

De l'analyse ciblée à la non ciblée : quand la chimie analytique ouvre le champ d'investigation des micropolluants

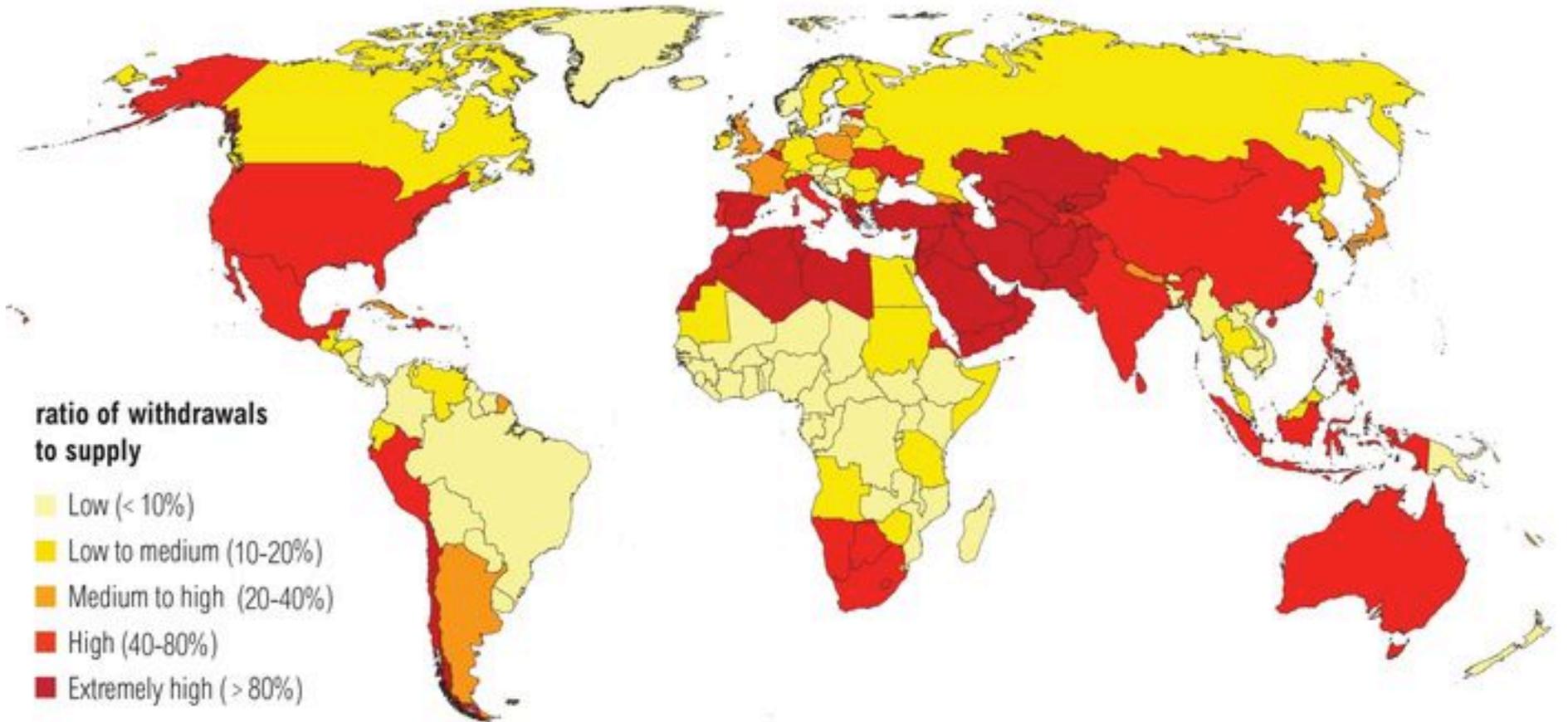
Application au milieu aquatique

H. Budzinski, MH. Dévier, C. Gardia-Parège, L. Fuster

LPTC – EPOC- UMR 5805 CNRS - Université de Bordeaux

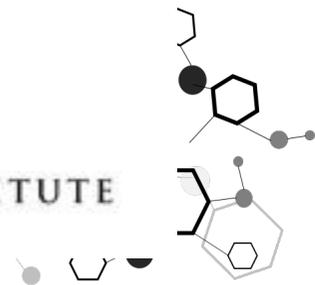


Water Stress by Country: 2040

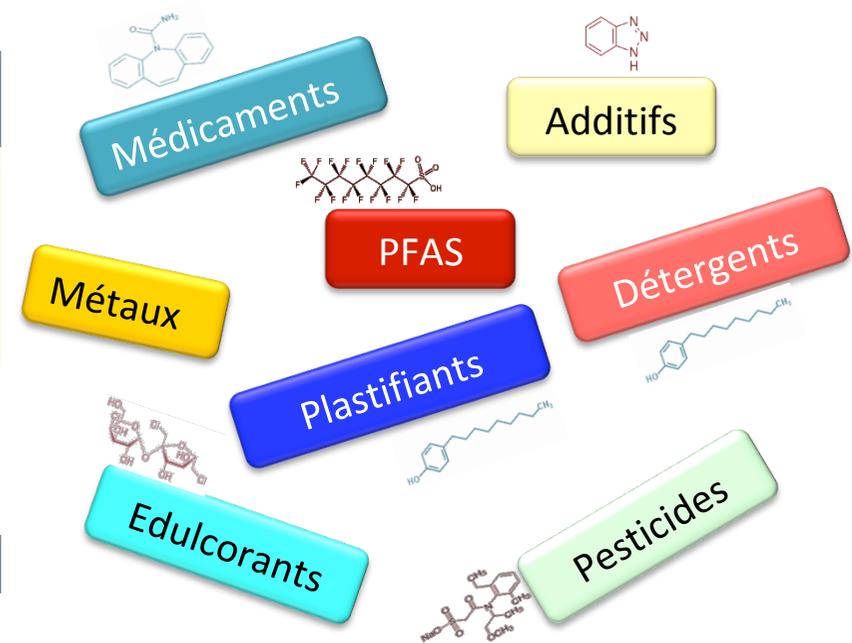
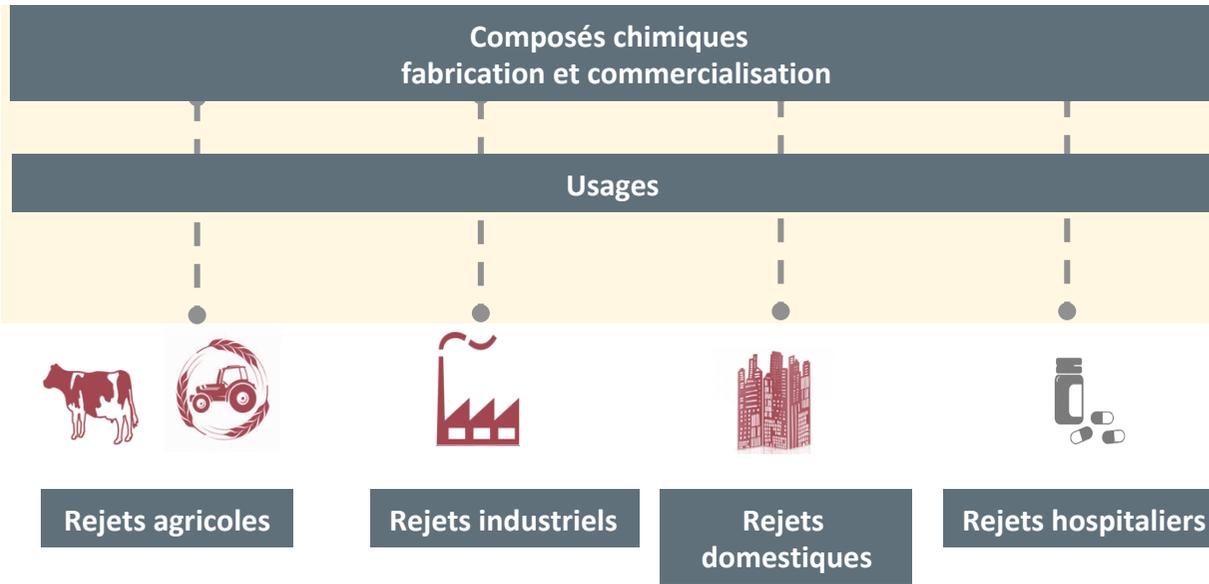


NOTE: Projections are based on a business-as-usual scenario using SSP2 and RCP8.5.

For more: ow.ly/RiWop



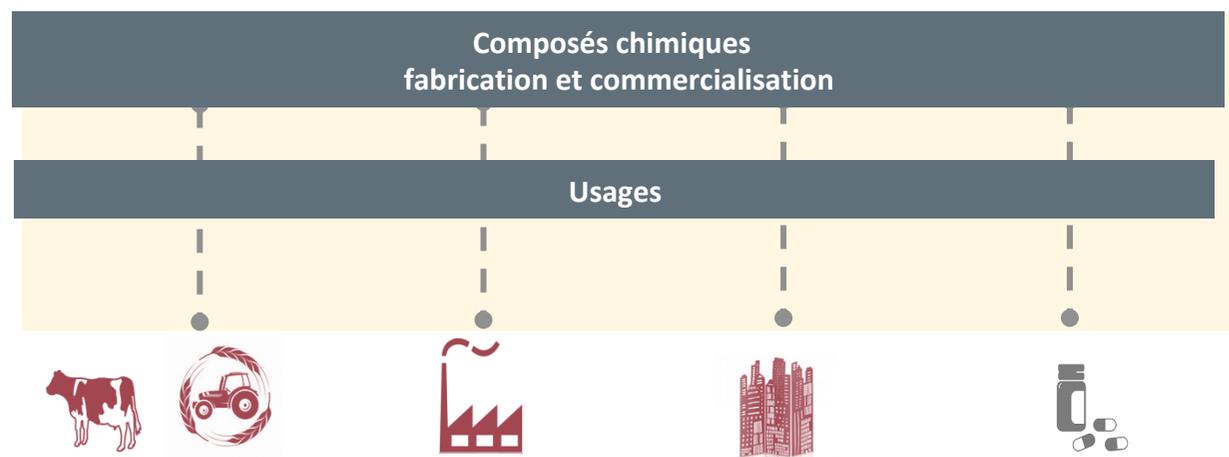
sources



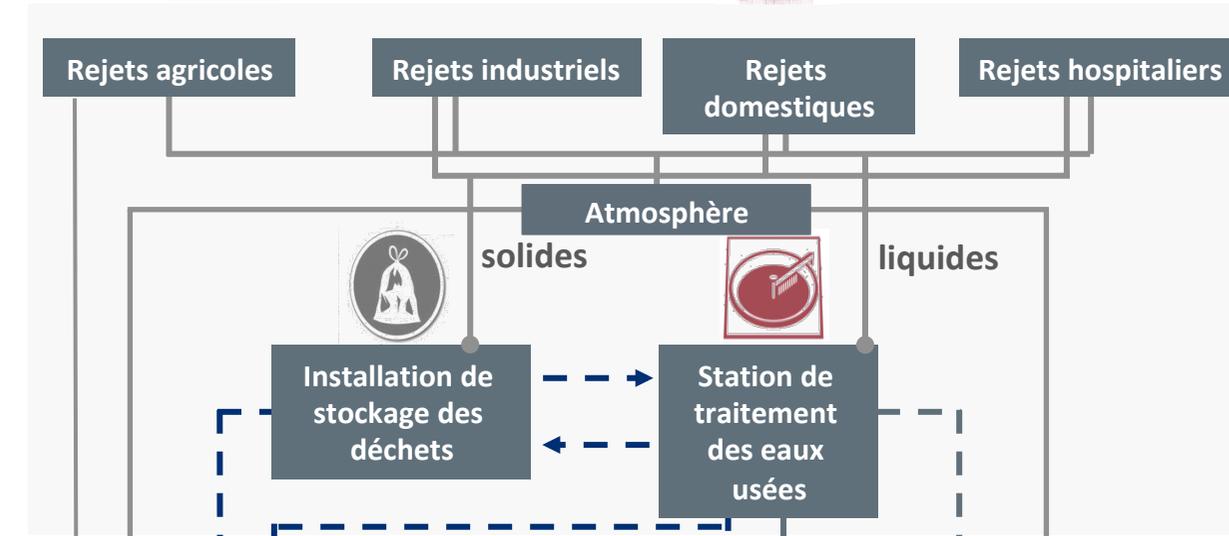
Fuster (2017)

Multi-usages – Multi-sources – Multi-classes – Multi-composés

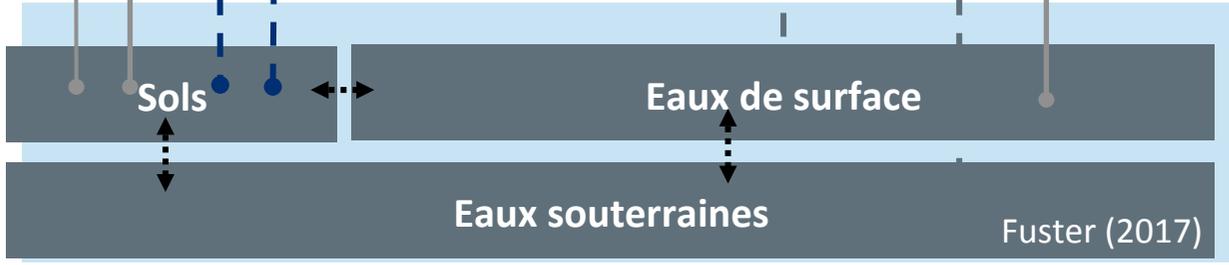
sources



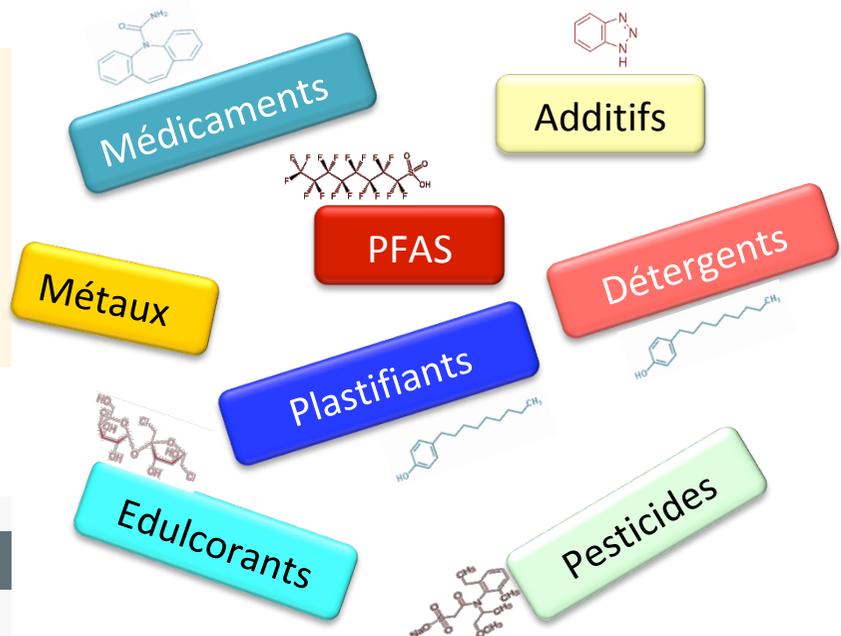
vecteurs



Récepteurs



Fuster (2017)

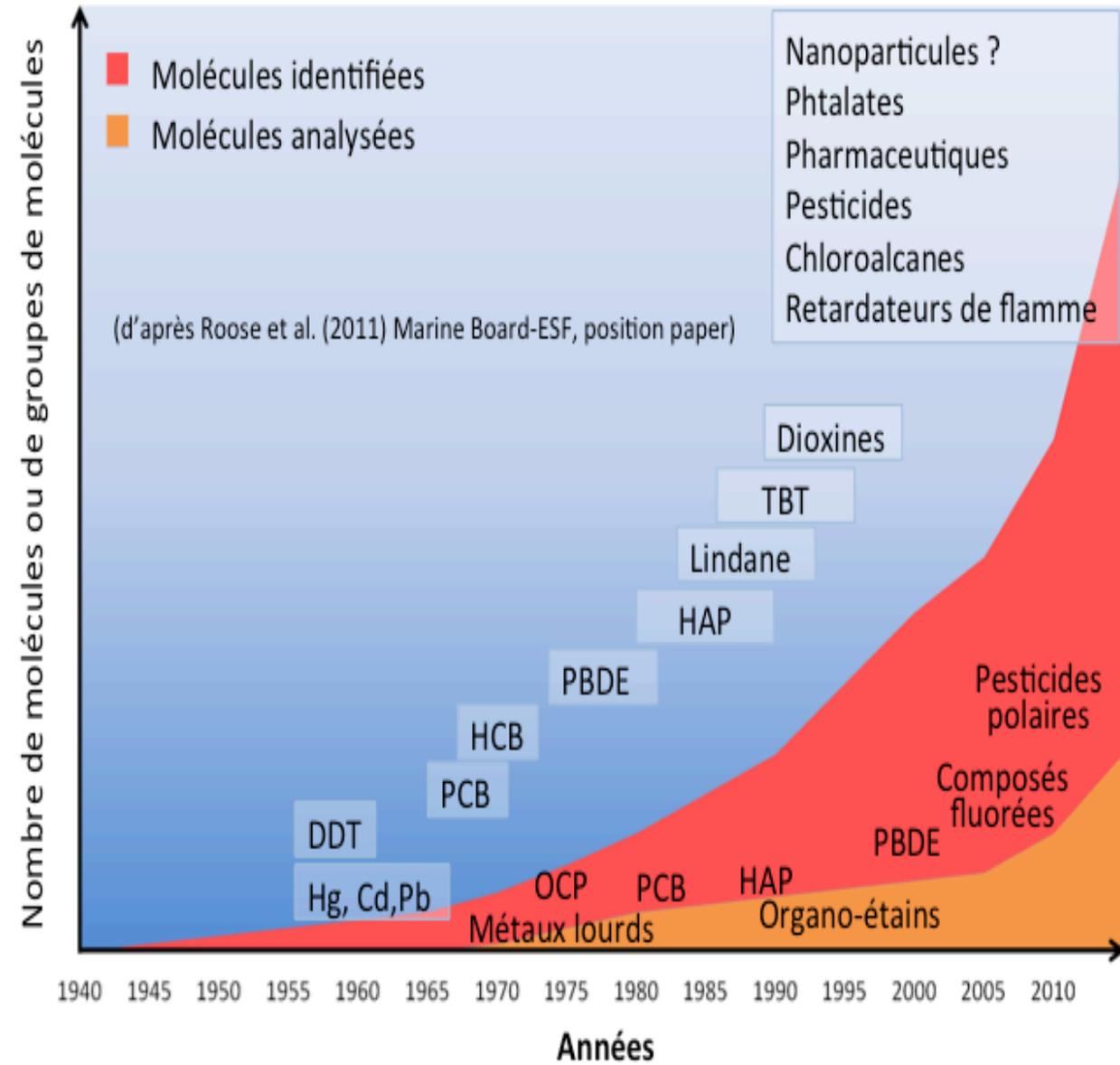


Composés chimiques
 Reg. 1907/2006/CE : REACH
 Reg. 1107/2009/UE : produits phytosanitaires
 Reg. 528/2012/UE : biocides
 Dir. 2001/82-89/CE : médicaments à usages vétérinaires/humains

