

## Faculté de Pharmacie

Année 2023

Thèse N°

### Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 22 février 2023

Par

Emma SANNA

### **Extraction QuEChERS des polychlorobiphényles dans la viande de porc et analyse par GC-MS dans le cadre du projet SENTINEL**

Thèse dirigée par le Professeur Franck Saint-Marcoux

Examineurs :

Président : M. Philippe Cardot, Professeur des Universités, Limoges

Jury : M. Antoine Dupuis, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Poitiers

Jury : Mme. Sylvie Chevolleau, Docteur et Ingénieur de recherche, INRAE

Jury : M. Franck Saint-Marcoux, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,  
Limoges





## Faculté de Pharmacie

Année 2023

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 22 février 2023

Par Emma SANNA

**Extraction QuEChERS des polychlorobiphényles dans la viande de porc et analyse par GC-MS dans le cadre du projet SENTINEL**

Thèse dirigée par le Professeur Franck Saint-Marcoux

Examineurs :

Président : M. Philippe Cardot, Professeur des Universités, Limoges

Jury : M. Antoine Dupuis, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Poitiers

Jury : Mme. Sylvie Chevolleau, Docteur et Ingénieur de recherche, INRAE

Jury : M. Franck Saint-Marcoux, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Limoges



# Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

---

Le 1<sup>er</sup> septembre 2022

## Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

## Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

## Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas

## Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

## Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. CARDOT Philippe	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie
M. TROILLAS Patrick	Biophysique et mathématiques
Mme VIANA Marylène	Pharmacie galénique

#### Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier (*)	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme. CHAUZEIX Jasmine	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. JOST Jérémy	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

#### Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

M. BASLY Jean-Philippe (*)	Chimie analytique et bromatologie
Mme BEAUBRUN-GIRY Karine	Pharmacie galénique
Mme BÉGAUD Gaëlle	Chimie analytique et bromatologie
M. BILLET Fabrice	Physiologie
Mme BONAUD Amélie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. CALLISTE Claude	Biophysique et mathématiques
M. CHEMIN Guillaume	Biochimie et biologie moléculaire
Mme CLÉDAT Dominique	Chimie analytique et bromatologie
M. COMBY Francis	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
Mme DELEBASSÉE Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme DEMIOT Claire-Elise (*)	Pharmacologie
M. FABRE Gabin	Biophysique et mathématiques
M. LABROUSSE Pascal (*)	Botanique et cryptogamie
Mme LAVERDET Betty	Pharmacie galénique
M. LAWSON Roland	Pharmacologie
M. LÉGER David	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MARRE-FOURNIER Françoise	Biochimie et biologie moléculaire
M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
Mme POUGET Christelle (*)	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(\*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

#### Assistant Hospitalo-Universitaire

Mme MARCELLAUD Elodie Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

#### Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

M. DELMON Cédric Pharmacognosie, botanique et mycologie

Mme KENE MALAHA Angéladine Épidémiologie, statistique, santé publique

#### Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew Chargé de cours

Mme VERCELLIN Karen

Professeur certifié

## Remerciements

---

Tout d'abord **aux membres du jury**,

**M. Franck Saint-Marcoux**, je tiens à vous remercier de m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse, de m'avoir fait confiance et de faire aujourd'hui partie de mon jury. Vous aurez marqué mes années d'étudiante en Pharmacie, tant par des cours des toxicologie passionnants que par une envie de transmettre les fondements de la recherche. Je vous remercie de m'avoir fait confiance lors de ce premier stage d'initiation à la recherche sur les pyréthriinoïdes dans l'urine des nouveaux-nés. Vous avez su me donner confiance et l'envie de comprendre et de chercher. Je vous remercie pour toutes les opportunités que vous avez pu m'offrir.

**M. Philippe Cardot**, pour me faire l'honneur de présider le jury de ma soutenance de thèse. Professeur de chimie analytique et de bromatologie durant mes études de Pharmacie, je vous remercie pour la transmission de votre savoir pour les sciences analytiques et l'environnement.

**Mme. Sylvie Chevolleau**, je vous remercie de me faire l'honneur d'être membre de mon jury pour cette thèse d'exercice. Sans votre travail et votre confiance, cette thèse n'aurait pas lieu d'être. Je vous remercie de m'avoir fait confiance pour ce projet, pour ces moments passés durant mon stage, pour ces longues discussions et ces échanges scientifiques. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et ton envie de transmettre.

**M. Antoine Dupuis**, pour l'honneur que vous me faites de faire partie de mon jury de thèse. Soyez assuré de ma plus profonde reconnaissance.

**Au personnel enseignant**,

Je suis très reconnaissante de l'ensemble du personnel enseignant qui m'a transmis leurs connaissances et m'a permis d'acquérir des compétences qui me permettent aujourd'hui de soutenir cette thèse d'exercice de Pharmacie et d'exercer ce beau métier de Pharmacien.

Je tiens aussi à remercier tout le corps d'enseignants du master 2 Sciences Analytiques de l'Université de Strasbourg pour tous les enseignements qui m'ont permis de développer mes compétences en sciences analytiques.

A l'équipe **Métatoul-Axiom**,

**Sylvie Chevolleau**, merci de m'avoir fait confiance pour développement de méthode et encore merci de me faire l'honneur d'être jury à ma soutenance de thèse.

Merci à **Alyssa Bouville**, **Elodie Mirmont**, **Justine Ferey** et **Kevin Wagner** que j'ai pu rencontrer durant ce stage de master 2. Je suis très reconnaissante d'avoir pu travailler avec vous et d'avoir rencontré des scientifiques inspirants et sincères. Et un grand merci à Alyssa pour l'apprentissage de coupe de colonne de chromatographie gazeuse.

Un stage de master 2 ensoleillé par une « co-stagiaire » rayonnante, merci à toi **Noéline**. Une belle rencontre sudiste qui n'oublie pas ses origines alsaciennes, merci pour ton soutien, pour ces moments

passés ensemble. Je suis très heureuse de t'avoir rencontré et j'espère te revoir très vite pour la fête de la fraise.

**À mes ami.e.s,**

Je suis très reconnaissante des rencontres que j'ai pu faire durant mon master 2 à Strasbourg. **Fayçal, Xin, Maxime, Maëlys, Augustin, Louis**, de très belles rencontres sur les bancs de la faculté, merci pour l'accueil dans cette belle ville.

**Six années à la faculté de Pharmacie de Limoges**, une page qui se tourne, tellement de gens à citer et à remercier.

Une pensée me va en premier vers **Amélie**, des connaissances au lycée et des amies soudées à la fin de nos études. Je suis tellement reconnaissante de t'avoir à mes côtés aujourd'hui et pour encore de longues années. Sans toi, ces études auraient eu moins de saveur et je n'aurais sans doute jamais été présidente d'Humani'lim. Merci pour ces longues heures de débats, de réflexions éthiques et de soirées. Médecine à l'extérieur mais Pharmacienne à l'intérieur.

**Patrick**, un acolyte en Pharmacie et surtout en associatif. Nos premiers pas en assemblée générale à l'ANEPF, je pense que nous nous en souviendrons longtemps. Merci pour ta confiance pendant ma présidence à Humani'lim, tu ne t'en rends peut-être pas compte mais tu as été d'un grand soutien.

Je ne pouvais pas faire cette thèse sans évoquer les **Marion(s)**, deux pharmaciennes accomplies et merveilleuses. **Marion Castro**, une belle rencontre associative, ma présidente à Humani'lim, ma marraine, mon amie, je suis très fière de tes accomplissements. **Marion Boucheteil**, merci pour ton amitié sincère et véritable avec qui je n'ai que de bons souvenirs pendant les cours et après, engagée à Humani'lim, mon seul regret sera qu'on ne sera pas parti ensemble pour cette mission de solidarité internationale. Heureuse de vous compter parmi mes amies, vous avez illuminé mes études de Pharmacie, les galas et sans oublier les rattrapages.

**Louis**, on s'était dit qu'on boirait le champagne ensemble pour nos thèses et ça nous semblait si loin et pourtant. Merci pour ces belles années étudiantes. Je suis très reconnaissante d'avoir vécu ces aventures avec toi.

**Paul**, heureuse de t'avoir rencontré et de toujours partager des discussions jamais assez longues. A très vite, je te souhaite le meilleur.

**Anna**, « je veux bien faire le secrétariat mais que si tu ne trouves personne », je t'avoue que j'ai arrêté de chercher et je ne regrette rien. Merci pour cette belle année associative à Humani'lim passée à tes côtés et pour ton amitié.

Je ne peux pas citer tous les pharmaciens qui m'ont marqué mais j'ai quand même envie de remercier **Amélie SM, Clarisse, Sarah-Laure, Maïna, Florian, Rémy et Flavien**. Merci à vous.

Merci à **Humani'lim** et à tous les anciens et aux futurs membres qui ont fait et qui feront vivre cette magnifique association.

Merci aux différents bureaux de la corpo **ACE2MPL** pour les fêtes inoubliables et l'esprit associatif. Limoges LPBVDF.

Merci à tous mes amis Limougeaux, géographe, professeur, serveur, menuisier, artiste, agriculteur et j'en passe, un groupe hétérogène et tellement soudé. Merci pour votre soutien.

**Claire** et **Héloïse**, mes premières rencontres de vie étudiante. Je vous aime fort, merci pour tout.

Merci à toi **Charlotte**, pour ton soutien et ces longues discussions sur notre avenir.

**À ma famille,**

À mes parents, **Sadia** et **Pierre**, je vous remercie pour votre soutien impassible et votre patience. Merci de m'avoir permis de faire ces longues études, sans votre aide le chemin aurait été plus épineux pour atteindre ce jour. Merci Maman de t'intéresser à tout et de discuter de mes cours de pharmacie avec passion et merci à vous deux pour toutes ces relectures de mémoires et maintenant de ma thèse.

À ma sœur **Saphia** et à mon frère **Thomas**, merci pour votre bienveillance et votre gentillesse. Je me sens chanceuse d'être si proche de vous, merci pour votre soutien.

A ma belle-famille, **Françoise, Stéphane, Éponine, Baptiste et Marta**, ce premier confinement nous aura rapproché, merci pour vos encouragements.

**À toi,**

Merci pour ton soutien sans faille, pour tes encouragements et ta confiance. Un grand merci pour ta patience pendant cette période de transition vers le monde du travail et la rédaction de cette thèse. Je sais que cette transition n'est pas évidente pour toi non plus et je suis là pour te soutenir. Merci pour tous tes petits plats réconfortants, merci d'avoir assumé la charge de la maison pendant cette période de rédaction. Je ne te ferai plus attendre pour manger en tout cas plus pour rédiger la thèse.

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Liste des abréviations

---

ACN : Acétonitrile

ACTA : Association de coordination technique agricole

ACTIA : Association de coordination technique pour l'industrie agroalimentaire

ANIA : Association de coordination technique alimentaires

ANR : Agence Nationale de la Recherche

Anses : Agence nationale de sécurité de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARS : Agences régionales de santé

ASE : extraction accélérée par solvant

AXIOM : Analyse de Xénobiotiques, IdentificatiOn et Métabolisme

CAS : Chemical Abstracts Service

CGAD : Confédération générale de l'alimentation en détail

CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> Na<sup>+</sup> : Acétate de sodium

CNRS : Centre nationale de la recherche scientifique

CV : Coefficient de variation

DGAL : Direction générale de l'alimentation

DGCCRF : Direction générale de la concurrence, de la consommation et des fraudes

DGS : Direction générale de la santé

DL : dioxine like

DRAAF : Direction régionale de l'alimentation, de l'agriculture et des forêts

dSPE : extraction sur phase solide dispersive

EFSA : Autorité européenne de la sécurité des aliments

EMB : Extrait Matrice Blanche

ESV : Plateforme de santé végétale

FCD : Fédération du Commerce et de la Distribution

GC-MS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GC-MSMS : chromatographie gazeuse couplée au spectromètre de masse en tandem

GPC : chromatographie à exclusion stérique

HLB : balance hydrophile lipophile

HPLC-HRMS : chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse haute résolution

IFIP : institut du porc

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

InVS : Institut de veille sanitaire  
IUPAC : International union of pure and applied chemistry  
LC : chromatographie liquide  
LLE : Extraction liquide-liquide  
LOD : Limite de Détection  
LOQ : Limite de Quantification  
MAE : extraction par micro-onde assistée  
MgSO<sub>4</sub> : sulfate de magnésium anhydre  
nDL : non dioxine like  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
ONIRIS : École nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation  
PCB : Polychlorobiphényles  
POP : polluants organiques persistants  
PSA : amines primaires et secondaire  
QC : Contrôle qualité  
QuEChERS : Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe  
RASFF : Rapid Alert System for Food and Feed  
SCA : Surveillance de la Chaîne Alimentaire  
SF : solution fille  
SFE : extraction par fluide supercritique  
SIM : Selected Ion Monitoring  
SPE : extraction sur phase solide  
SPME : microextraction sur phase solide  
Sub-TM : inférieur à la teneur maximale  
TIC : Total Ion Chromatogramme  
TIC : Total Ion Current  
TOF : Time of Flight  
UE : Union Européenne  
Z-sep : Oxyde de zirconium

# Table des matières

---

Introduction .....	17
I. SENTINEL : un projet de surveillance renforcée de la sécurité chimique des viandes .....	20
I.1. Gestion de la sécurité alimentaire dans l'union européenne .....	20
I.2. Renforcement de la veille sanitaire sur l'alimentation.....	22
I.3. Généralités sur le projet SENTINEL .....	25
II. Les polychlorobiphényles : une famille de polluants organiques persistants .....	27
II.1. Généralités sur les polychlorobiphényles .....	27
II.2. Propriétés physico-chimiques des polychlorobiphényles .....	29
II.3. Utilisation industrielle des mélanges de polychlorobiphényles .....	30
II.4. Présence dans l'environnement et risques toxicologiques .....	31
II.5. Réglementation française .....	33
II.6. Techniques de dosage des PCBs .....	34
II.6.1. Préparation des échantillons : extraction et purification .....	34
II.6.2. Techniques analytiques de détection et dosage des PCBs.....	35
II.7. État de l'art sur la technique d'extraction QuEChERS des PCBs dans l'alimentation .....	36
III. Matériels et méthodes.....	39
III.1. Préparation des échantillons .....	39
III.2. Analyse des PCBs par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse .....	39
III.3. Analyse des PCBs en solvants.....	40
III.3.1. Détermination de la limite de détection et de quantification en solvant .....	40
III.3.2. Mise en place de la gamme d'étalonnage.....	41
III.4. Méthodes d'extraction et de purifications.....	41
IV. Résultats et discussions .....	45
IV.1. Conditions d'analyse en GC-MS.....	45
IV.2. Analyse du mélange des 7 congénères en solvant .....	45
IV.2.1. Détermination de la limite de détection et de la limite de quantification .....	45
IV.2.2. Performance de la gamme d'étalonnage.....	46
IV.3. Extractions et optimisations .....	47
IV.4. Bilan de l'optimisation et perspectives.....	54
Discussion - Conclusion.....	56
Références bibliographiques .....	58
Annexes .....	62
Serment De Galien .....	70

## Table des illustrations

---

Figure 1 Contrôles privés et publics dans le domaine de la sécurité alimentaire (5) .....	18
Figure 2 Présentation de l'analyse des risques au niveau européen (5) .....	21
Figure 3 Organigramme des membres communs aux trois plateformes (SCA, ESV, ESA). Figure du site plateforme-sca.fr .....	24
Figure 4 Logo du projet SENTINEL (15) .....	25
Figure 5 Structure de la famille des polychlorobiphényles (PCBs). Fiche toxicologique INRS (18).....	27
Figure 6 Principales étapes de synthèses des PCBs (23) .....	29
Figure 7 Utilisation industrielle des PCBs (25) .....	31
Figure 8 Figure illustrant l'origine des PCBs dans l'environnement et l'alimentation (26).....	32
Figure 9 Protocole QuEChERS de l'extraction et de la purification des PCBs dans la viande (Figure réalisée sur biorender.com).....	42
Figure 10 Chromatogramme de la séparation des PCBs dans l'hexane à 500 pg/μL .....	45
Figure 11 Chromatogrammes d'une analyse en mode SIM du mélange de PCBs à 0,5 pg/μL .....	46
Figure 12 Comparaison des chromatogrammes TIC de l'essai 1.....	48
Figure 13 Comparaison du rendement d'extraction pour les essais 1, 3 et 4 .....	50
Figure 14 Comparaison de l'effet matrice pour les essais 1, 3 et 4.....	50
Figure 15 Chromatogramme SIM des PCBs 28, 52, 138 et 153 pour les essais 5,6 et 7 dopé à 25 pg/μL .....	51
Figure 16 Rendement d'extraction avec un dopage de 25, 50 et 100 pg/μL pour chaque PCB.....	52
Figure 17 Rendement d'extraction avec un dopage de 25, 50 et 100 pg/μL pour chaque PCB.....	52

## Table des tableaux

---

Tableau 1	Tableau de l'organisation des contrôles et de la veille sanitaire alimentaire (9).....	22
Tableau 2	Identifications des congénères étudiés (Pubchem).....	28
Tableau 3	Propriétés physico chimiques des PCBs nDL (24).....	29
Tableau 4	Résumé des méthodes d'extraction et d'analyses des PCBs et de molécules avec une structure similaire.....	38
Tableau 5	Conditions de GC-MS pour la détection des PCBs marqués <sup>13</sup> C (Standard Interne) et natifs	40
Tableau 6	Quantités de réactifs utilisés pour chaque étape du protocole initial.....	41
Tableau 7	Récapitulatif des extractions effectuées avec la matrice du projet SENTINEL (sous-noix de Jambon lyophilisée et broyée).....	43
Tableau 8	Résultats de limite de détection et de quantification pour chaque PCB.....	46
Tableau 9	Répétabilité et justesse des solutions de contrôles à 2.5, 25 et 250 pg/μL dans l'hexane....	47
Tableau 10	Répétabilité de l'analyse des échantillons, des QCs et des EMB dopés de l'essai 1.....	47
Tableau 11	Répétabilité de l'analyse des échantillons, des QCs et des EMB dopés de l'essai 3.....	49
Tableau 12	Répétabilité de l'analyse des échantillons, des QCs et des EMB dopés de l'essai 4.....	49
Tableau 13	Préparation des solutions pour la détermination de la LOD et la LOQ en solution.....	67
Tableau 14	Préparation des solutions permettant de préparer les gammes d'étalonnage.....	67
Tableau 15	Préparation de la gamme d'étalonnage avec standard interne.....	67

## Introduction

---

L'accroissement de la population mondiale, l'intensification et l'industrialisation de l'agriculture mondiale entraîne des défis importants de santé publique. Ajoutée à la vitesse actuelle de distribution des produits, des maladies d'origine alimentaire sont retrouvées dans le monde entier d'après l'OMS, provoquées par des bactéries, des virus, des parasites, des molécules chimiques. L'annexe 1 présente les contaminants pouvant être trouvés dans la chaîne alimentaire. Cette évolution a fait émerger une prise de conscience scientifique, politique et des consommateurs en Europe et dans le monde sur les risques sanitaires dans l'alimentation ainsi le projet SENTINEL s'y inscrit. De plus les consommateurs ont ressenti ces dernières années une perte de sérénité et de confiance avec leurs alimentations, un constat décrit dans l'étude intitulée « Inquiétudes » (1). Des chercheurs ont fait des revues regroupant un nombre important d'études sur la sécurité sanitaire des aliments contaminés chimiquement dans les années 2000 (2-4). C'est à la contamination par produit chimiques d'origine environnementale que les chercheurs du projet SENTINEL vont s'intéresser et plus précisément les polluants organiques persistants qui s'accumulent dans l'environnement et dans le corps humain par le biais de la chaîne alimentaire animale principalement. La famille des polychlorobiphényles détectée dans la viande est choisie comme modèle d'étude. Ces molécules fortement toxiques détectées à des niveaux faibles dans les denrées alimentaires entraînent une accumulation dans le temps et affectent la santé humaine et animale sur le long terme altérant la reproduction, le développement, le système immunitaire et pouvant provoquer des cancers. C'est cette détection infra-réglementaire qui intéresse les chercheurs du projet SENTINEL, un projet qui s'imbrique dans les objectifs de l'état français. En effet dès 1998, différentes lois ont mis en avant la nécessité d'un renforcement de la veille sanitaire et l'Europe en a fait une de ces priorités en appelant ses états membres à renforcer les contrôles afin d'améliorer la sécurité des consommateurs d'ici 2019. La France a ainsi créé une plateforme de surveillance sanitaire de la chaîne alimentaire (SCA) pour répondre aux objectifs de l'UE et développer une surveillance croisée entre tous les acteurs professionnels dans l'ensemble de la chaîne alimentaire. Atteindre ces objectifs nécessitent des contrôles réguliers et stricts à différentes échelles privés et publics décrites dans la pyramide (figure 1) du rapport 2-2019 de la Cour des comptes européenne (5) : les professionnels du secteur alimentaire, les états membres et l'union européenne.

