



**HAL**  
open science

# Stratégies de détection et d'identification des produits de transformation de phytosanitaires dans les eaux par UHPLC-HRMS

Loïc Richard

► **To cite this version:**

Loïc Richard. Stratégies de détection et d'identification des produits de transformation de phytosanitaires dans les eaux par UHPLC-HRMS. Chimie. 2021. hal-04355140

**HAL Id: hal-04355140**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04355140>**

Submitted on 20 Dec 2023

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

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

Richard Loic

Master Analyse et contrôle, chimie analytique

Date : 1<sup>er</sup> mars 2021 au 31 aout 2021, Soutenance le 31 aout 2021

*Société : INRAE Centre Lyon-Grenoble Auvergne Rhône Alpes, UR RiverLy*

*Equipe : laboratoire de chimie des milieux aquatiques (LAMA), micropolluants organiques*

*Co-encadrants : Christelle Margoum et Kevin Rocco*

# Stratégies de détection et d'identification des produits de transformation de phytosanitaires dans les eaux par UHPLC- HRMS

## Résumé

L'objectif du stage est d'obtenir une solution « vieillie » de produits de transformation de pesticides de différentes familles : tébuconazole, terbuthylazine et le fenoxycarb dans le but d'étudier leur éco-toxicité. Pour cela, l'enjeu majeur du sujet est le développement d'une méthode d'identification de ce type de composés par analyse suspectée par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse haute résolution quadripôle temps de vol. Le développement de cette méthode analytique a permis la détection et identification de plusieurs produits de transformation pour chaque pesticide avec un indice de confiance élevé. Enfin, un suivi analytique de stabilité de ces produits a été mis en œuvre afin de s'assurer de pouvoir utiliser les solutions créées dans le cadre de l'étude éco-toxicologique.

## Table des matières

Remerciements .....	3
Liste des annexes.....	4
Acronymes.....	5
Introduction.....	6
I) Bibliographie .....	8
1) L'analyse en environnement : Etat de l'art .....	8
2) Méthodologie mise en œuvre pour l'analyse suspectée .....	11
3) Les produits phytosanitaires et leur dégradation .....	12
a) <i>Tébuconazole</i> .....	13
b) <i>Fenoxycarb</i> .....	13
c) <i>Terbuthylazine</i> .....	14
II) Matériels et méthodes.....	15
1) Appareillage pour l'analyse .....	15
2) Retraitement de données .....	16
3) Mise en place du suivi de l'appareil .....	17
4) Matériels et protocoles de dégradation de pesticides .....	18
III) Résultats et discussions.....	21
1) Identification de produits de transformation par analyse suspectée.....	21
2) Stabilité des produits de transformation .....	30
IV) Conclusion .....	34
Références.....	36
Annexes .....	38

## Remerciements

Je tiens à remercier Christelle Margoum pour m'avoir permis de réaliser ce stage très intéressant et enrichissant. Sa gentillesse et son sens de l'organisation m'ont permis d'avancer durant le stage.

Je tiens également à remercier Kevin Rocco, co-encadrant et doctorant au laboratoire, pour sa gentillesse et sa volonté de me transmettre tout au long du stage. Ses conseils et remarques très constructives et toujours bienveillantes m'ont été essentiels et je garderai d'excellents souvenirs de notre travail en collaboration.

Mes remerciements se dirigent aussi vers Céline Guillemain, Amandine Daval, Pierre Boutet et Loïc Richard pour leur aide et les conseils précieux qu'ils m'ont apporté au cours du stage.

Je remercie également l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur accueil et leur bonne humeur quotidienne.

Enfin, je tiens à remercier Chloé Bonnineau, Jean-Marc Chovelon et Christophe Rosy pour le prêt de matériel de dégradation et tous les conseils d'utilisation.

## Liste des annexes

Annexe 1 : Récapitulatif des différentes étapes du projet Tapioca

Annexe 2 : Tableau des caractéristiques physico-chimiques des substances phytosanitaires

Annexe 3 : Description des moyens de dégradation

Annexe 4 : Appareil UHPLC Acquity H-Class / HRMS XEVO G2-S QToF

Annexe 5 : Tableau des composés du QCmix

Annexe 6 : Exemple de carte de contrôle pour l'Atenolol (Avril 2021)

Annexe 7 : Photographies de la sonde à ultrasons (*Branson Sonifier Sound*, à gauche) et de l'enceinte à UV (*Suntest 765*, à droite) utilisées dans le cadre du stage

Annexe 8 : Courbe d'étalonnage du tébuconazole

Annexe 9 : Caractéristiques des colonnes pour la chromatographie bidimensionnelle

Annexe 10 : Structure des TPs de la TBT présents au laboratoire

Annexe 11 : Structure des TPs de la TBT

## Acronymes

ACP : Analyse en composantes principales

BSM : Binary Solvant Manager

CM : Column Manager

FNX : Fenoxycarb

FTN : Flow Through Needle

HRMS : High resolution mass spectrometry

INRA : Institut national de recherche agronomique

INRAE : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

IRSTEA : Institut national de recherche en sciences technologiques pour l'environnement et l'agriculture

NTS: Non-Target Screening

QCmix : Quality Control Mixture

QSM : Quaternary Solvant Manager

QToF: Quadrupole Time of Flight

TAPIOCA : Transformation phytopharmaceutiques conséquences aquatiques

TBT : Terbutylazine

TBZ : Tebuconazole

TPs : Produits de transformation

UHPLC: Ultra High pressure liquid chromatography

## Introduction

Depuis la révolution industrielle du début du XIX<sup>ème</sup> siècle, de nombreuses découvertes ont permis de développer massivement de nouvelles sources d'énergies et des nouveaux produits améliorant considérablement le niveau de vie de l'être humain. Dans le domaine agricole, la découverte des pesticides (ou produits phytosanitaires) a permis de cultiver plus rapidement et intensément les terres et donc de créer une agriculture intensive. Bien que l'usage de tels produits présente des avantages conséquents d'un point de vue économique et de productivité, notamment pour les industriels, leur utilisation massive pose problème.

Leur usage entraîne de nombreuses contaminations des eaux et les connaissances scientifiques actuelles des pesticides ne sont pas suffisantes pour répondre aux enjeux écologiques que ceux-ci induisent. En particulier, ces produits se décomposent dans l'environnement via des processus biotiques et abiotiques. Les produits de dégradation ainsi obtenus, appelés plus généralement produits de transformation (TPs), sont pour le moment relativement peu étudiés ni connus et peuvent pourtant être autant voire plus néfastes pour l'environnement que les pesticides eux-mêmes. <sup>1</sup>

La disponibilité accrue de la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) dans l'analyse chimique a considérablement amélioré la détection et l'identification des composés dans les échantillons environnementaux ou agroalimentaires par exemple. Cela a ouvert de nouvelles opportunités de recherche en sciences de l'environnement. <sup>2</sup>

INRAE, organisme né de la fusion entre l'INRA et l'IRSTEA début 2020 s'intéresse à l'ensemble des problématiques environnementales et agroalimentaires. Le laboratoire de chimie des milieux aquatiques et plus particulièrement l'équipe *micropol* au sein de laquelle mon stage s'est déroulé, mène des projets de recherche pour l'identification des produits phytosanitaires et de leur produit de transformation retrouvés dans les eaux.

Le stage dans son intégralité est au cœur d'un projet national sur 3 ans nommé TAPIOCA. Celui-ci fait suite à un appel à projets de recherche « Produits phytopharmaceutiques » du plan Ecophyto II+ financé par l'agence française de la biodiversité. Il vise à améliorer la prise en compte des produits de dégradation des phytosanitaires en développant des stratégies d'identification et de détection dans les milieux aquatiques et en étudiant leur écotoxicité. Le projet fait ainsi appel à de nombreux experts et partenaires avec divers domaines de compétences.

TAPIOCA est décomposé en 4 grandes tâches. (Annexe 1)

Le stage s'inscrit dans les 2 premières tâches du projet et a pour objectif d'aboutir à l'obtention d'une solution de produits de transformation stable à partir de 3 produits phytosanitaires de famille différentes : un fongicide, le tébuconazole, un herbicide, le terbuthylazine et un insecticide, le fenoxycarb. La dégradation de ces 3 pesticides est réalisée uniquement via des processus abiotiques, c'est-à-dire des processus reposant sur l'influence des facteurs physico-chimiques.

Tout l'enjeu du stage repose sur l'identification des produits de transformation résultant des dégradations des pesticides. En effet, ces composés sont actuellement inconnus ou très peu connus. Dans ce contexte, de nombreux verrous existent, et une méthode d'analyse ciblée classique n'est pas envisageable car les standards analytiques ne sont pas disponibles. Au cours de ce stage, c'est une méthode reposant sur l'identification des TP par analyse suspectée par UHPLC-HRMS qui sera utilisée.

Finalement, les solutions de TP obtenues seront utilisées dans la suite du projet pour l'étude comparative des effets de la présence de pesticides et de leurs produits de transformation à la fois sur des organismes vivants aquatiques micro et macroscopiques.



## I) Bibliographie

Bien qu'étudiés depuis environ une dizaine d'années dans le domaine de la chimie analytique environnementale, les produits de transformation issus des produits phytosanitaires demeurent relativement peu connus. Il en est de même pour l'analyse suspectée de ce type de composés par UHPLC couplée à un spectromètre de masse haute résolution QTOF.

L'étude bibliographique a eu dans un premier temps pour objectif de développer mes connaissances sur l'utilisation actuelle des techniques analytiques dans le domaine environnemental. De plus, des recherches bibliographiques ont été menées pour l'utilisation de l'analyse suspectée dans le cadre de la recherche de produits de transformation.

Enfin, une investigation poussée sur les 3 pesticides de l'étude a été réalisée. Pour chacun d'entre eux, celle-ci a permis de déterminer leurs propriétés physico chimiques ainsi que de trouver par quel moyen abiotique il est possible de les dégrader dans le but d'obtenir les solutions vieilles de produits de transformation.

### 1) L'analyse en environnement : Etat de l'art

La quantité de produits chimiques dans l'environnement étant en constante augmentation ces dernières années, il est essentiel d'améliorer leur détection. On estime que 90% des eaux sont contaminés par des pesticides. <sup>3</sup> De plus, les niveaux de contaminations sont faibles, le plus souvent à l'échelle de traces et la quantification de micropolluants organiques est devenue indispensable.

On trouve actuellement dans l'environnement de nombreux composés chimiques à la fois connus et inconnus. Ces derniers représentent le challenge principal concernant leur analyse et détection puisque dans la plupart des cas, les standards analytiques ne sont pas disponibles et leur propriétés physico-chimiques sont peu voire pas connues. Cela rend ainsi une analyse ciblée « classique » impossible. <sup>4</sup>

Le développement des analyses par approche suspectée et non ciblée (NTS) est ainsi indispensable dans ce contexte. Les clés de ces approches sont la disponibilité accrue et l'essor de la haute résolution en spectrométrie de masse couplé à la chromatographie liquide haute performance. <sup>5</sup> En effet, deux développements technologiques sont d'une importance critique dans le domaine de l'analyse des échantillons environnementaux. <sup>6</sup> Premièrement, le développement de techniques d'ionisation *soft* telles que l'électrospray (ESI) ou l'ionisation

chimique à pression atmosphérique (APCI) ont permis un couplage plus facile entre spectrométrie de masse et chromatographie liquide.<sup>7</sup>

De plus, l'arrivée de la spectrométrie de masse haute résolution a permis d'avoir une résolution de pics avec des différences de masse très faibles (inférieure à 5 ppm) tout en conservant une bonne sensibilité.

Ainsi, alors que l'analyse ciblée permet d'analyser dans un échantillon une petite proportion de contaminants choisis en amont de l'analyse, le NTS permet d'obtenir une information sur l'ensemble des molécules présentes dans un échantillon. Ce type d'approche permet l'acquisition de données plus exhaustives, sans sélection préalable des composés. En effet, le traitement et l'acquisition des données sont fait sans a priori. Le dénombrement de composés présents dans un échantillon se fait alors via l'apparition de « features ». Cette appellation traduit un couple entre le rapport masse sur charge et le temps de rétention d'un signal, pouvant correspondre à un composé. A partir des features, des analyses statistiques telles que l'ACP sont souvent menées afin d'obtenir l'empreinte globale d'un échantillon. Ce type d'approche est souvent utilisée dans le cadre de screening large de divers polluants dans des échantillons environnementaux, tels que les pesticides, produits pharmaceutiques ou produits industriels chimiques, et a aussi permis l'identification de produits de transformation.

8-10

Dans le cadre du stage, une approche suspectée à mi-chemin entre l'analyse ciblée et le NTS, a été utilisée pour l'analyse des pesticides par UHPLC-HRMS comme on peut le voir sur la figure 1 ci-dessous. En analyse suspectée, le traitement et l'interprétation des données sont faits avec un léger a priori : on suspecte une ou plusieurs molécules d'être présente(s) dans l'échantillon. Il est alors possible de rechercher ces molécules ainsi que leurs produits de dégradation, décrits ou non dans la littérature, grâce à des informations chromatographiques (temps de rétention) et spectrométriques (masses, fragmentation).

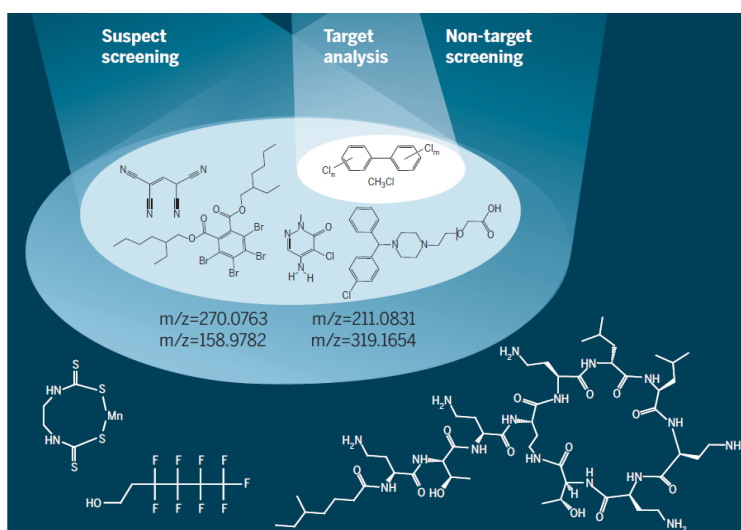


Figure 1: Différences entre analyse ciblée, analyse suspectée et analyse non ciblée.<sup>5</sup>

Dans la plupart des cas pour les échantillons environnementaux et plus spécifiquement pour les produits de transformation de pesticides, on recherche des molécules qui ne sont pas ou peu documentées ou encore qui n'étaient pas « censées » être présentes dans l'échantillon, justifiant une approche suspectée. Pour certains pesticides, il a déjà été démontré que les produits de transformation sont présents en plus grande quantité dans l'environnement que les molécules mères, d'où l'importance d'améliorer leur détection et identification.<sup>3,11</sup>

Les approches NTS et suspectée étant relativement récentes dans le domaine de l'analyse environnementale, des propositions d'harmonisations sont en cours pour fixer une norme concernant l'identification d'un composé par ce type d'analyse.<sup>12</sup>

L'échelle de Schymanski présentée Figure 2 est donc intéressante pour pouvoir, en fonction des informations recueillies sur le composé, donner un niveau de confiance sur son identification.<sup>12</sup>

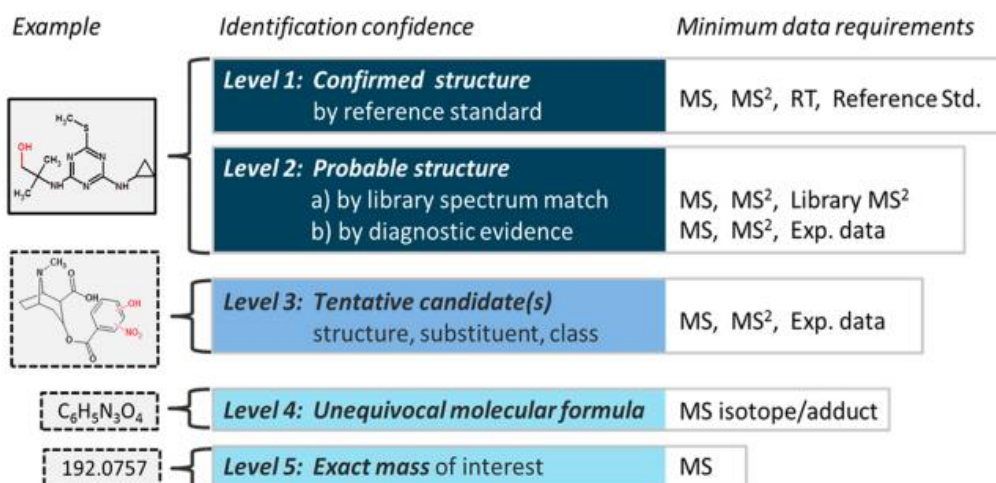


Figure 2 : Echelle proposée par Schymanski pour l'identification des composés par analyse HRMS

## 2) Méthodologie mise en œuvre pour l'analyse suspectée

La création de bases de données est l'élément clé pour l'approche suspectée par UHPLC couplée HRMS. Pour une identification de composés suspectés la plus précise possible, les bases de données sont incontournables et doivent contenir un maximum d'information sur la molécule suspectée. La masse mono-isotopique et la formule brute sont indispensables.

