THESE DE DOCTORAT

ONIRIS

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie-Santé
Spécialité : Santé Publique

Par
Cassandre JEANNOT

Développement et application de stratégies de type Suspect Screening (SS) et Non-Targeted Screening (NTS) basées sur la spectrométrie de masse multidimensionnelle et très haute résolution pour étendre la connaissance de l'exposome dans un contexte d'évaluation du risque chimique dans les aliments

Thèse présentée et soutenue à Oniris VetAgroBio, Nantes, le 12 Novembre 2025

Unité de recherche : UMR INRAE/ONIRIS 1329 LABERCA

Collaboration : ANSES

Rapporteur.rice.s avant soutenance :

Dr Emmanuelle VULLIET	Directrice de recherche, CNRS, Lyon, France
Dr Gauthier EPPE	Professeur, Université de Liège, Liège, Belgique

Composition du Jury :

Président :	Dr François FENAILLE	Directeur de recherche, CEA, Saclay, France
Examinateurs :	Dr Anne TOGOLA	Chargée de recherche, BRGM, Orléans, France
	Dr François FENAILLE	Directeur de recherche, CEA, Saclay, France
	Dr Bruno LE BIZEC	Professeur, ONIRIS, INRAE, LABERCA, Nantes, France
Dir. de thèse :	Dr Gaud DERVILLY	HDR, ONIRIS, INRAE, LABERCA, Nantes, France
Co-dir. thèse :	Dr Julien PARINET	Professeur, Université Laval, Québec, Canada

« Ils nous montrent que, lorsque nous cherchons à être meilleurs que nous ne le sommes, tout devient meilleur aussi autour de nous. »

Paulo Coelho, *L'Alchimiste*

Remerciements

Après ces trois années de recherche, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont accompagné durant ce projet. Je leur suis profondément reconnaissante pour leurs conseils, leurs sourires et, parfois, pour leur simple présence, qui ont permis d'alléger ce parcours.

Dans un premier temps, je souhaite remercier l'ensemble des membres de mon jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer ce travail de thèse. J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Emmanuelle VULLIET et au Pr. Gauthier EPPE, qui ont accepté d'être rapporteur.rice.s, pour le temps consacré à la lecture attentive et à l'évaluation critique de mon manuscrit. Mes remerciements vont également au Dr. Anne TOGOLA, au Dr. François FENAILLE et au Pr. Bruno LE BIZEC pour nos futurs échanges lors de l'évaluation de ce travail.

Je souhaite remercier ma directrice de thèse, Dr. Gaud DERVILLY, et mon directeur de thèse, Pr. Julien PARINET, pour leur confiance, leur disponibilité et la richesse de nos échanges tout au long de ce parcours. Leurs conseils avisés et leur accompagnement ont été essentiels pour nourrir ma progression, tant que le plan scientifique que personnel. Je tiens à adresser des remerciements particulièrement chaleureux à Gaud, pour son soutien indéfectible, son optimisme communicatif, sa bienveillance et son écoute attentive, durant ces trois années.

Je remercie, une nouvelle fois, Bruno LE BIZEC pour son accueil chaleureux au sein du Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) et son soutien tout au long de ce projet.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi individuel de thèse, Dr. Hélène TERRISSE, Dr. Yann AMINOT et Dr. Thierry GUÉRIN, pour nos échanges très enrichissants, leur disponibilité et leur soutien durant ces réunions. Je remercie également la Région Pays de la Loire et l'Anses pour leur soutien financier.

Mes remerciements vont également à l'ensemble du personnel du Laberca et de l'Anses (équipes PBM et ETNA) pour toutes nos discussions professionnelles et personnelles, ainsi que leur soutien. Je tiens à exprimer des remerciements plus particuliers et sincères à Déborah et Louise pour leur amitié, leurs encouragements et leur soutien infaillible, mais également à Antonin, Axel, Chloé, Christophe, Clémence, Dana, Étienne, Julien, Justine, Nicolas, Tarek et Yassine, pour tous nos échanges et bons moments passés ensemble.

J'aimerais également remercier mon père, Jean-Philippe JEANNOT, ma belle-mère, Carole JEANNOT, ma sœur, Victoire JEANNOT, pour leur amour, leur soutien infaillible et leurs encouragements. Une mention spéciale pour mes frères poilus, LoustiK et Tahaa. Mes remerciements les plus sincères à mes ami.e.s de longues dates, Gamze, Lisa, Marie, Ninnog et Reda, pour leur bienveillance, leur soutien, mais aussi leur compréhension de ma faible disponibilité ces derniers temps.

Et finalement, les trois années de thèse, dans le miroir de la vie, sont un chemin jalonné de hauts et de bas, comparable à des sommets et des vallées, pour la personne avec qui j'aime tant partager des randonnées. Je souhaite profondément remercier celui qui, chaque jour, dans la vie comme dans l'aventure qu'est la thèse, a su rendre ces sommets plus lumineux, et ces vallées moins sombres. Ma plus profonde gratitude à toi, Armand.

Merci à tous !

Table des matières

Liste des abréviations et acronymes 2
Liste des figures 8
Liste des tableaux 12
Introduction générale 14
Valorisations scientifiques 20
Chapitre I : État de l'art 24
1. Le concept d'Exposome 25
2. Le principe de l'analyse des risques chimiques 29
2.1. L'évaluation du risque chimique alimentaire en 4 étapes 30
3.1.1. Identification du danger (1) 32
3.1.2. Caractérisation du danger (2) 32
3.1.3. Évaluation de l'exposition (3) 32
3.1.4. Caractérisation du risque (4) 34
2.2. La gestion et la communication du risque 35
2.3. La problématique des mélanges 36
3. Les substances chimiques d'intérêt 40
3.1. Les substances per- et polyfluoroalkylées (PFAS) 42
3.2. Les pesticides 53
3.3. Les produits pharmaceutiques et vétérinaires 57
3.4. Les substances d'origine naturelle : les mycotoxines et les alcaloïdes 62
4. Les méthodes analytiques 67
4.1. Stratégies analytiques ciblées : illustration avec le cas des PFAS 69
4.1.1. Préparation d'échantillons 70
4.1.2. Méthodes d'analyse 72
4.1.3. Recommandations européennes 75
4.2. Stratégies suspecte et non ciblée 76
4.2.1. Préparation d'échantillons 79
4.2.2. Méthodes d'analyse 82
4.2.3. Traitement des données 92
5. Conclusion de l'état de l'art et objectifs de la thèse 105
Chapitre II : Développement et application d'une méthode analytique non ciblée par LC-HRMS pour l'analyse des PFAS dans les aliments 108
Contexte de l'étude 109

Article 1 : Advancing PFASs monitoring in food: From targeted SPE-LC-MS/MS to non-targeted QuEChERS-LC-HRMS approaches 112

Principaux résultats liés aux développements méthodologiques 138

Article 2 : High-resolution mass spectrometry for extended PFAS surveillance in food: Combining suspect and non-targeted approaches 140

Principaux résultats liés à l'application de la méthodologie de recherche 164

Chapitre III : Développement et application d'une méthode multi-résidus et contaminants par LC-HRMS pour une meilleure caractérisation des échantillons alimentaires 170

Contexte de l'étude 171

Article 3 : High-throughput QuEChERS–UHPLC-QTOF-MS method for multi-class food residues and contaminants screening: Application to seafood and dairy products 176

Principaux résultats liés aux développements méthodologiques 206

Principaux résultats liés à l'application de la méthodologie de recherche 206

Article 4 : Multi-platform screening strategies for confirmed identification and characterization of chemical diversity in french food 208

Principaux résultats liés à l'application de la méthodologie de recherche 222

Article 5 : Implementation of non-targeted approaches to a freshwater benthic fish (Machoiron) used as a sentinel species to assess various contaminants present in a lake in Ivory Coast 224

Principaux résultats liés à l'application de la méthodologie de recherche 240

Chapitre IV : Mise en évidence de la complémentarité entre deux approches analytiques pour une analyse étendue des PFAS dans les aliments 242

Article 6 : Optimizing PFAS monitoring: A direct comparison of sample preparation and HRMS workflows on Q-Exactive and Q-ToF instrument 244

Principaux résultats liés à l'évaluation de la complémentarité des approches 271

Chapitre V : Évaluation de l'exposition des consommateurs 274

1. Calcul de la concentration du PFPrA dans un aliment 276
2. Conformité des échantillons 277
3. Évaluation de l'exposition du consommateur 277

Conclusion générale et perspectives 282

1. Conclusion 283
2. Limites et perspectives de ces travaux 286

Références bibliographiques 290

Annexes 320

Annexes de l'Article 1 (Supplementary data) : Advancing PFASs monitoring in food: From targeted SPE-LC-MS/MS to non-targeted QuEChERS-LC-HRMS approaches 326

Annexes de l'Article 2 (Supplementary data) : High-resolution mass spectrometry for extended PFAS surveillance in food: Combining suspect and non-targeted approaches 333

Annexes de l'Article 3 (Supplementary data) : High-throughput QuEChERS–UHPLC-QTOF-MS method for multi-class food residues and contaminants screening: Application to seafood and dairy products..... 338

Annexes de l'Article 4 : Multi-platform screening strategies for confirmed identification and characterization of chemical diversity in french food..... 352

Annexes de l'Article 5 : Implementation of non-targeted approaches to a freshwater benthic fish (Machoiron) used as a sentinel species to assess various contaminants present in a lake in Ivory Coast..... 364

Annexes de l'Article 6 : Optimizing PFAS monitoring: A direct comparison of sample preparation and HRMS workflows on Q-Exactive and Q-ToF instrument..... 371

Liste des abréviations et acronymes

1,3-D 1,3-Dichloropropène

6:2 FTOH 6:2 Fluorotelomère alcool

6:2 FTS 6:2 FluoroTelomère Sulfonate

ACN Acétonitrile

ACP Analyse en composantes principales - *Principal Component Analysis (PCA)*

AF Aflatoxine

AFFFs Mousses filmogènes aqueuses - *Aqueous film-forming foams*

AIF *All Ion Fragmentation*

API Ionisation à pression atmosphérique - *Atmospheric Pressure Ionization*

ARfD Valeurs de référence aiguës - *Acute Reference Dose*

ATC Anatomique, Thérapeutique et Chimique - *Anatomical Therapeutic Chemical*

ATSDR Agence pour le registre des substances toxiques et des maladies - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

BEA Beauvéricine

CCRVDF Comité du codex sur les résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments - *Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods*

CCS Section efficace de collision - *Collision Cross Section*

CD Compound Discoverer

CE Contaminants Émergents - *Emerging Contaminants (EC)*

CECs Contaminants préoccupants émergents - *Contaminants of Emerging Concern*

CI Ionisation chimique

CIC Chromatographie ionique après combustion - *Combustion Ion Chromatography*

CIRC Centre International de Recherche sur le Cancer - *International Agencies for Research on Cancer (IARC)*

Cl-PFESAs Acides sulfoniques d'éther polyfluoroalkyliques chlorés - *Chlorinated PolyFluoroAlkyl Ether Sulfonic Acids*

CVMP Comité des médicaments à usage vétérinaire - *Committee for Veterinary Medicinal Products*

DAOA Denrées Alimentaires d'Origine Animale

DDA Acquisition dépendante des données - *Data-Dependent Acquisition*

DDT DichloroDiphénylTrichloroéthane

DGAL Direction Générale de l'Alimentation

DG SANTE Direction Générale de la santé et de la sécurité alimentaire - *Directorate-General for Health & Food Safety*

DHT Dose Hebdomadaire Tolérable - *Tolerable Weekly Intake (TWI)*

DIA Acquisition indépendante des données - *Data-Independent Acquisition*

DJA/DJT Doses Journalières Admissibles/Tolérables - *Acceptable Daily Intake (ADI)*

DON Déoxynivalénol

d-SPE Extraction en phase solide dispersive - *dispersive-SPE*

EAT Études de l'Alimentation Totale

ECHA Agence européenne des produits chimiques - *European CHemicals Agency*

EEA Agence européenne de l'environnement - *European Environment Agency*

EFSA Autorité Européenne de Sécurité des Aliments - *European Food Safety Authority*

EI Étalons Internes

EMA Agence européenne des médicaments - *European Medecines Agency*

ENNs Enniatines

EOC Contaminants émergents organiques - *Emerging Organic Contaminants*

EOF Fluor organique extractible - *Extractable Organic Fluorine*

ESI Ionisation électrospray - *Electrospray Ionisation*

FAO Organisation pour l'alimentation et l'agriculture - *Food and Agriculture Organisation*

FASA *Perfluoroalkyl sulfonamide*

FB1 Fumonisine B1

FDA *Food and Drug Administration*

FTOHs Fluorotélomères alcooliques

FTSAs Fluorotélomères sulfonates

FUSLE Extraction solide-liquide assistée par ultrasons focalisés - *Focused Ultrasound SLE*

GC Chromatographie Gazeuse

GCB Graphitized Carbon Black

HAP Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HBM Biosurveillance Humaine - *Human BioMonitoring*

HILIC Chromatographie en interaction hydrophile

HRMS Spectrométrie de Masse Haute Résolution

HS Séries homologues - *Homologous Series*

IMS Spectrométrie de mobilité ionique

INCA Individuelles Nationales des Consommations Alimentaires

IPCS Programme international sur la sécurité des substances chimiques - *International Programme on Chemical Safety*

IPE Extraction par paire d'ions

IT Trappes Ioniques

JECFA (FAO/OMS) Comité international d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires - *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*

JMPR Comité pour les résidus de pesticides à l'échelle internationale - *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*

KMD *Kendrick Mass Defect*

LC Chromatographie Liquide

LIT Trappe ionique linéaire

LLE Extraction liquide-liquide - *Liquid Liquid Extraction*

LM Limites Maximales

LMR Limites Maximales de Résidus

LOD Limite de détection - *Limit of Detection*

LOI Limite d'identification - *Limit of Identification*

LOQ Limite de quantification - *Limit of Quantification*

LRMS Spectrométrie de masse à basse résolution

m/C Masse normalisée par le nombre d'atomes de carbone

MD Défaut de masse - *mass defect*

MD/C Défaut de masse normalisé par le nombre d'atomes de carbone

MDF Filtrage du défaut de masse - *mass defect filtering*

MeOH Méthanol

$MgSO_4$ Sulfate de magnésium

MS Spectrométrie de masse - *Mass Spectrometry*

MS/MS Spectrométrie de masse en tandem (MS^2)

MSPD Dispersion sur phase solide

MAE Extraction assistée par micro-ondes

MTBE Méthyl-Tert-Butyl-Ether

m/z Rapport masse sur charge

NaCl Chlorure de sodium

NEtFOSE N-éthyl perfluorooctane sulfonamidoéthanol

NOAEL Dose sans effet nocif observé - *No Observable Adverse Effect Level*

NTS Recherche non-ciblée - *Non-Targeted Screening*

OCDE Organisation de Coopération et de Développement Économiques - *Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)*

OMS Organisation Mondiale de la Santé - *World Health Organization (WHO)*

ORP Observatoire des Résidus de Pesticides

OTA OchraToxine A

PAPs Esters de phosphate de polyfluoroalkyle - *Polyfluoroalkyl phosphate esters*

PBDE diphényléthers polybromés

PC Poids Corporel - *body weight (bw)*

PCB PolyChloroBiphényles

PF Poids à l'état Frais - *wet weight (ww)*

PFAAs Acides perfluoroalkylés

PFAS Substances Per- et polyFluoroAlkylées

PFBA Acide perfluorobutanoïque - *PerFluoroButanoic Acid*

PFCAs Acides carboxyliques perfluorés

PFHxA Acide perfluorohexanoïque - *PerFluoroHexanoic Acid*

PFHxS PerFluoroHexane Sulfonate

PFNA Acide perfluorononanoïque - *PerFluoroNonanoic Acid*

PFOA Acide perfluorooctanoïque - *PerFluoroOctanoic Acid*

PFOS PerFluoroOctane Sulfonate

PFOSA Perfluorooctane sulphonamide

PFP Pentafluorophényle

PFPeA Acide perfluoropentanoïque - *PerFluoroPentanoic Acid*

PFPEs Perfluoropolyéthers - *PerFluoroPolyEthers*

PFPrA Acide perfluoropropanoïque

PFSAs Acides sulfoniques perfluorés

PLE Extraction liquide sous pression

PNSE Plans Nationaux Santé-Environnement

POPs Polluants Organiques Persistants - *Persistent Organic Pollutants*

PSA *Primary and Secondary Amine*

PTFE PolyTétraFluoroÉthylène

Q Quadripôle

QSRR Relation quantitative structure-retention **-** *Quantative Structure Retention Relationship*

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

REACH Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques - *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*

RFB Retardateurs de Flamme Bromés

RMN Résonance Magnétique Nucléaire

RPLC Chromatographie liquide en phase inverse - *Reversed-Phase Liquid Chromatography*

scPFAS PFAS à chaînes courtes - *short-chain PFAS*

SE Extraction par solvant - *Solvent Extraction*

SFC Chromatographie en phase supercritique - *Supercritical Fluid Chromatography*

SLE Extraction solide-liquide - *Solid Liquid Extraction*

SPE Extraction en phase solide - *Solid Phase Extraction*

SPME Micro-extraction en phase solide

SRM *Selected Reaction Monitoring*

SS Recherche suspecte - *Suspect Screening*

TBBPA Tétrabromobisphénol A - *TetraBromoBisPhenol A*

TF Fluor total - *Total Fluor*

TFA Acide trifluoroacétique

Tims *Trapped Ion Mobility Spectrometry*

TOF Temps de vol - *Time of Flight*

TS Recherche ciblée - *Targeted Screening*

UAE Extraction assistée par ultrasons - *Ultrasonically Assisted Extraction*

UE Union Européenne

(U)HPLC Chromatographie liquide à (ultra-)haute performance

UMR Unité Mixte de Recherche

US-EPA Agence de protection de l'environnement des États-Unis – *United States. Environmental Protection Agency*

VTR Valeurs Toxicologiques de Référence

WAX Échangeurs d'anions faibles

ZEN Zéaralénone

Liste des figures

Figure 1. Schéma de l'organisation et des objectifs de la thèse 17
Figure 2. Représentation globale des expositions internes et externes affectant l'être humain tout au long de sa vie (https://www.inrae.fr/) 26
Figure 3. Voies de transfert des substances chimiques via les milieux environnementaux et la chaîne alimentaire illustrant les expositions humaines multiples issues de l'environnement (US EPA, 2025) 27
Figure 4. Différentes voies d'exposition humaine aux substances chimiques : inhalation, ingestion et contact dermique 27
Figure 5. Schéma représentatif du processus d'analyse des risques chimiques, adapté de (FAO of the United Nations, WHO et Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Application of Risk Management to Food Safety Matters, 1997) 30
Figure 6. Schéma représentant l'exposition globale et l'exposition combinée aux mélanges de substances chimiques (Kienzler et al., 2016) 37
Figure 7. Illustration schématique de l'exposition chimique humaine consistant à la fois en des composants externes et internes, qui englobe le nombre d'espèces chimiques, la plage dynamique, la diversité structurelle et les propriétés physicochimiques (Lai et al., 2024)..... 38
Figure 8. Illustration de l'European Environment Agency représentant le territoire inconnu des risques chimiques (EEA, 2019) 40
Figure 9. Principaux domaines d'utilisation des PFAS dans les secteurs industriels et de consommation (Dr Martin Juneau, M. D., 2022) 43
Figure 10. Exemples de substances classées comme PFAS ou non selon la définition de l'OCDE (Wang et al., 2021)..... 45
Figure 11. Classification générale des PFAS en deux catégories : non-polymères et polymères, illustrées par quatre exemples (PFOA, PFOS, PTFE, KRYTOX), adaptée de (OECD, 2013; Panieri et al., 2022)..... 46
Figure 12. Exposition humaine aux PFAS et voies d'exposition associées. Trois voies d'exposition principales ont été identifiées pour les PFAS : l'inhalation, l'ingestion et le contact cutané (Arnesdotter et al., 2025)..... 48
Figure 13. Effets des PFAS sur la santé humaine (European Environment Agency (EEA), 2023) 49
Figure 14. Les différentes voies d'exposition de la population générale aux pesticides (EEA, 2023) .. 54
Figure 15. Classification des pesticides par type de nuisible ciblé et de leur famille chimique (Alengebawy et al., 2021)..... 56
Figure 16. Les cinq niveaux de la classification ATC de l'OMS, illustrés par l'exemple du paracétamol 58
Figure 17. Principales voies de transports des produits pharmaceutiques humains et vétérinaires dans l'environnement (OECD, 2019)..... 60
Figure 18. Aperçu des principales sources d'exposition aux mycotoxines (European Environment Agency (EEA), 2025) 64
Figure 19. Nombre de publications scientifiques entre 2000 et 2024 contenant les mots-clés « PFAS », « PFAS and water », « PFAS and environment » et « PFAS and food », d'après les données extraites de la base Scopus ; figure réalisée à partir des données collectées en juillet 2025 69
Figure 20. Schéma conceptuel des trois approches méthodologiques (Targeted Screening, Suspect Screening and Non-targeted screening) pour étudier l'exposome chimique (Pourchet et al., 2020).. 77
Figure 21. Illustration des types d'ionisation utilisés dans les études non-ciblées en LC et GC-HRMS (Manz et al., 2023)..... 84
Figure 22. Aperçu de l'analyse instrumentale des composants fluor total (TF), fluorure inorganique (IF), fluor organique extractible (EOF), et des PFAS neutres (Fr.2) et anioniques (Fr.3) connus dans

l'eau en utilisant la chromatographie ionique (IC), la chromatographie ionique à combustion (CIC) et chromatographie en phase liquide spectrométrie de masse quadrupolaire triple (LC-MS/MS), respectivement (Ruan et Jiang, 2017) 88
Figure 23. Étapes essentielles pour élargir la couverture analytique grâce à l'exposomique basée sur la HRMS par i) (Lai et al., 2024) et ii) (Fisher, Croley et Knolhoff, 2021) 93
Figure 24. Niveaux de confiance proposés pour l'identification par (Schymanski et al., 2014) 95
Figure 25. Résumé des enjeux analytiques des approches ciblées et suspectes/non-ciblées par (Pourchet et al., 2020) 96
Figure 26. Schémas du flux de travail général pour la découverte de PFAS grâce aux approches non-ciblées par i) (Liu et al., 2019) et ii) (Wang et al., 2022) 97
Figure 27. Résumé de six approches pour la recherche non-ciblée de PFAS, avec leurs exigences, avantages et inconvénients (Bugsel, Zweigle et Zwiener, 2023) 98
Figure 28. Illustration d'une série d'homologues représentée dans un diagramme de défaut de masse normalisé CF2 (Liu et al., 2019) 99
Figure 29. Positions des différentes classes chimiques dans le graphique MD/C-m/C (Bugsel, Zweigle et Zwiener, 2023) 100
Figure 30. Critères d'identification des PFAS à différents niveaux de confiance, par (Charbonnet et al., 2022) 102
Figure 31. Schéma récapitulatif des principales étapes méthodologiques décrites dans l'article 1, incluant la préparation des échantillons, l'analyse par LC-HRMS et le traitement des données pour l'identification étendue des PFAS dans des matrices alimentaires 110
Figure 32. Cartes illustrant les zones d'échantillonnages en Europe (à gauche, France) et en Afrique (à droite, Algérie) investiguées dans le Chapitre II 111
Figure 33. Schéma récapitulatif de l'application de la méthode présentée dans l'Article 1, correspondant aux travaux (Article 2) présentés pour l'identification de PFAS additionnels à ceux surveillés habituellement 111
Figure 34. Detailed sample preparation steps using SPE and QuEChERS methods 121
Figure 35. Relative signal Intensities (TICs) observed by LC-(ESI-)MS/MS for the analysis of PFASs in spiked milk (10 ng/mL) extracted by QuEChERS comparing 5 different solvent mixtures: ACN/H2O (grey), ACN/FA (red), ACN/H2O/FA (blue), MeOH (yellow) et MTBE/H2O (purple) 126
Figure 36. Concentrations of 4 selected PFASs (PFOA, PFOS, PFNA, PFHxS) measured by LC-MS/MS following the application of either the SPE or QuEChERS extraction protocol, with supplementation at three levels (1, 5, and 10 $\mu g \cdot kg^{-1}$, wet weight) across 20 food items 131
Figure 37. Chromatographic profiles of PFPeA obtained from (1) an egg sample and (2) a crustacean sample in SS acquisition mode, comparing the extraction protocols: SPE and QuEChERS 132
Figure 38. a) Kendrick mass defect for CF2 repeating unit vs m/z of 28 PFASs standard listed in our internal database and classified by family: PFCA (n = 11), PFSA (n = 10), Cl-PFESA (n = 2) and others PFASs (n = 5). Homologous series are identified by shifts in the x-axis divisible by 49.9968 (CF2) and the same CF2 normalized mass defect. In yellow, a suspect PFASs signal highlighted by NTS data processing. b) Chromatogram profile for PFPrA standard. c) Chromatogram profile for PFPrA in an egg sample 134
Figure 39. Distribution of the 58 food samples analyzed, grouped by food category (n = 5), regardless of their origin (France, Algeria, or European hotspots). 147
Figure 40. Detection frequencies (%) of 17 PFAS identified from an initial suspect screening database of 28 compounds, across five food categories (n = 58 samples), by geographical origin: France (FR), Algeria (ALG), and European Union (EU) hotspot samples 152
Figure 41. md/C vs m/C representation of the PFAS standard solution (blue circles) analyzed by LC-(ESI-)-HRMS and processed in Compound Discoverer (CD) software using the additional filter as

initially defined in the literature (Kaufmann et al. 2022) (left) and after applying the optimized filter parameter developed in this study (right) 156
Figure 42. Chromatographic profile of a) PFPrA in three egg samples, b) 6:2 FTS in an egg sample, and c) Fipronil sulfone in two egg samples from hotspots, analyzed by LC-HRMS using the non-targeted workflow developed in this study. Signals processed with Compound Discoverer. 158
Figure 43. Kendrick mass defect for CF2 repeating unit vs m/z of certain PFAS standard families listed in our internal database and classified by family: PFCA (n = 11), PFSA (n = 10) and Cl-PFESA (n = 2). Homologous series are identified by shifts in the x-axis divisible by 49.9968 (CF2) and the same CF2 normalized mass defect. In green, three suspect PFAS signals highlighted by NTS data processing (in green). 159
Figure 44. Concentrations de 4 PFAS (µg/kg, poids frais) mesurées dans les 58 échantillons investigués dans le chapitre II, répartis en cinq catégories alimentaires, comprenant des produits commerciaux provenant de France (FR) et d'Algérie (ALG), ainsi que des échantillons issus de zones de contamination connues (hotspots) en Europe (EU) 166
Figure 45. Schéma récapitulatif des principales étapes méthodologiques décrites dans les articles 3, 4 et 5, incluant la préparation des échantillons, l'analyse par LC-HRMS, la validation de la méthode, le traitement des données, et l'application à diverses matrices alimentaires pour l'identification d'une large gamme de substances chimiques 172
Figure 46. Cartes illustrant les zones d'échantillonnage en Europe (à gauche, France) et en Afrique (à droite, Côte d'Ivoire) investiguée dans le Chapitre III. 173
Figure 47. Overview of the four sample extraction protocols (1, 2, 3, 4) followed by a puritifcation step using d-SPE (A or B) for the analysis of 397 residues and contaminants (201 pesticides, 169 veterinary drugs, and 27 PFAS) in seafood samples. 192
Figure 48. Detection rates (%) of four extraction methods (1, 2, 3, 4) using two different d-SPE as a purification step PSA/C_{18}/Na_2SO_4 (a) or EMR–Lipid (b), in the pooled fishery products sample supplemented between 0.01 mg·kg^{-1} and 0.1 mg·kg^{-1} with 397 chemicals (201 pesticides, 169 veterinary drugs, and 27 PFAS). The error bars correspond to the standard deviation (SD) (Mean ± SD, n = 3). 193
Figure 49. Boxplot of a) S/N ratios and b) intensities obtained for 397 chemicals (pesticides (n = 201), veterinary drugs (n = 169), PFAS (n = 27)) and the sum of these compounds in pooled fishery products (n = 3) depending of the extraction methods (1, 2, 3, 4) and the d-SPE (A or B) used. 194
Figure 50. Boxplot for a) S/N ratios and b) intensities obtained for pesticides (n = 201), veterinary drugs (n = 169), PFAS (n = 27) and the sum of these compounds in 20 pooled fishery products (n = 3) depending on the chromatographic column (1, 2, 3) and gradient (A, B, C) applied. 195
Figure 51. Percentage of chemicals presenting limits of identification (LOI) at 0.001, 0.01, 0.1, and > 0.1 mg.kg^{-1} obtained in a) 20 seafood products, and b) 20 dairy products and identification rates at 0.1, 0.01, and 0.1 mg.kg^{-1} obtained in c) 20 seafood products, and d) 20 dairy products under optimized conditions. 198
Figure 52. Principal component analysis (PCA) of the dataset of 20 seafood products, including fish (n = 10) and shellfish (n = 10) 204
Figure 53. a) Principal component analysis (PCA) of the dataset of 20 food samples, including eggs (n = 3), fish (n = 5), shellfish (n=4), meat products (n = 5), and dairy products (n = 3) and **b)** associated biplot showing both samples and contaminant loadings 221
Figure 54. Principal Components (PCA) of the dataset of 29 fish composite samples 238
Figure 55. Overview of the sample preparation methods (QuEChERS A or B) and analytical workflows (Methods 1 or 2) applied in the PFAS-specific and multi-contaminant approaches 249
Figure 56. Schematic overview of the study design. Two sets of samples were processed using two sample preparation protocols (QuEChERS A and B) and two analytical strategies (Method 1 and

Method 2). This scheme summarizes the comparative workflows discussed with each comparison detailed in dedicated section of the article..... 251
Figure 57. Caracterization of the pooled fishery products sample supplemented at 0.01 $mg.kg^{-1}$ for each PFAS. The error bars correspond to the standard deviation (SD) (Mean ± SD, n = 3). **a)** Detection rates, **b)** boxplot of S/N ratios and **c)** signal intensities of 27 PFAS using two different QuEChERS protocols (A (in blue) and B (in yellow)),..... 252
Figure 58. Comparison of perfluorobutane sulfonic acid (PFBS) signals extracted by QuEChERS A (blue) and QuEChERS B (green). **a)** Extracted ion chromatogram; **b)** Isotopic pattern and mass error of the precursor ion; **c)** Experimental fragmentation spectrum (in blue or green) matched against the library spectrum produced by the injecting standard in solvent (in orange) 252
Figure 59. Frequency of PFAS detection in 20 food samples with pre-existing contamination, broken down by extraction method. Orange bars (QA) indicate compounds detected via QuEChERS A only; purple bars (QB) represent detections via QuEChERS B only. All extracts were analyzed using the same method (Analysis method 1). The striped orange-purple segments show compounds found by both methods. PFAS are grouped by chemical class (PFCAs, PFSAs, FASA, PFECA, FTS), with the y-axis showing the number of samples in which each compound was detected..... 254
Figure 60. Venn diagram illustrating the distribution of PFAS identified according to the extraction method used in an egg sample (#3). The orange circle indicates compounds identified via QuEChERS A only; the purple circle represents identifications via QuEChERS B only; The overlap area highlights compounds detected by both methods. 257
Figure 61. Comparison of **a)** perfluorobutanoic acid (PFBA), **b)** perfluoroundecanoic acid (PFUnDA), and **c)** perfluorotridecanoic acid (PFTrDA) signal intensities, extracted by QuEChERS A without additional filter (up) and QuEChERS A (including additional filter) (below) 258
Figure 62. Frequency of PFAS detection in 20 food samples with pre-existing contamination, broken down by analysis method. Green bars indicate compounds detected via Analytical method 1 only; yellow bars represent detections via Analytical method 2 only. The striped green-yellow segments show compounds found by both methods. PFAS are grouped by chemical class (PFCAs, PFSAs, FASA, PFECA, FTS), with the y-axis showing the number of samples in which each compound was detected. 262
Figure 63. Venn diagram illustrating the distribution of PFAS identified according to the analytical method used in a fish sample (#9). The green circle indicates compounds identified via Analytical method 1 only; the yellow circle represents identifications via Analytical method 2 only; The overlap area highlights compounds found by both methods. 263
Figure 64. Comparison of **a)** perfluorobutanoic acid (PFBA) signals in sample #1 and **b)** perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) in sample #8 after extraction of samples by QuEChERS B method and analysis by Methods 1 & 2. 264
Figure 65. Structure chimique de l'acide perfluoropropanoïque (PFPrA) 276
Figure 66. Schéma récapitulatif des travaux réalisés dans le cadre de ce projet de doctorat, en lien avec les différents aspects de l'évaluation des risques chimiques dans les aliments 283
Figure 67. Photographie des 51 denrées alimentaires d'origine animale (DAOA) après achat dans le cadre du projet de thèse d'Antonin Padioleau 321
Figure 68. Courbes d'étalonnage obtenues pour les 5 PFAS quantifiés (PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS, PFPrA) dans une gamme en solvant par LC-HRMS..... 321

Liste des tableaux

Tableau 1. Les quatre étapes principales de l'évaluation du risque chimique alimentaire, ainsi que la formulation préalable du problème, adapté de (WHO, 2011)..... 31
Tableau 2. Hiérarchisation de la caractérisation du risque, adapté de (ANSES 2011) 34
Tableau 3. Representative examples of the use of QuEChERS to extract PFASs from foods 116
Tableau 4. Comparison of validation criteria for molecular families (pesticides, veterinary drugs, PFAS, alkaloids, and mycotoxins) in food matrices 187
Tableau 5. Percentage of compounds detected according to chromatographic column and gradient used in the extract post-supplemented between 0.01 and 0.1 mg.kg^{-1} with the 397 chemicals. 195
Tableau 6. Detailed information on sample preparation protocols. 248
Tableau 7. PFAS detected in the 20 food matrices, according to the sample preparation protocol (QuEChERS A or QuEChERS B) and the analytical method applied (Method 1 or Method 2) 255
Tableau 8. Concentration (en µg/kg de pf) du PFPrA et des 4 PFAS réglementés dans l'UE (PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS) mesurées dans 3 œufs provenant du commerce en France (#1 à #3) et 3 autres prélevés dans des « points chauds » en Europe (#4 à #6). Les valeurs en gras dépassent les limites réglementaires fixées entre 0,3 et 1 µg/kg de poids frais selon le PFAS (PFOS, PFOA, PFNA et PFHxS) et 1,7 µg/kg pour la somme de ces 4 PFAS. 277
Tableau 9. Estimation de l'exposition alimentaire hebdomadaire d'un adulte de 70 kg à cinq PFAS (PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS et PFPrA) via la consommation de quatre œufs par semaine, comparée à la DHT fixée par l'EFSA pour les 4 PFAS réglementés..... 278
Tableau 10. Synthèse de l'étude bibliographique concernant les méthodes d'analyse des PFAS dans diverses matrices alimentaires, avec les méthodes de traitement de données communément utilisées : recherche dans des bases de données, identification de fragments MS/MS, détection de séries homologues..... 322
Tableau 11. Synthèse de l'étude bibliographique concernant i) les méthodes d'analyse non-ciblée des PFAS dans les aliments et ii) incluant des méthodes utilisées au cours de l'analyse non-ciblée de PFAS dans d'autres matrices. 324

Introduction générale

La santé humaine et celle des écosystèmes forment un équilibre indissociable, au cœur du concept *One Health*. Ce principe met en évidence l'impact des activités humaines sur la dégradation des écosystèmes et, par conséquent, sur la santé et la qualité de vie des populations. L'intensification des activités industrielles, agricoles et chimiques a multiplié la présence et l'accumulation de contaminants chimiques persistants dans l'air, l'eau, les sols conduisant secondairement à la contamination des denrées alimentaires, et à des risques potentiels pour les écosystèmes comme pour les populations humaines. Ces contaminants, qu'ils soient historiques — comme les polychlorobiphényles (PCB) ou dioxines —, ou plus émergents — comme les retardateurs de flamme bromés (RFB) et les substances per- et polyfluoroalkylées (PFAS) —, se caractérisent par une stabilité chimique, une persistance environnementale et une capacité à s'accumuler dans les chaînes trophiques. À ces polluants, s'ajoutent les résidus — comme les pesticides et les médicaments vétérinaires —, qui, bien que généralement plus rapidement dégradables, peuvent participer à des effets cocktails avec les contaminants persistants et contribuer à des expositions cumulées complexes au sein des écosystèmes et de la chaîne alimentaire. L'exposition à ces composés, souvent chronique et multi-sources, est associée à des effets sanitaires majeurs allant des perturbations endocriniennes à l'augmentation des pathologies chroniques.

Dans ce contexte, le concept d'*exposome*, introduit en 2005 par Christopher Wild, offre un cadre intégratif pour appréhender l'ensemble des expositions chimiques auxquelles un individu est soumis tout au long de sa vie, qu'elles soient d'origine alimentaire, environnementale ou comportementale. Longtemps centrée sur le rôle des facteurs génétiques, la recherche en santé publique a été profondément transformée par le concept d'exposome, qui place désormais la compréhension des expositions au cœur des stratégies de prévention. L'introduction du concept d'exposome dans les politiques de santé publique françaises s'est faite de manière progressive. Dès 2016, la loi de modernisation du système de santé (loi Santé n°2016-41 du 26 janvier 2016, portée par Marisol Touraine) amorce une refonte des approches en santé publique. Cette dynamique se concrétise en 2019 par son inscription explicite dans le Code de la santé publique (article L1411-1). Cette orientation est également reflétée dans les plans nationaux santé-environnement (PNSE) : dès le PNSE3 (2015-2019), une « nouvelle approche de la santé environnementale » est amorcée, puis renforcée dans le PNSE4 (2021-2025), où l'exposome est intégré comme l'un des quatre axes prioritaires. Enfin, la future stratégie nationale de santé 2023–2033 confirme la volonté d'inscrire durablement ce concept dans les orientations stratégiques françaises en matière de santé publique.

L'évaluation du risque chimique, étape clé de cette stratégie, repose traditionnellement sur la mesure d'un nombre restreint de résidus et contaminants connus, sélectionnés selon les réglementations

applicables. Si ces approches ciblées, mettant en œuvre des méthodes de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/GC-MS/MS) en mode *Selected Reaction Monitoring* (SRM), ont démontré leur efficacité pour fournir des données quantitatives robustes, elles restent insuffisantes face aux défis actuels suivants : (1) détecter des substances encore inconnues, mal caractérisées ou sans standards analytiques disponibles ; (2) permettre l'identification simultanée, en une seule analyse, d'un large panel de composés ; (3) mieux appréhender les co-expositions multiples et variées, qui sont courantes dans l'alimentation et l'environnement ; et (4) explorer un spectre physicochimique étendu, avec un minimum d'*a priori* analytique.

L'émergence de la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) associée à des techniques variées de séparation chromatographique (LC et GC), permet désormais de réaliser des criblages suspects et non ciblés à grande échelle. Ces approches ouvrent la voie à l'identification simultanée de centaines de contaminants, y compris des composés émergents pour lesquels les standards analytiques ne sont pas toujours disponibles.

L'intégration de ces avancées permet de dépasser les limites des approches ciblées et de renforcer l'évaluation des risques en offrant une vision plus complète et dynamique de l'exposome, essentielle pour appréhender les expositions cumulées et leurs impacts sur la santé, dans le but d'orienter les stratégies de prévention et de gestion du risque.

Dans ce contexte, le projet EMERGEXPO a été conçu pour relever un défi majeur : mieux comprendre et caractériser l'exposome chimique auquel le consommateur est soumis. La question centrale à laquelle ce projet entend répondre est la suivante : **Comment approfondir la connaissance de l'exposome afin de mieux caractériser l'exposition chimique des consommateurs ?**

Pour répondre à cet enjeu, ce projet s'articule autour de deux axes complémentaires détaillés ci-après et schématisés sur la **Figure 1** :

1. Développer une méthodologie analytique innovante pour élargir la connaissance de l'exposome (*Objectif 1*).

Cet axe vise à concevoir et valider des approches de criblage suspect et non ciblé, en s'appuyant sur des matrices alimentaires clés. Les travaux débuteront par une première étude sur les PFAS (*Objectif 1.A*) avant de s'élargir à une gamme plus vaste de de résidus et de contaminants incluant les pesticides, les produits chimiques industriels, les médicaments et certaines substances naturelles comme les alcaloïdes et les mycotoxines (*Objectif 1.B*).

L'approche combinera : (i) une préparation d'échantillons plus large et moins spécifique, visant à préserver la diversité des composés d'intérêt potentiels, (ii) l'acquisition de données larges et non-ciblées *via* LC-HRMS, (iii) et un traitement avancé des données pour identifier des substances connues ou encore mal documentées.

2. Évaluer l'exposition réelle des consommateurs à ces substances chimiques (*Objectif 2*).

S'appuyant sur les données recueillies lors du premier volet, ce second axe, bien que secondaire dans l'envergure globale du projet, revêt néanmoins une importance notable. Il vise, en guise de preuve de concept, à quantifier certains contaminants identifiés, en particulier ceux qui demeurent encore en marge des cadres réglementaires européens, afin de fournir une première évaluation représentative de l'exposition chimique *via* l'alimentation. Cette analyse contribuera à orienter la hiérarchisation des risques et à mieux cibler les priorités en matière de gestion, tout en restant subordonnée à l'objectif principal de la recherche.

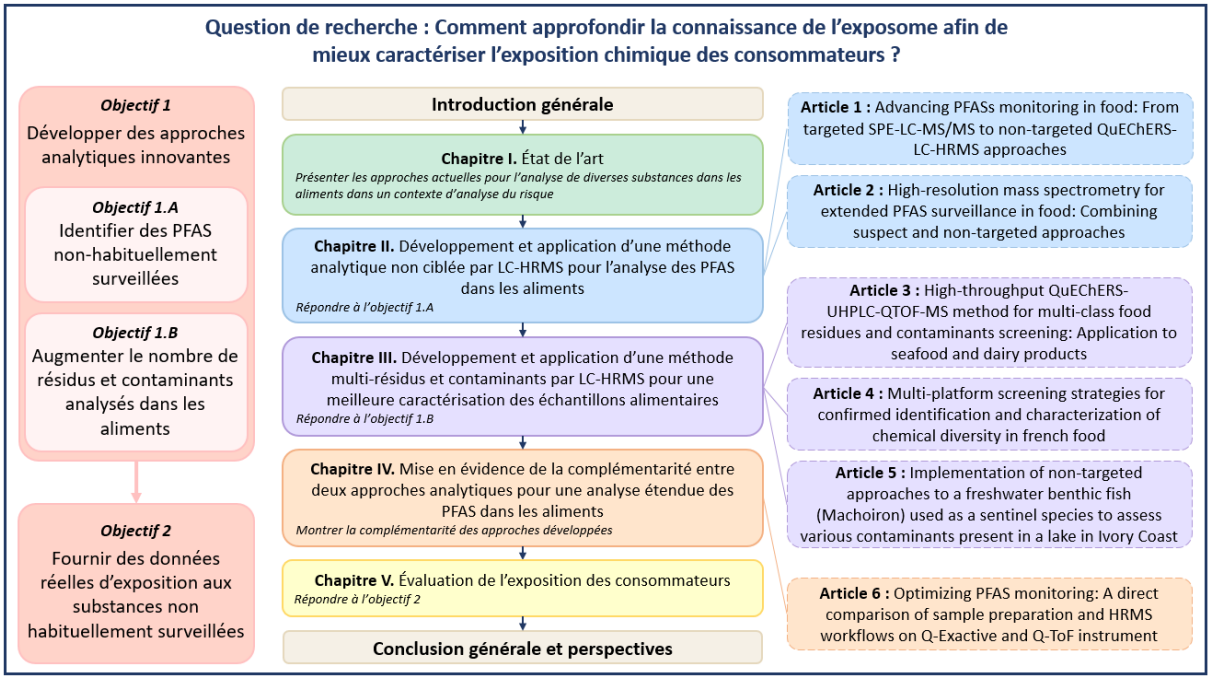


Figure 1. *Schéma de l'organisation et des objectifs de la thèse*

À l'aide de ce travail de recherche, ce projet ambitionne de produire certaines des premières données nationales de recherche large spectre sur la contamination chimique des aliments**,** contribuant ainsi aux débats scientifiques et réglementaires internationaux sur la gestion des risques émergents. Il s'inscrit pleinement dans la démarche One Health, conciliant sécurité des aliments, protection des populations et préservation des écosystèmes. Les données générées fourniront un socle essentiel pour orienter les décisions publiques sur les stratégies de prévention face aux contaminants émergents.

Dans ce contexte, cette thèse a été réalisée entre le LABERCA (LABoratoire d'Étude des Résidus et des Contaminants dans les Aliments) au sein d'Oniris VetAgroBio, à Nantes, et l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), à Maisons-Alfort, et co-financée par l'Anses et la Région Pays de la Loire. Le LABERCA, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1329 Oniris-INRAE, est spécialisé dans la sécurité chimique des aliments en se consacrant à la caractérisation de l'exposition du consommateur aux substances chimiques. Sous la tutelle des ministères de la santé, de l'environnement, de l'agriculture, et du travail, l'ANSES œuvre à la protection de la santé humaine, animale, et de l'environnement.

Ce manuscrit s'articule autour de cinq chapitres, tels que brièvement décrits ci-après.

Le premier chapitre introduit le contexte général de ces travaux de recherche en proposant un panorama à la fois de l'exposition humaine aux substances chimiques d'intérêt et des méthodes développées pour leur surveillance dans les aliments. Il aborde les concepts clés de l'exposome, les principes de l'analyse du risque chimique alimentaire, les familles de résidus et contaminants étudiées ainsi que les stratégies analytiques, ouvrant la voie aux méthodes non ciblées. Ce chapitre pose ainsi les bases scientifiques nécessaires à la compréhension des enjeux liés à l'évaluation de l'exposition chimique alimentaire et introduit les objectifs de la thèse.

Le deuxième chapitre détaille les travaux ayant conduit à la mise au point d'une méthode d'analyse plus globale des PFAS dans les aliments. Il se compose de deux parties. La première décrit le développement méthodologique visant à analyser des composés perfluorés au-delà de ceux habituellement surveillés en analyse de routine. La seconde présente l'application de cette méthode à des échantillons collectés en supermarché, représentatifs de la consommation courante, ainsi qu'à d'autres prélevés dans des zones reconnues pour leur présence et/ou forte contamination en ces substances chimiques d'intérêt, en Europe et en Afrique du Nord.

