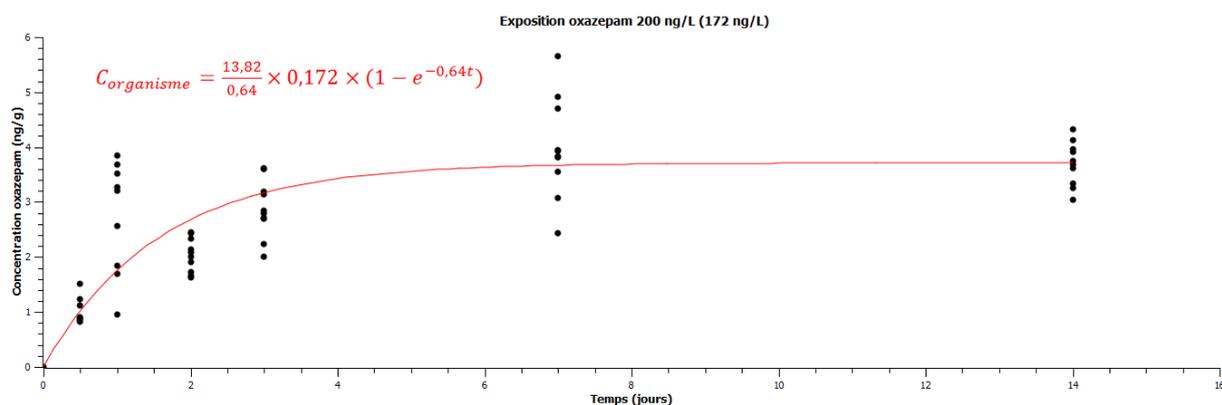


Figure 141: Modélisation des cinétiques d'accumulation de l'oxazépam chez *Gammarus fossarum*

Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuraction de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroGC&Ch&RS-NanoLC-MRM³

Lorsque nous effectuons le calcul des BCF selon l'équation présentée ci-dessus, nous obtenons des valeurs de 21,6 et 4,97 pour l'oxazépam et la carbamazépine, respectivement. Les BCF calculés grâce aux modèles sont donc similaires à ceux calculés précédemment (Table 92).

Les analyses ayant été réalisées sur 10 individus pour chaque point de cinétique, il est possible de déterminer une variabilité inter-individuelle. Celle-ci a été évaluée en calculant les coefficients de variation (CV %) obtenus sur les concentrations internes pour chaque jour de prélèvement. Les résultats sont présentés dans la Table 93. Ces variabilités s'avèrent finalement relativement faibles. Bien que les CV calculés soient supérieurs à ceux obtenus pour les précisions intra- et inter-jour relatives à la validation de la méthode d'analyse, il semble difficile de détacher la variabilité inter-individuelle de l'erreur engendrée par la stratégie analytique (erreur expérimentale et erreur due au modèle de régression). Des expériences supplémentaires s'avèrent donc nécessaires. A titre d'exemple, nous pourrions réaliser l'exposition d'une centaine d'organismes, dont la moitié serait poolée et l'autre moitié analysée à l'échelle d'un individu. L'analyse en grand nombre d'aliquots du pool permettrait d'évaluer l'erreur analytique (la diversité inter-individuelle étant négligée en raison du grand nombre d'organismes poolés), alors que les analyses à l'échelle d'un individu permettraient d'évaluer la diversité inter-individuelle.

Durée d'exposition	Carbamazépine (CV %)	Oxazépam (CV%)
12h	<LQ	23,4
24h	<LQ	37,4
Jour 2	NC ^a	15,1
Jour 3	8,0	18,1
Jour 7	12,9	23,1
Jour 14	18,6	10,9
Dépuraction 24h	<LOQ	NC ^a
Dépuraction 48h	<LOQ	27,1

^a Non calculé car un seul échantillon

Table 93: Coefficients de variation (CV %) des concentrations internes en carbamazépine et oxazépam mesurées sur 14 jours d'exposition et 2 jours de dépuraction chez *Gammarus fossarum*