Les bases de données peuvent être construites par deux moyens complémentaires :

- Via une recherche des produits de transformation déjà identifiés dans la littérature et pouvant ainsi être intégrés à la base de données. Pour un pesticide donné, les composés obtenus après dégradation dépendent du processus de dégradation utilisé, il est donc préférable d'avoir une base de donnée distincte en fonction de la dégradation utilisée.
- Via une prédiction in-silico, c'est-à-dire par logiciel informatique ou site internet, des produits de transformation possibles pour un pesticide donné. Pour le tébuconazole (TBZ), les travaux approfondis sur ce sujet réalisés par Kevin Rocco, co-encadrant et doctorant, ont été utilisés pour créer des bases de données dans le but de compléter celles trouvées dans la littérature. Pour les deux autres substances du projet (fenoxycarb FNX et terbuthylazine TBT), il existe plusieurs logiciels en libre accès tels que Eawag PBDD (<http://eawag-bbd.ethz.ch/predict/>) ou le CTS (<https://qed.epa.gov/cts/gentrans/>) notamment qui permettent de simuler la dégradation d'un composé pour intégrer des TPs suspectés à la base de donnée. <sup>13</sup>

De plus, la prédiction in-silico de fragmentation pour chaque produit de transformation présent de la base de donnée est également possible via CFM-ID<sup>14</sup>(<https://cfmid.wishartlab.com/>). Cet outil prédit la fragmentation d'un ion parent à 3 énergies de collisions (10, 20 et 40 V). Afin de limiter les faux positifs ; seuls les fragments les plus abondants sont sélectionnés et incrémentés dans la base de donnée. Cela permet d'apporter une dimension supplémentaire dans la confirmation de la présence d'un composé dans l'échantillon analysé.

Enfin, les données chromatographiques peuvent être exploitées afin d'affiner encore la suspicion de composés. Lors d'un stage précédent, un outil de prédiction de temps de rétention en fonction des propriétés physico-chimiques du composé a été développé sur l'appareil UHPLC/QTOF du laboratoire.<sup>15</sup> A cet outil, trois modèles de prédiction in-silico s'ajoutent permettant d'obtenir un temps de rétention prédit à partir des propriétés physico-chimiques de la molécule.<sup>16</sup> Ceux-ci viennent confirmer la précision du modèle expérimental. Ainsi, cette autre dimension de prédiction permet d'apporter une confirmation supplémentaire de l'identification d'un composé si les temps de rétention expérimentaux et ceux prédits concordent (delta inférieur à 2 minutes).

### 3) Les produits phytosanitaires et leur dégradation

Les pesticides sont classés en trois grandes familles selon l'organisme cible : fongicide, herbicide, et insecticide. Dans le cadre du projet TAPIOCA, un produit par famille a été sélectionné afin d'obtenir l'étude la plus complète possible. Les composés choisis répondent à un cahier des charges assez complet.

En effet, des caractéristiques physico chimiques et toxicologiques sont à respecter pour chaque composé. (annexe 2) Par exemple, la solubilité dans l'eau est primordiale puisque cela facilitera l'analyse par UHPLC-HRMS et les expérimentations. Les produits doivent également avoir une toxicité suffisante sur les organismes vivants dans le but de comparer celle-ci avec celle de leurs produits de transformation. Enfin, les phytosanitaires doivent être dégradables afin de pouvoir obtenir des TPs pour les expérimentations, mais être assez stables notamment à la photolyse ou à l'hydrolyse pendant la durée des expositions en aquarium prévues dans la suite du projet.

Dans le cadre du projet, deux moyens de dégradations performants seront utilisés et testés sur les pesticides : la photocatalyse et la sonochimie. (Description en annexe 3)

a) *Tébuconazole*

Le tébuconazole (TBZ) fait partie de la famille des fongicides. C'est-à-dire qu'il est utilisé contre le développement de champignons essentiellement. Bien que sur le marché depuis 27 ans, il demeure encore un manque de connaissances concernant son devenir dans l'environnement, sa transformation et l'impact éco-toxicologique de ses produits de transformation.

Sa structure chimique est la suivante :

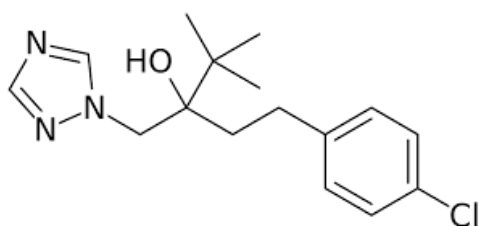


Figure 3 : Structure moléculaire du tébuconazole (TBZ)

Le tébuconazole fait partie de la famille des triazolés avec un cœur cyclique à 3 azotes stables constituant ainsi très souvent le produit final de dégradation dans l'environnement. Ses propriétés remplissent intégralement le cahier des charges fixés dans le cadre du projet (annexe 2). Le travail préalable réalisé au sein du laboratoire a permis d'avoir une base de données contenant 291 produits de transformation directement utilisable pour des analyses suspectées.

La dégradation de ce composé par photocatalyse sur TiO<sub>2</sub> est documentée et semble ainsi possible en un temps réduit, inférieur à une heure. <sup>17,18</sup>

b) *Fenoxycarb*

Le fenoxycarb (FNX) est un insecticide utilisé pour la régulation de croissance des insectes en inhibant l'hormone juvénile responsable de leur reproduction.

Il fait partie de la famille des carbamates dont la structure chimique est la suivante :

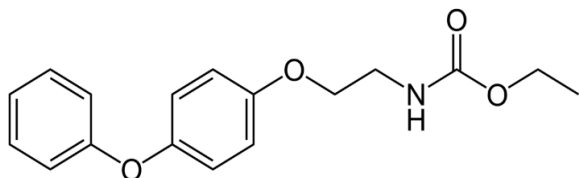


Figure 4 : Structure moléculaire du fenoxycarb (FNX)

Bien que la littérature concernant sa dégradation et la formation de produits de transformation soit très peu fournie, ce composé semble être dégradé par photolyse en environ 15-20 jours. <sup>19</sup> Une dégradation par photocatalyse sur TiO<sub>2</sub> est ainsi envisageable. <sup>20</sup>

## c) Terbutylazine

La terbutylazine (TBT) est un herbicide utilisé dans le milieu agricole contre le développement de divers végétaux. Il était très appliqué en vigne jusqu'à son interdiction en 1997. Depuis 2017, il est néanmoins de nouveau autorisé en France pour la culture de maïs bien qu'il demeure diverses interrogations concernant sa toxicité.

Il fait partie de la famille des triazines comme le montre sa structure :

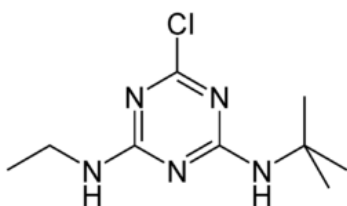


Figure 5 : Structure moléculaire de la terbutylazine (TBT)

Ce composé est dégradable par photocatalyse sur  $\text{TiO}_2$  et différents produits de transformation sont décrits dans la littérature. Les protocoles sont adaptés et utilisés dans le cadre du stage. <sup>21-23</sup>

## II) Matériels et méthodes

### 1) Appareillage pour l'analyse

L'ensemble des analyses des pesticides et de leurs produits de transformation ont été réalisées sur un UPLC-HRMS de Waters. (Photographie en annexe 4)

La partie chromatographique de l'appareil est composé de 4 blocs :

- FTN : passeur d'échantillon réfrigéré à 4°C pour placer les vials d'analyse.
- QSM : Quaternary solvent manager, pompe haute pression pouvant gérer simultanément 4 types de solvants permettant l'application des gradients.
- CM : four à 30°C contenant la colonne chromatographique et le *pre-heater*. La colonne utilisée est une colonne apolaire C18 HSS T3 ( $d_p=1,8\mu\text{m}$ ,  $d=2,1\text{mm}$  et  $l=100\text{mm}$ ) fournie par Waters.
- BSM : pompe binaire non utilisée dans le cadre du stage.

La méthode chromatographique utilisée est composée de deux solvants : Eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) et Acétonitrile (ACN), tous les deux acidifiés à 0,1% avec de l'acide formique. La méthode de gradient appliqué dure 20 minutes. La composition de départ de  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  98/2 v/v est appliquée pendant 2 minutes. Puis la proportion en ACN est augmentée jusqu'à atteindre 99/1 ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  en 13 minutes. Soit une pente de gradient de  $6\%.\text{min}^{-1}$ . La composition finale de gradient est conservée durant deux minutes puis celui-ci revient aux conditions initiales pour reconditionner la colonne pour l'injection suivante.

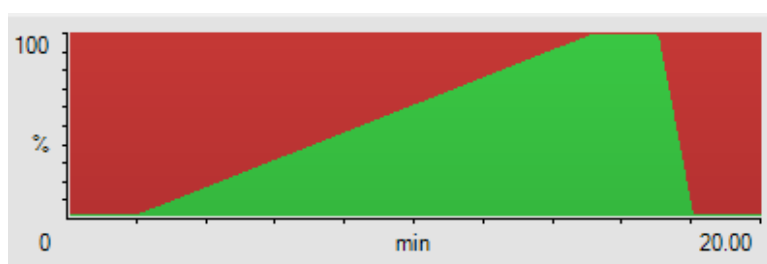


Figure 6 : Gradient appliqué pour les analyses (en rouge :  $\text{H}_2\text{O}$ , et en vert : ACN)

Le spectromètre de masse est un appareil à haute résolution QTOF. Il est ainsi composé de deux analyseurs ; un quadripôle couplé à un temps de vol et séparé par une cellule de collision. Après avoir été ionisés par une source électrospray en mode positif (ESI+), les ions sont sélectionnés par le quadripôle. Ils seront ensuite fragmentés dans la cellule de collision. Le principe du QTOF repose alors sur la mesure du temps de vol des ions qui dépend du rapport masse sur charge ( $m/z$ ) de ceux-ci.



La fenêtre d'acquisition massique va de 50 à 1200 m/z, avec un mode d'acquisition continuum de type MS<sup>e</sup>. Ce dernier consiste en deux acquisitions conjointes, en scans intercalés :

- une acquisition très faiblement fragmentée (full-scan, MS1, 6eV)
- une acquisition fragmentée, avec une rampe d'énergie de collision allant de 10 à 45eV

Le mode de fragmentation en MS<sup>e</sup> est dit « data independant acquisition » (DIA), c'est-à-dire que tous les ions précurseurs sont fragmentés simultanément. Lors de l'acquisition, l'absence de sélection a priori durant l'étape de fragmentation permet ainsi de prendre pleinement en compte l'information spectrométrique dans le cadre d'analyses dites « rétrospectives », a posteriori.

Le logiciel d'acquisition des données utilisé est MassLinx, fourni par Waters.

## 2) Retraitement de données

Des logiciels constructeurs vendus sous forme de licence avec l'appareil sont utilisés pour le retraitement de données tel que Unifi ou MassLynx (Waters) dans le cadre du stage. Il existe également des substituts au travers de logiciels open-source tels que mzMine.<sup>24</sup> Grace aux informations contenues dans la base de donnée, une méthode de retraitement est créée dans Unifi. Après acquisition et importation des données, une méthode d'analyse est construite directement sur ce logiciel. L'interprétation des résultats, consistant en l'identification de composés, est effectuée en fixant des critères d'acceptation chromatographiques et spectrométriques. Cela passe par l'application de "filtres" au sein du logiciel, détaillés dans la suite du rapport.

Pour étudier la dégradation des composés, on suit leur « chute » de concentration par analyse ciblée quantitative, et l'apparition potentielle de leur TPs par analyse suspectée qualitative. De ce fait, deux méthodes ont été créés et adaptées en fonction des composés analysés :

- Une méthode appelée « Target » permettant la quantification des substances mères (pesticides ici) à l'aide de gammes d'étalonnages intégrés à la séquence d'analyse.
- Une méthode « suspect screening », utilisé pour la recherche de produits de transformation à partir des bases de données fournies pour chaque composé.

### 3) Mise en place du suivi de l'appareil

Avant chaque lancement d'analyse, l'ensemble des échantillons sont dopés avec 2 composés deutérés : le diuron d6 et tébuconazole d6. Ces deux composés sont utilisés pour vérifier l'erreur en masse (différence entre la masse théorique et celle expérimentale), l'intensité, et le temps de rétention. Ainsi en début de séquence sont placés des blancs dopés permettant le contrôle de ces valeurs afin de savoir si la séquence prévue peut être lancée dans de bonnes conditions. Le bon fonctionnement de l'appareil est d'autant plus important pour l'objectif de détection de produits de transformation par analyse suspectée car les composés à détecter sont présents à de faibles teneurs dans les échantillons. Il est alors primordial de s'assurer du bon fonctionnement de l'appareil et en particulier de la sensibilité. .

Lors du stage et en collaboration avec mon encadrant doctorant Kevin Rocco, un protocole a été mis en place pour avoir un suivi plus approfondi de l'appareil. Le QTOF est un appareil haute résolution présentant souvent des variations d'intensités et d'erreurs en masse non négligeables en inter-séquence. Les cartes de contrôles mises en place ont ainsi été essentielles au cours du stage pour ne pas tirer de conclusions biaisées lors du retraitement de données.

Pour cela, des composés de différentes familles, pesticides et pharmaceutiques, ont été mélangés au sein d'un Quality Control Mix. (composition du QCmix en annexe 5)

Ces composés ont été sélectionnés afin de couvrir une fenêtre de temps de rétention (RT) - rapport masse sur charge ( $m/z$ ) la plus importante possible, comme on peut le voir sur la figure 7.