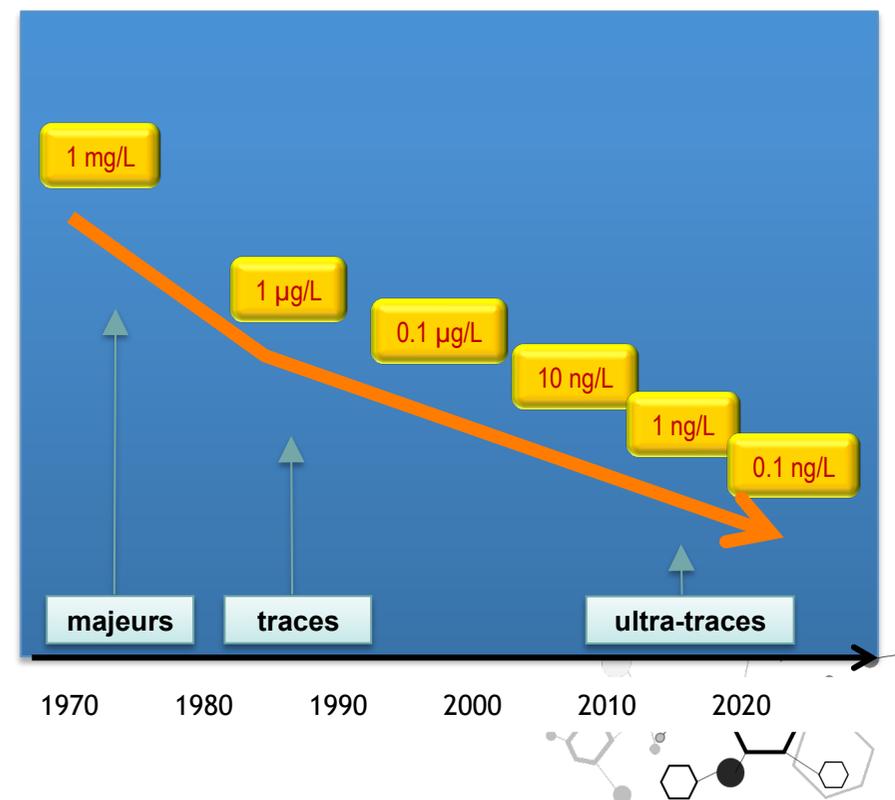
Emissions et Rejets
 Dir. 2010/75/UE « IED » ; émissions industrielles
 Reg. 166/2006 « E-PRTR » : déclaration des rejets : 91 molécules
 Dir. 91/271/CEE « ERU » collecte, transport et traitement des eaux urbaines

Milieus
 Dir. 2000/60/CE : DCE
 Dir. 2006/118/CE : eaux souterraines
 Dir. 2008/56/EC « DCSMM » : milieu marin
 Arrêté du 08/01/98 pour épandage boue sur sol agricole

Analyses ciblées :



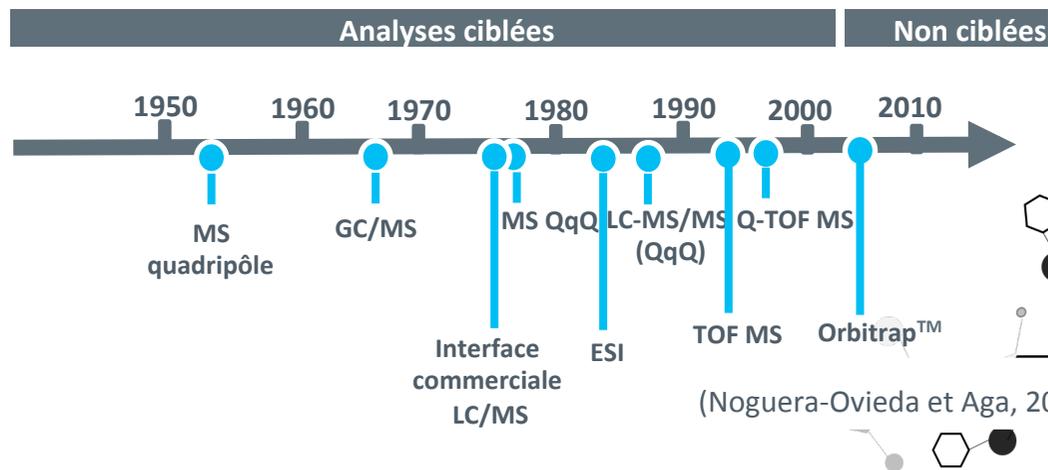
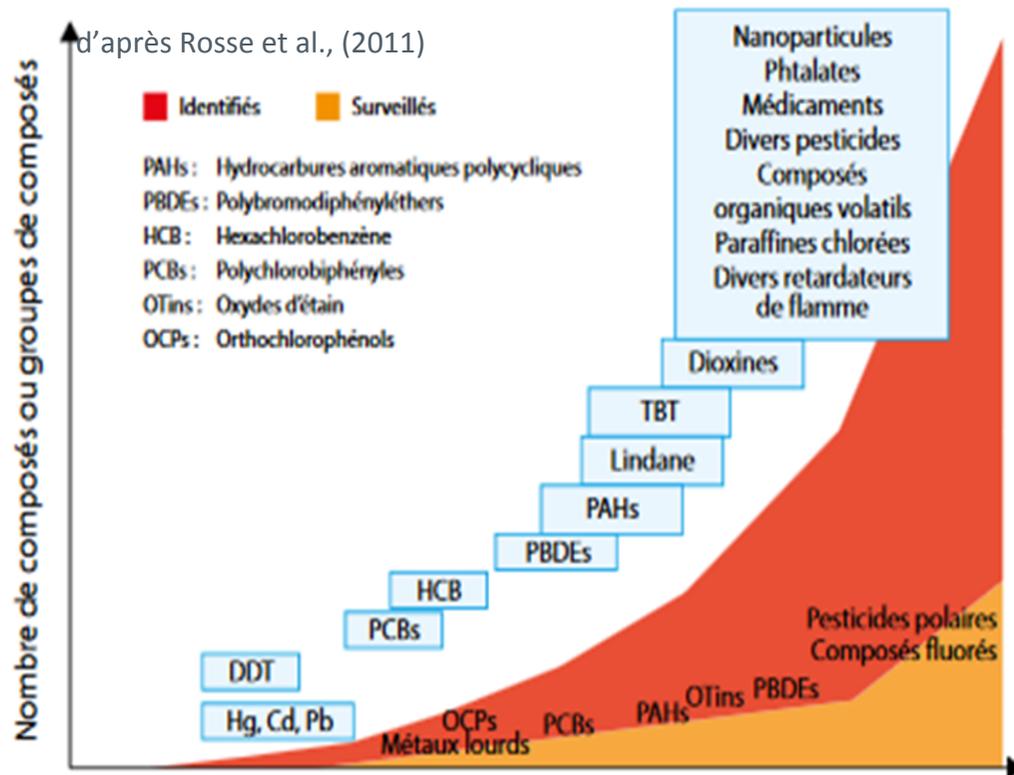
- Screening de plus en plus large
- Mise en évidence d'un grand nombre de composés
- Sensibilité améliorée de façon continue



Contaminants réglementés

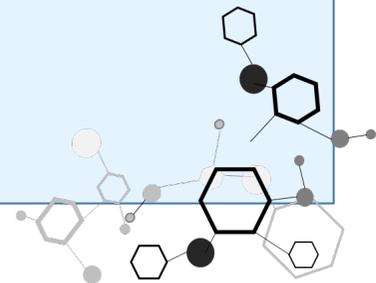
Contaminants d'intérêt émergent déjà identifiés

Contaminants inconnus



Contaminations environnementales - Micropolluants

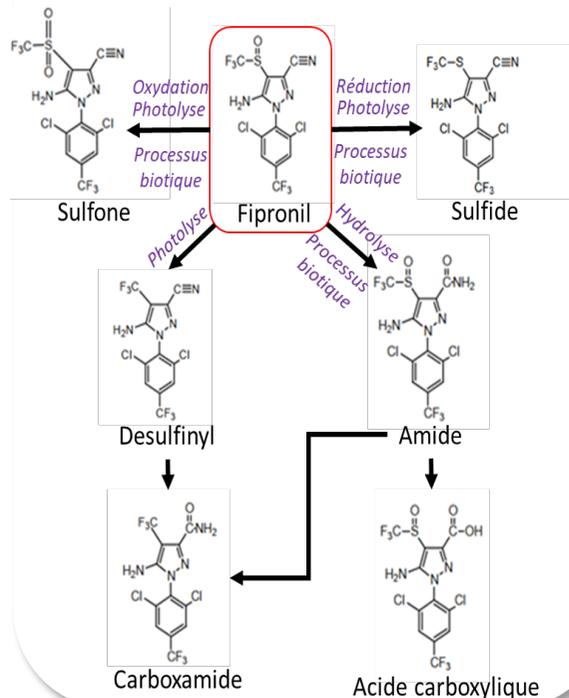
- Faibles niveaux (ex : ng/L) (sensibilité – traces et ultra-traces)
 - Cas des hormones stéroïdiennes : effets toxiques au ng/L
 - Normes de Qualité Environnementale (NQE) : Endosulfan 0,5 ng/L – EE2 0,035 ng/L
 - Matrices complexes et variées
 - Multi-contaminants – Mélanges
- } sélectivité/multirésidus
- Variabilité / Représentativité (spatiale / temporelle)
 - **Spéciation/transformation** →
 - **Lien présence/effets toxiques** →



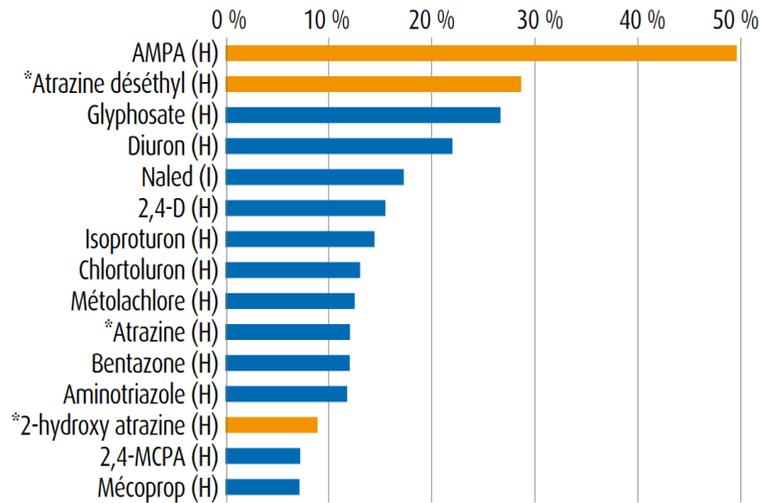
Les enjeux

- >130 millions de composés organiques et inorganiques référencés (CAS registry)
- Plus de 110 000 composés chimiques mis sur le marché européen (dont 30 000 à 70000 utilisés chaque jour)
- Dans l'environnement, ces chiffres sont décuplés -> produits de transformation

Un composé peut mener à plusieurs produits

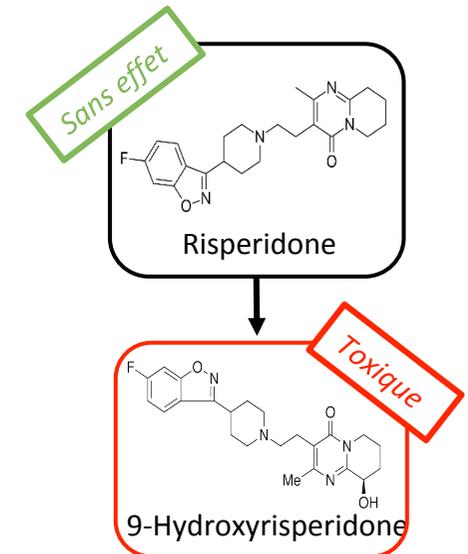


Taux de quantification des pesticides dans les cours d'eau en France (2007 à 2009)



(Commissariat général au développement Durable, octobre 2011)

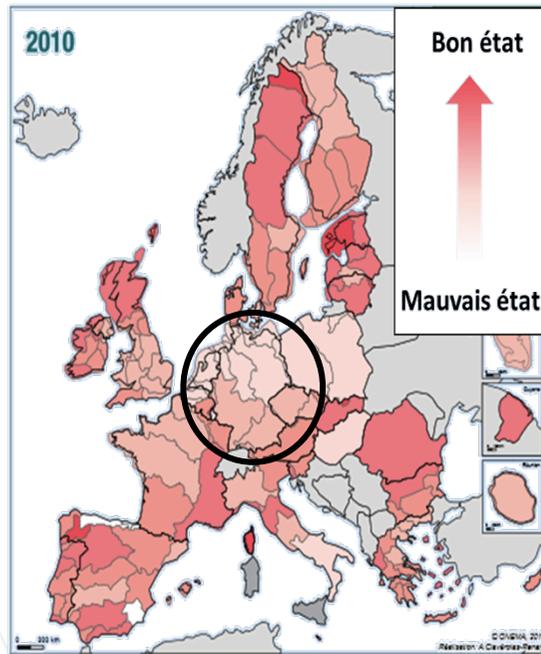
Parfois...produit de transformation plus toxique que le composé parent



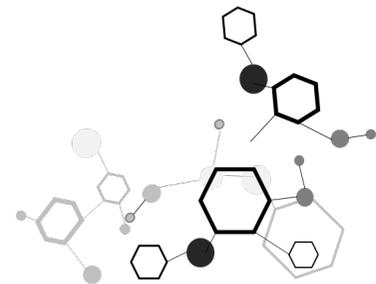
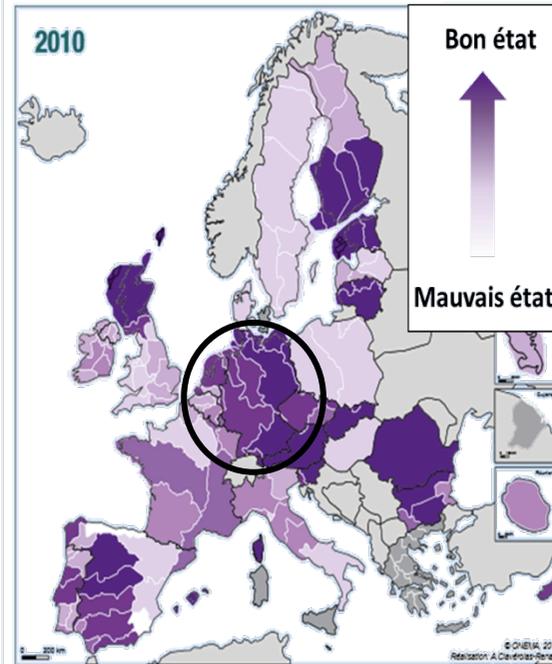
Les enjeux

- Etablir un lien entre l'état chimique et les observations écologiques
 - lien de cause à effet

Part des masses d'eau de surface (toutes catégories d'eau confondues) en bon ou très bon état écologique

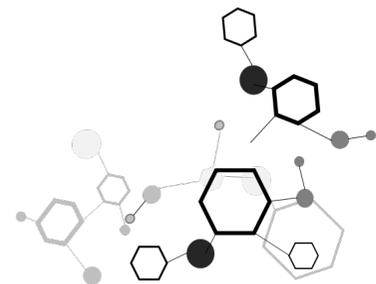


Part des masses d'eau de surface (toutes catégories d'eau confondues) en bon état chimique



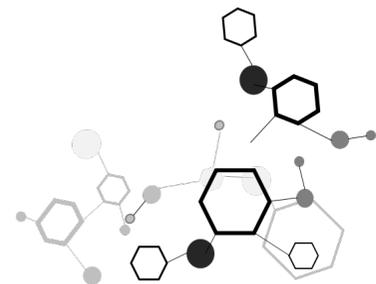
Différents axes de recherche

- Développement de stratégies analytiques
- Caractérisation des sources
- Etude des phénomènes de transformation
- Développement de l'analyse dirigée par les effets (EDA)