### Pyramide des contrôles privés et publics dans le domaine de la sécurité alimentaire

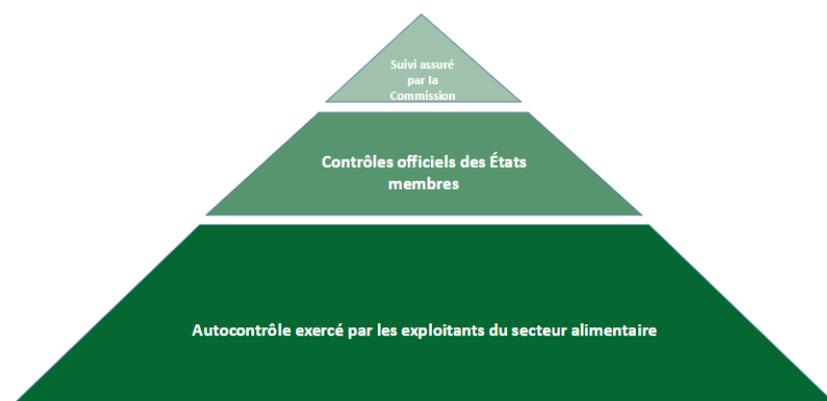


Figure 1 Contrôles privés et publics dans le domaine de la sécurité alimentaire (5)

En réponse aux objectifs du 21<sup>ème</sup> siècle de l'Europe et de la France sur le renforcement de la veille sanitaire alimentaire, le projet de recherche collaboratif SENTINEL a été construit sur 4 ans pour améliorer chaque action des acteurs de la pyramide (Figure1) :

- l'efficacité des inspections réglementaires des autorités sanitaires,
- les auto-contrôles industriels
- faire un suivi infra-réglementaire de molécules chimiques.

Les polychlorobiphényles dans la viande choisie comme modèle d'étude vont permettre de développer des outils de screening haut-débit, efficaces, sensibles et à coûts maîtrisés. Ce projet collaboratif regroupe différents acteurs du secteur agroalimentaire dans le domaine de la viande ainsi que des scientifiques dans différents domaines et différents instituts de recherche afin d'allier des critères sanitaires, économiques, sociaux et réglementaires viables.

Une partie du projet est de développer une technique d'extraction, sensible, efficace et à coûts maîtrisés pour répondre aux objectifs de simplification des auto-contrôles et à l'aspect économique des analyses. En effet, les analyses analytiques à haut débit sont des méthodes coûteuses et différents groupes de travail ont cherché à diminuer ce coût. Un travail sur la simplification de la méthode d'extraction des PCBs dans la viande est un axe de recherche développé à la plateforme analytique Metatoul-Axiom interne au laboratoire TOXALIM de l'Inrae de Toulouse, partenaire du projet, projet porté par le Dr. Sylvie Chevolleau. Six mois de recherche ont été consacrés à ce développement d'extraction par la méthode QuEChERS, acronyme de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged et Safe qui est une méthode très utilisée pour le dosage des molécules chimiques dans de multiples matrices. La détection est faite

par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à simple quadripôle dans un premier temps.

En débutant par développer la gestion de la sécurité sanitaire des aliments au niveau européen puis français ; les tenants et les aboutissants du projet SENTINEL seront présentés dans cette thèse. Un focus sur le choix des polychlorobiphényles comme modèle d'étude sera ensuite proposé avant de vous présenter mon travail effectué durant ces 6 mois de recherche et qui continuent toujours aujourd'hui au sein de l'équipe Metatoul-Axiom.

# **I. SENTINEL : un projet de surveillance renforcée de la sécurité chimique des viandes**

---

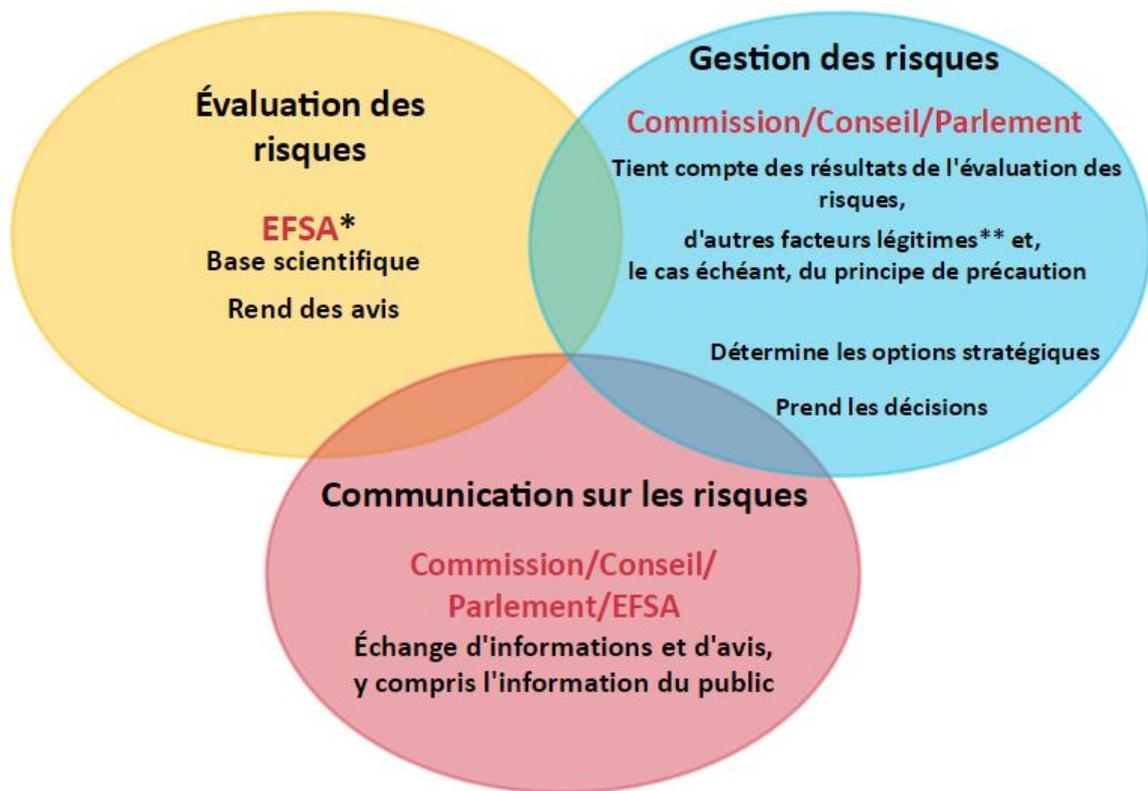
SENTINEL est un projet ANR de renforcement du système actuel de surveillance et de sécurité chimique des aliments en étudiant la présence de polychlorobiphényles dans la viande. Dans un premier temps, la gestion de la sécurité sanitaire de la chaîne alimentaire à l'échelle de l'Europe et de la France sera exposée succinctement puis un focus sera fait sur le projet SENTINEL et l'implication de mon travail de recherche dans ce projet.

## **I.1. Gestion de la sécurité alimentaire dans l'union européenne**

A l'échelle de l'Union Européenne, la sécurité alimentaire couvre 4 grands domaines : l'hygiène alimentaire, la santé animale, la santé des végétaux et les contaminants et résidus (le domaine d'intérêt dans cette étude). La politique de sécurité des denrées alimentaires de l'UE est principalement régie par l'article 168 de la Santé Publique et l'article 169 de la protection des consommateurs. Cette politique européenne vise un niveau élevé de protection de la santé des consommateurs tout en maintenant un marché économique européen. Comme le souligne le slogan « de la ferme à l'assiette » porté par l'UE, un second objectif est d'intégrer cette exigence en termes de sécurité dans l'ensemble de la chaîne d'approvisionnement alimentaire : production, distribution et consommation des aliments. La responsabilité de la mise en œuvre des normes européennes et des contrôles officiels appartient à chaque État membre de l'UE mais aussi aux entreprises et à l'ensemble des acteurs du secteur agro-alimentaire (6). Un rapport spécial de la cour des comptes européenne a constaté et confirme que l'une des grandes priorités de l'UE était la sécurité alimentaire de l'ensemble de la chaîne alimentaire régie afin de garantir un niveau élevé de protection des consommateurs (5). En 2002, le Conseil et le Parlement Européen ont constitué le règlement n° 178/2002 (7) en établissant le socle concernant les principes généraux de la législation alimentaire constituant et renforçant l'autorité européenne de sécurité des denrées alimentaires en instaurant : l'analyse de risques, les principes de précaution, de transparence, d'innocuité, de traçabilité, de retrait-rappel, d'informations au service de contrôles. En créant de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) fournissant une assistance scientifique et technique à la commission européenne et aux États membres de l'UE sur les domaines impactant la sécurité alimentaire. En coopérant aussi avec différents organismes internationaux et nationaux, l'EFSA est chargée de la coordination et de l'identification des risques émergents et de fournir des conseils sur la gestion des risques. Cette autorité contribue à l'élaboration de la législation, des règles et des politiques européennes permettant de protéger les consommateurs contre les risques qui pèsent sur la chaîne alimentaire. La figure 2 présente les acteurs européens mettant en place les principes présentés (5). Ce règlement a permis la création d'un système d'alerte rapide et efficace pour les denrées

alimentaires et les aliments pour animaux (RASFF) permettant de garantir un échange rapide des informations liées à la chaîne alimentaire humaine ou animale au niveau européen. Les États membres de l'UE et la commission de l'EFSA participent à ce système d'alerte. Les informations provenant du système d'alerte sont mises à disposition du grand public.

### Les trois volets de l'analyse des risques au niveau de l'UE



\* L'EMA est chargée d'évaluer les risques au niveau de l'UE dans le domaine des médicaments (notamment ceux à usage vétérinaire).

\*\* Des facteurs sociétaux, économiques, traditionnels, éthiques et environnementaux, ainsi que la faisabilité des contrôles.

Source: Cour des comptes européenne.

Figure 2 Présentation de l'analyse des risques au niveau européen (5)

En 2019, le règlement 2019/1381 du Parlement européen et du conseil a modifié le règlement présenté précédemment (178/2002) en appliquant davantage de transparence envers le public, en renforçant l'indépendance et la solidité des études scientifiques, en renforçant les liens entre la gouvernance et la science et en ajoutant un plan de communication sur les risques sanitaires (8). Ces modifications sont applicables depuis le 27 mars 2021.

## I.2. Renforcement de la veille sanitaire sur l'alimentation

La veille sanitaire implique une maîtrise des risques tout le long de la chaîne alimentaire et le contrôle au niveau national implique différents services administratifs à différentes échelles, centrale, régionale, départementale. Le tableau 1 du rapport d'information n°442 de la commission des finances représente l'organisation en France des contrôles et de la veille sanitaire aux différentes échelle ; une organisation en « mille-feuille » qui est propice à des pertes d'efficacité d'après le rapport (9). Santé Publique France a succédé à l'institut de veille sanitaire (InVS) en poursuivant une veille épidémiologique et l'Anses assure l'expertise scientifique dans le domaine de la production alimentaire.

Tableau 1 Tableau de l'organisation des contrôles et de la veille sanitaire alimentaire (9)

**Schéma général de l'organisation (hors DOM et région parisienne)**

Niveau	Administrations			Agences	
Central	Direction générale de l'alimentation (DGAI) (ministère de l'agriculture)	Direction générale de la concurrence, de la consommation et des fraudes (DGCCRF) (ministère de l'économie)	Direction générale de la santé (DGS) (ministère des affaires sociales)	Institut de veille sanitaire (InVS)	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses)
	<i>Brigade nationale d'enquête vétérinaire et phytosanitaire</i>	<i>Service national des enquêtes</i>			
Régional	Direction régionale de l'alimentation, de l'agriculture et des forêts (DRAAF) (Service régional de l'alimentation)	Direction régionale des entreprises, de la concurrence, de la consommation, du travail et de l'emploi (DIRECCTE) (Pôle C)	Agences régionales de santé (ARS)	NP	NP
			<i>Cellule interrégionale d'épidémiologie en région (CIRE)</i>		
Départemental	Direction départementale (de la cohésion sociale) et de la protection des populations (DD(CS)PP)		Délégations territoriales des ARS	NP	NP

*NP : non pertinent*

Une veille européenne est réalisée quotidiennement par la DGAL et l'ANSES en utilisant un outil intitulé *European Media Monitor* développé par la Commission européenne (9). Un comité éditorial composé de différents experts est ensuite chargé de valider la pertinence des signaux et de publier un bulletin de veille sanitaire. Cependant, la nécessité d'améliorer la veille sanitaire au plan national et européen ainsi que les activités de surveillance des dangers biologiques et chimiques dans les aliments a été souligné au comité interministériel pour la modernisation de l'action publique et rappelé en 2014 d'après le rapport de Barbusiaux et Guillou, (10). Le Parlement Européen a appelé les États membres, d'ici 2019, à renforcer leurs mécanismes de contrôle de sécurité alimentaire. Ainsi durant le salon international de l'agriculture, en mars 2018, un accord visant à renforcer la surveillance sanitaire dans le domaine de la santé des végétaux, des animaux et de la sécurité sanitaire des aliments a été conclu entre le ministre

de l'Agriculture et de l'Alimentation, l'INRAe et l'Anses. Lors de cet événement, il a été encore une fois rappelé la nécessité de renforcer le dispositif national de surveillance et de prévention des risques sanitaires et des moyens humains et financiers ont été affectés à l'INRAe. En réponse à la demande du parlement, le gouvernement français a lancé en juillet 2018 la plateforme de Surveillance de la Chaîne Alimentaire (SCA) dirigée par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) permettant de couvrir l'ensemble des événements sur la sécurité sanitaire des aliments au niveau national, européen et mondial. Une convention a été signée par 14 membres publics et privés pour la création de la plateforme (11):

- les ministères de la Santé, de l'Agriculture et de l'Économie : la DGS, la DGA et la DGCCRF
- des organismes scientifiques nationaux : l'ANSES, Santé Publique France et l'INRAe,
- des instituts techniques : l'association de coordination technique agricole (ACTA) et l'association de coordination technique pour l'industrie agro-alimentaire (ACTIA),
- des organismes professionnelles l'association nationale des industries alimentaires (ANIA), la confédération générale de l'alimentation en détail (CGAD), Coopération agricole de France, la fédération du Commerce et de la Distribution (FCD), Oqualim et des laboratoires d'analyses ADILVA.

La mise en place de la plateforme de surveillance de la chaîne alimentaire a permis aux différents maillons de la chaîne alimentaire de travailler ensemble avec des groupes de travail transversaux (11). La plateforme revendique un travail en transversalité comme source d'innovation avec une démarche intitulé « One Health ». La santé publique, la santé animale et l'environnement étant liés, la plateforme SCA s'est associée à la plateforme de santé animale (ESA) et à la plateforme de santé végétale (ESV) permettant de collaborer et de mutualiser les ressources (figure 3).



Figure 3 Organigramme des membres communs aux trois plateformes (SCA, ESV, ESA). Figure du site plateforme-sca.fr

Pour atteindre les objectifs fixés par la plateforme SCA, il est indispensable que les industriels ainsi que les autorités de sécurité sanitaires aient accès à des méthodes de détection à haut débit, sensibles et rentables permettant de suivre les contaminations aux différentes étapes de la chaîne alimentaire. La détection et le suivi microbiologique (bactéries, virus, champignons, parasites) par les autorités sanitaires et en auto-contrôle par les industries sont possibles avec le progrès de la biologie moléculaire avec des techniques haut débit, rapide, spécifique et sensible (12). La surveillance microbiologique peut aussi être assurée par des techniques analytiques (chromatographie et spectrométrie de masse) qui permettent aussi la détection des contaminants chimiques : molécules persistantes, pesticides, métaux, médicaments. En France, ces méthodes analytiques sont utilisées par la DGAL dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle du dépassement de la teneur maximale autorisée dans un aliment et par l'ANSES pour l'étude de l'exposition alimentaire chronique de la population à des contaminants à des doses inférieures à la limite de teneur maximale (TM). Des avancées ces dernières années sur ces méthodes ont permis d'avoir des méthodes très sensibles pour la détection de teneurs infra-TM (13) qui permettent une surveillance réglementaire plus régulière et des auto-contrôles indispensables pour renforcer la veille sanitaire (14). Mais ces méthodes sont très coûteuses et ont un débit faible.

Le projet SENTINEL s'inscrit dans le projet de renforcement de la sécurité chimique des aliments avec comme objectif le développement d'outils de screening haut débit sensibles, mais avec des coûts maîtrisés et un rendement plus intéressant. La finalité de ce projet est d'augmenter l'efficacité des contrôles des autorités sanitaires, de faciliter et de renforcer les auto-contrôles industriels et de permettre ainsi un suivi préventif des PCB à des niveaux infra-réglementaires.

### I.3. Généralités sur le projet SENTINEL

Ce projet de recherche courant de 2020 à 2024 implique 11 partenaires de 4 instituts de recherche (INRAE, CNRS, INRIA, ONIRIS), 1 université (Perpignan) et 1 institut technique (IFIP : institut du porc). La figure 4 représente le logo du projet SENTINEL, un « Outils de surveillance de la sécurité chimique des aliments ». La filière viande est choisie pour étudier la présence de polychlorobiphényles (PCB) dans la viande. Cette famille de molécules sera présentée dans la suite de ce travail.



Figure 4 Logo du projet SENTINEL (14)

Coordonné par Monsieur Erwan Engel (15), l'objectif principal est de renforcer la veille sanitaire en termes de sécurité chimique des aliments avec 3 angles de recherche complémentaires proposés, décrits et publiés par l'ANR :

- Le *sample pooling* permettant de réduire le coût et la lourdeur des méthodes analytiques en analysant non plus un échantillon, mais un ensemble d'échantillon en spectrométrie de masse à haute résolution et sensibilité pour des analyses à des teneurs sub-TM.
- Le développement de biosenseurs, une technologie de terrain permettant de doser les PCBs extraient directement de la viande
- La détection des marqueurs d'exposition aux PCBs qui seraient plus facilement détectables et permettrait d'étudier une exposition antérieure à cette famille de molécule.

Un objectif primordial dans ce projet est de maintenir une cohérence avec l'évolution actuelle de la filière viande. Une équipe partenaire du projet crée des scénarios d'évolution possibles en faisant des interviews d'acteurs de la filière viande. Les résultats de recherche ont été et seront étudiés au fur à mesure du projet avec un aspect économique, réglementaire et social afin de transférer les outils développés vers l'industrie et les autorités sanitaires de manière viable. Les scénarios possibles seront aussi modifiés avec cet aspect économique et les représentants de l'IFIP seront aussi régulièrement consultés pour rester en contact avec les réalités du terrain avec un coût-bénéfice favorable.

Les premiers résultats du projet SENTINEL ont montré que le *sample pooling* permettait de traiter de 2 à 200 échantillons de manière reproductible en limitant les coûts d'analyses. Une expérimentation animale de contamination de volaille a permis de produire des échantillons de tissus et de fluides contaminés afin d'étudier les marqueurs d'exposition par volatolomique, l'étude des molécules volatiles et par protéomique, l'étude des protéines en chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse simple ou en tandem, ces résultats sont en cours d'analyse (16).

Le travail décrit dans cette thèse est inclus dans le projet de *sample pooling* avec un focus particulier sur l'étape d'extraction du développement analytique et un objectif principal de simplifier cette étape, d'en réduire le coût, tout en maintenant son efficacité.

Le développement d'une méthode d'extraction simple, rapide et efficace du type QuEChERS (signifiant Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) puis l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour séparer et détecter les molécules d'intérêts a fait l'objet de mon stage de master 2 au sein de la plateforme MetaToul-AXIOM au sein de l'équipe TOXALIM à l'INRAe de Toulouse. L'objectif de ce développement a été de réduire le coût et le temps d'extraction développée par l'équipe travaillant sur les *sample pooling*.

Dans la suite de ce document la famille des polychlorobiphényles sera décrite afin de contextualiser le modèle d'étude choisi. Un état de l'art des développements de méthodes d'extractions des PCBs dans différentes matrices sera proposé.

## II. Les polychlorobiphényles : une famille de polluants organiques persistants

### II.1. Généralités sur les polychlorobiphényles

Le terme polychlorobiphényle regroupe une famille d'hydrocarbures aromatiques halogénés ayant une structure moléculaire composée d'un noyau biphényle substitué par 1 à 10 atomes de chlore (Figure 5 (17)). Cette famille peut être composée de 209 congénères grâce à un nombre variable de substitution et différents isomères de position (18).