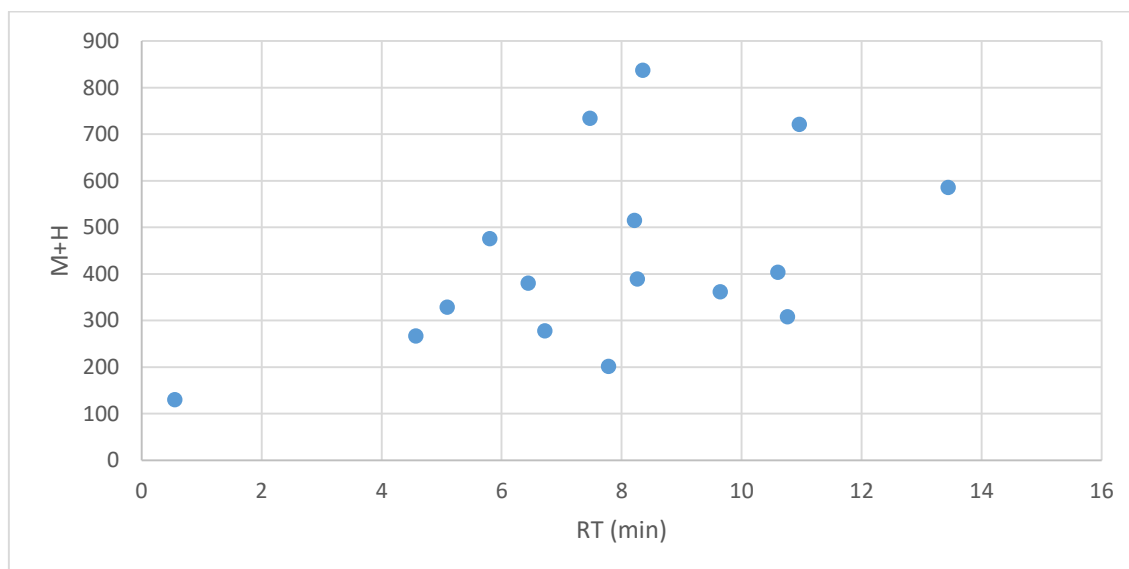


Figure 7 : Répartition des composés du QCmix en fonction de leur RT et rapport  $m/z$

Une méthodologie de travail a été développée pour uniformiser l'utilisation de ce QCmix au sein du laboratoire pour tous les opérateurs. Ainsi, les QCmix sont intégrés dans toutes les séquences d'analyses lancées sur l'appareil en début, milieu et fin de séquence afin d'avoir une information sur la déviation possible de l'appareil en intra-séquence. Le retraitement de ces données est automatisé et rapide et permet *in-fine* d'obtenir une carte de contrôle pour chaque composé.

Trois paramètres importants ont été suivis via ces contrôles : le temps de rétention, l'intensité et l'erreur en masse.

De trop fort écarts à la moyenne + ou - 2 écarts types, notamment sur les valeurs d'intensités, permet ainsi l'interruption de la séquence, ou instaure un recul supplémentaire lors du retraitement des données dans le cas où la séquence est terminée. Des exemples de cartes de suivi pour un composé du QCmix sont consultables en annexe 6.

#### 4) Matériels et protocoles de dégradation de pesticides

##### a) La sonde ultrasons (Photographie en annexe 7)

La sonde à ultrasons utilisée vient du fournisseur BRANSON Ultrasonics et les paramètres par défaut appliqués sont une puissance de 150W en mode continu (pulsation continue durant le temps programmé).

La première mise en route et utilisation de l'appareil a nécessité quelques optimisations. En effet, dans la littérature, les expériences réalisées dans le cadre de la dégradation de produits de transformation utilisent pour la plupart des bains à ultrasons et non une sonde. La puissance d'ultrasons délivrée est beaucoup plus localisée avec une sonde. Cela peut a priori augmenter les rendements de dégradation, mais pose aussi des problèmes de forte montée en température comme le montrent les relevés suivants au contact de la sonde réalisés avec des Tinytags, enregistreurs de données de température programmable.

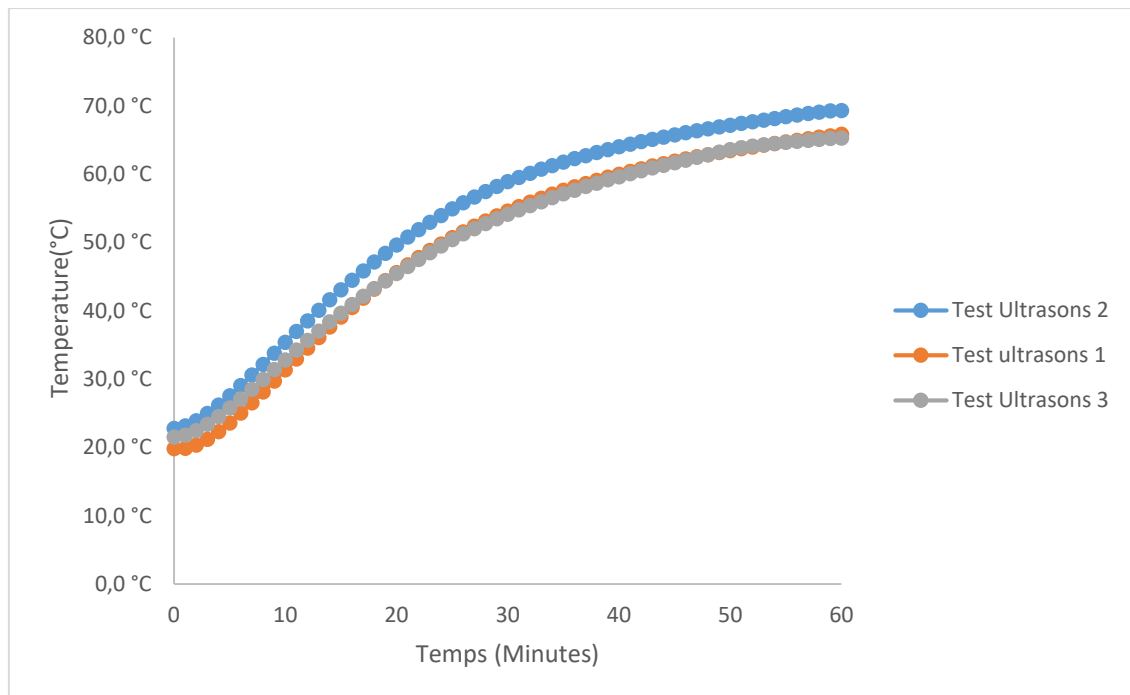


Figure 8 : Evolution de la température(°C) dans l'eau au contact de la sonde pour 3 séries d'essais avec un réglage de la sonde à 150W, mode continu

Cela engendre donc jusqu'à 30% de pertes par évaporation de la solution. Des tests ont été réalisés afin de minimiser au maximum celles-ci. En effet, le mode « pulse » permet d'activer ou d'arrêter la sonde automatiquement durant l'exposition et le réglage de la puissance ont ainsi permis de trouver les paramètres optimaux qui seront appliqués pour la dégradation de pesticides, sans toutefois éliminer totalement les pertes par évaporation (environ 5% de perte).

Le protocole appliqué à la suite des optimisations est résumé dans le tableau suivant :

Volume (mL)	Concentration (mg/L)	Mode	Temps (min)	Puissance (W)
20	1mg/l	Pulse 1min on/1min off	60	35

Tableau 1 : Protocole utilisé pour la dégradation par ultrasons

b) La photocatalyse (Photographie en annexe 7)

Des tests avec de l'eau ultra pure ont dans un premier temps été réalisés dans le but d'avoir une information sur l'évolution de la température au cours de l'expérience. Ainsi, des relevés de température ont été effectués à l'aide de TinyTags également (figure 9).

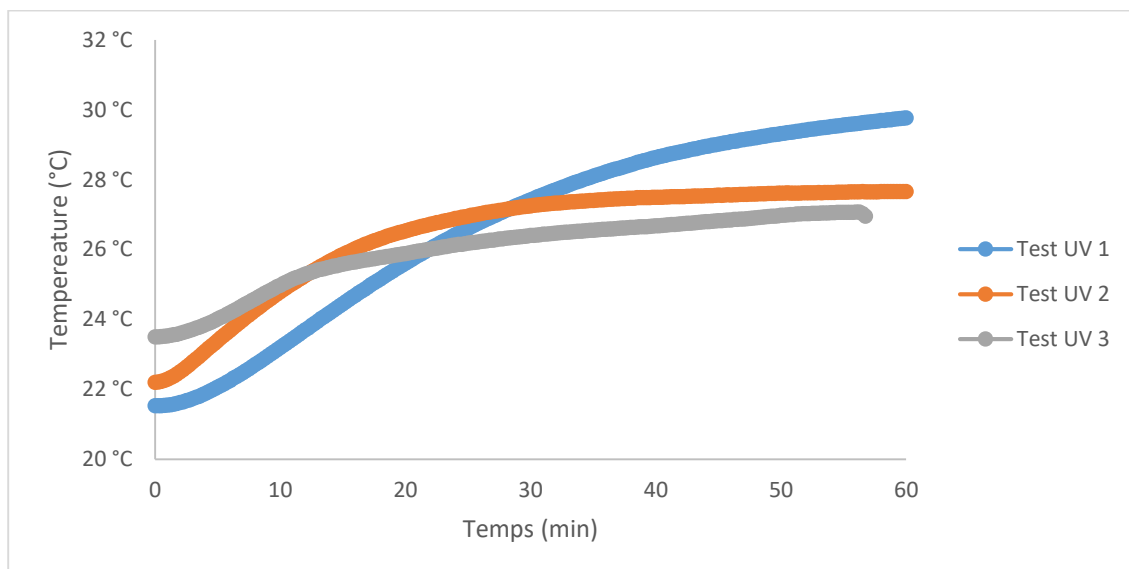


Figure 9 : Evolution de la température en fonction du temps dans l'enceinte à UV lors de 3 séries d'essais

La figure 9 montre que la température augmente peu en une heure ; seulement 7°C au maximum. La dégradation par effet de la température pourra donc être considérée comme négligeable devant celle venant de la photocatalyse.

Comme expliqué en partie bibliographique, le protocole appliqué pour la dégradation par photocatalyse a été pris et adapté des publications citées auparavant pour le tébuconazole et la terbuthylazine. Par défaut d'informations concernant le fenoxycarb, le même protocole que pour le tébuconazole a été utilisé. Ceux-ci sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Volume eau	Concentration	Temps	Densité de photons	Nombre de prélèvements
50 mL	$C_{TiO_2} = 550\text{mg/L}$ $C_{TBZ} = 1\text{mg/L}$ ou $C_{FNX} = 1\text{mg/L}$ ou $C_{TBT} = 5\text{mg/L}$	60 min	765 W/m <sup>2</sup>	6

Tableau 2 : Protocoles utilisés pour la dégradation par photocatalyse des 3 composés de l'étude

Un suivi cinétique de l'évolution de la composition de la solution aqueuse a été réalisé à l'aide de prélèvements toutes les 10 minutes qui sont directement filtrés sur un filtre *Chromafil* 0.20 µm pour s'affranchir du TiO<sub>2</sub> puis mis en vial et congelés avant analyse. Des analyses par ICP-MS seront réalisés en complément pour s'assurer que le TiO<sub>2</sub> est totalement éliminé. Ce suivi a pour but d'avoir une information quantitative sur l'évolution de la concentration en substance mère mais aussi d'avoir une information qualitative sur l'apparition ou non de produits de transformation durant l'exposition. A l'issue du retraitement, un temps optimal de dégradation sera sélectionné essentiellement pour l'étude de stabilité et la suite du projet TAPIOCA. Ce temps devra contenir un maximum de TPs avec une intensité suffisante.

### III) Résultats et discussions

#### 1) Identification de produits de transformation par analyse suspectée

Dans le cadre des objectifs du stage, la partie la plus importante n'est pas celle de la quantification de la substance mère mais celle concernant l'identification de produits de transformation par analyse suspectée. La détermination d'un temps « optimal » de dégradation sera faite pour chaque pesticide : temps pour lequel un maximum de TPs sont présents en terme de nombre et d'intensité. L'approche suspectée étant limitée par la liste des produits présents dans les bases de données, il est probable que la liste de TPs identifiés ne soit pas exhaustive. Le retraitement des données est un processus long qui nécessite une analyse poussée pour s'affranchir des erreurs d'identification (faux positifs par exemple).

De plus, l'identification des TPs a été faite avec une confiance élevée du fait des filtres appliqués très sélectifs lors du retraitement de données :

- erreur en masse inférieure à 10 ppm,
- delta de RT inférieur à 1 minute par rapport au temps de rétention prédit,
- fragments trouvés
- identification et présence du TP au sein des trois réplicats d'injection et de dégradation

#### l) Tébuconazole

Pour ce composé, deux bases de données de produits de transformation ont été utilisées.

La première comporte 291 produits de transformation venant de divers modèles de prédiction et de la bibliographie. Celle-ci présente l'avantage d'être très complète mais entraîne des problèmes de mésappariements (faux positifs par exemple) lors du retraitement de données avec Unifi puisqu'elle comporte de nombreux isomères difficilement séparables par UHPLC-HRMS avec les conditions chromatographiques appliquées.

La seconde base de données est spécifique à la photocatalyse. Elle a été créée uniquement à partir de la bibliographie concernant la dégradation du tébuconazole par photocatalyse et contient 14 produits de transformation.<sup>17,18</sup>

Par ailleurs, la détermination d'une structure développée de TP a été difficile. En effet, la base de données contenant de nombreux produits de transformation, certains sont des isomères et possèdent donc la même masse moléculaire et souvent un temps de rétention prédit très proche. Pour l'interprétation des résultats, la mise en place de groupes en fonction de la masse mono-isotopique au sein de la base de données a été essentielle. Celle-ci a permis d'obtenir

63 groupes et ainsi de simplifier le retraitement et l'analyse des résultats. Les structures de TP indiquées dans la partie résultat sont donc celles des produits de transformation dont les isomères correspondent le mieux ainsi que le plus souvent, dans les répliquats d'injection et de dégradation, lors de l'analyse suspectée avec Unifi.

#### a) Dégradation par photocatalyse

Dans un premier temps, une analyse quantitative de la concentration en tébuconazole a été effectuée afin de déterminer si ce moyen est efficace pour dégrader ce composé. (courbe d'étalonnage présentée en Annexe 7)

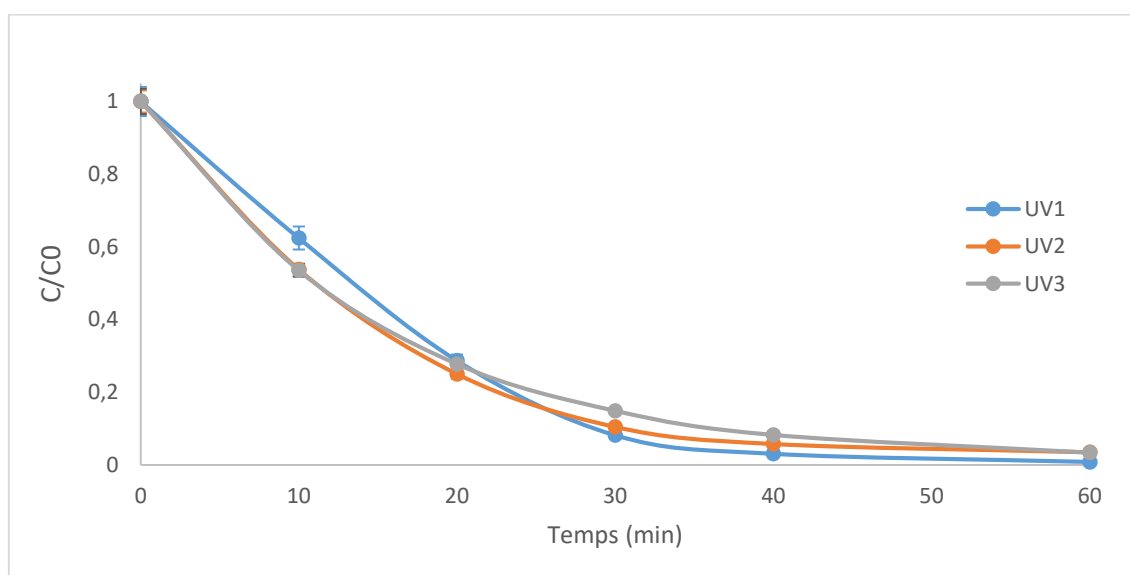


Figure 10 : Evolution de la concentration relative par rapport à la concentration initiale en TBZ au cours de l'exposition aux UV

Sur la figure 10, on peut constater que la photocatalyse est un moyen très efficace de dégradation du tébuconazole. En effet, en 40 minutes seulement, la totalité du TBZ a été dégradé puisque les valeurs restantes de réponse du détecteur sont celles retrouvées dans les blancs et sont donc dues à un léger *carry-over*. De plus, la perte en TBZ est répétable puisqu'elle est quasiment identique pour chaque triplicat de dégradation réalisé.