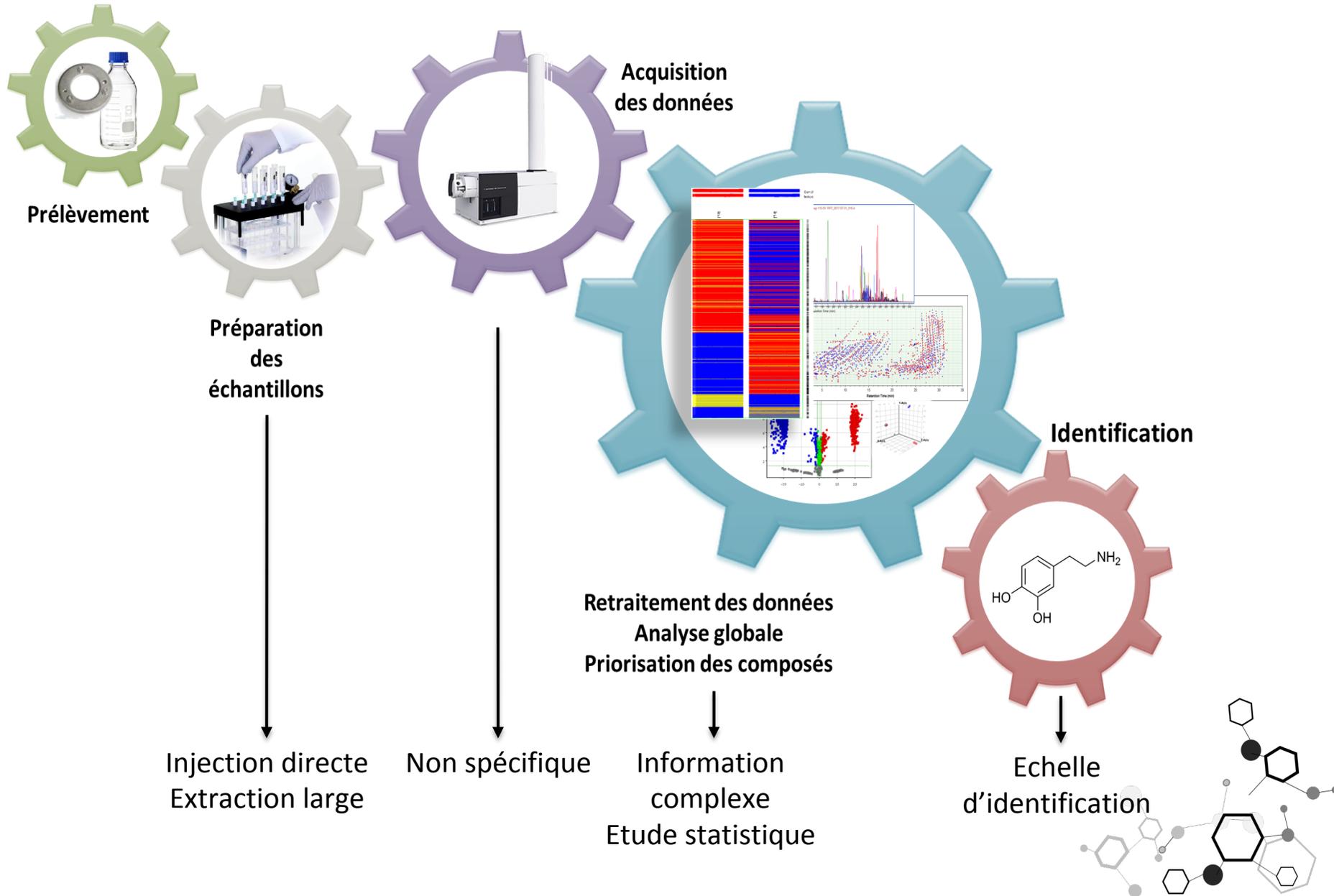


Différents axes de recherche

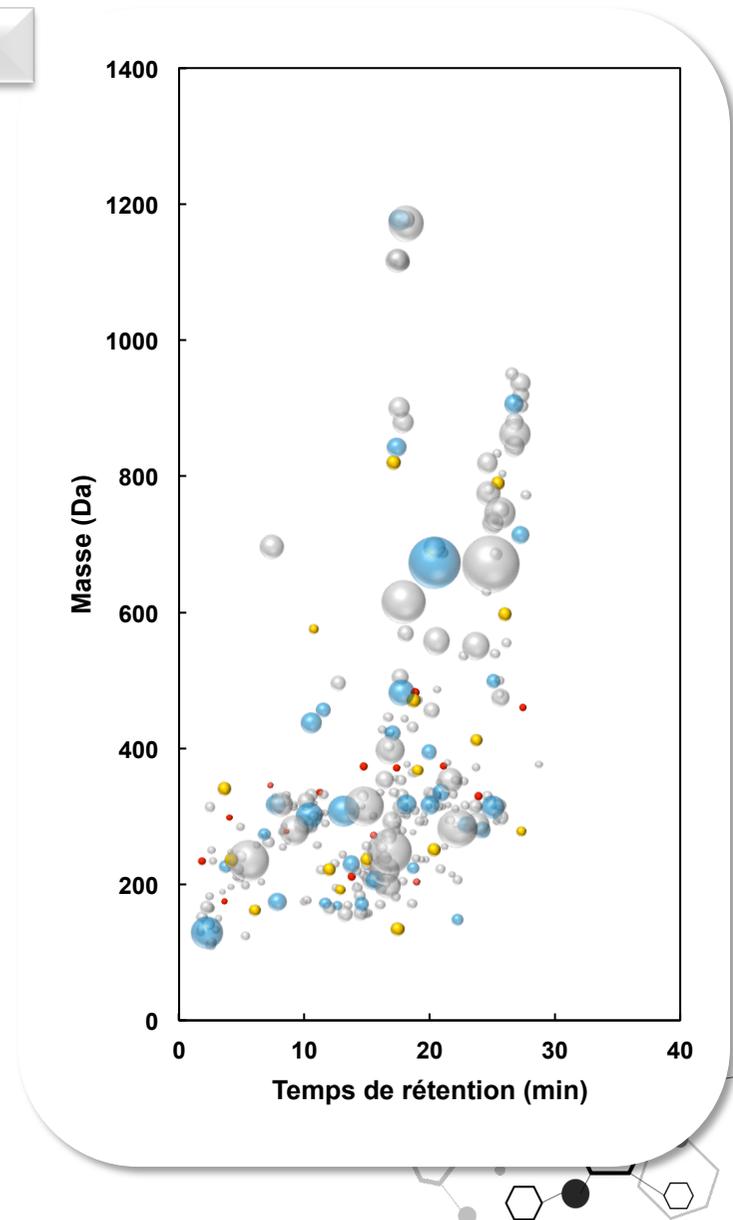
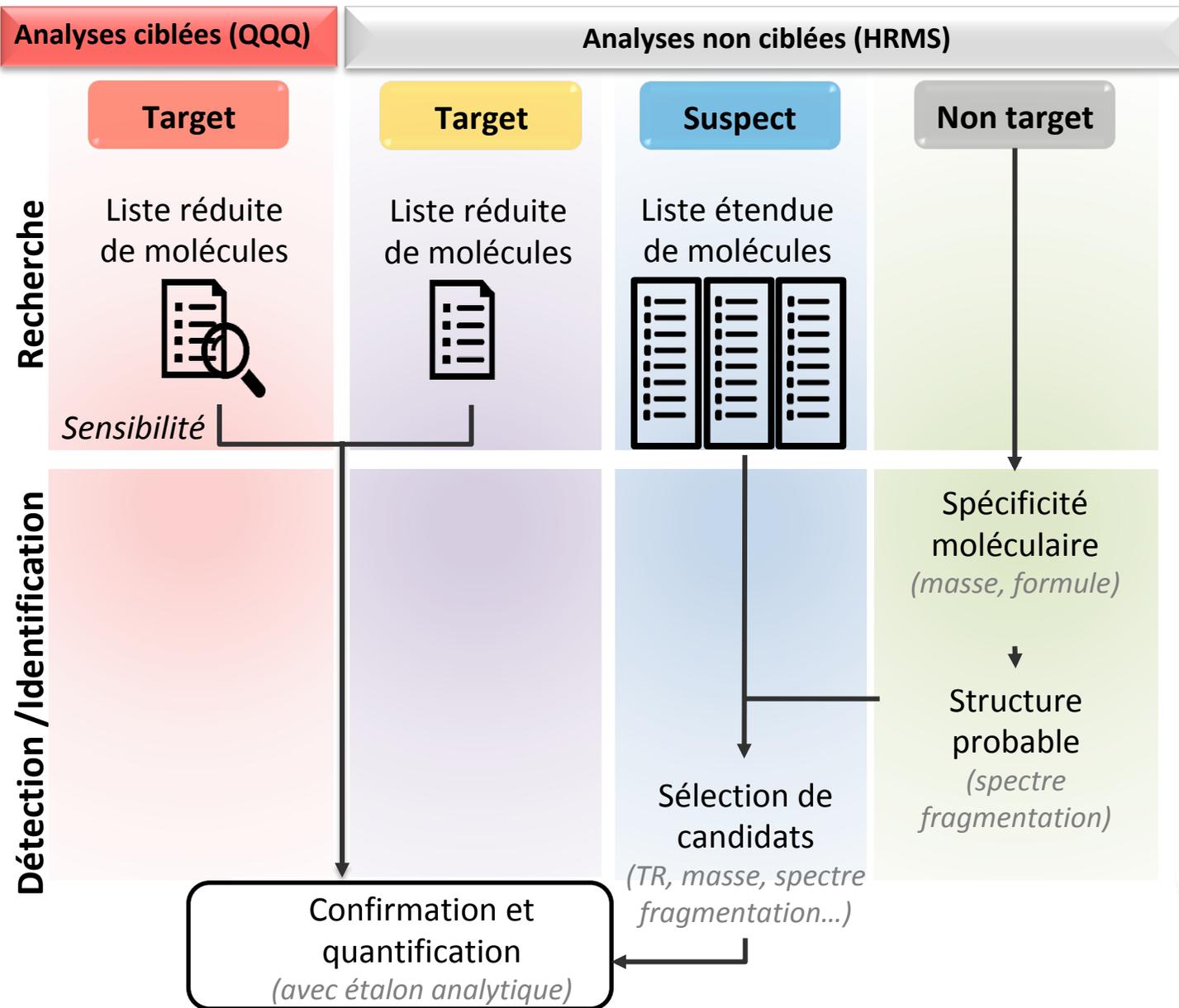
- Développement de stratégies analytiques
- Caractérisation des sources
- Etude des phénomènes de transformation
- Développement de l'analyse dirigée par les effets (EDA)



Adaptation de la méthodologie

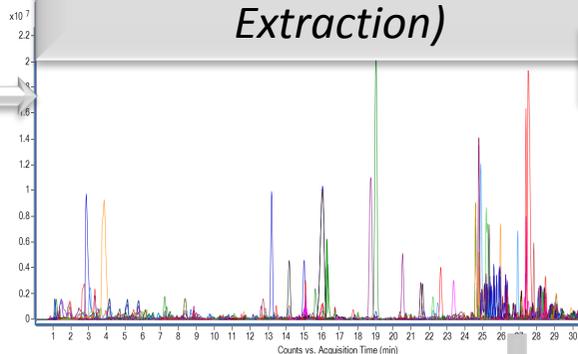


Stratégies analytiques



Acquisition et traitement des données HRMS

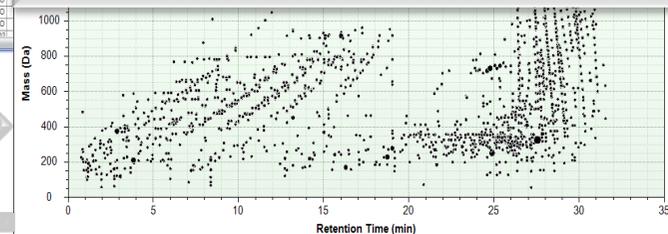
Criblage moléculaire
(*Molecular Feature Extraction*)



Spécificité des molécules

Cpd	File	Source	Name	Formula	Saturated	RT	m/z	Mass	Score	Score (Lab)	Score (DB)
4	20100621_L1	DESearch	Be (2-Hydroxyprop...	C6 H15 N O2		0.9403	116.107	133.1103	49.81		99.6
495	20100621_L1	DESearch	Be (2-Hydroxyprop...	C6 H15 N O2		0.9403	116.107	133.1103	49.81		99.6
5	20100621_L1	DESearch	Be (2-Hydroxyprop...	C6 H15 N O2							
494	20100621_L1	DESearch	Be (2-Hydroxyprop...	C6 H15 N O2							
496	20100621_L1	DESearch	Be (2-Hydroxyprop...	C6 H15 N O2							
490	20100621_L1	NFG		C8 H15 N O							
497	20100621_L1	DESearch-NFG	Tropine	C8 H15 N O							
499	20100621_L1	NFG		C8 H15 N O							
487	20100621_L1	DESearch	Benzocoumarone...	C8 H6 O4							
990	20100621_L1	NFG		C8 H4 O3							
488	20100621_L1	DESearch	Benzocoumarone...	C8 H6 O4							
998	20100621_L1	NFG		C8 H4 O3							
20	20100621_L1	DESearch-NFG	p-Hydroxydextra...	C9 H13 N O							
511	20100621_L1	NFG		C9 H13 N O							
512	20100621_L1	NFG		C9 H13 N O							
13	20100621_L1	DESearch	Benzoquinone...	C9 H8 N O2							

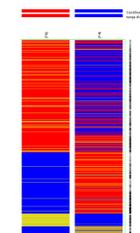
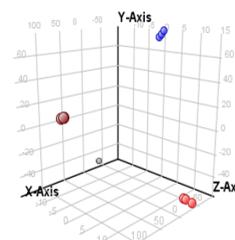
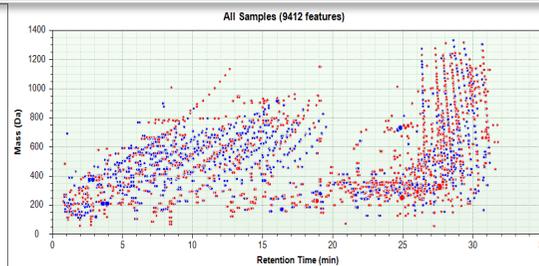
Empreinte moléculaire de
l'échantillon
(*Mass Profiler*)



Mass spectrometer:
Agilent 6540 Q-TOF LC/MS

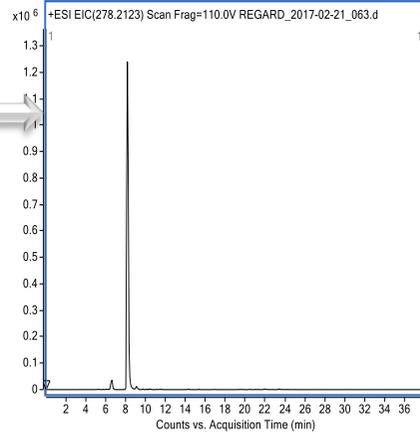
Gamme de masse : 100-1700 m/z
Mode ionisation : ESI +, ESI-
Mode d'acquisition : MS

Analyse des données

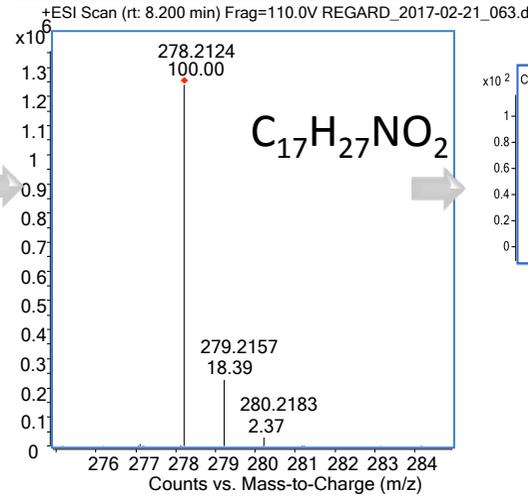


Identification moléculaire

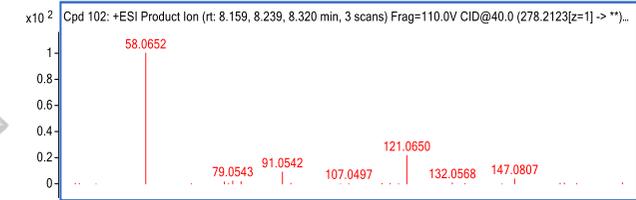
TR et aire du composé d'intérêt
(Extract ion chromatogram)



Massif isotopique



Spectre de fragmentation



Comparaison des spectres obtenus à ceux disponibles dans les bibliothèques spectrales
(internes, commerciales)

Correspondance:
Structure probable

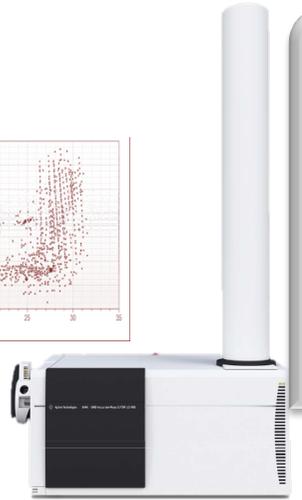
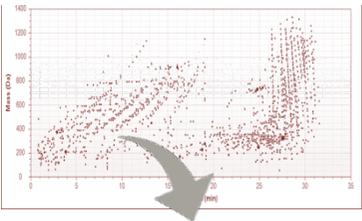
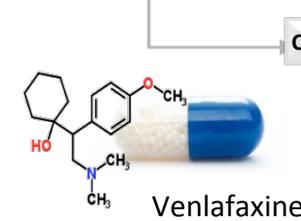
Pas de correspondance:

- Recherche de structure par :
 - logiciel in silico (Metfrag)
 - Propriétés physico-chimique
 - Référence bibliographique...