Conclusion

La quantification ciblée de polluants faiblement concentrés au sein de matrices biotiques complexes représente souvent un challenge important. Dans ce chapitre, les bénéfices apportés par la détection en mode MRM³ pour mener ce type d'études ont été présentés, comparativement aux performances obtenues en MRM. L'obtention de performances quantitatives supérieures en terme de limite de quantification a été rendue possible par l'utilisation d'un appareil hybride quadripôle/trappe ionique linéaire, permettant d'utiliser alternativement l'un des 2 modes de quantification développés ici. Ainsi, selon la substance considérée, il a pu être observé un abaissement des LOQ de facteur allant de 0,7 à 3 en utilisant la MRM³, par rapport à ce qui était observé en mode MRM. De plus, la spécificité supplémentaire apportée par la méthode représente

*Chapitre 6 : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuraction de potentiels traceurs de pollution anthropique chez *Gammarus fossarum* par MicroQuEChERS-NanoLC-MRM³*

un grand intérêt pour la simplification du processus analytique, permettant ainsi de se passer d'une préparation d'échantillon poussée ou d'une modification des paramètres chromatographiques qui permettraient d'éliminer un interférent. De plus, le fait de n'observer qu'un pic chromatographique net et sans interférence pourrait permettre d'automatiser le processus d'intégration des pics (en se basant par exemple sur le temps de rétention), simplifiant encore le traitement de longues séries d'échantillons. Dans l'idée de développer des méthodes robustes et abordables financièrement, cette simplification du processus représente aujourd'hui un avantage certain lorsque l'analyse nécessite des centaines d'échantillons.

La miniaturisation de l'étape de purification sur phase dispersive communément utilisée pour les méthodes de type QuEChERS nous a permis de réaliser l'extraction à l'échelle d'un crustacé, permettant ainsi l'évaluation de la bioaccumulation à l'échelle d'un individu. Les rendements d'extraction, supérieurs à 90%, mettent en évidence la pertinence d'une telle miniaturisation, sans dégradation des performances aujourd'hui reconnues de la méthode QuEChERS.

La mise en œuvre de la nanochromatographie liquide, technique séparative encore peu utilisée en analyse environnementale, nous a permis de s'affranchir de la très faible quantité d'échantillon disponible. L'étape de pré-concentration en ligne, induisant l'injection d'un plus large volume d'échantillon, a été optimisée grâce à la méthodologie des plans d'expériences, permettant ainsi de réduire le nombre d'expériences et d'obtenir les paramètres de piégeage optimaux pour chacune des substances ciblées. Cette stratégie statistique nous a également permis de mettre en évidence l'existence d'effets synergiques entre les facteurs influant sur la pré-concentration, confirmant ainsi les hypothèses émises dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

La spécificité et la sensibilité de méthode analytique développée ici, incluant une extraction de type Micro-QuEChERS et une analyse par NanoLC-MRM³, nous a finalement permis d'évaluer les cinétiques d'accumulation et de dépuraction de trois potentiels traceurs de pollution anthropiques chez le crustacé *Gammarus fossarum*. Les résultats indiquent que cette espèce possède un fort potentiel bioaccumulateur vis-à-vis des substances psychotropes, plus important pour l'oxazépam que pour la carbamazépine, ainsi qu'une capacité de dépuraction relativement rapide. Ces analyses ont également démontré une faible variabilité interindividuelle dont l'évaluation exacte nécessiterait des expérimentations supplémentaires.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce projet effectué en étroite collaboration avec les équipes d'écotoxicologues du laboratoire IRSTEA avait pour objectif premier le développement de méthodes analytiques permettant l'étude de la bioaccumulation de polluants émergents chez trois invertébrés aquatiques d'eau douce. La sélection des composés d'intérêt pour cette étude a été effectuée dans un objectif de représentativité des diverses familles et classes physico-chimiques de substances dont l'occurrence dans l'environnement est avérée. Les 35 composés retenus, issus de plusieurs listes de priorisation, appartiennent à de nombreuses familles de polluants telles que les pesticides, les plastifiants, les médicaments, les hormones, les alkylphénols, les alkyls perfluorés ou encore les filtres UV. La réalisation d'un tel objectif imposait notamment de disposer de méthodes analytiques sélectives, sensibles et robustes, tout en prenant en compte la diminution drastique de la quantité d'échantillon disponible due à la très faible masse des invertébrés benthiques étudiés dans le cadre de ce projet, mais également le caractère multi-résidus de la méthode à mettre en place. Un protocole basé sur une extraction de type MicroQuEChERS suivie d'une analyse par NanoLC-MS/MS a ainsi été développé. La miniaturisation de la méthode d'extraction QuEChERS a permis d'évaluer la bioaccumulation des polluants sélectionnés à l'échelle d'un seul individu pour deux des espèces investiguées (*Gammarus fossarum* et *Potamopyrgus antipodarum*), offrant ainsi à l'écotoxicologie les mêmes outils qu'à la toxicologie humaine. La mise en place de cette extraction/partition à l'acétonitrile assistée par des sels fournit des rendements d'extraction supérieurs à 75% pour la majorité des composés d'intérêt tout en consommant seulement 700 µL de solvant organique par extraction. A l'heure où les problématiques environnementales deviennent des enjeux sociétaux, la chimie analytique doit elle aussi s'inscrire dans une démarche de diminution de la quantité de produit chimique utilisée. Ce protocole semble donc parfaitement s'inscrire dans l'aire d'une chimie plus « verte ». La mise en œuvre d'une analyse par NanoLC-MS/MS a permis de détecter et de quantifier simultanément les polluants d'intérêt, offrant ainsi la sélectivité recherchée et une sensibilité permettant d'atteindre des niveaux de la trace et de l'ultra-trace dans des matrices biotiques pourtant complexes. Ces travaux montrent également la faisabilité et la pertinence de cette plateforme analytique encore peu utilisée dans le domaine de la chimie environnementale.