Le troisième chapitre détaille le développement d'une méthode multi-résidus et multi-contaminants visant à offrir une représentation plus globale des substances chimiques dans les aliments, tout en relevant le défi lié à la diversité physico-chimique des composés rendant leur analyse simultanée complexe. Il est composé de trois parties. La première partie présente les développements analytiques réalisés pour mettre au point la méthode de recherche large spectre. Les deuxième et troisième parties exposent les résultats obtenus en appliquant cette méthodologie au même ensemble d'échantillons collectés en supermarché, présenté dans le chapitre précédent, ainsi qu'à des poissons provenant d'Afrique du Nord.

Le quatrième chapitre met en lumière la complémentarité des deux approches développées dans les chapitres II et III, visant à étendre la couverture chimique des PFAS détectables dans les aliments.

Le cinquième chapitre vise à évaluer l'exposition du consommateur à ces substances chimiques d'intérêt, dont certaines sont pour l'instant absentes des cadres réglementaires alimentaires. Ce chapitre constitue une preuve de concept, en caractérisant l'exposition du consommateur sur la base de la mise en évidence préalable de ces substances par des approches non ciblées. Cette démarche innovante permet ainsi d'évaluer l'impact des données générées et leur potentiel d'application, notamment pour des composés émergents qui ne font pas encore l'objet d'un encadrement réglementaire. Il s'agit d'un objectif secondaire de ce travail, venant compléter l'axe principal de recherche en soulignant la valeur ajoutée des approches non ciblées pour anticiper et élargir le champ de la surveillance alimentaire.

Enfin, le dernier chapitre présente les conclusions et les perspectives de ce travail de thèse.

Le travail de valorisation scientifique associé à ces recherches est présenté dans la section *Valorisations scientifiques* ci-après.

Valorisations scientifiques

Publications scientifiques dans des journaux internationaux à comité de lecture

Publications parues dans le cadre du projet de thèse (n = 2)

Jeannot, C., Macorps, N., Le Bizec, B., Parinet, J., Dervilly, G., 2025. Advancing PFASs monitoring in food: from targeted SPE-LC-MS/MS to non-targeted QuEChERS-LC-HRMS approaches. Food Chemistry: X. 29, 102674. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102674 (*Article 1)* IF 8,2.

Jeannot, C., Macorps, N., Amziane, A., Le Bizec, B., Parinet, J., Dervilly, G., 2025. High-resolution mass spectrometry for extended PFAS surveillance in food: Combining suspect and non-targeted approaches. Food Chemistry: X. 29, 102843. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102843 (*Article 2)* IF 8,2.

Publications en cours de soumission dans le cadre du projet de thèse (n = 1)

Jeannot, C., Le Bizec, B., Dervilly, G., Parinet, J., 2025. High-throughput QuEChERS–UHPLC-QToF-MS method for multi-class food residue and contaminant screening: application to seafood and dairy products. Food Chemistry. Soumission le 12/08/2025 *(Article 3)* IF 9,8.

Publications en cours de préparation dans le cadre du projet de thèse (n = 3)

Jeannot, C., Le Bizec, B., Dervilly, G., Parinet, J., Multi-platform screening strategies for confirmed identification and characterization of chemical diversity in french food. *(Article 4)*

Jeannot, C., Le Bizec, B., Dervilly, G., Parinet, J., Implementation of non-targeted approaches to a freshwater benthic fish (Machoiron) used as a sentinel species to assess various contaminants present in a lake in Ivory Coast. *(Article 5)*

Jeannot, C., Le Bizec, B., Parinet, J., Dervilly, G., Optimizing PFAS Monitoring: A Direct Comparison of Sample Preparation and HRMS Workflows on Q-Exactive and Q-ToF Instrument. *(Article 6)*

Communications orales

Nationales (6)

Jeannot, C. À la découverte des doctorantes et doctorants du centre INRAE Pays de La Loire : Cassandre Jeannot. Vidéo de 2 minutes et 29 secondes (https://www.laberca.org/accueil/toutes-les-actualites/vue-detaillee/portrait-inrae-cassandre-jeannot). Septembre 2023, Nantes, France.

Jeannot, C., Le Bizec, B., Parinet, J., Dervilly, G. Session 1 : Analyse des PFAS par NTS : retours d'expérience et discussions méthodologiques. Réseau Aquaref, Journées d'échanges sur l'analyse des PFAS, 6 et 7 novembre 2023, IFREMER, Nantes, France.

Jeannot, C. Développement et application de stratégies analytiques innovantes de type Suspect Screening (SS) et Non-Targeted Screening (NTS) pour étendre la connaissance de l'exposome dans un contexte d'évaluation du risque chimique dans les aliments. Ma thèse en 180 secondes (https://www.youtube.com/watch?v=LNBmLLCQaew à 27min40), Finale nantaise, 20 février 2024, Nantes, France.

Jeannot, C., Le Bizec, B., Dervilly, G., Parinet, J. Étendre la connaissance de l'exposome du consommateur : développement et optimisation de stratégies SS et NTS dans les aliments. 16ème

Congrès Francophone de Sciences Séparatives et Couplages de l'AFSEP (SEP 25), 25-27 mars 2025, Paris, France.

Jeannot, C., Le Bizec, B., Dervilly, G., Parinet, J. Développement et optimisation des approches non-ciblées pour mieux caractériser l'exposition du consommateur à la diversité des PFAS présents dans les aliments. Présentation à l'Anses, 15 avril 2025, Maisons-Alfort, France

Jeannot, C., Le Bizec, B., Dervilly, G., Parinet, J. Développement et applications de stratégies analytiques innovantes pour une identification élargie des contaminants dans les aliments. 53ème Congrès du Groupe Français de recherches sur les Pesticides (GFP), 11-13 juin 2025, Perpignan, France.

Internationales (3)

Jeannot, C., Le Bizec, B., Parinet, J., Dervilly, G. Simultaneous activation of 3 levers to extend the spectrum of PFAS studied in food matrices, the approach that makes all the difference. 11ème Congrès International de Recent Advances in Food Analysis (RAFA), 4-8 novembre 2024, Prague, République Tchèque.

Jeannot, C., Le Bizec, B., Dervilly, G., Parinet, J. Extending knowledge of the consumer exposome in food: development and optimization of SS and NTS strategies: My research subject. Présentation à McGill, 14 mai 2025, Montréal, Canada.

Jeannot, C., Le Bizec, B., Dervilly, G., Parinet, J. Development of suspect screening (SS) and non-targeted screening (NTS) strategies to better characterize food chemical exposure. Format 180 secondes. Journées Scientifiques et Doctorales de l'Anses, 4 et 5 juin 2025, Maisons-Alfort, France.

Communications affichées

Nationales (3)

Jeannot, C., Le Bizec, B., Parinet, J., Dervilly, G. Development and application of innovative analytical strategies such as suspect screening (SS) and non-targeted screening (NTS) to extend the knowledge of the exposome in the context of chemical risk assessment in food. Journées Scientifiques de l'École Doctorale Biologie Santé, 4 et 5 avril 2023, Nantes, France. *Prix du meilleur poster*.

Jeannot, C., Le Bizec, B., Parinet, J., Dervilly, G. Extending the knowledge of the exposome by suspect screening (SS) and non-targeted screening (NTS) of PFAS in food. Journée Scientifique de l'École Doctorale Biologie Santé, 16 avril 2024, Angers, France.

Jeannot, C., Le Bizec, B., Dervilly, G., Parinet, J. Extending the knowledge of the exposome by suspect screening (SS) and non-targeted screening (NTS) in food. Journées Scientifiques et Doctorales de l'Anses, 2 et 3 octobre 2024, Maisons-Alfort, France. *Prix du meilleur poster*.

Internationales (1)

Jeannot, C., Le Bizec, B., Dervilly, G., Parinet, J. Development and optimisation of an SS and NTS strategy to extend the characterisation of the consumer exposome to over 900 chemical residues and contaminants. 11ème Congrès International de Recent Advances in Food Analysis (RAFA), 4-8 novembre 2024, Prague, République Tchèque.

Chapitre I : État de l'art

Pour répondre à la question de recherche associée à ce travail de doctorat, ce premier chapitre présente une vue d'ensemble de l'état de l'art concernant l'exposition des individus à certains résidus et contaminants chimiques ainsi que les approches développées pour leur surveillance dans les denrées alimentaires. L'objectif est de comprendre l'étendue des expositions auxquelles l'être humain est soumis au cours de sa vie, avec un focus particulier sur l'exposition par voie alimentaire, et de présenter les stratégies mises en œuvre pour protéger le consommateur. Ce chapitre est présenté en cinq parties. La première introduit les concepts d'exposome mettant en lumière la nécessité d'intégrer l'ensemble des expositions environnementales, et en particulier chimiques dans les aliments, pour améliorer l'étude des maladies chroniques. La deuxième partie expose les principes de l'analyse du risque chimique alimentaire depuis l'évaluation jusqu'à la gestion et la communication du risque, en mettant en lumière les défis posés par les expositions multiples. La troisième partie porte sur les substances chimiques d'intérêt, incluant divers résidus et contaminants d'origine synthétique ou naturelle. Elle présente d'abord les aspects liés à l'évaluation du risque, puis ceux relatifs à la gestion réglementaire, notamment les limites maximales autorisées lorsqu'elles existent. La partie suivante détaille les méthodes analytiques mises en œuvre pour détecter ces composés. Elle décrit l'évolution des approches ciblées vers des stratégies non ciblées, à travers les méthodes de préparation des échantillons, les techniques d'acquisition et de retraitement des données, ainsi que les éventuelles exigences réglementaires qui encadrent la validation de ces méthodes analytiques. La dernière partie permet ainsi de situer les enjeux scientifiques liés à l'évaluation de l'exposition chimique *via* l'alimentation, et introduit les objectifs et la problématique de la présente thèse.

1. Le concept d'Exposome

L'exposome

Depuis toujours, les êtres humains sont confrontés à diverses maladies chroniques, attribuées autrefois presque systématiquement à des facteurs génétiques, sans considérer pleinement l'influence de l'environnement et des expositions tout au long de la vie. Il est alors devenu évident que les seuls déterminants héréditaires ne permettaient pas d'expliquer l'ensemble de ces pathologies, dont une large part résulte de l'influence combinée de facteurs environnementaux et sociaux complexes. C'est dans ce contexte que Christopher Wild, épidémiologiste britannique alors directeur du CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer), introduit en 2005 le concept d'Exposome, afin de mieux comprendre l'impact cumulé de l'ensemble des expositions auxquelles un individu est soumis au cours de sa vie. Ce concept prend en compte des expositions variées : agents chimiques issus de l'environnement ou de l'alimentation, agents physiques (comme le bruit), agents biologiques (comme les microorganismes), ainsi que les carences nutritionnelles et les facteurs psychosociaux ou socioéconomiques (comme le stress ou les inégalités sociales) (Wild, 2005). Il a ainsi souligné l'importance de prendre en compte les expositions non génétiques, notamment d'origine environnementale ou comportementale, pour mieux comprendre l'étiologie de certaines maladies et orienter les stratégies de prévention.

Contrairement au génome, correspondant à l'ensemble du patrimoine génétique d'un individu et demeurant inchangé tout au long de sa vie, l'exposome est dynamique : il évolue en permanence selon les interactions de l'individu avec son environnement. Conscient de la nécessité d'une définition plus large, Wild a complété en 2012 la définition initiale, en introduisant la prise en compte de (i) l'exposome externe général (contexte social, économique, environnement urbain ou rural, climat, capital social) ; (ii) l'exposome externe spécifique (régime alimentaire, activité physique, usage de substances, environnement professionnel, infections) ; (iii) l'exposome interne (réponses biologiques aux expositions (inflammation, stress oxydatif, altérations métaboliques), incluant les processus endogènes (génomique, épigénétique, microbiome, métabolome etc)) (Wild, 2012; ANSES, 2023). La **Figure 2** présente le concept d'exposome en soulignant les différentes voies d'expositions internes et externes humaines tout au long de la vie.

Aujourd'hui, la recherche vise à caractériser ces différentes facettes de l'exposome et à mesurer leur rôle dans le développement de maladies humaines, notamment les cancers, les maladies

endocriniennes ou neurodégénératives, ainsi que leurs interactions potentielles entre elles ou avec des paramètres biologiques (INRAE, 2021).

En France, le conseil scientifique de l'agence nationale œuvrant pour la protection de la santé publique dans les domaines de l'alimentation, de l'environnement et du travail définit l'exposome comme correspondant « à la totalité des expositions néfastes comme bénéfiques à des agents chimiques, biologiques et physiques, en interaction avec le statut physiologique, le milieu de vie et le contexte psycho-social, que connaît un organisme vivant de sa conception jusqu'à la fin de sa vie, afin d'expliquer son état de santé. » (ANSES, 2023).



Figure 2. *Représentation globale des expositions internes et externes affectant l'être humain tout au long de sa vie (https://www.inrae.fr/)*

L'écoexposome

En parallèle des recherches sur l'exposome, qui se concentrent principalement sur la santé humaine, l'écoexposome étend cette approche aux organismes non humains. En s'appuyant sur l'étude de contaminants tels que les pesticides ou les polluants organiques persistants (POPs), ces recherches permettent d'évaluer les effets des pollutions sur les espèces animales (la faune) et végétales (la flore), ainsi que sur les écosystèmes et la biodiversité. Cette démarche contribue à une meilleure compréhension des risques environnementaux, et fournit des éléments clés pour évaluer les effets des pollutions sur le vivant. Elle renforce ainsi la prévention des risques pour la protection de l'environnement et la santé humaine. La **Figure 3** illustre les expositions chimiques multiples présentes dans l'environnement et montre comment leur interconnexion conduit aux différentes expositions humaines, *via* les milieux environnementaux et la chaîne alimentaire. Les expositions chimiques

exogènes (d'origine extérieure, comme les polluants environnementaux) peuvent modifier les expositions endogènes (d'origine interne, liées au métabolisme ou aux processus physiologiques) (Escher *et al.*, 2017; INRAE, 2021; Scholz *et al.*, 2022).

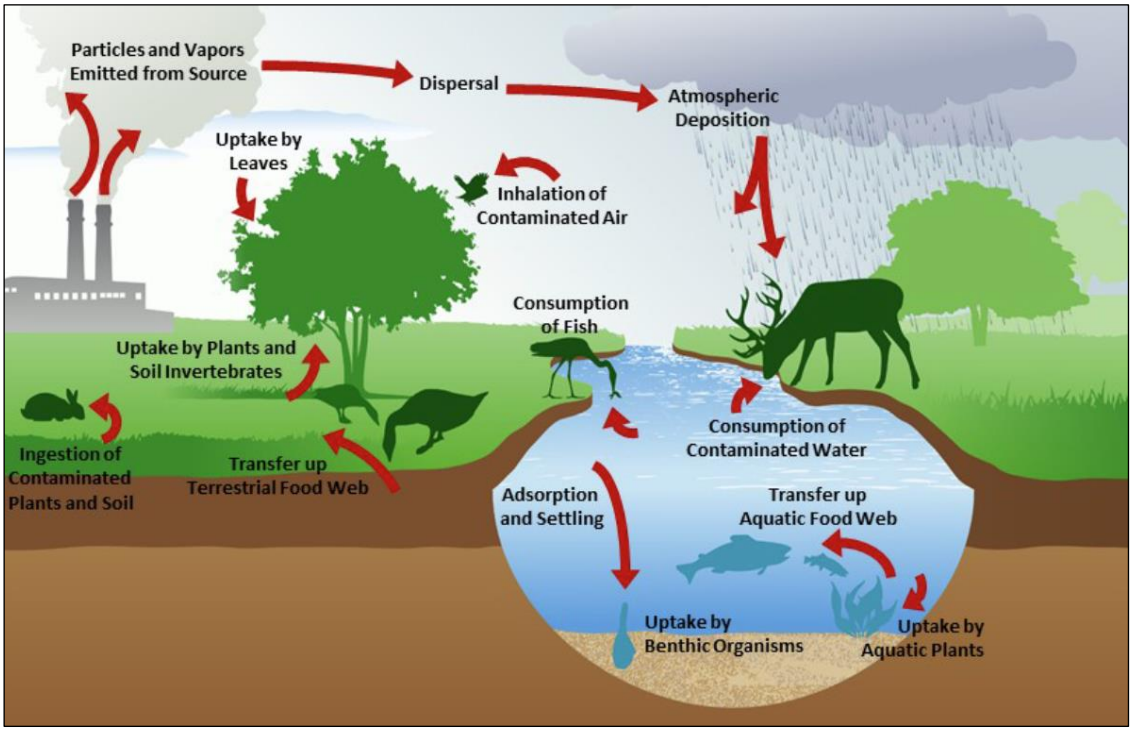


Figure 3. *Voies de transfert des substances chimiques via les milieux environnementaux et la chaîne alimentaire illustrant les expositions humaines multiples issues de l'environnement (US EPA, 2025)*

Ces interconnexions se traduisent par différentes voies d'exposition humaine aux substances chimiques, principalement l'ingestion, l'inhalation et, selon la catégorie de population, le contact cutané (**Figure 4**).

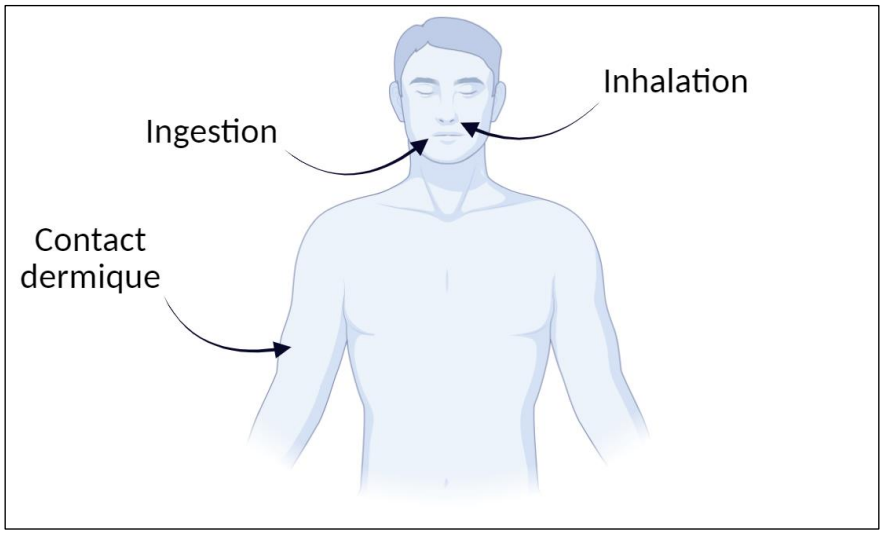


Figure 4. *Différentes voies d'exposition humaine aux substances chimiques : inhalation, ingestion et contact dermique*

L'exposome chimique alimentaire

L'exposome alimentaire constitue une composante essentielle de l'exposome global. En effet, parmi les différentes voies d'exposition aux substances chimiques, présentées sur la **Figure 4**, la voie alimentaire représente l'une des sources majeures pour l'être humain – hormis les expositions professionnelles – en particulier pour les composés étudiés dans le cadre de ce doctorat. Les denrées alimentaires agissent ainsi comme un vecteur quotidien pour l'entrée de contaminants et composés variés : polluants environnementaux (pesticides, polluants organiques persistants, mycotoxines, …), résidus pharmaceutiques ou de détergents, additifs, composés néoformés issus des procédés de cuisson, ou encore substances migrantes provenant des matériaux en contact avec les aliments. Toutefois, les aliments contribuent également à l'exposition à des contaminants inorganiques ainsi qu'à des agents microbiologiques — bactéries, virus ou parasites — dont le risque est étroitement lié aux pratiques agricoles, de transformation et de conservation. Cette diversité de sources illustre la complexité de l'exposition alimentaire et renvoie directement à l'élargissement progressif du concept d'exposome. En effet, dans les années qui ont suivi la première définition de l'exposome par Christopher Wild, le concept a été enrichi, notamment avec (Rappaport and Smith, 2010), qui ont mis en lumière l'exposome chimique interne. Celui-ci comprend les molécules exogènes — telles que les xénobiotiques ou les composés d'origine naturelle, comme les mycotoxines — détectées chez l'homme, ainsi que leurs produits de transformation.

La recherche sur l'exposome chimique est aujourd'hui particulièrement structurée, en raison de ses enjeux sociétaux majeurs. La pollution chimique, *via* l'air ou l'alimentation, est aujourd'hui reconnue comme l'une des principales causes de maladies et de décès prématurés. Cet enjeu est d'autant plus critique que plus de 350 000 substances chimiques ont été synthétisées à ce jour, et que leur présence croissante dans l'environnement complexifie l'évaluation de leurs effets sur la santé (INRAE, 2021; Karlsson, 2023).

Ces déterminants alimentaires de l'exposome, caractérisés par des expositions multiples, dynamiques et cumulatives, jouent un rôle central dans l'étiologie de pathologies chroniques telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires ou les troubles métaboliques. Au-delà de la nécessité d'en évaluer l'impact sanitaire, l'enjeu est double : hiérarchiser les dangers afin d'éclairer les politiques publiques afin de guider les stratégies de prévention, et affiner la caractérisation quantitative et qualitative des expositions à l'origine de ces impacts (INRAE, 2021).

2. Le principe de l'analyse des risques chimiques

L'alimentation constitue l'une des principales voies d'exposition de l'être humain à de nombreuses substances chimiques, qu'il s'agisse de résidus ou de contaminants d'origines environnementale, industrielle ou technologique. Depuis plusieurs décennies, leur présence dans les denrées alimentaires, parfois à l'état de traces, soulève des enjeux importants en matière de santé publique. Pour évaluer et maîtriser ces risques potentiels, une méthode rigoureuse et internationalement reconnue d'**analyse des risques** a été mise en place, permettant de garantir un niveau de sécurité sanitaire satisfaisant pour les consommateurs.

Cette approche a été largement structurée par les recommandations du *Codex Alimentarius*, référence mondiale en matière de normes alimentaires, qui en a défini les grandes étapes : l'évaluation, la gestion et la communication du risque. Créée par la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations - Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) et l'OMS (l'Organisation Mondiale de la Santé – World Health Organization (WHO)), la Commission du *Codex Alimentarius* (en latin, signifiant code alimentaire) est un organisme intergouvernemental qui a pour mission d'établir des normes alimentaires internationales afin de protéger la santé des consommateurs et d'assurer l'équité des échanges commerciaux (Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, 2007).

Elle repose sur une approche structurée et itérative qui permet d'identifier les dangers, d'évaluer leur impact potentiel sur la santé, puis de définir des mesures de maîtrise appropriées. Ainsi, lorsque cela est nécessaire, des recommandations, comme la fixation de teneurs maximales dans certaines denrées alimentaires pour diminuer l'exposition du consommateur, peuvent être émises. C'est dans cette optique que l'ANSES a formulé des conseils de consommation concernant les poissons, visant à concilier les besoins nutritionnels essentiels pour la population avec la réduction des risques liés à la surexposition de certains contaminants. Lorsque des dépassements des teneurs maximales autorisées sont constatés, une surveillance renforcée est mise en place afin d'identifier l'origine du problème, d'en prévenir la récurrence, et les denrées concernées ne peuvent alors être mises sur le marché. Ce processus comprend trois composantes distinctes et complémentaires : **l'évaluation du risque**, **la gestion du risque** et **la communication sur le risque**, représentées dans la **Figure 5**.

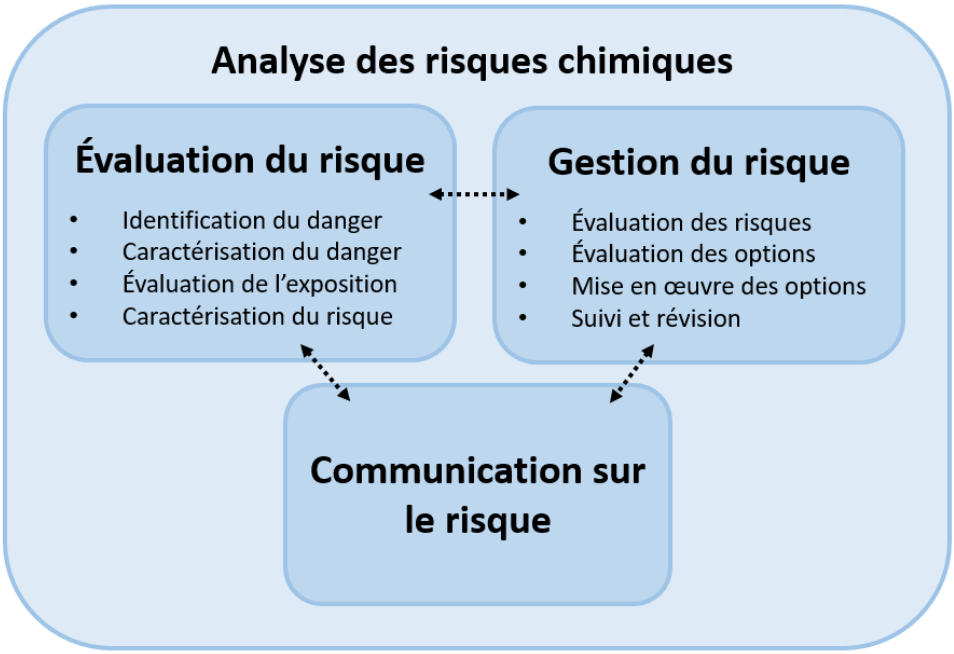


Figure 5. *Schéma représentatif du processus d'analyse des risques chimiques, adapté de (FAO of the United Nations, WHO et Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Application of Risk Management to Food Safety Matters, 1997)*

2.1. L'évaluation du risque chimique alimentaire en 4 étapes

L'évaluation du risque chimique alimentaire est un processus scientifique visant à estimer, à partir des données disponibles, les effets néfastes connus ou potentiels sur la santé humaine résultant de l'exposition à des dangers d'origine alimentaire. Elle doit s'appuyer sur les données les plus pertinentes, quantitatives autant que qualitatives, en tenant compte du contexte national. Le résultat de cette évaluation correspond à la probabilité qu'un effet néfaste survienne à la suite d'une exposition à une substance chimique ; c'est ce que l'on appelle le *Risque*. Celui-ci se définit par la relation : *Risque = Danger × Exposition*. Le *Danger* correspond à la propriété intrinsèque d'une substance de provoquer des dommages, tandis que l'*Exposition* désigne le contact effectif avec cette substance, *via* différentes voies d'exposition (WHO, 2011).

Ce processus intègre l'ensemble de la chaîne alimentaire, depuis la production jusqu'à la consommation, y compris les méthodes d'analyse, d'échantillonnage et les pratiques traditionnelles. L'évaluation doit également considérer les groupes sensibles et prendre en compte les effets aigus, chroniques, cumulés ou combinés, en se basant sur des scénarios d'exposition réalistes définis par la politique d'évaluation des risques (Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, 2007). Elle donne généralement lieu à un avis (opinion), et, le cas échéant, à des recommandations destinées au gestionnaire du risque.

Le processus d'évaluation des risques se déroule en quatre étapes principales : (1) **l'identification du danger**, (2) **la caractérisation du danger**, (3) **l'évaluation de l'exposition** et (4) **la caractérisation des risques**. Elles sont définies, ci-dessous, dans ce manuscrit telles que présentées par la Commission du Codex Alimentarius (Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, 2007). Ce document vise à fournir des directives aux gouvernements nationaux concernant l'analyse des risques en matière de sécurité sanitaire des aliments. Ces quatre étapes sont souvent précédées d'une étape additionnelle visant à définir le problème : **la formulation du problème**. Cette étape est essentielle pour définir les questions à traiter, en identifiant les connaissances disponibles et en établissant un plan d'analyse adapté, afin de garantir que l'évaluation réponde aux besoins des gestionnaires de risques. Le contenu de ces grandes étapes est présenté dans le **Tableau 1** (WHO, 2011). Ce processus est réalisé pour étudier une seule substance à la fois, contrairement aux scénarios réalistes de co-exposition, discutés dans la partie La problématique des mélanges (page 36).

Tableau 1. *Les quatre étapes principales de l'évaluation du risque chimique alimentaire, ainsi que la formulation préalable du problème, adapté de (WHO, 2011)*

Étape	***Description***	***Contenu***
Formulation du problème	Établir la portée et l'objectif de l'évaluation et le degré d'incertitude acceptable	Définir la question Connaissances préalables Temps et ressources nécessaires Nature du résultat d'évaluation souhaité Plan d'analyse
Identification du danger (1)	Identifier le type et la nature des effets néfastes sur la santé	Études humaines Études toxicologiques sur l'animal Études de toxicologie in vitro Études structure-activité Autres technologies prédictives
Caractérisation du danger (2)	Description qualitative ou quantitative des propriétés inhérentes d'un agent ayant le potentiel de causer des effets néfastes sur la santé	Sélection de l'ensembles de données critiques Modes/mécanismes d'action Variabilité cinétique Variabilité dynamique Dose/exposition-réponse pour les effets critiques
Évaluation de l'exposition (3)	Évaluation de la situation d'exposition de la (sous-) population identifiée dans la formulation du problème à un agent particulier (par exemple, la concentration ou la quantité)	Caractéristiques de la population exposée Sources Ampleur Fréquence Durée Voie d'exposition

Caractérisation du risque (4)	Conseils pour la prise de décisions	Déclarations ou recommandations qualitatives ou des indications quantitatives ou des estimations de risques Nature et gravité des effets Probabilité des effets Orientations fondées sur la santé Populations concernées Incertitudes

3.1.1. Identification du danger (1)

L'étape d'identification du danger est présentée comme *l'identification des agents biologiques, chimiques et physiques susceptibles de provoquer des effets adverses pour la santé et qui peuvent être présents dans un aliment donné ou un groupe d'aliments*. Selon l'IPCS (International Programme on Chemical Safety), un effet adverse est un *changement de la morphologie, de la physiologie, de la croissance, du développement, de la reproduction ou de la durée de vie d'un organisme, d'un système ou d'une (sous-)population qui entraîne une altération de la capacité fonctionnelle, une altération de la capacité à compenser un stress supplémentaire ou une augmentation de la susceptibilité à d'autres influences* (IPCS, 2004).

3.1.2. Caractérisation du danger (2)

L'étape de caractérisation du danger est présentée comme *l'évaluation qualitative et/ou quantitative de la nature des effets adverses pour la santé associée aux agents biologiques, chimiques et physiques qui peuvent être présents dans un aliment.* Pour ce faire, la relation dose-réponse est présentée comme la *détermination de la relation entre le degré d'exposition (dose) à un agent chimique, biologique ou physique et la gravité et/ou la fréquence des effets adverses qui en résultent pour la santé (réponse)*. Elle doit être évaluée pour les agents chimiques, et doit être effectuée si les données sont disponibles pour les agents biologiques ou physiques. C'est lors de cette étape que des Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR) peuvent être déterminées.

3.1.3. Évaluation de l'exposition (3)

L'étape d'évaluation de l'exposition est présentée comme *l'évaluation qualitative et/ou quantitative de l'ingestion probable d'agents biologiques, chimiques et physiques par le biais des aliments, ainsi que par suite de l'exposition à d'autres sources, le cas échéant*.

L'objectif de cette étape est de déterminer si les individus sont exposés à une substance chimique potentiellement dangereuse, de quantifier cette exposition et d'identifier les voies, milieux et durées

concernés. Deux approches complémentaires sont distinguées : les expositions humaines externes et internes.

L'évaluation de l'exposition externe estime les quantités de contaminants ingérées, inhalées ou absorbées, principalement *via* l'alimentation (plus de 90 % des apports). Pour certains contaminants, comme les POPs, cette exposition se fait en particulier par la consommation d'aliments riches en graisses, comme les poissons, les viandes et les œufs, tandis que d'autres substances peuvent présenter des voies d'exposition alimentaire différentes (Polder *et al.*, 2016). L'évaluation de l'exposition alimentaire repose sur la combinaison des données de consommation des denrées et des données de contamination chimique. En France, les habitudes de consommation sont documentées par les enquêtes INCA (Individuelle Nationale de Consommation Alimentaire), qui permettent d'estimer les quantités d'aliment ingérées. Les niveaux de contamination, quant à eux, proviennent principalement des études de l'alimentation totale (EAT).

Les EAT ont pour objectif premier d'estimer l'exposition de la population aux substances chimiques présentes dans les aliments à partir de l'ensemble du régime alimentaire. Pour cela, elles s'appuient sur la sélection des aliments en fonction des données de consommation, leur préparation sous une forme représentative de celle dans laquelle ils sont réellement consommés, puis leur analyse chimique (WHO et FAO, 2008; EFSA et FAO, 2011). Ces études à grande échelle fournissent ainsi des informations précieuses sur les niveaux d'exposition et la fréquence de dépassement des VTR, mais ne permettent pas d'identifier précisément les sources de contamination.

En France, ces EAT successives menées au cours des 20 dernières années témoignent d'un élargissement considérable, passant d'une trentaine de substances étudiées à plusieurs centaines, dans une diversité de produits alimentaires croissante, générant ainsi des milliers de données analytiques. Il y a déjà eu trois EAT nationale : la première (EAT1) a été réalisé entre 2001 et 2004, la seconde (EAT2) entre 2006 et 2011, suivie d'une EAT infantile (EATi) entre 2011 et 2016 – initiative particulièrement rare à l'échelle mondiale – et l'EAT3 actuellement en cours (WHO et FAO, 2008; ANSES, 2019). Elles constituent un outil puissant, coûteux et complexe à mettre en œuvre, accessible principalement aux pays disposant de ressources suffisantes ou bénéficiant du soutien d'organisations internationales telles que la FAO ou l'OMS, et permettent de cibler un large spectre de composés.

L'exposition alimentaire est généralement estimée selon l'équation :

$$Exposition\ alimentaire = \frac{\sum(Concentration\ chimique\ dans\ l'aliment \times Quantité\ consommée)}{Poids\ corporel}$$

Avec l'exposition alimentaire en mg contaminant/kg poids corporel, la concentration de la substance dans l'aliment en mg contaminant/kg aliment, et le poids corporel (pc) en kg.

Elle peut concerner des expositions aiguës (24 h) ou chroniques (moyenne sur la durée de vie). De plus, les évaluations destinées aux nutriments tendent à sous-estimer l'exposition, tandis que celles portant sur des contaminants chimiques surestiment volontairement l'exposition pour des raisons de précaution. Dans ce cadre, différentes stratégies d'estimation sont appliquées, telles que l'upper bound (UB), qui considère toutes les valeurs non quantifiées comme égales à la limite de quantification, et le lower bound (LB), qui les assimile à zéro, afin de couvrir un spectre d'hypothèses d'exposition (Rivière *et al.*, 2014).

3.1.4. Caractérisation du risque (4)

L'étape de caractérisation du risque est présentée comme *l'estimation qualitative et/ou quantitative, compte tenu des incertitudes inhérentes à l'évaluation, de la probabilité de la fréquence et de la gravité des effets adverses connus ou potentiels sur la santé susceptible de se produire dans une population donnée, sur la base de l'identification des dangers, de la caractérisation des dangers et de l'évaluation de l'exposition*. Au cours de cette étape, les données issues des deux étapes précédentes — la caractérisation du danger et l'évaluation de l'exposition — sont croisées afin d'estimer le risque pour la santé humaine. Les niveaux d'exposition calculés sont comparés aux valeurs toxicologiques de référence (VTR), établies lors de la caractérisation du danger. Pour faciliter l'interprétation et la prise de décision, l'Anses a proposé un système de hiérarchisation du risque dans le cadre de l'EAT 2, présenté dans le **Tableau 2** (ANSES 2011).

Tableau 2. *Hiérarchisation de la caractérisation du risque, adapté de (ANSES 2011)*

Quelle conclusion ?	Dans quels cas ?
1. Risque pouvant être écarté	- Pas de dépassement de la VTR - Pas de risque d'inadéquation d'apport nutritionnel par rapport aux besoins
2. Risque ne pouvant être écarté	- Dépassement de la VTR - Risque d'inadéquation d'apport nutritionnel par rapport aux besoins ou dépassement de la limite de sécurité
3. Impossibilité de conclure	- Absence de VTR robuste, de LS ou de besoin défini, ou absence de caractérisation de l'exposition - Dépassement de la VTR, sous l'hypothèse haute, majorant l'exposition

2.2. La gestion et la communication du risque

La gestion du risque, seconde composante du processus d'analyse des risques, est une étape distincte de l'évaluation. Elle consiste à examiner les différentes options de gestion en concertation avec les parties prenantes, en s'appuyant sur les résultats de l'évaluation des risques ainsi que sur d'autres facteurs légitimes, tels que les enjeux de santé publique ou les considérations socio-économiques. L'objectif est de sélectionner, mettre en œuvre, puis ajuster si nécessaire les mesures de prévention et de contrôle les plus adaptées pour assurer la protection des consommateurs et garantir des pratiques équitables.

Pour ce faire, les organismes chargés de la gestion des risques doivent rester distincts de ceux responsables de leur évaluation, afin de préserver l'indépendance et l'intégrité scientifique du processus. En Europe, l'évaluation des risques est assurée par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA, European Food Safety Authority), tandis que la DG SANTE (Directorate-General for Health & Food Safety) est responsable de leur gestion. En France, cette séparation est également appliquée : l'Anses conduit l'évaluation scientifique des risques, tandis que la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) se charge de la gestion et de la mise en œuvre des mesures correspondantes.

Les EAT, qui relèvent de l'évaluation des risques, peuvent être complétées par des plans de surveillance et de contrôle (PSPC). Ces derniers constituent un outil de gestion des risques visant à vérifier la conformité réglementaire des denrées alimentaires. Ces approches poursuivent des finalités différentes, mais contribuent à une vision globale de l'exposition des populations, d'un suivi ciblé du respect des normes, et par conséquent à générer des données robustes pour l'évaluation de l'exposition (WHO et FAO, 2008).

La dernière composante du processus d'analyse des risques est **la communication sur le risque**. Il s'agit d'un échange interactif d'informations et d'opinions tout au long de ce processus, portant sur les risques, les facteurs qui y sont associés ainsi que leur perception. Cette communication implique l'ensemble des parties prenantes : les évaluateurs et gestionnaires des risques, les consommateurs, les acteurs de l'industrie agroalimentaire et de l'alimentation animale, les milieux académiques, ainsi que d'autres parties intéressées. Cette composante comprend également l'explication des résultats de l'évaluation des risques et la base des décisions prises en matière de gestion des risques (Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, 2007).

2.3. La problématique des mélanges

En 2023, environ 2,55 milliards de tonnes de produits chimiques de synthèse ont été produites dans le monde, contre environ 2,3 milliards en 2017, soulignant une croissance continue du secteur (TradeImex, 2023). La pollution chimique, regroupée sous le concept des *nouvelles entités* (*novel entities*), est aujourd'hui reconnue comme l'une des limites planétaires à ne pas franchir pour préserver l'habitabilité de la Terre. Ce concept fait référence à des entités qui sont nouvelles au sens géologique et qui pourraient avoir des répercussions à grande échelle menaçant l'intégrité des processus du système terrestre. En effet, dans le cadre des limites planétaires, la pollution chimique correspond à l'introduction massive de substances de synthèse dans la biosphère, dont la persistance, la bioaccumulation et la toxicité peuvent entraîner des perturbations irréversibles pour les écosystèmes et la santé humaine (Rockström *et al.*, 2009; Persson *et al.*, 2022). Des travaux récents montrent que l'augmentation continue de la production et des rejets d'un nombre croissant de produits chimiques de synthèse dépasse largement la capacité de la planète à en limiter les impacts. Cette dynamique signifie que la limite planétaire relative aux nouvelles entités est désormais franchie, et que des actions urgentes sont nécessaires pour réduire la production et les rejets. Néanmoins, la persistance de nombreuses de ces substances et/ou les effets qui leur sont associés continueront de constituer une menace, même en cas de réduction immédiate (Persson *et al.*, 2022).

Cette production massive alimente une pollution chimique omniprésente. Ces polluants sont retrouvés dans tous les compartiments environnementaux, *via* six grandes voies de transport : les sols, l'air, l'eau, la faune, les humains et le commerce, s'accumulant ainsi dans les écosystèmes, les chaînes alimentaires et les organismes vivants. Ils sont à l'origine de nombreux effets toxicologiques, et peuvent en particulier contribuer à l'étiologie des maladies chroniques (Naidu *et al.*, 2021). La pollution chimique serait responsable d'un décès prématuré sur six dans le monde, soit plus de neuf millions de morts par an, par exposition à l'air, à l'eau, aux aliments ou à des biens de consommation contaminés. Par ailleurs, plus de 10 000 substances chimiques sont utilisées ou présentes dans notre alimentation moderne, exposant les populations à des risques directs par ingestion (Naidu *et al.*, 2021).

L'évaluation et la gestion des risques chimiques sont le plus souvent conduites de manière cloisonnée, en analysant les substances une à une, parfois par familles chimiques (comme les PCB ou les PFAS), mais rarement de façon intégrée. Ainsi, la majorité des évaluations repose sur une approche dite d'exposition globale — aussi appelée l'exposition agrégée —, qui considère une substance unique, mais intègre ses différentes voies d'exposition (ingestion, inhalation, etc.) et sources potentielles (eau, alimentation, poussière, tabac, contact, activité professionnelle etc.) (**Figure 6** ; *Aggregate exposure*).

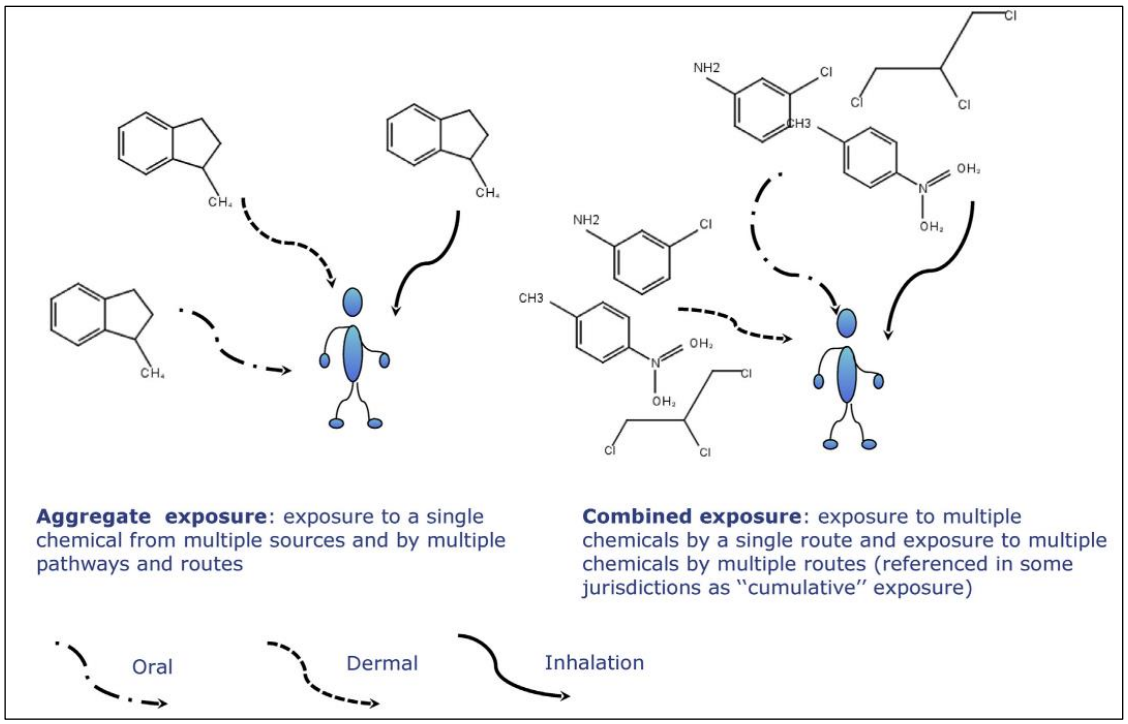


Figure 6. *Schéma représentant l'exposition globale et l'exposition combinée aux mélanges de substances chimiques (Kienzler et al., 2016)*

Pour évaluer la totalité de l'exposition humaine, l'évaluation de l'exposition interne repose quant à elle sur la biosurveillance humaine (HBM, Human BioMonitoring) et mesure directement la présence de polluants dans des matrices biologiques comme le sang ou l'urine, reflétant l'accumulation de ces substances dans l'organisme (Tolonen *et al.*, 2022). Cette approche est nécessaire car l'évaluation de l'exposition externe *via* l'alimentation, l'air ou d'autres voies ne permet pas de quantifier l'accumulation réelle dans les tissus humains. Or, des expositions prolongées, même à de faibles doses peuvent avoir des effets délétères sur la santé, notamment du fait des mélanges de substances et de leurs interactions. La biosurveillance fournit donc une mesure intégrée et cumulative de l'exposition totale à divers composés, indispensable pour estimer les risques sanitaires à long terme et orienter les politiques de gestion des risques.

En parallèle, les réglementations établissent généralement des seuils ou des limites maximales pour chaque contaminant pris isolément, dans des matrices spécifiques telles que les aliments, l'eau ou l'air. Cette approche reste éloignée des scénarios réalistes de co-exposition, dans lesquels les individus sont exposés simultanément à de multiples substances par des voies et sources variées (Kienzler *et al.*, 2016; Manz *et al.*, 2023).

Toutefois, dans la réalité, comme expliqué précédemment à travers le concept d'exposome, les individus sont le plus souvent exposés non pas à une seule substance chimique, mais à un ensemble

de produits chimiques simultanément (**Figure 6** ; *Combined exposure*), et en revanche, les risques liés à l'exposition combinée de ces substances sont rarement évalués (Kienzler *et al.*, 2016).

En effet, le processus de l'évaluation des risques est fragmenté ; il ne tient pas compte des expositions cumulative et combinée, ni des risques potentiels liés à d'autres molécules présentes dans les formulations, comme les coformulants et les adjuvants, qui peuvent contribuer à la toxicité globale. L'exposition combinée désigne l'exposition à diverses substances chimiques par une seule voie, et l'exposition cumulative représente l'exposition à diverses substances chimiques *via* plusieurs voies (**Figure 7**) (Kienzler et al., 2016; EEA, 2023; Manz et al., 2023).