Achat du composé:
si disponible dans le commerce

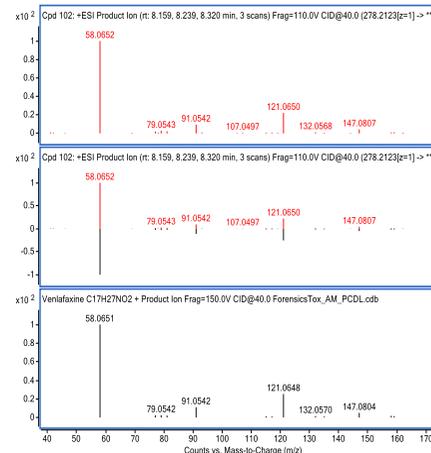
Liste de structure probable

Confirmation

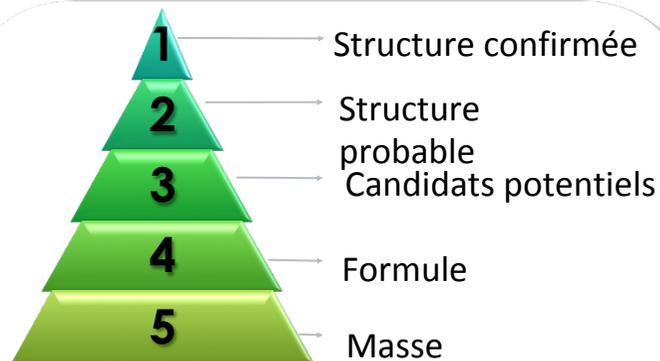


Spectromètre de masse :
Agilent 6540 Q-TOF LC/MS

Mode d'acquisition :
Target MS/MS
Auto MS/MS (Data Dependent Acquisition)

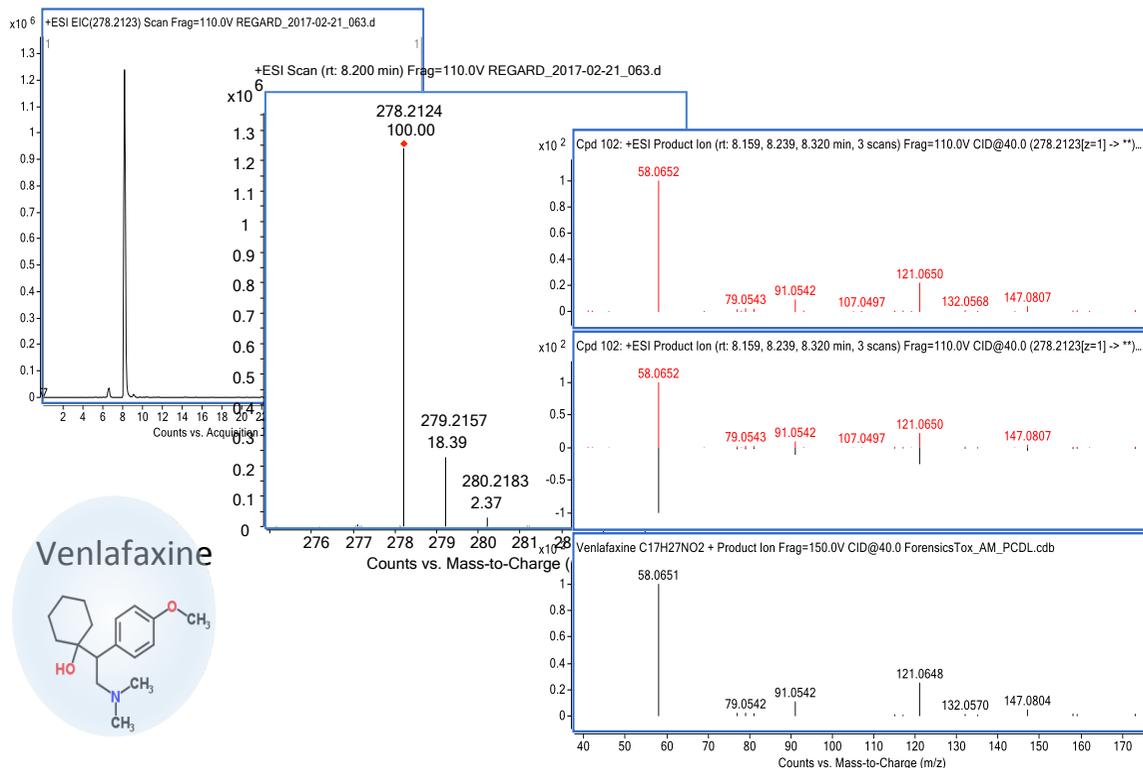


Niveau d'identification

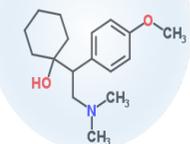


(Schymanski et al, 2014)

- ✓ La recherche d'inconnue est complexe
 - ✓ La confiance à accorder aux données est relative et abstraite
- Proposition d'une échelle d'identification pour hiérarchiser les résultats
 - Nécessiter de disposer *in fine* d'étalons analytiques



Venlafaxine



1 : Venlafaxine

2 :



3 : Critères de sélection 2123

4 : Profil : C₁₇H₂₇NO₂

5 : 277.2042 Da

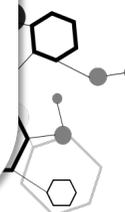
Le plus référencé :
1418 ref contre 23 pour
le 2nd

2 < Log Kow < 3

13933

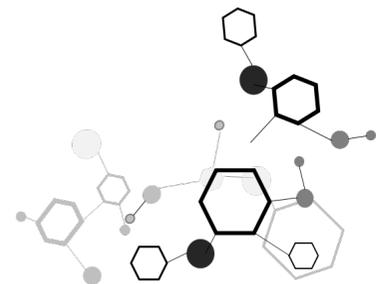
13935

Nb de composés
(Chempider)



Différents axes de recherche

- Développement de stratégies analytiques
- **Caractérisation des sources**
- Etude des phénomènes de transformation
- Développement de l'analyse dirigée par les effets (EDA)

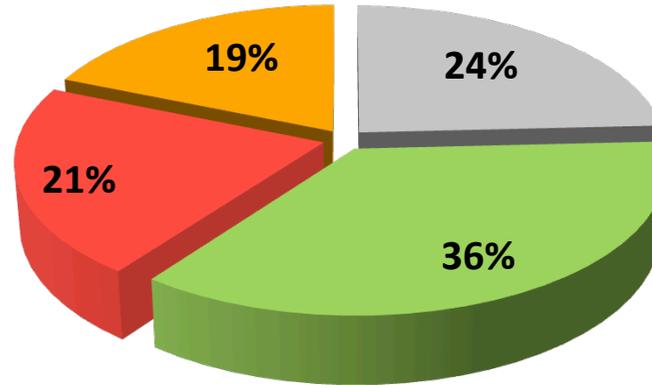


Sources : station de traitement des eaux usées (STEU)

AMPERE et ARMISTIQU

30% < Efficacité < 70%
Médicaments (roxytromycine...),
Plastifiants (Bisphénol A), Autres...

Efficacité < 30%
Pesticides (glyphosate...),
Médicaments (carbamazépine...),
Autres...



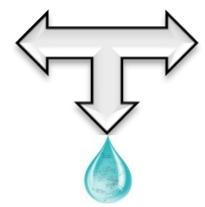
Efficacité non évaluée
PBDE, Pesticides (DDT...)
Autres...

Efficacité > 70%
PAHs, AKP (NP...), Médicaments
(paracétamol...), Hormones
(β E2...), Autres...

Choubert et al., 2012

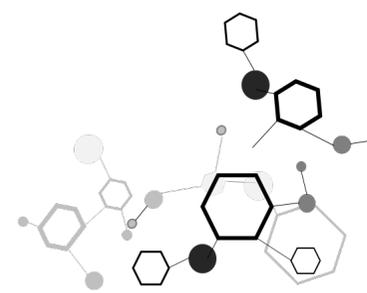
Partiellement efficace

Production de produits de transformation

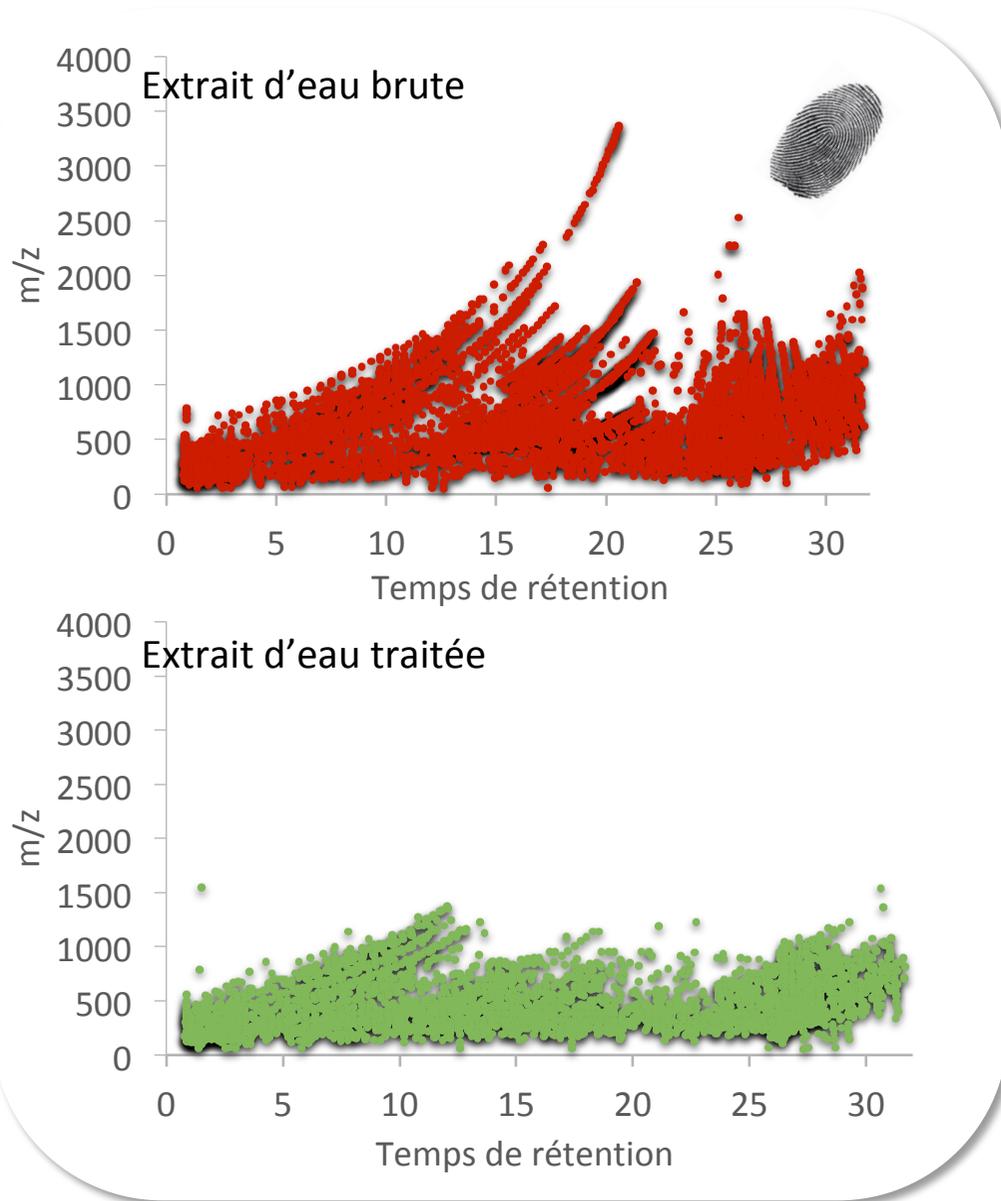


Composés introduits dans l'environnement

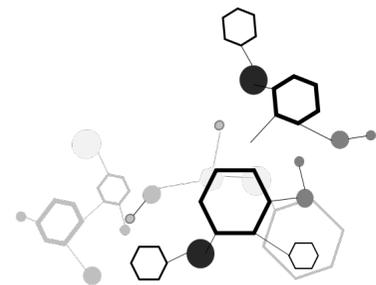
➤ **Impacts environnementaux?**



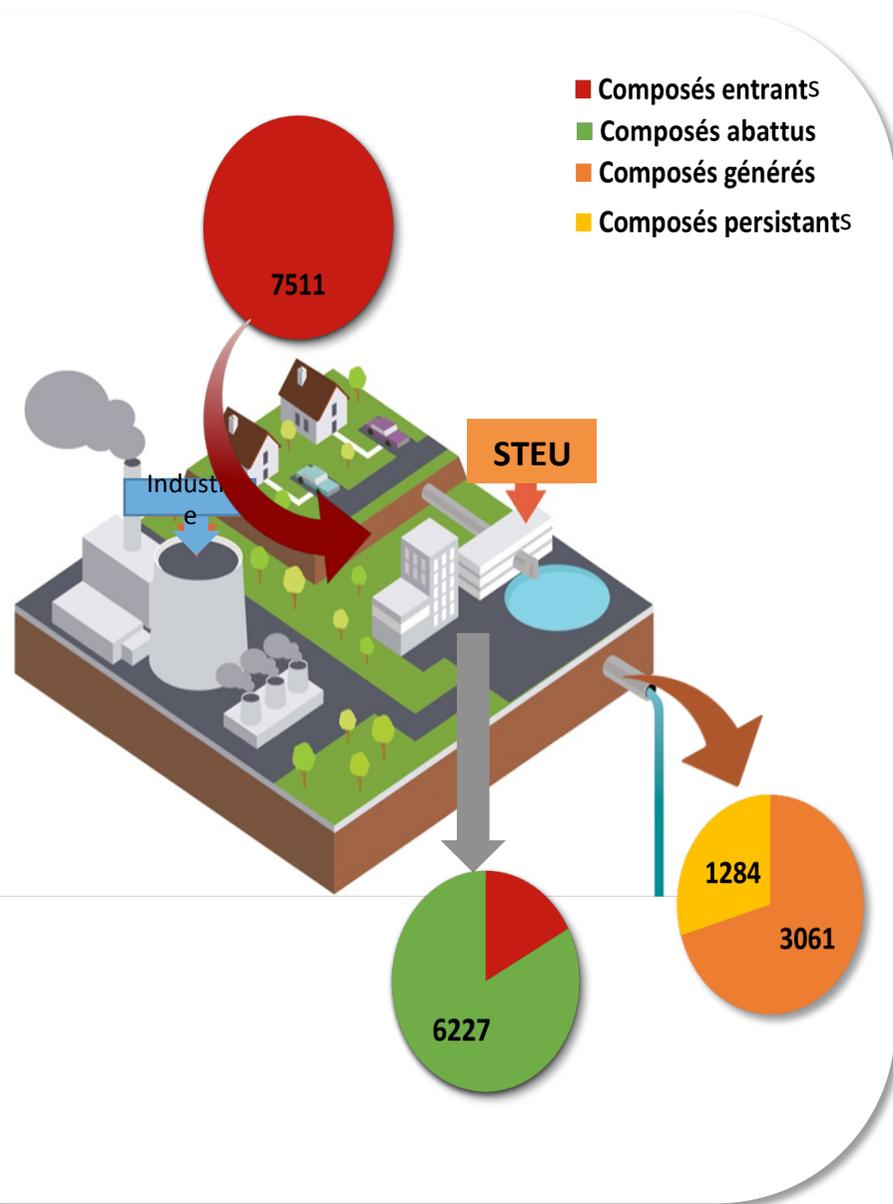
L'analyse globale - station de traitement des eaux usées



- Empreinte chimique de chaque échantillon
- Plusieurs milliers de composés
 - ✓ Impossible de tous les identifier (à l'heure actuelle)
 - ✓ Possibilité d'analyser dans sa globalité l'information



L'analyse globale - station de traitement des eaux usées

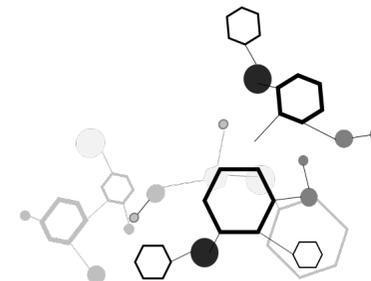


- Empreinte chimique de chaque échantillon
- Plusieurs milliers de composés
 - ✓ Impossible de tous les identifier (à l'heure actuelle)
 - ✓ Possibilité d'analyser dans sa globalité l'information

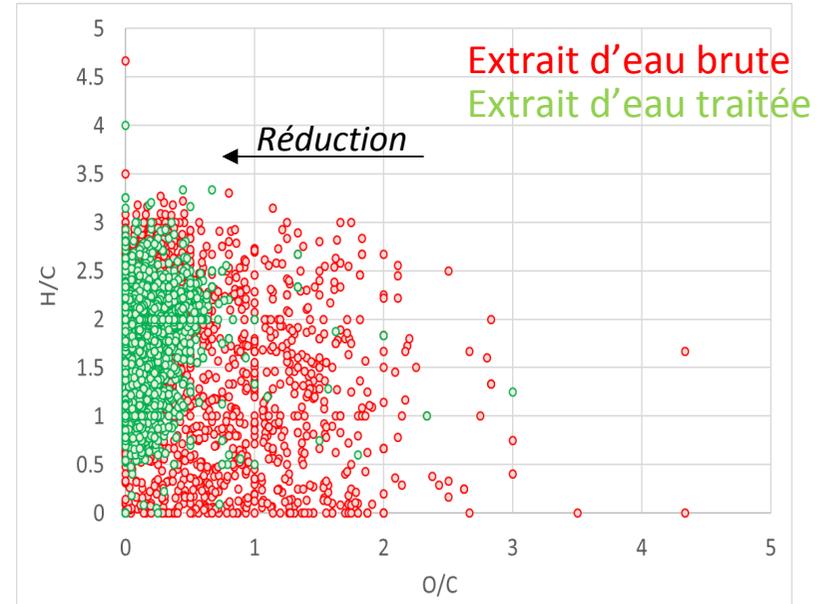
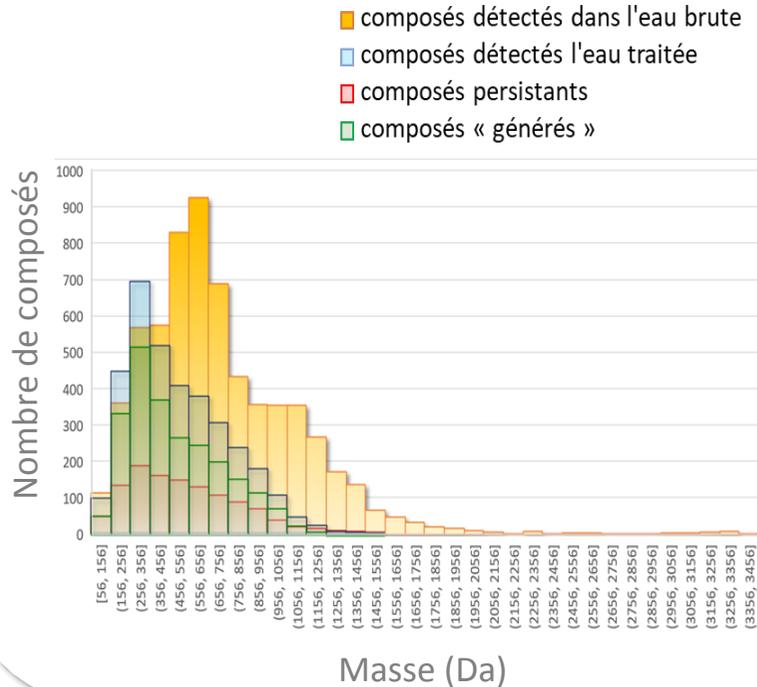
Efficacité des STEU:

Composés persistants	17%
Composés abattus	83%
Composés générés	70% des composés sortants

Produits de transformation ?