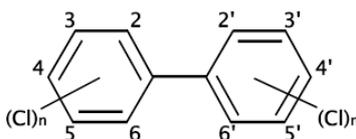


Figure 5 Structure de la famille des polychlorobiphényles (PCBs). Fiche toxicologique INRS (18)

La nomenclature de l'IUPAC permet d'identifier et de classer les congénères en attribuant un chiffre entre 1 et 209 en fonction du degré croissant de substitution des atomes de chlore et de la numérotation des atomes de carbones substitués. Les PCBs sont aussi classés en 2 groupes en fonction de leur mécanisme d'action similaire ou non aux dioxines, c'est-à-dire la capacité à se lier au récepteur Ah qui entraîne un mécanisme toxique (19,20) :

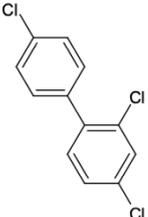
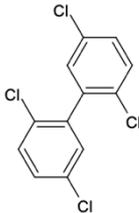
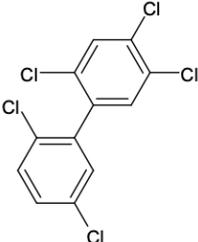
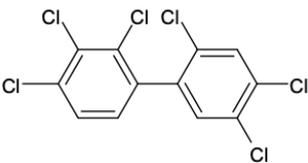
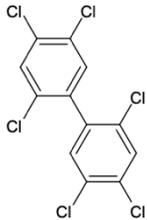
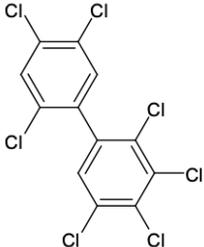
- Les PCB de type dioxine (autre appellation : dioxine-like, PCBs-DL) ayant un mécanisme similaire aux dioxines sont capables de se lier au récepteur Ah. Ce sont les PCBs les plus toxiques.
- Les PCB n'étant pas de type dioxine (autre appellation : non dioxine-like, PCBs-nDL) ont un mécanisme différent du mécanisme des dioxines. Ce groupe est majoritairement détecté dans les matrices alimentaires contaminée (19).

Les PCB-nDL sont particulièrement détectés dans l'environnement et sont utilisés comme traceurs de la présence de PCB dans l'environnement et dans différentes matrices (21) . La saisine n°2006-SA-0305 de l'Afssa les nomme PCBs indicateurs, ils sont au nombre de 6 congénères : PCB 28, 52, 101, 138, 153 et 180. Ce sont des PCBs-nDL et leur somme représente 50 % de l'ensemble des PCBs dans les aliments. Le PCB 118 est aussi détecté régulièrement dans l'environnement, mais l'Afssa recommande en 2006 de retenir uniquement les 6 PCB-nDL cités ci-dessus pour mesurer les niveaux de contamination. L'Afssa indique dans la saisine :

*« dans des situations de contamination « bruit de fond », la détection des 6 PCB nDL permettrait de prédire la teneur en PCB-DL du même aliment et pourrait donner une indication du possible dépassement des seuils réglementaires exprimés pour la somme des PCBs dans cet aliment. »*

Dans cette étude, nous nous intéresserons aux PCB indicateurs en utilisant la nomenclature de l'IUPAC. La structure moléculaire, le numéro CAS, la formule brute et la masse exacte de ces PCBs indicateurs sont indiqués dans le tableau 2 :

Tableau 2 Identifications des congénères étudiés (Pubchem)

Congénères (IUPAC)	Identifications	Structure moléculaire (Pubchem)
PCB 28	CAS : 7012-37-5 Formule brute : $C_{12}H_7Cl_3$ Masse exacte : 255,96133	
PCB 52	CAS : 35693-99-3 Formule brute : $C_{12}H_7Cl_4$ Masse exacte : 291,91941	
PCB 101	CAS : 37680-73-2 Formule brute : $C_{12}H_5Cl_5$ Masse exacte : 325,8804	
PCB 138	CAS : 35065-28-2 Formule brute : $C_{12}H_4Cl_6$ Masse exacte : 357,8442	
PCB 153	CAS : 35065-27-1 Formule brute : $C_{12}H_4Cl_6$ Masse exacte : 357,84442	
PCB 180	CAS : 35065-29-3 Formule brute : $C_{12}H_3Cl_7$ Masse exacte : 291,91941	

Ces molécules sont synthétisées industriellement à partir de benzène et de chlore. La première étape est la synthèse du noyau biphenyle par déshydrogénation de deux molécules de benzène à 800°C et la deuxième étape est la chloration progressive du noyau à 100°C en présence de catalyseurs, le chlorure ferrique. La synthèse est représentée sous forme développée dans la figure 6.

Des mélanges de congénères sont obtenus en fin de synthèse et possèdent un nombre de chlore voisin avec différents isomères de position (18).

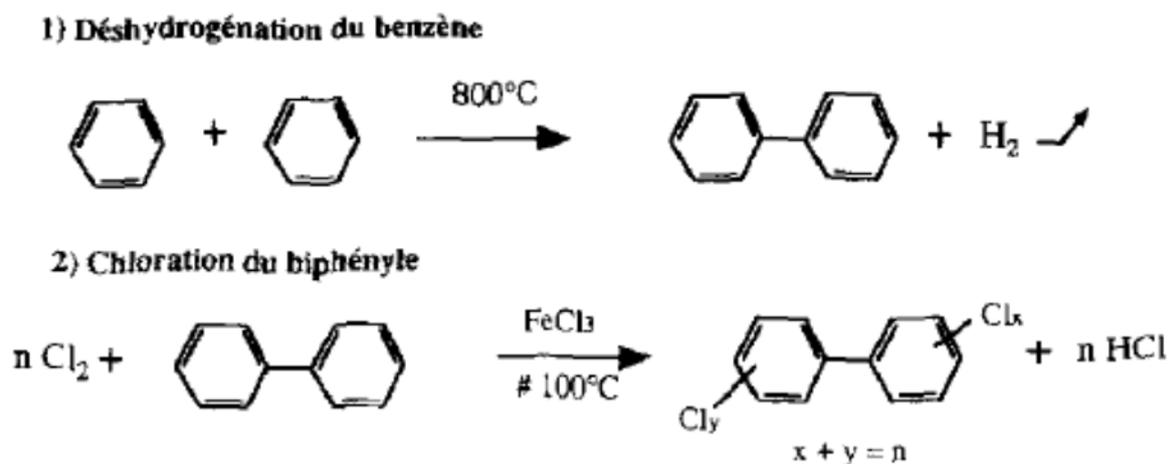


Figure 6 Principales étapes de synthèses des PCBs (22)

## II.2. Propriétés physico-chimiques des polychlorobiphényles

Les propriétés physico-chimiques des PCBs sont imputables au degré de substitution par le chlore et à la position des carbones substitués. Nous allons nous intéresser dans cette partie aux propriétés physico-chimiques permettant d'expliquer leurs utilisations industrielles et d'aborder l'analyse des PCBs indicateurs en laboratoire. Le tableau 3 regroupe :

- le coefficient de partage octanol/eau (XlogP) permettant d'appréhender le comportement des PCBs dans des solvants polaires ou apolaires et leur capacité à s'accumuler dans les corps gras.
- La constante d'Henry reflétant la volatilité d'une solution en solution aqueuse. Cette constante est directement corrélée à la volatilité de la molécule.

Tableau 3 Propriétés physico chimiques des PCBs nDL (24)

Congénères	Coefficient de partage octanol/eau (XlogP3)	Constante d'Henry à 25°C (Pa.m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )
PCB 28	5,6	28
PCB 52	6,1	24
PCB 101	6,5	30
PCB 138	7,2	9
PCB 153	7,2	15
PCB 180	7,9	2,2

Ces molécules sont très solubles dans les solvants organiques apolaires comme le montre le coefficient de partage octanol/eau. Le degré de chloration est inversement corrélé avec la volatilité des PCBs, plus le degré de chloration est élevé, moins la molécule est volatile. Ces propriétés leur apportent des caractéristiques très recherchées en industrie : ininflammabilité, stabilité thermique et chimique, faible tension de vapeur, constante diélectrique élevée (22). Ces mélanges de molécules seront rapidement utilisés dans l'industrie après leur découverte en 1881.

### **II.3. Utilisation industrielle des mélanges de polychlorobiphényles**

Schimdt et Schlum ont synthétisé, pour la première fois en 1881, les PCBs et les mélanges industriels ont été produits pour la première fois au début du 20<sup>ème</sup> siècle (18). Ces mélanges ont été largement utilisés dans différents domaines industriels et dans de nombreux pays comme les États-Unis, l'Allemagne, le Japon ou l'Italie. Ces substances ont été utilisées dans l'industrie dans les matériels électriques, les matières plastiques, les peintures, laques, vernis, les revêtements, l'industrie mécanique et ont connu un essor industriel dans le monde entier entre 1930 et 1980 (18,21). Entre 1929 et 1989, la production mondiale était de 1,5 million de tonnes. En France entre 1955 et 1985, 60 000 tonnes ont été vendus aux secteurs des matériaux électriques dans les transformateurs, les condensateurs de puissances, l'électroménager et l'éclairage (18,21,22). Le tableau de la figure 7 regroupe une liste non-exhaustive de l'utilisation industrielle des PCBs (23). Il a longtemps été considéré que les transformateurs électriques aux PCBs étaient, par exemple, un progrès technologique et économique par rapport à l'utilisation de transformateurs à l'huile qui pouvaient entraîner des incendies (24).

## Liste de quelques applications à systèmes fermés, partiellement ouverts et ouverts des PCB

Applications des PCB à systèmes fermés, partiellement ouverts et ouverts
<b>Systèmes fermés</b> Fluides d'isolation et/ou de refroidissement dans les transformateurs Fluides diélectriques dans les condensateurs Commutateurs
<b>Systèmes partiellement ouverts</b> Fluides caloporteurs Fluides hydrauliques dans les équipements de lavage, les chariots élévateurs et les pompes à haute pression Pompes à vide Régulateurs de tension Câbles électriques remplis de liquide Disjoncteurs remplis de liquide
<b>Applications ouvertes</b> Peintures Fluides lubrifiants utilisés dans les huiles et les graisses Agents d'imprégnation hydrofuges et retardateurs de flamme pour le bois, le papier, les textiles et le cuir Agents de stratification pour la fabrication du papier Additifs dans les colles, les produits d'étanchéité et les revêtements anticorrosifs Adjuvant pour insecticides Supports pour la catalyse de polymérisation dans la fabrication de produits pétrochimiques Huiles à immersion pour la microscopie Préparations pesticides Revêtements/enveloppes de câbles

Figure 7 Utilisation industrielle des PCBs (23)

Le nom commercial des mélanges varie d'un pays à l'autre suivant le fabricant. Les plus courants sont l'Aroclor (dénomination<sup>®</sup> Monsanto) aux États-Unis ou le Phénoclor (dénomination<sup>®</sup> Rhone-Poulenc) en France. Les principaux fabricants et noms commerciaux sont regroupés dans l'annexe 2.

### II.4. Présence dans l'environnement et risques toxicologiques

Les polychlorobiphényles sont des polluants organiques persistants, c'est-à-dire :

- Bioaccumulables dans les tissus adipeux des organismes vivants.
- Toxiques avec des effets nocifs sur les écosystèmes et la biodiversité.
- Mobiles sur des grandes distances.

La durée de demi-vie de ces molécules court entre 94 et 2700 ans selon les molécules (25). Leur large utilisation industrielle a rendu les PCBs omniprésents et ils ont été détectés dans différents compartiments environnementaux et s'accumulent dans les tissus corporels riches en gras comme la viande ou le poisson inclus dans la chaîne alimentaire. Les PCBs ont été détectés pour la première fois en 1966 par Sören Jensen (26) dans le sang humain puis la présence de ces molécules a été détectée dans l'environnement et les organismes vivants qui y vivent (27). La figure 8 extraite du manuel de

formation visant à la préparation d'un Plan National pour la gestion écologique des PCBs du programme des Nations Unies illustre l'origine des PCBs dans l'environnement (24).

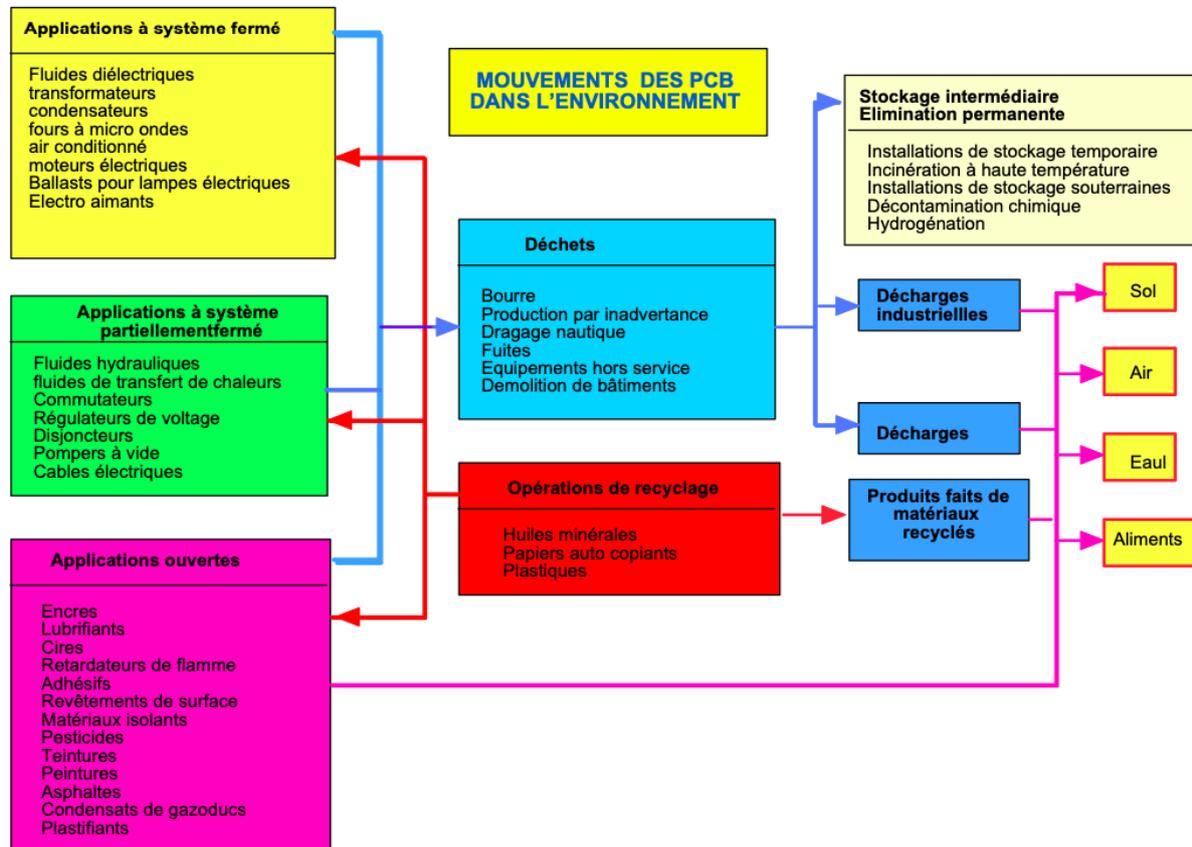


Figure 8 Figure illustrant l'origine des PCBs dans l'environnement et l'alimentation (24)

Malgré des opérations de stockages temporaires et d'élimination, les déchets des différentes utilisations industrielles libèrent des PCBs dans l'environnement : l'eau, l'air, les sols. Dans un article de 2021, des chercheurs ont fait une revue sur la présence et la concentration détectée de PCBs dans différents milieux et être vivants dans le monde, y compris dans des milieux où l'utilisation industrielle des PCBs n'a jamais existée (27). Ci-dessous, des exemples de détection de mélange de PCBs retrouvés au cours du temps (27) :

- 1971 : dans les régions des Grands Lacs de 2300 à 22 400 ng/g de poissons
- 1977 : dans le Michigan de 2400 à 5040 ng/g dans les poissons
- 2016 : 15 à 60 ng/g dans des boulettes de résine sur les plages au Ghana
- 2019 : en Tanzanie au lac Victoria, de 950 à 2240 ng/L dans l'eau et 10 ng/g dans les sédiments.
- 2020 : au Kenya dans la rivière Nairobi, 160 ng/g dans les sédiments et 700 ng/L dans l'eau

La présence de ces PCBs dans l'environnement est très préoccupante au vu de leur capacité à s'intégrer dans la chaîne alimentaire dans les tissus gras. L'alimentation en fait donc la principale source

d'exposition pour l'homme (28). La DL50 par voie orale chez le rat est comprise entre 4000 et 19 000 mg/kg (17), et en raison des concentrations retrouvées dans l'environnement et dans les organismes vivants, ces molécules ne présentent pas une toxicité aiguë importante. Cependant, leurs caractéristiques de POP entraîne une exposition prolongée, une accumulation des PCBs dans les tissus lipidiques et des effets néfastes importants. De nombreuses études ont montré que ces molécules avaient un effet néfaste pour l'homme avec des troubles de la reproduction (29,30), du système endocrinien (31,32), du système neurologique (33,34), à forte dose des réactions aiguës de la peau et des possibles risques de cancers. L'Organisation Mondiale pour la santé les classe cancérogènes du groupe 1. En 1968 au Japon, des milliers de personnes ont été intoxiquées par de l'huile de riz contaminée avec des PCBs provenant d'une fuite de compresseur de 2000 ppm allant jusqu'à entraîner la mort de certains habitants. En 1980, des événements similaires ont eu lieu à Taiwan avec de symptômes similaires : chloracné, céphalées, œdèmes de paupières, lésion hépatique, léthargie, perte d'appétit (21). Il est important de noter que la présence des PCBs dans l'environnement est uniquement d'origine anthropique, qui sont appelés des « déchets historiques », interdits à l'utilisation depuis la fin du 20<sup>ème</sup> siècle (24). En effet, ces événements et des avancées scientifiques ont entraîné l'interdiction de la production de PCBs dans de nombreux pays.

## **II.5. Réglementation française**

À la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, plusieurs conventions internationales ont été initiées pour réglementer et protéger la santé humaine et l'environnement de ces polluants persistants : la convention de Bâle (24), la convention de Rotterdam et la convention de Stockholm. Un Comité consultatif du réseau pour l'élimination des PCB a été mis en place par le programme des nations unies pour l'environnement et la convention de Stockholm. La production de PCBs a finalement été interdite en France en 1987, mais l'utilisation de certains appareils était encore autorisée. A partir de cette date, différents décrets, arrêtés et circulaires ont été rédigés en France pour fixer des limites de concentration des PCBs autorisées dans différentes matrices (35):

- 1985 : une limite de 0.5 µg/L pour les rejets d'eaux résiduaires.
- 1988 : une limite maximale de 2000 ng/g de PCBs dans la partie comestible des poissons d'eau douce.
- 1989 : une limite de PCBs maximale dans l'eau potable de 0.1 µg/L.
- 2000 : 1000 ng/g de sédiment sec en milieu naturel portuaire pour la somme des PCB.

Le conseil de l'Union européenne a déclaré dans la directive 96/59/CE en 1996 la mise hors service de tous les appareils contenant des PCBs d'ici 2010. En 2001, afin de protéger la santé humaine, animale

et l'environnement, l'UE a adopté une stratégie à 3 objectifs simples : évaluer l'état actuel de l'environnement, réduire l'exposition humaine et réduire les effets sur l'environnement (22). Entre 2003 et 2010, un plan national de décontamination et d'élimination des appareils contenant plus de 500 ppm a été déployé, puis 50 ppm en janvier 2017. Cependant la quantité importante utilisée depuis 1930, les fuites de PCBs contenus dans les appareils, l'incinération de certains appareils associés à leurs propriétés persistantes expliquent leurs concentrations toujours élevées retrouvées dans l'air, l'eau, le sol et les sédiments et présentés dans la partie précédente. Le règlement européen n°2022/2022 du 24 octobre 2022, applicable dès le 1<sup>er</sup> janvier 2023, est relatifs aux teneurs maximales autorisées en dioxines et en PCBs, l'annexe 3 est un tableau regroupant ces teneurs maximales en fonction des aliments. Les PCB-nDL (PCB 28, 52, 101, 138, 152, 180) ont des concentrations maximales dans la viande, le lait cru et les œufs de 40ng/g de graisse.

## **II.6. Techniques de dosage des PCBs**

### **II.6.1. Préparation des échantillons : extraction et purification**

La préparation des échantillons est une étape indispensable au dosage analytique. Cela implique l'extraction des molécules de la matrice, la purification de l'extrait afin d'éliminer les possibles molécules de la matrice qui risquent d'interférer dans l'analyse. Le choix de la méthode de préparation de l'échantillon dépend de la matrice étudiée, de la molécule à extraire, mais aussi de la technique analytique choisie pour la détection des molécules cibles. Ce développement s'appuie sur la revue des techniques de préparation d'échantillons par analyse analytique de Somenath Mitra et la revue sur les différentes techniques utilisées pour extraire, purifier et doser les PCBs de Mwanza et al. En 2021 (27,36).

Dans le cas d'une matrice liquide, la technique d'extraction liquide-liquide (LLE) est une technique classiquement utilisée. Il est aussi possible d'effectuer l'extraction sur phase solide (SPE) permettant de minimiser l'utilisation de solvant, la microextraction sur phase solide (SPME) permettant d'intégrer une fibre d'extraction et de faire du headspace-SPME afin d'extraire des molécules volatiles et l'extraction sur phase solide dispersive (d-SPE), une SPE simplifiée avec une phase solide à disperser avec la matrice.

Dans l'air, les PCBs sont collectés par système actif ou passif sur des membranes, résines ou polymères.