Concernant la recherche de TP, 3 ont pu être identifiés avec un haut niveau de confiance. La structure des composés est la suivante :

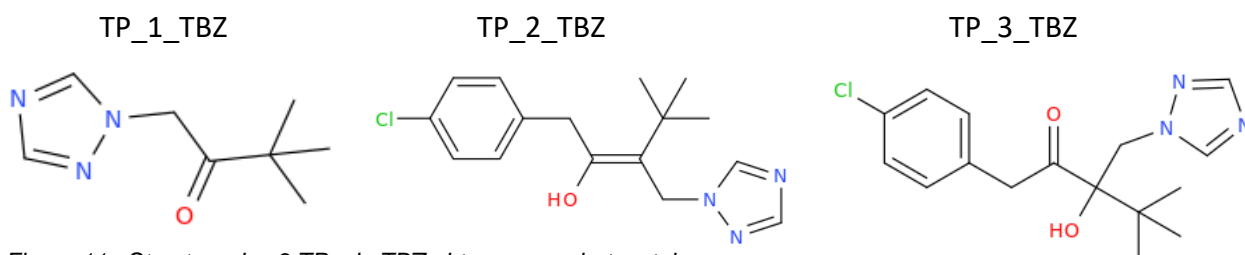


Figure 11 : Structure des 3 TP du TBZ obtenus par photocatalyse

Dans le cadre d'un autre stage chez un partenaire du projet TAPIOCA, la présence des produits de transformation a également été confirmée par analyse chromatographique liquide bidimensionnelle couplée QToF. (paramètres en annexe 7)

A noter que d'autres produits de transformation sont présents mais ne seront pas intégrés au graphique suivant, par manque de confiance quant à leur identification. En effet, pour la plupart d'entre eux, leur intensité est très faible, ainsi une identification inégale à travers les triplicats. Ainsi, lorsque les pics ne sont pas intégrés avec Unifi, il est impossible de moyennner les valeurs de réponse sur les réplicats.

De plus, un 4<sup>ème</sup> produit de transformation est présent avec une confiance élevée (même filtres appliqués que pour les 3 TPs précédents) mais n'a pas été identifié par le logiciel de retraitement et ce problème n'a pas pu être résolu malgré les différentes méthodes de retraitement testées. Cette non identification provient probablement d'un rapport signal sur bruit insuffisant pour l'intégration. A l'aide d'Unifi, une méthode d'analyse TARGET a permis d'obtenir des valeurs de réponses qui ne seront toutefois pas comparables avec celles obtenues pour les autres TPs dans le cas d'une méthode suspect.

Ainsi, les valeurs d'intensités des TPs identifiés évoluent selon le temps de dégradation comme le montre le graphique suivant :

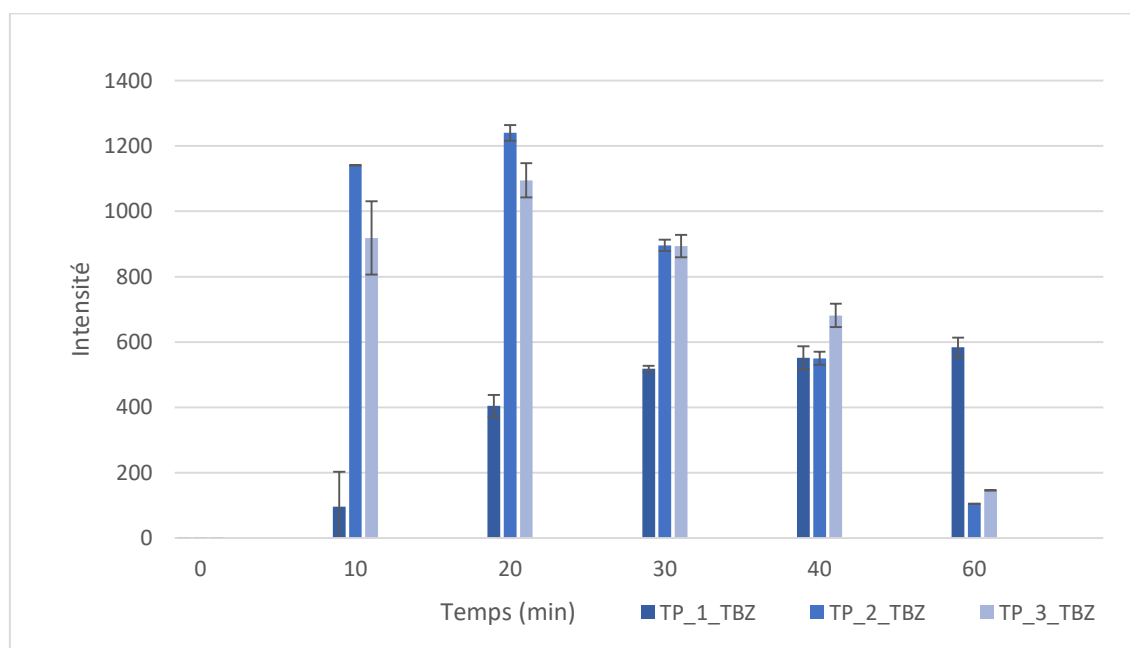


Figure 12 : Evolution de la réponse des TPs du TBZ identifiés, au cours de l'exposition aux UV (n=3)

On remarque que deux des trois TPs ont un comportement similaire. En effet, les TPs 2 et 3 apparaissent dès le début de la dégradation avec une intensité élevée à T=10 minutes et atteignent un maximum d'intensité à T=20 minutes pour ensuite décroître progressivement jusqu'à la fin de la dégradation. Le TP 1 augmente lui en intensité tout le long du suivi.



Le temps optimal sélectionné est 20 minutes ici. En effet, les produits de transformation 2 et 3 sont présents à leur intensité maximale et le TP1 avec une intensité proche de celle à T=60 minutes.

Enfin, il est important de noter que l'augmentation de leur intensité n'est pas inversement proportionnelle à la chute d'intensité observée pour le TBZ. En effet, cela peut être expliqué par le fait que les TP se dégradent eux même pour en former d'autres au cours de l'exposition aux UVs. Ces composés ne sont pas identifiés dans la solution, car leur teneur est trop faible pour qu'ils soient détectés, ou ils ne sont intégrés dans les bases de données.

### b) Dégradation par ultrasons

Comme dans le cas de la photocatalyse, une analyse quantitative a dans un premier temps été réalisée pour déterminer l'évolution de la concentration en tébuconazole au cours de l'exposition.

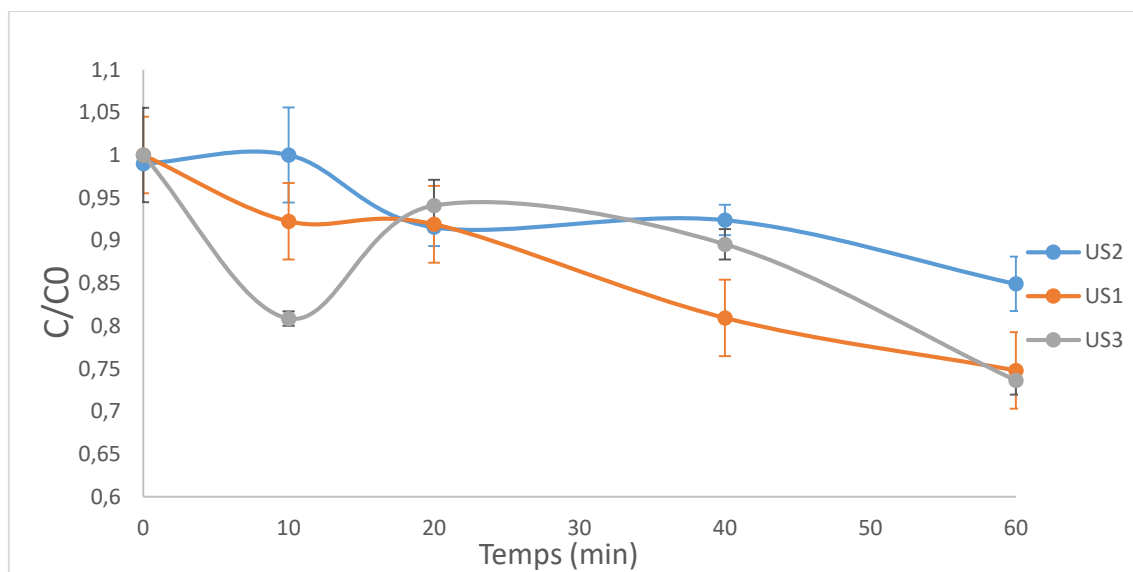


Figure 13 : Evolution de la concentration en tébuconazole au cours de l'exposition aux ultrasons pour 3 essais et des triplicats d'analyses pour chaque point de prélèvement

Sur la figure 13, on peut observer une diminution de la concentration en TBZ pour chaque essai entre 0 et 60 minutes. Cependant, celle-ci est très inférieure à celle obtenue par photocatalyse puisqu'elle baisse de seulement 25% au maximum en 60 minutes. On peut également constater que la dégradation est beaucoup moins répétable avec des fluctuations importantes entre les essais. Ce manque de répétabilité peut être expliqué par les problèmes de hausse de température et d'évaporation de la solution rencontrés au cours de l'expérience.

Cette méthode est donc moins efficace que la photocatalyse pour dégrader le TBZ.

Concernant la recherche de produits de transformation par analyse suspectée, malgré la faible perte en TBZ, elle a toutefois permis l'identification de 4 TP avec un indice de confiance élevé mais inférieur à précédemment du fait de la moins bonne répétabilité de la dégradation. Seulement un des 4 produits est en commun avec les 3 obtenus par photocatalyse.

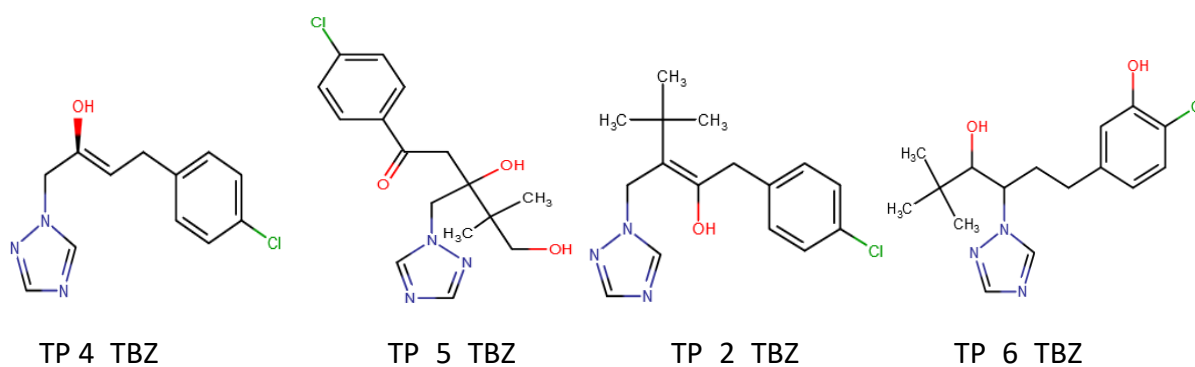


Figure 14 : Structure des différents TPs du TBZ obtenues par ultrasons (TP\_2\_TBZ en commun avec la photocatalyse)

L'intensité de ces composés varient selon le temps d'exposition selon la figure 15 :

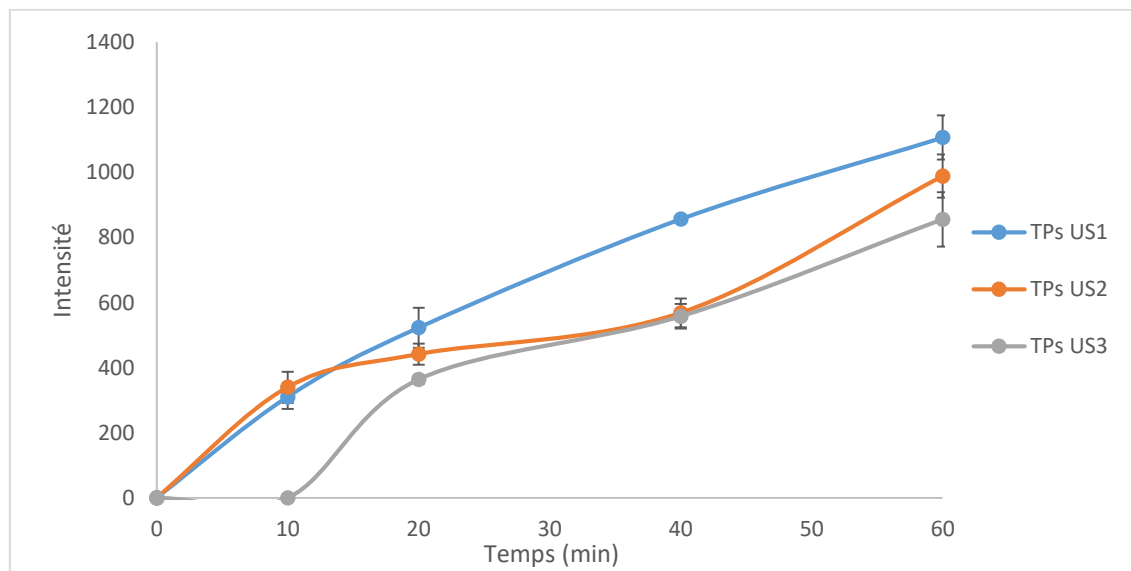


Figure 15 : Evolution de la somme des intensités en TPs au cours de l'exposition aux ultrasons

La somme de l'intensité des TPs obtenus augmente au cours de l'exposition (figure 15). Contrairement à la photocatalyse, celle-ci semble continuer d'augmenter entre 40 et 60 minutes d'exposition. Une perspective d'expérimentation serait donc d'allonger le temps de dégradation pour savoir si cette tendance se confirme. Cependant, l'augmentation de l'intensité peut également être expliquée par une évaporation d'eau au cours de l'expérimentation entraînant ainsi une re-concentration des TPs. Il est ainsi possible que ces derniers ne se forment pas plus pendant l'exposition malgré l'augmentation de l'intensité.

Pour le TBZ, la photocatalyse est donc un meilleur moyen de dégradation car elle permet de le dégrader quasi-totalement en seulement 40 minutes et d'identifier 3 produits de transformation avec un indice de confiance élevé. Bien que les ultrasons aient également permis d'obtenir des TPs, ceux-ci sont moins intenses car le TBZ est moins dégradé et la dégradation est beaucoup moins répétable. De plus, le problème d'évaporation de solution liée à une hausse de température de la solution élevée engendre un biais trop important. Par soucis de gain de temps également, les ultrasons ne seront donc pas testés pour les deux autres pesticides.

## II) Fenoxycarb

Pour cet insecticide, une base de donnée de TPs a été créée uniquement à partir de modèles de prédiction in-silico en libre accès à cause du manque de littérature sur ce composé. Celle-ci est ainsi composée de seulement 11 TPs.