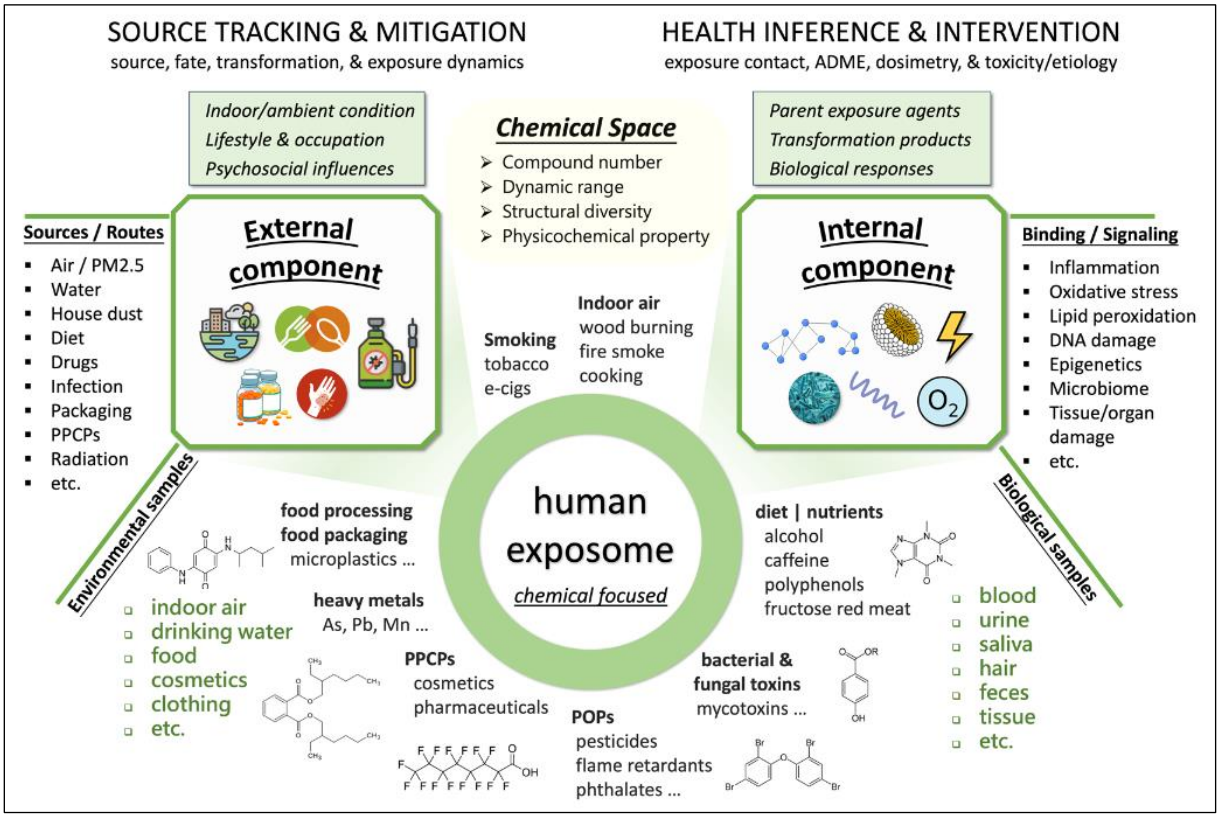


Figure 7. *Illustration schématique de l'exposition chimique humaine consistant à la fois en des composants externes et internes, qui englobe le nombre d'espèces chimiques, la plage dynamique, la diversité structurelle et les propriétés physicochimiques (Lai et al., 2024)*

L'exposition à des mélanges de substances chimiques, souvent appelée effet cocktail, reflète plus fidèlement la réalité d'une exposition chronique et continue, et peut produire des modes d'action (MOA) différents (Lai *et al.*, 2024). Lorsque plusieurs substances partagent un même mécanisme d'action, leurs effets peuvent s'additionner (dose addition). L'effet global correspond à la somme des effets individuels, ce qui permet d'estimer le risque en additionnant leurs concentrations. Si leurs mécanismes diffèrent, on parle d'action indépendante, avec une évaluation basée sur des modèles probabilistes (Gray, Conley et Bursian, 2024). Les interactions peuvent aussi modifier la toxicité globale à travers des effets de synergie, lorsque l'effet combiné est plus élevé que la somme des effets isolés

(effet additif), ou d'antagonisme, lorsque la combinaison atténue l'effet global. Les effets synergiques sont particulièrement préoccupants, car ils peuvent survenir à des niveaux d'exposition inférieurs aux seuils réglementaires établis pour chaque substance prise isolément (Hernández, Gil et Lacasaña, 2017; Chi *et al.*, 2023).

De plus, certains produits comme des biocides, pesticides, additifs alimentaires ou produits pharmaceutiques peuvent être constitués d'un seul composé ou de mélanges. Comme leur composition est généralement connue et que les substances sont relativement bien évaluées individuellement, l'évaluation des risques se fait principalement de manière prospective, sur la base des propriétés de chaque composant. Des tests peuvent parfois être réalisés sur les produits formulés, mais lorsque plusieurs produits sont utilisés simultanément — par exemple dans l'agriculture ou les soins personnels — les risques combinés qui en résultent ne sont généralement pas évalués (Kienzler *et al.*, 2016).

En 2012, la Commission européenne a publié une communication sur les effets combinés des produits chimiques, soulignant ses préoccupations face aux limites de l'évaluation des substances prises individuellement et proposant des orientations pour mieux comprendre et évaluer les risques liés aux mélanges chimiques. Elle rappelle que, si la législation européenne fixe des limites strictes pour chaque substance dans différentes matrices, les risques associés à leur combinaison sont rarement pris en compte (Kienzler *et al.*, 2016).

L'attention portée aux risques liés aux mélanges chimiques s'est accrue ces dernières années, en particulier pour l'exposition environnementale non intentionnelle à des mélanges inconnus. Plusieurs organisations, dont l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques - Organisation for Economic Co-operation and Development), l'EFSA et l'OMS, ont publié des lignes directrices sur leur évaluation. On reconnaît qu'un grand nombre de substances potentiellement dangereuses pour la santé humaine sont présentes dans la chaîne alimentaire. Cependant, le nombre de substances évaluées ou réglementées reste faible comparé au grand nombre (environ 100 000) de produits chimiques industriels utilisés régulièrement.

De plus, comme le souligne l'infographie de l'Agence européenne de l'environnement (EEA) intitulée *"The unknown territory of chemical risks"* (**Figure 8**)*,* une part importante des produits chimiques présents sur le marché et dans l'environnement échappe totalement à toute évaluation ou régulation — illustrant ainsi l'étendue de substances encore largement inconnues (EEA, 2019).

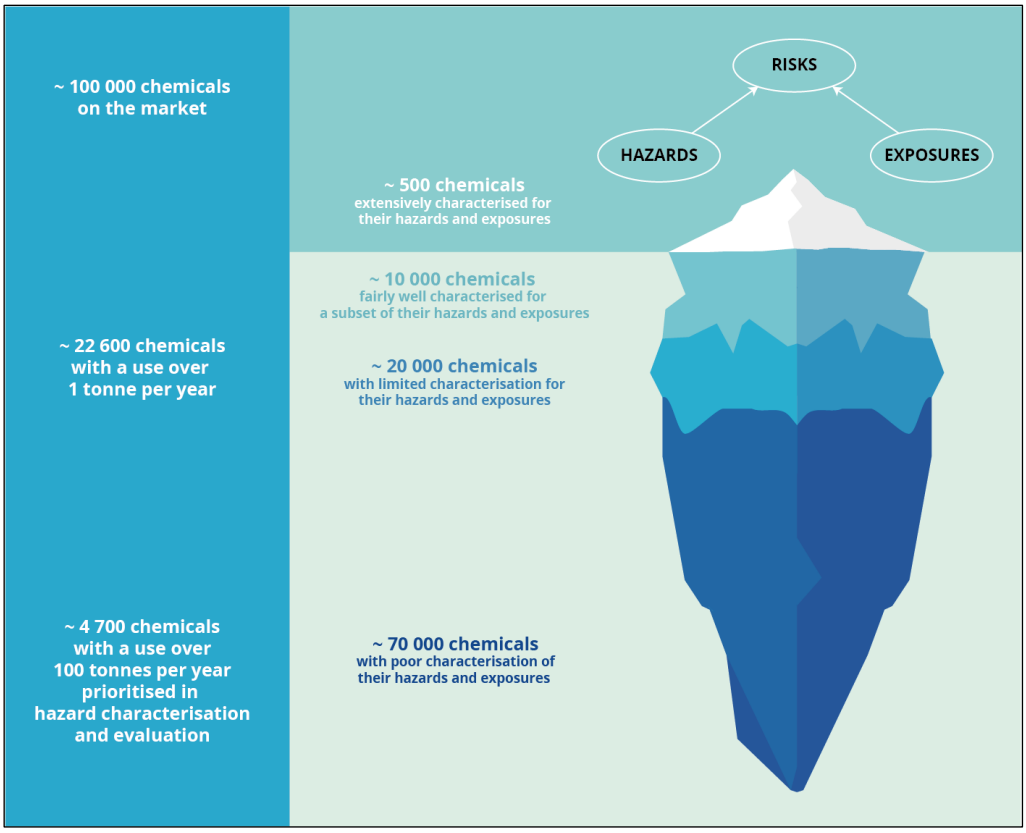


Figure 8. *Illustration de l'European Environment Agency représentant le territoire inconnu des risques chimiques (EEA, 2019)*

En 2019, le Programme des Nations unies pour l'environnement (United Nations Environment Programme (UNEP)) recensait plus de 140 000 substances chimiques et mélanges synthétisés par l'homme. Toutefois, des inventaires mondiaux plus récents de substances chimiques, publiés en 2020, estiment ce chiffre à plus de 350 000, soit un nombre bien plus élevé que ce qui avait été initialement rapporté. Et chaque année, de nouvelles substances synthétiques continuent d'être développées. Le manque d'informations toxicologiques, combiné à l'infinité de combinaisons possibles, rend l'évaluation des risques liés aux mélanges particulièrement complexes (Kienzler *et al.*, 2016; UNEP, 2019; Naidu *et al.*, 2021).

3. Les substances chimiques d'intérêt

Les êtres humains sont exposés à une grande diversité de substances chimiques à travers leur alimentation. Certaines sont volontairement utilisées dans le cadre des traitements appliqués aux cultures ou aux animaux d'élevage, et peuvent se retrouver en petites quantités dans les denrées alimentaires. Il s'agit des résidus, tels que les pesticides ou les médicaments vétérinaires. D'autres substances, en revanche, sont présentes de manière non intentionnelle, produites ou transférées au cours des différentes étapes de la chaîne alimentaire — qu'il s'agisse de la production, de l'emballage,

du transport ou encore par l'environnement, ce sont des contaminants. Certaines sont d'origine industrielle, comme les PFAS ou les PCB, qui sont rejetées dans l'environnement à la suite d'activités humaines. D'autres sont formées de manière non intentionnelle lors de processus de combustion, comme les dioxines, puis persistent dans l'environnement. Enfin, certaines ont une origine naturelle, comme les alcaloïdes et les mycotoxines.

Parmi ces grandes familles, certaines substances ont longtemps été ignorées en raison de leurs faibles concentrations et du manque de données sur leur devenir environnemental. Par exemple, l'Agence américaine pour les substances toxiques (ATSDR) a identifié 275 substances prioritaires en tant que polluants, en se basant sur leur fréquence de détection, leur toxicité et leur potentiel d'exposition humaine (Naidu *et al.*, 2021). De même, l'EFSA a listé 212 composés prioritaires, correspondant à ceux susceptibles de persister dans l'environnement, de s'accumuler dans la chaîne alimentaire et de présenter un risque chronique pour la santé humaine (Oltmanns *et al.*, 2019). Toutefois, ce chiffre reste probablement largement sous-estimé, en raison de la difficulté à détecter et à suivre de nouveaux composés, souvent inconnus, une fois relâchés dans l'environnement. Ces composés sont aujourd'hui au centre de l'attention scientifique grâce aux progrès des techniques analytiques pour mieux les caractériser, afin de prévenir les risques potentiels qu'ils pourraient représenter à l'avenir. Certaines de ces substances appartiennent à une catégorie appelée *contaminants émergents (CE),* également connus sous *emerging contaminants* (EC) ou de *contaminants of emerging concern* (CECs). Un risque émergent est défini comme « Un risque résultant d'un danger nouvellement identifié auquel une exposition significative pourrait se produire, ou un risque résultant d'une exposition et/ou d'une sensibilité nouvelle ou accrue et inattendue à un danger déjà connu » (EFSA, 2007). La définition de ces substances comme risque émergent illustre un changement de paradigme dans la manière d'aborder la pollution environnementale : il ne s'agit plus seulement d'étudier des substances bien connues, mais d'explorer des mélanges complexes provenant de multiples activités humaines. Contrairement aux polluants historiques, les CE ne sont pas encore réglementés, mais sont suspectés d'avoir des effets potentiellement nocifs sur la santé humaine et les écosystèmes. Conçus pour être stables, durables et résistants, ces contaminants persistent dans l'environnement, notamment dans les sols, les eaux et les organismes vivants, allant jusqu'à se bioaccumuler dans la chaîne alimentaire (Bhagat, Singh et Shimada, 2024). Les CE regroupent les médicaments, les PFAS, les produits de soins personnels, les surfactants, les pesticides, et les microplastiques et les nanomatériaux (Khan *et al.*, 2023).

Afin de protéger le consommateur, les processus d'analyse du risque, incluant l'évaluation et la gestion du risque, dont parfois la fixation de limites réglementaires dans les aliments, ont été réalisés pour chacune de ces familles de substances chimiques. Les caractéristiques de ces familles, les voies

d'exposition humaine, les dangers potentiels, ainsi que les réglementations mises en place dans les aliments pour protéger la santé humaine sont présentés ci-dessous.

3.1. Les substances per- et polyfluoroalkylées (PFAS)

Les PFAS sont une classe de composés chimiques synthétiques. Elles ont été introduites par des entreprises chimiques telles que 3M et DuPont dans les années 1940. Dès 1948, DuPont met au point le polytétrafluoroéthylène (PTFE), commercialisé sous la marque « Teflon », marquant le début de l'exploitation industrielle des PFAS. Ce composé, premier fluoropolymère commercialisé, illustre le tournant technologique majeur que ces substances ont représenté. Initialement conçus pour des applications industrielles de haute performance, les PFAS ont rapidement trouvé leur place dans de nombreux secteurs grâce à leurs propriétés physico-chimiques uniques. À l'échelle mondiale, la production annuelle actuelle de PFAS dépasse le million de tonnes, reflétant l'ampleur de leur intégration dans les procédés industriels et les produits de consommation courante (Evich *et al.*, 2022).

Les PFAS sont particulièrement utilisés pour leur importante stabilité chimique, leur résistance à la chaleur, aux produits chimiques, aux graisses et à l'eau (Panieri *et al.*, 2022; Das, Ananthanarasimhan et Rao, 2024). Leur structure moléculaire, caractérisée par des liaisons carbone-fluor (C-F) particulièrement fortes, leur confère une durabilité qui dépasse celle de la plupart des composés organiques traditionnels. Ces propriétés ont favorisé leur utilisation dans une multitude de produits de consommation et d'applications industrielles (**Figure 9**) : ustensiles de cuisine antiadhésifs, textiles hydrofuges, mousses anti-incendie, emballages alimentaires résistants aux graisses, cosmétiques, contenants pharmaceutiques, pesticides, et bien d'autres (Glüge *et al.*, 2020; Panieri *et al.*, 2022; Das, Ananthanarasimhan et Rao, 2024). Les PFAS sont définis sur la base de leur structure chimique, tandis que les pesticides le sont selon leur usage. Ainsi, certains PFAS sont intégrés dans des formulations de pesticides, et sont donc appelés des pesticides-PFAS ou PFAS-pesticides. Certains PFAS, également utilisés en pharmaceutique grâce à leurs propriétés, sont connus sous le nom de fluoro-pharmaceuticals (Zhang et Liang, 2023).

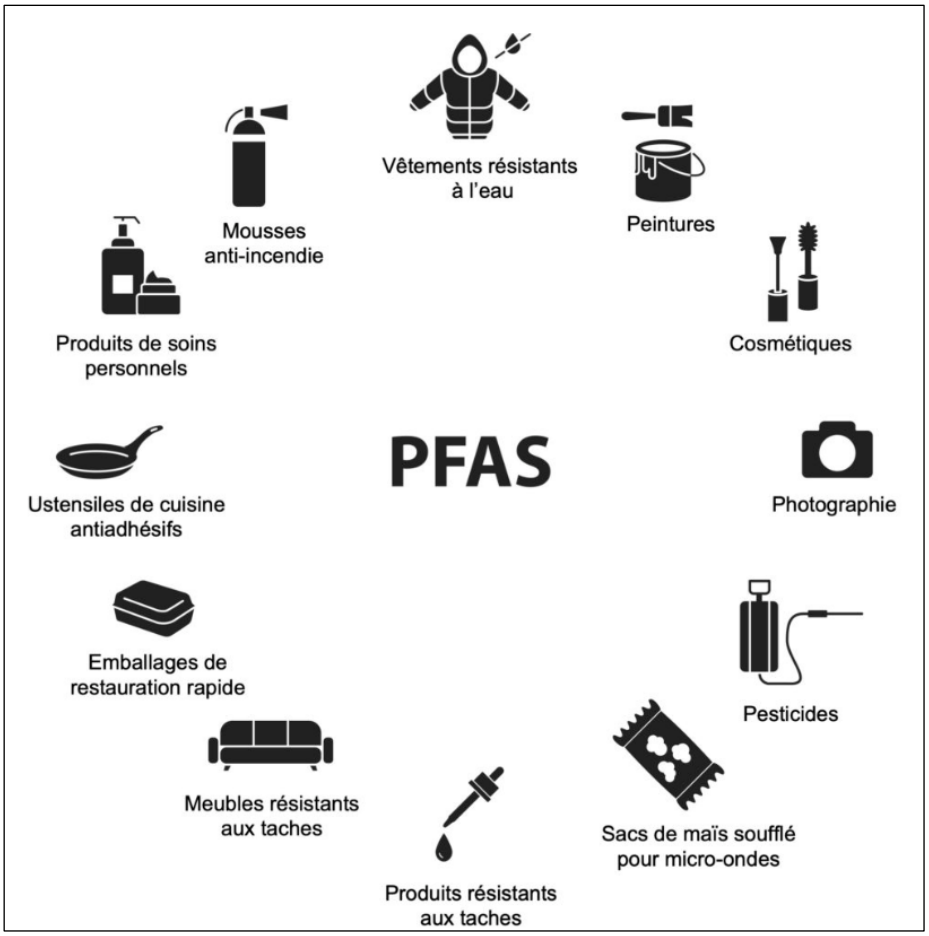


Figure 9. *Principaux domaines d'utilisation des PFAS dans les secteurs industriels et de consommation (Dr Martin Juneau, M. D., 2022)*

Une revue de la littérature récente a recensé 107 types de PFAS répartis en 15 catégories dans plus de 1000 produits de consommation courante, soulignant l'ampleur de leur diffusion (Dewapriya *et al.*, 2023). Leur résistance à la dégradation, qui explique leur succès commercial, est toutefois à l'origine d'une problématique environnementale majeure. En effet, les PFAS sont aujourd'hui reconnus pour leur persistance dans les milieux naturels et leur capacité à s'accumuler dans les organismes vivants, y compris l'être humain, suscitant des préoccupations sanitaires importantes.

En raison de leur extrême stabilité, de leur persistance dans l'environnement et de leur aptitude à s'accumuler (bioaccumulation) dans les organismes vivants, les PFAS sont souvent désignés sous le terme de « produits chimiques éternels » ou *forever chemicals* (Bhagat, Singh et Shimada, 2024). Cependant, cette appellation est aujourd'hui remise en question, car diverses études ont démontré le potentiel de certaines approches émergentes pour dégrader ou éliminer ces substances (Das, Ananthanarasimhan et Rao, 2024).

Les PFAS constituent une vaste famille de composés chimiques fluorés de synthèse, caractérisés par la présence d'au moins un groupement méthyle perfluoré ($–CF_3$) ou méthylène perfluoré ($–CF_2–$). Leur

structure de base comprend une chaîne carbonée hydrophobe de longueur variable (de 2 à 18 atomes de carbone), entièrement ou partiellement fluorée, associée à une tête hydrophile comportant des groupes fonctionnels polaires tels que les acides carboxyliques ou sulfoniques. Cette configuration confère aux PFAS un caractère amphiphile unique : la queue fluorée est à la fois hydrophobe et lipophobe, tandis que la tête fonctionnelle est hydrophile. L'une des caractéristiques clés de ces composés est la présence de la liaison carbone–fluor (C–F), considérée comme l'une des plus stables en chimie organique. Cette liaison confère aux PFAS une exceptionnelle résistance à la dégradation thermique, chimique et biologique, expliquant leur persistance dans l'environnement, leur mobilité dans les milieux naturels et leur propension à la bioaccumulation (Panieri *et al.*, 2022). La combinaison de ces propriétés physicochimiques – longueur de la chaîne, degré de fluoration et nature des groupes fonctionnels – a conduit au développement de milliers de molécules distinctes au sein de cette famille. Cette diversité structurelle permet une large gamme d'applications industrielles et commerciales, détaillées ci-dessus.

Historiquement, une première définition structurale des PFAS a été proposée en 2011 par (Buck *et al.*, 2011), qui les décrivait comme *" highly fluorinated aliphatic substances that contain 1 or more C atoms on which all the H substituents have been replaced by F atoms, in such a manner that they contain the perfluoroalkyl moiety CnF2n+1–"*, c'est-à-dire des substances aliphatiques hautement fluorées contenant au moins un motif perfluoroalkyle ($CnF_2n+1–$). Par la suite, l'OCDE a fait évolué cette définition pour prendre en compte l'existence de plusieurs molécules qui, bien qu'elles aient des atomes de carbone entièrement fluorés, ne possédaient pas de groupe $–CF_3$ et ne répondaient donc pas à la définition précédente (Wang *et al.*, 2021). Les PFAS étaient alors définis comme des "*fluorinated substances that contain at least one fully fluorinated methyl or methylene carbon atom (without any H/Cl/Br/I atom attached to it), i.e., with a few noted exceptions (represented by a carbon atom instead having H/Cl/Br/I atoms attached), any chemical with at least a perfluorinated methyl group (−CF3) or a perfluorinated methylene group (−CF2−)"*. Cette définition plus générale a permis d'inclure de nouveaux composés comme le fipronil, un composé notamment utilisé en médecine vétérinaire. La **Figure 10** illustre différents exemples de molécules fluorées, classées comme PFAS ou non, en fonction de l'ancienne et de la nouvelle définition.

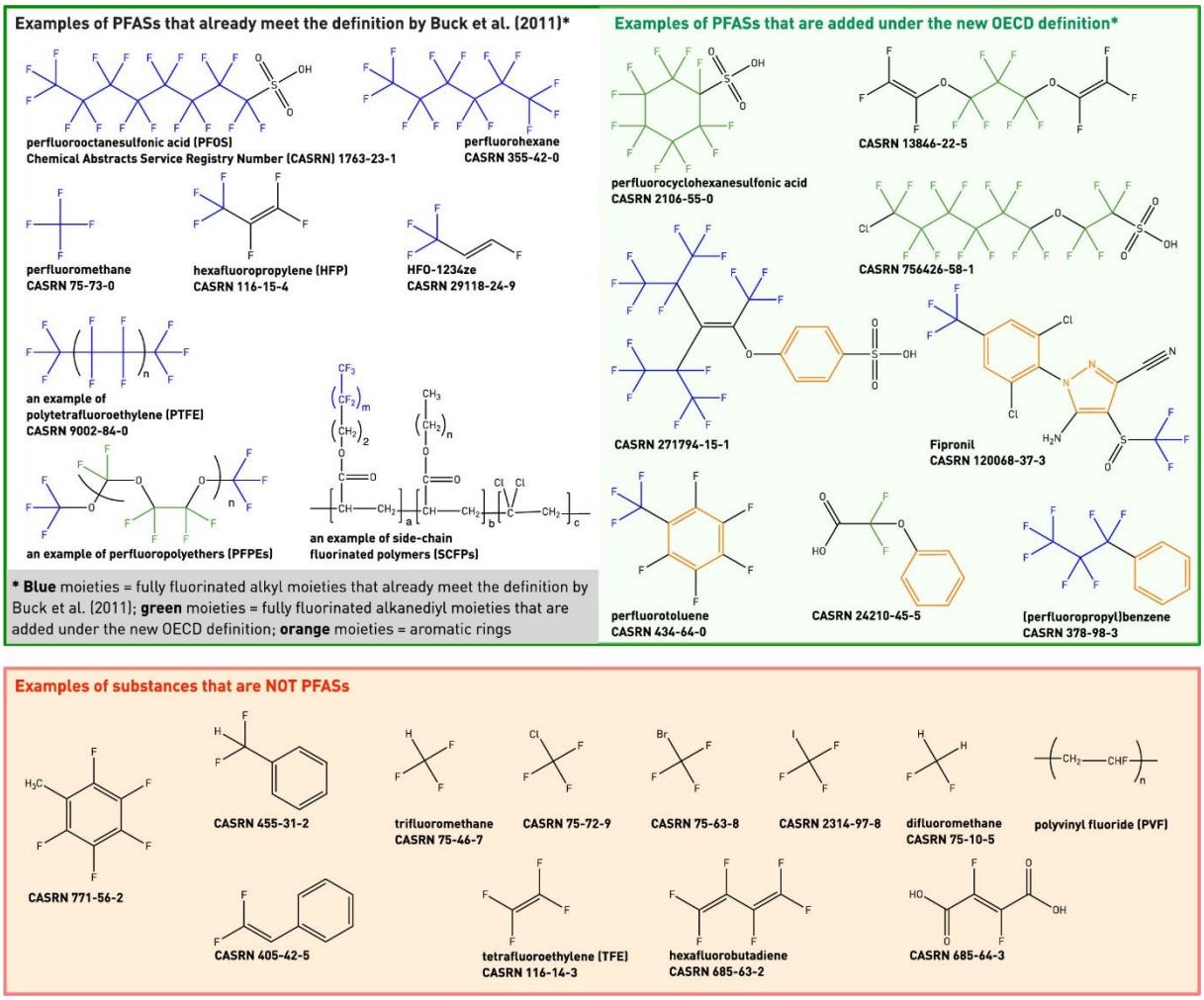


Figure 10. *Exemples de substances classées comme PFAS ou non selon la définition de l'OCDE (Wang* et al.*, 2021)*

Plus récemment, afin de simplifier et d'inclure encore plus de composés dans ce groupe, l'Agence américaine pour la protection de l'environnement (US-EPA) a introduit une nouvelle définition des PFAS qui supprime l'exigence d'une structure entièrement aliphatique, ne requérant plus que le groupe méthyle ou méthylène entièrement fluoré minimal soit saturé et aliphatique « *removes the requirement that the structure is entirely aliphatic, and only requires that the minimal fully fluorinated methyl or methylene group is saturated and aliphatic »* (Gaines, Sinclair et Williams, 2023).

Les PFAS sont généralement classés en deux grandes catégories : les substances non polymères et les substances polymères (**Figure 11**).

Parmi les non-polymères, on distingue deux sous-groupes principaux : les substances perfluoroalkylées, entièrement fluorées (comme l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) et l'acide perfluorooctanesulfonique (PFOS), qui possèdent une chaîne C8), et les substances polyfluoroalkylées, partiellement fluorées. Les perfluoroalkylées sont elles-mêmes subdivisées en diverses familles, dont les acides perfluoroalkylés (PFAAs). Cette famille de composés particulièrement résistants à la

dégradation inclut les acides carboxyliques (PFCAs) et les acides sulfoniques (PFSAs), qui possèdent des groupes fonctionnels polaires tels que le carboxylate (COO^-) et le sulfonate (SO_3^-), respectivement. Les PFAAs comprennent certaines des molécules les plus connues et parmi les plus étudiées comme le PFOA et le PFOS. Certains PFAS appartenant à la catégorie des polyfluoroalkylés, tels que les fluorotélomères alcooliques (FTOHs) ou les fluorotélomères sulfonates (FTSAs), sont qualifiés de précurseurs car ils peuvent se dégrader en composés perfluoroalkylés persistants (OECD, 2013; Panieri *et al.*, 2022; Das, Ananthanarasimhan et Rao, 2024). Par exemple, le 6:2 fluorotelomère sulfonate (6:2 FTS), largement utilisé en remplacement du PFOS, se dégrade en 6:2 fluorotelomère alcool (6:2 FTOH), puis en l'acide perfluorobutanoïque (PFBA), l'acide perfluoropentanoïque (PFPeA) et l'acide perfluorohexanoïque (PFHxA), des composés persistants et bioaccumulables (Hamid, Li et Grace, 2020; Lenka, Kah et Padhye, 2022; A. Lafond *et al.*, 2023). De même, le 8:2 FTSA peut être dégradé en 8:2 FTOH, conduisant ensuite à la formation de PFHxA et de PFOA (Evich *et al.*, 2022).

Les PFAS polymères incluent trois grandes classes : les fluoropolymères (par exemple le polytétrafluoroéthylène ou PTFE/Teflon), les polymères fluorés à chaînes latérales (comme certains acrylates fluorés), et les perfluoropolyéthers (PFPEs) (comme le KRYTOX), dont la structure comprend des atomes d'oxygène intercalés dans la chaîne carbonée. Tous ces polymères sont également très stables et largement utilisés pour leurs propriétés antiadhésives ou lubrifiantes (Buck *et al.*, 2011; OECD, 2013; Panieri *et al.*, 2022; Das, Ananthanarasimhan et Rao, 2024).

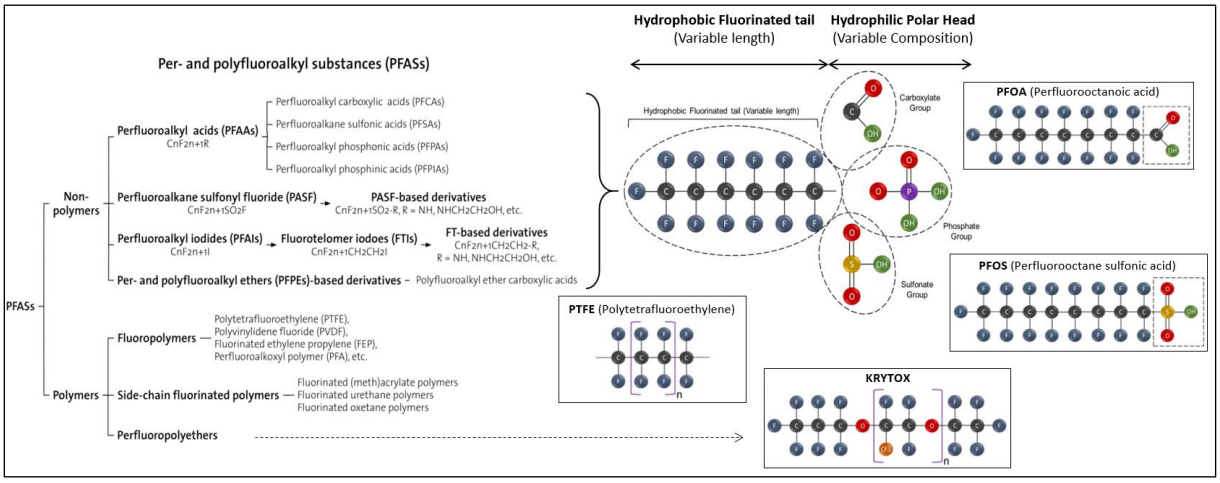


Figure 11. *Classification générale des PFAS en deux catégories : non-polymères et polymères, illustrées par quatre exemples (PFOA, PFOS, PTFE, KRYTOX), adaptée de (OECD, 2013; Panieri* et al.*, 2022)*

Les PFAS les plus connus, le PFOA et le PFOS, sont des composés à chaîne longue, contenant huit atomes de carbone (C8) ou plus, qui ont été largement utilisés avant d'être restreints en raison de leur toxicité et de leur persistance. Ils ont parfois été remplacés par des PFAS à chaîne courte, appelés *short-chain PFAS* (scPFAS), supposés moins dangereux. Cependant, des recherches récentes montrent

que ces alternatives sont tout aussi persistantes, potentiellement toxiques et facilement transportables dans l'environnement. Ces substances sont aujourd'hui détectées dans de nombreux compartiments environnementaux, notamment l'air, l'eau potable, les sols, les sédiments et la poussière domestique (Zheng, Eick et Salamova, 2023). Parmi les scPFAS, l'acide trifluoroacétique (TFA) suscite une inquiétude croissante. Il est aujourd'hui le PFAS le plus abondant dans l'environnement, détecté à des concentrations bien supérieures à celles des autres PFAS dans des milieux variés tels que l'eau de pluie, les sols, l'air, les plantes, les aliments et l'eau potable. Cette accumulation provient à la fois de rejets directs et de la dégradation de nombreux précurseurs, dont certains gaz fluorés, pesticides ou produits pharmaceutiques. En raison de sa persistance extrême et de sa mobilité, le TFA est désormais considéré comme une menace environnementale à l'échelle planétaire (Arp *et al.*, 2024).

Les PFAS sont aujourd'hui reconnus comme des contaminants omniprésents dans l'environnement et les organismes vivants (Panieri *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023; Riaz *et al.*, 2024). Après leur production industrielle à large échelle, ils sont tout d'abord retrouvés dans les produits de consommation courante, dans l'environnement *via* l'agriculture, et dans les décharges et les stations de traitement des eaux usées (Panieri *et al.*, 2022). Ces substances sont ensuite dispersées dans tous les compartiments de l'environnement *via* des processus comme la volatilisation, le dépôt atmosphérique, le ruissellement ou le lessivage, reliant les zones de production et d'utilisation à de nombreux milieux, parfois très éloignés, les glaciers alpins ou l'Arctique (De Silva *et al.*, 2021; Panieri *et al.*, 2022; Riaz *et al.*, 2024). Les PFAS pénètrent ensuite dans les chaînes trophiques par bioconcentration, bioaccumulation ou bioamplification, affectant les organismes aquatiques et terrestres à différents niveaux du réseau trophique (Chen *et al.*, 2023; Hedgespeth *et al.*, 2023). Les différentes routes depuis leur production jusqu'à l'exposition humaine, et en particulier la chaîne alimentaire, sont présentées dans la **Figure 12**.

Cependant, des recherches sont en cours pour approfondir les connaissances de certaines voies de contamination qui sont encore peu connues, et par conséquent, ne sont pas encore pleinement étudiées. Par exemple, la présence de PFAS chez les poissons est documentée, mais l'étendue de cette contamination chez les espèces d'eau douce est encore mal connue. Par ailleurs, des recherches récentes suggèrent que les aérosols marins pourraient représenter un mode de dispersion des PFAS, jusque-là méconnu (EFSA *et al.*, 2025). Finalement, leur présence a été confirmée dans l'air, l'eau douce, les eaux souterraines, les eaux marines, les sols, les poussières, les sédiments, ainsi que dans les matrices biologiques humaines telles que le sang, l'urine, les tissus ou les organes (Wang *et al.*, 2020; Panieri *et al.*, 2022). L'exposition humaine peut survenir par différentes voies : consommation d'eau potable contaminée, inhalation de poussières ou d'air ambiant, contact avec des produits de

consommation contenant des PFAS ou *via* l'ingestion d'aliments contaminés (De Silva *et al.*, 2021; Panieri *et al.*, 2022; Xing *et al.*, 2023).

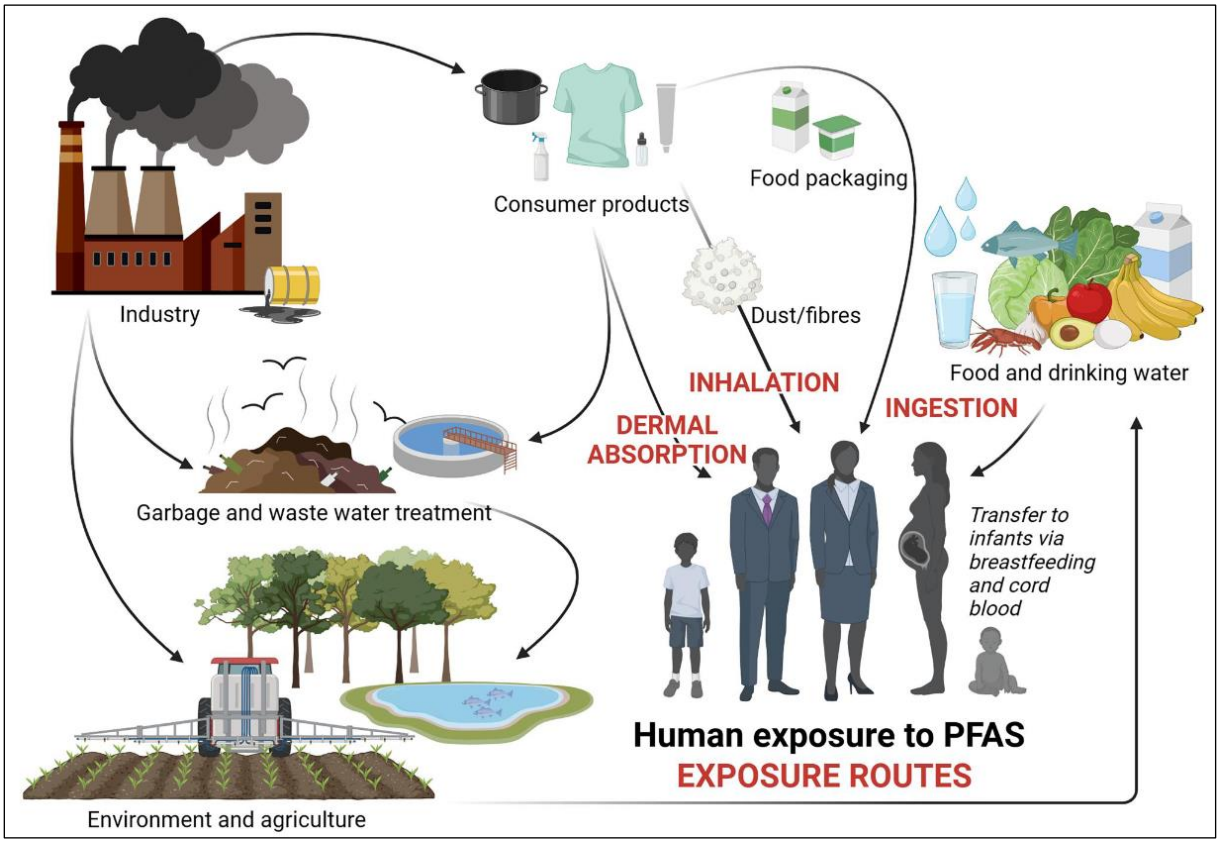


Figure 12. *Exposition humaine aux PFAS et voies d'exposition associées. Trois voies d'exposition principales ont été identifiées pour les PFAS : l'inhalation, l'ingestion et le contact cutané (Arnesdotter* et al.*, 2025)*

L'alimentation représente la principale voie d'exposition humaine aux PFAS (EFSA, 2020). La contamination des aliments par les PFAS peut s'opérer à travers la bioaccumulation dans la chaîne alimentaire, de leur présence dans les emballages alimentaires, ainsi que de l'utilisation d'ustensiles de cuisine contenant des PFAS. L'EFSA a évalué en 2020 les risques liés à la présence de PFAS dans les aliments et a identifié les poissons, les fruits et les œufs, ainsi que les produits contenant ces aliments, comme les principaux contributeurs à l'exposition des PFAS *via* l'alimentation (EFSA, 2020). Parmi ces aliments, la consommation d'aliments d'origine animale, et en particulier de poissons, est souvent identifiée comme la principale voie d'exposition à ces contaminants (Xing *et al.*, 2023).

Les PFAS suscitent une inquiétude croissante en raison de leurs effets toxiques avérés sur la santé humaine et l'environnement. De nombreuses recherches ont montré que l'exposition aux PFAS augmente significativement le risque de maladies thyroïdiennes, de lésions hépatiques, de cancers des testicules et des reins, ainsi que d'élévation des taux de cholestérol. Par ailleurs, cette exposition est également associée à une réduction de la réponse immunitaire, notamment à la vaccination, ainsi qu'à

des altérations du développement chez les nourrissons (Panieri *et al.*, 2022; European Environment Agency (EEA), 2023; Adamopoulos *et al.*, 2025). D'autres effets, pour l'instant moins avérés, ont été reportés, comme une augmentation du risque de cancer du sein, des troubles digestifs, des fausses couches, l'obésité, une puberté précoce et des anomalies de la qualité du sperme (Panieri *et al.*, 2022; Adamopoulos *et al.*, 2025). L'exposition aux PFAS perturbent divers systèmes biologiques, notamment endocrinien, immunitaire et reproducteur (Meyyazhagan *et al.*, 2023; Fujii *et al.*, 2025). La **Figure 13** présente un aperçu des effets sur la santé liés à l'exposition aux PFAS. Ces substances ont aussi des effets au niveau environnemental, notamment chez les poissons, les oiseaux et les mammifères, où elles provoquent des déséquilibres hormonaux, des troubles de la reproduction et des effets toxiques au stade développemental (Adamopoulos *et al.*, 2025). Ces constats soulignent la nécessité de poursuivre les recherches sur leurs mécanismes d'action et leurs voies d'exposition, afin d'améliorer la gestion des risques pour la santé humaine et la préservation de l'environnement.

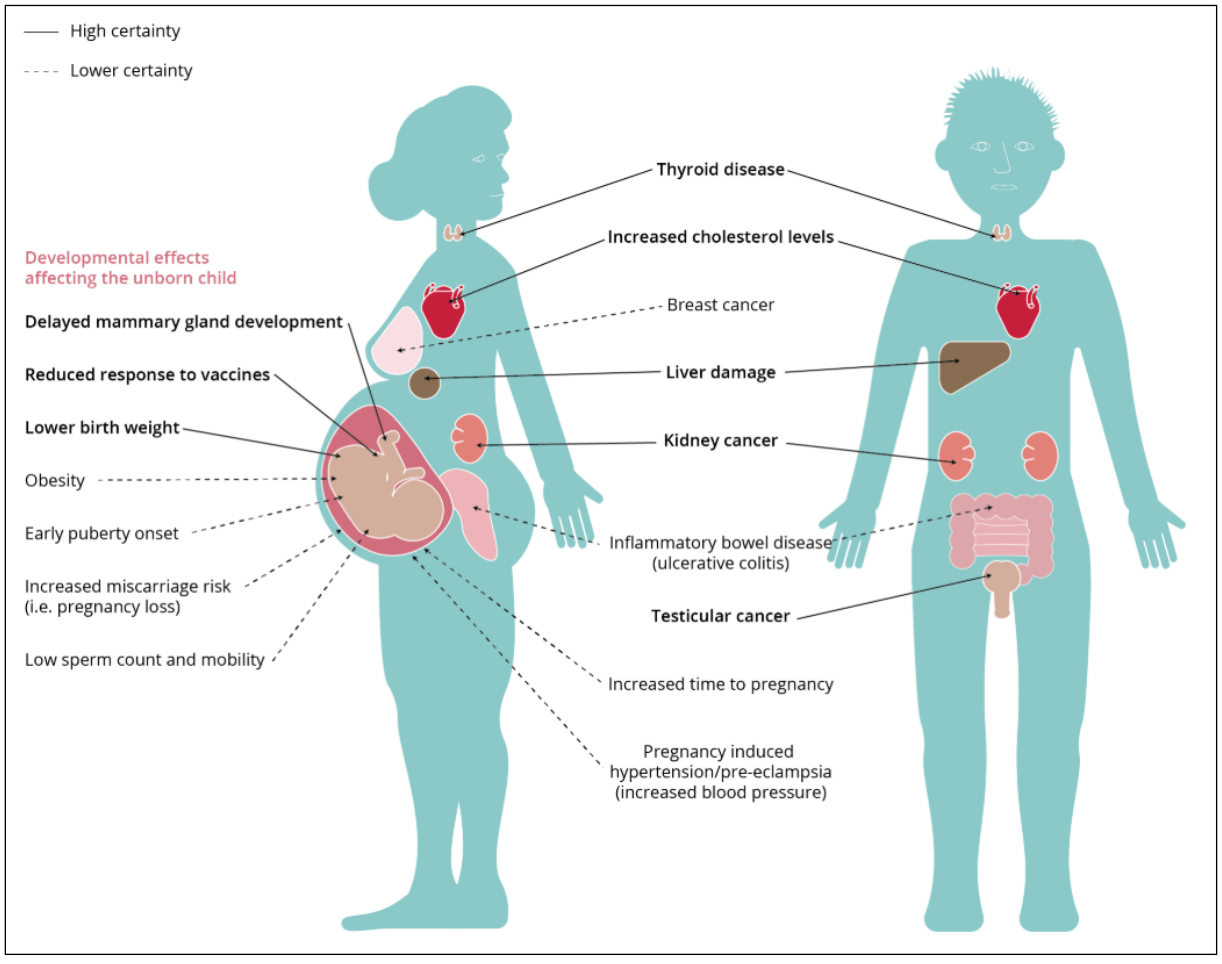


Figure 13. *Effets des PFAS sur la santé humaine (European Environment Agency (EEA), 2023)*

Récemment, l'IARC (International Agency for Research on Cancer - Centre international de recherche sur le cancer) et l'Agence du cancer de l'OMS ont mis en évidence pour les humains la cancérogénicité du PFOA, et la possible cancérogénicité du PFOS (Zahm *et al.*, 2024). Comme présenté précédemment,

les PFAS dits « émergents » sont de plus en plus utilisés en remplacement des composés traditionnels tels que le PFOS ou le PFOA, comme par exemple la classe des acides sulfoniques d'éther polyfluoroalkyliques chlorés (Cl-PFESAs), connue sous le nom commercial de F-53B, qui comporte le 6:2 Cl-PFESA et le 8:2 Cl-PFESA (Chen *et al.*, 2018). Toutefois, des études toxicologiques récentes indiquent que certains de ces substituts, comme le chloré polyfluoroalkyl éther sulfonate (Cl-PFESA), présentent une toxicité comparable, voire supérieure, à celle des PFAS historiques (Liu *et al.*, 2023).