Dans une matrice solide comme la viande qui compose la matrice de cette étude, les PCBs ont initialement été extraits au Soxhlet permettant une bonne extraction des PCBs (37) mais nécessitant une longue durée d'extraction et une grande quantité de solvants, des techniques d'extraction plus efficace, plus économique, nécessitant moins de solvant ont été développées au cours du temps. On peut citer :

- l'extraction par micro-onde assistée (MAE) : le solvant est chauffé par adsorption des ondes micro-ondes permettant une meilleure pénétration du solvant dans la matrice. Cette technique automatisée permet une extraction efficace à basse température (38).
- l'extraction accélérée par solvant (ASE) est une méthode d'extraction sous pression et à haute température permettant d'extraire plusieurs échantillons à la fois et nécessitant un long temps de manipulation (39–41)
- l'extraction par fluide supercritique (SFE) permet d'extraire efficacement avec un fluide supercritique et des co-solvants. Le CO<sub>2</sub> à haute pression est souvent utilisé comme fluide supercritique. Cette technique implique des coûts importants.
- l'extraction sur phase solide dispersive (d-SPE) utilise des sorbants (Forisil, C18, gel de silice ou alumine) qui adsorbent les analytes pour être ensuite élués sur une colonne chromatographique avec un solvant spécifique. Cette extraction est la deuxième étape de la méthode QuEChERS, l'acronyme en anglais de rapide, facile, peu coûteux, efficace, robuste et sûr. L'avantage principal de ces 2 techniques dans ce travail est l'absence d'instrument spécifique pour l'extraction et la purification.

Différentes méthodes de purification peuvent être utilisées : la chromatographie par perméation de gel (GPC), la chromatographie d'exclusion par taille (SEC), l'extraction sur phase solide par adsorption (SPE) ou l'extraction sur phase solide dispersive (d-SPE).

### **II.6.2. Techniques analytiques de détection et dosage des PCBs**

La chromatographie en phase liquide et en phase gazeuse sont les techniques de séparation utilisées pour la séparation des PCBs. Les principes fondamentaux et les paramètres d'utilisation de ces techniques ne seront pas approfondis dans cette partie, mais uniquement leur utilisation couplée à un détecteur et un analyseur pour le dosage des PCBs.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) utilise un solvant pour phase mobile s'écoulant dans une colonne d'adsorbants (la phase stationnaire), le choix de la phase stationnaire et de la phase mobile sont des éléments clés de cette technique. Cette technique est favorisée dans le cas de matrice liquide comme l'eau. Mwanza rapporte dans sa revue (27), des limites de détection élevées et une faible sensibilité aux composés volatils qui sont adsorbés et nécessite une grande quantité de solvants afin de continuer les analyses. Cette technique peut être couplée à différents détecteurs : UV, fluorescence, spectromètre de masse (MS), spectromètre de masse en tandem (MS/MS). La chromatographie en phase gazeuse est favorisée pour la détection des PCBs dans différentes matrices (28,42–46). Cette technique permet de séparer les analytes à l'état gazeux conduit dans la colonne par un gaz vecteur

après vaporisation dans un injecteur. Les températures appliquées à la colonne, la taille de la colonne ainsi que la composition de la colonne sont des paramètres qui influencent la séparation des molécules d'intérêt. Couplée à la spectrométrie de masse comme détecteur avec une ionisation par impact électronique ou ionisation chimique ainsi qu'un analyseur par quadripôle ou temps de vol, il est possible d'analyser des concentrations très faibles avec une haute sensibilité, une haute résolution, une précision, une exactitude et une reproductibilité élevées (44,47). Une autre technique de détection est la capture d'électron (ECD) sensible aux composés halogénés et limitée aux composés volatiles qui peut être couplée à la chromatographie gazeuse.

## **II.7. État de l'art sur la technique d'extraction QuEChERS des PCBs dans l'alimentation**

Comme décrit précédemment, ce travail expose la recherche de simplification, de réduction des coûts et du temps d'extraction des PCBs dans la viande de porc et plus particulièrement dans la sous-noix de jambon. Le muscle sous-noix de jambon a été choisi pour son homogénéité et sa teneur en gras limitée. Initialement, l'extraction des PCBs se faisait par différentes techniques, le Soxhlet dans un premier temps puis l'Extraction Assistée par Micro-ondes (MAE) et l'Extraction Accélérée par Solvant (ASE) et permettaient d'obtenir un bon rendement et une bonne répétabilité (39–41). L'ASE a jusque-là été utilisée comme méthode d'extraction par les partenaires du projet SENTINEL développant le sample pooling. En ajoutant plusieurs étapes de purifications (chromatographie d'exclusion, ajout d'adsorbants, filtration) des rendements compris dans la gamme [70-120%] ont été obtenus (48). Cependant, ces techniques exigent une longue durée d'extraction et des volumes de solvants importants et des appareils spécifiques (43). Des nouvelles techniques ont commencé à être développées comme la méthode appelée QuEChERS (acronyme de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) développée en 2003 pour la détermination de pesticides dans les fruits et les végétaux (49).

La méthode QuEChERS est divisée en 2 étapes : l'extraction et la purification. Le protocole original QuEChERS est indiqué en annexe 4 ainsi que la méthode officielle des États-Unis AOAC 2007.01 utilisant un tampon acétate. L'étude de ces protocoles ainsi que l'étude bibliographique résumée dans le tableau 4 a permis d'optimiser la méthode originale AOAC. La matrice de l'étude étant lyophilisée et broyée, la première étape est l'hydratation de la viande, différentes quantités d'eau ont été testées ainsi que différents temps d'agitation et un volume de 10 mL d'eau a finalement été retenu en agitant pendant 5 min. Le solvant d'extraction du protocole QuEChERS AOAC 2007.01 est l'acétonitrile (ThermoFischer®, HPLC grade) associé à du sulfate de magnésium anhydre (MgSO<sub>4</sub>) et de l'acétate de sodium (CH<sub>3</sub>COO-Na<sup>+</sup>). Différents solvants peuvent être envisagés ainsi que l'ajout ou non de sels. Les solvants envisagés sont l'acétonitrile, l'acétonitrile avec 1 % d'acide acétique, l'acétonitrile/hexane, l'acétate d'éthyle et l'hexane. Ce choix est orienté par la capacité du solvant à extraire les PCBs des lipides de la matrice tout

en limitant la quantité de matière grasse et de protéines dans l'extrait. Pour pallier les impuretés de la matrice, le protocole original préconise de purifier par dSPE le surnageant avant l'analyse avec du sulfate de magnésium anhydre et de la silice greffée avec des amines primaires et secondaires (PSA). La chromatographie par d'exclusion stérique (GPC) a par exemple été utilisée par le premier partenaire du projet pour éliminer les lipides (48). Cette technique ne sera pas utilisée dans ce projet, n'étant pas disponible au laboratoire et permettant de maintenir l'objectif de limiter les appareils spécifiques pour l'extraction. Les adsorbants utilisés lors de la phase de purification ont différentes fonctions (50):

- $MgSO_4$  : élimine les traces d'eau
- PSA : retire les composés acides, les pigments polaires, les sucres et les acides gras
- Silice greffée C18 : élimine les lipides et les stérols
- Florisil® constitué d'oxydes de silicium et de magnésium dans un rapport de 85/15 : pour extraire les impuretés non polaires comme les lipides
- Oxyde de zirconium (Z-sep) : retient la matière grasse et les pigments de la matrice

L'utilisation du froid sera aussi envisagée afin de solidifier la matière grasse et de la faire précipiter. La possibilité d'utiliser l'extraction sur phase solide en étape de purification est aussi envisagée.

Tableau 4 Résumé des méthodes d'extraction et d'analyses des PCBs et de molécules avec une structure similaire

Analytes	Type de matrice	Méthode d'extraction	Purification	Technique analytique	LOD/LOQ	Réf.
6 PCBs	Moules (6g)	QuEChERS 10mL Ace/Hexane (1 :4 v/v)	dSPE : 500mg Z-sep	GC-MS/MS HPLC-HRMS	LOQ : 0,5 ng/g	(44)
8 PCBs	Crabe (1g)	QuEChERS ACN (15mL)	dSPE :MgSO4, PSA, C18, Florisil	GC-MS	LOQ : 0,1- 3,6 µg.kg <sup>-1</sup>	(45)
19 PCBs	Poisson	QuEChERS ACN (30mL) H2O	dSPE (2mL) MgSO4, PSA, C18	GC-MSMS	LOQ < 1ng/g	(43)
7 PCBs	Salami, saucisses (1g)	Acetone (7mL)	dSPE (2mL) : MgSO4, PSA,	GC-MS	LOQ : 0,5- 1,3 ng.g <sup>-1</sup>	(28)
Pesticides apolaires	Gras de viande	ACN saturé hexane (18% v/v)	Froid 4°C nuit dSPE : MgSO4, C18, PSA	GC-MS	/	(42)
DDT*	Gras de vache	QueChERS (AOAC) ACN 1% acide acétique	Froid -20°C (3h) dSPE : MgSO4, C18, PSA, Florisil	GCxGC-TOF- MS	LOD : 0,1-2 ng.g <sup>-1</sup>	(47)
18 PCBs	Moules (10g)	QueChERS ACN (10mL)	dSPE : MgSO4, PSA,	GC-MS	/	(46)

\*Organochlorés ayant une structure similaire aux PCBs

Dans un premier temps, un développement avec des composés standards (PCBs indicateurs) en solution sera effectué en déterminant les conditions d'analyse de l'appareil (GC-MS), la performance de la gamme d'étalonnage, les limites de quantification et de détection devront être mesurées. Le développement en matrice pourra ainsi débiter par des extractions QuEChERS et une optimisation de la méthode afin de déterminer les performances en matrice.

Dans la suite de ce travail, j'exposerai le matériel et les méthodes utilisées durant le développement ainsi que les résultats qui seront discutés. Des perspectives seront ensuite proposées. La méthode d'extraction est toujours en cours de développement au sein de la plateforme analytique Metatoul-Axiom au laboratoire Toxalim à l'INRAE de Toulouse et ce document expose les premières avancées de ce développement.

## III. Matériels et méthodes

---

### III.1. Préparation des échantillons

La matrice viande choisie pour l'étude est la sous-noix de jambon de porc. D'après le protocole optimisé par le premier partenaire du projet SENTINEL (équipe MASS, unité QuaPA, INRAE Clermont-Ferrand) la viande a d'abord été hachée puis broyée dans l'azote liquide et enfin lyophilisée (51). Une perte d'environ 70 % d'eau est observée. Cette méthode de préparation permet d'obtenir un échantillon homogène de l'ensemble de la sous-noix. Le muscle a été choisi pour son homogénéité et son taux de matières grasses faible. Une prise d'essai d'1 g d'échantillon lyophilisé est utilisée pour l'extraction et correspond à 3,7 g de viande fraîche, la matière grasse est donc concentrée dans l'échantillon à analyser. En se référant aux résultats obtenus par le partenaire 1 du projet, 1 g de viande lyophilisée et broyée contiendrait 5 % de matière grasse. Les échantillons sont conservés sur le long terme à -80°C et des aliquotes de 10 g sont conservées à plus court terme à -20°C. Le dopage des échantillons avec les standards et standards internes (à différentes concentrations) se fait directement sur la prise d'essai de 1 g de viande lyophilisée et broyée en laissant 10 minutes les solutions s'imprégner.

### III.2. Analyse des PCBs par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses ont été réalisées par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) sur un instrument simple quadripôle (Thermo Scientific™ Trace 1310 et ISQ LT). Un passeur automatique permet d'injecter 1 µL d'extrait en mode splitless dans l'injecteur chauffé à 250 °C équipé d'un septum et d'un insert (Thermo Scientific, 4 mm ID, SSL liner) et l'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1 mL/min. La séparation chromatographique est assurée par une colonne Restek Rxi-5ms (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm). La température du four est fixée initialement à 100 °C pendant 1 minute, augmente jusqu'à 325 °C avec un gradient de 10 °C/min et sera maintenue pendant 7 minutes. La ligne de transfert MS est à 280 °C, la température de la source d'ionisation par impact électronique du spectromètre de masse est de 250 °C, l'énergie d'ionisation est de 70 eV. Le logiciel Xcalibur permet de piloter l'appareil et d'analyser les chromatogrammes et spectres de masse. Les PCBs sont, dans un premier temps, détectés en Full Scan par spectrométrie de masse (gamme de  $m/z$  150-600) permettant de déterminer les temps de rétention des molécules. Trois ions caractéristiques pour chaque congénère sont ensuite choisis pour une analyse en mode Selected Ion Monitoring (SIM). La liste des ions sélectionnés pour chaque PCBs, leur abondance relative théorique ainsi que les temps de rétention sont regroupées dans le tableau 5. Certains PCBs ayant le même nombre de chlore (101/118 et 153/138), les valeurs de  $m/z$  choisis sont spécifiques et ne sont pas forcément les plus intenses. Les

critères de validité pour confirmer la présence d'un PCB est son temps de rétention  $\pm 0,1$  min et la présence des ions 1 et 2 en analyse SIM. Il est à noter qu'en raison d'encrassement durant l'étude, la colonne a subi plusieurs découpes et les temps de rétention ont été corrigés après chaque maintenance.

Tableau 5 Conditions de GC-MS pour la détection des PCBs marqués  $^{13}\text{C}$  (Standard Interne) et natifs

Numéro du pic	PCBs (IUPAC)	Formule brut	TR (min)	m/z ions (abondance relative %)		
				Ion 1	Ion 2	Ion 3
1	28	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_3$	12,76	256 (100)	258 (98)	186,1 (80)
	28*			268 (100)	198,1 (50)	232 (20)
2	52	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_4$	13,44	291,9 (100)	220 (100)	289,9 (80)
	52*			304 (100)	232 (80)	232 (40)
3	101	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_5$	15,13	328,9 (100)	254 (70)	327,9 (60)
	101*			337,9 (100)	268 (50)	303 (20)
4	118	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_5$	16,30	327,9 (60)	256 (50)	184 (40)
	118*			337,9 (100)	268 (60)	303 (20)
5	153	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_6$	16,71	359,8 (100)	361,8 (80)	287,9 (60)
	153*			371,9 (100)	302 (50)	230 (20)
6	138	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_6$	17,23	361,9 (80)	289,9 (80)	218 (40)
	138*			371,9 (100)	302 (50)	336,9 (20)
7	180	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_7$	18,43	393,8 (100)	396 (80)	323,9 (80)
	180*			407,9 (100)	335,9 (70)	264 (30)

\*Standard interne marqué  $^{13}\text{C}$

### III.3. Analyse des PCBs en solvants

#### III.3.1. Détermination de la limite de détection et de quantification en solvant

Un mélange contenant 7 PCBs indicateurs (Wellington, réf BD-D7) (PCB 28, 52, 101, 118, 153, 138, 180) à 10 ng/ $\mu\text{L}$  (Nonane/Toluène, 96,5/3,5) est utilisé ainsi que le même mélange de PCBs marqués  $^{13}\text{C}$  (Wellington MBD-D7)(standard interne) à 5 ng/ $\mu\text{L}$  (Nonane/Toluène, 93/7). Une gamme de d'étalonnage de 5 niveaux de concentration : 0.1, 0.25, 0.5, 1 et 5 pg/ $\mu\text{L}$  a été préparée à partir d'une solution à 10 pg/ $\mu\text{L}$  (SF2) venant d'une solution fille à 1 ng/ $\mu\text{L}$ . Les volumes de préparations sont en annexe 5.1. Les solutions de la gamme ont été injectées 5 fois et 2 blancs d'hexane (ThermoFischer, Optima<sup>®</sup>) ont été injectés entre chaque série de gamme. La limite de détection (LOD) est définie pour un ratio  $\frac{\text{Intensité du pic PCBs}}{\text{Intensité du bruit de fond}}$  inférieur à 3. La limite de quantification (LOQ) est fixée pour un ratio  $\frac{\text{Intensité du pic PCBs}}{\text{Intensité du bruit de fond}}$  inférieur à 10 avec un coefficient de variation (CV) de la moyenne des aires inférieur à 15 %. La valeur de LOQ en solution permet de préparer le point bas de la gamme d'étalonnage. Toutes les solutions de standard sont étiquetées et conservées à  $-20$  °C durant toute l'étude.

### III.3.2. Mise en place de la gamme d'étalonnage

Une gamme d'étalonnage de 7 points entre 0.5 pg/ $\mu$ L et 500 pg/ $\mu$ L (0.5, 1, 5, 10, 50, 100 et 500) et trois solutions contrôle qualité (QC) : (2.5, 25 et 250 pg/ $\mu$ L sont préparées. Ces concentrations de contrôle qualité ont été choisies différentes de la gamme avec deux valeurs extrêmes et une valeur moyenne. Dans chaque solution, 50  $\mu$ L de standard interne à 1 ng/ $\mu$ L est ajouté permettant d'obtenir une concentration finale de standard interne à 50 pg/ $\mu$ L. Les volumes de préparation de ces solutions sont détaillés dans l'annexe 5.2. La gamme a été injectée 3 fois en intercalant les QCs entre chaque série. La linéarité, la répétabilité, la justesse et l'exactitude ont été déterminées. La répétabilité est exprimée en calculant le CV (%) =  $\frac{\sigma}{moyenne}$  pour chaque concentration et chaque PCB ( $\sigma$  correspond à l'écart-type). L'exactitude est exprimée en erreur de mesure (%) =  $\frac{C_{exp}-C_{th}}{C_{th}}$ . La justesse est exprimée en biais relatif (%) =  $\frac{moyenne C_{exp}-C_{th}}{C_{th}}$ . Ces critères permettront de valider la gamme d'étalonnage.

### III.4. Méthodes d'extraction et de purifications

Les premières expériences d'extraction et de purification ont été effectuées sur de la viande de bœuf cuite avec moins de 5 % de matière grasse lyophilisée et broyée. Cette viande n'était pas celle du projet (pas disponible à ce stade du stage) mais a permis d'établir un premier protocole d'extraction. Les quantités de réactifs utilisés pour ce protocole figurent dans le tableau 6 et le protocole général est décrit en figure 9. Ce protocole sera dans l'ensemble suivi pour la suite des optimisations.

Tableau 6 Quantités de réactifs utilisés pour chaque étape du protocole initial

Étapes	Protocole
Préparation d'échantillons	1g de viande lyophilisée
Extraction	10 mL d'eau 10mL d'acétonitrile 6g MgSO <sub>4</sub> anhydre 1,5g Acétate de sodium
Purification	Récupération du surnageant (ACN) 900 mg de MgSO <sub>4</sub> 300 mg de PSA 150 mg de C18

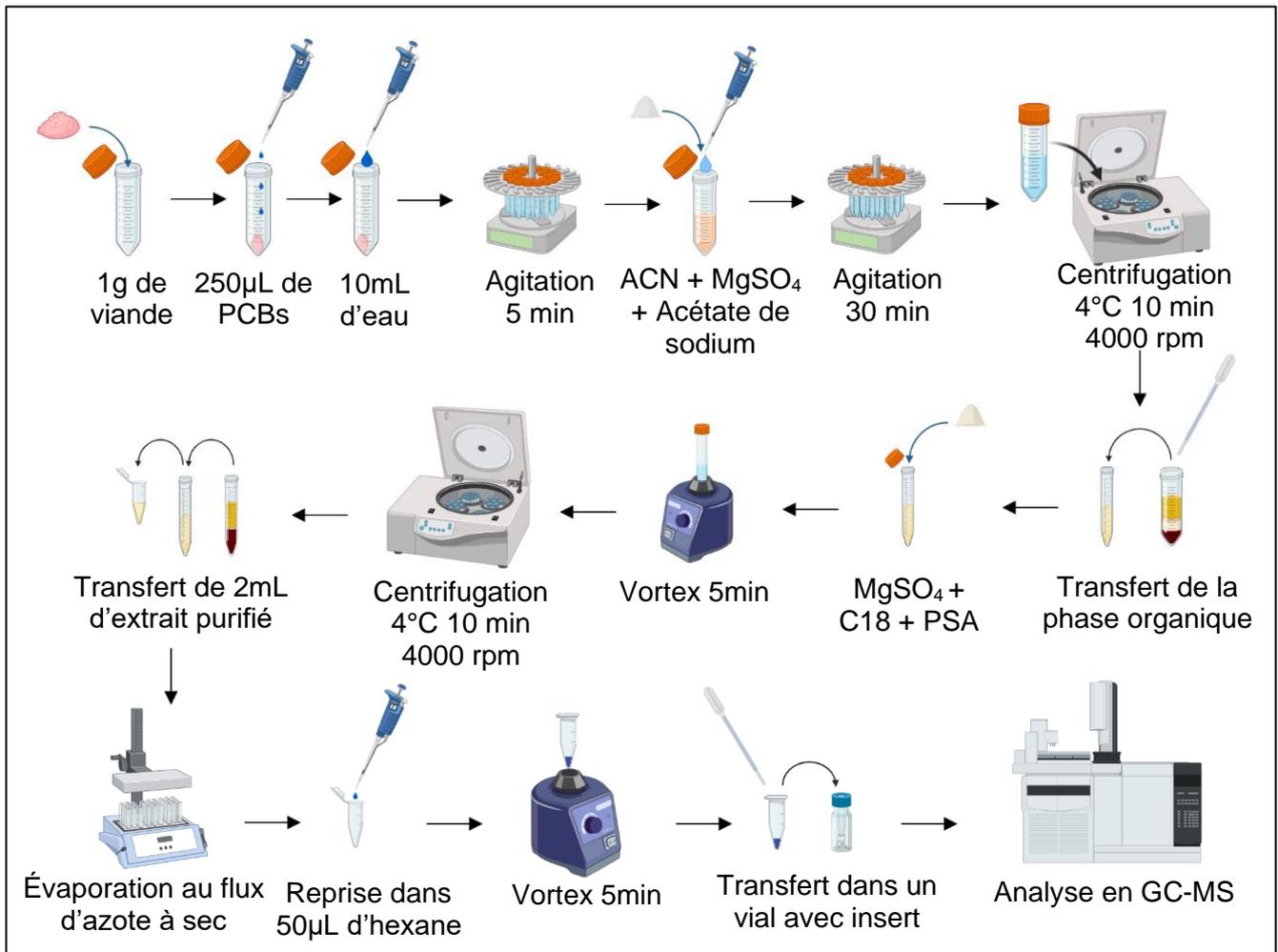


Figure 9 Protocole QuEChERS de l'extraction et de la purification des PCBs dans la viande (Figure réalisée sur biorender.com)

Les résultats du premier protocole ainsi que l'étude bibliographique ont permis d'optimiser le protocole et différentes pistes ont été envisagées :

- Essais avec différents solvants d'extractions : acétonitrile, hexane, acétate d'éthyle
- Augmentation de la durée des centrifugations
- Purification d'une unique aliquote unique en utilisant des quantités réduites d'adsorbants
- Purification par extraction sur phase solide (SPE) du type OASIS HLB Prime (cartouche 30 mg/1cc)
- Étape de refroidissement pour la précipitation de lipides
- Extraction simple avec l'hexane et l'acétate d'éthyle en solvant d'extraction

Le protocole de SPE en deux étapes débute par l'évaporation à sec de 100 µL de standard à 250 pg/µL, la reprise dans 1 mL d'acétonitrile. Après avoir conditionné la colonne avec 500 µL d'acétonitrile, l'extrait est déposé et élué puis évaporé de nouveau à sec afin d'être repris dans 100 µL d'hexane avant

d'être injecté. Le tableau 7 récapitule les tests d'extractions effectués et ne comprend, en ce qui concerne les tests en matrice, que la matrice du projet SENTINEL lyophilisée et broyée.