L'étude quantitative du fenoxycarb a été réalisée via une méthode « Target » et une gamme d'étalonnage.

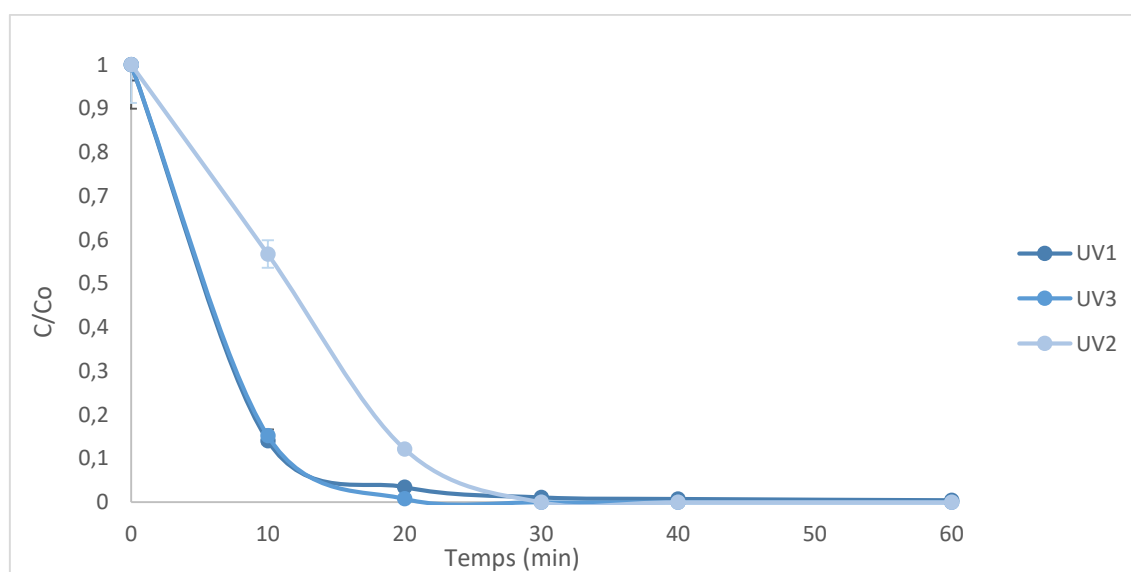


Figure 16 : Evolution de la concentration en fenoxycarb au cours de l'exposition (n=3)

La diminution de concentration en FNX est très rapide puisqu'en seulement 20/25 minutes, il n'y a plus de fenoxycarb dans la solution. Elle semble également très répétable pour deux des trois réplicats. Pour celui où la diminution est moins rapide (UV2), la différence vient d'une agitation de la solution moins efficace. Toutefois, le FNX est entièrement dégradé en maximum 30 minutes.

La méthode « suspect » est alors appliquée pour la recherche de produits de transformation, et mène à l'identification d'un seul TP.

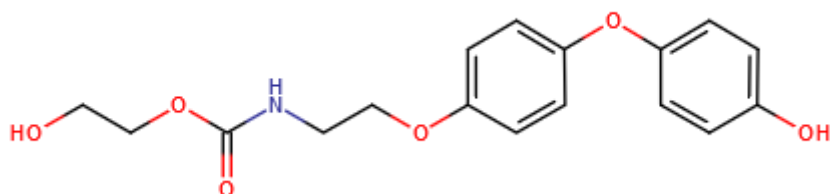


Figure 17 : Structure du TP du FNX obtenu par photocatalyse

Compte tenu du faible nombre de TPs intégrés à la base de données, identifier un produit peut être considéré comme un résultat satisfaisant.

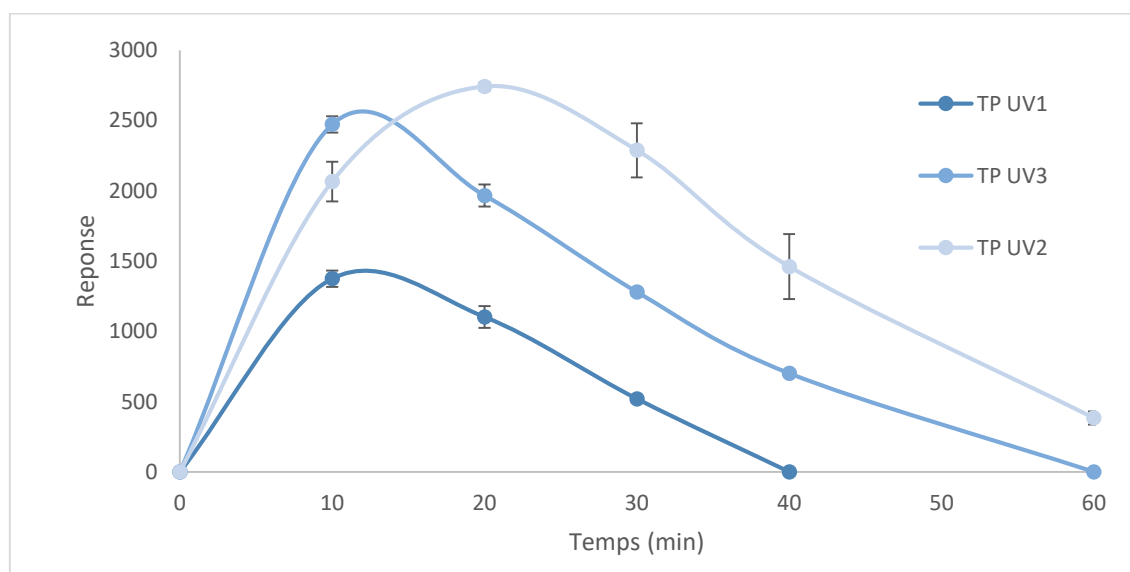


Figure 18 : Evolution de l'intensité du produit de transformation du FNX au cours de l'exposition

Deux conclusions peuvent être tirées de la figure 18 ci-dessus :

- Pour les réplicats UV1 et UV3, l'allure des courbes est identique et le maximum d'intensité du TP identifié est obtenu à 10 minutes. On observe ensuite une diminution de son intensité jusqu'à disparition totale à la fin de l'exposition. Cela peut s'expliquer par une dégradation du TP en un autre non inclus dans la base de donnée suspectée.

La différence d'intensité vient du fait que les analyses ont été menées dans deux séquences différentes et ces valeurs ne sont donc pas quantitativement comparables.

- Pour le réplicat UV2, on retrouve une courbe de même allure avec un décalage de 10 minutes en temps d'exposition. Cette observation est en accord avec la courbe de quantification (figure 15) où la concentration en FNX diminue moins rapidement que pour UV1 et UV3, le produit de transformation se forme donc également moins vite.

### III) Terbutylazine

Comme pour le FNX, la dégradation a été réalisée seulement par photocatalyse.

La base de données utilisée, incrémentée à la fois à partir de la littérature et des outils de prédictions in-silico est composée de 21 produits de transformation. Pour la TBT, 2 TP sont commercialisés et ont donc été achetés par le laboratoire : TBT deséthyl et TBT 2-hydroxy. (structures en annexe 10). Ceux-ci sont tous les deux présents dans la base de données, et il sera intéressant de savoir s'ils sont obtenus par photocatalyse.

Dans un premier temps, la quantification de la terbutylazine via une méthode « Target » a été réalisée.

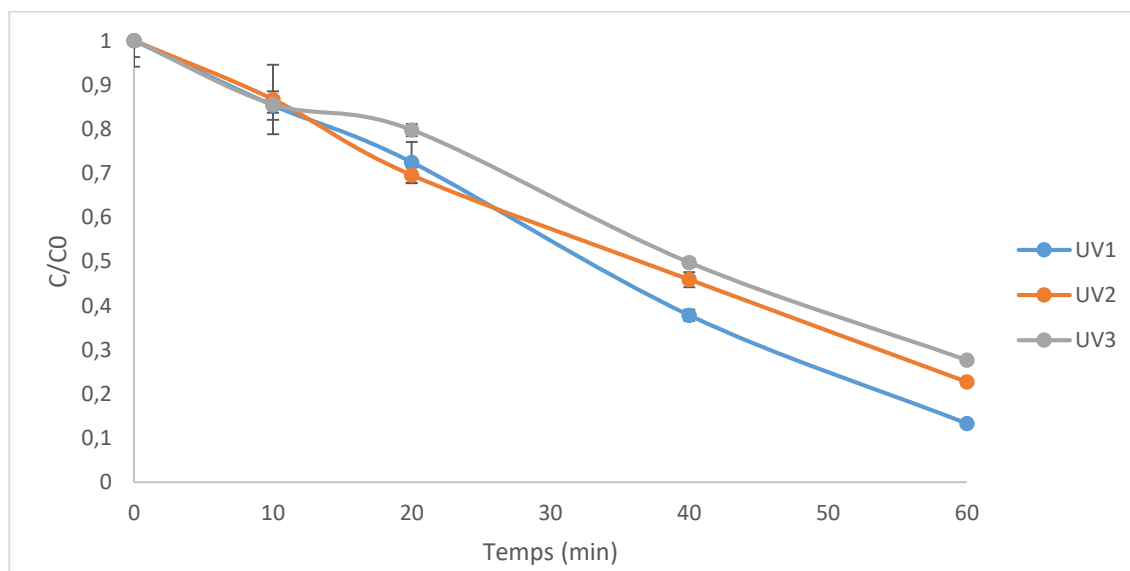


Figure 19 : Evolution de la concentration en TBT au cours de l'exposition

On peut constater que la concentration en TBT diminue plutôt linéairement durant l'exposition aux UVs pour chacun des réplicats, démontrant de nouveau la répétabilité de la méthode. A T=60 minutes, il reste ainsi seulement entre 12 et 25% de la concentration initiale, cette méthode est donc efficace pour dégrader la TBT.

La méthode « Suspect » permettant la recherche de produits de transformation de la TBT a permis d'identifier 8 TPs. (structures en annexe 12). Tous les TPs ont été identifiés avec une confiance élevée puisque les mêmes filtres que pour le TBZ ont été appliqués.

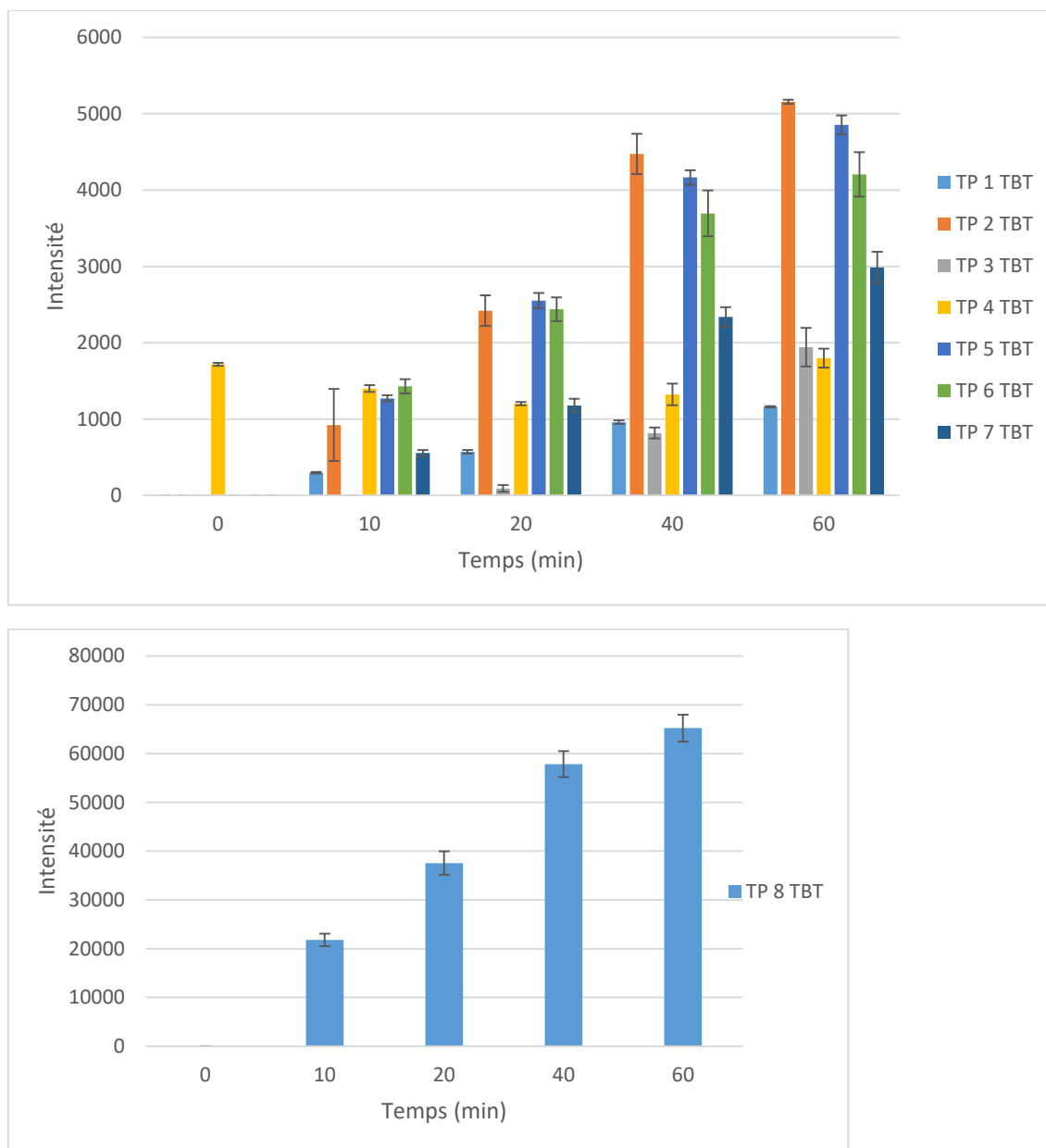


Figure 20 : Evolution de l'intensité des 8 TPs du TBT au cours de l'exposition (n=3)

Mis à part le TP 3 et le TP 4, tous les TPs semblent avoir le même comportement durant l'exposition. En effet, ils sont présents à partir de T=10 min, et se forment progressivement avec une augmentation de l'intensité entre 10 et 60 minutes. Le TP 3 se forme quant à lui à partir de 20 minutes puis tout au long de la dégradation.

Le TP 4 est la TBT 2-hydroxy que nous avons au laboratoire. Celui-ci a un comportement bien différent des autres TPs puisqu'il est déjà présent dès le début de l'exposition à T=0 min. Cette présence vient du fait que ce composé a une structure très proche de celle de la substance mère, la TBT (substitution d'un Cl par un groupe hydroxyle OH). On peut ainsi en déduire que même avant la mise en route de l'appareil, la lumière « naturelle » avec le TiO<sub>2</sub> suffit à former ce produit de transformation. Une autre hypothèse de la présence de ce composé dès le T=0min, vient de la pureté de la solution initiale en TBT. Ensuite, son intensité diminue jusqu'à t=20 minutes puis augmente de nouveau jusqu'à la fin de l'exposition pour atteindre environ l'intensité initiale.

Le TP 8 a un ordre de grandeur d'intensité comparable à celle de la TBT contrairement à la totalité des TPs identifiés jusque-là. Il est formé à partir de 10 minutes et son intensité augmente progressivement jusqu'à la fin de l'exposition. Pour la TBT, concernant le temps optimal de dégradation, il est évident que celui-ci est à T=60 minutes puisque tous les TPs identifiés sont présents à leur maximum d'intensité à ce temps.

Une possibilité serait d'allonger la dégradation au-delà de 60 minutes pour voir si la concentration en TBT continue de diminuer et si la teneur en TPs augmente encore.