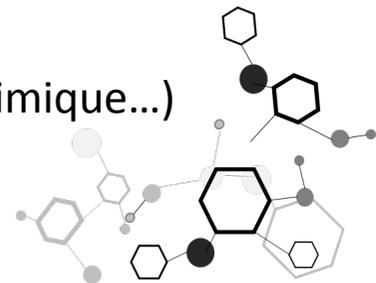


De l'analyse globale vers l'identification



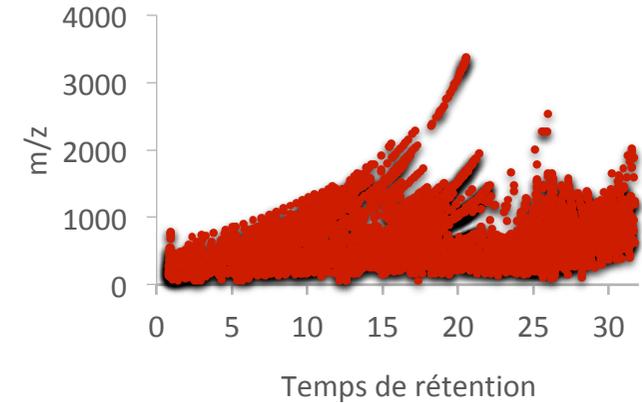
- Les composés abattus sont ceux ayant des masses > 450Da : potentiellement antibiotiques, surfactants
- Composés de masses plus petites dans l'eau traitée (perte de groupement chimique...)

➤ Mise en évidence de produits de transformation



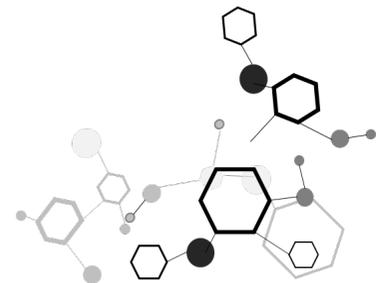
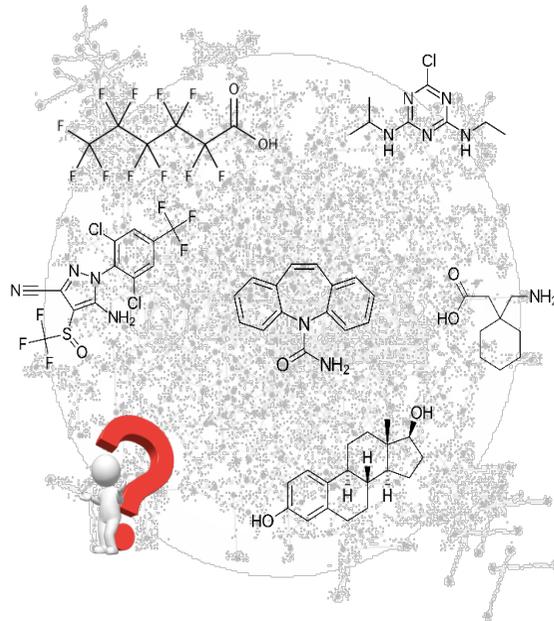
Déconvoluer l'information

- L'identification individuelle de chaque composé est très chronophage
 - Voir impossible pour des échantillons très complexes
- Besoin d'établir des stratégies d'identification



Recherche des composés connus

Analyse en suspect



L'identification – La recherche de suspects

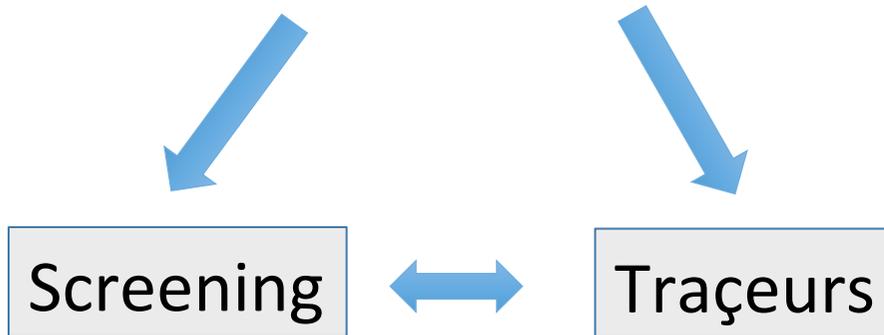
- En une analyse recherche de plusieurs centaines de molécules
 - Gain de temps d'analyse
 - Diminution des solvants

- Listes de « suspects » pouvant être axées sur des thématiques

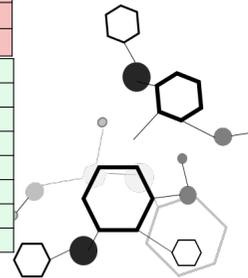
Exemple: *Liste REACH*

Liste usages

Liste activités biologiques (ex : PE...)

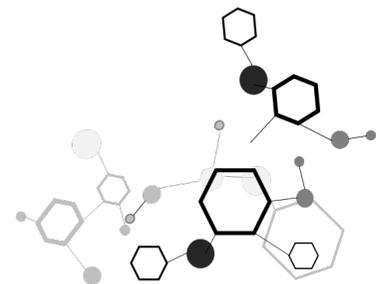


abacavir	2-hydroxy-atrazine	testostérone	6:2 FTSA
acébutolol	acétochlore ESA	17alpha-hydroxyprogesterone	8:2 FTSA
acide 4-chlorobenzoïque	AMPA	17 α ethynyestradiol	EtFOSAA
acide clofibrique	atrazine	18 α ethynyestradiol	FOSA
acide fénofibrique	azoxystrobine	6alpha-Me prednisolone	FOSAA
acide salicylique	bifenthrine	androstenedione A	MeFOSAA
amitriptyline	carbendazime	canrénone / spironolactone	PFBA
aspirine	chlortévinphos	cortisone	PFBS
aténolol	chlorotoluron	dexaméthasone	PFDA
atorvastatine	chlorpyrifos-ethyl	DHA	PFHpA
béazafibrate	cyfluthrine	DHEA	PFHpS
bisoprolol	cyperméthrine	DHEA	PFHxA
caféine	DCEMU	dihydrotestosterone DHT	PFHxS
carbamazépine	DEA	hydrocortisone	PFNA
cétirizine	DIA	hydroxydihydroprogesterone DHP	PFOS
clopidogrel	diazinon	hydroxyprogrenolone OHPn	PFPeA
diclofénac	dichlorvos	Norethindrone	
disopyramide	difenoconazole A B	Levonorgestrel	
fluoxetine	diflufénican	norgestimate	
gabapentine	dimetachlore	OH-progesterone-cap	
gemfibrozil	diuron	prednisone	
hydroxy-ibuprofène	DMSA	pregnenolone Pn	
ibuprofène	DMSI	progesterone Pg	
kétoprofène	endosulfan	4-nonylphénol (mélange isomères)	
lamivudine	epoxiconazole	4-ter octylphénol	
levetiracetam	esfenvalérate + fenvalérate	NP1EC	
lorazépam	famoxadone	NP1OE	
losartan	fenbuconazole	NP2OE	
méprobamate	fipronil	OP1OE	
métoprolol	fipronil desulfanyl	OP2OE	
naproxène	fipronil sulfide	4MBC	
névirapine	fipronil sulfone	avobenzone	
nordiazepam	flazasulfuron	EHMC	
oxazépam	fluquinconazole	octocrylene	
paracétamol	flutriol	ODPABA	
pravastatine	glyphosate	oxybenzone	
primidone	hexazinone	benzyl paraben	
propranolol	hexazinone	butyl paraben	
ranitidine	hydroxy-simazine	ethyl paraben	
ritonavir	imidaclopride	isobutyl paraben	
sotalol	isoproturon	isopropyl paraben	
théophylline	lambda-cyhalothrine	methyl paraben	
zidovudine	linuron	pentyl paraben	
di(2-éthylhexyl)phthalate	mancozèbe	propyl paraben	
BPA	métolachlore		
chlorhexidine	métolachlore ESA		
triclosan	métolachlore OXA		
	ométhoate		
	perméthrine		
	propiconazole		
	simazine		
	spiroxamine		
	tau-fluvalinate		
	tebuconazole		
	terbutylazine		
	terbutryne		
	terbutylazine desethyl		
	tetraconazole		
	trifloxystrobine		
	trifluraline		



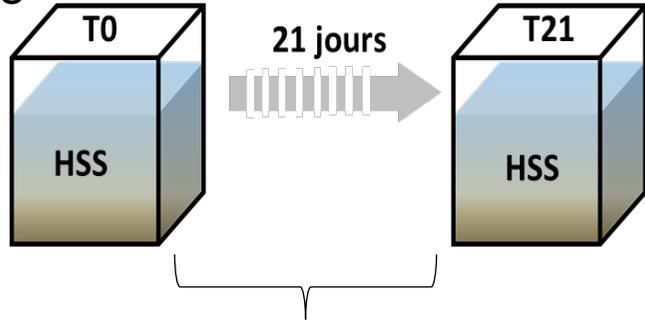
Différents axes de recherche

- Développement de stratégies analytiques
- Caractérisation des sources
- Etude des phénomènes de transformation
- Développement de l'analyse dirigée par les effets (EDA)



Dégradation en milieu contrôlé

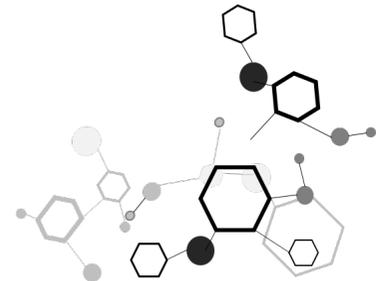
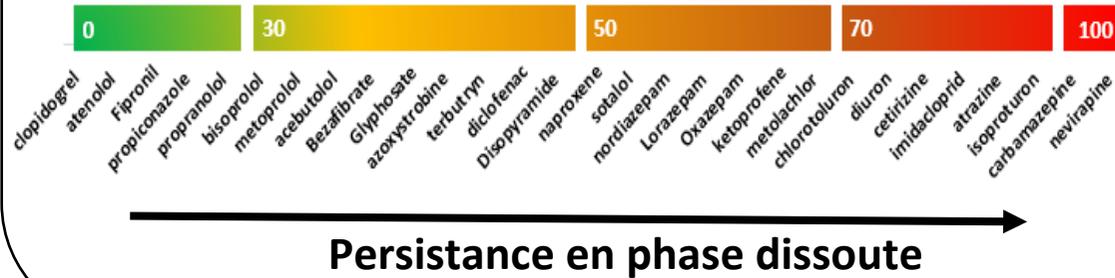
Eaux de l'estuaire de Seine (bouchon vaseux) + Effluent de STEU



Analyses ciblées

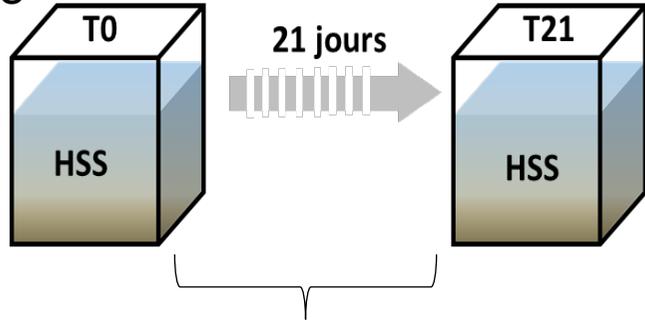


Moyenne de tous les aquariums
Echelle relative de stabilité en Seine



Dégradation en milieu contrôlé

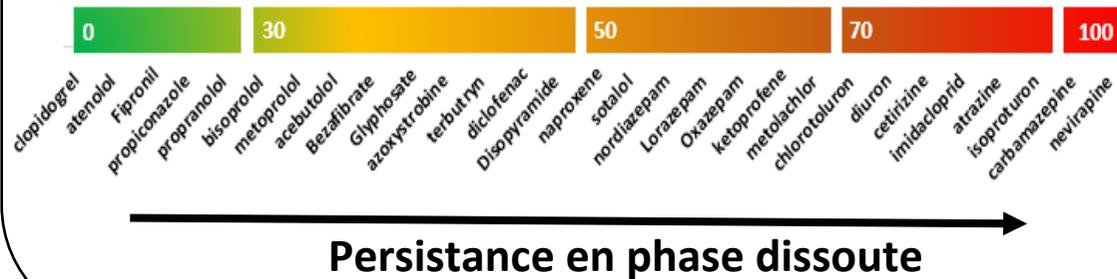
Eaux de l'estuaire de Seine (bouchon vaseux) + Effluent de STEU



Analyses ciblées



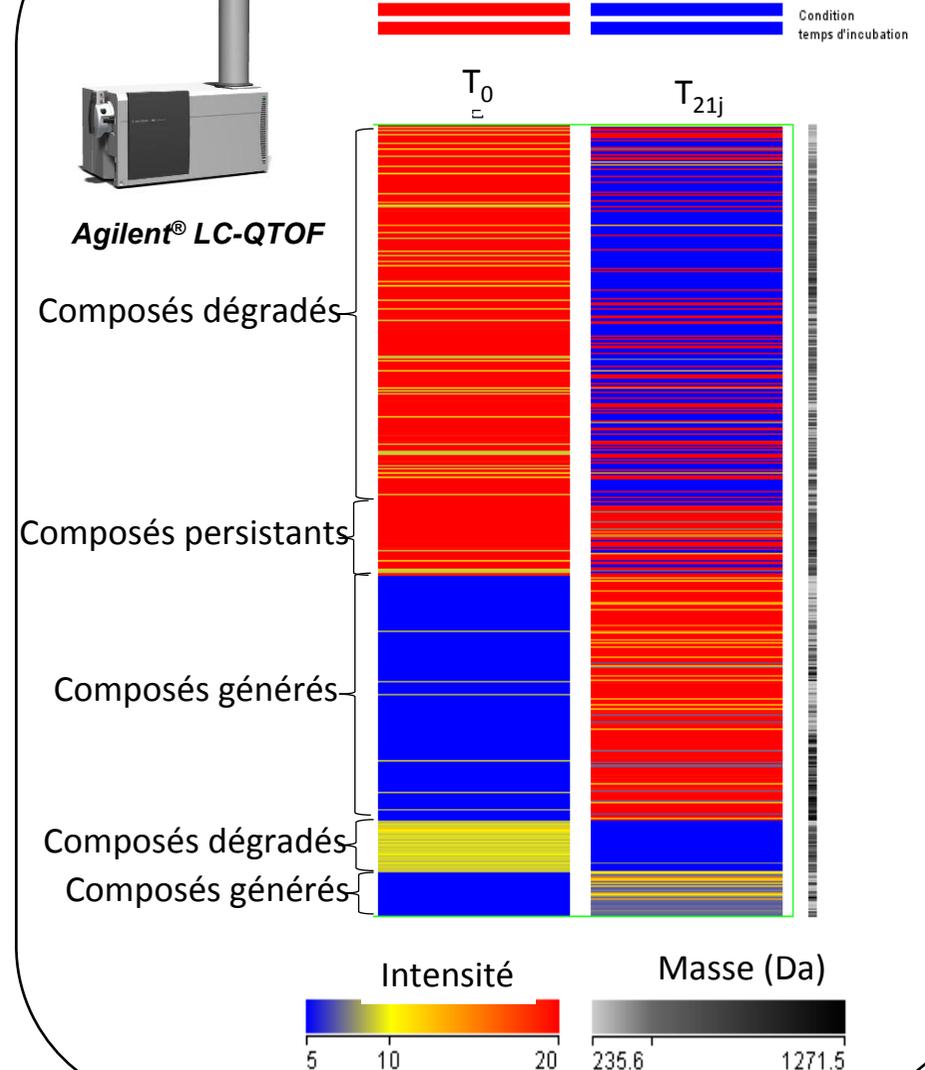
Moyenne de tous les aquariums
Echelle relative de stabilité en Seine



Analyses non ciblées



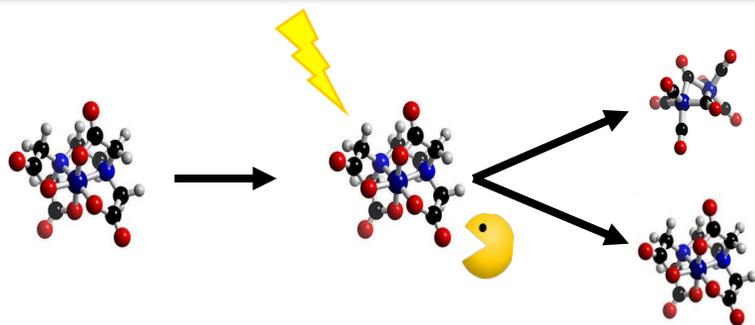
Agilent® LC-QTOF



L'identification – cas des produits de transformation

- Etablissement d'une liste de suspects basée sur les produits de transformation connus et référencés ou sur des transformations supposées théoriques (oxydation, hydrolyse, ...)