Les méthodes d'analyses ciblées, développées et validées dans le cadre de ces travaux ont été appliquées lors de campagnes d'exposition des organismes sélectionnés, réalisées sur différents sites d'étude localisés en région Rhône-Alpes. Les résultats obtenus mettent en évidence les capacités de bioaccumulation des espèces sentinelles choisies pour cette étude. Parmi les 35 polluants émergents d'intérêt, 19 ont été détectés dans au moins un échantillon analysé. Ces diverses études ont également permis de mettre en exergue des diversités de réponse inter-espèces, témoignant de la complémentarité des modèles biologiques choisis pour évaluer la qualité des milieux récepteurs. Bien que ces résultats aient permis de montrer l'apport des rejets de STEP en terme de contamination biodisponible pour les organismes aquatiques, ils témoignent également de la complexité de mise en œuvre de programmes de biomonitoring tant les résultats obtenus en laboratoire et sur le terrain peuvent dans certains cas s'avérer disparates. Ainsi, de nombreuses questions restent à ce jour en suspens. Ces résultats offrent cependant des perspectives de

Conclusion générale

recherche intéressantes notamment dans la compréhension de la contribution des différentes matrices environnementales (eau, sédiment, matière en suspension...) en terme de biodisponibilité des contaminants, mais également celle de l'impact de facteurs confondants tels que la température du milieu ou encore la quantité et la qualité de la nourriture disponible, pouvant impacter les processus de bioaccumulation.

La seconde partie de ce travail a été consacrée à la mise en œuvre d'approches métabolomiques permettant d'étudier les procédés de biotransformation. Ces études ont été réalisées par NanoLC-HRMS. Les résultats présentés dans ce manuscrit ont permis d'identifier les étapes clés permettant l'obtention d'empreintes moléculaires compréhensives, au cœur des études métabolomiques, telles que l'analyse des échantillons, le traitement de données de type « omique » ou encore l'interprétation des résultats. Le temps alloué à chacune de ces étapes augmente progressivement de l'analyse des échantillons au traitement mathématique/statistique des données et à l'interprétation des résultats. Tout au long de cette seconde partie, la métabolomique s'est avérée être une stratégie compréhensive, capable de mettre en évidence une quantité d'informations très importante. L'analyse d'échantillons d'origine biotique par spectrométrie de masse haute résolution couplée à la chromatographie liquide conduit à des empreintes moléculaires formées de milliers de signaux ayant des propriétés physico-chimiques et des intensités très différentes. Les résultats présentés dans ce manuscrit mettent en évidence l'impact de la manipulation et du stockage de l'échantillon, ainsi que l'influence des conditions expérimentales et du choix des paramètres de traitement des données sur la qualité des empreintes moléculaires. Ces travaux ont permis de mettre en exergue l'impact des pressions anthropiques sur le métabolome des invertébrés aquatiques d'eau douce, mais également de confirmer l'influence des conditions d'exposition qui avaient pu être suggéré lors des analyses de type ciblé, témoignant ainsi de la complémentarité des approches mises en jeu au cours de cette étude. Celles-ci permettront de rechercher des corrélations entre état des populations, biomarqueurs, et concentrations de polluants biodisponibles et bioaccumulés. Le principal verrou analytique reste cependant lié à l'annotation et à l'identification sans ambiguïté des métabolites. Bien que des projets de recommandations permettant d'assurer l'identification des métabolites soient maintenant disponibles, notamment au travers de la «Metabolomics Standards Initiative» (Sumner *et al.*, 2007) , cette ultime étape d'annotation reste encore et toujours la zone d'ombre des approches métabolomiques. Des initiatives telles que la mise en place de la base de données comme la HMDB facilitent maintenant l'affectation des pics. Cependant, il est encore nécessaire d'enrichir ces bases de données notamment en terme de données spectrales en variant les appareillages et les énergies de collisions. Toutefois, et sans surprise, les métabolites caractérisés dans les bases de données aujourd'hui disponibles se concentrent sur des mammifères, et en particulier sur la biologie humaine. Les études métabolomiques appliquées à l'environnement sont donc susceptibles de nécessiter des efforts supplémentaires et pourraient bénéficier considérablement de la création de bibliothèques de métabolites réservées aux organismes non-mammifères tels que les invertébrés. Les travaux réalisés au cours de ce projet pourraient ainsi constituer une première étape dans la détermination du métabolome des espèces d'intérêt. Une