Pour résumer, le tableau 3 présente les principales conditions de protocoles à reproduire afin d'obtenir un maximum de produits de transformation pour les 3 pesticides.

Pesticides	Volume (ml)	Concentration (mg/l)	Concentration TiO <sub>2</sub> (mg/l)	Temps optimal (min)	Nombre de TPs identifiés
TBZ	50	1	550	20	3
FNX	50	1	550	10	1
TBT	50	5	550	60	8

Tableau 3 : Résumé des conditions opératoires optimales pour chaque composé (photocatalyse)

## 2) Stabilité des produits de transformation

Dans le cadre du projet, une étude de stabilité est nécessaire. En effet, pour l'étude éco-toxicologique qui suivra, les produits seront introduits dans des aquariums avec une circulation d'eau gérée par des pompes (figure 18). Il est donc important de savoir si les produits seront à teneurs stables durant la durée de l'exposition (7 jours environ).

Pour cette partie, on s'intéresse à la fois à la stabilité des 3 pesticides sélectionnés et à celle des TPs identifiés et décrits dans la partie précédente, puisque les deux serviront lors de l'étude éco-toxicologique.

Les études de stabilité sont donc réalisées directement dans les conditions expérimentales de la future étude éco-toxicologique comme le montre les photos ci-dessous :

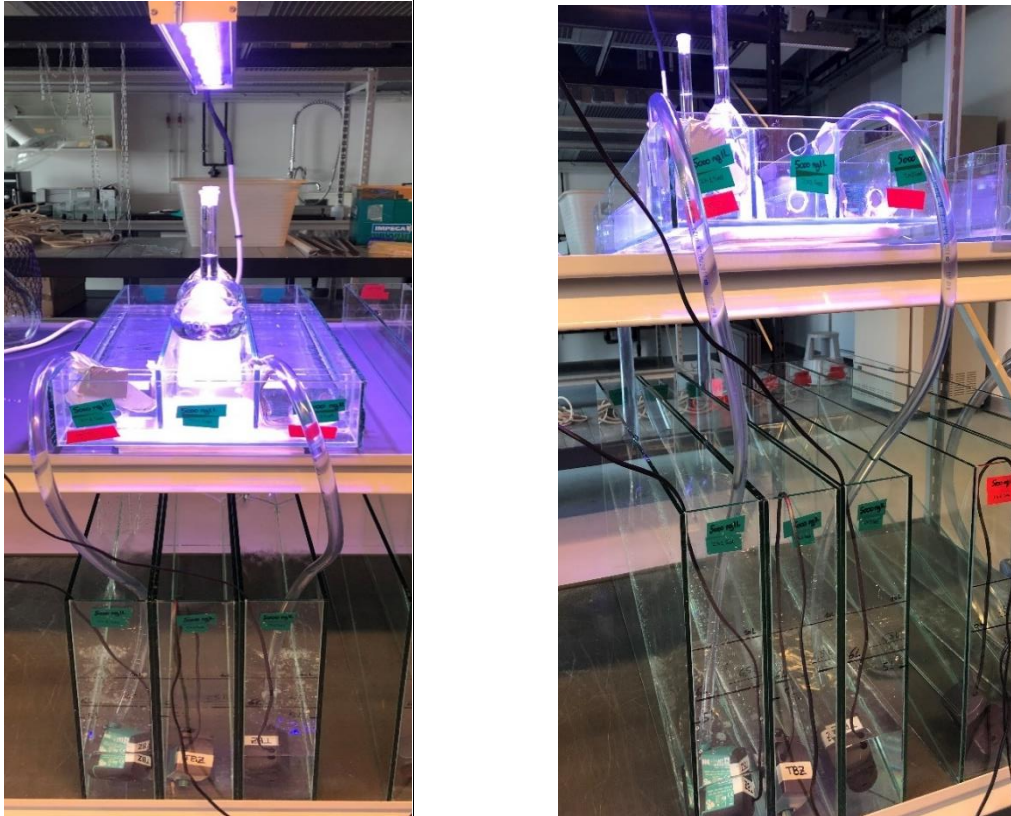


Figure 20 : Photos du dispositif expérimental qui sera utilisé pour les études éco-toxicologiques futures dans le cadre du projet TAPIOCA

Pour cela, des solutions « vieilles » de chaque pesticide ont été créées par dégradation des 3 molécules mères selon les conditions présentées dans le tableau 3 .

Un suivi est alors réalisé par prélèvements d'eau (1ml) à J0, J+2, J+5 et J+8 et une analyse suspectée est menée directement après chaque prélèvements.

#### 1) Tébuconazole

Une étude quantitative est réalisée sur le TBZ pour déterminer l'évolution de sa concentration au cours du temps dans le système expérimental.



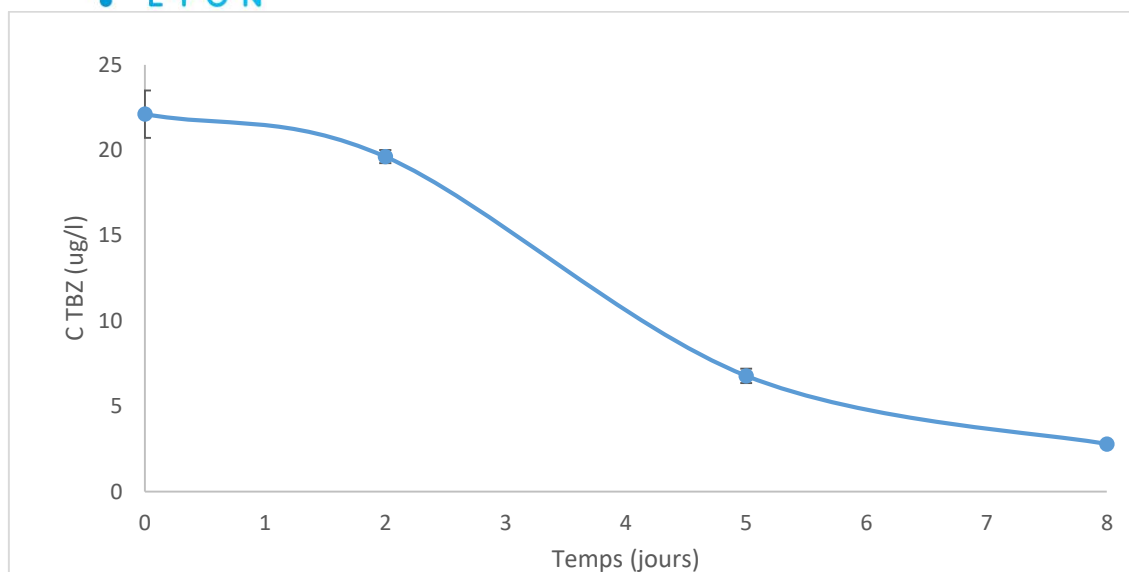


Figure 21 : Evolution de la concentration en TBZ lors du test de stabilité dans le système expérimental.

On s'affranchit ici de la variation inter-séquence du QToF en refaisant une courbe d'étalonnage pour chaque séquence. Ainsi, la concentration en tébuconazole a tendance à diminuer durant l'exposition dans les conditions de l'étude. Des hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette baisse :

- Une dégradation du TBZ sous ces conditions d'éclairage et de température, celle-ci semble peu probable étant donné que ce pesticide est très stable à la photolyse, à l'hydrolyse et à la température selon différents tests préliminaires réalisés lors du stage.
- Une adsorption progressive du TBZ sur les parois siliconées des tubes reliant l'eau aux pompes.

Une analyse suspectée a également été menée pour avoir une information sur la stabilité des TPs dans les mêmes conditions. Dans ce cas, il est impossible de s'affranchir de la variation d'intensité en inter-séquence de l'appareil.

Les conclusions découlant des courbes d'évolutions d'intensité des différents TPs ci-dessous sont donc données à titre informatif.

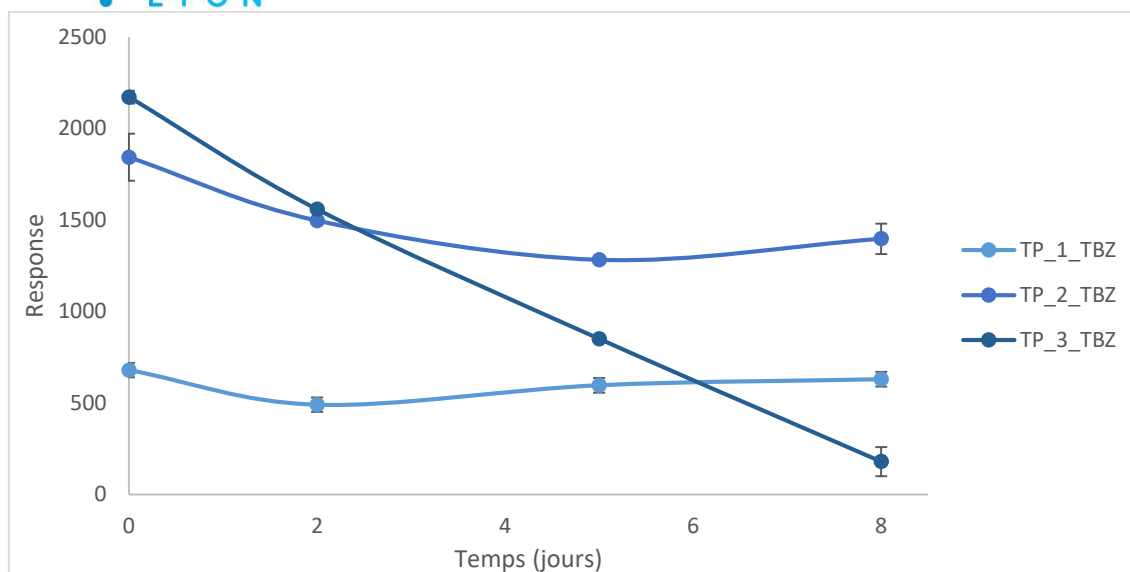


Figure 22 : Evolution des intensités des TPs du TBZ au cours du test de stabilité dans le système expérimental

Qualitativement, on peut conclure que les TPs sont présents à tous les points de prélèvements. L'allure des courbes pour les TPs 1 et 2 semblent montrer une certaine stabilité de ces composés dans la solution au cours du temps. Cependant, l'allure de la courbe du TP 3 montre une diminution linéaire de sa présence dans la solution au cours de l'exposition. Cela peut s'expliquer par une stabilité faible dans ces conditions aboutissant à une dégradation progressive du TP ou par une adsorption plus forte que les autres sur les tubes siliconés.

Par ailleurs, des tests ont également montré qu'une conservation de la solution au congélateur était envisageable dans le cadre de la poursuite du projet à la fois pour les TPs et solutions mères. Cela pourra permettre d'envisager de faire des dégradations sur des volumes importants afin d'avoir les solutions de TPs en stock directement prêtes à l'utilisation.

Pour les deux autres produits phytosanitaires, les tests de stabilité ne seront pas présentés dans le rapport car ils sont actuellement en cours d'analyse et de retraitement.

## IV) Conclusion

La recherche de produits de transformation n'étant que très développée à l'heure actuelle dans le domaine de l'analyse environnementale, celle-ci a présenté de nombreux challenges.

Dans un premier temps, les recherches bibliographiques ont permis de recenser des moyens de dégradation utilisables pour obtenir des TPs. La photocatalyse a été le moyen retenu pour dégrader les trois pesticides sélectionnés dans l'étude de par son efficacité sur le tébuconazole et son excellente répétabilité entre les réplicats, à la fois en terme de dégradation du pesticide mais aussi en terme de formation de TPs.

De plus, le développement d'une méthodologie d'identification par analyse suspectée a été mené afin de répondre aux différents objectifs du stage. La création de base de données pour chaque pesticide en est l'élément central. En effet, pour le tébuconazole et la terbuthylazine, des produits de transformation venant à la fois de la littérature et de modèles de prédiction in-silico ont pu être intégrés à leurs bases de données, les rendant ainsi plus complètes, avec respectivement 291 TPs pour le tébuconazole et 21 TPs pour la terbuthylazine. Dans le cas du fenoxycarb, la base de donnée est plus limitée en nombre de TPs (n=11) à cause de l'absence de littérature.

Les analyses par UHPLC couplée à la HRMS ainsi que les moyens de prédiction de temps de rétention et de fragmentation ont permis d'avoir un niveau de confiance élevé sur l'identification des produits de transformation.

Les objectifs du stage ont été atteints puisque pour les 3 produits phytosanitaires, des produits de transformation ont pu être identifiés avec 3 TPs pour le tébuconazole, 1 pour le fenoxycarb et 8 pour la terbuthylazine. Pour l'utilisation future de ces solutions de TPs dans le cadre d'études éco-toxicologiques du projet TAPIOCA, les tests de stabilité sont actuellement en cours. Pour le tébuconazole dans les conditions expérimentales de l'étude, les premiers résultats montrent une chute de la concentration du tébuconazole durant les 8 jours d'exposition. Pour les TPs du TBZ identifiés, même s'ils restent présents durant la durée du test, le constat semble identique avec une baisse progressive de l'intensité.

D'un point de vue personnel, ce stage a été source de nombreux apprentissages et m'a permis de découvrir la chimie analytique appliquée à un nouveau domaine qui me tient à cœur ; l'environnement. J'ai également pu apporter et développer mes compétences acquises lors de ma formation étudiante et de mes différents stages. Enfin, le fait de pouvoir travailler en présentiel avec le personnel a été vraiment positif pour moi après les derniers mois plus difficiles socialement.

Les différents échanges avec l'ensemble du personnel du laboratoire m'ont permis de me rendre compte de la diversité et pluralité des thématiques et projets de recherches portés par les laboratoires. J'ai beaucoup aimé l'intégration dans l'équipe et l'implication directe que j'ai pu avoir dans la vie du laboratoire, dans les réunions d'équipes et dans les diverses problématiques générales. Je resterai en contact avec les membres de l'équipe pour être au courant de l'évolution du projet TAPIOCA.