Recherche de PT par expérimentation et par simulation

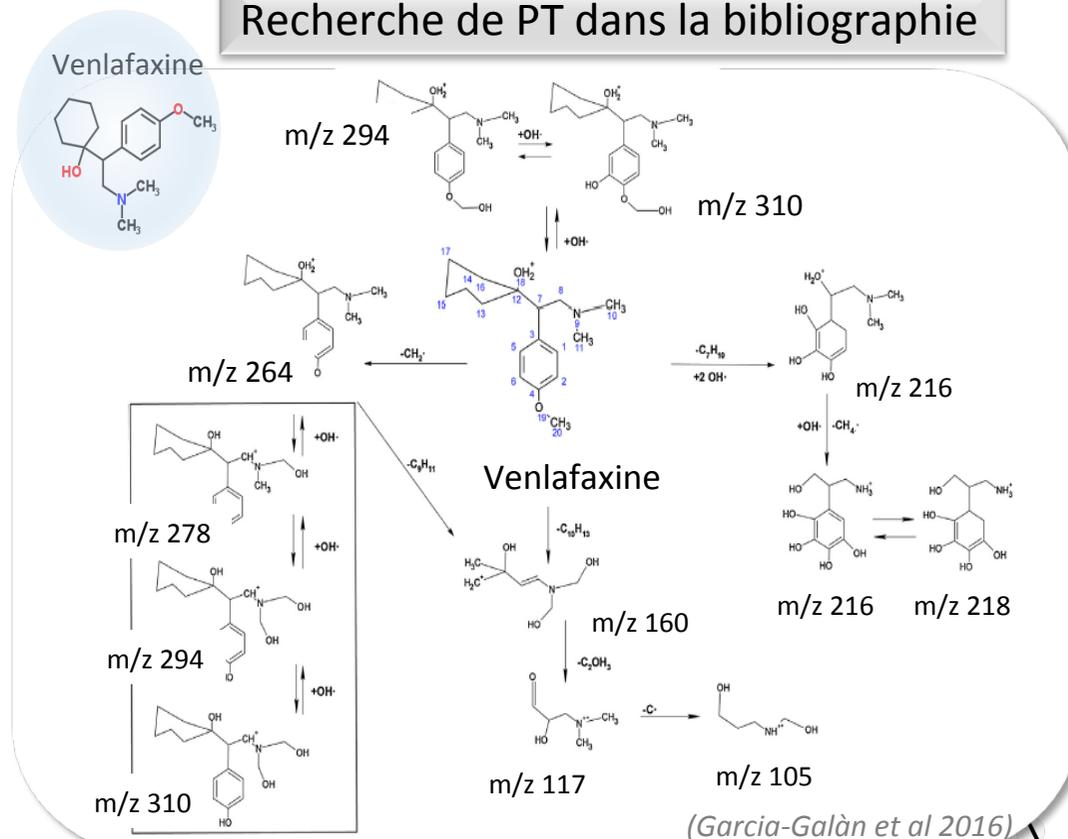


- Création de produits de transformation
- Identification de produits de transformation

Et/ou

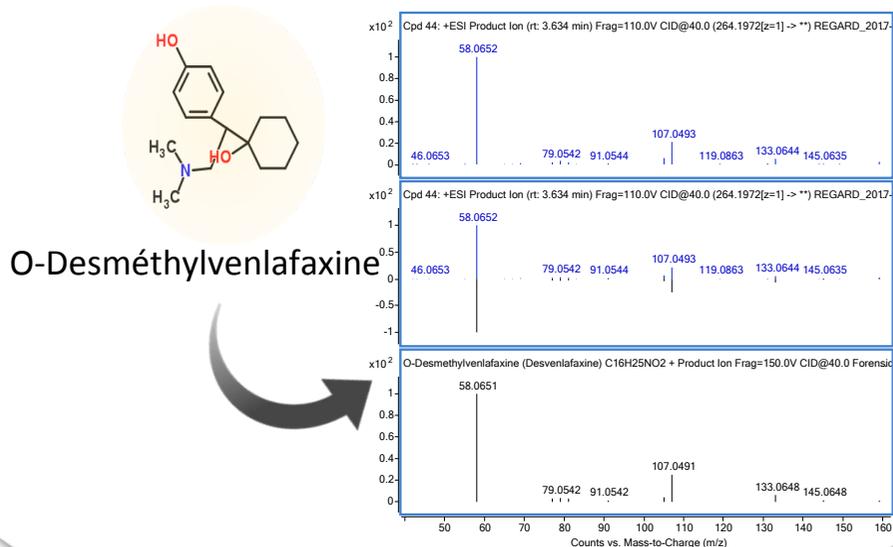
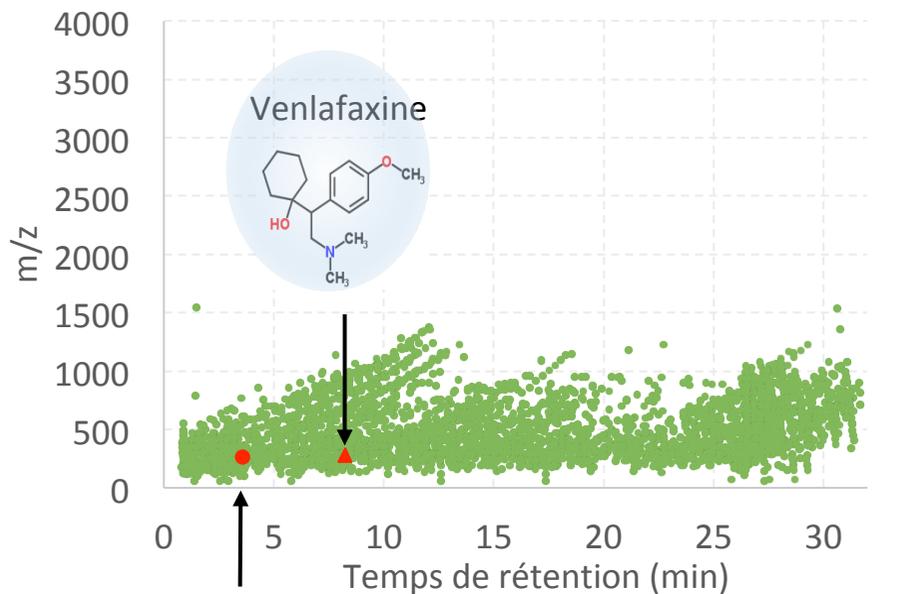
- Etablir des listes de suspects artificiels basés sur les processus de transformation

Recherche de PT dans la bibliographie

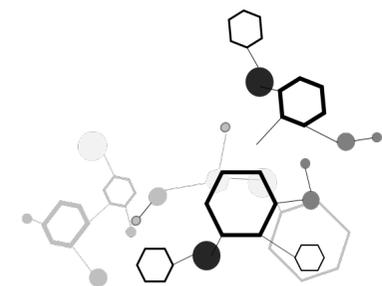


L'identification – cas des produits de transformation

Produits de transformation suspectés

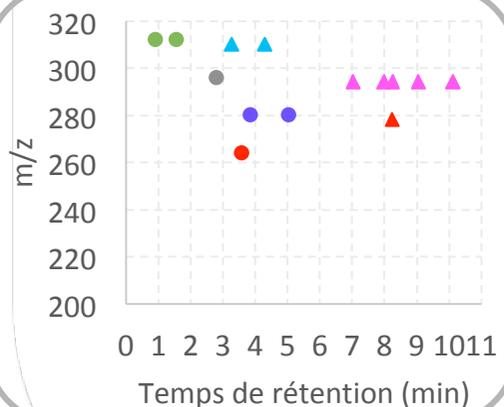
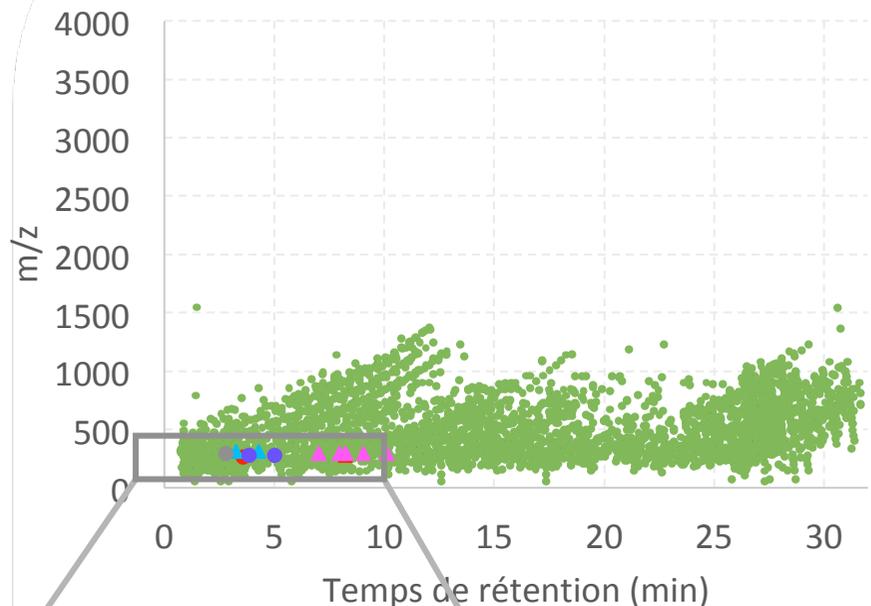


- Identification de la venlafaxine et de son produit de transformation le o-desméthylvenlafaxine dans un effluent de STEU



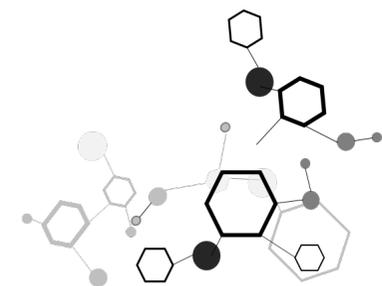
L'identification – cas des produits de transformation

Produits de transformation suspectés



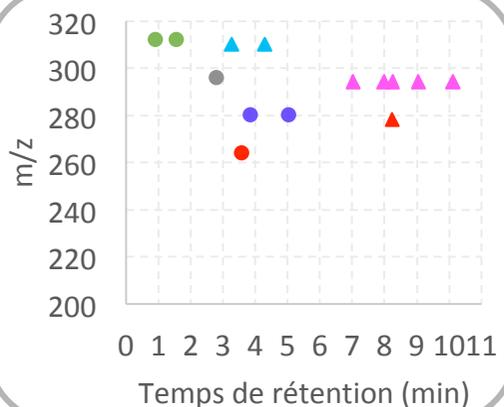
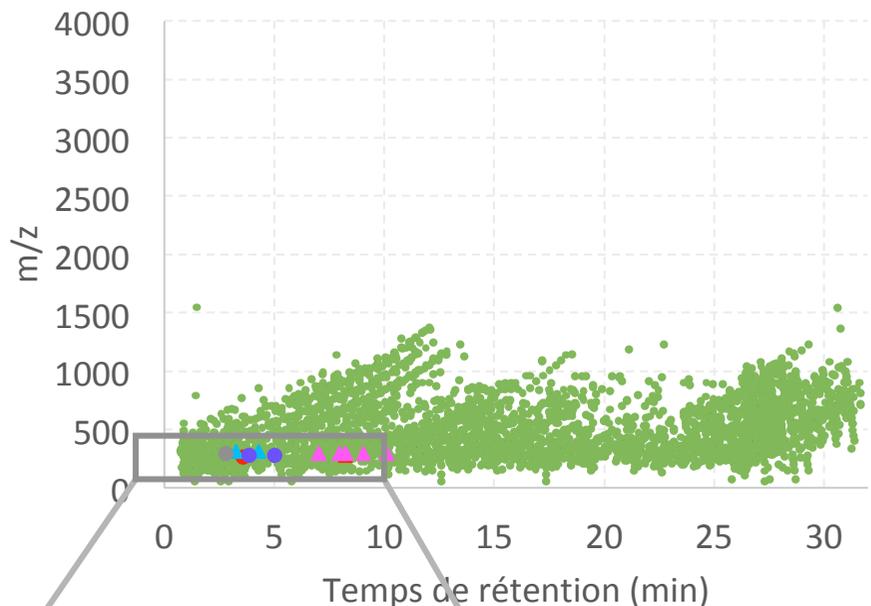
	Produits	[M+H] ⁺
Venlafaxine	DVFX	264.1958
	PT294	294.2053
	PT310	310.2008
	PT216	216.086
	PT218	218.1012
DVFX	PT280	280.1903
	PT296	296.1852
	PT312	312.1799

- Identification de la venlafaxine et de son produit de transformation le o-desméthylvenlafaxine dans un effluent de STEU
- Détection de différentes masses pouvant correspondre à d'autres produits de transformation



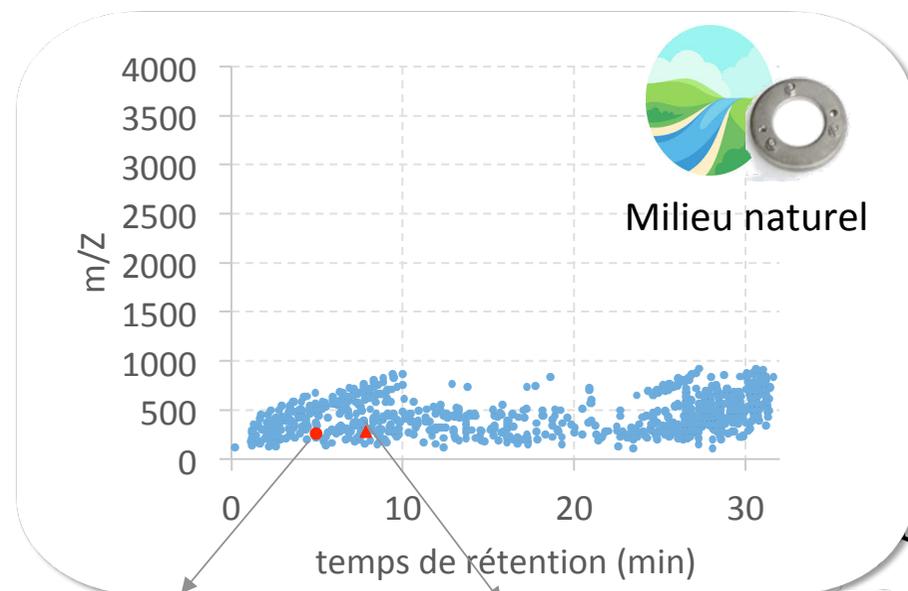
L'identification – cas des produits de transformation

Produits de transformation suspectés



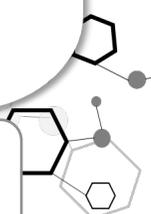
	Produits	[M+H] ⁺
Venlafaxine	DVFX	264.1958
	PT294	294.2053
	PT310	310.2008
	PT216	216.086
	PT218	218.1012
DVFX	PT280	280.1903
	PT296	296.1852
	PT312	312.1799

- Identification de la venlafaxine et de son produit de transformation le o-desméthylvenlafaxine dans un effluent de STEU
- Détection de différentes masses pouvant correspondre à d'autres produits de transformation
- Détection des deux composés dans le milieu naturel



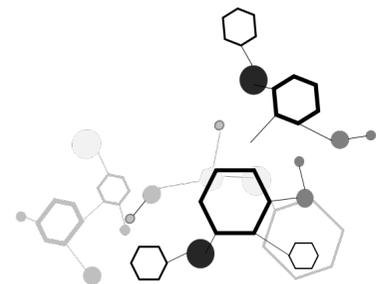
m/z 264
(O-desméthylvenlafaxine)

m/z 278 (venlafaxine)

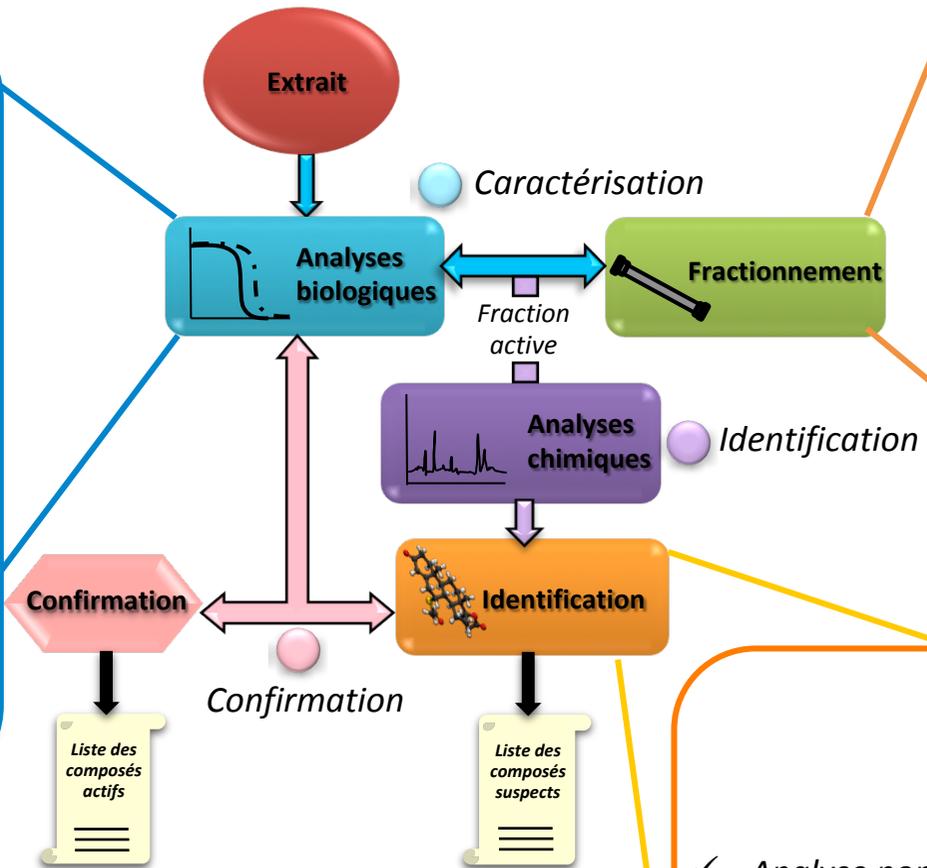
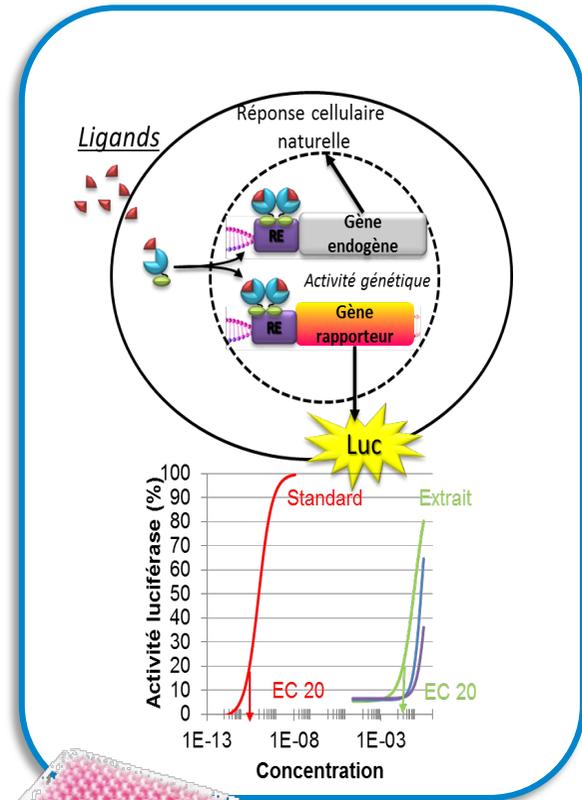