Tableau 7 Récapitulatif des extractions effectuées avec la matrice du projet SENTINEL (sous-noix de Jambon lyophilisée et broyée)

Numéro d'essai	Concentration de dopage	Extraction (Solvants + sels)	Type de purification	Particularités de l'essai
1	Mélange de PCBs <b>250 pg/μL</b>	<b>QuEChERS : ACN + MgSO4 + Acétate de sodium</b>	<b>dSPE</b>	
2			<b>dSPE + SPE OASIS HLB Prime 30mg/1cc</b>	Essai SPE
3*	Mélange de PCBs <b>250 pg/μL</b>	<b>QuEChERS : ACN + MgSO4 (en sachet) + Acétate de sodium (en sachet)</b>	<b>dSPE</b>	Essai avec des sels dans un conditionnement différent
4	Mélange de PCBs <b>250 pg/μL</b>	<b>QuEChERS : ACN + MgSO4 + Acétate de sodium</b>	<b>dSPE sur un aliquote de 3mL d'extrait + 150mg de MgSO4, 50mg de PSA et 50mg de C18</b>	Essai avec la purification d'aliquote de 3mL
5	Mélange de PCBs <b>100 pg/μL</b>	<b>QuEChERS : ACN + MgSO4 + Acétate de sodium</b>	<b>dSPE</b>	
6	Mélange de PCBs <b>50 pg/μL</b>	<b>QuEChERS : ACN + MgSO4 + Acétate de sodium</b>	<b>dSPE</b>	Diminution de la Concentration de dopage
7	Mélange de PCBs <b>25 pg/μL</b>	<b>QuEChERS : ACN + MgSO4 + Acétate de sodium</b>	<b>dSPE</b>	
8	Non dopé	Sans viande <b>ACN + MgSO4 + Acétate de sodium</b>	/	Étape 1 QuEChERS sans viande
9	Non dopé	/	<b>dSPE</b>	Étape 2 QuEChERS sans viande
10**	Mélange de PCBs <b>250 pg/μL</b>	Extraction liquide avec <b>Hexane</b> et sans hydratation de la viande, sans sels d'extraction	Extrait à 4°C <i>dSPE en cours</i>	Changement de méthode d'extraction
11**	Mélange de PCBs <b>250 pg/μL</b>	Extraction liquide avec <b>Acétate d'éthyle</b> et sans hydratation de la viande et sans sels d'extraction	Extrait à 4°C <i>dSPE en cours</i>	Changement de méthode d'extraction

\*Méthode d'extraction ayant permis d'obtenir les résultats les plus déterminants

*\* Les sels utilisés pour cet essai seront utilisés pour la suite des extractions*

*\*\*Essais en cours, aucun résultat ne sera présenté*

Pour tous les essais, les manipulations suivantes ont été faites :

- Extraction d'un gramme de viande dopé avant l'extraction en triplicat
- Extrait matrice blanche (EMB) en triplicat : dopage après extraction
- Un blanc : extraction sans viande non dopée
- Un blanc dopé : extraction sans viande dopé avant l'extraction
- Solution contrôle qualité de la concentration de dopage à

Seul l'essai numéro 1 ne comporte pas d'extrait matrice blanche dopée après extraction. Toutes les pesées de matrice sont égales à  $1 \pm 0,05$  g. Aucun protocole n'est pour l'instant validé, le développement de la méthode d'extraction est toujours en cours. Les rendements d'extraction ont été calculés en dopant la viande avant l'extraction et avant injection avec la même concentration puis avec le ratio  $\frac{\text{Aire des échantillons dopés avant extraction}}{\text{Aire des EMB dopés après extraction}} \times 100$  pour chaque PCBs et pour chaque échantillon du triplicat. La répétabilité a été estimée avec un calcul de coefficient de variation de l'aire des pics pour les échantillons, les extraits blancs matrices dopées après extraction et les points de contrôles injectés en triplicat à chaque analyse. L'effet matrice est calculé en faisant le ratio suivant  $\frac{\text{Aire des extraits matrices blanches dopés après}}{\text{Aire des contrôles qualités}} \times 100 - 100$ . Une valeur négative peut signifier une extinction de signal et une valeur positive, une ionisation augmentée par des coélutions ou interférences.

## IV. Résultats et discussions

### IV.1. Conditions d'analyse en GC-MS

Les conditions de l'analyse ont été optimisées et permettent de séparer tous les composés en 30,5 min de cycle de température. La figure 10 montre un chromatogramme TIC (*Total Ion Current*) illustrant la séparation des PCBs numérotés de 1 à 7 (voir correspondances dans le tableau 5). Les conditions de chromatographie permettent de séparer les composés d'intérêt, le mode SIM (*Single Ion Monitoring*) en spectrométrie de masse permet une détection spécifique et une meilleure sensibilité de chacun des 7 PCBs (Figure 11).

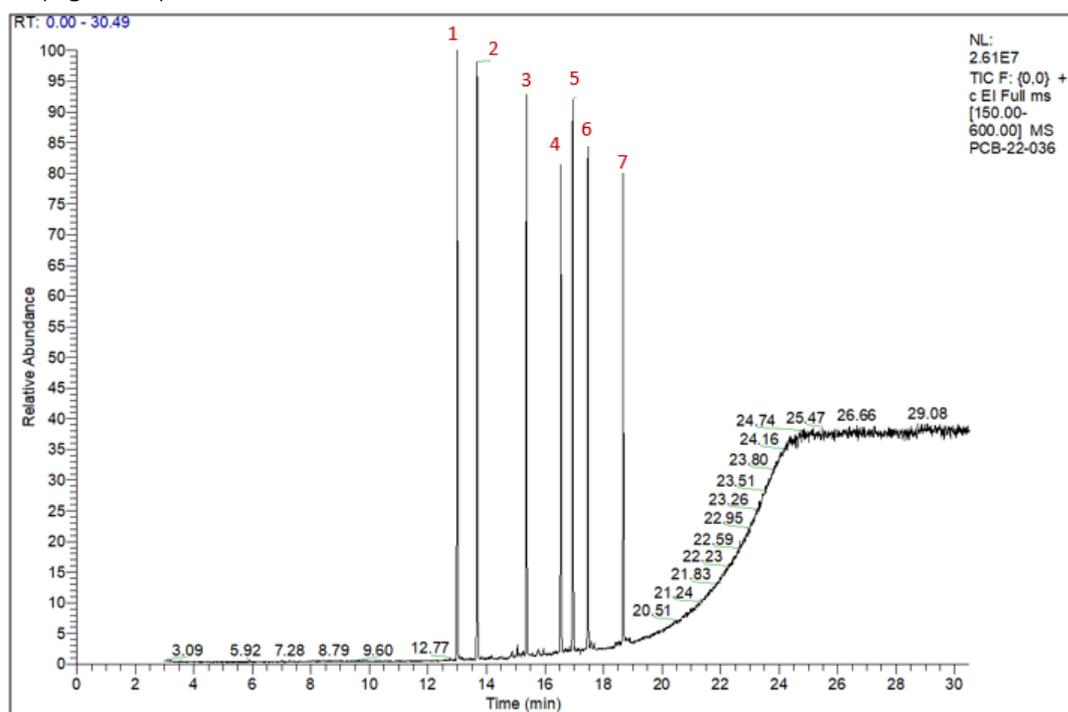


Figure 10 Chromatogramme de la séparation des PCBs dans l'hexane à 500 pg/ $\mu$ L

### IV.2. Analyse du mélange des 7 congénères en solvant

#### IV.2.1. Détermination de la limite de détection et de la limite de quantification

Les LOD et LOQ pour chaque PCBs sont regroupées dans le tableau 8. Pour les PCB 28, 52 et 153, la LOD en solvant est de 0,1 pg/ $\mu$ L et la LOQ est de 0,5 pg/ $\mu$ L. Les LOD et LOQ des 4 autres congénères sont plus élevées. Concernant les PCB 101, 118, 138 et 180, la LOD en solvant est de 0,25 pg/ $\mu$ L. La LOQ est comprise entre 1 et 5 pg/ $\mu$ L pour les PCBs 101 et 118, entre 0,5 et 1 pour le PCB 180 et égale à 1 pour le PCB 138. Il sera par la suite nécessaire de déterminer la LOD et la LOQ en matrice. La figure 11 illustre les chromatogrammes en mode SIM du mélange à 0,5 pg/ $\mu$ L.

Tableau 8 Résultats de limite de détection et de quantification pour chaque PCB

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180
LOD (pg/μL)	0,1	0,1	0,25	0,25	0,1	0,25	0,25
LOQ (pg/μL)	0,5	0,5	[1-5]	[1-5]	0,5	1	[0,5-1]

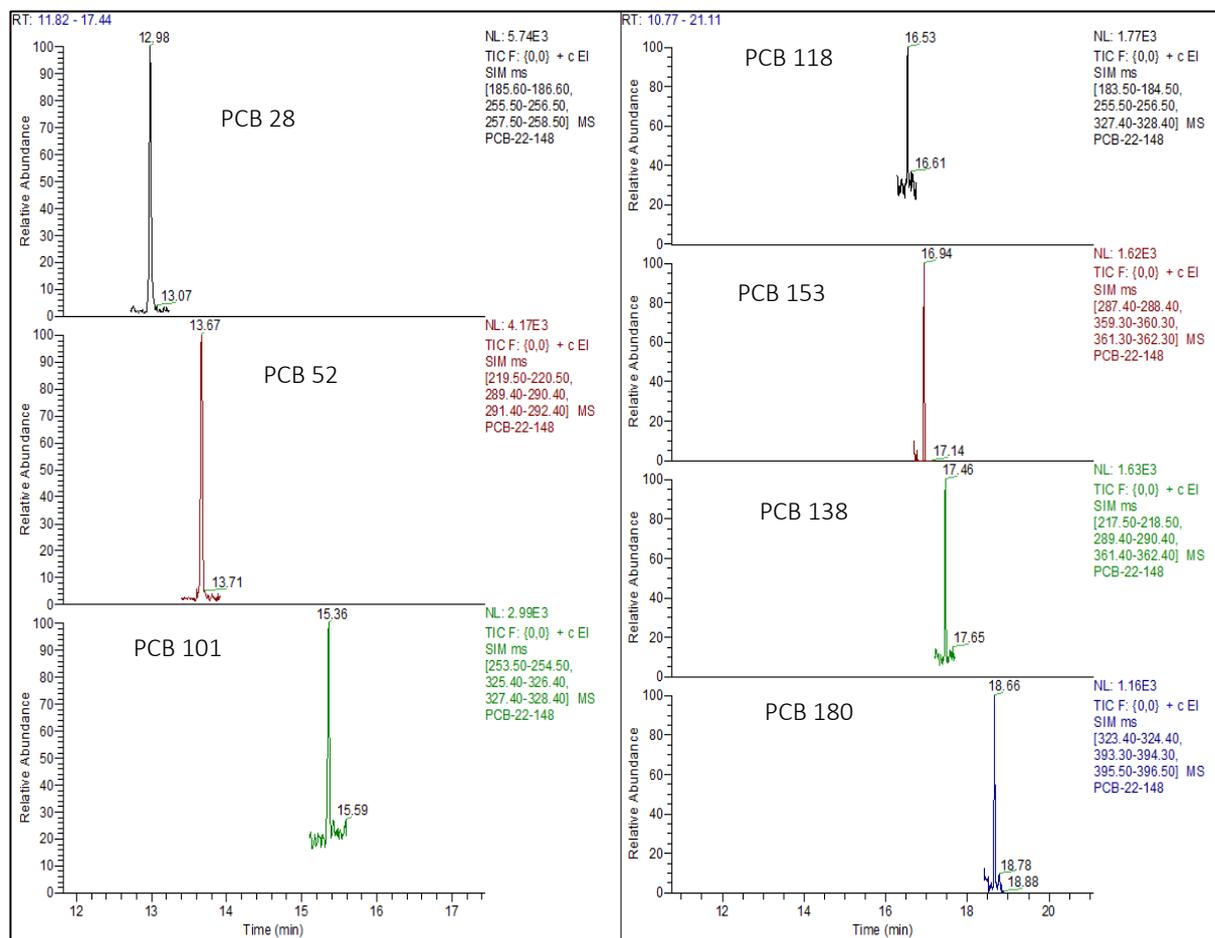


Figure 11 Chromatogrammes d'une analyse en mode SIM du mélange de PCBs à 0,5 pg/μL

#### IV.2.2. Performance de la gamme d'étalonnage

La détermination de la LOQ nous permet de choisir le point le plus bas de la gamme d'étalonnage, c'est à dire 0,5 pg/μL. Un modèle mathématique linéaire pour les PCB 28, 52, 101, 118, 180 et quadratique pour les PCBs 153 et 138 ainsi qu'une pondération de 1/X ont permis de tracer les courbes d'étalonnage pour chaque congénère avec des coefficients de régression compris entre 0,9996 et 0,9999. L'ajout d'un mélange de standard interne marqué <sup>13</sup>C a permis de corriger le manque de répétabilité observé lors des premières analyses. Les coefficients de variation calculés pour l'étude de répétabilité ainsi que l'exactitude sont inférieurs à 15 %. Cela confirme la robustesse des modèles choisis. La répétabilité et l'exactitude déterminées sur les solutions de contrôle qualité sont estimées respectivement par le coefficient de variation et le biais regroupés dans le tableau 9. Toutes les mesures sont inférieures à 15 %. Le modèle choisi pour la gamme d'étalonnage est donc validé.

Tableau 9 Répétabilité et justesse des solutions de contrôles à 2.5, 25 et 250 pg/μL dans l'hexane

	Contrôle Qualité	PCBs						
		28	52	101	118	153	138	180
Répétabilité CV (%)	QC 1	1,4	1,2	2,4	1,2	2,9	2,9	1,2
	QC 2	1	1,0	0,3	1,0	0,9	0,7	2,5
	QC 3	0,3	0,04	0,3	0,8	1,1	0,7	1,2
Justesse Biais (%)	QC 1	5,6	4,3	5,0	9,5	5,3	12,9	4,8
	QC 2	5	4,0	1,9	2,8	12,0	3,3	1,5
	QC 3	6,1	5,3	5,1	5,8	9,8	5,4	3,4

### IV.3. Extractions et optimisations

Afin de pouvoir calculer un rendement d'extraction et un effet matrice, il a fallu s'assurer que l'analyse de l'extrait matrice blanche ne détectait pas de PCBs. Un triplicat d'extraction sans dopage a donc été effectué et analysé en mode SIM ne détectant aucune molécule d'intérêt.

- Extraction avec le protocole de la figure 9 – avec un dopage à 25 pg/μL

Les premiers essais d'extraction avec la viande cuite lyophilisée et broyée ont été dopés avec le mélange de PCBs natifs à 25 pg/μL. En mode SIM, les interférences du bruit de fond couvrent la réponse des molécules d'intérêts. Les rendements d'extractions n'ont pas pu être calculés, mais le protocole a pu être optimisé. A titre d'exemple, les chromatogrammes de l'analyse SIM des PCBs 101, 28 et 138 sont en annexe 6. La suite du développement se fera en dopant la viande avec des mélanges à 250 pg/μL.

- **Essai 1** : Extraction QuEChERS avec le protocole indiqué figure 9 avec un dopage à 250 pg/μL

Lors de l'étape d'évaporation à sec, un précipité blanc sec a été observé dans le tube Eppendorf® 1,5 mL. Une étape de centrifugation de 5 min à 10000 rpm a été ajoutée avant la mise en vial et l'injection. Les coefficients de variations permettant d'estimer la répétabilité sont indiqués dans le tableau 10. Les injections d'extraits matrice blanche (EMB) dopé après extraction ont des coefficients de variations très élevés entre 11 et 60 %. Il est nécessaire d'améliorer cette valeur afin de pouvoir analyser les résultats. Cependant, en dopant avec un mélange à 250 pg/μL, le bruit de fond n'écrase pas le signal et il est possible d'intégrer les pics et de calculer un rendement et un effet matrice.

Tableau 10 Répétabilité de l'analyse des échantillons, des QCs et des EMB dopés de l'essai 1

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180
CV % Echantillon	13%	16%	16%	12%	16%	12%	17%
CV % EMB dopé	53%	11%	53%	52%	60%	57%	59%
CV% QC	2%	2%	2%	4%	4%	4%	5%

Les chromatogrammes de la figure 12 sont à la même échelle. Les chromatogrammes a et b provenant d'une extraction sans viande permettent d'observer les pics à 8,82 min à 17,42 min (ou 17,34 min) et à 26,41 min, résultants des réactifs utilisés durant l'extraction. Le chromatogramme b est un TIC de l'extraction du mélange des 7 PCBs sans viande, les mêmes pics que le chromatogramme a sont observés et le pic à 17,42 min est élargi. Le PCB 138 ayant un temps de rétention égal à 17,23 min et le composé à 17,42 min ayant des valeurs m/z communes, l'analyse en SIM peut être gênée (Annexe 6). Les chromatogrammes d, e et f sont les TIC des extraits matrices blanches non dopées et les PCBs ont des temps de rétention compris entre 12 min et 20 min (encadré en rouge). Ces chromatogrammes montrent la présence de molécules dans la matrice ayant des temps de rétention proches des molécules d'intérêts. De plus un pic à 23,11 min n'apparaissant qu'en présence de viande est dû à la matrice. Ces interférences n'ayant pas exactement les mêmes temps de rétention que les PCBs, ils pourraient ne pas gêner l'analyse, cependant, la précision du spectromètre de masse entraîne la détection d'interférences en mode SIM.

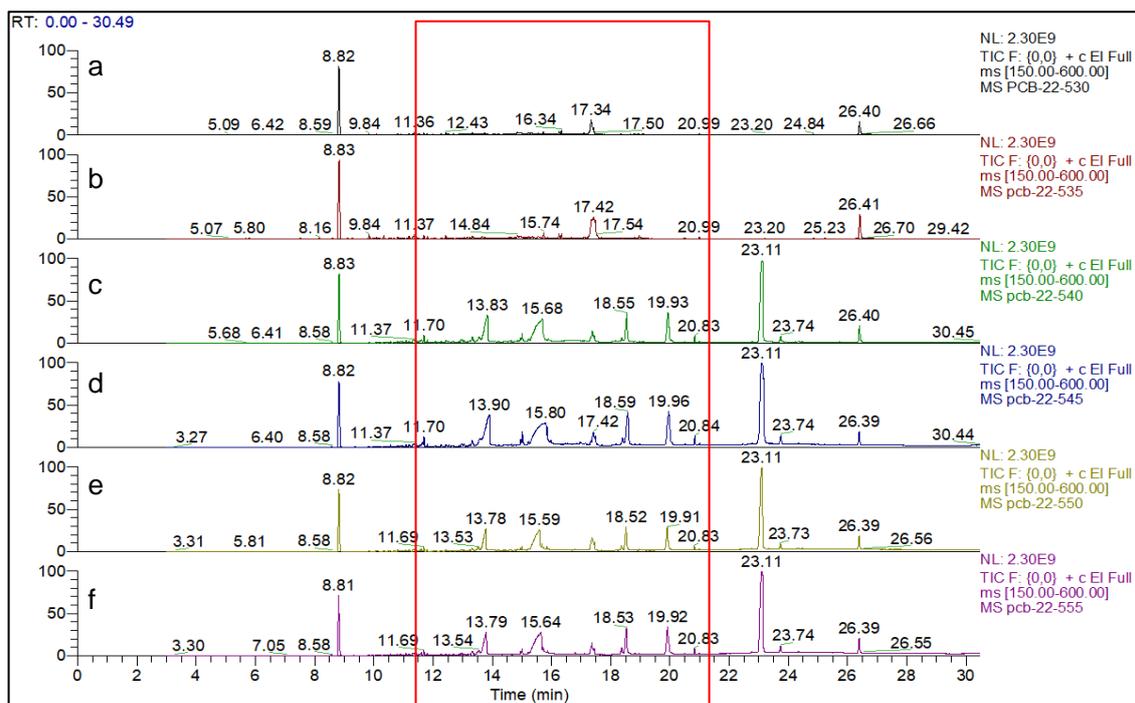


Figure 12 Comparaison des chromatogrammes TIC de l'essai 1

*a/ blanc non dopé, b/ blanc dopé avant, c/ Extrait Matrice Blanche dopé après, d/e/f Extrait Matrice Blanche non dopé. Encadré rouge : zone de détection des 7 PCBs.*

Les rendements d'extraction sont compris pour cette analyse entre 56 et 265 %. Les valeurs d'effets matrices sont tous négatifs et compris entre -10 et -77 %, il y aurait donc une perte de signal. Les rendements d'extractions ne sont pas exploitables (>200 %) et ne sont pas représentatifs de la possible efficacité de la méthode.