Conclusion générale

question demeure cependant : que peut-on considérer comme le métabolome de référence ? En effet, afin d'interpréter au mieux ces données de type « omique », il est d'une importance capitale de connaître la biologie fondamentale des espèces étudiées. Par exemple, les paramètres liés à l'histoire de vie, les stades de développement, le sexe, l'âge et les stratégies de reproduction sont importants. De toute évidence, les études métabolomiques relatives à l'étude des facteurs de stress naturels et/ou anthropiques seront moins pertinentes sans cette connaissance de base. Ce type d'approche pluridisciplinaire nécessite donc des échanges permanents entre le chimiste analyste, le statisticien/chimiométricien et le biologiste. Malgré ces verrous analytiques et méthodologiques, ces travaux ont tout de même permis de mettre en évidence les capacités de biotransformation de polluants émergents des organismes choisis pour cette étude, avec notamment l'annotation d'un métabolite de l'AINS ibuprofène chez *Chironomus riparius*. Il semble aujourd'hui important de s'intéresser aux métabolites des polluants environnementaux issus de leur transformation dans les organismes. Ceci est d'autant plus pertinent que les espèces sélectionnées pour cette étude représentent les premiers maillons de la chaîne alimentaire. Ces métabolites peuvent en effet être considérés comme de nouveaux composés possédant leurs propres propriétés physico-chimiques et leur propre toxicité qui pourrait s'avérer plus importante que celle des composés parents. Notons cependant que la disponibilité des composés standards de référence pour ces substances est souvent un point bloquant pour pouvoir développer les protocoles analytiques adéquats.

La dernière partie de ces travaux a été consacrée à la mise au point d'une méthode de quantification innovante par l'utilisation du mode MRM³. Cette étude avait pour objectif d'étudier les cinétiques d'accumulation de potentiels traceurs de pollution anthropique (carbamazépine, oxazépam et testostérone) chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*. En raison d'un nombre limité de polluants étudiés et toujours dans l'objectif de réaliser cette étude à l'échelle d'un individu, la méthode QuEChERS a pu être miniaturisée dans son intégralité, incluant l'étape d'extraction/partition assistée par des sels mais également l'étape de purification sur phase dispersive. Afin d'atteindre la spécificité et la sensibilité nécessaire à la quantification des polluants d'intérêt, la nanochromatographie liquide utilisée en combinaison avec le mode MRM³ a été mise en œuvre avec succès. Outre le fait de permettre d'abaisser les limites de quantification par rapport à une méthode MRM classique, cette technique a permis de s'affranchir de la présence d'interférents concentrés pour fournir une quantification encore plus fiable. Bien que ce mode de quantification ait déjà fait ses preuves dans le monde de la protéomique, ces travaux constituent la première utilisation d'un tel mode pour la quantification de petites molécules (<300 Da) et laisse entrevoir le potentiel de cette technique, notamment pour pallier à la complexité des matrices couramment étudiées en chimie environnementale.

Les défis analytiques relevés lors de ce projet de thèse ont donc permis de réelles avancées dans le domaine de l'analyse environnementale, offrant ainsi des outils fiables et robustes à l'écotoxicologie.