Différents axes de recherche

- Développement de stratégies analytiques
- Caractérisation des sources
- Etude des phénomènes de transformation
- Développement de l'analyse dirigée par les effets (EDA)



Approche EDA



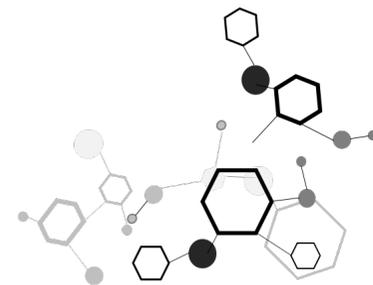
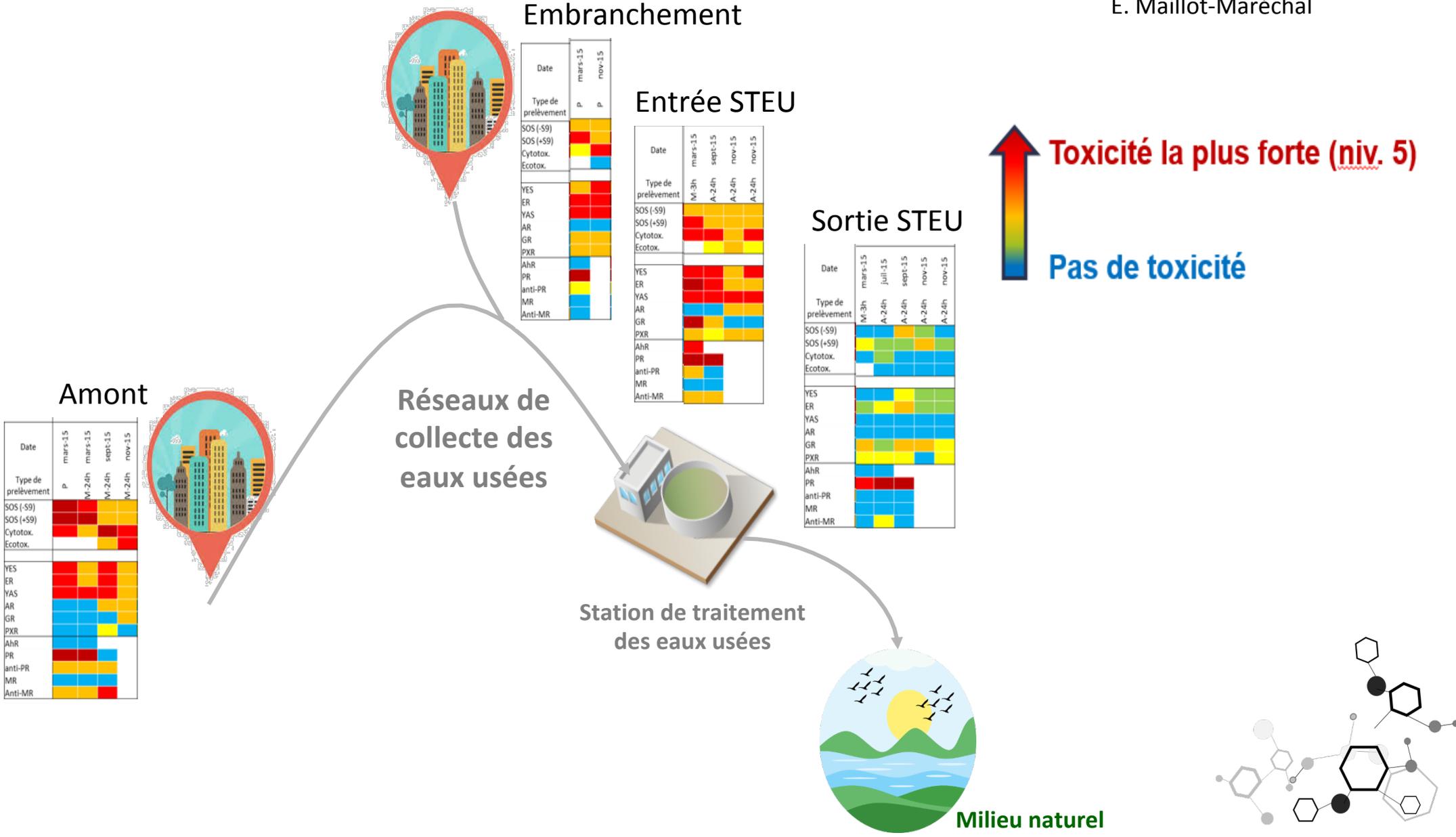
RP-HPLC (C18)

96	95	94	93	92	91	90	89	88	87	86	85
73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
72	71	70	69	68	67	66	65	64	63	62	61
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
48	47	46	45	44	43	42	41	40	39	38	37
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

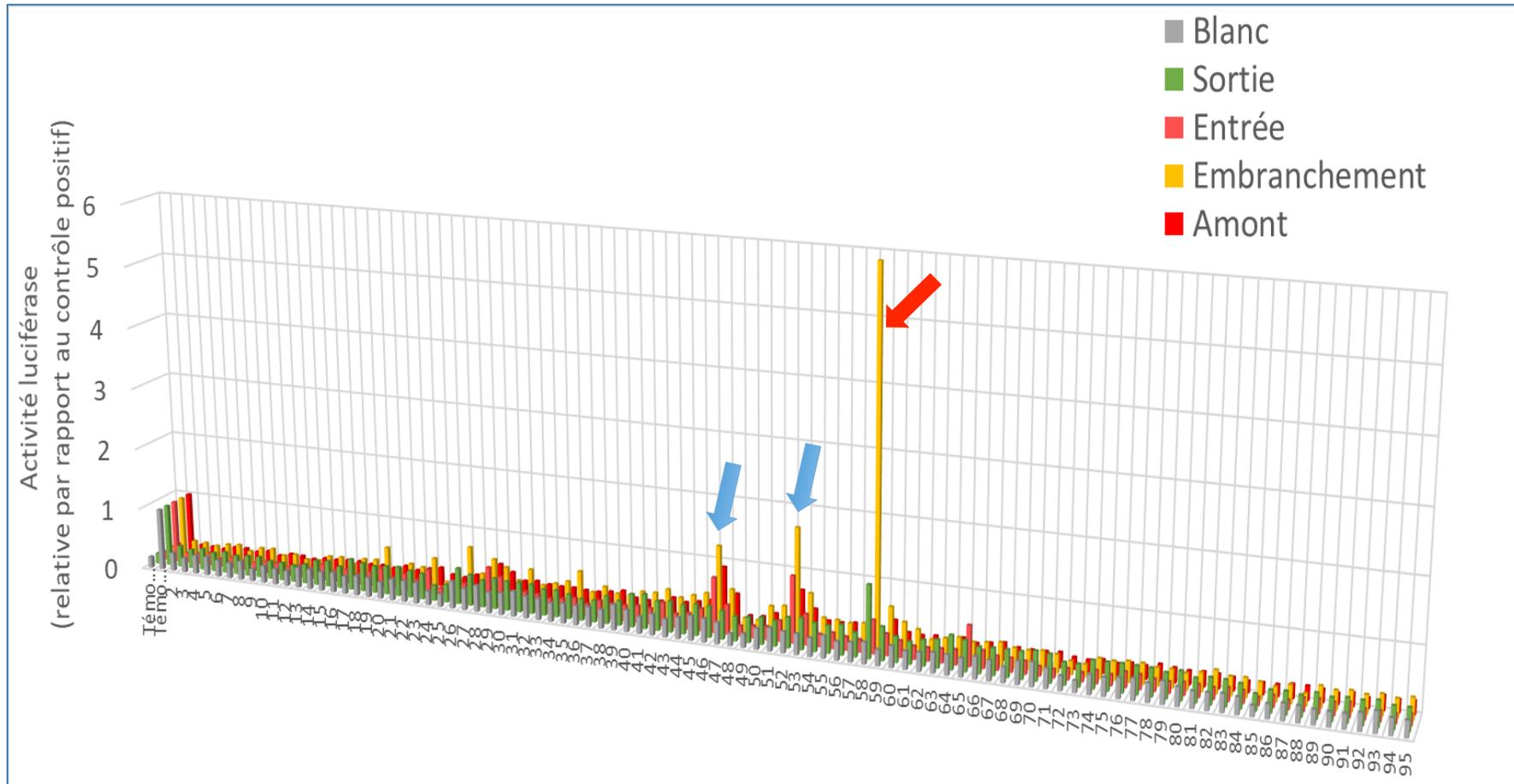
✓ **Analyse non ciblée LC-QTOF**



Etude éco-toxicologique en zone urbaine

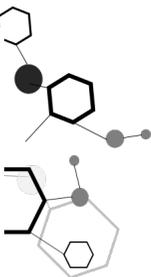


Profil biologique après fractionnement

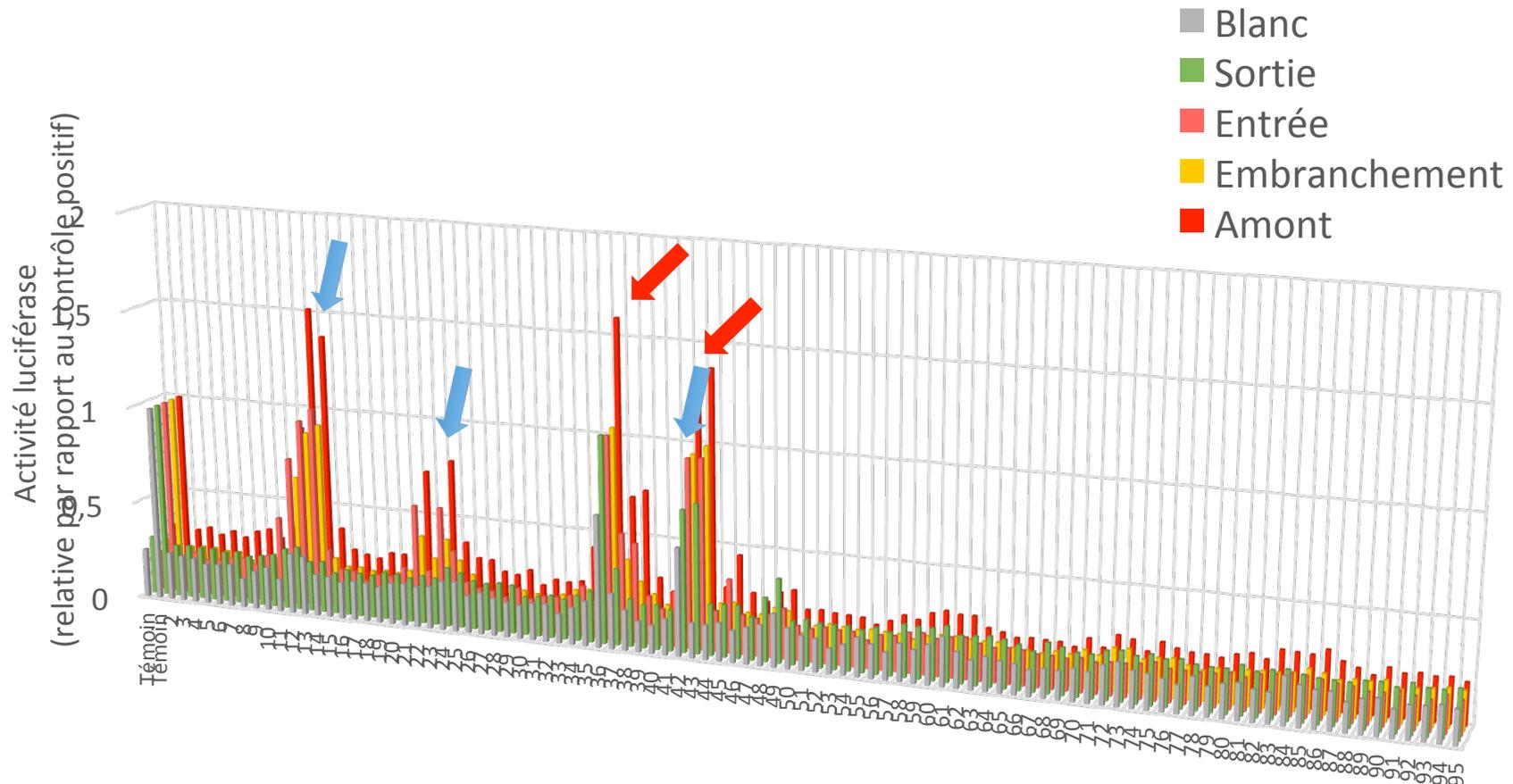


Activité AR/GR

- Fractions 46, 52 et 58 actives
- Continuum Amont -> Entrée de STEU
- F58 : l'activité persiste malgré le traitement de la station
 - Hypothèse : Les molécules responsables des activités sont potentiellement les mêmes entre les échantillons



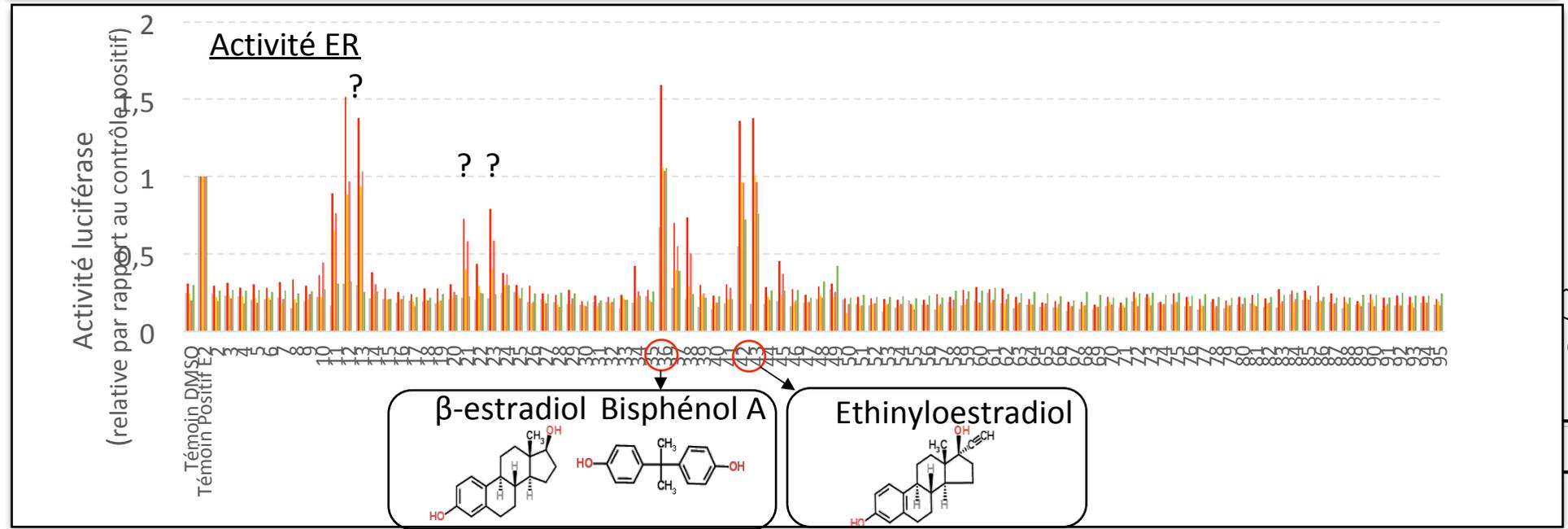
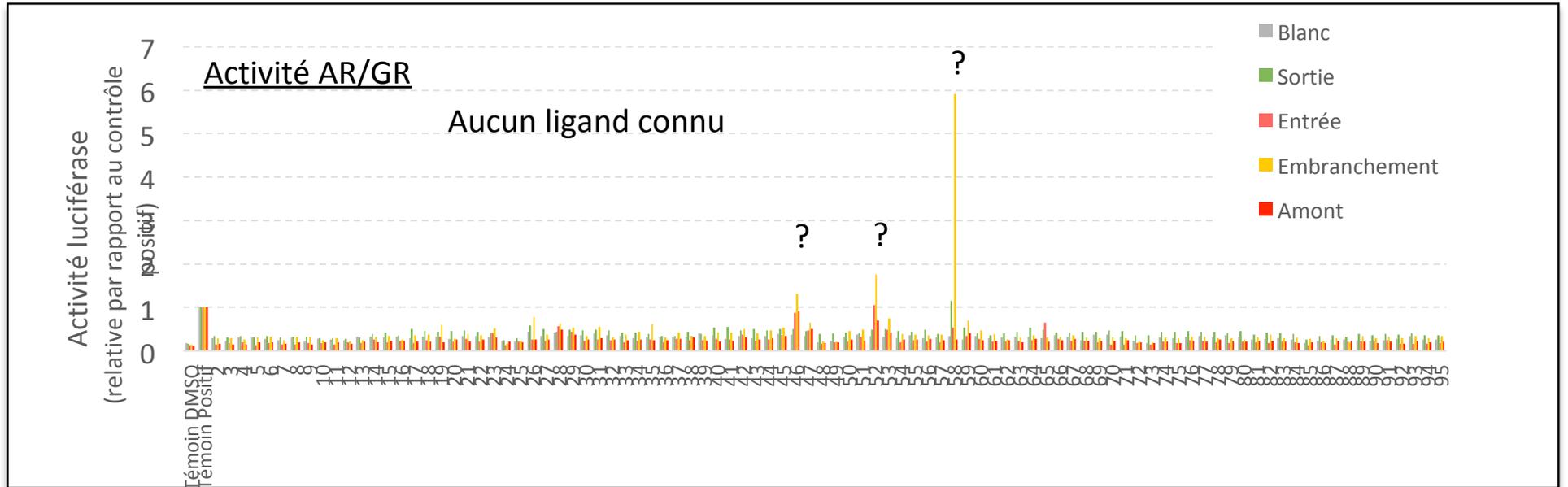
Profil biologique après fractionnement



Activité ER

- Fractions 12-13, 21, 23, 36, 42, 43 actives
- Continuum Amont -> Entrée de STEU
- F36, F43 : l'activité persiste malgré le traitement de la station
 - Hypothèse : Les molécules responsables des activités sont potentiellement les mêmes entre les échantillons