Pour protéger les consommateurs européens, en 2018, l'EFSA, agence évaluatrice des risques en Europe, a réévalué les données sur la toxicité du PFOA et du PFOS (EFSA, 2018c). En 2020, les limites sécuritaires, connues sous le nom de « dose hebdomadaire tolérable » (DHT) (*Tolerable Weekly Intake* (TWI)), ont été ré-évaluées et sont devenues plus strictes, avec une nouvelle dose tolérable hebdomadaire totale de 4,4 ng/kg de poids corporel (*body weight* (bw))/semaine pour la somme du PFOA, du PFOS, de l'acide perfluorononanoïque (PFNA) et du perfluorohexane sulfonate (PFHxS) en raison des effets sur le système immunitaire (EFSA, 2020). À cette époque, une grande partie de la population européenne devait alors dépasser le DHT en raison de l'absorption de PFAS provenant des aliments et de l'eau potable (European Environment Agency (EEA), 2023). En effet, ces limites étaient précédemment fixées à 1,5 µg/kg/jour et 0,15 µg/kg/jour pour le PFOA et le PFOS, respectivement.

Par exemple, lors de la seconde étude d'alimentation totale (EAT2) en France, 16 PFAS avaient été quantifiés dans différentes matrices alimentaires. Le taux d'exposition moyen au PFOA était de 0,74 ng/kg bw/jour pour un adulte, valeur bien inférieure à la limite à cette époque de 1500 ng/kg/bw/jour. Cependant, en comparant ces données aux nouvelles limites établies, l'exposition moyenne d'un adulte est de 4,62 ng/kg/bw/semaine seulement pour le PFOA, ce qui est déjà au-dessus de la valeur recommandée en 2020 (c'est-à-dire, 4,4 ng/kg bw/semaine pour la somme des 4 PFAS) (Rivière *et al.*, 2014).

L'ingestion — à travers les aliments et l'eau potable — étant la principale voie d'exposition de la population aux PFAS, par la suite, la directive (UE) 2020/2184 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2020 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine, qui est entrée en vigueur le 12 janvier 2021, a introduit des paramètres et des valeurs paramétriques pour les PFAS (European Parliament, 2020). Ces valeurs sont de 0,50 µg/l (500 ng/l) pour le paramètre « Total PFAS » et de 0,10 µg/l (100 ng/l) pour le paramètre « Somme PFAS », qui couvre une liste de 20 PFAS. Les États membres sont tenus de respecter ces paramètres au plus tard le 12 janvier 2026. De même, la Commission européenne, *via* la DG SANTE en tant que gestionnaire du risque, a modifié le réglement (CE) n°1881/2006 concernant les limites maximales (LM) pour ces contaminants alimentaires et, a fixé des nouvelles teneurs maximales, à la fois pour chacun de ces quatre PFAS (PFOA, PFNA, PFHxS, PFOS)

pris individuellement et pour leur concentration totale, dans certaines denrées alimentaires (European Commission, 2022c, 2023b). La LM individuelle la plus basse est de 0,2 µg/kg de poids à l'état frais (pf) tandis que la plus élevée est de 50 µg/kg (pf) dans les abats de gibier. Les LM pour la somme des 4 PFAS sont fixées entre 1,3 et 50 µg/kg pour les viandes (bovine, porc, volaille) et pour les abats de gibier, respectivement. Les œufs et certains poissons sont également soumis à ces LM, par exemple jusqu'à 1,7 et 45 µg/kg, respectivement, pour la somme des 4 PFAS.

De plus, en janvier 2023, les autorités nationales de l'Allemagne, du Danemark, des Pays-Bas, de la Norvège et de la Suède ont soumis à l'Agence européenne des produits chimiques (*European Chemicals Agency* - ECHA) une proposition visant à restreindre l'utilisation des PFAS dans le cadre du réglement REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals). Cette proposition soutient les ambitions européennes sur les produits chimiques et le plan d'action zéro pollution dans le cadre du European Green Deal (European Commission, 2021a). En France, cette dynamique a été concrétisée par l'adoption, en première lecture à l'Assemblée nationale le 4 avril 2024, d'une proposition de loi interdisant, à partir du 1er janvier 2026, la fabrication, l'importation et la vente de produits contenant des PFAS dans trois catégories de biens de consommation — produits cosmétiques, farts pour skis et textiles d'habillement. Les ustensiles de cuisine, initialement inclus, ont été finalement exclus, après notamment une forte mobilisation de la direction et des syndicats du groupe SEB (Le Monde, 2024a).

Les PFAS sont des composés chimiques particulièrement préoccupants pour l'environnement et la santé humaine. En effet, ils présentent pour certains des propriétés attribuées aux POPs. Les POPs sont caractérisés par quatre propriétés majeures : (i) une persistance élevée dans l'environnement due à leur résistance aux processus de dégradation biologiques, chimiques et photochimiques ; (ii) une bioaccumulation dans les tissus adipeux des organismes en raison de leur forte lipophilicité ; (iii) une toxicité importante même à faibles concentrations, pouvant entraîner des effets cancérogènes, des troubles endocriniens, des maladies métaboliques (obésité, diabète, athérosclérose), ainsi que des impacts neurologiques et reproductifs ; et (iv) un transport sur de longues distances, expliquant leur détection dans des régions éloignées telles que l'Arctique ou l'Antarctique, où ils n'ont pourtant jamais été utilisés ou produits (Acosta-Tlapalamatl *et al.*, 2022; Olasupo, Corbin et Shiflett, 2024).

La Convention de Stockholm sur les POPs a pour objectif de protéger la santé humaine et l'environnement en interdisant ou en limitant strictement la production et l'utilisation de plusieurs produits (OECD, 2013). C'est un accord international qui a été signé le 22 mai 2001 dans la ville éponyme. En 2001, la première version de cette convention, portait sur douze substances dites les « douze vilains », réparties en trois catégories : l'annexe A (production et usage à éliminer), l'annexe

B (production et usage à restreindre) et l'annexe C (production non intentionnelle, à restreindre et si possible à éliminer). Ces substances constituent une première liste de polluants, considérés parmi les contaminants les plus répandus et les plus nocifs pour l'environnement. Il s'agissait principalement de pesticides et d'insecticides organochlorés, auxquels s'ajoutaient certains composés industriels tels que les PCB et l'hexachlorobenzène.

Au fil des années, la Convention de Stockholm a été enrichie par plusieurs amendements, reflétant l'accumulation de nouvelles connaissances sur la toxicité et la persistance des substances chimiques. Ainsi, par exemple, en 2009, de nouvelles substances ont été ajoutées, dont la chlordécone, pesticide largement utilisé aux Antilles, puis en 2011 l'endosulfan a été inscrit à l'annexe A, suivi de l'hexabromocyclododécane en 2013, et d'autres substances en 2015 et en 2019. Aujourd'hui, certains pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), PFAS, retardateurs de flamme bromés, et divers composés chlorés aromatiques sont définis comme des POPs (Popli *et al.*, 2022; Olasupo, Corbin et Shiflett, 2024).

Les principales sources de POPs sont anthropiques, incluant les activités industrielles (textile, pâte à papier, pétrochimie, métallurgie, impression, cimenterie, etc.), l'agriculture (usage de pesticides) ou encore les décharges de déchets solides. Des sources naturelles comme les éruptions volcaniques et les incendies de forêts sont aussi mentionnées (Olasupo, Corbin et Shiflett, 2024). Ces composés contaminent divers milieux : air, eaux douces et marines, sols, sédiments ainsi que les organismes vivants, où ils persistent et circulent dans les réseaux trophiques par biomagnification (Acosta-Tlapalamatl *et al.*, 2022; Olasupo, Corbin et Shiflett, 2024). L'environnement aquatique constitue un réservoir important de POPs, notamment en raison de dépôts atmosphériques, de ruissellements agricoles, de rejets d'eaux usées, traitées ou non. Une fois présents, ces composés se fixent aux sédiments, aux coraux et à la biologie marine, exposant durablement les écosystèmes et les espèces aquatiques à des risques toxiques (Acosta-Tlapalamatl *et al.*, 2022; Olasupo, Corbin et Shiflett, 2024). Enfin, la voie alimentaire représente la principale source d'exposition humaine. Environ 90 % de l'exposition humaine totale aux POPs provient de la consommation d'aliments riches en lipides tels que le poisson, la viande et les œufs, dans lesquels ces composés s'accumulent préférentiellement (Polder *et al.*, 2016). Cette exposition chronique *via* le régime alimentaire pose de sérieuses préoccupations sanitaires et environnementales, et souligne la nécessité d'une surveillance rigoureuse des POPs, notamment dans les produits alimentaires.

Concernant les PFAS, le PFOS a été le premier PFAS à être intégré à la Convention, figurant à l'Annexe B (restriction) en 2009. Cette inscription impose des restrictions générales à sa production, son utilisation, son importation et son exportation. Le PFOA et ses composés apparentés ont été ajoutés à

l'Annexe A (élimination) de la Convention en 2019, impliquant leur élimination totale. En 2022, le PFHxS a été inscrit dans la même annexe (Bhagat, Singh et Shimada, 2024; Stockholm Convention, 2024; Fujii *et al.*, 2025). Plus récemment, en 2025, le conseil de l'Union européenne a soutenu l'inscription des acides perfluorocarboxyliques à chaîne longue dans l'Annexe A (Council Decision (EU), 2025). Cependant, tous les PFAS ne sont pas inscrits dans la Convention de Stockholm. De nombreux composés émergents échappent encore à la régulation internationale, malgré des préoccupations croissantes concernant leur toxicité potentielle (Bhagat, Singh et Shimada, 2024).

Malgré les restrictions en vigueur dans l'UE, de nombreux PFAS continuent d'être produits ailleurs dans le monde, sont importés en Europe, et même transportés par voie atmosphérique. Cette circulation mondiale contribue à une exposition continue des populations et à une contamination environnementale persistante (Glüge *et al.*, 2020; Joerss et Menger, 2023).

Par ailleurs, face à la persistance des PFAS dans l'environnement et aux effets nocifs associés, la conception de matériaux durables et respectueux de l'environnement, capables de résister à l'eau et aux graisses, apparaît aujourd'hui comme une nécessité incontournable. Pour répondre à cet enjeu, de nombreuses publications scientifiques récentes document le développement de matériaux alternatifs « PFAS-free », en particulier dans les matériaux d'emballage alimentaire (Tajvidi, 2023; Zhou *et al.*, 2024; Figuière *et al.*, 2025; Taliantzis et Ellinas, 2025) dû à leur potentiel de migration vers les aliments (Eze *et al.*, 2024). Dans un objectif similaire, le nombre de publications scientifiques visant à éliminer ou dégrader ces substances augmente. Le traitement thermique ou l'oxydation/réduction chimique font partie des principaux modes de dégradation des PFAS recensés (Das, Ananthanarasimhan et Rao, 2024).

3.2. Les pesticides

Les pesticides sont largement utilisés en agriculture par les systèmes modernes de production alimentaire pour protéger les cultures et préserver la production alimentaire mondiale. Ils sont également utilisés dans des contextes non agricoles, par exemple, dans les forêts, le long des routes et des chemins de fer, et dans les zones urbaines — parfois très fréquentées, et par des enfants — telles que les parcs publics, les terrains de jeux ou les jardins (EEA, 2023). À la suite de cet usage intensif et croissant, ils sont aujourd'hui omniprésents dans l'environnement : on les retrouve dans les sols, les eaux superficielles et souterraines, l'air ambiant et même dans les précipitations (Silva *et al.*, 2019; EEA, 2023). Leur dispersion généralisée ne résulte pas uniquement des pratiques agricoles, mais aussi de leur forte persistance, volatilité et mobilité, qui favorisent leur transport sur de longues distances et leur accumulation dans divers milieux (EEA, 2023). Une étude récente a d'ailleurs mis en évidence que les populations vivant à proximité de zones agricoles sont plus fortement exposées aux pesticides

présents dans l'air, en particulier lors des périodes de pulvérisation (EEA, 2023). L'exposition humaine peut également survenir par d'autres voies. Les pesticides atteignent les cours d'eau par différentes voies comme le ruissellement ou le drainage agricole, contaminant ainsi les eaux de surface, les nappes phréatiques, et par conséquent les ressources en eau potable (Silva *et al.*, 2019). De plus, l'exposition professionnelle concerne les agriculteurs, les forestiers ou encore les agents d'entretien urbain, qui manipulent ou appliquent ces produits. Ils peuvent également exposer involontairement leur entourage, en rapportant des résidus sur leurs vêtements (EEA, 2023).

Pour la population générale, hormis les professionnels de l'agriculture, la contamination des denrées alimentaires constitue la principale voie d'exposition à ces résidus. Ils peuvent être présents sur les fruits, légumes, produits céréaliers, ainsi que dans des aliments d'origine animale contaminés *via* la chaîne alimentaire (Meyyazhagan *et al.*, 2023). La **Figure 14** présente les différentes voies d'exposition humaine aux pesticides. Des études récentes de biomonitoring révèlent que 83 % des sols agricoles en Europe contiennent des résidus de pesticides, et que 22 % des sites de surveillance en rivière dépassent les seuils de substances préoccupantes (EEA, 2023).

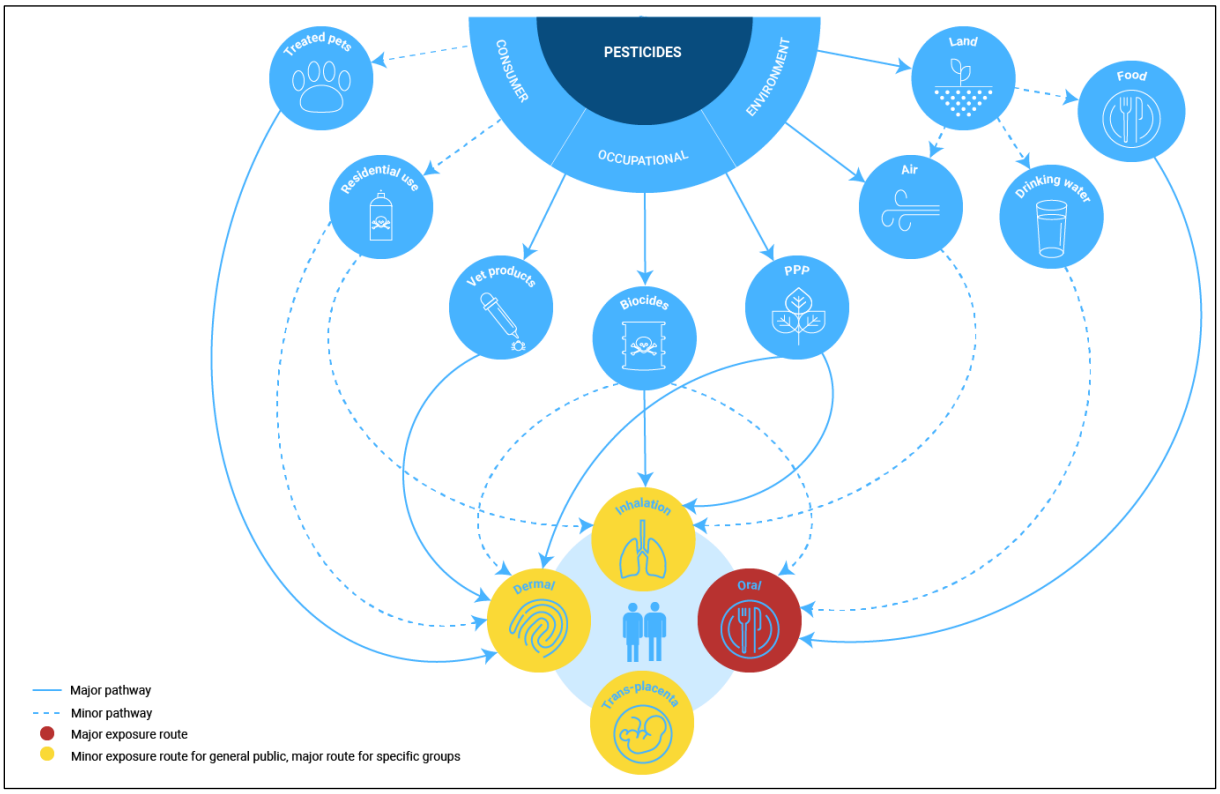


Figure 14. *Les différentes voies d'exposition de la population générale aux pesticides (EEA, 2023)*

L'usage intensif des pesticides pose des risques majeurs pour l'environnement et la santé humaine**.** Sur le plan environnemental, les effets écotoxiques sont bien établis : la toxicité aiguë se manifeste par la mortalité d'espèces sensibles, tandis que les effets chroniques entraînent une altération des

fonctions biologiques chez les organismes non ciblés (Aktar, Sengupta et Chowdhury, 2009). Ils sont notamment responsables de la diminution des populations d'insectes pollinisateurs, d'amphibiens et d'oiseaux, entraînant une diminution significative de la biodiversité (EEA, 2023). De plus, l'apparition de résistances chez les organismes ciblés, comme certains insectes, pousse à l'utilisation de doses plus importantes, ce qui contribue au cercle vicieux d'une utilisation accrue des pesticides (Aktar, Sengupta et Chowdhury, 2009; EEA, 2023). Concernant la santé humaine, les risques sont également nombreux. Les expositions professionnelles aux pesticides sont à l'origine de cas d'intoxication aiguë, avec des effets tels que des troubles respiratoires, cutanés ou neurologiques (Mostafalou et Abdollahi, 2017). À plus long terme, de nombreuses études établissent un lien probable ou avéré entre l'exposition chronique aux pesticides et des pathologies graves, notamment des cancers hormonodépendants (sein, prostate, ovaire), des troubles neurodégénératifs (Parkinson, Alzheimer), des anomalies du développement chez l'enfant, des troubles cognitifs, des altérations de la fertilité et des affections respiratoires chroniques (Mostafalou et Abdollahi, 2017; EEA, 2023). Bien qu'il ne soit pas encore possible de quantifier précisément la charge sanitaire liée aux pesticides en Europe, le poids de la preuve scientifique suggère une menace sanitaire sérieuse, en particulier pour les populations agricoles, les enfants, et les personnes vivant à proximité des zones traitées (EEA, 2023).

Les pesticides peuvent être classés selon leur famille chimique, leur mode d'action et leurs propriétés physico-chimiques. La **Figure 15** illustre la classification de ces composés selon leur mode d'action, c'est-à-dire le type de nuisible ciblé, puis leur famille chimique. Les principales catégories de pesticides, notamment les insecticides, se distinguent donc également par leur fonction active, incluant les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoïdes et les néonicotinoïdes (tels que l'imidaclopride et l'acétamipride) (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). Ces familles présentent des caractéristiques très différentes. Par exemple, les organochlorés comme le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) sont fortement lipophiles, persistants dans l'environnement et bioaccumulables dans les tissus biologiques, ce qui les rend particulièrement préoccupants pour la santé humaine et la faune (ATSDR, 2022). À l'inverse, les organophosphorés sont plus hydrosolubles, généralement moins persistants, mais souvent plus toxiques à court terme, notamment pour le système nerveux (Eaton, 2008). Les pyréthrinoïdes, quant à eux, sont dérivés de composés naturels et présentent une faible persistance environnementale, mais peuvent néanmoins être neurotoxiques, en particulier pour les jeunes enfants (Shafer, Meyer et Crofton, 2005). La diversité de ces familles chimiques implique des profils de risques très variables, tant pour l'environnement que pour la santé humaine.

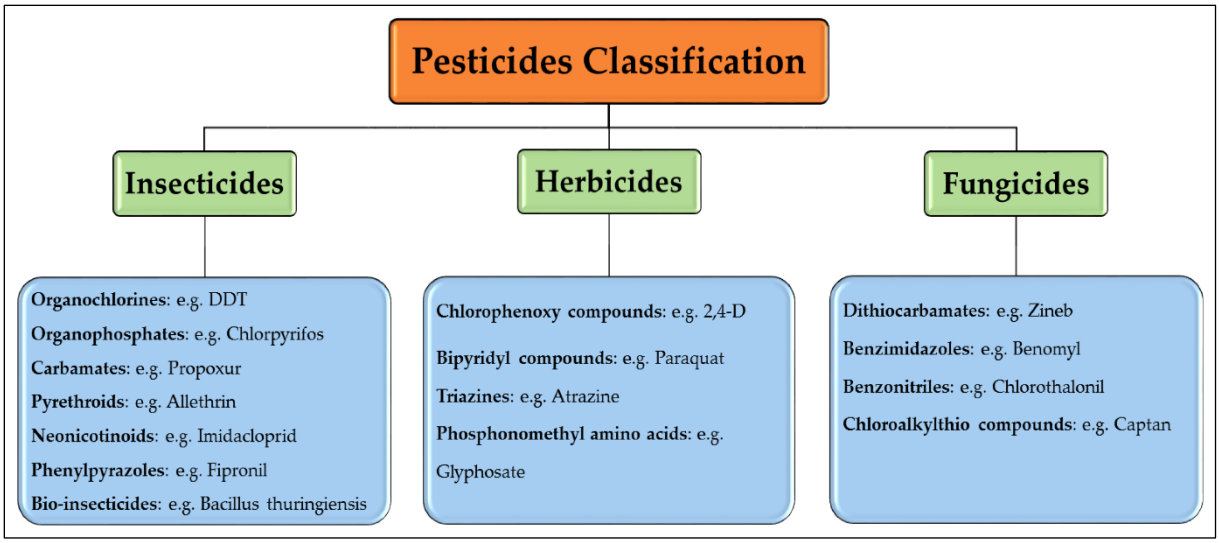


Figure 15. *Classification des pesticides par type de nuisible ciblé et de leur famille chimique (Alengebawy* et al.*, 2021)*

Dans notre système alimentaire mondial interconnecté, l'exportation de pesticides interdits dans l'Union européenne (UE) vers des pays en dehors de l'UE soulève de sérieuses préoccupations. En effet, cette exportation favorise la réintroduction de résidus de ces substances dans l'UE *via* les importations de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux, contribuant ainsi à la contamination mondiale et à l'exposition humaine indirecte (EEA, 2023). Par exemple, le fipronil, un insecticide toxique pour les abeilles interdit en France depuis 2004, continue d'être exporté par la France vers plusieurs pays tiers (Le Monde, 2024b), tandis que le 1,3-dichloropropène (1,3-D), un fumigant du sol classé cancérogène probable et interdit dans l'UE depuis 2007, est massivement exporté par l'Espagne (PAN Europe, 2025). De plus, bien que certains pesticides organiques persistants soient aujourd'hui interdits, leurs résidus demeurent présents dans l'environnement. Le DDT, utilisé massivement dans les années 1950, illustre ce phénomène, et dans certains pays, leur fabrication ou utilisation illégale persiste (Naidu *et al.*, 2021).

Concernant les pesticides, dans le processus d'analyse du risque alimentaire, l'évaluation du risque pour la santé de l'être humain a conduit à la fixation de VTR, qui sont les doses journalières admissibles (DJA) et valeurs de référence aiguës (ARfD, *Acute Reference Dose*), par le comité pour les résidus de pesticides à l'échelle internationale (*Joint FAO/WHO Meeting on pesticide residues* (JMPR)). La DJA, aussi connue sous le nom de *ADI* (Acceptable Daily Intake), est la quantité de substance qu'un humain peut ingérer chaque jour toute sa vie sans risque appréciable. L'ARfD est la quantité maximale qu'un humain peut ingérer en une seule journée ou un seul repas sans risque appréciable, lorsque la substance a des effets aigus. Ces VTR proviennent d'une base de données de l'Observatoire des Résidus de Pesticides (ORP) et combinent des pesticides avec des informations détaillées sur la DJA ou sur l'ARfD. Cette base de données est mise à jour à partir des dernières conclusions de l'EFSA, de la

base *EU Pesticides database*, ainsi que des monographies du JMPR et d'autres sources bibliographiques internationales (ANSES, 2014). En 2023, selon l'EFSA, moins de 1 % des échantillons alimentaires analysés en Europe présentaient un risque d'exposition chronique dépassant les DJA, et environ 2 % dépassaient les ARfD pour une exposition aiguë (EFSA, 2023).

Pour respecter ces VTR et protéger la population, des limites maximales de résidus (LMR) ont été fixées, par les gestionnaires du risque, dans les aliments (European Parliament, 2005). Les LMR sont fixées pour chaque substance active dans des denrées spécifiques lorsque des données sont disponibles ; à défaut, une valeur par défaut de 0,01 mg/kg est appliquée. Ces seuils permettent de détecter les contaminations alimentaires dépassant les niveaux jugés sûrs, en tenant compte des effets combinés et de l'exposition chronique.

Cependant, tous les résidus de pesticides n'ont pas de VTR. Par exemple, le tétrabromobisphénol A (TBBPA) est reconnu par le CIRC comme un cancérogène avéré pour l'homme, bien qu'aucune restriction globale n'ait encore été mise en place pour encadrer son utilisation (Meyyazhagan *et al.*, 2023). Cet exemple illustre la nécessité de continuer les recherches autour i) d'une meilleure compréhension de l'exposome chimique alimentaire et ii) des effets de ces substances sur la population et l'environnement afin de les protéger.

3.3. Les produits pharmaceutiques et vétérinaires

Le médicament est défini par le code de la Santé publique (article L.5111-1) comme *Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique*.

Les médicaments peuvent être classés selon leur forme galénique, leur mode d'administration, leurs usages ou leurs effets. L'un des systèmes les plus utilisés est la classification ATC (Anatomical Therapeutic Chemical) développée par l'OMS. Ce système à cinq niveaux classe les médicaments selon l'organe ou le système cible, leur effet thérapeutique et pharmacologique, ainsi que leur structure chimique. Chaque médicament reçoit un code ATC, indiqué dans sa fiche technique (résumé des caractéristiques du produit). La **Figure 16** présente les cinq niveaux de la classification ATC à travers l'exemple du paracétamol.

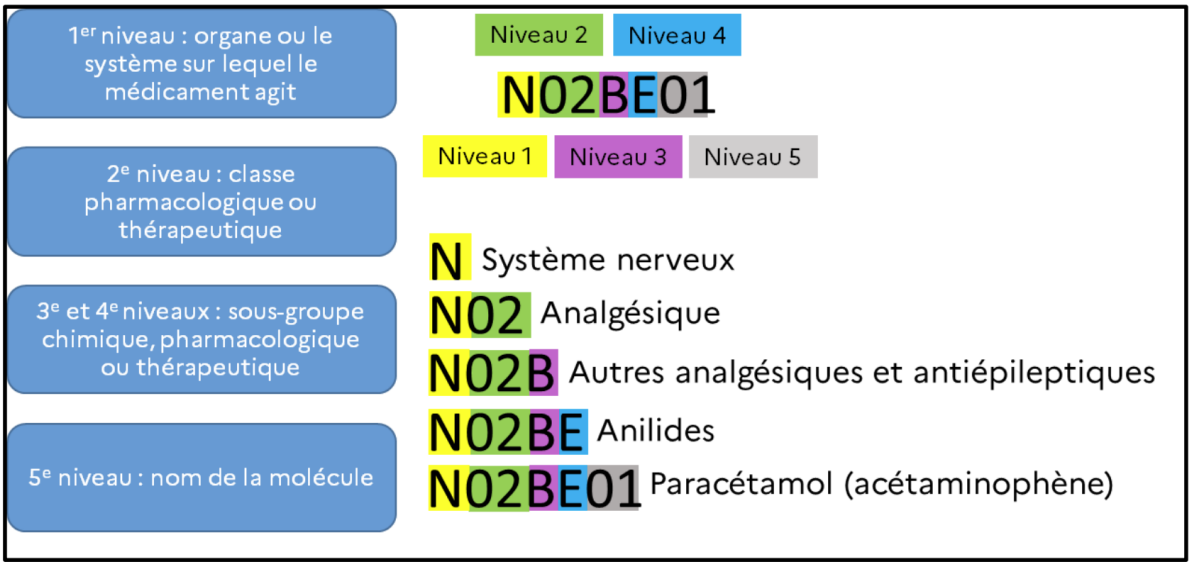


Figure 16. *Les cinq niveaux de la classification ATC de l'OMS, illustrés par l'exemple du paracétamol*

Les médicaments vétérinaires sont utilisés pour prévenir et traiter les maladies animales, contribuant au maintien de la santé des animaux dans les systèmes de production. Ils contribuent significativement à la santé animale, à la sécurité sanitaire des denrées alimentaires d'origine animale (DAOA) et à la rentabilité des filières d'élevage et d'aquaculture (OECD, 2019; Wang, Xie et Lee, 2021). Cependant, leur utilisation généralisée, et parfois excessive et illégale, soulève de nombreuses préoccupations environnementales et sanitaires. En effet, les résidus de médicaments vétérinaires – incluant des antibiotiques (pénicillines, tétracyclines, fluoroquinolones), antiparasitaires, anti-inflammatoires ou hormones – sont fréquemment détectés dans l'environnement, en particulier dans les écosystèmes aquatiques (Wang, Xie et Lee, 2021; Khalifa *et al.*, 2024). Ces composés, aux propriétés physico-chimiques variées (polarité, hydrosolubilité, lipophilie, persistance), présentent une biodégradabilité souvent faible, favorisant leur accumulation et leur dissémination dans les différents compartiments environnementaux (Wang, Xie et Lee, 2021).

Les voies de transfert des résidus de médicaments vétérinaires sont bien documentées. Ces substances sont administrées aux animaux principalement par l'alimentation, par voie orale ou par injection. Une partie est ensuite métabolisée, tandis que des résidus peuvent persister dans l'organisme. Certains restent dans le corps de l'animal, tandis que d'autres sont excrétés sous forme inchangée ou métabolisée. Les excrétas sont ensuite utilisés comme engrais agricoles ou rejetés directement dans l'environnement (Wang, Xie et Lee, 2021). Une fois dans l'environnement, les médicaments se diffusent jusqu'à atteindre les milieux aquatiques. En effet, ces résidus atteignent ensuite les sols, les nappes phréatiques et les eaux de surface par lixiviation, ruissellement ou infiltration. En raison de leur nature bioactive et de leur persistance, les produits pharmaceutiques s'accumulent dans les

organismes aquatiques. Les plantes, incluant les cultures maraîchères et fruitières, peuvent les absorber, entraînant une contamination de la chaîne alimentaire (OECD, 2019; Wang, Xie et Lee, 2021). La population est exposée à ces résidus persistants à travers la consommation d'aliments d'origine animale tels que la viande, le lait, les œufs mais également les produits de la mer, les fruits et les légumes, et l'eau potable (Khan *et al.*, 2023; Khalifa *et al.*, 2024).

D'autre part, tout comme les médicaments vétérinaires, les médicaments à usage humain finissent également dans l'environnement, exposant indirectement la population. En effet, les produits pharmaceutiques consommés par les ménages ou dans les établissements de santé sont souvent partiellement métabolisés puis excrétés. Une partie de ces substances atteint les stations d'épuration, qui ne sont pas toujours conçues pour éliminer efficacement les résidus pharmaceutiques. Ainsi, des concentrations résiduelles peuvent subsister dans les eaux usées traitées, qui sont ensuite rejetées dans les rivières, les lacs ou les océans. Par ailleurs, l'élimination inappropriée de médicaments dans les ordures ménagères peut entraîner leur infiltration dans les eaux souterraines ou les cours d'eau (O'Flynn *et al.*, 2021; Almazrouei *et al.*, 2023; Okuthe, Dube et Mafunda, 2025). Ces différentes voies renforcent la contamination de l'environnement par les médicaments et contribuent à l'exposition chronique des écosystèmes. Par conséquent, ces médicaments — vétérinaires ou humains — entrent dans le corps et peuvent mettre en danger la santé des populations humaines. La **Figure 17** illustre les voies de propagation des produits pharmaceutiques dans l'environnement.

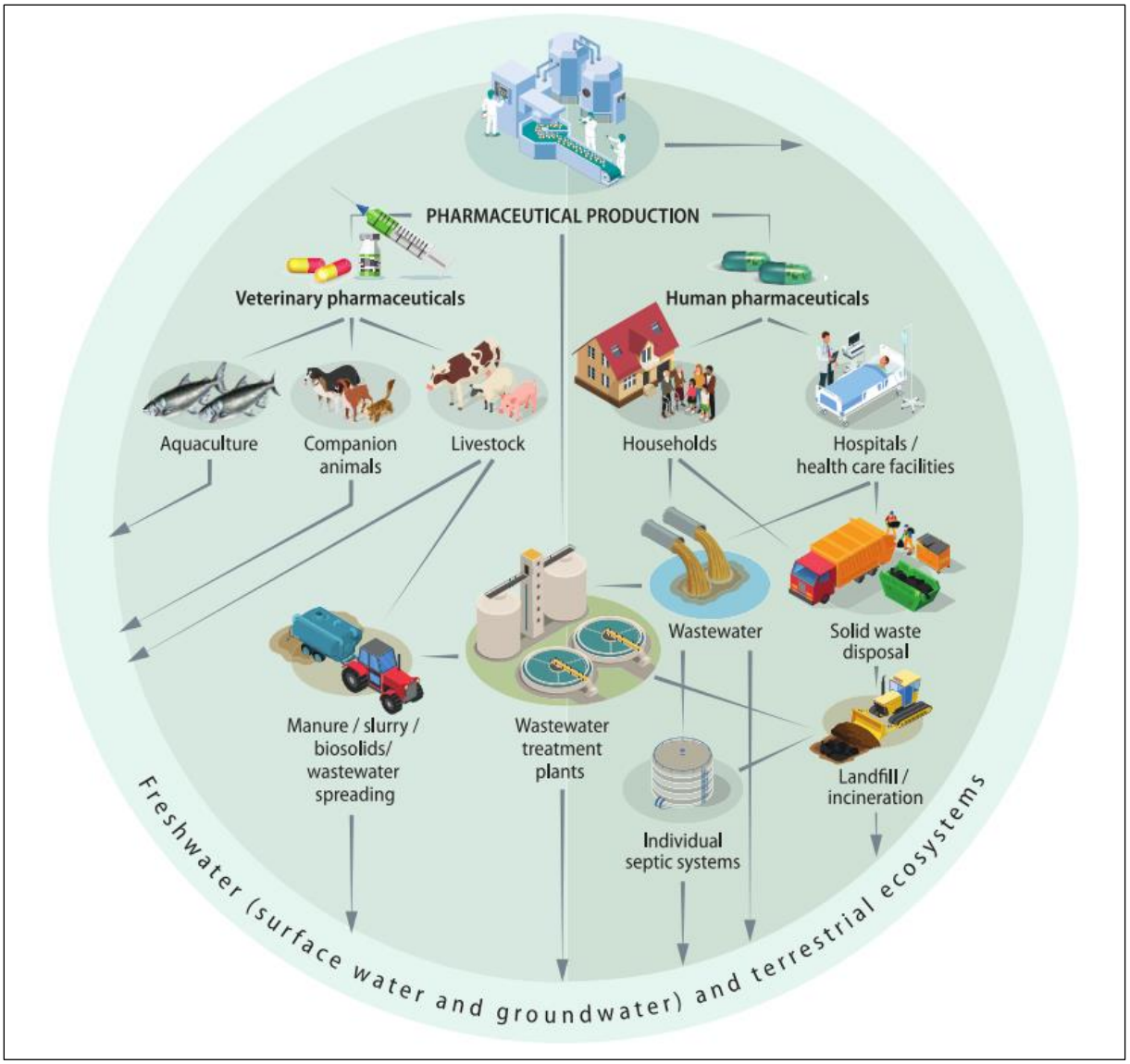


Figure 17. *Principales voies de transports des produits pharmaceutiques humains et vétérinaires dans l'environnement (OECD, 2019)*

L'OCDE (OECD, 2019) confirme cette situation à l'échelle mondiale : des résidus de médicaments (hormones, antidépresseurs, antibiotiques) ont été détectés dans les eaux de surface et souterraines, y compris en aval d'usines pharmaceutiques et de stations d'épuration, qui ne sont pas conçues pour éliminer efficacement ces substances. Leurs effets écotoxicologiques sont de plus en plus documentés : féminisation des poissons due aux œstrogènes, altérations comportementales liées aux psychotropes, perturbations endocriniennes diverses (OECD, 2019). Les médicaments vétérinaires appartiennent à la vaste catégorie des produits pharmaceutiques, qui inclut également les antibiotiques, les médicaments à usage humain et les produits de soins personnels, aujourd'hui de plus en plus reconnus pour leurs effets endocriniens involontaires (Okuthe, Dube et Mafunda, 2025). L'antibiorésistance, en particulier, constitue une menace majeure pour la santé humaine et animale,

liée à la présence chronique de faibles concentrations d'antibiotiques dans l'environnement. D'autres risques pour la santé humaine sont documentés comme les allergies (Khalifa *et al.*, 2024).

Cependant, l'intensification de la production animale, la hausse de la consommation mondiale de médicaments et le vieillissement des populations contribuent à l'augmentation des rejets de résidus pharmaceutiques et de leurs métabolites dans l'environnement au fil du temps. Dans ce contexte, les enjeux liés à la qualité de l'eau (changement climatique, utilisation des eaux usées) et à la sécurité sanitaire nécessitent une surveillance et une meilleure compréhension de la présence de résidus médicamenteux (OECD, 2019; Wang, Xie et Lee, 2021).

Pour protéger la santé et la sécurité des consommateurs, l'UE, les États-Unis, la Chine et d'autres pays ont établi des LMR pour les médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale (Wang, Xie et Lee, 2021).

En Europe, avant qu'un médicament vétérinaire ne soit autorisé sur le marché, le CVMP (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use) de l'EMA (European Medecines Agency) évalue la sécurité pour le consommateur : processus d'évaluation du risque. Dans un premier temps, la toxicologie est évaluée pour établir la dose sans effet nocif observé (NOAEL) ce qui permet de calculer les VTR : DJA et ARfD. Ensuite, en tenant compte de l'évaluation de l'exposition alimentaire humaine, le CVMP propose une LMR pour différentes matrices alimentaires afin de ne pas dépasser la DJA/ARfD (European Medicines Agency (EMA), 2009). La Commission européenne (DG SANTE) examine alors l'avis scientifique du CVMP afin d'établir la LMR à adopter obligatoirement dans toute l'UE (European Commission, 2010).

Au niveau international, le même processus est réalisé : c'est le JECFA (FAO/OMS) (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) qui établit les ADI et ARfD puis recommande des LMR au comité du Codex sur les résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments (CCRVDF). C'est ensuite la Commission dédiée de ce comité qui définit les LMR à respecter (Codex Alimentarius Commission, 2021).

Cependant, les connaissances restent limitées quant au devenir de ces composés lorsqu'ils sont régulièrement rejetés dans l'environnement, que ce soit par leur fabrication, leur usage, leur excrétion ou leur mauvaise élimination. Cette incertitude souligne la nécessité de mieux les surveiller et les identifier dans les milieux exposés (OECD, 2019).

3.4. Les substances d'origine naturelle : les mycotoxines et les alcaloïdes

En plus des contaminations par des xénobiotiques ou contaminants d'origine anthropique, les denrées alimentaires peuvent contenir des substances toxiques d'origine naturelle, comme les mycotoxines produites par des moisissures ou les alcaloïdes présents dans certaines plantes. Ces composés peuvent s'introduire à différentes étapes de la chaîne alimentaire — culture, transformation, stockage ou transport — et entraîner des pertes de qualité sanitaire, nutritionnelle et commerciale (Frenich, Romero-González et del Mar Aguilera-Luiz, 2014).

Les mycotoxines sont des composés toxiques produits naturellement par certaines espèces de champignons, notamment *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Claviceps*. Issues du métabolisme secondaire de ces moisissures, elles se retrouvent comme contaminants dans de nombreux produits agricoles à travers le monde (European Environment Agency (EEA), 2025).

Elles sont classées en deux catégories : les mycotoxines de champ / culture et les mycotoxines de stockage. Les mycotoxines de champ se développent sur les cultures, notamment dans des conditions humides et chaudes (par exemple, *Fusarium*). Les céréales, les fourrages et les fruits sont particulièrement sensibles à la contamination par les mycotoxines de champ. Les mycotoxines de stockage se développent pendant le stockage des aliments, notamment lorsque les conditions de stockage sont inadéquates par exemple, *Aspergillus, Penicillium*). Les aliments stockés dans des silos, des bâtiments ou des hangars sont particulièrement sensibles à la contamination par les mycotoxines de stockage. Elles se distinguent également en cinq grandes familles : Aflatoxines, Trichothécènes, Zéaralénones, Fumonisines et Ochratoxines. Les Aflatoxines et les Ochratoxines sont produites par des champignons du genre *Aspergillus* (*Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus ochraceus*). Elles sont présentes dans les céréales, les fruits à coque et les produits dérivés du lait. Les Trichothécènes, Zéaralénones, Fumonisines sont produites par des champignons du genre Fusarium (Fusarium graminearum, Fusarium verticillioides et Fusarium moniliforme). Elles sont présentes dans les céréales, les fourrages et les produits carnés. Il faut également distinguer les toxines dites « traditionnelles », telles que les fumonisines, les trichothécènes et la zéaralénone, des toxines émergentes comme la beauvéricine (BEA) et les enniatines (ENNs) (Albero, Fernández-Cruz et Pérez, 2022).

De plus, certaines mycotoxines appartiennent à la famille des alcaloïdes. Les **alcaloïdes** sont une famille chimique caractérisée par la présence d'un ou plusieurs atomes d'azote dans leur structure, généralement sous forme de base organique. Il existe quatre grandes familles : les alcaloïdes opioïdes, les alcaloïdes tropaniques, les alcaloïdes pyrrolizidiniques, et les alcaloïdes de l'ergot. Certains alcaloïdes sont des mycotoxines, comme par exemples les alcaloïdes de l'ergot (ergotamine,

ergocristine, etc.) qui sont produits par le champignon *Claviceps purpurea* et qui sont à la fois des alcaloïdes (par leur structure chimique) et des mycotoxines (par leur origine fongique et leur toxicité).

L'exposition humaine aux mycotoxines et aux alcaloïdes se fait principalement par l'alimentation, en particulier *via* les céréales, les grains et leurs produits dérivés, qui constituent la principale source de contamination (**Figure 18**). Plusieurs facteurs contribuent à la production de mycotoxines, tels que l'humidité, la température, les niveaux d'oxygène, les espèces fongiques et le substrat. Les plantes peuvent absorber ces toxines durant leur croissance ou après la récolte, et celles-ci persistent dans les aliments même après le lavage, la cuisson ou certaines transformations, car plusieurs mycotoxines résistent à la chaleur et aux procédés classiques de préparation. En parallèle, des voies d'exposition non alimentaires existent, notamment par inhalation ou par contact cutané (**Figure 18**), surtout dans les environnements professionnels tels que les exploitations agricoles, les silos ou les usines de transformation. Enfin, les mycotoxines peuvent atteindre les systèmes aquatiques par ruissellement agricole, rejets d'eaux usées ou élimination inadéquate de produits contaminés ; certaines, comme l'ochratoxine A (OTA), résistent aux traitements classiques des eaux usées, tandis que d'autres, telles que la zéaralénone (ZEN) et le déoxynivalénol (DON), peuvent persister dans les rivières, lacs ou nappes phréatiques, posant ainsi un risque pour la qualité de l'eau potable (European Environment Agency (EEA), 2025). Cependant, très peu de travaux ont évalué le risque de contamination de l'eau par les mycotoxines. Pourtant, quelques études ont mis en évidence la présence de *Fusarium* et de toxines associées, notamment les trichothécènes comme le DON et la ZEA, dans les sols, les systèmes de drainage et les cours d'eau (Frenich, Romero-González et del Mar Aguilera-Luiz, 2014).

Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires principalement produits par les plantes, où ils jouent un rôle de défense. L'homme en fait usage depuis longtemps en raison de leurs nombreuses propriétés biologiques, allant d'effets stimulants à des applications médicinales. On les retrouve ainsi dans l'alimentation courante, par exemple la caféine du café, la théobromine et la caféine du cacao, la théophylline du thé, la tomatine de la tomate ou encore la solanine de la pomme de terre. Ces composés présentent un large spectre d'activités, notamment antiparasitaires, antibactériennes, antioxydantes ou encore insecticides, ce qui explique leur utilisation comme médicaments (morphine, quinine, colchicine, éphédrine, etc.), stimulants (caféine, nicotine) ou poisons (strychnine). Par conséquent, la consommation humaine d'alcaloïdes se fait à travers divers aliments et boissons, mais aussi *via* des usages thérapeutiques. De plus, l'exposition humaine à ces substances peut également provenir de la consommation de drogues, ou encore d'une exposition professionnelle par contact cutané ou inhalation lors de la manipulation de plantes ou de produits dérivés (Akinboye *et al.*, 2023).