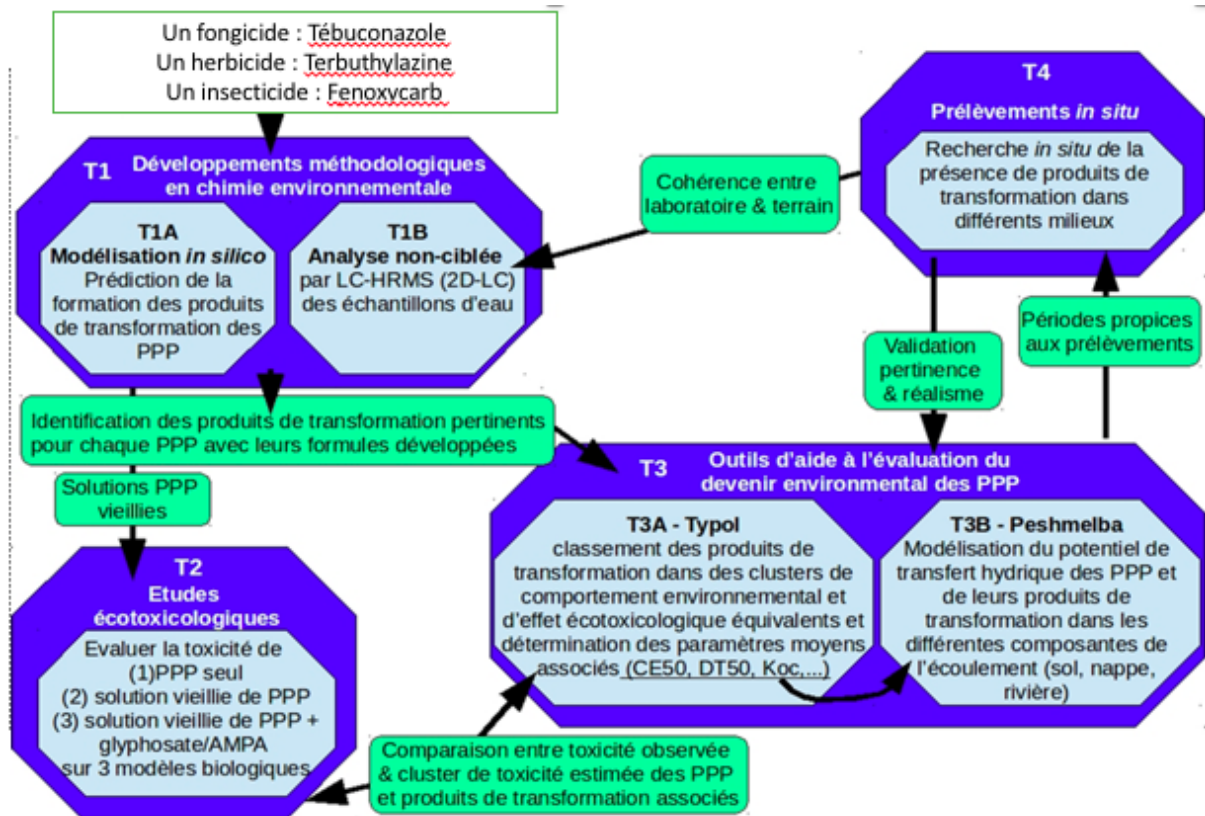
## Références

- (1) Fenner, K.; Canonica, S.; Wackett, L. P.; Elsner, M. Evaluating Pesticide Degradation in the Environment: Blind Spots and Emerging Opportunities. *Science* **2013**, *341* (6147), 752–758. <https://doi.org/10.1126/science.1236281>.
- (2) Kern, S.; Fenner, K.; Singer, H. P.; Schwarzenbach, R. P.; Hollender, J. Identification of Transformation Products of Organic Contaminants in Natural Waters by Computer-Aided Prediction and High-Resolution Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (18), 7039–7046. <https://doi.org/10.1021/es901979h>.
- (3) Le Cor, F.; Slaby, S.; Dufour, V.; Iuretig, A.; Feidt, C.; Dauchy, X.; Banas, D. Occurrence of Pesticides and Their Transformation Products in Headwater Streams: Contamination Status and Effect of Ponds on Contaminant Concentrations. *Sci. Total Environ.* **2021**, *788*, 147715. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147715>.
- (4) Bletsou, A. A.; Jeon, J.; Hollender, J.; Archontaki, E.; Thomaidis, N. S. Targeted and Non-Targeted Liquid Chromatography-Mass Spectrometric Workflows for Identification of Transformation Products of Emerging Pollutants in the Aquatic Environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, *66*, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.009>.
- (5) Escher, B. I.; Stapleton, H. M.; Schymanski, E. L. Tracking Complex Mixtures of Chemicals in Our Changing Environment. *Science* **2020**, *367* (6476), 388–392. <https://doi.org/10.1126/science.aay6636>.
- (6) Hollender, J.; Schymanski, E. L.; Singer, H. P.; Ferguson, P. L. Nontarget Screening with High Resolution Mass Spectrometry in the Environment: Ready to Go? *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (20), 11505–11512. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02184>.
- (7) Schulze, B.; Jeon, Y.; Kaserzon, S.; Heffernan, A. L.; Dewapriya, P.; O'Brien, J.; Gomez Ramos, M. J.; Ghorbani Gorji, S.; Mueller, J. F.; Thomas, K. V.; Samanipour, S. An Assessment of Quality Assurance/Quality Control Efforts in High Resolution Mass Spectrometry Non-Target Workflows for Analysis of Environmental Samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *133*, 116063. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116063>.
- (8) Choi, Y.; Lee, J.-H.; Kim, K.; Mun, H.; Park, N.; Jeon, J. Identification, Quantification, and Prioritization of New Emerging Pollutants in Domestic and Industrial Effluents, Korea: Application of LC-HRMS Based Suspect and Non-Target Screening. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *402*, 123706. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123706>.
- (9) Ibáñez, M.; Sancho, J. V.; Hernández, F.; McMillan, D.; Rao, R. Rapid Non-Target Screening of Organic Pollutants in Water by Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled to Time-of-Light Mass Spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2008**, *27* (5), 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.03.007>.
- (10) Tkalec, Ž.; Negreira, N.; López de Alda, M.; Barceló, D.; Kosjek, T. A Novel Workflow Utilizing Open-Source Software Tools in the Environmental Fate Studies: The Example of Imatinib Biotransformation. *Sci. Total Environ.* **2021**, *797*, 149063. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149063>.
- (11) Moschet, C.; Wittmer, I.; Simovic, J.; Junghans, M.; Piazzoli, A.; Singer, H.; Stamm, C.; Leu, C.; Hollender, J. How a Complete Pesticide Screening Changes the Assessment of Surface Water Quality. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (10), 5423–5432. <https://doi.org/10.1021/es500371t>.
- (12) Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (4), 2097–2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>.
- (13) Yuan, C.; Tebes-Stevens, C.; Weber, E. J. Prioritizing Direct Photolysis Products Predicted by the Chemical Transformation Simulator: Relative Reasoning and Absolute Ranking. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55* (9), 5950–5958. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c08745>.
- (14) Allen, F.; Pon, A.; Wilson, M.; Greiner, R.; Wishart, D. CFM-ID: A Web Server for Annotation, Spectrum Prediction and Metabolite Identification from Tandem Mass Spectra. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (W1), W94–W99. <https://doi.org/10.1093/nar/gku436>.

- (15) Bride, E.; Heinisch, S.; Bonnefille, B.; Guillemain, C.; Margoum, C. Suspect Screening of Environmental Contaminants by UHPLC-HRMS and Transposable Quantitative Structure-Retention Relationship Modelling. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *409*, 124652. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124652>.
- (16) Aalizadeh, R.; Nika, M.-C.; Thomaidis, N. S. Development and Application of Retention Time Prediction Models in the Suspect and Non-Target Screening of Emerging Contaminants. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *363*, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.09.047>.
- (17) Calza, P.; Baudino, S.; Aigotti, R.; Baiocchi, C.; Branca, P.; Pelizzetti, E. High-Performance Liquid Chromatographic/Tandem Mass Spectrometric Identification of the Phototransformation Products of Tebuconazole on Titanium Dioxide. *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37* (6), 566–576. <https://doi.org/10.1002/jms.315>.
- (18) Stamatis, N.; Antonopoulou, M.; Konstantinou, I. Photocatalytic Degradation Kinetics and Mechanisms of Fungicide Tebuconazole in Aqueous TiO<sub>2</sub> Suspensions. *Catal. Today* **2015**, *252*, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.09.023>.
- (19) Dpr, J. S. Environmental Fate of Fenoxycarb. 9.
- (20) Ahern, J.; Kanan, S.; Sara, Z.; Job, T.; Alnaizy, R.; Abu Farha, N.; Patterson, H. Photocatalysis of Fenoxycarb over Silver-Modified Zeolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22* (5), 3186–3192. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2621-5>.
- (21) Le Cunff, J.; Tomašić, V.; Wittine, O. Photocatalytic Degradation of the Herbicide Terbutylazine: Preparation, Characterization and Photoactivity of the Immobilized Thin Layer of TiO<sub>2</sub>/Chitosan. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2015**, *309*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.04.021>.
- (22) Álvarez, P. M.; Quiñones, D. H.; Terrones, I.; Rey, A.; Beltrán, F. J. Insights into the Removal of Terbutylazine from Aqueous Solution by Several Treatment Methods. *Water Res.* **2016**, *98*, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.026>.
- (23) Sanlaville, Y.; Guittonneau, S.; Mansour, M.; Feicht, E. A.; Meallier, P.; Kettrup, A. Photosensitized Degradation of Terbutylazine in Water. *Chemosphere* **1996**, *33* (2), 353–362. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(96\)00176-2](https://doi.org/10.1016/0045-6535(96)00176-2).
- (24) González-Gaya, B.; Lopez-Herguedas, N.; Bilbao, D.; Mijangos, L.; Iker, A. M.; Etxebarria, N.; Irazola, M.; Prieto, A.; Olivares, M.; Zuloaga, O. Suspect and Non-Target Screening: The Last Frontier in Environmental Analysis. *Anal. Methods* **2021**, *13* (16), 1876–1904. <https://doi.org/10.1039/D1AY00111F>.
- (25) Agarwal, S.; Tyagi, I.; Gupta, V. K.; Dehghani, M. H.; Bagheri, A.; Yetilmesoy, K.; Amrane, A.; Heibati, B.; Rodríguez-Couto, S. Degradation of Azinphos-Methyl and Chlorpyrifos from Aqueous Solutions by Ultrasound Treatment. *J. Mol. Liq.* **2016**, *221*, 1237–1242. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.04.076>.
- (26) Pirsahab, M.; Moradi, N. Sonochemical Degradation of Pesticides in Aqueous Solution: Investigation on the Influence of Operating Parameters and Degradation Pathway – a Systematic Review. *RSC Adv.* **2020**, *10* (13), 7396–7423. <https://doi.org/10.1039/C9RA11025A>.
- (27) Vaya, D.; Surolia, P. K. Semiconductor Based Photocatalytic Degradation of Pesticides: An Overview. *Environ. Technol. Innov.* **2020**, *20*, 101128. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101128>.

# Annexes

## Annexe 1 : Récapitulatif des différentes étapes du projet TAPIOCA



## Annexe 2 : Tableau des caractères physico-chimiques des substances phytosanitaires

Famille	Composé	analysable en LCMS	CRITERES							Toxicité	Autorisation en cours	Utilisation en vigne et retrouvé sur le site SAAM	Conclusions
			solubilité eau (mg/L)	Koc (L/kg)	log Kow	Solubilité	DT50 (j) hydrolyse eau	DT50 (j) photolyse eau	Dégradable mais pas trop				
Fongicide	Tebuconazole	OUI											coche toutes les cases + bien étudié par plusieurs équipes
Insecticide	Fenoxycarb	OUI	7.9	4800	4.07	OK	stable	16	OK	Forte pour les insectes		OUI ?	toxicité OK, déjà étudié par Ecotox, sensibilité ok en LC/MS
Insecticide	Chlorpyrifos-methyl	OUI	2,74	4645	4	OK	21	1,7	OK	Forte pour les insectes	Interdit depuis le 31/01/2020	OUI	bon candidat, sauf DT50 hydrolyse
Insecticide	Imidaclopride	OUI	610	255	0,57	OK	stable	0,2	OK ?	Forte pour les insectes	interdit PPP depuis 09/2018 sauf biocide	NON	candidat ok sauf photolyse
Insecticide	Cypermethrin	NON	0,009	307558	5,55	Trop faible	stable	7,8	OK				Refusé - difficultés d'analyse en LC/MS
Insecticide	autres néonicotinoïdes												à étudier si besoin en remplacement du fenoxycarb
Herbicide	Terbutylazine	OUI	6,6	151-318	3,4	OK	stable	stable	OK	Forte pour les algues	Ré-autorisé pour le maïs depuis 2017	NON	bon candidat, toxique - quelques TP bien connus et aspect "politique" intéressant

### Annexe 3 : Description des moyens de dégradation

Il existe deux grands moyens de dégradations de produits phytosanitaires dans l'environnement : biotique et abiotique.

Une dégradation biotique met en jeu l'action d'organismes vivants alors qu'un processus abiotique résulte de paramètres physico-chimiques pouvant dégrader le composé. Dans le milieu naturel, la plupart des dégradations de pesticides sont issues de processus biotiques seuls ou associés à des facteurs abiotiques.

Dans le cadre du stage, la dégradation des 3 produits phytosanitaires se fait en conditions contrôlées de laboratoire en s'affranchissant des processus biotiques existants dans l'environnement. Une des contraintes majeures vient du fait que les solutions vieilles de produits de transformations formées doivent être dans l'eau puisqu'elles seront utilisées ensuite en aquarium pour l'étude toxicologique sur divers organismes vivants macro et microscopiques. Ainsi, les procédés nécessitant des conditions assez dures notamment via l'ajout d'oxydant fort, d'acides ou de bases n'ont pas été retenus et ne seront donc pas détaillés dans cette partie.

Les processus de dégradations utilisés sont différents pour chacun des composés puisqu'ils dépendent essentiellement de leur propriété physico-chimique.

#### 1) La sonochimie

Parmi les moyens de dégradations actuellement utilisés, la sonochimie est une technologie prometteuse pour l'élimination de pesticides dans les milieux aqueux. Cette technique a déjà été appliquée pour la dégradation de nombreux composés organiques. <sup>25</sup>

C'est un domaine s'intéressant aux effets des ondes ultrasonores sur les réactions chimiques. Dans un milieu liquide, les ondes ultrasoniques ont une interaction indirecte avec les composés à dégrader via un phénomène de cavitation, c'est-à-dire la formation, croissance et destruction d'une bulle transitoire. <sup>26</sup>

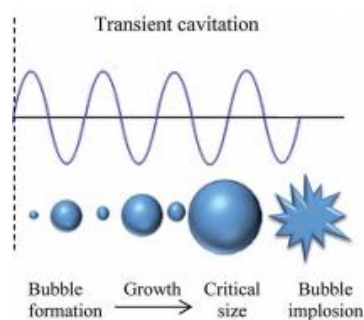
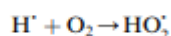
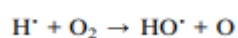
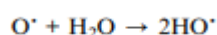
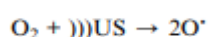
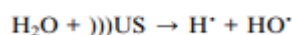


Figure A1 : Schéma simplifié de la formation jusqu'à l'explosion de la bulle transitoire



Dans la majorité des cas, deux mécanismes sont responsables de la dégradation des pesticides par ultrasons en fonction de leur propriétés chimiques. Pour les composés les plus hydrophobes et volatils, la dégradation a lieu à l'intérieur des bulles de cavitation par pyrolyse. Le deuxième mécanisme repose sur la formation de radicaux hydroxyles au sein de la bulle. En effet, les molécules d'eau et de dioxygène dissous subissent des dissociations thermiques pour former les radicaux selon le mécanisme suivant :



C'est alors dans la solution liquide au contact de la bulle que les réactions d'oxydation ou d'hydroxylation ont lieu via l'action des radicaux formés sur les composés d'intérêts.

Il n'existe actuellement pas de documentation dans la bibliographie pour les 3 composés d'intérêts. Mais cette méthode étant simple et documentée pour d'autres phytosanitaires, elle sera tout de même testée pour chacun d'entre eux.

## 2) La photocatalyse

La photocatalyse est un type particulier de catalyse hétérogène dont le principe repose sur l'activation d'un semi-conducteur, jouant le rôle de catalyseur, placé en suspension dans le milieu réactionnel.