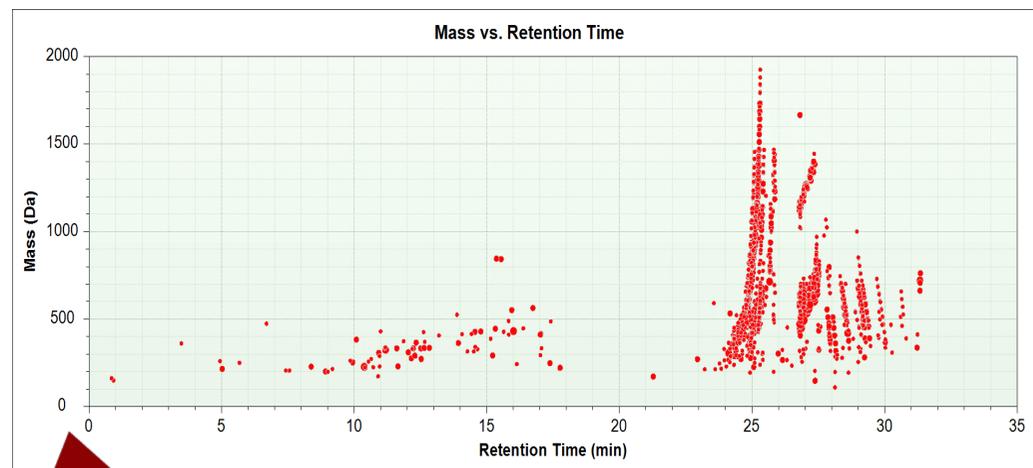
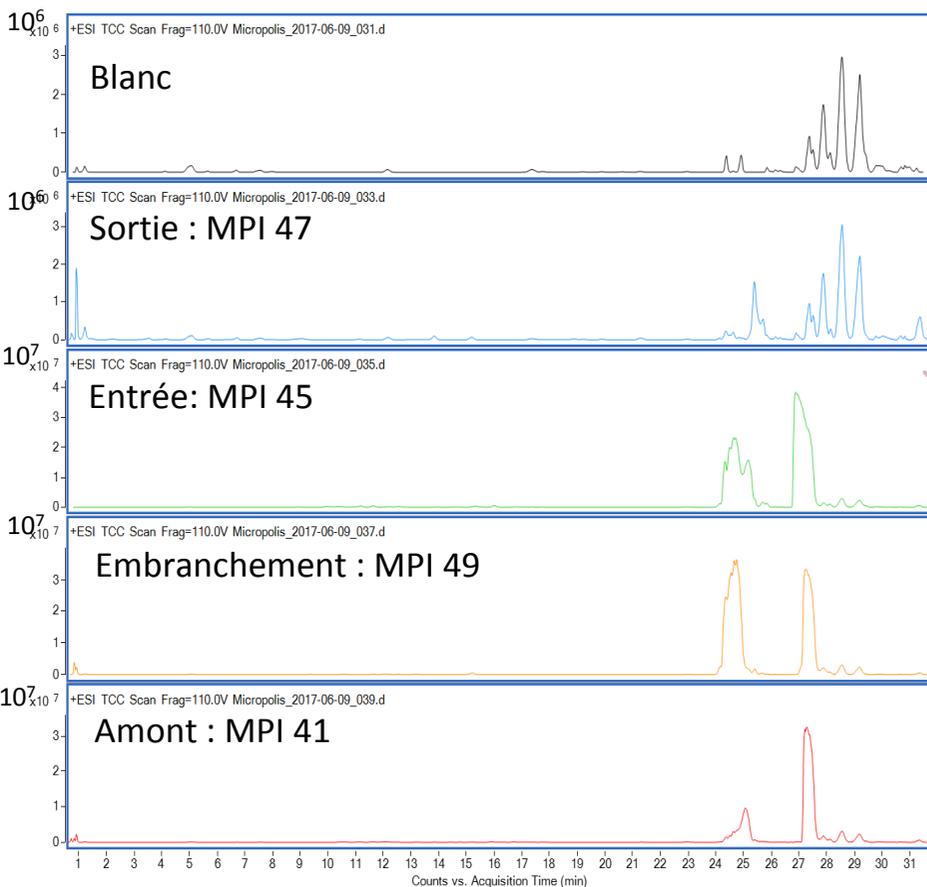
Ligands connus potentiellement collectés - calibration HPLC



Stratégie d'identification

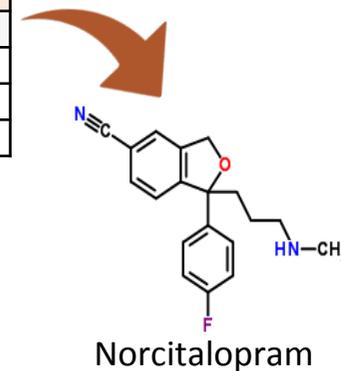
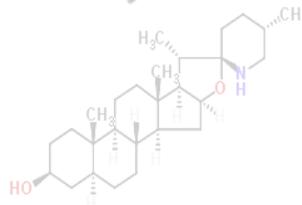
➤ Exemple F52 : activité AR/GR (MPI41, MPI49 et MPI45)

- 1 - Acquisition puis extraction des ions
- 2 - Empreintes moléculaires d'une fraction
- 3 - Comparaison des empreintes
- 4 - Liste de molécules communes
- 5 - Recherche de la structure

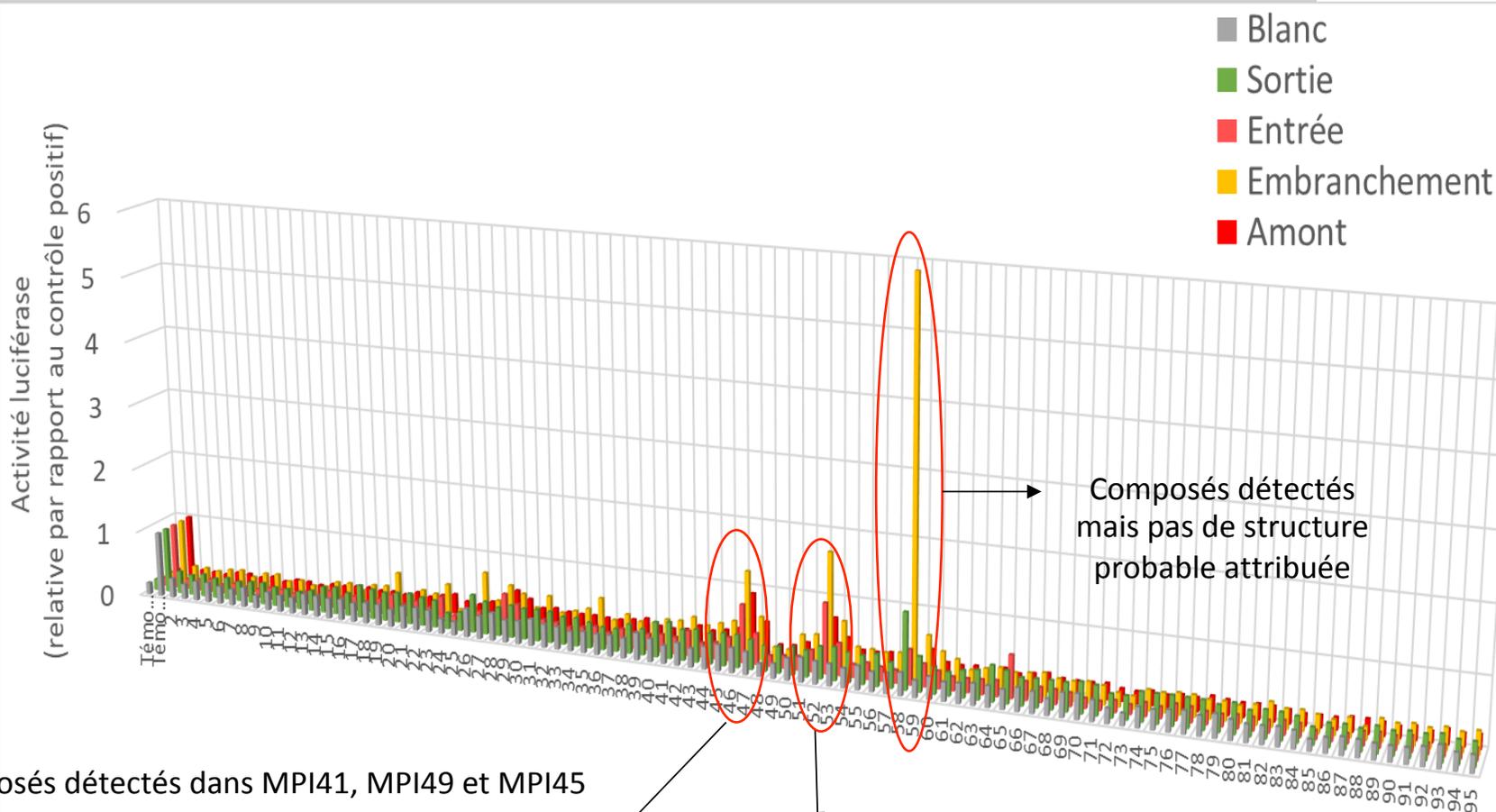


Comparaison des empreintes

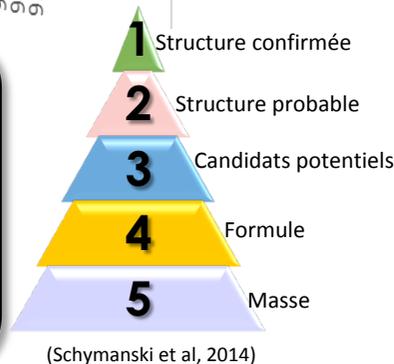
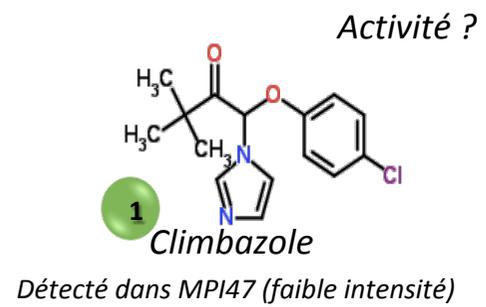
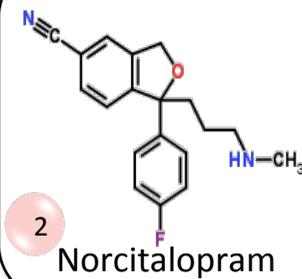
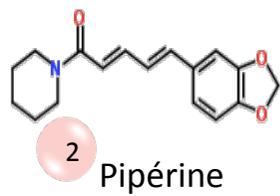
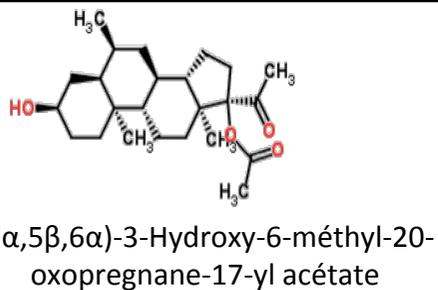
m/z	rt	Aire		
		MPI45	MPI49	MPI41
226.1595	10.718	368940	288954	223908
311.156	12.045	501336	1734851	1595802
416.3532	14.425	544291	151751	219528
448.3427	16.381	266844	422500	271015
564.401	16.741	359880	80303	350687
533.2936	24.178	404659	122538	83228



Molécules suspectées et identifiées – Activité AR/GR



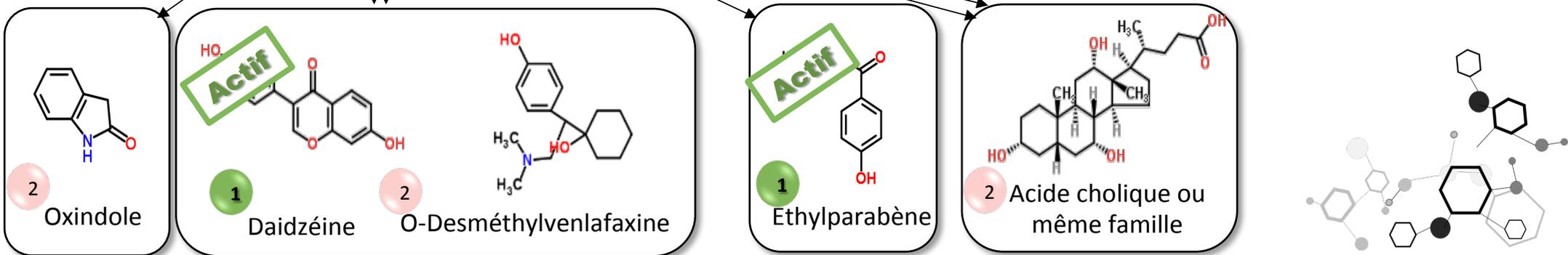
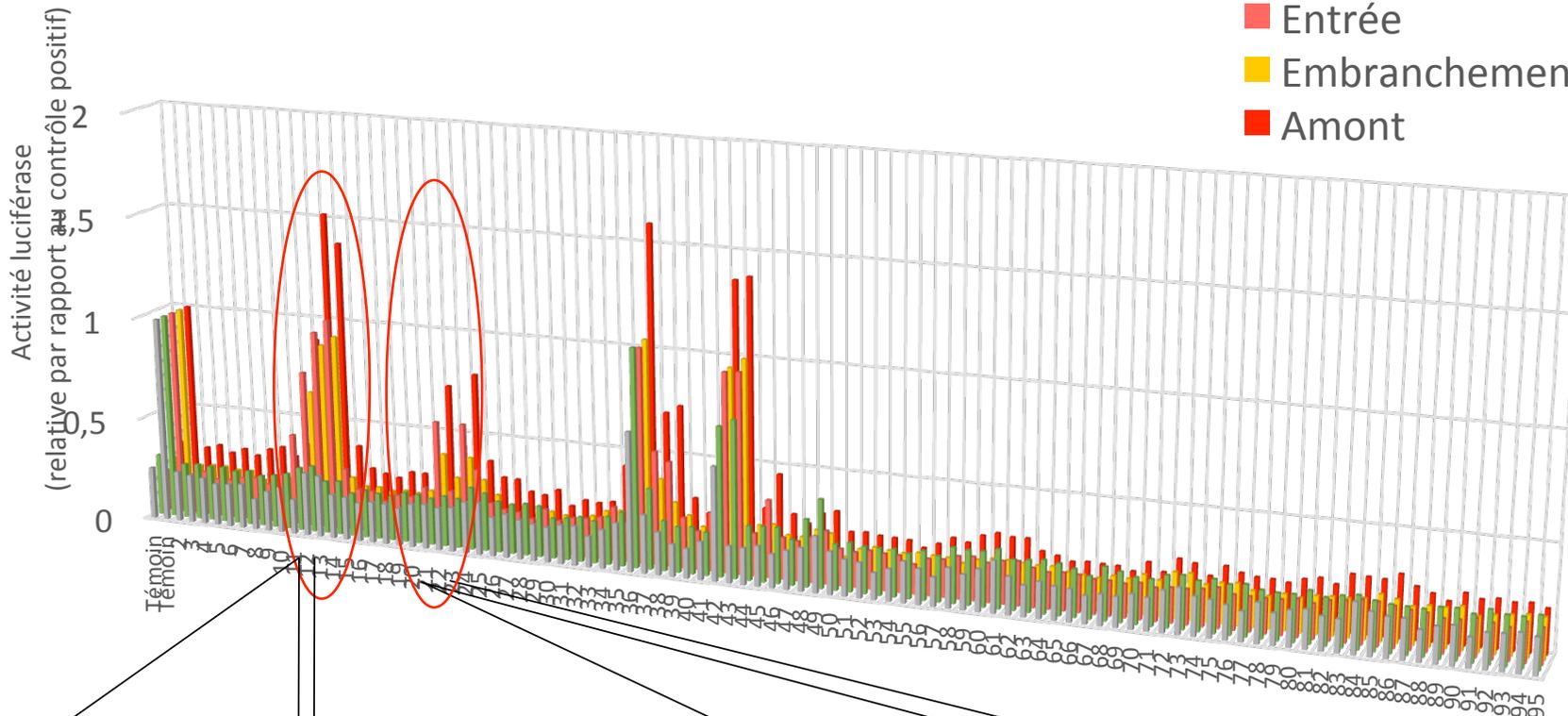
➤ Composés détectés dans MPI41, MPI49 et MPI45



Molécules suspectées et identifiées – Activité ER

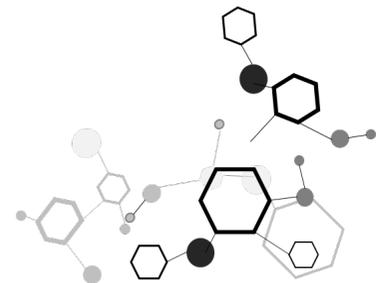
➤ Composés détectés dans MPI41, MPI49 et MPI45

- Blanc
- Sortie
- Entrée
- Embranchement
- Amont



Bilan de l'étude

- Les profils biologiques de fractionnement obtenus montrent un continuum amont – sortie de STEU :
 - Les molécules biologiquement actives sont communes
- Des analyses non ciblées ont été effectuées sur les fractions :
 - F46, F52, F58 -> activité AR/GR
 - F12-13, F21, F23 -> activité ER
- La stratégie d'identification est basée sur les composés communs entre les différents échantillons
- Différentes familles de composés sont identifiées dans les différentes fractions :
métabolite de médicaments, psychotropes, phytoestrogènes, parabène...
 - Parmi les composés identifiés, des ligands ER sont détectés -> daidzéine, éthylparabène



CONCLUSION ET BESOINS

- Mise en évidence d'un grand nombre de composés (de + en +)
- Caractérisation de mélanges de plus en plus complexes
- Capacité d'adresser les faibles concentrations

Mais

- Impossible de tout caractériser – Effet mélange
- Produits de transformation
- Lien présence/effet? (« Effect Directed Analysis »)
- Variabilité
- Long terme - Fenêtre d'exposition

- **Améliorer le traitement et le stockage des données HRMS**
(bases de données, logiciels, statistiques, ...)





A water droplet is captured in mid-air, just above a surface of water. The droplet is clear and has a crown-like shape at its base. Below it, concentric ripples spread out across the water's surface. The background is a gradient of blue, from a lighter blue on the left to a darker blue on the right. A large, light blue thought bubble with a black outline is positioned on the right side of the image. Inside the bubble, the text 'Merci de votre attention' is written in a red, serif font. Two smaller, empty thought bubbles are connected to the main one by thin lines.

**Merci de votre
attention**