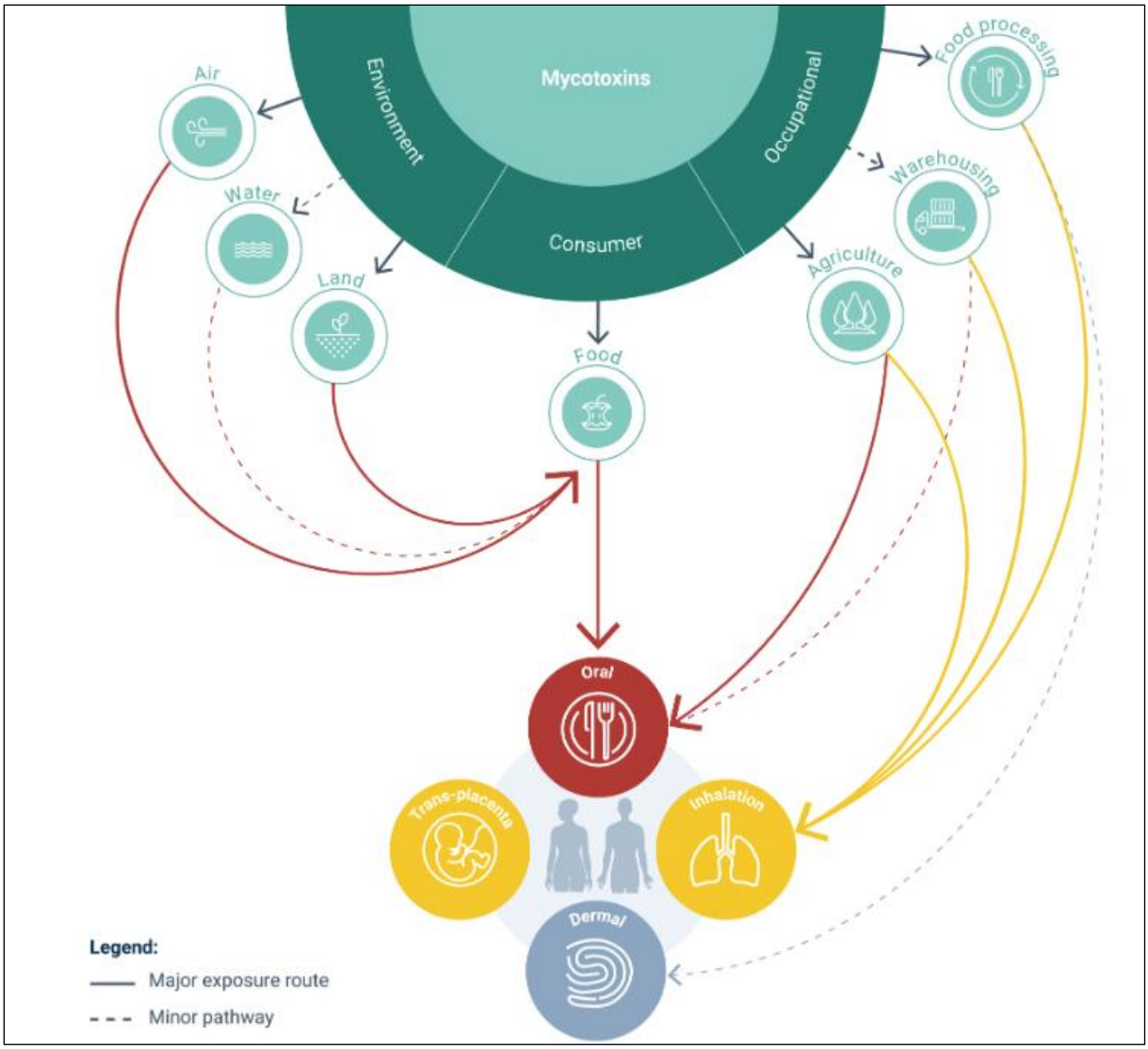


Figure 18. *Aperçu des principales sources d'exposition aux mycotoxines (European Environment Agency (EEA), 2025)*

Plus de 350 types de mycotoxines ont été identifiés, mais seule une trentaine d'entre elles présente des propriétés toxiques préoccupantes pour la santé humaine et animale. Lorsque les aliments contaminés sont consommés, les mycotoxines sont rapidement absorbées, affectant le foie et provoquant des troubles métaboliques. Les aflatoxines sont une des familles les plus toxiques, en particulier l'aflatoxine (AF) B1 (AFB1). Cependant, parmi les fusariotoxines, les fumonisines de type B, comme la fumonisine B1 (FB1), la ZEN et le DON, mais également l'OTA sont considérées comme les plus préoccupantes en raison de leur présence parfois importante dans les aliments et de leurs effets néfastes sur la santé animale et humaine. Ces composés peuvent provoquer des effets aigus et chroniques tels que carcinogenèse, mutagenèse, tératogenèse, toxicité hépatique et rénale, perturbations endocriniennes, troubles immunitaires et reproductifs, ainsi que des baisses de productivité et des pertes embryonnaires chez les animaux d'élevage. Les principales familles de mycotoxines problématiques comprennent les aflatoxines, les trichothécènes, les zéaralénones, les

fumonisines et les ochratoxines, présentes dans les céréales, fourrages, fruits à coque, produits laitiers et produits carnés (Frenich, Romero-González et del Mar Aguilera-Luiz, 2014; De Felice, Spicer et Caloni, 2023; Sadighara *et al.*, 2024; European Environment Agency (EEA), 2025).

Un certain nombre d'alcaloïdes présentent des effets toxiques pour l'homme et les animaux. Leur toxicité peut aller de manifestations légères, comme des nausées ou des vomissements, à des conséquences plus graves et chroniques, telles que des effets tératogènes ou même une mort subite. Certains, comme la morphine, la cocaïne, la caféine ou la nicotine, sont d'ailleurs largement consommés ou détournés à des fins récréatives. Les alcaloïdes de l'ergot peuvent entraîner une stimulation directe des muscles lisses, une activité sympatholytique centrale et un blocage périphérique des récepteurs α-adrénergiques. L'ingestion d'alcaloïdes quinolizidiniques provoque des symptômes tels qu'une vision trouble, des bouffées vasomotrices, une sécheresse buccale ou encore une confusion. Enfin, plusieurs alcaloïdes pyrrolizidiniques sont reconnus pour leur hépatotoxicité et leur potentiel cancérogène (Akinboye *et al.*, 2023).

Les mycotoxines peuvent subir des modifications dans les plantes ou lors de procédés technologiques, donnant naissance à des formes dites « modifiées », dont la présence et la toxicité restent encore mal caractérisées. Ces transformations, qui incluent des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse ou de conjugaison avec des molécules polaires, altèrent la structure chimique du composé d'origine et peuvent masquer leur détection. Or, ces formes modifiées peuvent redevenir toxiques après hydrolyse dans l'organisme, soulevant d'importantes préoccupations toxicologiques. De plus, elles échappent souvent aux méthodes analytiques classiques en raison de leurs propriétés physicochimiques particulières et du manque de standards de référence, ce qui conduit à sous-estimer la contamination réelle. La surveillance de ces métabolites reste donc essentielle pour garantir la sécurité sanitaire alimentaire et la santé humaine et animale (Righetti *et al.*, 2016).

L'EFSA joue un rôle central dans l'évaluation du risque lié aux mycotoxines**.** Elle collecte et analyse les données d'occurrence dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, et élabore des lignes directrices destinées aux demandeurs concernant l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité des additifs qui visent à réduire la contamination par les mycotoxines. Sur la base de ces données et d'analyses toxicologiques, l'EFSA fournit aux gestionnaires du risque de la Commission européenne ou des États membres des avis scientifiques qui les aident à fixer des niveaux maximaux de mycotoxines dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Elle évalue également l'exposition humaine et animale à ces contaminants, en tenant compte de groupes spécifiques de population (nourrissons, enfants, personnes suivant des régimes particuliers) et des différentes espèces animales.

Concernant les valeurs de référence, l'EFSA a défini des doses journalières tolérables (DJT) ou hebdomadaires (DHT) pour certaines mycotoxines bien étudiées. Par exemple, la ZEN a un DJT de 0,25 µg/kg de poids corporel/jour**,** la somme de trois types de DON une DJT de 1 mg/kg de poids corporel par jour, la FB1 de 1 µg/kg p.c./jour, et l'OTA un DHT de 120 ng/kg p.c. Néanmoins, toutes les mycotoxines ne disposent pas de valeurs toxicologiques de référence, notamment lorsque les données sont insuffisantes ou lorsque la substance est génotoxique et cancérogène (ex. l'aflatoxine B1). De même, pour les alcaloïdes, l'EFSA a conduit des évaluations de risque, en particulier pour les alcaloïdes de l'ergot : il a été conclu qu'ils représentent un risque sanitaire notable pour certaines espèces d'élevage comme les porcs et les bovins, alors que le risque est jugé faible pour les volailles, les ovins et les caprins. Cependant, les données restent limitées pour établir des DJT robustes pour l'ensemble des alcaloïdes, ce qui constitue une lacune importante dans l'évaluation du risque (EFSA, 2006, 2011, 2018a, 2024; European Environment Agency (EEA), 2025).

La Commission européenne, sur la base des recommandations scientifiques de l'EFSA, établit des limites maximales autorisées pour les contaminants dans les denrées alimentaires, tels que définis dans le Réglement (UE) 2023/915 du 25 avril 2023 (European Commission, 2023b). Ce texte réglementaire fixe, entre autres, des seuils pour plusieurs mycotoxines préoccupantes — notamment les aflatoxines, l'OTA, le DON, la ZEN et les fumonisines. Il introduit également des limites pour certains alcaloïdes, comme par exemple pour la présence d'alcaloïdes tropaniques dans les produits destinés aux nourrissons, renforçant ainsi la protection des populations les plus vulnérables.

Les données sur la présence et les effets des mycotoxines dans les aliments restent limitées. En particulier pour les mycotoxines émergentes, qui sont encore peu étudiées, non recherchées de façon systématique et non encadrées par la réglementation. L'intérêt pour ces dernières croît en raison de leur fréquence d'occurrence et de leurs impacts potentiels, soulignant la nécessité d'une évaluation complète du risque (Albero, Fernández-Cruz et Pérez, 2022; De Felice, Spicer et Caloni, 2023).

De plus, la contamination des aliments peut résulter de la présence simultanée de plusieurs mycotoxines, soit parce qu'un même champignon, comme *Fusarium*, en produit plusieurs, soit par la contamination croisée de différentes espèces fongiques. Or, la législation européenne se limite encore aux données d'exposition à une mycotoxine à la fois, sans prendre en compte les effets additifs ou synergiques possibles. L'évaluation de la contamination multi-mycotoxines des aliments reste donc essentielle pour mieux comprendre leur qualité et leur toxicité (Albero, Fernández-Cruz et Pérez, 2022). La Commission européenne a alors sollicité l'EFSA pour évaluer les risques que ces toxines pourraient poser à la santé humaine et animale (Albero, Fernández-Cruz et Pérez, 2022).

Avec le réchauffement climatique, qui progresse en Europe à un rythme plus rapide que la moyenne mondiale, la prévalence de certaines mycotoxines devrait augmenter. Dans les régions tempérées et humides, les conditions plus chaudes et plus humides favorisent le développement de champignons producteurs de toxines telles que l'AF, le DON, la ZEN ou encore l'OTA. Les épisodes climatiques extrêmes bouleversent déjà la répartition géographique des mycotoxines en Europe et ailleurs, rendant leur présence dans les cultures alimentaires de plus en plus imprévisible. De plus, les organismes vivants – qu'il s'agisse des plantes, des champignons, des bactéries ou même des mammifères – peuvent modifier la structure chimique de ces toxines, générant ainsi une diversité encore plus large de contaminants potentiels. Enfin, l'augmentation de l'utilisation des farines végétales dans l'alimentation animale et piscicole renforce le risque d'exposition, ce qui souligne la nécessité de multiplier les études sur l'impact des mycotoxines et de leurs métabolites, ainsi que d'évaluer les risques liés à la contamination des aliments destinés aux humains et aux animaux d'élevage, en particulier les poissons (Righetti *et al.*, 2016; Albero, Fernández-Cruz et Pérez, 2022; European Environment Agency (EEA), 2025).

Face à l'omniprésence, la diversité chimique et au manque de données toxicologiques disponibles sur les contaminants émergents, il devient urgent d'approfondir la recherche sur leur occurrence, leur comportement et leurs effets, mais aussi de développer des outils de détection capables d'identifier de nouveaux contaminants encore méconnus (Bhagat, Singh et Shimada, 2024).

4. Les méthodes analytiques

Dans le but de caractériser la teneur de ces différentes substances d'intérêt dans les aliments, des méthodes analytiques ont été développées. Ces méthodes sont réalisées à partir de protocoles d'extraction et d'analyse développés pour être sélectifs et sensibles pour les composés d'intérêt.

Cette approche est désignée sous le terme de *Recherche ciblée*, ou *Targeted Screening* (TS) en anglais. Elle se définit comme une méthode permettant la recherche de composés dont le nom chimique et la structure sont connus grâce aux étalons analytiques. Par conséquent, des méthodes quantitatives ciblées, ainsi que des données sur l'exposition et l'évaluation des risques, sont souvent disponibles. Une préparation d'échantillon très sélective est mise en œuvre pour isoler les composés d'intérêt tout en éliminant les interférences de matrice. La détection repose le plus souvent sur la spectrométrie de masse en tandem à basse résolution (par exemple, triple quadripôle - QqQ en mode d'acquisition SRM) associée à une identification par une comparaison entre les données acquises et celles de référence obtenues à partir d'étalons certifiés (critères basés sur les temps de rétention chromatographiques, spectres MS et MS/MS). La quantification est réalisée de préférence par la méthode de dilution isotopique. Des instruments à haute résolution (Orbitrap, temps de vol (ToF)) peuvent aussi être

utilisés, permettant de combiner analyses ciblées, suspectes et non ciblées — décrites ci-dessous —, bien que leurs performances puissent être légèrement inférieures à celles des approches ciblées optimisées (Pourchet *et al.*, 2020).

Après avoir été développées, ces méthodes sont d'abord validées selon les différents guides de référence en fonction des familles de composés, le cas échéant accréditées selon le référentiel ISO17025, avant d'être utilisées à large échelle, en analyse de routine. Pour cela, des textes de référence encadrent la validation des méthodes pour chaque famille de substances d'intérêt.

- Le laboratoire de référence de l'Union européenne pour les POPs halogénés présente un document sur les paramètres analytiques pour l'analyse de PFAS dans les aliments (EURL POPS, 2024). De plus, dans le but de garantir la fiabilité des contrôles officiels de teneurs en PFAS dans certaines denrées alimentaires, des exigences sur les méthodes de prélèvement et d'analyses d'échantillons ont été communiquées par (European Commission, 2022a), comme par exemple des précautions (pas de vêtements, gants ou cosmétiques contenant des PFAS) à respecter lors de la journée de prélèvement d'échantillons, des informations sur le plan d'échantillonnage, ou encore des procédures incluant des appareils et équipements ne contenant pas de PFAS.
- La validation de méthode pour l'analyse des pesticides dans les denrées alimentaires doit suivre les directives du document N° SANTE/11312/2021v2 (European Commission, 2021b).
- Pour les résidus de médicaments vétérinaires, la validation de la méthode doit être effectuée conformément au réglement 2021/808 de la (Commission Regulation, 2021), qui présente également des méthodes à utiliser pour l'échantillonnage.
- Le document 2023/2783 présente les critères à appliquer lors du contrôle de la teneur de toxines végétales (alcaloïdes) et mycotoxines dans des denrées alimentaires (European Commission, 2023a).

Les paramètres analytiques pris en compte dans ces processus peuvent varier d'une étude à l'autre, certains étant communs tandis que d'autres diffèrent, en raison notamment de choix méthodologiques, d'objectifs spécifiques ou encore de terminologies et de sémantiques variables selon les domaines. Il convient également de souligner que, au-delà des critères de validation, les critères d'identification — tels que le temps de rétention, les ions spécifiques ou encore les transitions — peuvent varier selon les travaux. Plusieurs auteurs, comme (Koloka *et al.*, 2025), s'appuient sur des critères définis dans divers documents de référence (European Commission, 2021b, 2022a; EURL POPS, 2024). Dans cette perspective, l'élaboration de critères harmonisés, complets et applicables à l'ensemble des familles de composés pourrait constituer une avancée importante.

4.1. Stratégies analytiques ciblées : illustration avec le cas des PFAS

L'analyse des PFAS dans les denrées alimentaires suscite un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique, devenu quasiment exponentiel au cours des trois dernières années, comme en témoigne le foisonnement d'études et de données publiées sur le sujet. Le nombre de publications proposant des méthodes analytiques pour détecter ces composés dans diverses matrices alimentaires ne cesse d'augmenter **Figure 19**, entraînant parallèlement une multiplication des revues bibliographiques synthétisant ces approches.

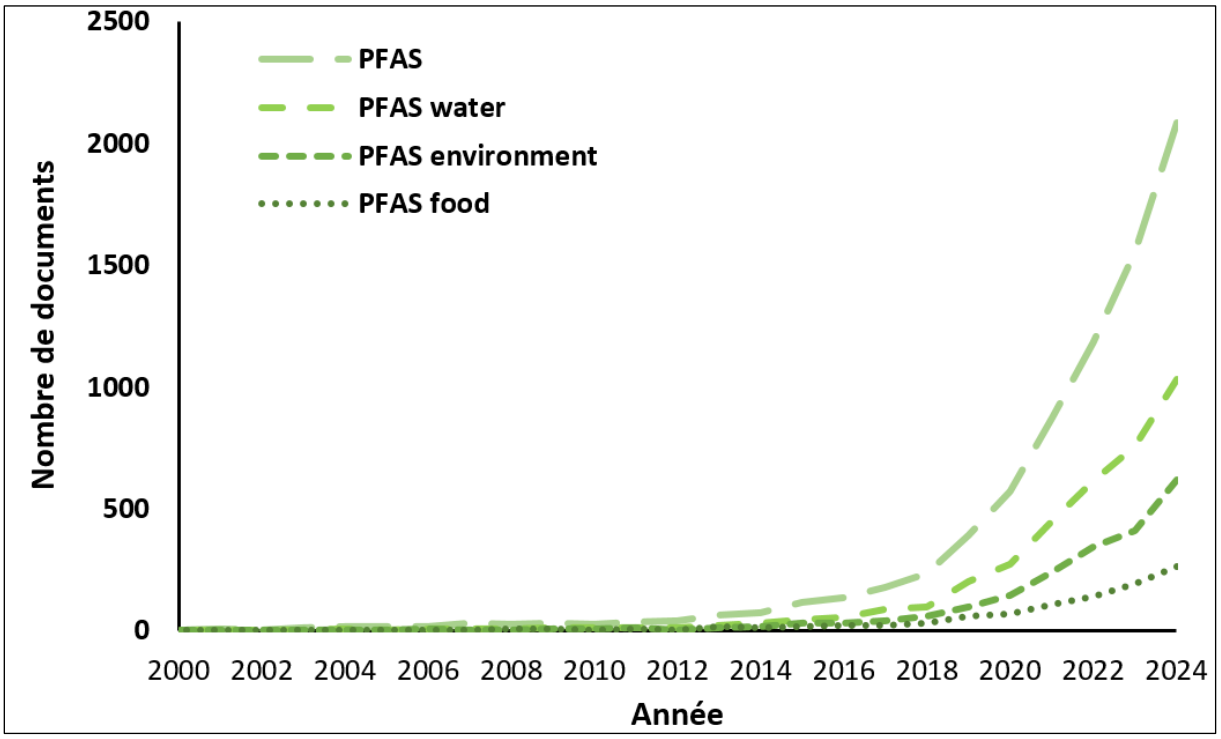


Figure 19. *Nombre de publications scientifiques entre 2000 et 2024 contenant les mots-clés « PFAS », « PFAS and water », « PFAS and environment » et « PFAS and food », d'après les données extraites de la base Scopus ; figure réalisée à partir des données collectées en juillet 2025*

Les deux paragraphes ci-dessous présentent respectivement les méthodes de préparation des échantillons et les techniques analytiques associées, en s'appuyant sur les informations issues de ces articles. En parallèle, une recherche bibliographique approfondie a été conduite dès le début du projet afin de soutenir les développements analytiques. Cette étude a été enrichie de manière itérative tout au long des trois années, et a abouti à la constitution d'un tableau de synthèse regroupant de nombreux articles scientifiques (n > 100) portant sur l'analyse des PFAS dans différents types d'aliments. Une sélection des articles les plus pertinents est présentée dans le **Tableau 10**, en Annexes. Ce travail de revue a permis d'identifier les approches les plus courantes, d'anticiper certaines difficultés analytiques, et de guider les choix méthodologiques tout en assurant une meilleure comparabilité des résultats obtenus dans le cadre de la thèse.

Ces articles scientifiques se concentrent sur l'analyse d'un nombre défini de PFAS, et présentent donc des méthodes de recherche ciblée. Les techniques d'analyse des PFAS se sont rapidement développées, passant d'une recherche spécifique des deux PFAS les plus étudiées (le PFOA et le PFOS), à la suite de l'avis scientifique de l'EFSA en 2008 et par conséquent des recommandations de la Commission Européenne en 2010 (Commission Recommendation, 2010), à des mesures de routine d'environ 30 PFAS par série, avec des standards analytiques, y compris des étalons internes (EI) marqués, disponibles dans le commerce et une détection par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Cependant, les PFAS présentent une très large diversité de propriétés physico-chimiques, avec des masses moléculaires, des groupes fonctionnels, des longueurs de chaîne, des géométries moléculaires, des paramètres ou encore des valeurs de log P qui varient selon la structure du composé. Cette hétérogénéité illustre le défi majeur que représente leur extraction, détection et identification, soulignant la nécessité de développer des stratégies analytiques adaptées pour couvrir l'ensemble de ce spectre (Fabregat-Palau *et al.*, 2025).

4.1.1. Préparation d'échantillons

La première étape pour l'analyse de PFAS dans diverses matrices alimentaires est la préparation d'échantillons. De nombreuses revues rassemblent les différentes méthodologies courantes pour l'extraction des PFAS et la purification des extraits dans diverses échantillons alimentaires, comme les viandes, les poissons, les produits laitiers, les fruits et les légumes, les œufs, et des aliments tels que consommés (Jahnke et Berger, 2009; Al Amin *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2020; Ogunbiyi *et al.*, 2023; Eze *et al.*, 2024; Iannone *et al.*, 2024; Koloka *et al.*, 2025). Dans certains cas, ces revues bibliographiques rapportent également les pourcentages de recouvrement, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) associés aux méthodes présentées.

Plusieurs techniques d'extraction sont utilisées pour analyser un nombre défini de PFAS dans des matrices alimentaires, notamment l'extraction assistée par ultrasons (UAE), l'extraction par paire d'ions (IPE), l'extraction liquide-liquide (LLE), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction solide-liquide assistée par ultrasons focalisés (FUSLE), l'extraction solide-liquide (SLE), l'extraction en phase solide (SPE), ainsi que, plus récemment, la méthode QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe). Ces méthodes utilisent une variété de solvants ou de mélanges de solvants selon la nature de l'échantillon, tels que l'hexane/acétone, le méthanol (MeOH), l'acétonitrile (ACN), le méthyl-tert-butyl-éther (MTBE), les mélanges MeOH/KOH (hydroxyde de potassium), MeOH/acide formique (AF), ou encore ACN/eau. L'IPE présente cependant l'inconvénient majeur d'entraîner la co-extraction

de lipides et d'autres composés lipophiles, ce qui complique l'analyse des matrices riches en graisses, dont de nombreux aliments. La SLE, bien que plus simple à mettre en œuvre, présente un faible débit analytique, limitant son efficacité pour les analyses à grande échelle. Enfin, l'extraction liquide sous pression (PLE) a été proposée comme alternative pour l'analyse des PFAS dans les poissons, mais cette approche reste contraignante en raison de ses coûts instrumentaux élevés et de sa sélectivité limitée pour les composés organiques dans des matrices complexes. Pour améliorer l'efficacité d'extraction des PFAS, plusieurs études ont combiné différentes techniques, telles que la sonication couplée à la SLE, ou encore la PLE et la SPE, ainsi que l'association de la FUSLE avec la SPE. Récemment, d'autres méthodes basées de la technique QuEChERS ont été développées, comme la méthode QuEChERSER (QuEChERS + efficace + robuste), qui permet l'extraction d'un plus grand nombre de composés. Initialement conçue pour l'analyse simultanée de plus de 350 pesticides, médicaments vétérinaires et contaminants environnementaux, cette approche a ensuite été élargie à l'analyse de 33 PFAS dans le bœuf, le poisson-chat, le poulet, le porc et les œufs (Taylor et Sapozhnikova, 2022).

Parmi ces différentes techniques, la SPE et la méthode QuEChERS figurent parmi les plus couramment utilisées pour l'analyse des PFAS dans les matrices alimentaires. La SPE est particulièrement répandue lorsqu'il s'agit de cibler des composés spécifiques, grâce à l'utilisation de divers sorbants tels que Oasis WAX, ENVI-Carb, Strata-X-AW, échangeurs d'anions faibles (WAX), HLB, Bond Elut ou encore EMR-Lipid. Ces cartouches permettent une purification efficace en éliminant les composés interférents. Cependant, leur utilisation peut réduire le taux de récupération de certains composés, ce qui limite leur efficacité lorsqu'il s'agit d'extraire une plus large gamme de PFAS. La méthode QuEChERS, couramment utilisée pour l'extraction de contaminants organiques dans les denrées alimentaires, a démontré une grande efficacité pour l'analyse des PFAS. Cette méthode, initialement développée pour les pesticides (Anastassiades *et al.*, 2003a), est maintenant adaptée pour l'analyse des PFAS dans les aliments. Elle implique une extraction par solvant, généralement en utilisant de l'ACN acidifié avec de l'acide formique ou le MeOH ou le MTBE, suivie d'une étape de *salting out*, souvent à l'aide d'un mélange de sulfate de magnésium ($MgSO_4$) et de chlorure de sodium (NaCl). Cette étape favorise la séparation des phases, la migration des analytes d'intérêt vers la phase organique, ce qui permet une extraction efficace même à l'état de traces. Après cette étape, une purification est réalisée par extraction en phase solide dispersive (d-SPE), afin d'éliminer les co-extraits issus de la matrice alimentaire, comme l'acide cholique qui peut interférer avec les composés ciblés. Divers sorbants sont utilisés lors de cette étape comme le *Graphitized Carbon Black* (GCB), le *Primary and Secondary Amine* (PSA), C_{18} (octadécylsilane), EMR Lipid et le $MgSO_4$. Le GCB élimine les composés non fluorés, en particulier les composés aromatiques responsables de la coloration des matrices biologiques, grâce à des interactions π-π avec le carbone graphitisé. Le PSA est un échangeur d'anions faible, qui permet

l'élimination d'acides organiques polaires, des sucres et d'autres interférents polaires susceptibles d'interférer lors l'analyse instrumentale. Le C_{18} est utilisé pour retenir les composés hydrophobes, tels que les lipides résiduels. L'EMR Lipid est efficace pour éliminer efficacement les lipides des matrices alimentaires complexes. Le $MgSO_4$ assure l'élimination de l'eau résiduelle par dessiccation (Ogunbiyi *et al.*, 2023; Van Leeuw *et al.*, 2024; Koloka *et al.*, 2025). L'utilisation combinée de ces sorbants permet une purification efficace des extraits, améliorant ainsi la sensibilité des analyses de PFAS dans des matrices complexes telles que les produits alimentaires.

Après l'étape d'extraction, une étape de purification est parfois ajoutée afin de minimiser les interférences analytiques tout en préservant les composés d'intérêt. Cette purification repose généralement sur une ou plusieurs SPE. D'autres techniques complémentaires comme la filtration, la centrifugation ou la dilution peuvent également être employées selon la complexité de la matrice. Le **Tableau 10** (page 322) présente une partie des différentes publications étudiées au cours de ce travail de doctorat.

Par exemple, (Moretti *et al.*, 2024) ont utilisé une extraction à l'ACN et une purification par cartouche SPE (Strata X-AW) pour rechercher la présence de 66 PFAS dans des œufs de tortue. Une méthode combinant une extraction FUSLE suivie d'une étape de purification par SPE (WAX et Envi-Carb) a été utilisée pour extraire des PFAS dans divers produits de la pêche (Zabaleta *et al.*, 2015). Dans le cadre d'une EAT française, l'extraction a été réalisée avec du MeOH, puis deux SPE (C_{18} et Envi-Carb) ont été utilisées pour l'étape de purification (Rivière *et al.*, 2014). Alors que l'EAT réalisée par la FDA (Food and Drug Administration) a analysé divers aliments en utilisant une méthode QuEChERS combinant une extraction par acétonitrile/eau/acide formique, un *salting out* avec $MgSO_4$ et NaCl, une purification par d-SPE ($MgSO_4$, PSA, GCB), suivie d'une filtration finale (Genualdi *et al.*, 2022). La méthode d'extraction QuEChERS est de plus en plus utilisée, comme dans la publication récente de (Koloka *et al.*, 2025), avec une extraction par eau/ACN/AF, $MgSO_4$/NaCl et une purification par d-SPE (EMR-Lipid), pour l'analyse de poissons.

4.1.2. Méthodes d'analyse

Après un protocole d'extraction spécifique aux PFAS ciblés par l'analyse, le développement de méthodes instrumentales sélectives et sensibles pour la séparation et la quantification des PFAS est essentiel afin de couvrir l'ensemble des composés présentant des propriétés physico-chimiques variées. Les revues bibliographiques citées précédemment présentent également les méthodes d'analyse les plus utilisées pour détecter un nombre spécifique de PFAS dans des matrices alimentaires (Jahnke et Berger, 2009; Al Amin *et al.*, 2020; De Silva *et al.*, 2021; Ogunbiyi *et al.*, 2023; Eze *et al.*, 2024; Iannone *et al.*, 2024).

Pour l'analyse des PFAS non volatils et semi-volatils, la LC-MS/MS, en mode SRM, est aujourd'hui l'une des méthodes les plus couramment employées pour l'analyse ciblée des PFAS.

La LC, étape essentielle en amont de la spectrométrie de masse, est particulièrement adaptée à l'analyse des PFAS, souvent présents sous forme d'ions anioniques, cationiques ou zwitterioniques. Elle permet de réduire les interférences de matrice et de fournir des informations de rétention utiles à l'élucidation structurale. La plupart des études utilisent la LC en phase inverse avec des colonnes C_{18}, et plus rarement C8, pour séparer les PFAS, notamment leurs isomères structuraux qui ont la même masse exacte. Cette séparation est cruciale pour faciliter l'interprétation des spectres et maximiser la découverte de composés. Pour la séparation chromatographique, la colonne Thermo Hypersil Gold est communément utilisée (Ogunbiyi *et al.*, 2023).

De plus, des techniques chromatographiques complémentaires, telles que la chromatographie en phase supercritique (SFC) et la chromatographie en interaction hydrophile (HILIC), offrent des alternatives précieuses pour l'analyse de composés difficiles, notamment les PFAS à chaînes ultra-courtes et très mobiles (Joerss et Menger, 2023). La SFC gagne en intérêt comme troisième approche chromatographique, aux côtés de la LC et de la GC, permettant l'analyse d'un large spectre de composés, des non-polaires aux très polaires, grâce aux progrès réalisés dans les phases stationnaires et les performances de séparation. Par exemple, une méthode UHPSFC-MS/MS a été développée pour l'analyse des PFAS dans des matrices alimentaires, offrant une séparation rapide et efficace et constituant une alternative pertinente aux LC-MS/MS conventionnelles (Amziane *et al.*, 2022).

La chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) est largement utilisée pour l'analyse des PFAS en raison de sa robustesse et de sa capacité à séparer efficacement les composés non polaires et modérément polaires. Cependant, les PFAS très polaires, comme les espèces à chaînes ultra-courtes, y sont souvent insuffisamment retenus. La HILIC s'est ainsi imposée comme une alternative prometteuse, permettant une rétention et une séparation efficaces des analytes très polaires et hydrophiles. Elle permet des séparations rapides et reproductibles et a été appliquée avec succès pour améliorer la détection de PFAS dans des matrices complexes (Serafimov *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024).

Pour quantifier ces composés, les instruments à basse résolution (LRMS), tels que les trappes ioniques (IT) ou les triples quadrupoles (QqQ), sont employés grâce à leur sensibilité et sélectivités élevées. Cette technique est largement utilisée pour la séparation et la quantification des PFAS anioniques, tels que PFSAs et les PFCAs, notamment en mode ionisation électrospray négatif (ESI−), qui permet la déprotonation des groupes fonctionnels et offre une sensibilité élevée ainsi qu'une large plage dynamique.

La LC-ESI-MS/MS est la méthode la plus couramment utilisée dans les études visant à déterminer les concentrations de PFAS dans les matrices alimentaires. Cette méthode d'analyse a par exemple été utilisée pour investiguer la présence de 13 PFAS dans des œufs (Ozaki *et al.*, 2025), de 15 PFAS dans diverses espèces de poissons sauvages provenant de différentes régions de Suisse (Jaus, Rhyn et Valentini, 2023), de 33 PFAS dans des fruits de mer du commerce aux États-Unis (Bedi *et al.*, 2023), ou encore de 45 PFAS dans de nombreux fruits et légumes (Meng, DeStefano et Knappe, 2022). Le **Tableau 10** (page 322) regroupe différentes études utilisant cette méthode d'analyse. Cependant cette méthode ne permet pas d'identifier tous les PFAS car certains composés comme le PFBA et le PFPeA ne possèdent qu'une seule transition en spectrométrie de masse triple quadrupole (QQQ), limitant la fiabilité de leur détection, et nécessitant une analyse par HRMS (Genualdi *et al.*, 2022).

Bien que certains PFAS, comme les PFCA, puissent faire l'objet de séparations par chromatographie en phase gazeuse après dérivation, les PFAS volatils tels que les alcools fluorotélomères (FTOHs) peuvent être directement analysés en utilisant la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) avec des techniques d'ionisation chimique (CI) (Jahnke et Berger, 2009; Ogunbiyi *et al.*, 2023).

Les méthodes MS/MS présentent cependant plusieurs limites. Ces instruments (IT ou QqQ) nécessitent la connaissance préalable des transitions de fragmentation des composés, la disponibilité de standards analytiques commerciaux pour chaque composé, ne permettent pas de distinguer des analytes de masses nominales proches, et offrent une capacité restreinte pour la surveillance simultanée d'un grand nombre de substances, limitant leur portée aux seuls PFAS déjà identifiés, excluant de nombreux composés émergents ou inconnus (Ogunbiyi *et al.*, 2023). Pour dépasser ces limites, la HRMS est de plus en plus utilisée. Les instruments comme le quadrupole–TOF (QTOF) ou l'Orbitrap (couplé à un quadrupole (Q-Orbitrap) ou une trappe ionique linéaire (LIT-Orbitrap) offrent une mesure exacte de la masse et la possibilité d'obtenir des données MS/MS, ce qui permet l'analyse simultanée de nombreux composés, y compris l'enregistrement de signaux correspondants à des composés non ciblés, en une seule analyse (Ogunbiyi *et al.*, 2023; Koloka *et al.*, 2025). En 2009, différents types de spectromètres pour l'analyse des PFAS (ion trap MS/MS, QqQ MS/MS, et ToF-HRMS) ont été comparés, concluant que la méthode ToF-HRMS, qui combinait à la fois une grande sélectivité et une sensibilité optimale, était la plus performante (Jahnke et Berger, 2009). Plus récemment, grâce à leur pouvoir de résolution élevé (RP > 30 000), les instruments de type Q-Orbitrap sont désormais préférés aux Q-TOF (RP ~ 8 000), offrant une sensibilité et une précision accrues pour l'assignation précise des formules moléculaires et l'identification de nouveaux PFAS dans des matrices complexes, en particulier dans les échantillons alimentaires (Ogunbiyi *et al.*, 2023).

Les PFAS dans les aliments sont donc désormais également analysés par LC-HRMS. Les systèmes UHPLC-LIT-Orbitrap HRMS et UHPLC-Q-Orbitrap HRMS sont principalement utilisés, comme par exemple pour l'investigation d'échantillons de poissons (Koloka *et al.*, 2025), de lait maternel (Beser *et al.*, 2019), d'œufs (Chiumiento *et al.*, 2023) ou encore de viande et de thon (Roviaro *et al.*, 2025). De nombreux autres exemples, présentés dans le **Tableau 10** (page 322), utilisent la HRMS pour l'analyse d'un nombre spécifique de PFAS dans les aliments.

Cependant, un défi analytique majeur concerne le décalage entre la production croissante de PFAS émergents et la disponibilité de standards analytiques commerciaux, indispensables aux méthodes ciblées de routine. Bien qu'elles offrent une sensibilité et une sélectivité élevées, les méthodes classiques en LC-MS/MS, ne permettent l'analyse que d'un nombre limité de composés pour lesquels des standards sont disponibles. Or, une grande partie des PFAS présents dans l'environnement et donc dans les aliments, ou générés par transformation reste inconnue ou non caractérisée. Dans ce contexte, la HRMS représente une alternative essentielle, en permettant la recherche en mode suspect et l'analyse non ciblée, et par conséquent la détection de composés sans standard (Pan *et al.*, 2020; De Silva *et al.*, 2021; Ogunbiyi *et al.*, 2023).

4.1.3. Recommandations européennes

Au-delà des 4 PFAS à surveiller et des 18 additionnels à surveiller dans la mesure du possible dans les denrées alimentaires (European Commission, 2022b), et en tenant compte du grand nombre de PFAS potentiellement présents dans l'environnement — c'est-à-dire plus 7 millions (Schymanski *et al.*, 2023) —, les agences de santé sont de plus en plus préoccupées par la nécessité d'une surveillance plus large.

Pour mieux comprendre cette évolution, il est utile de revenir sur les premières orientations données il y a une quinzaine d'années. Ainsi, dès 2010, la Commission européenne recommandait déjà aux États membres de rechercher la présence de PFOS, PFOA, et, si possible, leurs précurseurs, tels que le perfluorooctane sulphonamide (PFOSA), le N-éthyl perfluorooctane sulfonamidoéthanol (NEtFOSE) et l'alcool fluorotélomère 8:2, mais également les composés similaires au PFOS mais dont la chaîne est de longueur différente (C4 — C15), ainsi que les tensioactifs phosphates de polyfluoroalkyles (PAPs) tels que 8:2 diPAPS et 8:2 monoPAPS, afin de mesurer leur présence dans les denrées alimentaires (Commission Recommendation, 2010). Elle recommandait également de fournir à l'EFSA des données régulières dans le but de surveiller l'évolution de l'exposition à ces substances.

Par la suite, en 2020, l'EFSA a émis des recommandations plus larges pour améliorer les méthodes d'analyse des PFAS dans les aliments, en préconisant de développer des méthodes analytiques plus sensibles et précises pour les PFAS individuels mais également additionnées (EFSA, 2020). L'agence

recommande également de renforcer les données d'occurrence des PFAS, tant dans l'environnement que dans les denrées alimentaires largement consommées, et de mettre régulièrement à jour les évaluations d'exposition, notamment à mesure que des méthodes analytiques plus sensibles deviennent disponibles. Elle souligne également la nécessité d'études supplémentaires sur le transfert des PFAS tout au long de la chaîne alimentaire, l'impact de la cuisson, des procédés de transformation et du transfert depuis les matériaux au contact des aliments, ainsi que sur d'autres sources d'exposition comme l'air intérieur et les poussières domestiques. Enfin, l'agence insiste sur le besoin de recherches sur les effets de certains PFAS sur le développement mammaire, l'immunotoxicité et les mécanismes d'action sous-jacents (EFSA, 2020).

Plus récemment, la Commission Européenne a souligné la nécessité de *rechercher la présence dans les denrées alimentaires de substances perfluoroalkylées nouvelles* (European Commission, 2022b). Toutes ces recommandations visent à mieux caractériser la contamination des aliments et à améliorer l'évaluation de l'exposition.

Les méthodologies traditionnellement utilisées basées sur une extraction par SPE et une analyse par LC-MS/MS sont sélectives à quelques composés, et ne permettent donc pas de répondre à ces besoins. Cependant, les améliorations technologiques récentes en spectrométrie de masse permettent de passer d'une approche ciblée à une approche non ciblée pour améliorer la caractérisation de l'exposition à un ensemble de contaminants, sans avoir d'indices *a priori* sur leur présence (INRAE, 2021).

4.2. Stratégies suspecte et non ciblée

Les méthodes ciblées, bien que performantes, restent limitées à une liste de composés prédéfinis. Dans le but d'approfondir la compréhension de l'exposome chimique alimentaire, il est donc essentiel de développer des approches élargissant l'identification à un spectre plus vaste de contaminants potentiels. Les avancées technologiques en HRMS, combinées à des approches analytiques non ciblées et suspectes permettent justement d'identifier des substances non recherchées ou encore inconnues (Nakayama *et al.*, 2019). Un schéma conceptuel représentant les trois approches méthodologiques pour comprendre l'exposome chimique est présenté par (Pourchet *et al.*, 2020), incluant (i) les méthodes ciblées (*Targeted Screening*, TS) pour les composés connus, (ii) la recherche suspecte (*Suspect Screening*, SS) pour les composés « connus inconnus » et (iii) la recherche non-ciblée (*Non-Targeted Screening*, NTS) pour les « inconnus inconnus » (**Figure 20**).

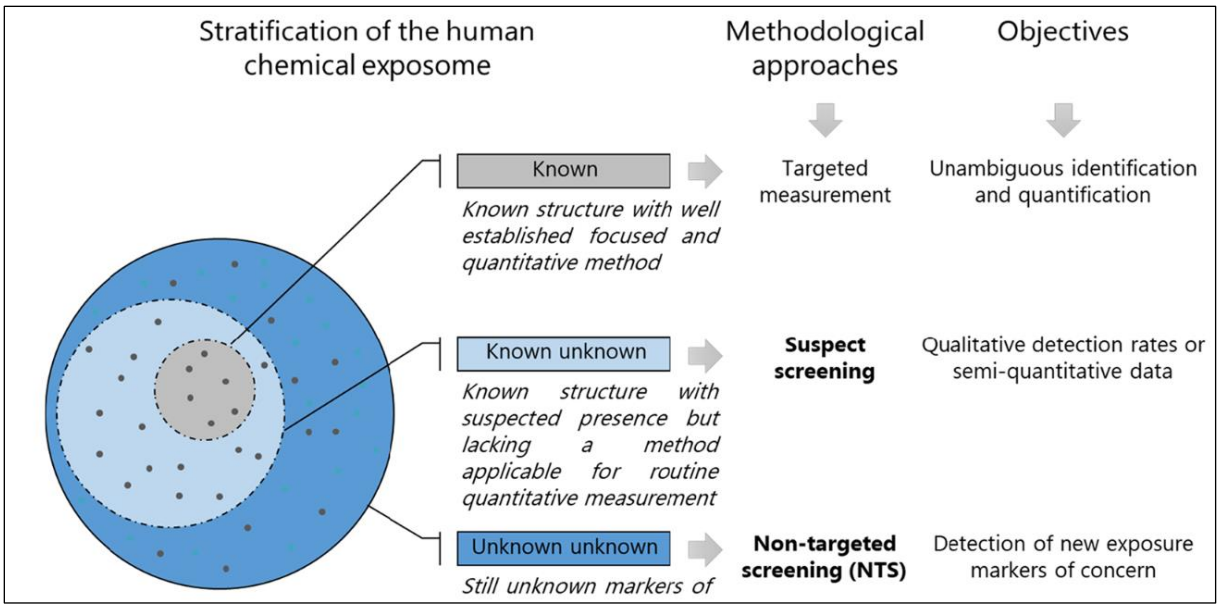


Figure 20. *Schéma conceptuel des trois approches méthodologiques (Targeted Screening, Suspect Screening and Non-targeted screening) pour étudier l'exposome chimique (Pourchet* et al.*, 2020)*

La recherche suspecte (SS) désigne la recherche de composés connus (« inconnus connus ») en termes de nom chimique et de structure. Cette approche, généralement appliquée à grande échelle, vise à produire des données semi-quantitatives pour mieux prioriser les composés à cibler par la suite, tout en permettant de caractériser des mélanges complexes. L'absence fréquente d'étalons analytiques limite toutefois la validation des méthodes et la confirmation définitive de l'identité des composés suspects. Cette approche peut être vue comme une extension des analyses multi-résidus, dans laquelle certains marqueurs peuvent être identifiés sans ambiguïté et éventuellement quantifiés selon une méthode ciblée, tandis que d'autres sont principalement mesurés de manière qualitative, grâce à l'utilisation de bibliothèques de référence (Pourchet *et al.*, 2020; Manz *et al.*, 2023).

La recherche non-ciblée (NTS) a pour but la détection de composés inconnus (« inconnus inconnus ») sans critère préalable, afin d'identifier de nouveaux marqueurs d'exposition ou d'intérêt toxicologique. Bien que les étapes de préparation et d'acquisition soient proches de celles du suspect screening, l'analyse des données diffère et constitue un défi majeur. Cette approche, nécessitant des capacités analytiques avancées est la plus prometteuse pour élargir la connaissance de l'exposome chimique humain et anticiper les risques sanitaires futurs, et les dispositions réglementaires et d'évaluation des risques qui en découlent, en passant d'une recherche guidée par hypothèse à une génération de données ouvrant de nouvelles hypothèses (Pourchet *et al.*, 2020; Manz *et al.*, 2023).

Concernant les PFAS, ces méthodes — suspecte et non-ciblée — ont permis de détecter de nombreuses structures non répertoriées (comme des anions, zwitterions, cations et composés neutres) dans des matrices complexes, notamment dans les mousses anti-incendie, connues pour

contenir une grande diversité de PFAS (Nakayama *et al.*, 2019). La majorité des recherches sur ces substances se focalisent principalement sur les milieux aquatiques, alors que les études concernant leur présence dans les denrées alimentaires restent encore relativement rares (**Figure 19**, page 69), malgré l'importance majeure de l'alimentation en tant que voie d'exposition pour l'être humain. Or, comme expliqué précédemment, dans la partie Recommandations européennes (page 75), les autorités sanitaires insistent sur l'urgence de renforcer les recherches concernant les PFAS émergents présents dans les aliments.

Pour répondre à cette nécessité, les analyses non ciblées ont permis d'identifier plus de 165 PFAS, répartis en quatre nouvelles classes chimiques, dans des échantillons de poissons prélevés à proximité de sites de production de fluoropolymères (Nakayama *et al.*, 2019). Ces résultats illustrent le rôle clé des techniques analytiques avancées pour élargir la surveillance de ces substances au-delà des composés réglementés. Ils mettent également en évidence l'ampleur encore sous-estimée de la contamination par les PFAS dans l'environnement, y compris dans les aliments, qui restent bien moins étudiés que les milieux environnementaux.

Dans ce contexte et pour répondre aux objectifs de ce travail, un état de l'art des méthodes multi-résidus et contaminants suspectes et non-ciblées, avec une attention particulière aux applications dédiées à la caractérisation des PFAS, est nécessaire. Afin de mieux comprendre les possibilités et les limites actuelles de l'analyse non ciblée et suspecte appliquée aux PFAS dans les denrées alimentaires, une recherche bibliographique a été menée. Celle-ci s'est concentrée dans un premier temps sur l'analyse des PFAS dans les aliments, en croisant les mots-clés *PFAS*, *food*, *non-target screening*, *suspect screening*, *egg* et *fish*, etc. Une partie des résultats obtenus est présentée dans le **Tableau 11** (page 324), en Annexes. Toutefois, le nombre d'études directement liées à la recherche suspecte ou non-ciblée de PFAS dans les aliments s'est révélé limité (n < 15 études). Par conséquent, la recherche a été élargie aux publications traitant de recherche SS ou NTS de PFAS dans d'autres matrices, notamment environnementales, où la littérature est beaucoup plus abondante (**Figure 19**, page 69). Durant ce projet, ces données ont également été compilées sous forme de tableau pour faciliter leur exploitation (**Tableau 11**, page 324). Dans un second temps, la recherche bibliographique a été élargie aux approches multi-résidus et contaminants, afin de couvrir une large gamme de composés chimiques présents dans les aliments.