- **Essai 2** : Purification par SPE OASIS HLB Prime

La purification par SPE ne permet pas de récupérer la totalité des PCBs avec des rendements d'extraction compris entre 4 et 45 %. En observant le chromatogramme, très peu d'impuretés sont éliminées ou ont une baisse d'intensité.

- **Essai 3** : Extraction QuEChERS avec des sels dans un conditionnement différent

Une hypothèse de contamination ou de qualité des sels d'extraction a été vérifiée en changeant de conditionnement de sels. La répétabilité est vérifiée avec les calculs de coefficients de variation regroupés dans le tableau 11. Les rendements d'extractions sont compris entre 49 et 100 %. Le calcul de l'effet matrice est compris entre 3,7 et 15,1 % pour les PCBs 28, 118, 153 et 180 et entre -2,1 et -29,1 % pour les PCB 52 et 138. Les chromatogrammes présentent des interférences avec une plus faible intensité et les résultats de rendement d'extraction et surtout d'effet matrice sont améliorés. Ces sels seront utilisés pour la suite du développement de méthode.

Tableau 11 Répétabilité de l'analyse des échantillons, des QCs et des EMB dopés de l'essai 3

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180
CV % Echantillon	13%	13%	15%	15%	15%	21%	13%
CV % EMB dopé	15%	15%	14%	17%	17%	16%	16%
CV% QC	0,4%	1%	1%	1%	3%	1%	2%

- **Essai 4** : Purification d'une aliquote de 3mL

La répétabilité est vérifiée avec les calculs de coefficients de variation regroupés dans le tableau 12 et les coefficients sont homogènes et inférieurs à 10 %.

Tableau 12 Répétabilité de l'analyse des échantillons, des QCs et des EMB dopés de l'essai 4

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180
CV % Échantillon	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
CV % EMB dopé	2%	0,03%	1%	2%	2%	4%	4%
CV % QC	0,4%	1%	1%	1%	3%	1%	2%

Les rendements d'extractions sont homogènes et compris entre 54 et 73 %. L'effet matrice est majoritairement positif sauf pour le PCB 52 et 138. En valeur positive l'effet matrice est compris entre 0 et 25 % et en négatif entre -3 et -7 %.

La figure 13 permet de comparer les résultats rendements d'extraction des essais 1, 3 et 4 et permet de montrer une optimisation de la méthode d'extraction avec des rendements d'extractions exploitables. La figure 14 montre l'évolution de l'effet matrice qui est plus faible lors de l'essai 3. Les rendements d'extractions étant acceptables avec un dopage à 250 pg/μL, la prochaine étape est une

diminution de la concentration de dopage afin d'estimer une limite de détection en concevant un rendement satisfaisant.

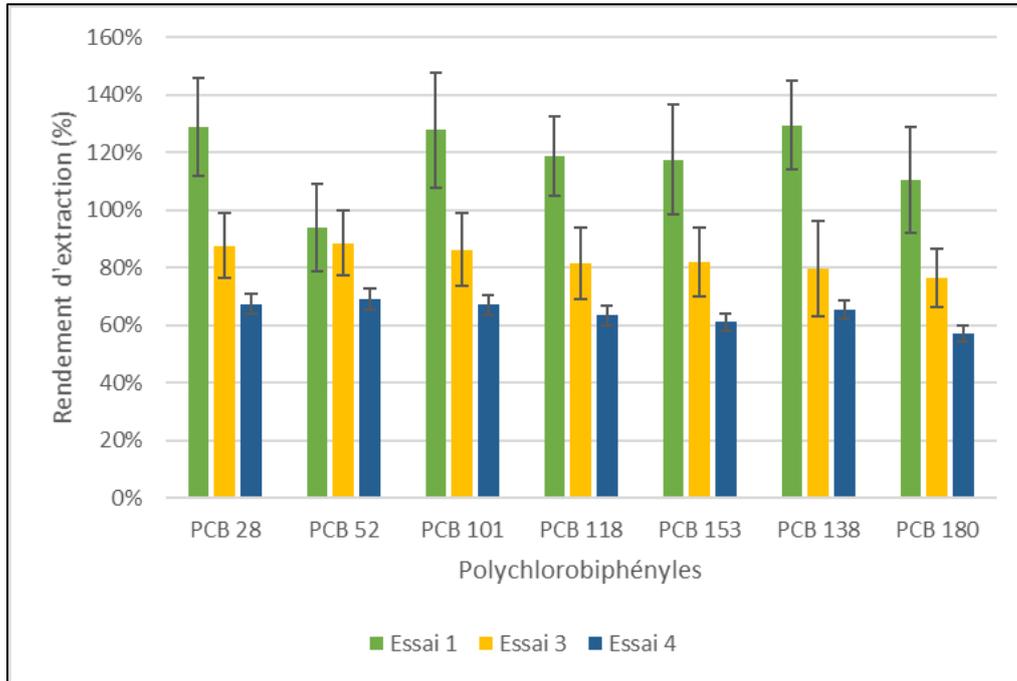


Figure 13 Comparaison du rendement d'extraction pour les essais 1, 3 et 4

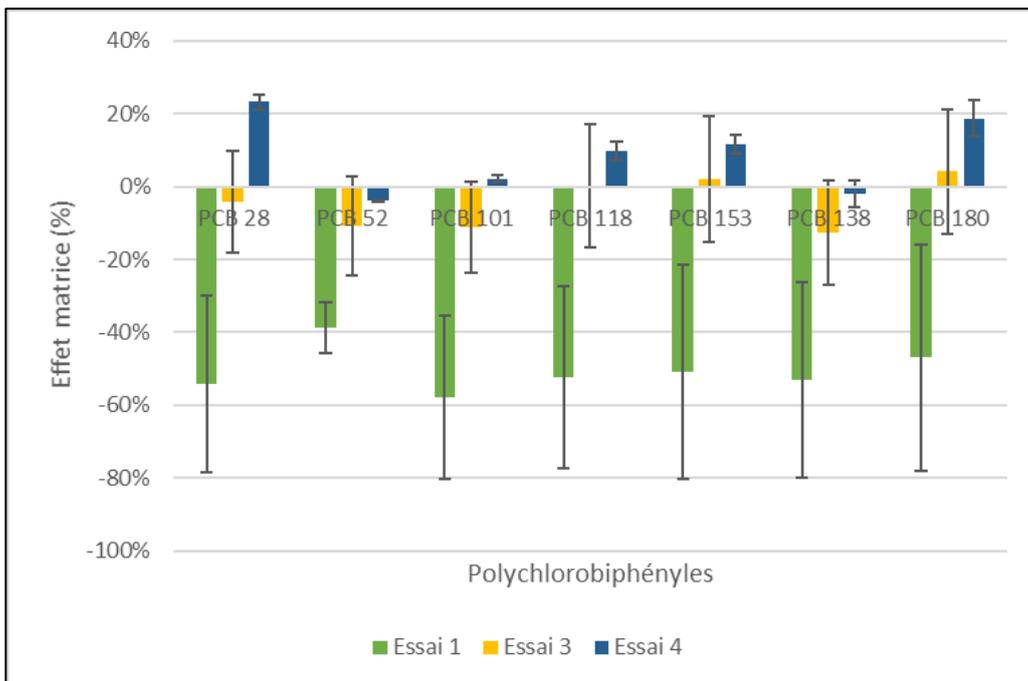


Figure 14 Comparaison de l'effet matrice pour les essais 1, 3 et 4

- **Essai 5, 6 et 7** : Extraction QuEChERS avec les sels en sachets sans aliquote avec un dopage à 100 pg/μL (essai 5), 50 pg/μL (essai 6) et 25 pg/μL (essai 7)

En diminuant la concentration de dopage, l'intégration des pics pour chaque PCB a dû être faite manuellement sauf pour le PCB 153. La figure 15 illustre les chromatogrammes des PCBs 52 et 153, les autres chromatogrammes sont en annexe 7. À partir de 25 pg/μL, le PCB 118 n'est plus détectable, voir annexe 7.

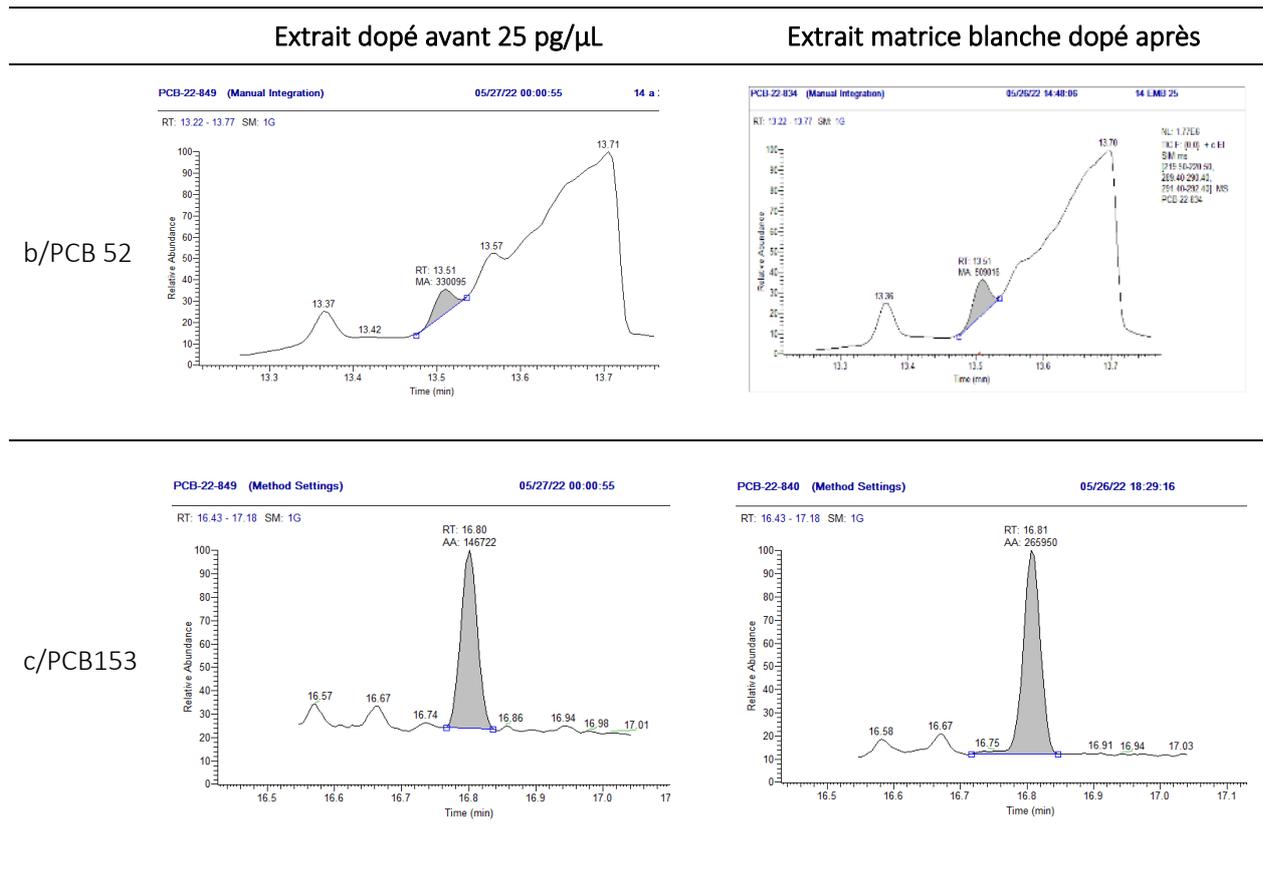


Figure 15 Chromatogramme SIM des PCBs 28, 52, 138 et 153 pour les essais 5,6 et 7 dopé à 25 pg/μL

Les rendements d'extractions de l'essai 5, 6 et 7 sont représentés dans la figure 16.

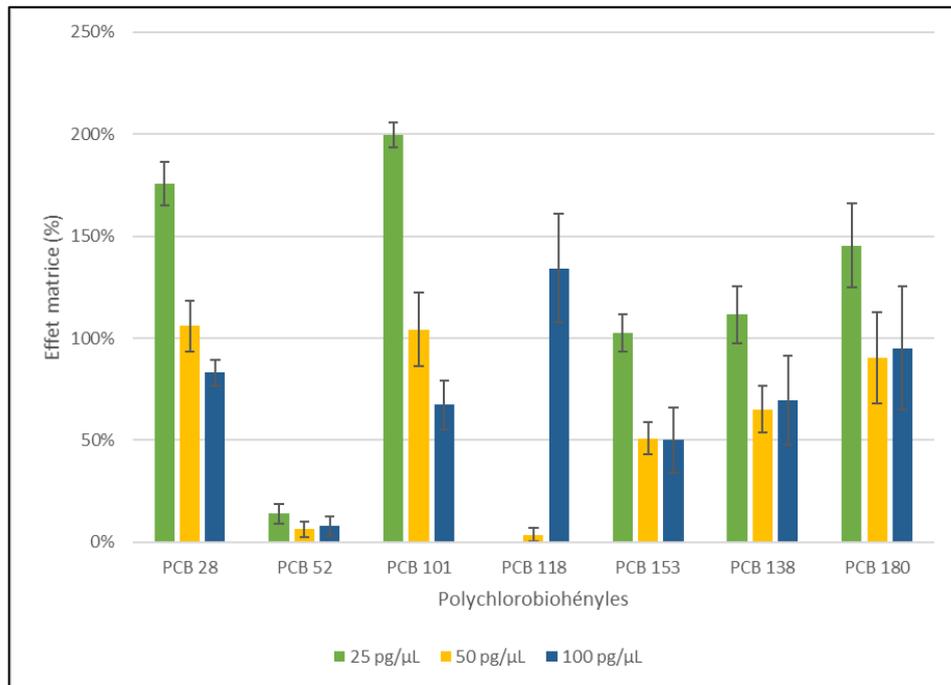


Figure 16 Rendement d'extraction avec un dopage de 25, 50 et 100 pg/μL pour chaque PCB

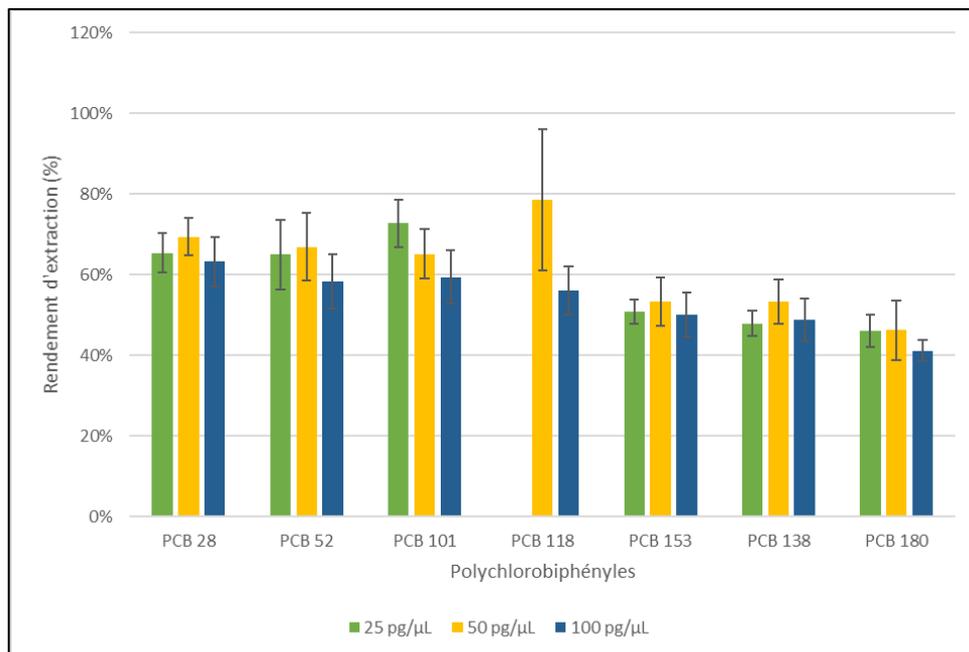


Figure 17 Effet matrice avec un dopage de 25, 50 et 100 pg/μL pour chaque PCB

Le rendement d'extraction est stable en fonction de la concentration. La figure 17 représente l'effet matrice. Toutes les valeurs sont positives et une diminution de l'effet matrice est observée lorsque la concentration augmente.

- **Essai 8** : Sans viande et uniquement l'extraction QuEChERS
- **Essai 9** : Sans viande et uniquement la purification QuEChERS

Ces essais ont pour objectif d'essayer de discriminer l'étape QuEChERS interférant avec l'analyse des PCBs et les étapes ont été préparés séparément.

La figure 18 montre les chromatogrammes à la même échelle avec les triplicats de chaque essai. À 17,45 min, un pic est détecté au niveau de l'étape d'extraction et non au niveau de l'étape de purification. Comme vu dans l'essai 1, le PCB 138 sort à un temps de rétention de 17,23 min et le pic d'interférences dû aux réactifs de la méthode d'extraction qui étaient retrouvés lors de l'analyse du blanc de l'essai.

Cela signifie que même en enchaînant l'étape de purification (dSPE) après l'étape d'extraction, cette interférence n'est pas éliminée. Ces interférences pourraient être contournées en mode SIM mais la précision de l'appareil utilisé ne le permet pas. De plus, la présence d'eau a été observée dans le solvant d'extraction lors d'une étape de congélation.

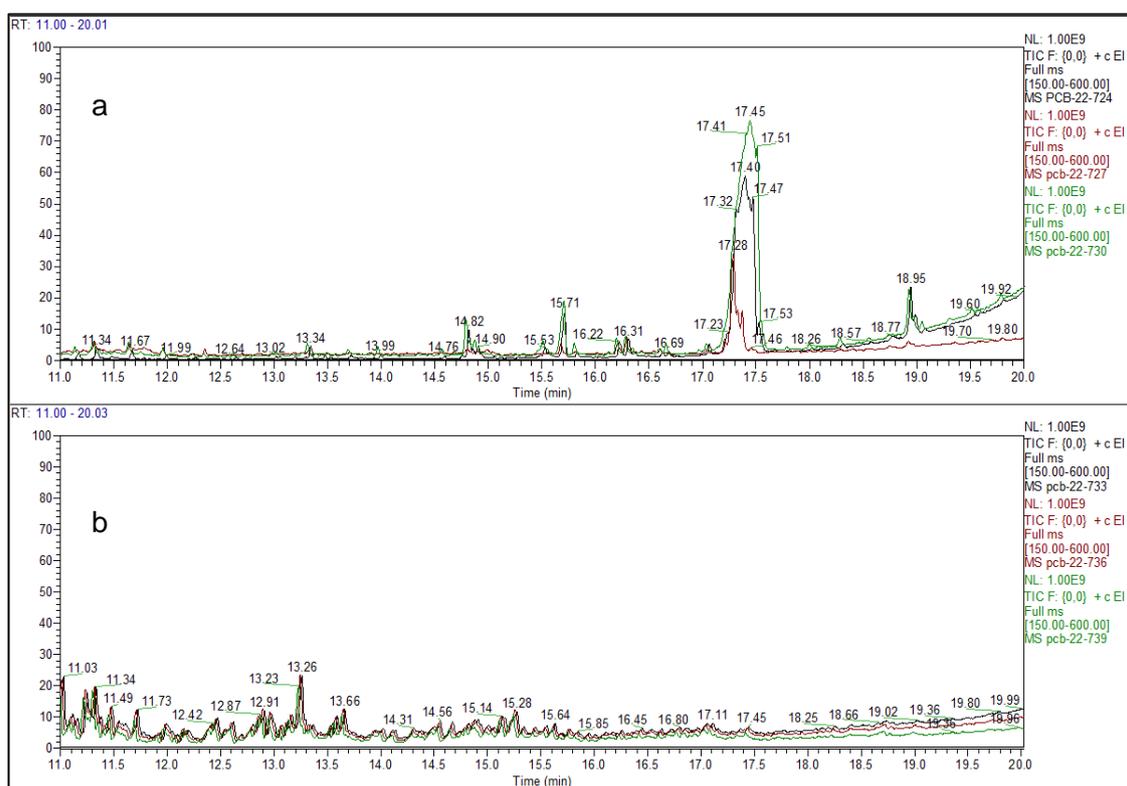


Figure 18 Chromatogramme TIC de l'essai 8 (a) et 9 (b) au niveau de la zone de détection des 7 PCBs

Les essais 10 et 11 ne seront pas développés dans ce document, les résultats étant en cours d'analyse.