Le catalyseur le plus souvent utilisé est le dioxyde de titane et c'est celui qui sera utilisé dans le cadre du stage. Le TiO<sub>2</sub> est un semi-conducteur possédant une structure électronique à bande interdite. Lorsqu'il est soumis à un rayonnement de photons d'énergie supérieure ou égale à celle de sa bande interdite, un électron peut passer de sa bande de valence (BV) à une orbitale vacante de la bande de conduction (BC) selon le schéma ci-dessous.<sup>27</sup>

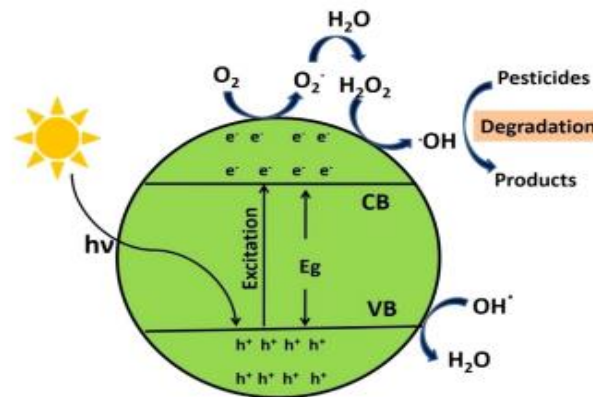


Figure A2 : Schéma simplifié du processus réactionnel en photocatalyse

Il y a alors formation d'un trou positif au niveau de la BV et libération d'un électron à la BC. Ainsi, les deux charges créées peuvent interagir avec les composés respectivement pour une photo-oxydation ou photo-réduction. La filtration du solide  $TiO_2$  avant analyse est réalisable par la simple utilisation de filtre  $45\mu m$ . Ces réactions sont donc intéressantes dans le cadre de la dégradation de produits phytosanitaires.

Enfin, la photocatalyse est un moyen de dégradation efficace et dont l'application est documentée pour 2 des composés d'intérêts : le tébuconazole et la terbuthylazine.<sup>17 18</sup> Cette technique sera également testée sur le fenoxycarbe.

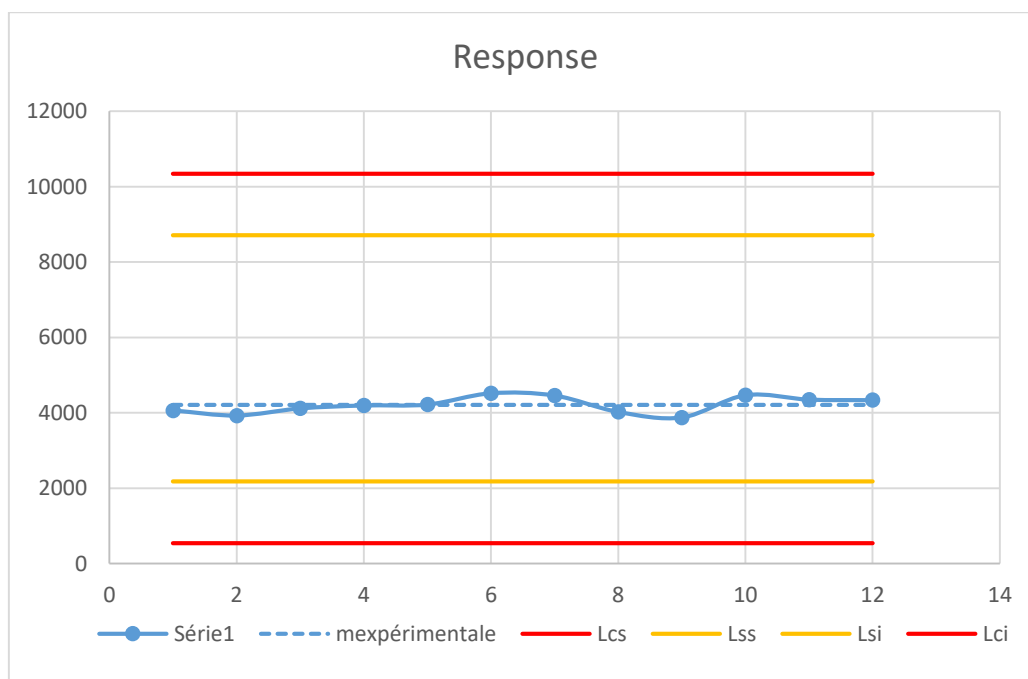
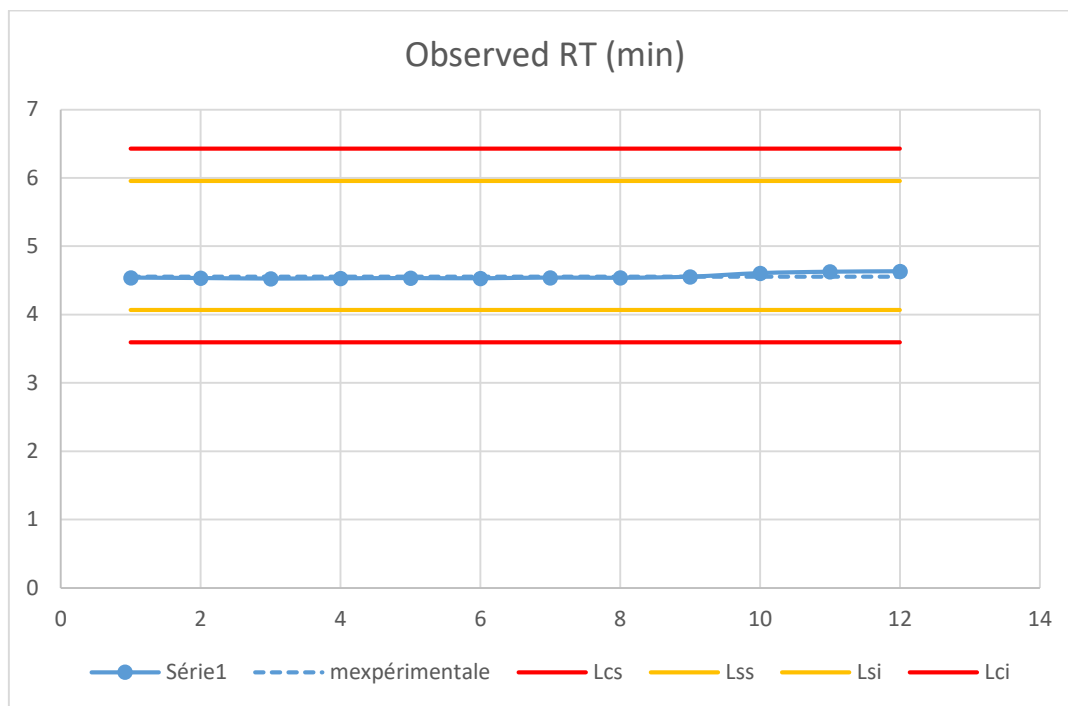
Annexe 4 : Appareil UHPLC Acquity H-Class / HRMS XEVO G2-S QToF



Annexe 5 : Tableau des composés du QCmix

	M+H	RT (min)	Familles
<b>Metformin</b>	130,108722	0,55	Pharmaceutique
<b>Atenolol</b>	267,170319	4,57	Pharmaceutique
<b>Tiapride</b>	329,152955	5,09	Pharmaceutique
<b>Netilmicin</b>	476,307875	5,80	Pharmaceutique
<b>Celiprolol</b>	380,254383	6,44	Pharmaceutique
<b>Venlafaxine</b>	278,211456	6,72	Pharmaceutique
<b>Erythromycin</b>	734,468518	7,47	Pharmaceutique
<b>Simazine</b>	202,0854	7,78	Pesticide
<b>Telmisartan</b>	515,244153	8,21	Pharmaceutique
<b>Cetirizine</b>	389,162647	8,26	Pharmaceutique
<b>Roxithromycin</b>	837,531846	8,35	Pharmaceutique
<b>Bezafibrate</b>	362,115362	9,64	Pharmaceutique
<b>Azoxystrobin</b>	404,124097	10,60	Pesticide
<b>Tebuconazole</b>	308,152417	10,76	Pesticide
<b>Ritonavir</b>	721,320037	10,96	Pharmaceutique
<b>Montelukast</b>	586,217719	13,44	Pharmaceutique
<b>Diuron d6</b>	239,06196	9,35	Pesticide (deutéié)

Annexe 6 : Exemple de carte de contrôle pour l'Atenolol (Avril 2021)

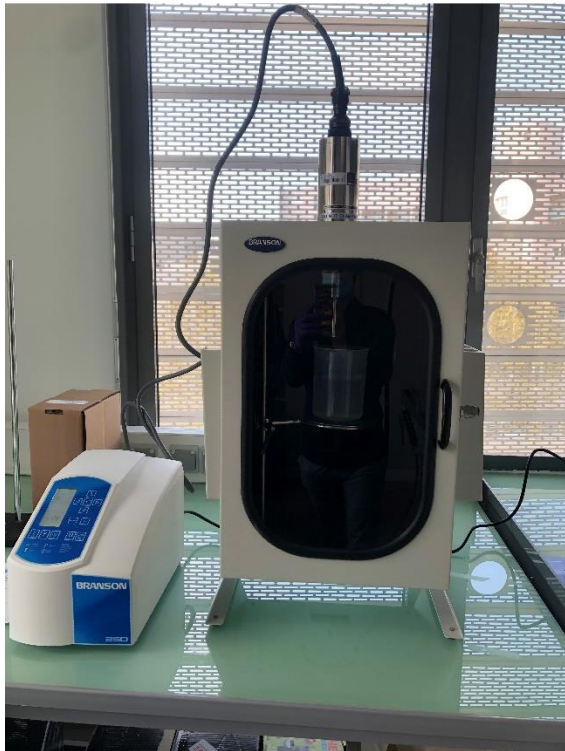


LSI/LSS : Limite inférieure de surveillance/Limite supérieure de surveillance (+/- 2σ)

LCI/LCS : Limite inférieure critique/Limite supérieure critique (+/- 3σ)

mexp : Moyenne expérimentale de la série

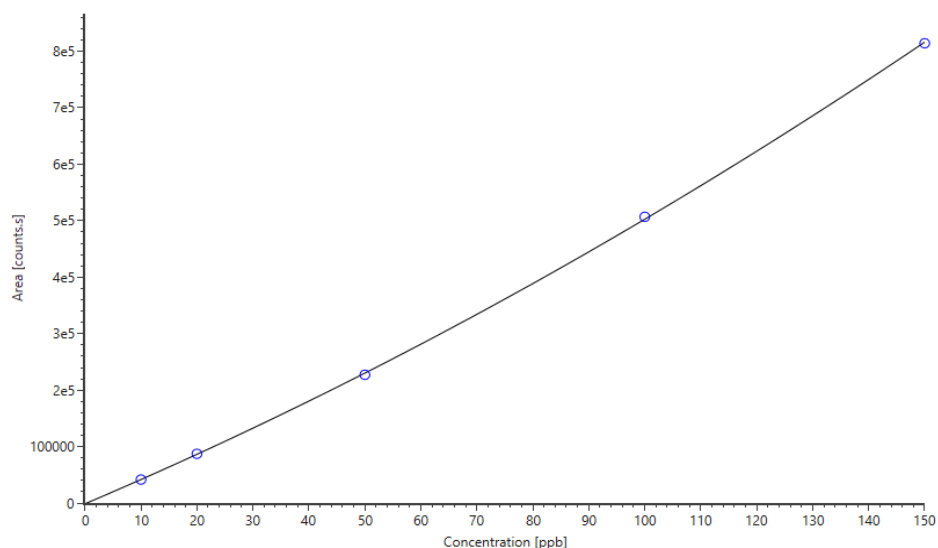
Annexe 7 : Photographies de la sonde à ultrasons (*Branson Sonifier Sound*, à gauche) et de l'enceinte à UV (*Suntest 765*, à droite) utilisées dans le cadre du stage



### Annexe 8 : Courbe d'étalonnage du tébuconazole

Calibration component: Tebuconazole  
 Equation:  $Y = 8.2 \cdot X^2 + 4.22e3 \cdot X - 1.1e3$   
 Weighting: 1/X

% RSD (%): 1.885  
 R<sup>2</sup>: 0.999924

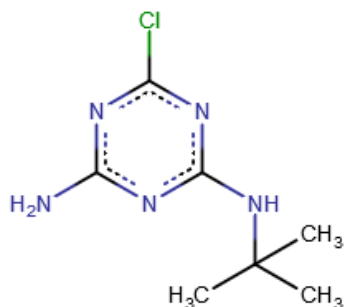


### Annexe 9 : Caractéristiques des colonnes pour la chromatographie bidimensionnelle

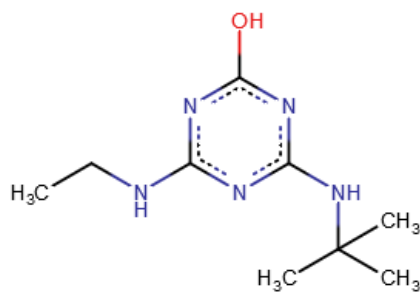
Première dimension : Discovery ZrCarbon (SUPELCO) 50mm*2.1mm 3µm. Phase en zircone recouverte de PGC	
Volume injecté	140 µL
Débit	75 µL/min
Température	45°C
Temps d'analyse	70 min

Deuxième dimension : Acquity CSH C18 (Waters) : 30 x 2.1 mm, 1.7µm	
Volume injecté	34 µL
Débit	2000 µL/min
Température	80°C
Temps d'analyse	0,46 min

Annexe 10 : Structure des TPs de la terbuthylazine présent au laboratoire

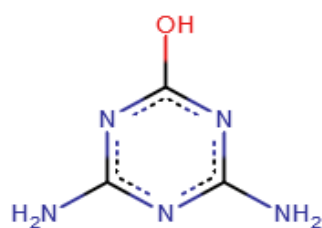


Désethyl-TBT

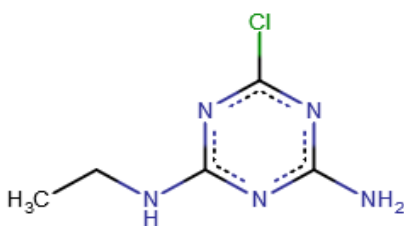


2-hydroxy TBT

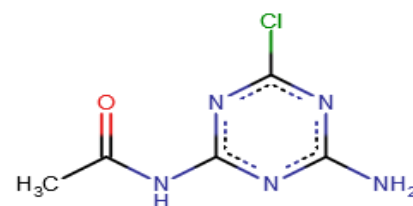
Annexe 11 : Structure des TPs de la terbuthylazine



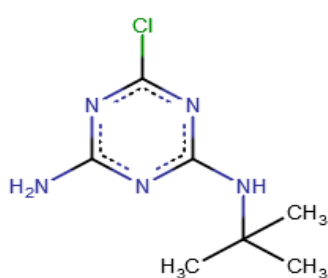
TP 1



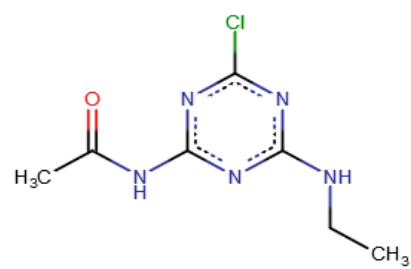
TP 2



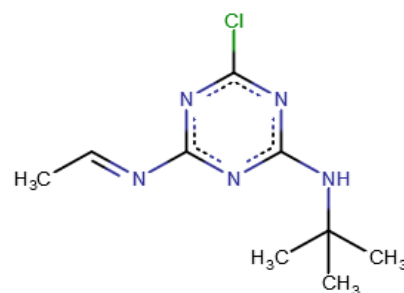
TP 3



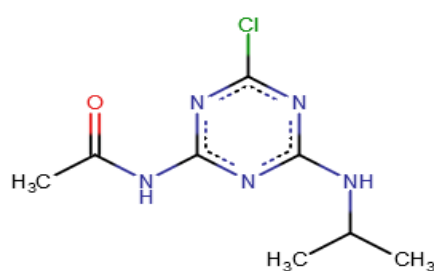
TP 4



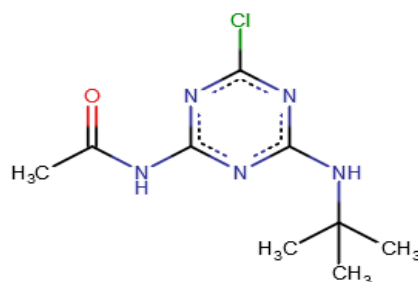
TP 5



TP 6



TP 7



TP 8