Au cours de cette partie, les trois leviers clés du développement de méthodes SS et NTS — c'est-à-dire la préparation des échantillons, la méthode analytique et le traitement des données — seront présentés et discutés à travers cet état de l'art, en mettant l'accent sur les spécificités liées aux PFAS, aux pesticides et aux médicaments, substances émergentes, dans les matrices alimentaires.

4.2.1. Préparation d'échantillons

Le choix de la méthode de préparation d'échantillon est important durant le développement d'un protocole non-ciblé. À la différence d'une approche ciblée, où le développement vise à optimiser le rendement d'extraction pour un nombre prédéfini et limité de composés, la préparation d'échantillon en non-ciblé doit rester la plus exhaustive possible afin de maximiser l'extraction d'un large spectre de composés (connus et inconnus) avec une grande diversité de propriétés physico-chimiques constituant un défi important pour leur extraction, tout en réduisant les interférences venant de la matrice.

4.2.1.1. Cas particulier des PFAS

Concernant les PFAS, certains protocoles utilisés pour produire des extraits d'échantillons qui servent lors de la recherche ciblée sont également adaptés à l'analyse non-ciblée, ou avec des modifications mineures (Liu *et al.*, 2019). Ainsi, (Kaufmann *et al.*, 2022) ont extrait des échantillons de poissons grâce à une extraction par solvant puis une purification par cartouche SPE (Oasis WAX). De même, des poissons ont été extraits par solvant puis purifiés avec de la poudre Envi-Carb afin d'analyser des PFAS par méthode de recherche ciblée/non-ciblée (Crimmins *et al.*, 2014). De façon similaire, (Chu et Letcher, 2024) ont réalisé une extraction d'œufs et de foie d'ours polaire destinés à une recherche ciblée et non-ciblée. Ils ont séparé les extraits en deux fractions, l'une regroupant les PFAS neutres ou basiques et l'autre les PFAS acides, afin d'optimiser leur détection par analyses ciblées et non-ciblées. Ce fractionnement permet également de limiter les faux positifs en NTS, en vérifiant la cohérence entre la nature chimique attendue du composé et la fraction dans laquelle il a été détecté. Des poissons ont été extraits par solvant puis purifiés par SPE (WAX) pour rechercher la présence de PFAS *via* des approches SS et NTS (Liu *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2022).

Ces protocoles ont permis de mettre en évidence la présence de composés principalement par des approches suspectes, reposant sur la recherche dans des bases de données et identifiant principalement des composés dont les standards étaient disponibles. En revanche, peu de développements spécifiques en non-ciblé ont été réalisés, ce qui implique que certains PFAS émergents ou encore inconnus pourraient avoir été omis, en raison de limites liées à l'extraction ou aux outils utilisés pour leur détection.

Comme expliqué précédemment, la littérature concernant la recherche non-ciblée de PFAS dans les aliments est moins documentée que dans d'autres matrices comme les eaux, les décharges ou encore les échantillons humains, et en particulier au niveau des méthodes de préparation d'échantillons, justifiant pleinement les travaux de développement entrepris dans le cadre de ce doctorat.

4.2.1.2. Cas particulier des méthodes multi-résidus et contaminants

Comme présenté précédemment pour les PFAS, la préparation des échantillons est une étape essentielle en analyse non ciblée. Cet enjeu est encore plus marqué dans le cadre des analyses multi-résidus et multi-contaminants, où l'extraction doit permettre de récupérer des composés aux propriétés physico-chimiques extrêmement hétérogènes, bien au-delà de la seule famille des PFAS (Guo *et al.*, 2020). Ainsi pour développer une méthode multi-classes, il est important de comprendre les méthodes appliquées à chaque classe individuellement.

Les différentes techniques pour extraire les PFAS des matrices alimentaires ont été présentées ci-dessus.

L'extraction des pesticides dans les matrices alimentaires est généralement réalisée par différentes techniques telles que l'extraction Soxhlet, la PLE, SLE, la dispersion sur phase solide (MSPD) ou la méthode QuEChERS. Ces méthodes peuvent être suivies d'un nettoyage par SPE ou par d-SPE. Le choix de la méthode utilisée dépend notamment de la nature de la matrice (solide ou liquide) et des composés ciblés (Beyer et Biziuk, 2008; Martínez Vidal *et al.*, 2009; Aguilera-Luiz *et al.*, 2013). La méthode QuEChERS est l'une des plus couramment utilisée. Elle a servi à l'extraction de pesticides dans différents fruits et légumes (Lehotay *et al.*, 2010) ou encore dans des pêches en conserve et fraîches (Costa, Caldas et Primel, 2014). Initialement développée pour les matrices riches en eau (80 à 95 %) comme les fruits et légumes, cette méthode a ensuite été utilisée dans d'autres types d'échantillons, comme des aliments gras, pigmentés ou secs. Cette extension d'application requiert toutefois certaines optimisations du protocole afin de préserver ou d'optimiser ses performances (Santana-Mayor *et al.*, 2019). La revue bibliographique de (Wilkowska et Biziuk, 2011) regroupe différentes méthodes QuEChERS pour l'analyse de pesticides dans de nombreuses matrices alimentaires, comme les fruits et les légumes et des matrices alimentaires riches en matières grasses (lait, œufs, noix, maïs, soja, céréales, poissons, crustacés et autres fruits de mer, foie, volaille, porc, bœuf et avocats).

Les étapes d'extraction des médicaments vétérinaires, et plus globalement des produits pharmaceutiques, et de purification des extraits, dans les matrices alimentaires est généralement réalisée par SE (extraction par solvant), SPE et méthode QuEChERS, mais aussi par extraction par agitation mécanique, LLE, SLE, PLE, MSPD, UAE, ou encore micro-extraction en phase solide (SPME) (Aguilera-Luiz *et al.*, 2013; Berendsen *et al.*, 2013; Frenich, Romero-González et del Mar Aguilera-Luiz, 2014; Manimekalai *et al.*, 2019; Wang, Xie et Lee, 2021; Dai, Tang et Dai, 2025). Par exemple, une extraction par SLE suivie d'une purification par SPE a été utilisée pour l'analyse de 155 médicaments vétérinaires de 21 classes différentes dans des échantillons de volaille et de porc (Zhao *et al.*, 2021).

Une étude a comparé quatre techniques d'extraction (SE, SPE, MSPD, QuEChERS) pour l'analyse multi-classe de médicaments vétérinaires dans des œufs (Garrido Frenich *et al.*, 2010). Après avoir testé différentes conditions d'extraction (comme SPE, MSPD), la méthode d'extraction retenue était de type QuEChERS pour l'analyse de différents médicaments vétérinaires dans des crevettes (Villar-Pulido *et al.*, 2011). De plus, au-delà du développement d'un protocole d'extraction multi-résidus, capable de couvrir un large panel de substances – ici près de 100 médicaments vétérinaires –, l'étude de (Peters *et al.*, 2009) met en évidence la nécessité que ce protocole soit applicable à différentes matrices alimentaires. Pour cela, le protocole de préparation d'échantillon développé requiert une méthodologie générique, mais suffisamment robuste pour traiter des matrices complexes comme l'œuf, où une purification supplémentaire de l'extrait peut être nécessaire.

Dans le but d'extraire simultanément des composés présentant des propriétés physiques et chimiques différentes, les protocoles multi-résidus privilégient des procédures de préparation d'échantillons génériques afin d'obtenir des rendements satisfaisants pour tous les composés. Cependant, ces approches non sélectives entraînent l'extraction de nombreuses substances de matrice pouvant interférer avec la détection et réduire la sélectivité globale. Les méthodes génériques de préparation des échantillons les plus fréquemment rapportées sont l'extraction par solvant, l'extraction en phase solide (SPE) et l'approche QuEChERS (Berendsen *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2017; Hajeb *et al.*, 2022a; Lai *et al.*, 2024). La méthode privilégiée pour l'analyse des résidus et contaminants dans les denrées alimentaires est la procédure QuEChERS. Elle se distingue par sa grande adaptabilité, pouvant être modifiée selon les besoins, notamment par le choix du solvant d'extraction (acétonitrile, méthanol, acétate d'éthyle ou acétone), l'ajustement du pH du milieu d'extraction (neutre ou acide), l'ajout d'un modificateur de pH des phases mobiles (acide formique ou acétique) ou encore la sélection du sorbant (PSA, C_{18} etc) utilisé lors de l'étape de purification par d-SPE. Une autre approche générique, également utilisée, est la méthode dite *dilute-and-shoot*, qui consiste à ajouter un solvant organique à l'échantillon, l'agiter, puis l'injecter directement sans étape supplémentaire de préparation (Frenich, Romero-González et del Mar Aguilera-Luiz, 2014). Cependant, bien que la méthode *dilute-and-shoot* présente l'avantage d'être rapide, simple et de limiter les pertes potentielles de composés inconnus, elle comporte plusieurs limites majeures pour l'analyse non ciblée, en particulier dans le domaine alimentaire. En l'absence d'étapes de purification ou d'extraction, la matrice de l'échantillon reste inchangée, ce qui peut entraîner des effets de matrice significatifs sur les signaux MS ainsi qu'une dégradation des performances instrumentales (encrassement du cône d'échantillonnage, colmatage des colonnes chromatographiques, perte d'efficacité de séparation). De plus, cette approche essentiellement adaptée aux matrices simples (eau, urine) peut se révéler inappropriée pour les matrices complexes comme les denrées alimentaires, où la suppression des interférences est

essentielle pour obtenir des spectres MS² de qualité et assurer une interprétation fiable des données (Guo *et al.*, 2020). Les méthodes utilisées couramment sont celles présentées précédemment. Par exemple, (Aguilera-Luiz *et al.*, 2013) ont utilisé une extraction par solvant suivie d'une purification par SPE pour l'analyse de pesticides et de médicaments vétérinaires dans des aliments pour animaux. Au-delà des pesticides, des médicaments vétérinaires et composés pharmaceutiques, et des PFAS présentés précédemment, la méthode QuEChERS s'est révélée efficace pour l'extraction d'un large éventail d'autres familles de composés, qu'il s'agisse de contaminants alimentaires ou de composés d'origine naturelle. Elle a notamment été appliquée pour l'analyse des mycotoxines, polyphénols, régulateurs de croissance, hormones stéroïdiennes, retardateurs de flamme, HAP, PCB, diphényléthers polybromés (PBDE), alcaloïdes, toxines marines lipophiles, colorants ou encore des tensioactifs non ioniques (Santana-Mayor *et al.*, 2019). En effet, grâce à sa rapidité, sa fiabilité et son faible coût, la méthode QuEChERS a fait l'objet de nombreux travaux visant à adapter son protocole à une large gamme de contaminants et de matrices (Kim *et al.*, 2019). Plusieurs variantes ont alors été développées, comme la méthode QuEChUP (combinaison de QuEChERS et QuPPe) (Diallo *et al.*, 2023a) et la méthode QuEChERSER (*QuEChERS + efficient and robust*) (Taylor et Sapozhnikova, 2022). La méthode QuEChUP repose sur une double extraction à l'acétonitrile (ACN) puis au mélange ACN/méthanol, et a été développée et validée pour l'analyse de 850 pesticides et de médicaments vétérinaires dans les produits de la mer (Diallo *et al.*, 2023a). La méthode QuEChERSER, initialement élaborée pour l'analyse de plus de 300 pesticides, de médicaments vétérinaires et de contaminants environnementaux dans le poisson et la viande, a ensuite été étendue à la détection de 33 PFAS dans le bœuf, le poisson-chat, le poulet, le porc et les œufs (Taylor et Sapozhnikova, 2022).

Dans certains cas, deux extractions distinctes sont effectuées afin de permettre à la fois une analyse LC-HRMS et GC-HRMS, maximisant ainsi la couverture du spectre des composés extractibles et analysables, comme l'illustre en (Dürig *et al.*, 2023) en appliquant des méthodes de recherche suspecte et non-ciblée aux poissons.

4.2.2. Méthodes d'analyse

Les approches non-ciblées visent à détecter simultanément un large éventail de composés, connus ou inconnus, sans être restreintes par une liste prédéfinie et limitée, ce qui est essentiel pour découvrir de nouveaux composés. La LC-HRMS s'avère particulièrement adaptée à cet objectif, car sa haute résolution permet l'obtention de masse moléculaire précise, et donc une identification fiable des formules moléculaires et une distinction fine entre composés proches, contrairement aux méthodes MS/MS ciblées qui par définition ne permettent de suivre que certains ions ou transitions définis au préalable. La séparation chromatographique peut être également optimisée pour séparer un

maximum de composés, par exemple en utilisant un gradient étendu, assurant une meilleure résolution des analytes, même dans des matrices complexes. Cette combinaison d'une séparation chromatographique efficace et d'une détection HRMS répond pleinement aux exigences d'une approche non ciblée.

Pour étendre la connaissance de l'exposome chimique alimentaire, après une étape initiale de préparation d'échantillon souvent non sélective, il est essentiel de disposer d'une méthode analytique également non sélective afin d'acquérir un maximum de données et de détecter le plus grand nombre possible de composés en un seul passage analytique (Lai *et al.*, 2024).

- La séparation chromatographique

Pour ce faire, une séparation chromatographique efficace avant la détection en spectrométrie de masse est essentielle. Contrairement aux modes d'injection directe, la chromatographie permet d'introduire progressivement les analytes dans le spectromètre de masse, réduisant ainsi la suppression ionique et l'encrassement de la source. Pour l'analyse de différentes classes de résidus et de contaminants mais également pour les analyses non-ciblées, la chromatographie en phase inverse, notamment sur colonnes C_{18}, est la plus couramment utilisée (Gilbert-López *et al.*, 2010; Villar-Pulido *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2017; Cladière *et al.*, 2018). D'autres phases stationnaires, telles que le C8, le pentafluorophényle (PFP) ou la HILIC, émergent comme alternatives intéressantes pour améliorer la rétention des composés polaires ou offrir une sélectivité unique vis-à-vis d'isomères (Fu *et al.*, 2017; Manz *et al.*, 2023; Lai *et al.*, 2024).

- Les méthodes d'ionisation

La GC et la LC sont complémentaires pour couvrir l'espace chimique de l'exposome, chacune étant associée à des techniques d'ionisation spécifiques. En GC, l'ionisation par impact électronique (EI) reste la plus courante et permet l'analyse de composés non polaires, volatils ou semi-volatils, et thermostables. D'autres approches basées sur l'ionisation à pression atmosphérique (API) — incluant l'APCI ou l'APPI — mais également l'ionisation chimique (CI) élargissent encore le champ d'analyse accessible en GC. En LC, l'ESI est la méthode la plus utilisée, car elle permet l'analyse de composés non volatils, polaires ou hydrophiles, et thermiquement instables, tels que les pesticides, les médicaments (licites ou illicites) et les mycotoxines. En analyse non ciblée par LC-HRMS, l'ESI est fréquemment exploitée dans les deux modes de polarité (ESI+ et ESI−), offrant une large couverture chimique. Dans certains cas, l'APCI peut compléter l'ESI en réduisant le bruit de fond et en accédant à des zones chimiques moins couvertes, les deux techniques étant ainsi complémentaires (Manz *et al.*, 2023; Lai *et*

al., 2024). Une étude des différents types d'ionisation utilisés dans les études suspectes et non-ciblées a relevé la large utilisation de l'ESI en LC-HRMS (**Figure 21**) (Manz *et al.*, 2023).

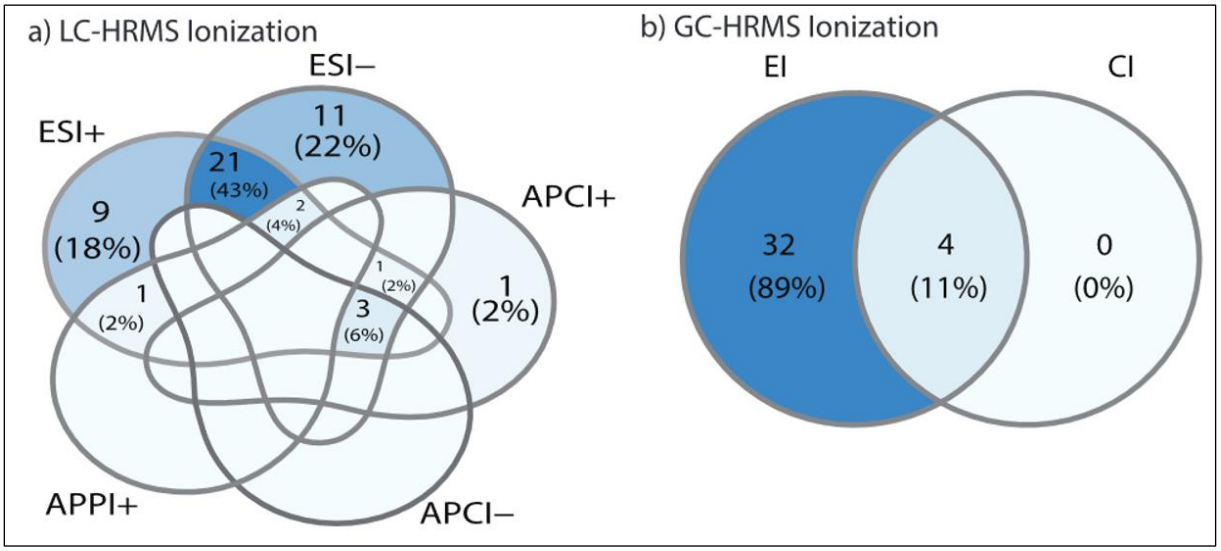


Figure 21. *Illustration des types d'ionisation utilisés dans les études non-ciblées en LC et GC-HRMS (Manz* et al.*, 2023)*

La combinaison de la LC ou de la GC avec la HRMS s'est imposée comme un pilier des analyses suspectes et non ciblées. Ces techniques permettent de séparer et de détecter un large spectre de molécules, qu'elles soient polaires, non polaires, volatiles ou thermiquement instables, et offrent ainsi une couverture chimique étendue adaptée à l'étude de l'exposome alimentaire. La LC-HRMS est particulièrement polyvalente pour les composés polaires et thermosensibles, tandis que la GC-HRMS excelle pour les analytes volatils et stables à la chaleur, les deux approches étant complémentaires. Une technologie plus récente, la spectrométrie de mobilité ionique (IMS), peut être intégrée aux systèmes LC/GC-HRMS pour ajouter une dimension de séparation basée sur la taille, la forme et l'état de charge des ions dans la phase gazeuse, calculant ainsi leur section efficace de collision (CCS). Par exemple, son intégration à des approches LC-MS a permis de distinguer rapidement (en millisecondes) des isomères de PFAS, surpassant les temps d'analyse des méthodes LC-MS conventionnelles et apportant des informations structurales précieuses pour la caractérisation d'espèces émergentes (Ogunbiyi *et al.*, 2023). L'IMS présente un intérêt majeur pour l'étude de l'exposome car il permet d'élargir la couverture moléculaire des échantillons et, grâce aux valeurs de CCS précises (mesurées ou prédites), d'améliorer l'identification des composés en complément de la masse exacte et des spectres MS/MS (Metz *et al.*, 2017). Bien que prometteuse pour aider à l'identification de composés complexes et réduire les interférences, l'IMS reste aujourd'hui moins répandue et plus exploratoire. Ainsi, pour étendre la connaissance de l'exposome chimique alimentaire, les approches LC-HRMS et GC-HRMS sont les plus utilisées (Manz *et al.*, 2023; Lai *et al.*, 2024; Szabo *et al.*, 2024).

- L'acquisition des données MS^1

Dans un premier temps, en HRMS, le mode full scan consiste à acquérir de manière continue les rapports masse/charge (*m/z*) sur une plage définie, avec une fréquence et une résolution déterminées par les caractéristiques de l'instrument. La résolution reflète la capacité à séparer deux pics voisins dans un spectre, ce qui est essentiel pour distinguer des ions isobares et détecter des analytes minoritaires souvent masqués à basse résolution. Un gain en résolution permet donc d'observer des composés rares mais complexifie les spectres obtenus, rendant nécessaires des stratégies de priorisation pour étudier les signaux pertinents. Les données MS^1 fournissent des informations précises sur la masse exacte, les motifs isotopiques et les temps de rétention, permettant de déduire la composition élémentaire, d'identifier des homologues et de filtrer des milliers de signaux afin de cibler les candidats les plus probables. En effet, contrairement aux méthodes ciblées dans lesquels l'acquisition MS^1 est sélective (seuls les ions d'intérêt, correspondant à des structures connues ou à des sous-structures diagnostiques, sont préalablement définis et suivis), les approches non ciblées réalisent un profilage MS^1 global, sans restriction aux ions précurseurs prédéfinis, générant ainsi un ensemble de données beaucoup plus large. Les deux approches permettent d'obtenir des informations qualitatives (présence d'un analyte pour confirmation ou dépistage) et/ou quantitatives (absolues ou semi-quantitatives), mais les méthodes non ciblées offrent l'avantage supplémentaire de détecter et d'annoter des analytes qui n'avaient pas été identifiés *a priori* (Lai *et al.*, 2024). Cependant, l'identification structurale exige des données complémentaires issues de la fragmentation en MS^2, qui génère des spectres informatifs sur la structure moléculaire (Liu *et al.*, 2019; Bugsel, Zweigle et Zwiener, 2023).

- L'acquisition des données MS^2

L'acquisition simultanée de données MS^1 et MS^2 en HRMS permet d'obtenir des spectres de fragmentation riches, essentiels à l'élucidation structurale. Ensuite, pour obtenir les spectres MS^2, deux stratégies de fragmentation sont principalement utilisées : l'acquisition dépendante des données (*data-dependent acquisition*, DDA) et l'acquisition indépendante des données (*data-independent acquisition*, DIA).

En mode DDA, le spectromètre effectue d'abord un balayage MS^1 complet afin de mesurer les rapports masse/charge (*m/z*) de tous les ions présents, puis sélectionne automatiquement, selon des critères prédéfinis (intensité de pic, plage *m/z*), un nombre limité de précurseurs les plus abondants pour une fragmentation MS^2 (par exemple, le *top n*). Cette méthode permet d'obtenir des spectres MS^2 de haute qualité, avec un rapport signal/bruit optimisé, ce qui facilite l'interprétation des fragments. Cependant,

elle est orientée vers les ions majoritaires, ce qui limite la détection de composés présents à faibles concentrations dans des matrices complexes. Les effets de suppression d'ionisation, dus à la co-élution de composés de la matrice, peuvent également empêcher la sélection de certains précurseurs. Des approches complémentaires, comme l'exclusion dynamique ou les workflows en deux injections — la première servant à repérer les précurseurs d'intérêt, puis la seconde à les fragmenter spécifiquement — permettent d'augmenter le taux de fragmentation ciblée, mais engendrent un temps d'analyse et de traitement des données plus longs.

En mode DIA, tous les ions présents dans une plage *m/z* prédéfinie sont systématiquement fragmentés en MS^2, sans étape préalable de sélection des précurseurs par le quadrupole. Cette approche exhaustive augmente significativement la probabilité de détecter des composés minoritaires, ce qui la rend particulièrement adaptée aux analyses non ciblées et à la découverte de nouveaux PFAS. Parmi ses variantes, on retrouve le SWATH (*Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment-Ion Spectra*, Sciex), où le spectre est acquis sur plusieurs fenêtres *m/z* plus étroites, améliorant ainsi la sensibilité et la spécificité, l'All Ions MS/MS et *All Ion Fragmentation* (AIF), qui fragmentent simultanément l'intégralité de la gamme *m/z* sans pré-sélection, permettant une recherche rapide des PFAS inconnus, ou encore le MSe (Waters), qui alterne deux canaux d'énergie de collision : un canal basse énergie générant un spectre TOF standard et un canal haute énergie produisant un ensemble riche de fragments. La technique TOF-MSe permet l'acquisition simultanée de spectres complets des ions parents et fragments en une seule analyse.

Les acquisitions en mode DDA et DIA, au cœur des processus de priorisation des signaux, constituent les stratégies centrales pour l'obtention de spectre MS^2, durant les analyses suspectes et non ciblées en HRMS pour l'étude de l'exposome (Guo *et al.*, 2020; Szabo *et al.*, 2024). Les cinq techniques de priorisation en ligne utilisées en DDA sont : (1) Top N, (2) listes d'inclusion/exclusion, (3) abondance isotopique, (4) formation d'adduits, et (5) déclenchement MS^2 à basse résolution. Lors d'analyses de SS ou NTS, la stratégie la plus simple et la plus répandue est la sélection « Top N », qui consiste à choisir pour l'analyse MS^2 les N pics MS^1 les plus abondants d'un scan unique, dépassant un seuil d'intensité donné. La plupart des instruments HRMS permettent également de déclencher les analyses MS^2 en utilisant une liste d'inclusion contenant des valeurs *m/z* prédéfinies, qui peut être établie à partir d'une liste de priorisation (Szabo *et al.*, 2024).

- Les systèmes HRMS

Les systèmes HRMS modernes utilisent souvent une configuration hybride en couplant un filtre de masse rapide, sélectif et à faible résolution comme le quadripôle (Q) (pour la sélection des précurseurs,

si nécessaire) de manière séquentielle à un détecteur de masse sensible et précis (par exemple, Orbitrap) pour permettre des modes d'acquisition de données flexibles (Lai *et al.*, 2024). Ces systèmes Q-HRMS intègrent désormais diverses déclinaisons de ces approches, adaptées aux objectifs de couverture chimique et de reproductibilité. Ainsi, les méthodes DIA sont disponibles sur une large gamme d'instruments, allant de MS^e (Waters Q-ToF) et AIF (Agilent Q-ToF) à SWATH (Sciex TripleTOF), DIA (Thermo Q-Orbitrap) et dia-PASEF (short for *parallel accumulation serial fragmentation*, Bruker timsTOF). Ces évolutions permettent d'optimiser la sensibilité et la vitesse d'acquisition, tout en élargissant la couverture analytique, renforçant ainsi l'efficacité des recherches non ciblées (Aguilera-Luiz *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2024).

Les instruments HRMS récents, tels que l'Orbitrap Tribrid et le Q-Orbitrap Astral (Thermo Fisher Scientific), le ZenoTOF (Sciex) et le timsTOF (Bruker), associent des analyseurs de masse avancés pour améliorer les analyses ciblées et non ciblées. L'Orbitrap Tribrid combine un quadripôle, un Orbitrap et un piège ionique linéaire, permettant une détection parallèle et l'utilisation de modes de fragmentation multiples pour une identification précise des composés inconnus.
Le ZenoTOF augmente la sensibilité des Q-ToF grâce à un piège Zeno, prend en charge diverses techniques de fragmentation et offre une acquisition rapide pour élargir la couverture chimique.
Le timsTOF associe l'IMS à une HRMS, offrant une séparation orthogonale, une meilleure spécificité et une sensibilité maximale (Lai *et al.*, 2024).

Les instruments HRMS couramment utilisés lors d'analyses non-ciblées sont les QTOF ou les Orbitrap, qui offrent une précision de mesure importante (< ± 0,001 *m/z*), une haute sensibilité spectrale et une résolution de masse élevée, permettant la détermination simultanée des masses exactes des ions précurseurs et de leurs fragments, ainsi que des motifs isotopiques.

Ces approches non-ciblées permettent d'augmenter l'espace chimique, défini comme l'ensemble de toutes les molécules possibles (théoriquement ou empiriquement) (Kaufmann, 2012; Fu *et al.*, 2017). Cependant, avec l'acquisition de nombreuses données non-spécifiques, l'utilisation de traitements informatiques adaptés est nécessaire pour réussir à exploiter ces données. De plus, la constitution de bibliothèques numériques basées sur ces données (MS^2) facilite les analyses rétrospectives et l'identification de composés non ciblés (Koloka *et al.*, 2025).

4.2.2.1. Cas particulier de l'analyse des PFAS

Si la préparation des échantillons pour l'analyse des PFAS dépend de la matrice étudiée, en revanche, une fois l'extrait obtenu, différentes méthodes peuvent être utilisées pour l'acquisition et le traitement

des données en analyse non ciblée de PFAS, y compris pour d'autres types de matrices. Dans la perspective de développer une méthode de détection la plus performante possible, et compte tenu du fait que la recherche non ciblée de PFAS a été davantage appliquée aux matrices environnementales qu'aux matrices alimentaires, cet état de l'art présente un panorama des approches analytiques suspectes et non ciblées pour l'étude de ces composés fluorés.

- Les stratégies analytiques non-ciblées pour l'étude des PFAS

Ces stratégies couvrent un spectre allant des méthodes globales, destinées à quantifier toutes les formes de fluor, aux méthodes suspectes et non-ciblées visant l'identification de PFAS spécifiques. Pour répondre au défi posé par la diversité physico-chimiques (comme la masse moléculaire entre 114 et 1050 g/mol, ou les log P compris entre 0,9 et 10,7 (Fabregat-Palau *et al.*, 2025)) et le nombre croissant de PFAS (plus de 7 millions (Schymanski *et al.*, 2023)), des approches non spécifiques ont été développées afin de quantifier toutes les formes de fluor, qu'elles soient inorganiques ou organiques, extractibles ou non (**Figure 22**).

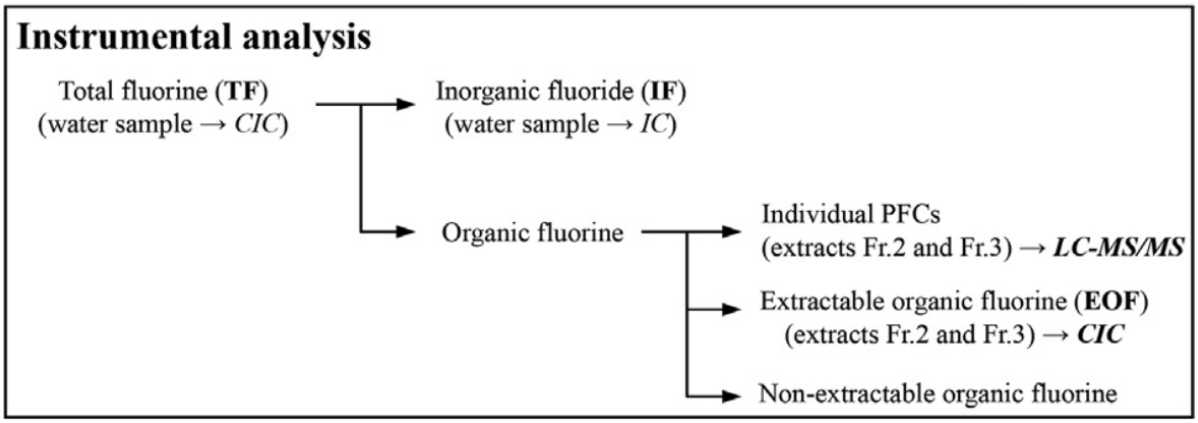


Figure 22. *Aperçu de l'analyse instrumentale des composants fluor total (TF), fluorure inorganique (IF), fluor organique extractible (EOF), et des PFAS neutres (Fr.2) et anioniques (Fr.3) connus dans l'eau en utilisant la chromatographie ionique (IC), la chromatographie ionique à combustion (CIC) et chromatographie en phase liquide spectrométrie de masse quadrupolaire triple (LC-MS/MS), respectivement (Ruan et Jiang, 2017)*

Parmi celles-ci, la chromatographie ionique après combustion (CIC) est largement utilisée pour déterminer le fluor total (TF). Le fluor organique extractible (EOF) ou adsorbable (AOF) sont utilisés avec la CIC pour l'analyse de l'eau, des sédiments, des échantillons biologiques et, plus récemment, des produits de consommation tels que les cosmétiques. L'EOF regroupe non seulement les PFAS connus, mais aussi d'autres composés organofluorés pouvant être extraits par des solvants organiques (Ruan et Jiang, 2017; Liu *et al.*, 2019; Nakayama *et al.*, 2019; De Silva *et al.*, 2021). D'autres techniques incluent la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du fluor-19 (^{19}F RMN), la spectroscopie

par émission gamma induite par particules (PIGE), l'analyse par absorption moléculaire à source continue (CS-MAS), la spectrométrie de masse à plasma inductif couplé en tandem (ICP-MS/MS), l'analyse par activation neutronique instrumentale (INAA) ou encore la spectroscopie de photoélectrons X (XPS) (McDonough, Guelfo et Higgins, 2019; De Silva *et al.*, 2021; Eze *et al.*, 2024). La spectroscopie PIGE et la RMN du ^{19}F constituent des approches non destructives et non spécifiques prometteuses, mais leur utilisation reste encore très peu documentée dans la littérature scientifique (McDonough, Guelfo et Higgins, 2019; Nakayama *et al.*, 2019; De Silva *et al.*, 2021).

La LC-HRMS a récemment permis des avancées dans l'identification des PFAS ioniques semi-volatils, cependant, la connaissance de nouveaux types de PFAS neutres et volatils reste limitée, en partie en raison d'un usage encore restreint de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la HRMS pour l'analyse non ciblée (Pan *et al.*, 2020). La GC est parfois utilisée pour explorer certains produits de décomposition thermique. Par ailleurs, la séparation basée sur la mobilité ionique, intégrée dans certains instruments HRMS, offre une autre dimension de séparation utile pour différencier isobares et isomères, et peut être couplée à la LC pour renforcer la sélectivité (Ruan et Jiang, 2017; Liu *et al.*, 2019). L'IMS peut être utilisée lors de recherches suspecte et non-ciblées afin d'améliorer les analyses PFAS (Winchell *et al.*, 2021; Ogunbiyi *et al.*, 2023).

- <u>Analyse non-ciblée des PFAS par LC-HRMS</u>

Parmi toutes ces techniques, l'utilisation de la LC-HRMS est la plus communément utilisée, permettant l'identification de PFAS émergents ou inconnus sans les standards analytiques correspondants (Knolhoff et Fisher, 2021). Ces méthodes ouvrent ainsi la voie à une vision plus exhaustive de la contamination dans diverses matrices environnementales (eau, sédiments, sols, particules atmosphériques) et biologiques (Knolhoff et Fisher, 2021; Ogunbiyi *et al.*, 2023; Koloka *et al.*, 2025).

Ainsi, la combinaison de la LC et de la HRMS constitue aujourd'hui la stratégie la plus performante pour la découverte et la caractérisation d'un panel étendu de PFAS, dépassant les contraintes des méthodes ciblées tout en garantissant une qualité analytique élevée. De nombreuses revues bibliographiques rassemblent et comparent ces approches analytiques, offrant une vision d'ensemble des stratégies de criblage non ciblé et de l'utilisation de la HRMS pour la priorisation, l'identification et la caractérisation des PFAS dans divers échantillons environnementaux et biologiques (Ruan et Jiang, 2017; Liu *et al.*, 2019; Bugsel, Zweigle et Zwiener, 2023; Steeves, Cahill et Jobst, 2024). Ces stratégies sont applicables pour guider le développement de méthodes analytiques appliquées aux échantillons alimentaires.

Pour la séparation chromatographique des PFAS, la phase C_{18} est la plus couramment utilisée en raison de sa capacité à interagir efficacement avec les chaînes perfluorées. Dans le cadre d'une approche non ciblée, le gradient est généralement étendu par rapport aux méthodes ciblées, permettant ainsi une séparation plus fine entre les analytes et une meilleure résolution des composés présents dans des matrices complexes. Cette optimisation permet une identification plus fiable et un recouvrement plus important des PFAS, connus ou émergents. Par exemple, (Wang *et al.*, 2022) ont analysé des PFAS *via* une approche ciblée avec un gradient de 8 min en utilisant une LC-MS/MS (QQQ), et *via* une approche non-ciblée avec un gradient de 26 min en utilisant une LC-HRMS (QTOF-MS).

Concernant les méthodes d'ionisation, l'électrospray (ESI) constitue l'interface LC-MS la plus couramment utilisée pour générer les masses monoisotopiques des PFAS ioniques, tandis que l'ionisation par photoionisation à pression atmosphérique (APPI) représente une alternative adaptée aux analytes neutres tels que les FTOH et les FASA (*Perfluoroalkyl sulfonamide)*. D'autres approches plus spécifiques, comme le bombardement rapide d'atomes (FAB), permettent une ionisation directe sans préparation ni séparation chromatographique. Cette technique repose sur la collision d'un flux d'atomes à haute énergie cinétique, issus de l'ionisation du xénon, avec un mélange d'échantillon et de matrice (3-nitrobenzyl alcool), produisant des ions $[M\text{-}H]^-$ de PFAS en mode négatif. Le FAB se distingue par sa rapidité et sa simplicité pour le criblage élémentaire de formulations contenant des tensioactifs fluorés ou d'eaux souterraines contaminées par les mousses filmogènes aqueuses (AFFFs). Toutefois, sa faible sensibilité instrumentale limite son emploi pour les matrices environnementales où les PFAS sont présents à l'état de traces. La majorité des études, menées en mode électrospray négatif, ont permis d'identifier de nouveaux PFAS anioniques, tandis que l'utilisation complémentaire du mode positif dans l'analyse des AFFFs et de produits commerciaux contenant des PFAS a également conduit à la mise en évidence de PFAS cationiques et zwitterioniques.

Les modes DDA et DIA sont principalement utilisés comme stratégies de fragmentation lors d'analyses non-ciblées de PFAS (Ruan et Jiang, 2017; Liu *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020; Bugsel, Zweigle et Zwiener, 2023; Ogunbiyi *et al.*, 2023; Szabo *et al.*, 2024). L'acquisition DIA peut également se faire avec plusieurs énergies de collision, générant ainsi des spectres MS^2 plus riches, qui contiennent des fragments provenant de différentes parties de la molécule, ce qui facilite l'élucidation structurale et permet la construction de bases de données rétrospectives. Cependant, en raison de la fragmentation simultanée de tous les ions co-éluants, les spectres obtenus peuvent être complexes, rendant l'élucidation structurale plus difficile. Malgré cela, la capacité de conserver simultanément l'information sur les ions précurseurs et les ions produits en fait une méthode de choix pour la détection à la fois ciblée, suspecte et non-ciblée, qu'il s'agisse de PFAS anioniques, cationiques, neutres

ou zwitterioniques, dans des matrices environnementales ou biologiques variées. L'optimisation de l'acquisition MS^2 est ainsi un élément clé pour assurer une identification fiable des PFAS dans les workflows d'analyse non ciblée.

L'approche innovante de recherche d'ions parents à haute résolution (HRPIS - *high-resolution parent-ion search*) a ainsi conduit à l'identification rapide et précise de 47 nouveaux PFAS ainsi que 43 PFAS rarement rapportés, incluant 40 non ioniques, 30 cationiques, 15 zwitterioniques et 5 anioniques, dans des tensioactifs commerciaux (Nakayama *et al.*, 2019). Concernant les applications non ciblées pour l'analyse des PFAS dans l'alimentation, une méthode HRMS en mode full-scan a été mise au point à l'aide d'un système QToF-MS fonctionnant en mode MSe, avec une source ESI en mode négatif, dans des poissons (Baygi *et al.*, 2021). Une méthode dérivée, appelée *in-source fragmentation* (ISF) *flagging*, repose sur la production de fragments directement dans la source du spectromètre afin de détecter des ions diagnostiques spécifiques aux PFAS. Cette stratégie, appliquée en deux injections — la première pour repérer les candidats potentiels *via* les fragments caractéristiques et la seconde pour confirmer leur identité par MS/MS — a permis, lors d'analyses *via* un Orbitrap d'eaux usées, de foie de poisson et de sérum, de révéler respectivement 5, 10 et 4 classes de PFAS jusque-là inconnues.

4.2.2.2. Cas particulier des méthodes multi-résidus et contaminants

Grâce aux avancées récentes dans les instruments analytiques, il est désormais possible d'analyser simultanément de nombreux composés appartenant à différentes classes chimiques, aux propriétés physico-chimiques très variées, facilitant ainsi le développement de méthodes d'analyse multi-classes (Frenich, Romero-González et del Mar Aguilera-Luiz, 2014). Ces méthodes, initialement développées à l'aide de familles physico-chimiques variées (pesticides, médicaments vétérinaires, etc), peuvent ensuite être appliquées dans le cadre d'analyses suspectes et non-ciblées.

Historiquement, les méthodes multi-résidus reposaient sur la GC ou la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplées à la spectrométrie de masse pour la détermination de résidus et contaminants organiques. Au cours de la dernière décennie, la HPLC s'est imposée comme la technique de choix, en particulier pour l'analyse de pesticides polaires, peu volatils ou thermiquement instables, qui nécessitent une dérivatisation préalable pour une analyse par GC, mais également pour la détermination simultanée de nombreux résidus et contaminants industriels ou naturels (médicaments, PFAS, mycotoxines etc) dans les matrices alimentaires (Martínez Vidal *et al.*, 2009; Frenich, Romero-González et del Mar Aguilera-Luiz, 2014; Manimekalai *et al.*, 2019; Wang, Xie et Lee, 2021; Manz *et al.*, 2023).

L'association de la chromatographie liquide à ultra-haute performance (UHPLC) avec la HRMS a ainsi démontré son efficacité pour l'analyse simultanée de différentes classes de résidus et contaminants dans les aliments et les matrices environnementales (Aguilera-Luiz *et al.*, 2013; Frenich, Romero-González et del Mar Aguilera-Luiz, 2014; Lai *et al.*, 2024). Les systèmes UHPLC–QqTOF–MS et UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS sont couramment utilisés pour des analyses mutli-classes — incluant des pesticides, des médicaments vétérinaires, des PFAS, des mycotoxines, des composés industriels — dans des diverses matrices alimentaires, comme des aliments pour animaux, des viandes, des œufs, ou des poissons (Peters *et al.*, 2009; Aguilera-Luiz *et al.*, 2013; Cladière *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2021; Taylor et Sapozhnikova, 2022). Le développement de ces approches non ciblées ouvre la voie à la découverte de nouveaux composés et à l'élargissement de notre compréhension des expositions alimentaires (Berendsen *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2024).

4.2.3. Traitement des données

Après une extraction visant à maximiser la récupération des composés, l'acquisition des nombreuses données associées, l'identification des composés potentiels à partir de spectres MS^1 et MS^2, sans information *a priori*, s'avère particulièrement complexe, notamment à faible concentration, constituant ainsi l'étape la plus critique de l'analyse non ciblée. Pour faciliter cette étape, différentes techniques de réduction et de filtrage des données sont utilisées, telles que la suppression des signaux de fond, l'application de seuils d'intensité et le regroupement selon les isotopes stables ou les adduits. Ces étapes nécessitent donc des outils informatiques spécifiques pour le traitement des données afin d'identifier les substances chimiques inconnues ou suspectées dans l'exposome. Ces étapes sont indispensables pour produire des données de qualité, condition préalable à l'obtention de résultats statistiques robustes. Les principales étapes de ce processus, *via* la détection des *features* et l'annotation des composés, sont présentées dans la **Figure 23**.

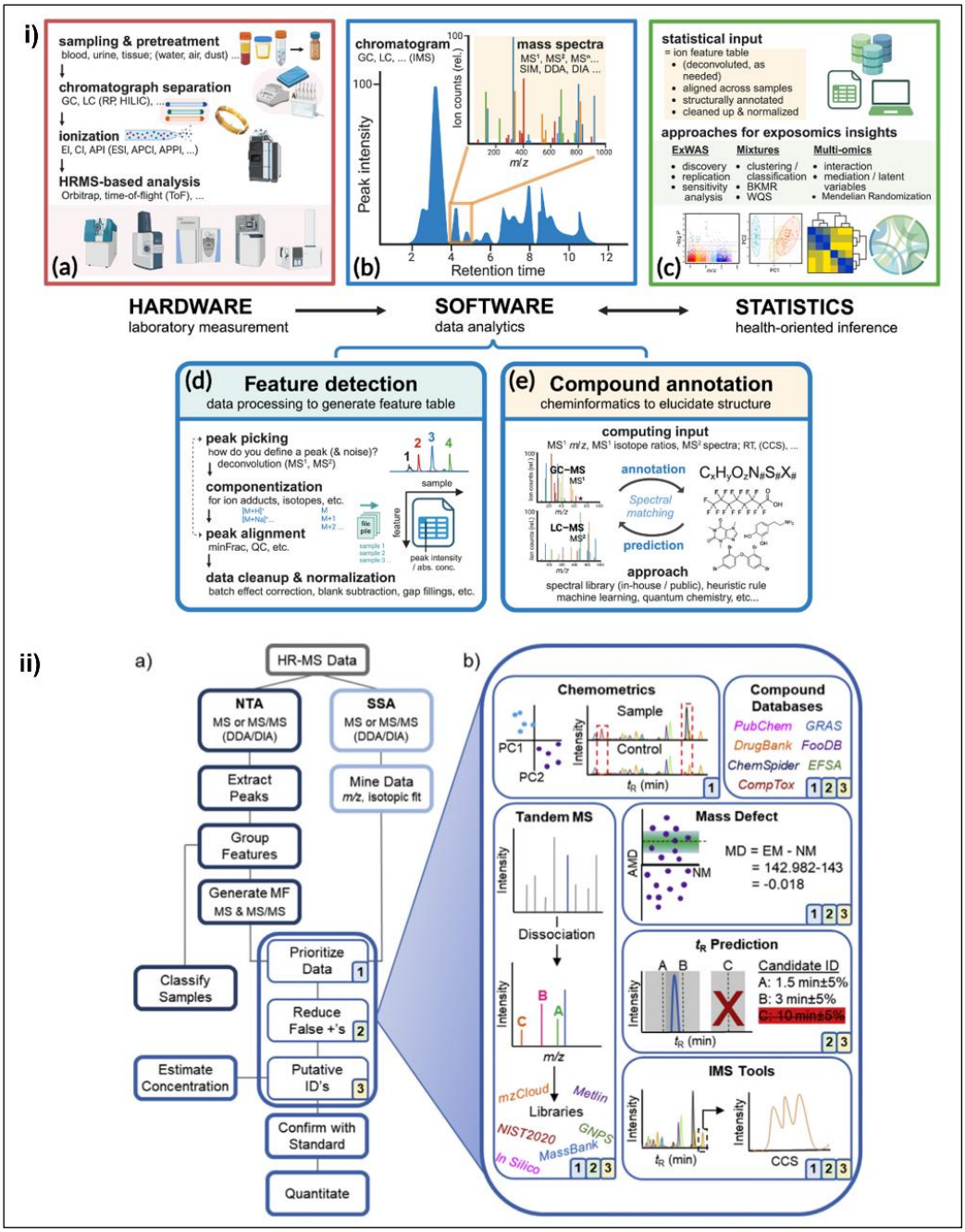


Figure 23. *Étapes essentielles pour élargir la couverture analytique grâce à l'exposomique basée sur la HRMS par i) (Lai* et al.*, 2024) et ii) (Fisher, Croley et Knolhoff, 2021)*

Tout d'abord, l'extraction des *features* (détection, intégration, alignement des pics) constitue la première étape clé du traitement informatique des données HRMS, permettant de transformer les signaux bruts en un format tabulaire exploitable pour les analyses statistiques et bio-informatiques. Ce processus inclut successivement le *peak picking*, l'alignement des pics, puis les étapes de nettoyage (par filtrage du bruit, soustraction du fond, etc) et de normalisation des données afin d'assurer la comparabilité et la qualité des jeux de données. Dans certains cas, l'utilisation d'échantillons blancs (solvant ou extraction) permet de corriger les interférences analytiques ; un rapport intensité échantillon/blanc peut alors servir de critère pour éliminer les ions non informatifs (Fu *et al.*, 2017; Lai

et al., 2024). Par exemple, cette étape est illustrée dans la **Figure 23**, schéma (i) lors de l'étape (d) *Feature detection* (Lai *et al.*, 2024).