#### IV.4. Bilan de l'optimisation et perspectives

L'optimisation de notre méthode d'étude a débuté par la mise en place d'un protocole QuEChERS permettant d'hydrater suffisamment la viande et d'obtenir un extrait limpide injectable. Les premiers essais ont vite montré que la matrice de viande était riche en impuretés (matière grasse, protéines...) ne permettant pas d'estimer un rendement d'extraction, l'appareil analytique ne permettant pas de différencier les impuretés des molécules d'intérêt. La purification a donc été une étape clé du développement de méthode afin de limiter les interférences situées dans la gamme de temps de rétention étudiée [12 - 19] min. La concentration de dopage multipliée par 10 (250 pg/ $\mu$ L) a permis de détecter les PCBs et d'observer des différences lors des optimisations. Malgré une centrifugation de l'extrait avant l'injection, de nombreux encrassements de la colonne chromatographique ainsi que de la source d'ionisation ont été observés à la suite de la présence de lipides et ou de réactifs QuEChERS. En effet, l'essai 8 a particulièrement encrassé la colonne.

L'objectif de cet essai était dans un deuxième temps de doper les solutions afin d'estimer l'effet matrice, mais l'encrassement de la tête de colonne a élargi le signal et a diminué l'intensité de la réponse, les chromatogrammes n'ont donc pas pu être analysés. Des améliorations au niveau de la maintenance préventive du GC-MS ont été mises en place. Après les injections des essais présentant un nombre important d'interférence à l'analyse, la tête de colonne avait été coupée puis la colonne avait été changée. Des mesures ont été mises en place afin de limiter la multiplication des contaminations. Le nombre de rinçage de l'aiguille a été augmenté et a été fait dans 3 bains d'hexane différents avant l'injection et un autre bain après l'injection. Toutes les 100 injections le septum est surveillé et changé régulièrement (toutes les 300 injections environ). Les derniers essais ont montré que les réactifs QuEChERS de l'étape d'extraction entraînaient, en GC-MS, des interférences et particulièrement à 17,3 minutes dans la fenêtre de détection du PCB 138. En mode SIM, les interférences entourant les pics d'intérêts peuvent aussi s'expliquer par la résolution du spectromètre de masse qui ne permet pas une détection précise de la valeur m/z. Le protocole de l'essai 3 dopé à 100 pg/ $\mu$ L est retenu à ce stade du développement, il permet d'obtenir un rendement d'extraction compris entre 41 et 79 %. L'extraction nécessite des améliorations, cependant l'étape de purification est une étape essentielle des perspectives. Les perspectives concernant l'extraction sont une extraction liquide-liquide avec hydratation de la viande avec l'hexane ou l'acétate d'éthyle afin d'extraire les lipides et les PCBs. Cette technique nécessite des précautions, en effet, un essai non exposé dans ce papier (avec la matrice de viande cuite, lyophilisée et broyée) consistait à extraire les PCBs avec de l'hexane ou de l'acétate d'éthyle. Les vials contenant l'extrait dans l'hexane sont conservés à 6° C montraient la présence de matières grasses solidifiées jaune/blanche qui à température ambiante se liquéfiaient. La perspective pour la purification par extraction sur phase solide dispersive est l'ajout d'adsorbants spécifiques et de

varier les quantités. L'utilisation d'adsorbants spécifiques au nettoyage de matière grasse sera la première étape, l'ajout du Florisil® a été testé et a permis d'obtenir des résultats prometteurs. L'ajout de Florisil® durant l'étape de purification a permis d'obtenir un rendement d'extraction de 67 à 86 %. Des essais ont été effectués avec 150, 300 et 900 g de Florisil®. Des périodes de froid à 4 °C ou à -20 °C ainsi que des centrifugations à froid sont aussi prévus pour éliminer un culot d'impuretés si possible ou pour vérifier la présence ou non de matière grasse qui risqueraient d'abîmer l'appareil analytique. Des essais sont encore en cours : utilisation d'une technique d'extraction liquide-liquide après réhydratation de la viande avec de l'hexane ou de l'acétate d'éthyle, purification par extraction sur phase solide.

## Discussion - Conclusion

---

Le projet portait sur le développement d'une méthode d'extraction de traces de polychlorobiphényles dans la sous-noix de jambon de porc de manière rapide, peu coûteuse, simple, robuste et sûre. La méthode QuEChERS a donc été choisie comme socle de travail pour ce développement avec une analyse par GC-MS simple quadripôle.

L'objectif global du projet SENTINEL est la sécurité alimentaire avec l'amélioration de la détection et du dosage de traces de molécules chimiques dans les aliments et particulièrement dans la viande. Ce travail s'inscrit dans un projet de *sample pooling* qui a montré des résultats prometteurs en terme d'efficacité, de sensibilité et de maîtrise des coûts (48). Cependant, l'étape d'extraction reste une étape critique car chronophage, nécessitant des appareils spécifiques et une grande quantité de solvant. L'objectif est donc d'optimiser cette étape afin d'augmenter le nombre de contrôles par la suite sur le terrain par les industriels mais aussi les organismes de contrôles.

Plusieurs optimisations ont été nécessaires afin d'extraire et de purifier les PCBs. Le morceau de viande a été choisi pour son homogénéité ainsi que pour son faible taux de matière grasse cependant, la lyophilisation permettant d'analyser l'ensemble du morceau entraîne une concentration de cette matière grasse et des substances pouvant interférer lors de l'analyse. En routine, la matière grasse composée de lipides et d'acides gras peut être analysée en GC-MS mais en subissant généralement des dérivatisations au préalable permettant de les rendre plus volatils (52). Dans ce projet, la présence de matière grasse lors de l'analyse a entraîné un encrassement régulier de la colonne chromatographique et donc la mise en place d'une maintenance préventive : changement régulier du septum, du liner, coupe de la tête de la colonne, changement de la colonne, changement et lavage de l'aiguille de l'injection. De plus, l'extraction d'un mélange de PCB sans viande a montré des interférences dues aux réactifs utilisés pour l'extraction (essai 1 et 8). Les réactifs utilisés lors de la première étape du protocole QuEChERS ont un temps de rétention proche du PCB 138 et ne permettent pas d'obtenir un bruit de fond négligeable avec l'appareil analytique utilisé. Ces essais ont donc permis de retenir une méthode d'extraction (protocole de l'essai 3) avec un rendement entre 41 et 79 % et un effet matrice entre 6 et 130%. Ce développement a aussi permis de connaître les voies d'optimisation à explorer. Les perspectives sont d'extraire les PCBs stockés dans les lipides par une extraction liquide-liquide avec de l'hexane ou de l'acétate d'éthyle avec ou sans hydratation de la viande au préalable, ainsi que de jouer sur le pH pour optimiser l'extraction. De plus, des tubes en plastiques ont été utilisés tout le long des analyses et par la suite le verre sera privilégié. Concernant la purification, la prochaine étape est de tester l'ajout de Florisil® dans différentes proportions et d'ajouter une étape de froid à 4°C ou à -20°C avec l'ajout possible d'une centrifugation à froid. L'ajout de Florisil® durant l'étape de purification a été

fait par la suite et a permis d'obtenir un rendement d'extraction de 67 à 86 %. De plus, des essais avec des extractions sur phase solide (SPE) sont testés en étape de purification.

Finalement, il est important de rappeler les limites de détection de la technique utilisant un spectromètre de masse simple quadripôle, instrument basse résolution ne permettant pas une précision de valeurs  $m/z$ . L'utilisation de la technique  $MS^n$  avec l'analyse des transitions, ou l'utilisation d'un spectromètre haute résolution pourraient améliorer l'analyse des extractions en apportant une meilleure sélectivité de détection et une précision de masse. La suite du projet sera donc de tester la technique d'extraction validée en chromatographie gazeuse – MS simple quadripôle avec une chromatographie gazeuse couplée à un « orbitrap » par l'équipe travaillant sur la *sample pooling*. Cette optimisation de l'extraction de polychlorobiphényles dans la viande de porc par la méthode QuEChERS est toujours en cours de développement par le Dr. Sylvie Chevolleau à l'Inrae de Toulouse au sein de laboratoire Métatoul-AXIOM Toxalim et semble prometteur pour la suite du projet SENTINEL.

## Références bibliographiques

---

1. Jean Pierre Poulain. De la perception des risques à la prise en compte des inquiétudes alimentaires. 2016;
2. Borchers A, Teuber SS, Keen CL, Gershwin ME. Food Safety. Clin Rev Allergy Immunol. oct 2010;39(2):95-141.
3. Fung F, Wang HS, Menon S. Food safety in the 21st century. Biomed J. avr 2018;41(2):88-95.
4. Lebelo K, Malebo N, Mochane MJ, Masinde M. Chemical Contamination Pathways and the Food Safety Implications along the Various Stages of Food Production: A Review. Int J Environ Res Public Health. 28 mai 2021;18(11):5795.
5. European Court of Auditors. Dangers chimiques dans notre alimentation: la politique de l'UE en matière de sécurité alimentaire nous protège, mais tout n'est pas réglé. Rapport spécial n° 02, 2019. [Internet]. LU: Publications Office; 2019 [cité 2 févr 2023]. Disponible sur: <https://data.europa.eu/doi/10.2865/759731>
6. Ensuring food is safe: the veterinary and phytosanitary system of the European Union explained. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2017.
7. Parlement européen. Règlement n° 178/2002 du parlement européen et du conseil. janv 2002;
8. Parlement européen. Règlement (UE) 2019/1381 du Parlement européen et du conseil relatif à la transparence et la pérennité de l'évaluation des risques de l'Union dans la chaîne alimentaire. sept 2019;
9. Houpert A, Botrel. Rapport d'information fait au nom de la commission des finances sur les moyens de la politique de sécurité sanitaire des aliments. févr 2017;
10. Christian Babusiaux, Marion Guillau. La politique de sécurité sanitaire des aliments. juin 2014;
11. Plateforme de surveillance de la Chaîne Alimentaire [Internet]. Plateforme de surveillance de la Chaîne Alimentaire. Disponible sur: <https://www.plateforme-sca.fr/page/qui-sommes-nous>
12. Law JWF, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. Front Microbiol [Internet]. 12 janv 2015 [cité 11 déc 2022];5. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00770/abstract>
13. Domínguez I, Garrido Frenich A, Romero-González R. Mass spectrometry approaches to ensure food safety. Anal Methods. 2020;12(9):1148-62.
14. Erwan Engel. SENTINEL : Des outils de screening haut-débit pour une surveillance renforcée de la sécurité chimique des viandes. [Internet]. Disponible sur: <https://sentinel.ifip.asso.fr>
15. Engel Engel. Des outils pour renforcer la surveillance des contaminants chimiques des aliments.
16. Erwan Engel. Des outils de screening haut-débit pour une surveillance renforcée de la sécurité

chimique des aliments – SENTINEL [Internet]. Agence Nationale de Recherche. 2021 [cité 15 déc 2022]. Disponible sur: <https://anr.fr/Projet-ANR-19-CE21-0011>

17. INRS. Biphényles chlorés, Fiche toxicologique n°194. 2007; Disponible sur: [www.inrs.fr/fichetox](http://www.inrs.fr/fichetox)
18. M. Pellet et al. Contamination du milieu naturel par les polychlorobiphényles (PCB) : connaissance du polluant et techniques de dépollution. BRGM. 1 sept 1993;
19. Lucile Montestrucq. Les PCBs (Polychlorobiphényles). Observatoire Régional de la santé Rhône-Alpes; 2008.
20. Chevallier A, Bui LC, Coumoul X. Le récepteur de la dioxine : rôle endogène et médiateur de la toxicité de la dioxine. Cah Nutr Diététique. avr 2011;46(2):67-74.
21. Karim A, Lucie B, Kévin JB, Kévin J. Les polychlorobiphényles. Un problème nouveau pour une pollution ancienne. 2010;68.
22. Brignon JM, Gouzy A. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Les polyChloroBiphenyles (PCB). 2011;89 p.
23. Whyllie P, Wagner, Urs. Les inventaires des PCB Le point de départ. 2010; Disponible sur: [www.pops.int/pen](http://www.pops.int/pen)
24. Nations Unis. Manuel de formation visant la préparation d'un Plan National pour la Gestion Ecologiquement Rationnelle des PCBs et des équipements contaminés aux PCBs dans le cadre de la mise en oeuvre de la Convention de Bâle. 2001.
25. République Française. Plan national d'actions sur les polychlorobiphényles (PCB). févr 2008;
26. Jensen S. The PCB Story. 1972;1(4):9.
27. Mwanza MM, Ndunda EN, Bosire GO, Nyamori VO, Martincigh BS. Advances in sample pretreatment and detection of PCBs in the environment. J Hazard Mater Adv. déc 2021;4:100028.
28. Kuzukiran O, Filazi A. Determination of Selected Polychlorinated Biphenyl Residues in Meat Products by QuEChERS Method Coupled with Gas Chromatography–Mass Spectrometry. Food Anal Methods. juill 2016;9(7):1867-75.
29. Mendola P, Buck GM, Sever LE, Zielezny M, Vena JE. Consumption of PCB-contaminated Freshwater Fish and Shortened Menstrual Cycle Length. Am J Epidemiol. 1 déc 1997;146(11):955-60.
30. Dallinga JW. Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood. Hum Reprod. 1 août 2002;17(8):1973-9.
31. Langer P, Kocan A, Tajtáková M, Petřík J, Chovancová J, Drobná B, et al. Possible Effects of Polychlorinated Biphenyls and Organochlorinated Pesticides on the Thyroid after Long-term Exposure to Heavy Environmental Pollution: J Occup Environ Med. mai 2003;45(5):526-32.
32. Moore M, Mustain M, Daniel K, Chen I, Safe S, Zacharewski T, et al. Antiestrogenic Activity of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyl Congeners Identified in Human Serum. Toxicol Appl Pharmacol. janv 1997;142(1):160-8.

33. Kilburn KH. Visual and neurobehavioral impairment associated with polychlorinated biphenyls. *Neurotoxicology*. août 2000;21(4):489-99.
34. Schantz SL, Gasior DM, Polverejan E, McCaffrey RJ, Sweeney AM, Humphrey HE, et al. Impairments of memory and learning in older adults exposed to polychlorinated biphenyls via consumption of Great Lakes fish. *Environ Health Perspect*. juin 2001;109(6):605-11.
35. Brunet J, Darmendrail D, Roy S. Etat des lieux sur la pollution des fleuves par les PCB dans le monde Actions des pouvoirs publics Exemples de décontamination. 2007;
36. Mitra S, éditeur. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Hoboken, N.J.: J. Wiley; 2003. 458 p. (Chemical analysis).
37. Reddy et al. AVB. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment: Recent updates on sampling, pretreatment, cleanup technologies and their analysis. *Chem Eng J*. févr 2019;358:1186-207.
38. Lahmanov DE, Varakina YI. A short review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in fatty samples. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 13 mai 2019;263:012061.
39. Tapie et al. Fast and efficient extraction methods for the analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in biological matrices. *Anal Bioanal Chem*. juill 2008;391(6):2169-77.
40. Müller A, Björklund E, von Holst C. On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*. août 2001;925(1-2):197-205.
41. Zheng B, Hu H, Zhang X, Guo Y, Zhang X, Xue L, et al. Sample Pretreatment Method for Determination of Indicator Polychlorinated Biphenyls in Seafood using Ultrasonic Extraction Followed by Dispersive Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography – Electron Capture Detection. *J Chromatogr Sci*. 1 juill 2018;56(6):555-63.
42. Castillo M, González C, Miralles A. An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS. *Anal Bioanal Chem*. mai 2011;400(5):1315-28.
43. Chamkasem et al., Tiffany. Analysis of 19 PCB congeners in catfish tissue using a modified QuEChERS method with GC–MS/MS. *Food Chem*. févr 2016;192:900-6.
44. Chiesa LM, Nobile M, Malandra R, Pessina D, Panseri S, Labella GF, et al. Food safety traits of mussels and clams: distribution of PCBs, PBDEs, OCPs, PAHs and PFASs in sample from different areas using HRMS-Orbitrap® and modified QuEChERS extraction followed by GC-MS/MS. *Food Addit Contam Part A*. 4 mai 2018;35(5):959-71.
45. Liu T, Zhou J, He L, Gan J. Determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in Chinese mitten crabs ( *Eriocheir sinensis* ) using modified QuEChERS followed by GC-MS. *Anal Methods*. 2020;12(18):2398-406.

46. Madureira TV, Santos C, Velhote S, Cruzeiro C, Rocha E, Rocha MJ. Contamination levels of polychlorinated biphenyls in wild versus cultivated samples of female and male mussels (*Mytilus* sp.) from the Northwest Coast of Iberian Peninsula—new application for QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) methodology. *Environ Sci Pollut Res*. janv 2014;21(2):1528-40.
47. Buah-Kwofie A, Humphries MS. Validation of a modified QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in fatty biological tissues using two-dimensional gas chromatography. *J Chromatogr B*. janv 2019;1105:85-92.
48. Nguyen TL, Ratel J. Faisabilité d'analyser des mélanges d'échantillons pour améliorer la surveillance des contaminants chimiques des aliments: cas des polychlorobiphényles (PCB) dans la viande. sept 2021;31.
49. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and « dispersive solid-phase extraction » for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int*. avr 2003;86(2):412-31.
50. Kim L, Lee D, Cho HK, Choi SD. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. *Trends Environ Anal Chem*. avr 2019;22:e00063.
51. Planche C, Ratel J, Mercier F, Blinet P, Debrauwer L, Engel E. Assessment of comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry based methods for investigating 206 dioxin-like micropollutants in animal-derived food matrices. *J Chromatogr A*. mai 2015;1392:74-81.
52. Ollivier V, Ollivier D, Artaud J. *Analyse des lipides*. 2015;28.

## Annexes

---

Annexe 1. Infographie des contaminants dans la chaîne alimentaire (EFSA, 2017).....	63
Annexe 2. Principaux fabricants et noms usuels de produits contenant des PCB (19) .....	64
Annexe 3. Réglementation européenne : nouvelles teneurs maximales dès le 1 <sup>er</sup> janvier 2023 .....	65
Annexe 4. Protocole d'extraction QuEChERS originale et méthode officielle AOAC 2007.01.....	66
Annexe 5. Volume nécessaire pour la préparation des solutions .....	67
Annexe 5.1. Préparation des solutions pour la détermination de la LOD et LOQ.....	67
Annexe 5.2. Préparation des solutions de la gamme d'étalonnage.....	67
Annexe 6. Chromatogramme en mode SIM de l'extraction avec la viande cuite lyophilisée et broyée .....	68
Annexe 7. Chromatogrammes de l'essai 7 dopé à 25 pg/μL.....	69

## Annexe 1. Infographie des contaminants dans la chaîne alimentaire (EFSA, 2017)

# Contaminants dans la chaîne alimentaire

Les niveaux de contaminants dans l'alimentation humaine et animale sont généralement trop faibles pour porter gravement atteinte à la santé des consommateurs ou des animaux mais ils peuvent engendrer des effets tels qu'une intoxication alimentaire, et leur présence ou leur accumulation au fil du temps sont susceptibles d'affecter la santé humaine ou animale.

## QUELS TYPES DE CONTAMINANTS TROUVE-T-ON DANS L'ALIMENTATION HUMAINE ET ANIMALE?



### Toxines naturelles

Issues de champignons, d'algues ou de plantes, notamment certaines mauvaises herbes ou plancton marin

### Métaux et substances inorganiques

Plomb, mercure et substances telles que nitrates ou fluor

### Médicaments vétérinaires non autorisés

Utilisation interdite chez les animaux producteurs d'aliments

### Contaminants environnementaux

Produits chimiques industriels ou d'usage courant présents dans l'air, les sols ou l'eau

### Contaminants de transformation

Contaminants générés par des procédés tels que la cuisson à haute température

## COMMENT PROTÈGE-T-ON LES CONSOMMATEURS & LES ANIMAUX?



### COLLECTE DES DONNÉES

Les États membres signalent à l'EFSA si des aliments sont contaminés et dans quelle mesure



### ÉVALUATION DES RISQUES

Les scientifiques réalisent une estimation de l'exposition humaine et animale à ces contaminants et les risques potentiels



### GESTION DES RISQUES

Ces données et ces avis constituent un fondement scientifique pour les décisions prises par les gestionnaires du risque

Consultez le dossier de l'EFSA à ce sujet: [www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/contaminantsfoodfeed](http://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/contaminantsfoodfeed)

 [efsa.europa.eu](http://efsa.europa.eu)

© Autorité européenne de sécurité des aliments, 2017. La reproduction est autorisée, sauf à des fins commerciales, moyennant mention de la source.