L'étape suivante consiste en l'annotation, *via* parfois la prédiction, qui vise à relier les données spectrales à une structure moléculaire probable. En combinant plusieurs informations issues de l'analyse en couplage chromatographie-HRMS (temps de rétention chromatographique, masse exacte, motifs isotopiques, adduits, fragments MS/MS, etc.), il devient possible de réduire progressivement le champ des molécules candidates. Cette étape est illustrée dans la **Figure 23**, dans le premier schéma (i) par (Lai *et al.*, 2024) lors de l'étape (e) *Compound annotation*. Ainsi, pour prioriser les *features* d'intérêt dans de grands jeux de données HRMS en analyse non ciblée, (Fisher, Croley et Knolhoff, 2021) présentent différentes stratégies efficaces et les plus communément utilisées. Le calcul du défaut de masse (MD) fait du *mass defect filtering* (MDF) une approche efficace (**Figure 23**, dans le second schéma (ii)). En se basant sur la différence entre masse exacte et masse nominale, le MDF permet de repérer des classes de composés avec des signatures caractéristiques et d'éliminer le bruit ou les composés endogènes (Fu *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2020; Lai *et al.*, 2024).

Pour réaliser ces étapes essentielles et complexes de traitement des données en NTS et en SS, l'utilisation de logiciels spécialisés permettant d'extraire, de prioriser et d'annoter les *features* détectés par HRMS est recommandée. Parmi les logiciels les plus couramment utilisés figurent des solutions *open-source* et largement adoptées dans la communauté scientifique, telles que MZmine**,** XCMS**,** MS-DIAL ou enviMass, mais également des logiciels liés aux constructeurs d'instruments, comme Compound Discoverer (CD) (Thermo Fisher), MassHunter (Agilent) ou MarkerView (Sciex). Si les solutions commerciales sont souvent privilégiées, notamment pour leur interopérabilité avec les plateformes analytiques correspondantes, leur utilisation limite la reproductibilité et l'uniformisation des pratiques entre laboratoires. À l'inverse, les logiciels *open-source* favorisent la transparence et l'échange, mais restent encore minoritaires dans les études, révélant ainsi un besoin d'outils accessibles et standardisés pour une véritable approche NTS (Fu *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2020; Manz *et al.*, 2023).

Une fois les *features* priorisées, par l'approche suspecte, ces outils comparent les masses exactes des ions détectés lors du scan complet de la spectrométrie de masse avec celles des composés figurant dans une liste suspecte, en respectant une tolérance de masse prédéfinie. De plus, celles-ci sont comparées aux spectres MS/MS disponibles dans des bibliothèques spécialisées telles que MassBank, HMDB, METLIN, ChemSpider ou mzCloud. Ces ressources offrent un large éventail de données sur les masses exactes, formules moléculaires, structures et parfois les spectres MS^2, bien qu'elles ne soient pas exhaustives et nécessitent parfois une recherche croisée entre plusieurs bases pour maximiser la

couverture. Afin d'améliorer la précision de l'identification, des outils de prédiction de fragmentation comme MetFrag, MolFind, ACD/MS Fragmenter ou MassFrontier peuvent simuler les ions fragments des composés candidats et permettre leur comparaison avec les données expérimentales. Cependant, la confirmation définitive requiert l'analyse de standards chimiques. Outre les bases de données en ligne, des bibliothèques internes peuvent être constituées pour cibler des substances d'intérêt spécifiques, offrant une pertinence accrue par rapport aux bases partagées. La recherche suspecte bénéficie ainsi d'une couverture analytique étendue et d'un niveau de confiance élevé, mais reste tributaire des variations instrumentales, des paramètres expérimentaux et des conditions d'acquisition, ce qui impose des ajustements soigneux lors de l'application de bases de données publiques (Fu *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2020; Lai *et al.*, 2024).

Les bibliothèques spectrales, qu'elles soient communautaires ou internes, ne couvrent que les produits chimiques connus, laissant de côté de nombreux contaminants émergents et métabolites inconnus. Pour pallier cette limitation, des approches non ciblées sont essentielles afin de détecter et caractériser ces *inconnus inconnus* (**Figure 20**, page 77) (Lai *et al.*, 2024).

Les approches de recherche non-ciblée sont basées sur l'utilisation d'outils statistiques utilisant les données priorisées, comme illustré sur la **Figure 23**, dans le premier schéma (i) par (Lai *et al.*, 2024) lors de l'étape (c) *Statistics*. Ces stratégies de recherche aboutissent fréquemment à l'identification provisoires de composés, difficilement confirmables en l'absence de standards de référence disponibles. Pour uniformiser la communication du degré de confiance, des niveaux ont été proposés par (Schymanski *et al.*, 2014) (**Figure 24**).

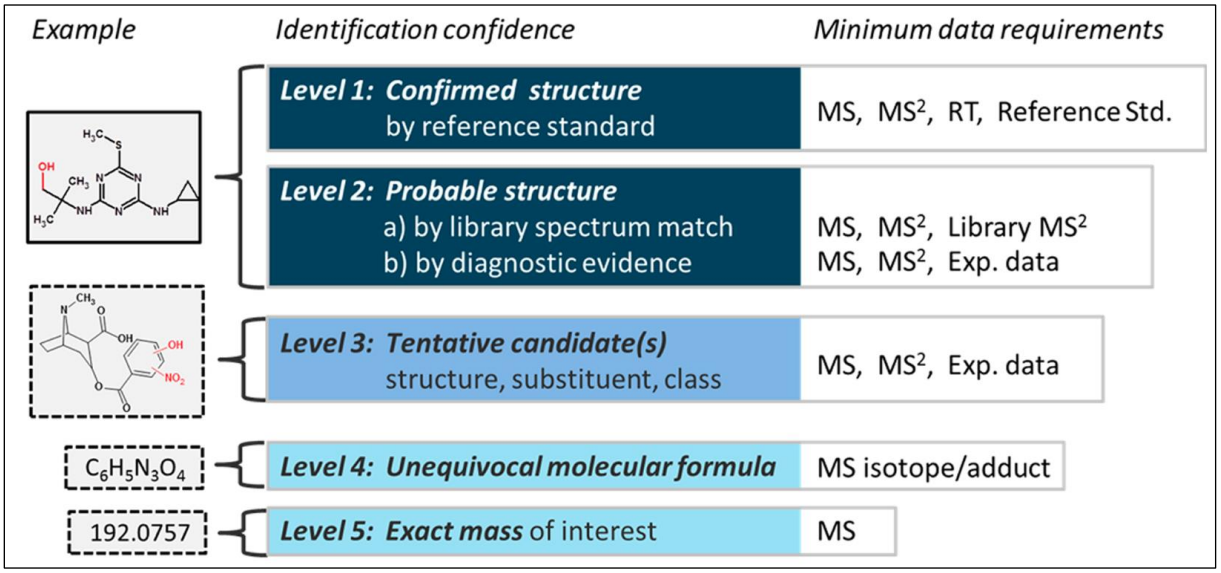


Figure 24. *Niveaux de confiance proposés pour l'identification par (Schymanski* et al.*, 2014)*

Ce système définit plusieurs niveaux allant du niveau 5, correspondant à la détection d'ions moléculaires candidats sur la base de la masse exacte seule, au niveau 1a, obtenu uniquement lorsque la structure est confirmée par un standard de référence *via* comparaison des spectres et du temps de rétention. Entre ces extrêmes, le niveau 4 correspond à l'attribution d'une formule moléculaire sur la base de la masse exacte et des motifs isotopiques, sans proposition structurelle. Le niveau 3 permet de proposer une ou plusieurs structures plausibles, par exemple *via* des recherches en bases de données ou la fragmentation in silico, mais sans pouvoir distinguer entre des isomères. Le niveau 2 correspond à une structure probable appuyée par des correspondances de spectres expérimentaux ou prédits et de données de rétention, mais sans confirmation expérimentale.

Pour augmenter ce niveau de confiance et confirmer l'identification des composés suspectés, des informations orthogonales — telles que le temps de rétention prédit *via* QSRR (Relation quantitative structure-retention) et les données de spectrométrie de masse en tandem — peuvent être utilisées pour éliminer les fausses identifications et améliorer la fiabilité des annotations. Ces informations sont particulièrement utiles pour les composés non inclus dans les bases de données existantes (Fu *et al.*, 2017).

En résumé, (Pourchet *et al.*, 2020) mettent en évidence les différences fondamentales entre les approches ciblées et suspectes/non ciblées, ainsi que les enjeux associés (**Figure 25**). Ces dernières reposent sur une préparation d'échantillons moins sélective, limitant les étapes de purification, une acquisition de données générique visant à capturer un maximum d'informations grâce à des instruments à haute résolution et des modes de fragmentation moins spécifiques, ainsi qu'un traitement de données adapté l'annotation de composés sans standards analytiques.

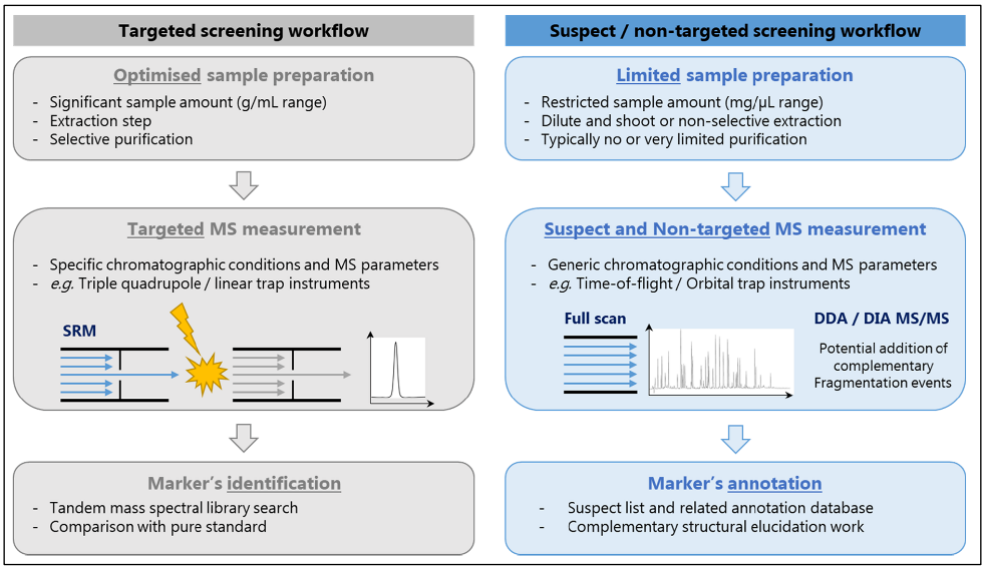


Figure 25. *Résumé des enjeux analytiques des approches ciblées et suspectes/non-ciblées par (Pourchet* et al.*, 2020)*

4.2.3.1. Cas particulier des PFAS

Certaines techniques de réduction des données ont été spécifiquement développées pour les PFAS. Des revues bibliographiques comme (Ruan et Jiang, 2017; Liu *et al.*, 2019; Bugsel, Zweigle et Zwiener, 2023) présentent ces stratégies. Les travaux de (Liu *et al.*, 2019) et (Wang *et al.*, 2022) illustrent le flux de travail communément utilisé pour l'identification de PFAS grâce aux approches non-ciblées (**Figure 26**) ; c'est aussi le cas de (Wang *et al.*, 2020; Jeong *et al.*, 2022). Ces flux de travail sont construits selon les mêmes étapes — c'est-à-dire une extraction et une filtration des *features*, puis une priorisation, et enfin une annotation des composés — que présenté dans la **Figure 23**, avec des modifications spécifiques aux PFAS, dû à leurs caractéristiques structurales comme la présence de groupes CF2.

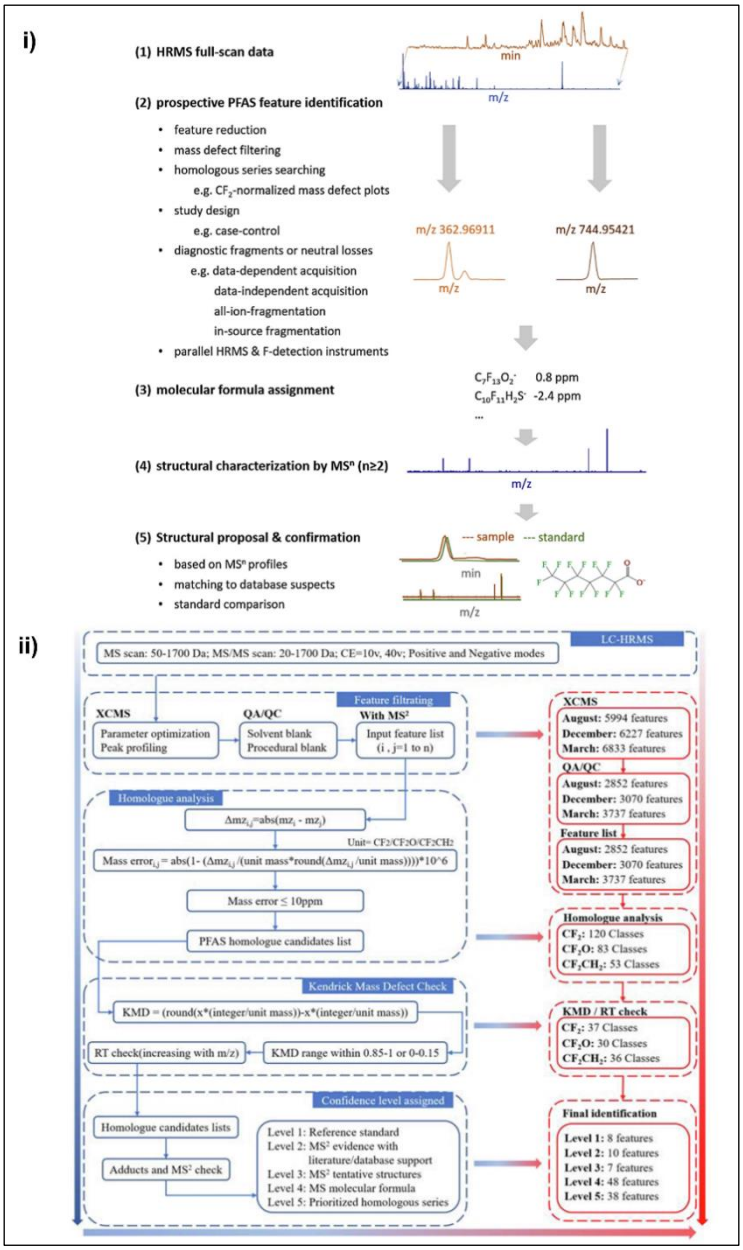


Figure 26. *Schémas du flux de travail général pour la découverte de PFAS grâce aux approches non-ciblées par i) (Liu* et al.*, 2019) et ii) (Wang* et al.*, 2022)*

En effet, après avoir priorisé les *features* d'intérêt, ces revues bibliographiques présentent diverses approches employées pour l'identification de nouveaux PFAS — comme la recherche de séries homologues ou une filtration par le défaut de masse (**Figure 26**) —, illustrées également par (Bugsel, Zweigle et Zwiener, 2023) dans la **Figure 27**. Cette figure souligne les approches utilisables selon le mode d'acquisition des données (MS^1 (full scan) ou MS^2 (DDA/DIA)).

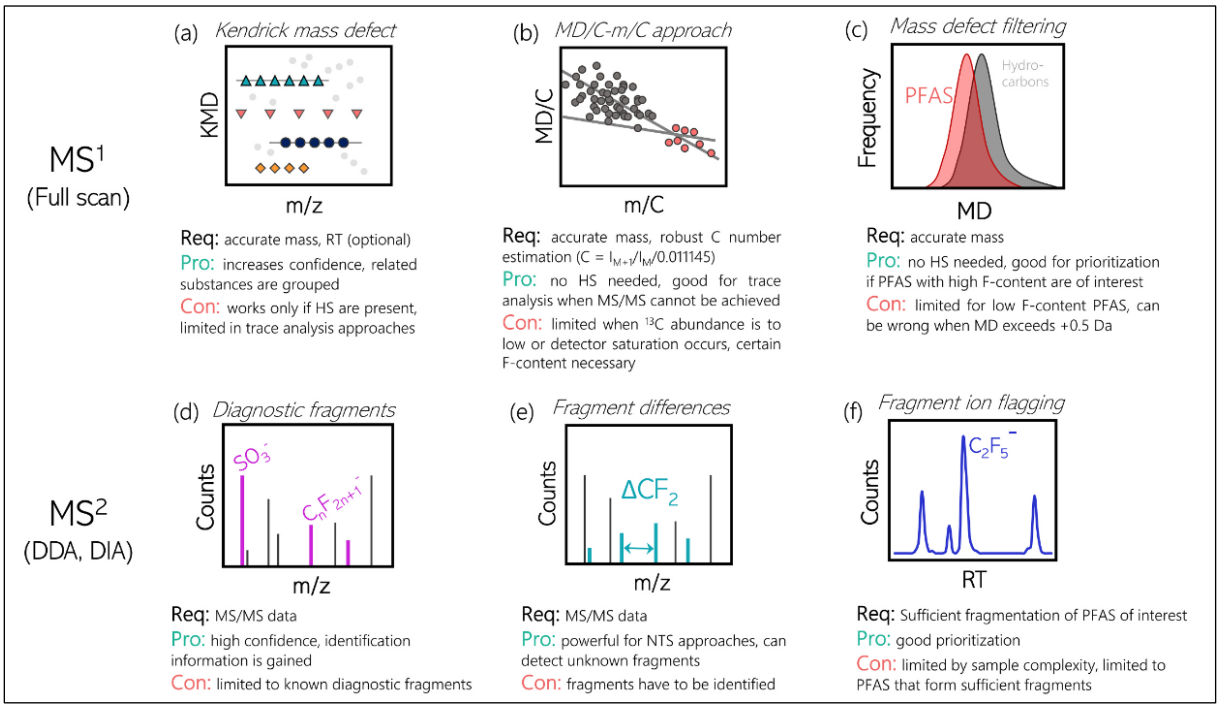


Figure 27. *Résumé de six approches pour la recherche non-ciblée de PFAS, avec leurs exigences, avantages et inconvénients (Bugsel, Zweigle et Zwiener, 2023)*

Le MD, défini comme la différence entre la masse exacte et la masse nominale d'une molécule, est souvent utilisé en analyse non ciblée pour réduire les données et prioriser les signaux des composés présentant un défaut de masse, par exemple les composés halogénés et notamment les PFAS. Les PFAS, riches en atomes de carbone (12,0000 Da) et de fluor (18,9984 Da) et pauvres en hydrogène (1,0078 Da), présentent généralement des MD faibles ou négatifs. Ce filtrage par MD peut ainsi permettre une première sélection de signaux d'intérêt dans les spectres *full-scan*, bien qu'il puisse générer des faux positifs, notamment avec d'autres contaminants contenant des hétéroatomes (S, P, O, Cl) produisant des effets similaires sur le MD.

La recherche de séries homologues, aussi appelée HS (*homologous series*), est une autre méthode de filtrage des données permettant de repérer la présence potentielle de composés fluorés. Elle repose sur le fait que de nombreux PFAS ont été, et sont encore, fabriqués sous forme de mélanges contenant une série d'homologues de différentes longueurs de chaîne. L'intervalle en *m/z* entre homologues varie selon la classe de PFAS, par exemple 49,997 pour les unités CF_2, 99,994 pour les unités CF_2CF_2,

64,012 pour les unités CH_2CF_2 et 65,991 pour les unités CF_2O. La représentation d'une série d'homologues apparaissant sur une ligne horizontale dans un diagramme de défaut de masse normalisé CF2 est illustrée par (Liu *et al.*, 2019). De plus, en phase de confirmation, l'observation du temps de rétention des analytes renforce la fiabilité des résultats obtenus : les analytes avec des chaînes fluorées plus longues présentent des temps de rétention plus élevés en chromatographie liquide en phase inverse (**Figure 28**).

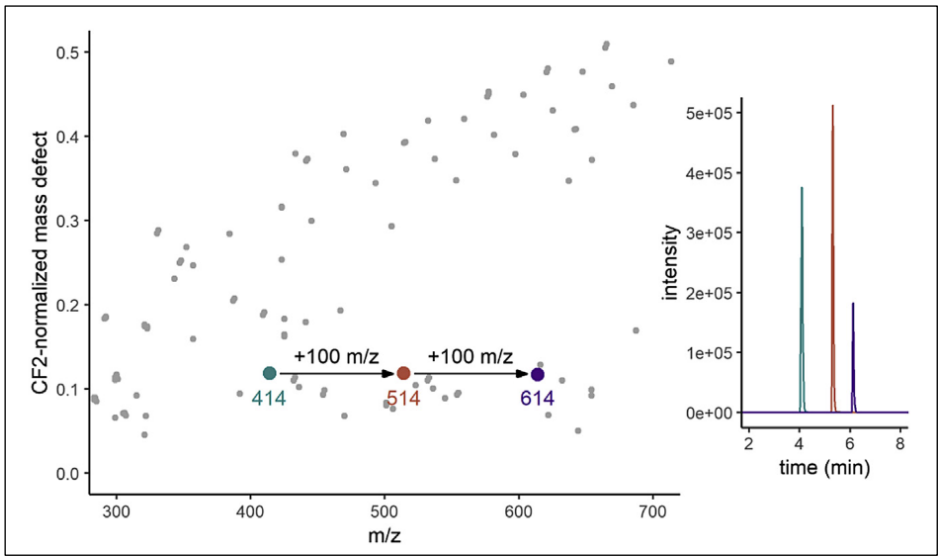


Figure 28. *Illustration d'une série d'homologues représentée dans un diagramme de défaut de masse normalisé CF2 (Liu* et al.*, 2019)*

Une amélioration notable de l'approche par défaut de masse est la méthode MD/C–m/C, qui consiste à tracer le MD normalisé par le nombre d'atomes de carbone (MD/C) en fonction de la masse normalisée par le nombre d'atomes de carbone (m/C) (**Figure 27**b). Cette approche largement utilisée est détaillée dans **Figure 29**. Cette représentation bidimensionnelle permet une séparation plus efficace entre les PFAS et d'autres composés riches en hétéroatomes à défaut de masse négatif (par ex. Cl, Br, P) par rapport aux hydrocarbures. Par exemple, comparés aux composés principalement constitués de CH_2 (hydrocarbures et matière organique naturelle), les PFAS, dominés par des groupes CHF et CF2, présentent un MD/C plus négatif en raison du défaut de masse du fluor, ce qui les déplace vers des valeurs MD/C plus basses. La sélection de zones spécifiques du graphique MD/C-m/C est efficace pour ainsi réduire le nombre de candidats.

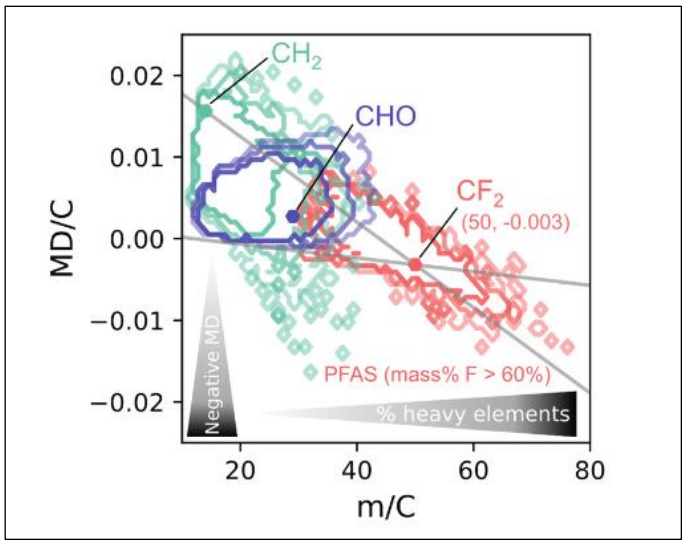


Figure 29. *Positions des différentes classes chimiques dans le graphique MD/C-m/C (Bugsel, Zweigle et Zwiener, 2023)*

Le *Kendrick Mass Defect* (KMD) est l'une des méthodes les plus puissantes pour l'identification des PFAS en recherche non ciblée (**Figure 27**a), car beaucoup proviennent de mélanges contenant des séries homologues (CF_2, C_2F_4, CF_2O). En redéfinissant la masse de l'unité répétitive pour lui attribuer un défaut de masse nul, les composés d'une même série partagent un KMD identique, ce qui facilite leur détection dans des données HRMS complexes. Cette approche, combinée à la recherche de séries homologues et à la vérification des temps de rétention, permet de renforcer considérablement la confiance dans l'identification des PFAS.

En complément des approches basées sur leur composition élémentaire spécifique, les PFAS présentent des schémas de fragmentation caractéristiques en spectrométrie de masse, incluant notamment des pertes neutres contenant du fluor, telles que la perte d'acide fluorhydrique (HF). Ces fragments et pertes spécifiques peuvent être exploités comme critères structuraux pour la détection, la priorisation et l'annotation de composés perfluorés dans le cadre de criblages non ciblés. La recherche de fragments diagnostiques dans les spectres MS/MS permet de révéler de nouvelles classes de PFAS, notamment grâce à leurs unités répétitives (CF_2, C_2F_4) et à des groupes fonctionnels spécifiques (SO_3^-, CO_2^-, PO_3^-…). Des listes concises de fragments de masse exacte, comme celles intégrées dans des outils tels que FluoroMatch 2.0 (Koelmel *et al.*, 2022) ou FindPFΔS (Zweigle, Bugsel et Zwiener, 2022), facilitent un repérage automatisé et rapide. L'association de fragments diagnostiques avec des pertes neutres ou des différences de masses caractéristiques (ΔCF_2, ΔC_2F_4…) renforce la détection et l'identification des PFAS inconnus dans des matrices complexes.

En plus de ces stratégies de priorisation, la découverte de « nouveaux » PFAS dans l'environnement est également possible grâce au développement de logiciels de traitement de données plus

performants et utilisant ces approches (Nakayama *et al.*, 2019). Ces logiciels incluent par exemple l'interrogation de bases de données afin de proposer une correspondance structurelle potentielle (Ogunbiyi *et al.*, 2023). Plusieurs logiciels, comme FluoroMatch 2.0 (Koelmel *et al.*, 2022), FindPFΔS (Zweigle, Bugsel et Zwiener, 2022) ou Compound Discoverer (Thermo), ont été développés pour faciliter la priorisation et l'analyse des données acquises en HRMS. Ces logiciels intègrent également des bases de données pour appuyer l'identification des composés. La correspondance des masses exactes avec celles présentes dans ces bases permet une identification provisoire des composés *via* une approche dite de « suspect screening ». Parmi les listes de suspects couramment utilisées, on trouve plusieurs bases publiques. Trois grandes bibliothèques de PFAS — NISTPFAS (4948 composés), PRIORISKPFAS (4240 composés) et PFASMASTER (8498 composés) — ont été comparé, montrant que chacune contenait de nombreux PFAS uniques (Joerss et Menger, 2023). Cette diversité illustre la complexité des PFAS et souligne les risques d'omission lorsque l'on se limite à une seule base. Au-delà de la recherche au niveau MS^1 (ions moléculaires), cette méthode peut aussi s'appliquer au niveau MS^2, en comparant les spectres de fragments aux bases de données contenant des informations de fragmentation à masse exacte. Cependant, la disponibilité de ces spectres reste limitée : par exemple, en 2022, MassBank ne contenait que 40 spectres MS^2 uniques pour des PFAS comportant une chaîne perfluoroalkyle. Cependant, certaines bases de données permettent aujourd'hui une recherche suspecte efficace des PFAS, telles que SFISHFLUORO sur la plateforme NORMAN Suspect List Exchange, ainsi que EPAPFASINV, PFASKEMI et PFASOECD sur le CompTox Chemistry Dashboard de l'EPA américaine. Pour le MS/MS, des données issues de la littérature et de bases publiques comme MassBank ou MZCloud peuvent être utilisées, tout comme des outils de prédiction in silico tels que MetFrag, CFM-ID ou MassFrontier. Cette combinaison d'outils et de bases améliore significativement l'identification et la priorisation des PFAS en analyse non ciblée.

Ces logiciels combinent ces différentes méthodes de priorisation pour pré-sélectionner les PFAS les plus probables et permettre ainsi de réduire significativement la liste des composés non ciblés.

Les niveaux proposés par (Schymanski *et al.*, 2014) pour uniformiser la communication du degré de confiance ont été adaptés aux PFAS par (Charbonnet *et al.*, 2022) (**Figure 30**). Au-delà de ce systèmes d'attribution du niveau de confiance, plus les preuves disponibles s'accumulent (par exemple l'appartenance à une série homologue ou des données MS^2 cohérentes), plus le niveau de confiance augmente (Guo *et al.*, 2020; Bugsel, Zweigle et Zwiener, 2023).

Level	Identification Confidence	Accurate Mass	Mass Defect	Isotopic Pattern Match	Consistent RT	Homologue (number; level)	MS^2 Fragments (number; type)	Library MS^2	Reference Standard
Level 1a	Confirmed by reference standard	✓	✓	✓	✓			✓	✓
Level 1b	Indistinguishable from reference standard	✓	✓	✓	✓			✓	✓
Level 2a	Probable by library spec. match	✓	✓	✓	✓			✓	
Level 2b	Probable by diagnostic fragmentation evidence	✓	✓	✓	✓	*≥ 1; ≥ level 3*	**≥ 3; diagnostic**		
Level 2c	Probable by diagnostic homologue evidence	✓	✓	✓	✓	**≥ 2; ≥ level 2a**	**≥ 2; diagnostic**		
Level 3a	Positional isomer candidates	✓	✓	✓	✓	*≥ 1; ≥ level 3*	**≥ 1; subclass-aligned**		
Level 3b	Fragmentation-based candidate	✓	✓	✓	✓	*≥ 1; ≥ level 3*	**≥ 1; subclass-aligned**		
Level 3c	Circumstantial candidate with fragmentation evidence	✓	✓	✓	✓	*≥ 1; ≥ level 3*	**≥ 1; subclass-aligned (in silico)**		
Level 3d	Circumstantial candidate with homologue evidence	✓	✓	✓	✓	**≥ 2; ≥ level 2a**			
Level 4	Unequivocal molecular formula	✓	✓	✓					
Level 5a	PFAS suspect screening exact mass match	**✓ (suspect list match)**							
Level 5b	Nontarget PFAS exact mass of interest	✓	✓			*≥ 3*	*≥ 2; subclass-aligned (in silico)*		

Figure 30. *Critères d'identification des PFAS à différents niveaux de confiance, par (Charbonnet* et al.*, 2022)*

La recherche suspecte, ne nécessitant pas la disponibilité immédiate de standards analytiques, permet de faire progresser le niveau de confiance d'une proposition structurale du niveau 3 au niveau 2 et d'analyser rapidement un grand nombre d'échantillons. Toutefois, de nombreux PFAS répertoriés dans les bases de données publiques ne disposent pas de formule moléculaire ou d'information structurale, ce qui rend l'analyse non ciblée toujours pertinente. De plus, les approches non ciblées complètes offrent la possibilité de détecter des produits de transformation, des impuretés de fabrication ou des PFAS absents des bases de données existantes.

Ces stratégies de recherche suspecte et non-ciblée — incluant les étapes de préparation d'échantillons, d'acquisition et de traitement des données — ont été appliquées avec succès pour la découverte de PFAS , en dehors du champ de ceux traditionnellement surveillés comme l'acide 7:3 fluorotélomère (7:3 FTA) ou l'acide N-méthylperfluorooctane sulfonamidoacétique (PFHxSAO), dans des échantillons de poissons (Crimmins *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018; Baygi *et al.*, 2021; Kaufmann *et al.*, 2022; Ren *et al.*, 2022) et d'œufs et de foie d'ours polaire (Chu et Letcher, 2024).

4.2.3.2. Cas particulier des méthodes multi-résidus et contaminants

Certaines études ont recherché plus de 800 substances multi-classes (pesticides, médicaments vétérinaires) simultanément dans des miels ou des produits de la pêche grâce à ces approches HRMS (Diallo *et al.*, 2023a; Makni *et al.*, 2024). Ces mêmes études ont aussi utilisé des bases de données MS^2 externes (MS-Dial) pour effectuer une recherche suspecte d'une plus large gamme de composés sans

les standards analytiques correspondants. Ces stratégies de recherches suspecte et non-ciblée ont été appliquées avec succès pour l'annotation de PFAS, de pesticides, d'herbicides, de produits pharmaceutiques, de produits de soins personnels dans des poissons (Baygi *et al.*, 2021), de pesticides, de retardateurs de flamme, de métabolites dans des poissons et des laits maternels (Baduel *et al.*, 2015), ou encore de substances chimiques liées au plastique dans les aliments (Tian *et al.*, 2020).

D'autres logiciels comme Compound Discoverer (Thermo) permettent d'effectuer une recherche suspecte en comparant les spectres de masse à des listes de masses, des bases de données MS^2 internes, mzVault ou mzCloud, tout en générant des formules moléculaires *via* le module Predicted Composition pour le NTS. Par exemple, bien que souvent utilisé pour l'identification de PFAS, ce logiciel a permis l'identification de plus de 480 composés (métabolites endogènes) (Cooper et Yang, 2024a).

D'autres méthodes non ciblées utilisent des outils comme les diagrammes KMD pour isoler les composés halogénés, déterminer le nombre d'atomes de brome et de chlore à partir des distributions isotopiques, et confirmer les compositions élémentaires grâce aux isotopes théoriques (Manz *et al.*, 2023; Lai *et al.*, 2024). Par exemple, Le logiciel HaloSeeker a été utilisé avec succès pour rechercher les signatures halogénées dans les empreintes HRMS *via* la stratégie du défaut de masse, facilitant ainsi le criblage non ciblé de composés halogénés dans des matrices complexes (Léon *et al.*, 2019).

De plus, les approches statistiques et chimiométriques jouent un rôle central pour prioriser et identifier les composés d'intérêt. Les méthodes d'analyse différentielle, qui exploitent des données multidimensionnelles, permettent d'isoler les *features* pertinentes sans liste prédéfinie de composés. Parmi celles-ci, l'analyse en composantes principales (ACP ou PCA) est largement utilisée pour détecter les variations entre groupes d'échantillons (temporels, biologiques, géographiques, etc.) et réduire le nombre de composés nécessitant une identification plus approfondie. Par exemple, basée sur les composés annotés, la ACP a été appliquée pour évaluer les marqueurs (résidus et contaminants) de différents miels (Makni *et al.*, 2024). D'autres méthodes multivariées comme l'analyse de discrimination par les moindres carrés partiels (PLS-DA), OPLS-DA et LDA, ainsi que des approches univariées telles que le t-test ou l'ANOVA, sont également employées pour l'analyse différentielle (Fu *et al.*, 2017; Knolhoff et Fisher, 2021; Szabo *et al.*, 2024).

L'utilisation croissante des analyses non ciblées par HRMS a généré un intérêt considérable pour améliorer la surveillance et l'identification des substances chimiques dans divers domaines. Cependant, malgré les progrès méthodologiques, l'adoption généralisée de ces techniques reste

freinée par plusieurs obstacles. Afin d'identifier ces barrières, le groupe de travail *Best Practices for Non-Targeted Analysis* (BP4NTA) a réalisé des réunions et enquêtes auprès de 61 scientifiques issus de secteurs variés, incluant producteurs et utilisateurs finaux des ces données. Les principaux défis relevés concernent le manque de formations spécifiques, l'absence de cadres standardisés pour l'assurance qualité et le design expérimental, la difficulté d'accès à des bases de données et bibliothèques de composés accessibles, ainsi que la nécessité d'intégrer les données NTS aux informations sur la toxicité et le devenir environnemental des substances. À partir de ces résultats, le groupe BP4NTA propose des axes de recherche et de développement, notamment la standardisation des outils de formation, afin de faciliter une adoption plus large et efficace des analyses NTS dans différents contextes scientifiques et réglementaires (Nason *et al.*, 2025).

À la suite des étapes de détection, d'annotation et de priorisation des variables issues d'analyses NTS ou SS, une évaluation du risque potentiel des substances nouvellement mises en évidence peut être amorcée par l'utilisation de modèles QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship). Ces modèles prédisent des paramètres toxicologiques humains ou écologiques à partir de descripteurs structuraux ou moléculaires, et sont particulièrement utiles pour les substances pour lesquelles aucune donnée expérimentale n'est encore disponible. En combinant les annotations générées lors du criblage avec les profils de danger estimés, les approches QSAR permettent de classer les composés selon leur niveau de risque potentiel, facilitant ainsi l'identification des substances à surveiller en priorité (Lai *et al.*, 2024; Szabo *et al.*, 2024).

En parallèle, il est essentiel d'étudier l'exposition du consommateur à ces substances nouvellement identifiées dans les denrées alimentaires. Cette étape est cruciale pour orienter les efforts de recherche, prioriser les actions de gestion du risque et renforcer la surveillance chimique des aliments.

5. Conclusion de l'état de l'art et objectifs de la thèse

Les connaissances actuelles ainsi que les recommandations émanant de différentes instances européennes et internationales, soulignent que l'exposition humaine à un large éventail de substances chimiques *via* l'alimentation reste encore insuffisamment caractérisée. La diversité des composés concernés — notamment pesticides, mycotoxines, PFAS, résidus de médicaments ou contaminants émergents — met en évidence la nécessité de renforcer la surveillance chimique des denrées alimentaires afin de mieux évaluer les risques pour la santé publique.

Pour répondre à cet enjeu, ce projet de thèse vise à améliorer la caractérisation de l'exposition des consommateurs, en développant des méthodes analytiques robustes, fiables et adaptées à l'analyse conjointe d'un large spectre de résidus et de contaminants *via* des approches suspectes et non ciblées.

L'approche repose sur l'optimisation de trois étapes critiques : une préparation des échantillons aussi peu spécifique que possible afin de préserver la diversité des composés présents, l'acquisition de données à large spectre et le traitement de données complexes incluant les processus d'annotation et de priorisation. Dans ce cadre, la LC-HRMS sera la technique de choix, en raison de sa sensibilité, de sa capacité de détection étendue, et de sa compatibilité avec les stratégies analytiques multi-composés.

En fournissant une vision plus intégrée de l'exposome chimique alimentaire, ces travaux contribueront non seulement à mieux documenter les profils de contamination dans les aliments, mais aussi à renforcer les outils d'évaluation des risques et, *in fine*, à éclairer les stratégies de prévention sanitaire et les décisions des autorités compétentes.

Chapitre II : Développement et application d'une méthode analytique non ciblée par LC-HRMS pour l'analyse des PFAS dans les aliments

L'intérêt croissant exprimé par différentes instances européennes et internationales pour le développement de méthodes analytiques capables d'identifier des substances chimiques, en particulier celles non encore réglementées dans les denrées alimentaires — comme certains PFAS —, a été exposé dans le chapitre précédent. Dans ce contexte, et en réponse à la nécessité d'approfondir la connaissance de l'exposome chimique alimentaire, le Chapitre II poursuit un double objectif : développer une stratégie analytique innovante, puis l'appliquer à des échantillons alimentaires afin de générer des données complémentaires à celles issues des dispositifs de surveillance de routine.

Ce chapitre s'articule en deux parties, répondant ainsi à l'*Objectif 1.A de ce travail*. La première décrit le développement et l'optimisation d'une méthodologie permettant d'identifier des PFAS au-delà de ceux habituellement suivis. La seconde illustre l'application concrète de cette approche, afin de mieux caractériser les substances, ou mélanges de substances, auxquelles les consommateurs peuvent être exposés *via* leur alimentation.

Contexte de l'étude

Les PFAS constituent aujourd'hui un groupe de contaminants émergents particulièrement préoccupants. Utilisées depuis les années 1950 dans de nombreuses applications industrielles et domestiques (revêtements antiadhésifs, textiles, mousses anti-incendie, emballages alimentaires), ces composés synthétiques se caractérisent par une extrême persistance dans l'environnement, une tendance à la bioaccumulation et des effets potentiellement délétères sur la santé humaine et les écosystèmes. Plusieurs d'entre eux sont désormais reconnus comme POPs et font l'objet de régulations strictes dans l'alimentation : quatre PFAS (PFOA, PFOS, PFNA, PFHxS) sont actuellement réglementés dans certaines denrées alimentaires au sein de l'Union européenne. Toutefois, en raison de la grande diversité structurale des PFAS, plusieurs milliers de molécules sont répertoriées. Les programmes de surveillance ciblés restent insuffisants et pourraient sous-estimer l'exposition alimentaire réelle. Par exemple, la méthode de référence accréditée ISO17025 utilisée au LABERCA, et au début de cette thèse, cible 25 PFAS, ce qui illustre l'ampleur du décalage entre les composés effectivement surveillés et l'univers chimique des PFAS. En effet, bien qu'une vingtaine de PFAS soient considérés d'intérêt particulier pour la surveillance dans l'alimentation, cela ne représente qu'une fraction minime des milliers de substances existantes. Leur nombre a fortement augmenté au fil des dernières années : de plus de 4700 recensés en 2018 (Wang *et al.*, 2021), à plus de 8000 en 2022 (Kaufmann *et al.*, 2022), tandis que la base de données PubChem en dénombrait déjà plus de 7 millions cinq ans plus tard (Schymanski *et al.*, 2023). Dans ce contexte, l'EFSA souligne la nécessité d'améliorer les méthodes analytiques et d'étendre le spectre des composés pris en compte dans les programmes de surveillance et la réglementation (EFSA, 2020; European Commission, 2022b).

Les enjeux concernant le développement d'une méthodologie de recherche élargie pour l'identification de PFAS, au-delà de ceux déjà réglementés, dans les aliments ont été présentés dans la partie Les substances per- et polyfluoroalkylées (PFAS) (page 42). Dans ce contexte, la première partie de ce chapitre (*Article 1* ci-après) présente le développement de la stratégie analytique, en partant d'une approche de recherche ciblée conventionnelle (SPE-LC-MS/MS) vers une approche étendue de recherche suspecte et non ciblée, grâce à une préparation d'échantillon de type QuEChERS, suivie d'une étape d'acquisition par LC-HRMS et traitements de données avancés permettant de prioriser les signaux fluorés (**Figure 31**) : approche QuEChERS-LC-HRMS-CD.

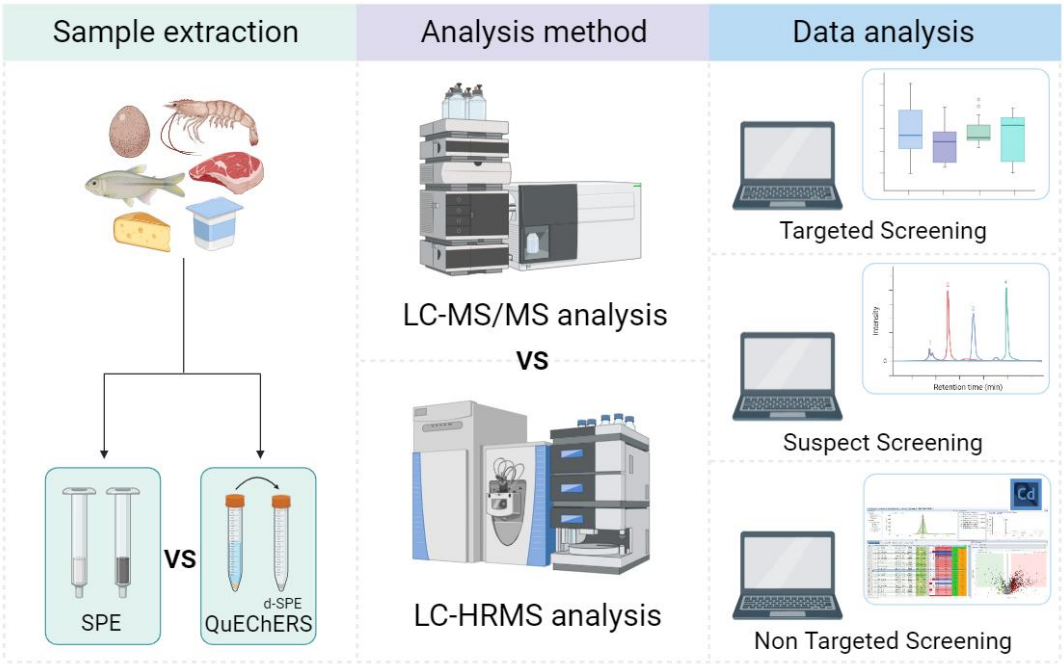


Figure 31. *Schéma récapitulatif des principales étapes méthodologiques décrites dans l'article 1, incluant la préparation des échantillons, l'analyse par LC-HRMS et le traitement des données pour l'identification étendue des PFAS dans des matrices alimentaires*

Dans le cadre des travaux de recherche du LABERCA sur l'exposome chimique du consommateur français, une sélection de 51 DAOA a été constituée sur la base des données de consommation issues de l'étude nationale INCA, afin de refléter au mieux le régime alimentaire moyen en France et de permettre l'analyse ciblée et non ciblée de contaminants présents dans ces aliments (Padioleau, 2024) (**Figure 67**, en Annexes). Ces échantillons — couvrant différentes catégories (poissons, fruits de mer, viandes, œufs, produits laitiers) — ont été collectés dans des grandes et moyennes surfaces (GMS) et sur des marchés locaux, en tenant compte de leur qualité commerciale (premier prix, marques distributeur, labels de qualité, bio) et de leur origine géographique (France, UE, hors UE). Seule la partie comestible a été conservée, c'est-à-dire, par exemple, le muscle et la peau pour les cuisses de poulet, la chair pour les bulots et crevettes. Les échantillons ont ensuite été lyophilisés, broyés, homogénéisés et stockés à -20 °C, de manière à constituer une base de référence durable pour divers projets de recherche. Pour la présente étude, 20 échantillons ont été sélectionnés au sein de cette banque, en ciblant les denrées animales identifiées comme de forts contributeurs de l'exposition alimentaire aux PFAS et couramment consommées en France. Afin de mieux prendre en compte la variabilité géographique de la contamination, 20 échantillons alimentaires supplémentaires ont été intégrés à l'étude. Ils proviennent d'un travail antérieur mené en Algérie, ayant mis en évidence une contamination marquée par les PFAS dans certaines matrices comme les poissons, les viandes et les œufs (Amziane *et al.*, 2022; Amziane, 2023). Ce contexte offre une opportunité intéressante d'explorer des profils de contamination différents de ceux observés en France, en lien avec des usages, des

pratiques industrielles ou des sources d'exposition spécifiques. En parallèle, des échantillons ont été collectés dans des zones identifiées comme « hotspots » de pollution aux PFAS en Europe, sélectionnées à partir de données scientifiques disponibles et de réseaux de surveillance. Dans l'objectif d'identifier un spectre élargi de composés perfluorés, le protocole analytique optimisé dans le cadre de cette étude a été appliqué à l'ensemble de ces échantillons (**Figure 32**).