ISBN 978-92-9199-918-7 | DOI: 10.2805/148420 | TM-04-17-039-FR-N

 **efsa**  
European Food Safety Authority

Annexe 2. Principaux fabricants et noms usuels de produits contenant des PCB (18)

PAYS	NOMS COMMERCIAUX	FIRMES
U.S.A.	Asbestol Chlorextol Diaclor Dykanol Elemex Hyvol Inerteen No-Flamol Pyranol Saf-T-Kuhl Therminol Aroclor	American Corporation Allis Chlamers Sangamo Electric Cornell Dubilier Mac Graw Edison Acrovox Westinghouse Electric Wagner Electric General Electric Kuhlman Electric Monsanto Monsanto
G.B.	Aroclor	Monsanto
R.F.A	Clophen	Farbenfabriken Bayer
France	Phenoclor Pyralène Electrophényle	Rhône-Poulenc Prodélec Ugine-Kuhlman
U.R.S.S.	Soval	Sovol
Tchécoslovaquie	Delor	Chemko
Japon	Santotherm Kanechlor	Mitsubishi-Monsanto Kanegafuchi Chem. Co.
Italie	Fenclor D.K.	Caffaro Caffaro

### Annexe 3. Réglementation européenne : nouvelles teneurs maximales dès le 1<sup>er</sup> janvier 2023

Règlement UR n°2022/2022

Teneurs maximales précisées et/ou mises en place :

Catégories d'aliments	Somme des dioxines (OMSPCDD/FTEQ)*	Somme des dioxines et PCB de type dioxine (OMS-PCDD/FPCB-TEQ)*	Somme des PCB28, PCB52, PCB101, PCB138, PCB153 et PCB180 (ICES - 6)*
	<i>(en pg/g de graisses)**</i>	<i>(en pg/g de graisses)**</i>	<i>(en ng/g de graisses)**</i>
Lait cru et produits laitiers, y compris matière grasse butyrique	2.0	4.0	40
Œufs de volailles et ovoproduits à l'exception des œufs d'oie	2.5	5.0	40
Viandes et produits à base de viandes (à l'exclusion des abats comestibles) provenant des animaux suivants :			
Bovins, ovins et caprins	2.5	4.0	40
Volailles	1.75	3.0	40
Porcs	1.0	1.25	40
Chevaux	5.0	10.0	
Lapins	1.0	1.5	
Sangliers ( <i>Sus scrofa</i> )	5.0	10.0	
Gibier à plumes sauvages	2.0	4.0	
Cervidés	3.0	7.5	
	<i>(en pg/g de poids à l'état frais)</i>	<i>(en pg/g de poids à l'état frais)</i>	<i>(en ng/g de poids à l'état frais)</i>
Foie de bovins, de caprins, de volailles, de porcs et de chevaux et de produits qui en sont dérivés	0.30	0.50	3.0
Foie d'ovins et produits qui en sont dérivés	1.25	2.00	3.0
Foie de gibier à plumes sauvages	2.5	5.0	

## Annexe 4. Protocole d'extraction QuEChERS originale et méthode officielle AOAC 2007.01

**PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS**  
 Extraction sur phase solide | QuEChERS Interchim®

**QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)**

Depuis plus de 30 ans, les méthodes d'extraction de pesticides évoluent pour devenir de plus en plus sûres et robustes. La littérature initiale faisait mention de l'utilisation des techniques d'extraction liquide/liquide et de SPE en phase dispersée (dSPE), cependant ces méthodes ont nécessité une amélioration pour éviter les problèmes d'émulsion, de perte de rendement, de consommation de solvants élevée et ainsi répondre aux nouvelles obligations des analystes utilisant des instruments et colonnes d'analyse devenant de plus en plus sensibles. C'est pourquoi aujourd'hui les consommables QuEChERS sont largement utilisés pour l'extraction rapide, simple et robuste, des pesticides contenus dans les aliments de consommation courante (fruits, légumes, viandes, poissons, etc...).

QuEChERS est une méthode développée et publiée depuis 2003 par le département recherche du ministère de l'agriculture américaine. Aujourd'hui, elle permet la purification de plus de 200 composés de polarités diverses avec des taux de recouvrement supérieurs à 85 %.

Les QuEChERS Interchim® sont tous réalisés à partir d'adsorbants de haute pureté remplis dans des tubes à centrifuger de différents volumes garantis sans extractibles.

Les adsorbants utilisés sont :

- Le sulfate de magnésium anhydre : élimine les traces d'eau pour une meilleure dispersion des composés de l'échantillon et facilite le traitement de la phase organique.
- De la silice greffée PSA (Primary Secondary Amine) : retire les composés acides, les pigments polaires, les sucres et acides gras de la matrice.
- De la silice greffée C18 : purifie la matrice des lipides et stéroïls.
- Le carbone graphite (PGC) : élimine les pigments comme la chlorophylle ainsi que les molécules à structures planaires et les caroténoïdes.

QuEChERS Méthode ORIGINALE	QuEChERS Méthode AOAC 2007.01	QuEChERS Méthode EN 15662
<b>Etape 1 - Extraction Liquide/Liquide</b>		
Ajouter 10 ml d'Acétonitrile à 10 g d'échantillon dans un tube à centrifuger de 50 ml contenant 4 g MgSO <sub>4</sub> anhydre et 1 g NaCl. Ajouter le standard interne Agitation et Centrifugation	Ajouter 15 ml d'une solution Acétonitrile/Ac. Acétique 1 % à 15 g d'échantillon dans un tube à centrifuger de 50 ml contenant 6 g MgSO <sub>4</sub> anhydre et 1,5 g d'Acétate Na. Ajouter le standard interne Agitation et Centrifugation	Ajouter 10 ml d'Acétonitrile à 10 g d'échantillon dans un tube à centrifuger de 50 ml contenant 4 g MgSO <sub>4</sub> anhydre, 1 g NaCl, 1 g Na <sub>2</sub> Citrate Dihydrate et 0,5 g Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Citrate Sesquihydrate. Ajouter le standard interne Agitation et Centrifugation
Récupérer 1 ml de surnageant	Récupérer 1 à 8 ml de surnageant	Récupérer X ml de surnageant
<b>Etape 2 - Purification en phase SPE dispersée (dSPE)</b>		
Transférer le surnageant de l'étape 1 dans un tube à centrifuger contenant 150 mg MgSO <sub>4</sub> anhydre et 50 mg PSA. Agitation et Centrifugation	Transférer le surnageant de l'étape 1 dans un tube à centrifuger contenant 150 mg MgSO <sub>4</sub> anhydre et 50 mg PSA par ml de surnageant. Agitation et Centrifugation	Transférer le surnageant de l'étape 1 dans un tube à centrifuger contenant X*150 mg MgSO <sub>4</sub> anhydre et X*25 mg PSA. Du carbone graphite peut-être ajouté pour les échantillons contenant des concentrations importantes de chlorophylle et/ou de caroténoïdes. Agitation et Centrifugation
Transférer 0,5 ml de l'extrait en analyse HPLC ou GC.	Transférer l'extrait conservé avec 6,7 mM d'acide formique pour une analyse HPLC. Transférer l'extrait conservé avec du toluène pour une analyse GC. Ajout de triphénylphosphate (TPP)	Transférer Y ml de l'extrait conservé avec Y*10 µl d'une solution Acétonitrile/Acide formique 5 % (10 µl/ml d'extrait) pour une analyse HPLC ou GC.

**B.166** | Tél : 33 (0)4 70 03 88 55 | Hotline : 33 (0)4 70 03 73 09 | E-mail : [interchrom@interchim.com](mailto:interchrom@interchim.com) | Fax : 33 (0)4 70 03 82 60

## Annexe 5. Volume nécessaire pour la préparation des solutions

### Annexe 5.1. Préparation des solutions pour la détermination de la LOD et LOQ

Tableau 13 Préparation des solutions pour la détermination de la LOD et la LOQ en solution

	<b>G3</b>	<b>G2</b>	<b>G1</b>	<b>G0</b>	<b>G00</b>
Concentration (pg/μL)	5	1	0,5	0,25	0,1
Facteur de dilution	1/2	1/10	1/20	1/40	1/100
<b>Volume prélevé SF2 (μL)</b>	<b>150</b>	<b>30</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>Volume Hexane ajoutée (μL)</b>	<b>150</b>	<b>270</b>	<b>285</b>	<b>390</b>	<b>990</b>
Volume total	300	300	300	400	1000

### Annexe 5.2. Préparation des solutions de la gamme d'étalonnage

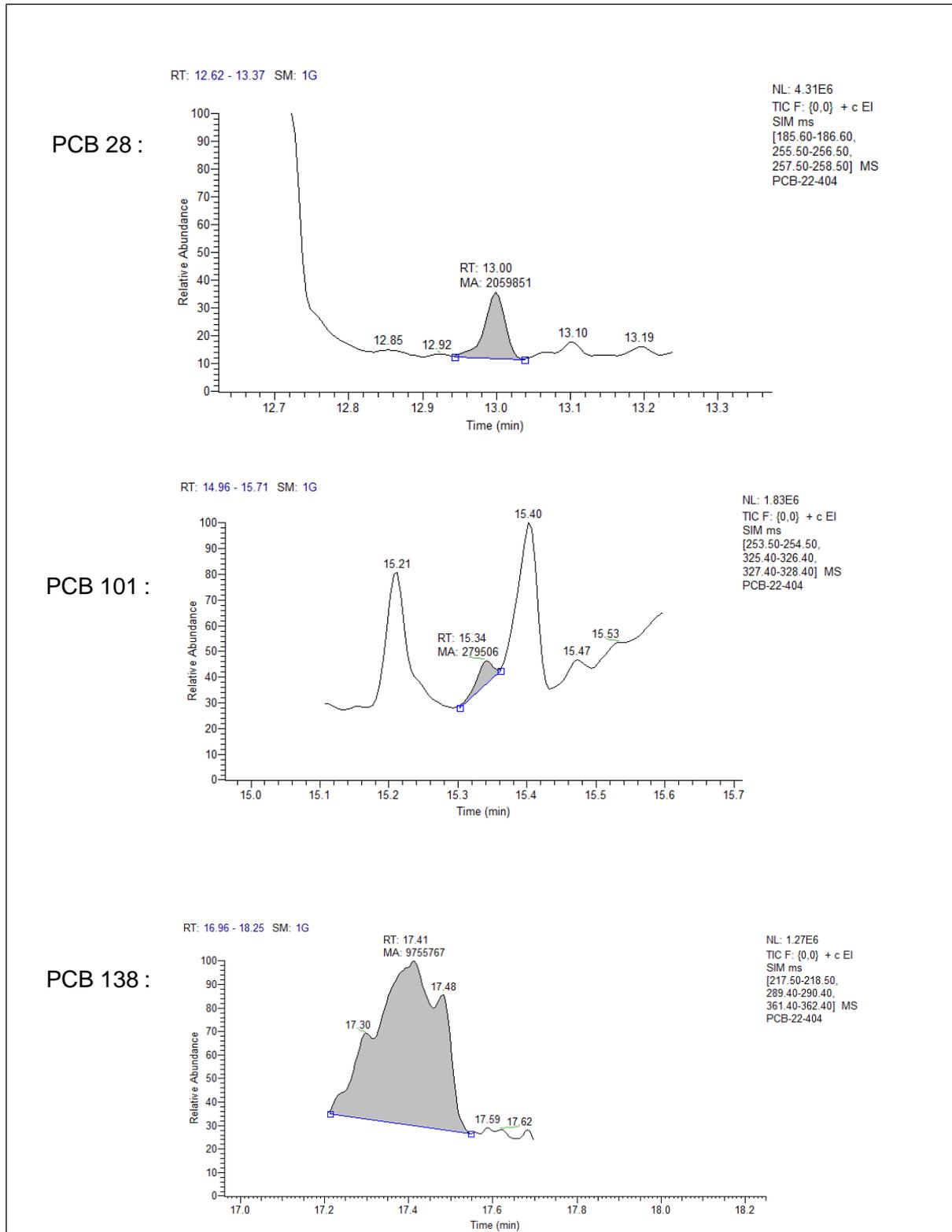
Tableau 14 Préparation des solutions permettant de préparer les gammes d'étalonnage

	<b>Solution Fille 1 (SF1)</b>	<b>Solution Fille 2 (SF2)</b>	<b>Solution Fille SI</b>
Concentration (pg/μL)	<b>1000</b>	<b>10</b>	<b>1000</b>
Facteur de dilution	<b>1/10</b>	<b>1/100</b>	<b>1/5</b>
Volume Solution mère prélevé (μL)	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>/</b>
Volume Solution mère <sup>13</sup> C prélevé (μL)	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>200</b>
Volume Hexane prélevé (μL)	<b>900</b>	<b>990</b>	<b>800</b>
Volume total (μL)	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

Tableau 15 Préparation de la gamme d'étalonnage avec standard interne

	<b>G7</b>	<b>G6</b>	<b>G5</b>	<b>G4</b>	<b>G3</b>	<b>G2</b>	<b>G1</b>
Concentration (pg/μL)	<b>500</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>
Facteur de dilution	<b>1/2</b>	<b>1/10</b>	<b>1/20</b>	<b>1/100</b>	<b>1/2</b>	<b>1/10</b>	<b>1/20</b>
<b>Volume prélevé SF1 (μL)</b>	<b>500</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>10</b>	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>/</b>
<b>Volume prélevé SF2 (μL)</b>	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>500</b>	<b>100</b>	<b>50</b>
<b>Volume de dopage SFSI (μL)</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
Volume Hexane ajoutée (μL)	<b>450</b>	<b>850</b>	<b>900</b>	<b>940</b>	<b>450</b>	<b>850</b>	<b>900</b>
Volume total (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

## Annexe 6. Chromatogramme en mode SIM de l'extraction avec la viande cuite lyophilisée et broyée

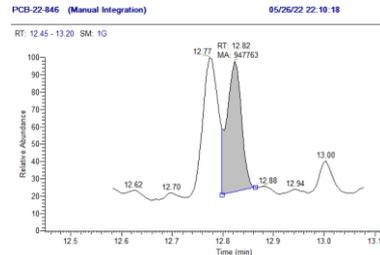
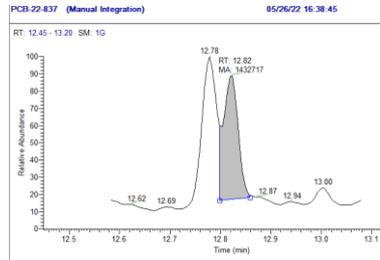


# Annexe 7. Chromatogrammes de l'essai 7 dopé à 25 µg/µL

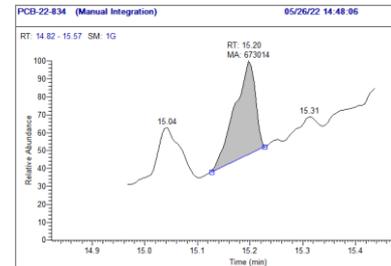
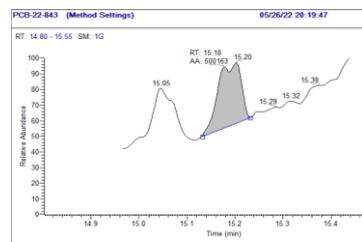
Extrait dopé avant 25 µg/µL

Extrait matrice blanche dopé après 25 µg/µL

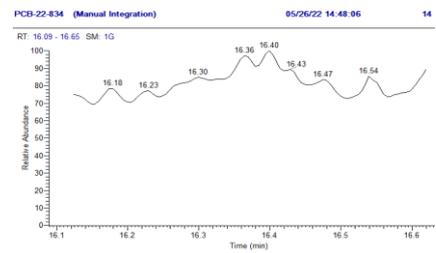
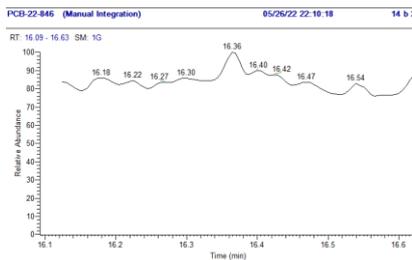
PCB 28



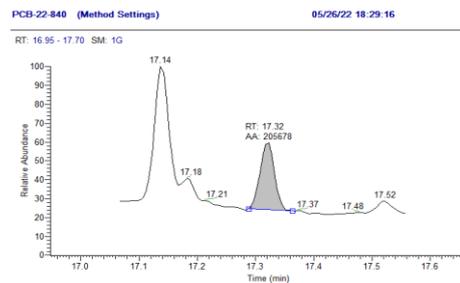
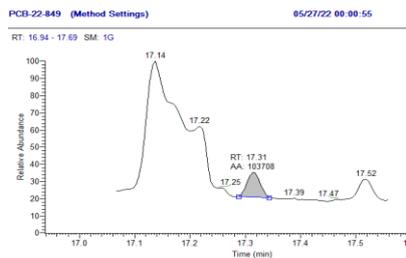
PCB 101



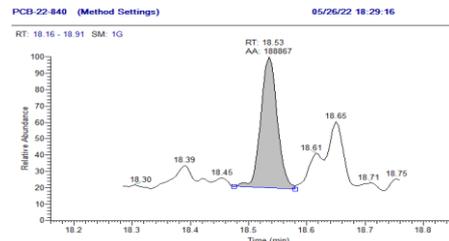
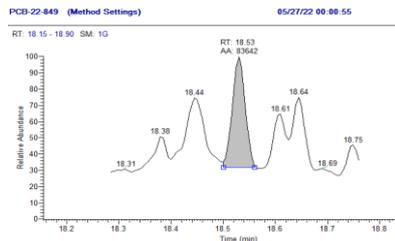
PCB 118



PCB 138



PCB 180



## Serment De Galien

---

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Attention, ne supprimez pas le saut de section suivant (page suivante non numérotée)

## **Extraction QuEChERS des polychlorobiphényles dans la viande de porc et analyse par GC-MS dans le cadre du projet SENTINEL**

---

Les maladies d'origine alimentaire émergent dans le monde entier. L'Union européenne a fait appel à ses États membres afin de renforcer leur système de contrôle et de veille sanitaire sur les denrées alimentaires. La France a ainsi créé la plateforme de surveillance de la chaîne alimentaire (SCA) et le projet SENTINEL a été imaginé afin d'améliorer les techniques analytiques en termes d'efficacité et de coût pour la détection des substances chimiques dans l'alimentation. L'objectif est d'augmenter l'efficacité des inspections réglementaires, des auto-contrôles industriels et du suivi à des niveaux infra-réglementaires. La détection des polychlorobiphényles (PCB) dans la viande de porc a été choisie comme modèle d'étude. Des mélanges ont été utilisés au 20<sup>ème</sup> siècle dans l'industrie, toxiques pour l'homme, leurs utilisations ont été interdites en France mais ces polluants organiques persistants sont toujours retrouvés aujourd'hui dans l'alimentation humaine. Une méthode d'extraction rapide et simple est en cours de développement avec la technique QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) permettant de diminuer le coût et la complexité de l'extraction. L'analyse est basée sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). L'extraction développée est réalisée sur de la viande lyophilisée réhydratée avec du MgSO<sub>4</sub> et de d'acétonitrile. L'extrait est purifié avec du MgSO<sub>4</sub>, du PSA et du C18. Le développement a permis d'obtenir un rendement d'extraction entre 41 et 79 % et un effet matrice entre 4 et 142%. Des perspectives d'amélioration sont déjà en cours afin d'optimiser le rendement d'extraction et l'ajout de Florisil lors de l'étape de purification a permis d'obtenir un rendement de 67 à 86 %.

---

Mots-clés : Polychlorobiphényles, SENTINEL, GC-MS, QuEChERS, sécurité alimentaire

### **Detection of polychlorinated biphenyls by using QuEChERS extraction and GC-MS in the context of SENTINEL program**

---

Food safety is a priority for European Union and France. Member States are so asked to strengthen their food control and health monitoring systems. Food Chain Surveillance Platform (FCS) has been created in France and the SENTINEL project has been developed to improve analytical techniques in terms of efficiency and cost for the detection of chemical substances in food. The main objective is to increase the efficiency of regulatory inspections, industrial self-monitoring or monitoring at sub-regulatory levels. The detection of polychlorinated biphenyls (PCBs) in pork was chosen as a study model. They have been used in the 20<sup>th</sup> century in industry, they are toxic for humans, and though their use was banned in France, these persistent organic pollutants are still detectable in human food. A fast and simple extraction method is being developed with the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) technique to reduce the cost and complexity of extraction. The analysis was performed by gas chromatography (GC-MS). The developed extraction is performed on freeze-dried meat rehydrated with MgSO<sub>4</sub> and acetonitrile. The extract is purified with MgSO<sub>4</sub>, PSA and C18. The development resulted in an extraction yield between 41 and 79% and a matrix effect between 4 and 142%. Improvements are already underway to improve the extraction yield and the addition of Florisil during the purification step has resulted in a yield of 67 to 86 %.

---

Keywords : polychlorinated biphenyls, SENTINEL, GC-MS, QuEChERS, food safety