Figure 32. *Cartes illustrant les zones d'échantillonnages en Europe (à gauche, France) et en Afrique (à droite, Algérie) investiguées dans le Chapitre II*

La seconde partie (*Article 2* ci-après) met en œuvre cette approche sur l'ensemble des échantillons (les 20 DAOA et des échantillons issus de sites spécifiques), afin de rechercher la présence de PFAS déjà connus et surveillés, mais surtout de révéler des substances émergentes, parfois encore non répertoriées dans les aliments, grâce au non-targeted screening (**Figure 33**). Les données supplémentaires (*Supplementary data)* de ces 2 articles sont disponibles dans les parties associées en Annexes.

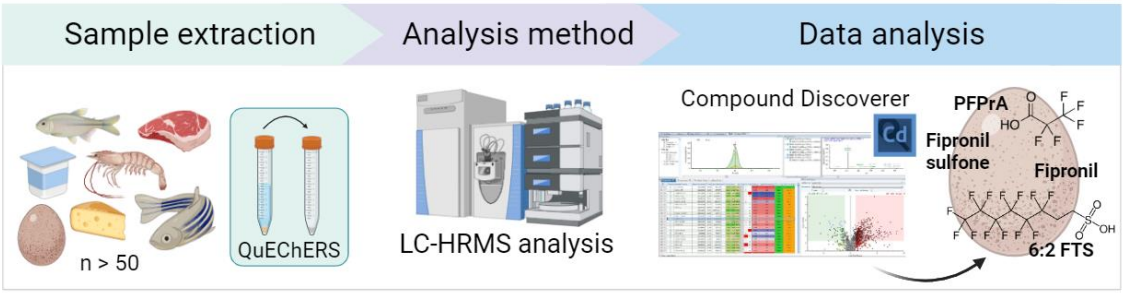
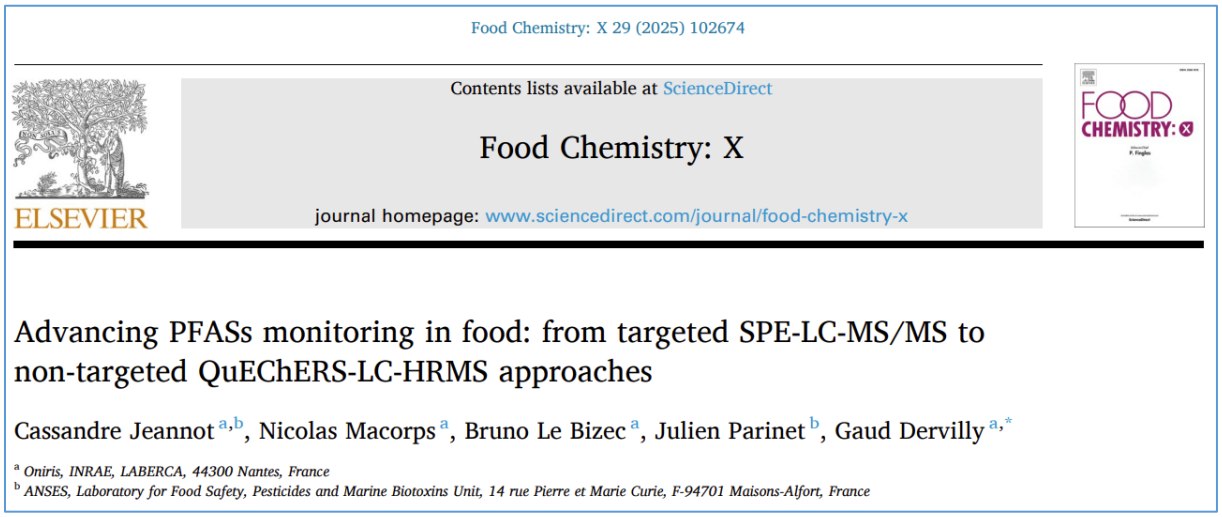


Figure 33. *Schéma récapitulatif de l'application de la méthode présentée dans l'Article 1, correspondant aux travaux (Article 2) présentés pour l'identification de PFAS additionnels à ceux surveillés habituellement*

Article 1 : Advancing PFASs monitoring in food: From targeted SPE-LC-MS/MS to non-targeted QuEChERS-LC-HRMS approaches



Food Chemistry: X 29 (2025) 102674

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry: X

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/food-chemistry-x

Advancing PFASs monitoring in food: from targeted SPE-LC-MS/MS to non-targeted QuEChERS-LC-HRMS approaches

Cassandre Jeannot [a,b], Nicolas Macorps [a], Bruno Le Bizec [a], Julien Parinet [b], Gaud Dervilly [a,*]

[a] Oniris, INRAE, LABERCA, 44300 Nantes, France
[b] ANSES, Laboratory for Food Safety, Pesticides and Marine Biotoxins Unit, 14 rue Pierre et Marie Curie, F-94701 Maisons-Alfort, France

Food Chemistry: X. 29, 102674. 2025. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102674 IF 8,2.

Contribution de l'autrice

La banque d'échantillons utilisée dans cette étude a été constituée lors d'un précédent travail de doctorat au LABERCA (Padioleau, 2024), à partir de 51 denrées alimentaires d'origine animale représentatives de la consommation nationale française, préparées et conservées à -20 °C. Dans le cadre de mes travaux, j'ai sélectionné 20 échantillons au sein de cette banque. Après avoir été formée par l'équipe en charge de l'analyse accréditée des PFAS dans les aliments du LABERCA (Unité Contaminants - UCO), j'ai mis en œuvre une méthode ciblée incluant une SPE, suivie d'une analyse LC-MS/MS et du traitement des données sur les 20 échantillons.

Avant de pouvoir développer une approche non ciblée, il était indispensable de maîtriser la méthode ciblée d'analyse des PFAS, tant sur le plan théorique que pratique. Cette dernière constitue en effet une référence en termes de sensibilité, de spécificité et de fiabilité analytique, et représente un socle essentiel pour valider les résultats issus du criblage non ciblé. Elle permet également d'acquérir une compréhension approfondie du comportement analytique de ces composés, notamment en matière de rétention chromatographique, de fragmentation et de réponse instrumentale. Cette étape a ainsi permis d'aborder la complexité des analyses non ciblées avec des bases solides, garantissant un meilleur contrôle de la qualité des données et une interprétation plus rigoureuse des résultats générés.

Ensuite, afin de développer une approche non ciblée pour l'analyse des PFAS dans les aliments, j'ai mené une revue bibliographique approfondie. Constatant le peu de données disponibles, j'ai élargi mes recherches à l'analyse non ciblée de résidus et contaminants dans les aliments, et de PFAS dans des matrices variées incluant principalement des échantillons environnementaux. À partir de cette synthèse, j'ai sélectionné plusieurs protocoles d'extraction de type QuEChERS, que j'ai ensuite testés en les couplant à une analyse LC-MS/MS. Parallèlement, j'ai collaboré avec Nicolas Macorps pour tester et optimiser les conditions chromatographiques et les paramètres de la LC-HRMS, afin d'adapter l'instrumentation à une approche non ciblée. J'ai également participé, à l'optimisation du traitement de données sur le logiciel Compound Discoverer, en reprenant les bases mises en place précédemment au laboratoire, afin d'améliorer l'efficacité de cette étape. J'ai appliqué toute cette stratégie non-ciblée développée aux échantillons.

Concernant la rédaction de l'article, j'ai rédigé une première version complète, incluant le résumé, les points forts, les figures, les tableaux et les informations complémentaires (Supplementary Information). Cette version a d'abord été relue et corrigée conjointement avec les encadrants du projet. Une fois le manuscrit consolidé, il a été soumis à l'ensemble des co-auteurs pour une relecture approfondie et des suggestions de modifications. Le processus de révision en réponse aux commentaires des évaluateurs a suivi la même démarche collaborative.

****

Highlights

- Comparison of extraction and purification methods for PFASs analysis
- Application of suspect and non-targeted strategy to twenty food samples
- Prioritisation of fluorinated signals is effective for filtering complex data
- Identification of additional PFASs to those routinely controlled
- Strategy confirmed as a tool to extend knowledge on chemical exposome

Abstract

Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) are increasingly recognized as emerging contaminants, with some classified as persistent organic pollutants (POPs), and four of them recently regulated in food. However, given the large variety of PFAS structures, comprehensive monitoring remains essential. This study introduced a suspect and non-targeted approach to identify PFASs beyond those conventionally monitored in foodstuffs. The strategy combined optimized QuEChERS sample preparation, LC-HRMS acquisition, and prioritization of fluorinated signal. Compared to targeted solid-phase extraction (SPE) and MS/MS acquisition (QqQ), this approach detected a wider range of PFASs in various food samples. As one of the first studies to apply non-targeted screening (NTS)— a technique commonly used in environmental analyses—to food, it demonstrates the potential to detect both known and previously unlisted PFASs, such as PFPrA in an egg sample. Ultimately, this expanded approach enhances exposure assessment and supports HRMS-based strategies for regulatory control and risk assessment.

Keywords PFASs, NTS, Sample preparation, QuEChERS

1. Introduction

Per- and poly-fluoroalkyl substances (PFASs) are man-made compounds widely used since the 1950s in many products, making them ubiquitous in the environment and a source of chronic exposure (Schymanski et al., 2023; Glüge et al. 2020). Compounds like PFOA, PFOS, and PFHxS are listed as persistent organic pollutants (POPs) under the Stockholm Convention due to their persistence, bioaccumulation, toxicity, and long-range transport (Zahm *et al.*, 2024). Food is one of the main routes of non-occupational exposure, with some PFASs found in protein-rich foods due to their affinity for proteins (Abunada, Alazaiza et Bashir, 2020; Aker *et al.*, 2023; Eze *et al.*, 2024).

The European Food Safety Authority (EFSA) set a tolerable weekly intake (TWI) of 4.4 $ng.kg^{-1}$ body weight for the sum of PFOA, PFOS, PFNA, and PFHxS due to immune system effects (EFSA, 2020). This led to maximum levels in food, e.g., 1.7 $\mu g.kg^{-1}$ for eggs and up to 50 $\mu g.kg^{-1}$ for game offal (European Commission, 2022c). While only four PFASs are regulated, their number has risen from 4700 in 2018 (Wang *et al.*, 2021) to over 8000 in 2022(Kaufmann *et al.*, 2022), with PubChem listing over 7 million (Schymanski *et al.*, 2023). EFSA recommends improving analytical methods and expanding PFAS monitoring and regulation (EFSA, 2020; European Commission, 2022b).

In response, the scientific community has advanced methods to detect more PFASs by enhancing preparation, separation, and data processing. Though mainly applied to environmental samples, food—despite being a key exposure route—has been less studied. With increasing concern from health agencies calling for broader monitoring, these approaches aim to better characterize food contamination and improve exposure assessments (EFSA, 2020; European Commission, 2022b).

Solid-phase extraction (SPE) is widely used for purifying PFASs in food samples when targeting specific compounds. Techniques include weak anion exchangers (WAX), hydrophilic-lipophilic balance (HLB) cartridges, or adsorbents like Graphitized Carbon Black (GCB), commonly paired with LC-MS/MS (Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (MS^2)) analysis (Pan *et al.*, 2020; Iannone *et al.*, 2024). These methods have been applied in studies such as the French total diet study

(Rivière *et al.*, 2014) and analyses of various food matrices (Meng, DeStefano et Knappe, 2022; Jaus, Rhyn et Valentini, 2023).

The QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) method, initially for pesticides (Anastassiades *et al.*, 2003b), is now adapted for PFASs analysis in food (**Tableau 3**) (Iannone *et al.*, 2024). It involves solvent extraction, typically using acetonitrile (ACN) acidified with formic acid (FA) or alternatives like methanol (MeOH) or methyl tert-butyl ether (MTBE) (Taniyasu *et al.*, 2003; Rivière *et al.*, 2014; Acosta-Dacal *et al.*, 2020), followed by a salting-out step to separate phases, commonly using $MgSO_4$/NaCl (Kim *et al.*, 2019; Genualdi *et al.*, 2022; Roberts, McNaughtan et de las Heras Prieto, 2023). The dispersive-SPE (d-SPE) step uses adsorbents like Primary Secondary Amine (PSA), GCB, octadecyl silica (C18) or $MgSO_4$ to remove interferences (i.e cholic acid, which can signal can interfere with some target compounds) and retain PFASs (Genualdi *et al.*, 2022; Sadighara *et al.*, 2024).

Tableau 3. *Representative examples of the use of QuEChERS to extract PFASs from foods*

Matrice	Solvent extraction	Salting-out	Clean-up (d-SPE)	Filtration	Reference
First QuEChERS protocol					
Fruits and vegetables	ACN	MgSO4/NaCl (4:1, w/w)	$MgSO_4$ / PSA	-	(Anastassiades *et al.*, 2003b)
Focus on PFASs extraction					
Fish	ACN	-	ENVI-Carb graphitized carbon	-	(Powley *et al.*, 2008)
Fish and milk	ACN / H_2O / FA	MgSO4/NaCl (4:1, w/w)	$MgSO_4$ / C18 / GCB	0.2 µm polyvinylidene fluoride filter	(Lacina *et al.*, 2011)
Milk and baby food	ACN / H_2O / FA	MgSO4/NaCl (4:1, w/w)	$MgSO_4$ / C18	0.22 µm nylon filter	(Lankova *et al.*, 2013)
Fruits and vegetables	ACN / FA	MgSO4/NaCl (4:1, w/w)	$MgSO_4$ / ENV SPE Bulk	Paper filter	(Sznajder-Katarzyńska *et al.*, 2018)
Food	ACN / H_2O / FA	MgSO4/NaCl (4:1, w/w)	$MgSO_4$ / PSA / GCB	0.2 µm nylon filter	(Genualdi *et al.*, 2022)
Fish, meat, and eggs	ACN / H_2O	MgSO4/NaCl (4:1, w/w)	$MgSO_4$ / PSA / C18 / CarbonX	-	(Taylor et Sapozhnikova, 2022)
Tomato, strawberry, and milk	ACN	NaCl	-	0.45 µm nylon filter	(Roberts, McNaughtan et de las Heras Prieto, 2023)

Filtration may be applied for complex matrices (**Tableau 3**), with SPE cartridges used if additional purification is needed, though this can reduce recoveries (Genualdi *et al.*, 2022; Sadighara *et al.*, 2024). QuEChERS offers a versatile, effective approach, critical for expanding PFASs extraction from diverse food matrices.

After non-selective sample preparation, selecting the appropriate analytical method is key to expanding the detection of PFASs through non-targeted analysis. Most studies extract PFASs from food samples using QuEChERS protocols and analyze them with LC-MS/MS for targeted quantification (Lacina *et al.*, 2011; Sznajder-Katarzyńska *et al.*, 2018; Genualdi *et al.*, 2022). This method allows monitoring of up to 45 PFASs (Rivière *et al.*, 2014; Meng, DeStefano et Knappe, 2022) but struggles to identify certain compounds like PFBA and PFPeA, as they only have one ion transition with QQQ, which require high-resolution mass spectrometry (HRMS) (Genualdi *et al.*, 2022). HRMS is increasingly used for wider screening, including suspect and non-targeted analyses (Knolhoff et Fisher, 2021). Qualitative analysis through MS/MS and data acquisition methods (DDA, DIA, AIF) helps minimize false detections but presents challenges for complex samples (Pan *et al.*, 2020; Chu et Letcher, 2024).

Data processing is essential for detecting PFASs using mass spectrometry and prioritizing key signals in HRMS data. Common features include homologue series (CF2), diagnostic fragment ions (DFIs), neutral loss, and Kendrick Mass Defect (KMD) plots. Techniques like mass defect filtering and exact mass matching with suspect lists aid PFASs identification (Bugsel, Zweigle et Zwiener, 2023; Feng *et al.*, 2024). Software tools such as FluoroMatch and Compound Discoverer are widely used for screening PFASs (Knolhoff et Fisher, 2021; Kaufmann *et al.*, 2022; Chu et Letcher, 2024; Cooper et Yang, 2024b; Feng *et al.*, 2024), with other programs like FindPFAS (Zweigle, Bugsel et Zwiener, 2022) and PFAScreen (Zweigle *et al.*, 2024) also reported.

In line with recent recommendations (EFSA, 2020; European Commission, 2022b), this work addresses a critical need to expand the spectrum of analyzable PFASs beyond the targeted ISO17025 method used in national monitoring plans, thereby responding to the growing demand from risk assessors and

managers for more comprehensive surveillance and control strategies. These professionals have highlighted the limitations of current monitoring approaches, which primarily focus on a narrow range of PFASs compounds, and have called for methods that can detect a broader array of these contaminants to better assess environmental contamination and human exposure, particularly in foodstuffs (Government of France, 2024). To this and, a novel application of a QuEChERS extraction method was initially developed to target a finite set of 28 PFASs, along with 15 labeled standards, reflecting those typically monitored in routine methods. This sample preparation method was applied across various food matrices, including fish and milk, and further coupled with non-targeted HRMS analysis. Its performance was then evaluated in both SS and non-targeted screening (NTS) context for the characterization of food samples of animal origin, demonstrating the potential of this approach to advance current monitoring capabilities.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

Ammonium acetate, KOH tablets and ammonia 32 % (NH_4OH), and Sodium Chloride (NaCl) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Methanol picograde was from Fisher, ACN for LC-MS and glacial acetic acid (ACA) from Carlo-Erba Reagents (Rodano, Italy). Acetonitrile for LC-HRMS was obtained from Honeywell, and FA and supelclean ENVI-Carb SPE tube from Supelco (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). HF Bond Elut – C18 was obtained from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), and Magnesium Sulfate ($MgSO_4$) from ThermoScientific. Ultrapure water (>14 MΩ.cm) and water for LC-HRMS from VWR (Radnor, PA, USA) were used.

The method was developed using 28 PFASs compounds plus their 15 labelled reference compounds. Standards of all selected PFASs (standards and internal standards) were purchased from Wellington Laboratories. A solution of all (n = 28) analytical standards containing the 4 regulated PFASs (European Commission, 2022c) but also the following 24 PFASs, called "PFASs mix", was prepared in methanol (0.1 ng.µL^{-1} each): perfluorobutanoic acid (PFBA), perfluoropentanoic acid (PFPeA), perfluorobutane

sulfonic acid (PFBS), perfluorohexanoic acid (PFHxA), perfluoroheptanoic acid (PFHpA), perfluorohexane sulfonate (PFHxS), perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluoroheptane sulfonic acid (PFHpS), perfluorooctane sulfonic acid (PFOS), perfluorononanoic acid (PFNA), perfluorodecanoic acid (PFDA), per-fluoroundecanoic acid (PFUnDA), perfluorodecane sulfonic acid (PFDS), perfluorododecanoic acid (PFDoDA), perfluorotridecanoic acid (PFTrDA), perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA), perfluorooctane sulfonamide (FOSA), 2-(N-methylperfluorooctanesulfonamido) acetic acid (MeFOSAA), 2-(N-ethylperfluorooctanesulfonamido) acetic acid (EtFOSAA), Perfluoropentanesulfonate (PFPeS), Perfluorononanesulfonate (PFNS), Perfluoroundecanesulfonate (PFUnDS), Perfluorododecanesulfonate (PFDoDS), Perfluorotridecanesulfonate (PFTrDS), Dodecafluoro-3H-4,8-dioxanonanoate (NaDONA), 2,3,3,3-Tetrafluoro-2-(1,1,2,2,3,3,3-heptafluoropropoxy)propanoic acid (GenX or HFPO-DA), 9-Chlorohexadecafluoro-3-oxanonane-1-sulfonate (9Cl-PF3ONS), 11-Chloroeicosafluoro-3-oxaundecane-1-sulfonate (11Cl-PF3OUdS)

A solution containing the following labelled PFASs used as internal standards (IS) (n=15) was prepared in methanol (0.1 ng.μL^{-1} each): PFBA 13C4, PFPeA 13C3, PFBS 13C3, PFHxA 13C5, PFHpA13C4, PFHxS18O2, PFOA 13C4, PFOS 13C4, PFNA 13C5, PFDA 13C2, PFUnDA 13C2, PFDoDA13C2, FOSA 13C8, 1 d5-EtFOSAA, 1 d3-MeFOSAA. A solution of $13C_8$ PFOS was prepared in methanol (0.01 ng/µL), as an external standard.

2.2. Investigated samples

Food items of animal origin were collected in France in 2021 as part of a previous study (Godéré et al., 2024), aiming to represent typical consumption patterns in France. These items were selected based on the third French individual and national food consumption survey (INCA3), conducted by the French Agency for Food, Environmental, and Occupational Health and Safety (ANSES) in 2014-2015. A subset of 20 items (n=20) was selected as follows: three eggs samples (n = 3), four seafood, shellfish, molluscs samples (cooked shrimps (n = 1), scallops (n = 1), raw mussels (n = 1) and cooked mussels (n = 1)), five fish samples (trout fillet (n = 1), back of cod (n = 1), alaska hake fillet (n = 1), smoked salmon (n = 1)

and sardines (n = 1), five meat samples (butcher steak (beef) (n = 1), côtelettes (lamb) (n = 1), white ham with rind (pork) (n = 1), chipolata (pork) (n = 1) and thigh with skin (chicken) (n = 1)) and three dairy products samples (grated emmental (n = 1), goat's cheese bûche (n = 1) and plain cow's milk yoghurt (n = 1)). These samples were stored at – 20 °C until analysis.

2.3. Sample preparation

2.3.1. Sample pretreatment

Samples were placed individually in petri dishes, which have been placed at -20 °C for at least 15 h, then freeze-dried during at least 36 h. Freeze-dried samples were homogenized and grounded to a powder, according to a previous work (Amziane *et al.*, 2022), and stored at -20 °C.

2.3.2. Solid Phase Extraction (SPE)

Samples were extracted according to the extraction method reported in 2014 (Rivière *et al.*, 2014), with minor modifications, and presented in **Figure 34**. Infant milk was prepared as described on the milk powder pack : 150 mg milk powder with 1 mL H_2O (at room temperature) for 1 mL milk. In order to develop a protocol applicable to milk and fish, the amount of freeze-dried fish was also set at 150 mg. Briefly, 60 µL of the IS solution was added to 150 mg dry sample. Then, the samples were mixed, left in contact with the IS solution for 15 min, and 3 mL of 0.01 M potassium hydroxide methanoic (MeOH/KOH) solution were added. The mixture was stored overnight at room temperature. The supernatant was evaporated under nitrogen to 1 mL. After addition of 4 mL of ultrapure water, two SPE (Oasis WAX and ENVI-Carb) purifications were successively performed. The extract was dried under nitrogen and reconstituted in 90 µL of MeOH ($13C_8$ PFOS) / H_2O (40/60; v/v), for LC-MS/MS and LC-HRMS analysis.

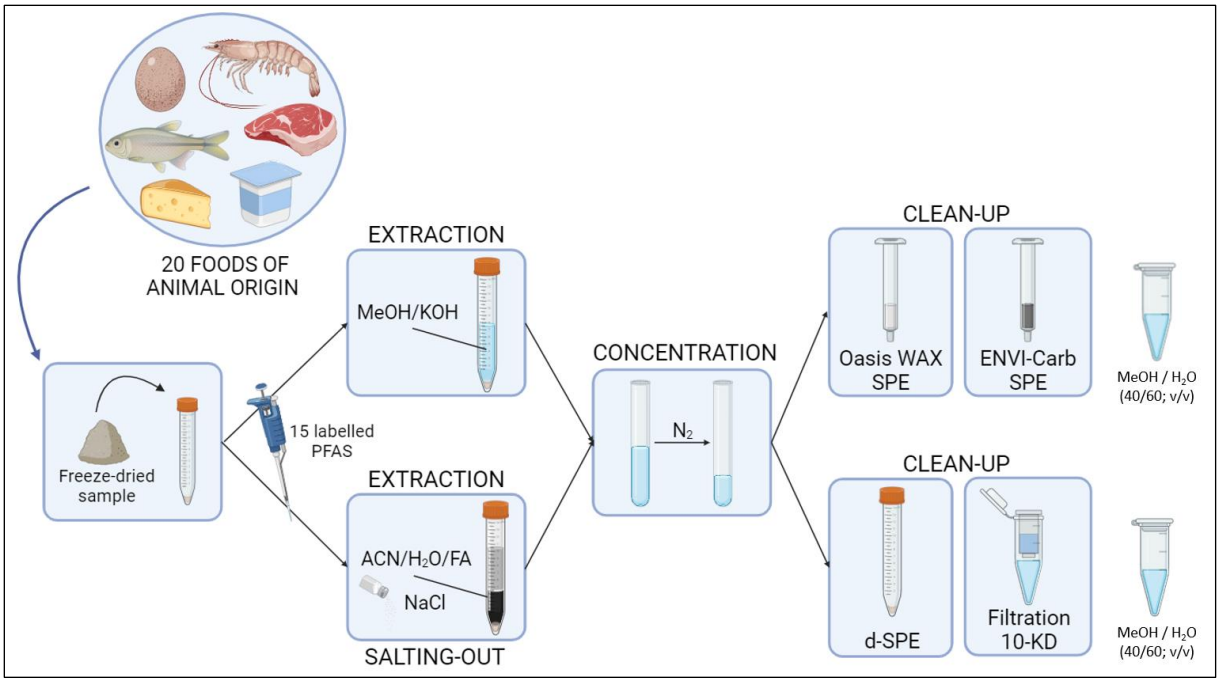


Figure 34. *Detailed sample preparation steps using SPE and QuEChERS methods*

2.3.3. QuEChERS

The optimisation of QuEChERS extraction protocol is presented in section 3.1. For each sample, the start of the protocol is the same as the SPE protocol up to the extraction solvent **Figure 34**. A volume of 5 mL of ultra-pure water was added, the mixture was mixed and allowed to soak for 15 min. To these samples, 5 mL of ACN and 50 µL of FA were added, the mixture was mixed, and 600 mg of NaCl were added. The samples were shaken for 1 min, centrifuged for 10 min at 4000 rpm (4 °C), and stored overnight at -20 °C. The supernatant was evaporated under nitrogen to 1 mL. The cleaned up step was performed by d-SPE with 150 mg of anh. $MgSO_4$ (150 mg), C_{18} (15 mg) and GCB (7.5 mg). The mixture was shaken for 1 min and then centrifuged for 10 min at 4000 rpm (4 °C). Supernatants were filtered through 0.22 µm nylon syringe filters. The extract was dried under nitrogen and reconstituted in the same mixture solvent as the SPE protocol (method A). A variant of this protocol was also tested by adding a filtration step (method B) using Omega 10 kDa membrane (Nanosep Centrifugal Filter; Ugap) **Figure 34**.

2.4. Instrumental analysis

2.4.1. LC-MS/MS analysis

Extracts obtained by applying SPE and QuEChERS protocols were analysed using an Agilent HP 1200 coupled to a QqQ 6495c Agilent mass spectrometer. The LC-MSMS conditions were based on (Rivière *et al.*, 2014), with minor modifications. The chromatographic separation was performed by a reverse phase C18-column (Hypersil Gold, 100 mm x 2.1 mm i. d., 1.9 µm particle size) equipped with a pre-filter (UHPLC filter 22180; Thermo Scientific, Bremen, Germany). The column ovens temperature was set to 50 °C. A gradient elution with water 20 mmol.L^{-1} ammonium acetate (A) and methanol (B) was used. The starting mobile phase composition was 30% B for 0.5 min. B was linearly increased to 67.5% in 2.5 min, to 69.5% in 2 min, to 73.5% in 2 min, and finally to 95% in 0.5 min (held for 1 min), before returning to 5% in 0.5 min and 30% in 1.5 min (held for 0.5 min). The total cycle time was 11 min. The flow rate was 0.6 ml.min^{-1}. The injection volume was set to 10 µL. Triple quadrupole mass spectrometer fitted with an electrospray ionisation (ESI) source operating in negative mode. ESI source conditions were set, as follows: gas temperature 150 °C, nebulizer 6 bars and gas flow rate 650 L.h^{-1}, sheath gas temperature 350 °C, and flow 12 L.min^{-1}, nozzle voltage 0 V, and capillary voltage 2.0 kV in negative mode. Multiple Reaction Monitoring (MRM) was used as an acquisition mode, for a total time of 8.5 min. For all PFASs (except PFBA and PFPeA), two transitions were required to confirm the identity of the analyte. The transitions followed for each molecule are reported in Table S1. For method development purposes, PFASs were quantified using the most intense transition.

2.4.2. LC-ESI(-)-HRMS analysis

Samples extracted by SPE and QuEChERS protocols were analyzed by an Ultimate 3000 UHPLC pumping system coupled to an Orbitrap Q-Exactive mass spectrometer. The LC-HRMS conditions were adapted and modified from the methods used by (Kaufmann *et al.*, 2022) and (Rivière *et al.*, 2014). The chromatographic separation was performed by a reverse phase C18-column (Hypersil Gold, 100 mm x 2.1 mm i. d., 1.9 µm particle size) equipped with a pre-filter (UHPLC filter 22180; Thermo Scientific, Bremen, Germany). The column ovens and the sample trays temperatures were set to 40 °C and 4 °C,

respectively. A gradient elution with water 5 mmol.L^{-1} ammonium formate (A) and acetonitrile (B) was used. The gradient started with 5% B for 0.5 min, increased linearly to 100% in 7.5 min (held for 6 min), before returning to 5% in 4 min (held for 2 min). The total cycle time was 20 min. The flow rate was 0.4 mL.min^{-1}. The injection volume was set to 5 µL. The Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific®, Bremen, Germany) fitted with ESI source operating in negative mode. Heated ESI source conditions were set, as follows: sheath gas flow = 55 arbitrary units (AU), auxiliary gas flow rate = 10 AU, auxiliary gas temperature = 300 °C, capillary temperature = 350 °C, spray voltage = 3 kV, and s-lens radio frequency = 40 AU. Data acquisition was performed by full scan and DIA modes. A MS1 full scan mode over the range 65 – 975 m/z at a resolving power of 70,000 at m/z 200 (acquisition window = 0–14 min) operating for the acquisition of the raw data. The automatic gain control (AGC target) and the maximum injection time (IT) were set at 1.10^6 and 100 ms, respectively. After a first processing, a list of suspect compounds is generated, as an inclusion list for non-targeted analyses using DIA mode. This mode used a mass-resolving power of 35000, with a pre-selection of the ions to be fragmented as a priority using a precursor ion list (PIL) of the targeted compound, including the retention time and the mass-to-charge ratio. A stepped normalized collision energy of 10, 30, and 90 electronvolts (eV) was employed. The AGC target and the maximum IT were set at 2.10^5 and set to auto, respectively.

2.5. Data processing

For targeted analyses (SPE + LC-MS/MS), Mass Hunter was used for peak integration of LC-MS/MS data. For each compound, two Selected Reaction Monitoring (SRM) (1 quantifier and 1 qualifier) were monitored. The acquisition parameters (SRM transitions and CE voltage) used in LC-MS/MS, in negative electrospray ionisation, for PFASs compounds are presented in Table S1. Labelled internal standards were used to quantify the 28 PFASs according to the isotopic dilution strategy (Rivière *et al.*, 2014). Data representation was performed using R software (version 4.0.1.0).

For the suspect screening analyses (QuEChERS + LC-HRMS), Skyline (MacLean *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2020), a user-friendly open-source software package, was used for peak integration of LC-HRMS

data. Peak assignment was made possible by querying an in-house database of available PFASs standards.

Non-targeted screening data analyses (QuEChERS + LC-HRMS) were performed using CD 3.3 SP2 software (Thermo Fishier Scientific) processing raw files acquired in full scan and DIA mode to annotate candidate compounds. The workflow and software parameters used were described on those of previously reported methods (Kaufmann *et al.*, 2022; Sanchez et Tautenhahn, 2023).

3. Results and discussion

The objective of this work was to develop an alternative extraction method for PFASs, replacing the routinely used SPE method, and to apply it in both suspect screening (SS) and non-targeted screening (NTS) workflows to evaluate its ability to broaden the range of PFASs detected. As part of this strategy, the approach also involved shifting from conventional targeted MS/MS detection to a more comprehensive HRMS-based strategy, allowing the identification of both known and previously unlisted PFASs in food.

The first step involved developing and optimizing a QuEChERS method for this purpose.

3.1. Optimisation of the QuEChERS extraction and purification steps

To develop a less selective preparation protocol for PFASs analysis in food, the choice was made as an alternative to the SPE towards a QuEChERS. The impact of various parameters was studied as described below and then optimized in order to maximize extraction yields. At this stage, LC-MS/MS was chosen as a reference monitoring method in targeted mode to compare the performance of the tests carried out (§2.4.1). Infant milk and a range of fish from lean to fatty types were selected as relevant matrices for the initial method development. These complex matrices were chosen because they have distinct properties, allowing for a comprehensive assessment of PFASs in different food types.

3.1.1. Extraction solvent

First, the selection of an appropriate solvent is a key determinant of extraction efficiency, thus necessitating the evaluation of multiple solvent options to identify the most suitable choice for the target matrix and analytes. This approach was first applied to infant milk, followed by fish, to optimize the extraction process for each matrix.

Milk samples were spiked with both the labeled PFASs mix (10 ng/mL, i.e. 0.067 ng/mg milk powder) and the PFASs mix (10 ng/mL). Based on literature on PFASs extraction, the samples were then extracted using five solvent mixtures commonly employed in extraction protocols, as follows: ACN/H_2O (6 mL; 5/1, v/v), ACN with 1% FA (5 mL), ACN/H_2O with 1% FA (6 mL; 5/1, v/v), MeOH (5 mL), and MTBE/H_2O (6 mL; 5/1, v/v).

The ACN/H_2O/1% FA mixture was the most effective in extracting the maximum quantity of PFASs from milk, as indicated by the intensity of the signals (**Figure 35**) and the signal-to-noise (S/N) ratio (Table S2). This mixture also resulted in low background noise (Table S2), highlighting its efficiency. In comparison, the ACN/H_2O mixture provided equivalent signal intensity for non polar PFASs (those with retention times exceeding 5 minutes) but failed to extract some more polar PFASs, those exhibiting shorter retention times, i.e. PFOA, PFHxA, and PFBS, that were either not detected (**Figure 35**) or displayed very low S/N ratios (Table S2). Conversely, the ACN/FA mixture was selective for polar PFASs (**Figure 35**), emphasizing the complementary nature of the ACN/H_2O/FA extraction method. This mixture offers a balanced solution for extracting both polar and apolar PFASs. Among the other solvents tested, MeOH only extracted apolar PFASs (**Figure 35**), similar to ACN/H_2O, but with lower S/N

ratios (Table S2). The MTBE/H_2O solvent allowed extraction of all targeted PFASs (**Figure 35**), but the S/N ratioswere lower than those obtained with the ACN/H_2O/FA mixture (Table S2).

The highest concentrations of 4 PFASs measured in the samples, calculated relative to the added internal standards (Figure S1), suggest that the ACN/H_2O/FA mixture provides superior detection sensitivity and better yields for extracting a wide range of PFASs from milk. This mixture's effectiveness is further supported by its widespread use in various food matrices beyond milk, as evidenced in a total diet study, demonstrating its versatility and reliability in extracting PFASs from diverse food types

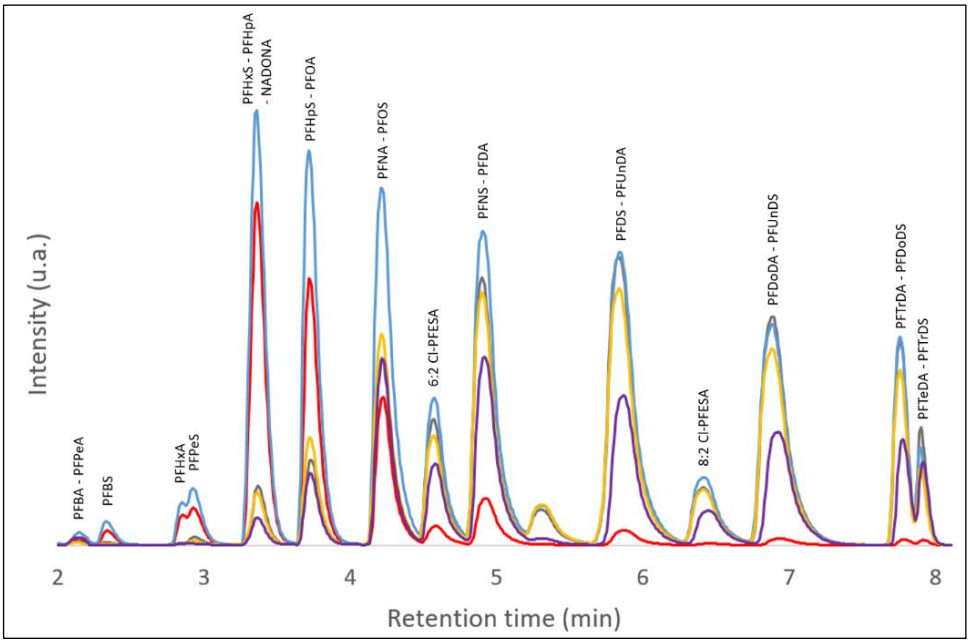


Figure 35. *Relative signal Intensities (TICs) observed by LC-(ESI-)MS/MS for the analysis of PFASs in spiked milk (10 ng/mL) extracted by QuEChERS comparing 5 different solvent mixtures: ACN/H2O (grey), ACN/FA (red), ACN/H2O/FA (blue), MeOH (yellow) et MTBE/H2O (purple)*

(Genualdi *et al.*, 2022). This is particularly important in the context of current regulatory frameworks, where achieving high sensitivity in detection is essential, especially when dealing with low-concentration compounds.

As a result, this ACN/H_2O/FA mixture has been selected for further development.

As for the fish matrix, a large number of protocols in the literature report the extraction of PFASs using a MeOH/KOH mixture (Rivière *et al.*, 2014). Consequently, the ACN/H_2O with 1% FA (6 mL; 5/1, v/v) mixture previoulsy selected for extracting milk was compared to MeOH/KOH (0.01 M; 5 mL), in

different fatty and lean fish mixtures. Samples were spiked with both the labelled (1.7 $ng.g^{-1}$ w.w) and the PFASs mix (1.7 $ng.g^{-1}$ w.w). The results (Table S2) show that 90% of the targeted PFASs exhibit improved S/N ratios, ranging from 2 to 13 times higher, when extracted using ACN/H_2O/FA compared to MeOH/KOH. However, there were some exceptions, such as PFOA for which the S/N ratio decreased by a factor of 3.

Based on the results presented above, for both milk and fish samples, the best extraction conditions were achieved with ACN/H_2O/FA. This method not only efficiently extracts all 28 targeted PFASs, but its ability to accommodate a wide range of physicochemical properties suggests that it has the potential to capture additional, potentially unknown PFASs present in food items, thus expanding the chemical space that can be extracted.

3.1.2. Extraction salts

In QuEChERS methods, two main salt compositions are commonly reported in the literature for the extraction step (Genualdi *et al.*, 2022; Roberts, McNaughtan et de las Heras Prieto, 2023). Their performance was compared to determine which provides the highest signal-to-noise (S/N) ratios, specifically using either a mixture of $MgSO_4$/NaCl (600 mg; 4:1, w/w) or NaCl alone (600 mg), as detailed in Table S2. The addition of NaCl alone allows the extraction of over 80 % of the 28 PFASs targeted with a S/N ratio up to 2.5 times higher. The $MgSO_4$ / NaCl mixture did not provide better results, except in rare cases where the S/N ratio was similar or slightly greater than with NaCl alone (e.g. for PFOS or PFTrDS, with S/N 1.1 and 1.5 times greater, resp.) (Table S2). This study did not demonstrate $MgSO_4$ was essential in the salting-out step, unlike what is often reported in the literature. As a result, adding only NaCl to this step was selected as a fast and efficient method.

Whereas literature protocols indicate that the extraction process is generally performed at room temperature for at least 15h (Rivière *et al.*, 2014), this parameter was also investigated at 4 °C and -20 °C to allow a better separation between the organic phase and the aqueous phase. Surprisingly, the

results show that this parameter does not have a major impact (Table S2), and was consequently set at -20 °C.

3.1.3. Purification step

Then, because of the complexity of some food matrices, a clean-up step of the extracts is crucial in sample preparation in order to increase detection performance such as sensitivity and selectivity. Although numerous purification methods have been reported in the literature, some methods appear to be more suitable depending on both the matrice and the selected PFASs (**Tableau 3**). To eliminate interferents while preserving the analytes of interest, the second part of the protocol QuEChERS (d-SPE step) must therefore resolve this difficult stage. Consequently, $MgSO_4$/C_{18}/GCB was selected for the d-SPE step as it is considered in the literature to be the best performing and most frequently used (Lacina *et al.*, 2011; Genualdi *et al.*, 2022; Taylor et Sapozhnikova, 2022). Additionnaly, dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME), using 10 % NaCl solution and chloroform, which is used in the reference method, was tested. The DLLME method increases the size of the extraction solvent contact surface, resulting in a higher enrichment factor (Leong, Fuh et Huang, 2014). Finally, and because of the risk of eliminating compounds of interest during this purification step, the performance of an extraction method without purification on increasing S/N ratios should also be compared. Because this crucial step also heavily depends on the matrix properties, those three conditions have been tested in various fish an milk and the outcome presented in Figure S2.

The same trends in results were observed in these very different matrices (Figure S2). Indeed, the DLLME purification allows detection with the highest S/N ratios of apolar PFASs. However, d-SPE step or no cleaning enabled extracting more polar PFASs, with S/N ratios up to 4 times higher using d-SPE, than the DLLME method. The DLLME protocol was further investigated, highlighting the presence of several polar PFASs in the unprocessed aqueous phase, and was therefore unsuitable to extract all targeted PFASs. These results clearly illustrate the difficulty of finding compromises when addressing

compounds with such diverse physico-chemical properties. Finally, the d-SPE method was selected as the best compromise for the purification step for both milk and fish samples (Figure S2).

As an additional lever to increase the detection sensitivity of analytes, the volume of recovery solvent, was therefore reduced from 130 µL to 90 µL, allowing a reasonable concentration of analytes without altering the quality of the signal.

3.1.4. Additional purification step

Finally, optimisation of the various QuEChERS parameters enabled optimal extraction of the 28 PFASs initially targeted in the study. Although a slight white deposit, probably salt due to the use of NaCl without $MgSO_4$, was observed on the cone of the LC-MS/MS instrument, the quantification of the analytes was not affected. In order to move towards a more global and less targeted workflow, these extracts were then analysed by LC-HRMS to anticipate future developments in this work. Clogging of the transfer capillary was observed, resulting in the implementation of a further purification step, as already reported as necessary in the literature, with all the challenges associated with adding such a step which must not compromise PFASs recovery (Roberts, McNaughtan et de las Heras Prieto, 2023).

Although this desalting step can be performed using SPE, alternative options were explored in order to preserve the simplicity and rapidity of the QuEChERS protocol. Consequently, two purification steps were assessed, alone or in combination, to address this crucial step: a PD-10 desalting column and a Omega 10 KDa membrane which performances were compared to the previously optimsed QuEChERS method, which does not involve any additional purification step (Table S2).

The extracts desalted using PD-10 were filtered through a 10 kDa cut-off membrane filter due to their opacity, and the quality of the signal was not deemed acceptable, based on an S/N ratio reduction of up to 5 times, compared with the optimised method. An additional purification step using a 10 kDa centrifugal filter improved signal clarity by reducing background noise, leading to up to a threefold increase in the signal-to-noise ratio for more than 75% of the PFASs (Table S2). This filter was chosen to minimize matrix interferences while preserving both the analytical equipment and its performance.

3.1.5. Comparative analysis of two sample preparation protocols for food analysis

The study then focused on applying both the SPE method, which serves as the reference protocol, and the optimized QuEChERS protocol to twenty food samples of animal origin, representative of typical consumption in France. Each PFAS was spiked into the samples at concentrations of 1, 5, and 10 $\mu g \cdot kg^{-1}$ (wet weight), in accordance with the concentration levels established for fish in Regulation 2022/2388, specifically for the four compounds PFOS, PFOA, PFNA, and PFHxS (European Commission 2022a). To compare the performance of the two protocols, the four regulated PFASs were quantified in 20 matrices using both the SPE and QuEChERS sample preparation methods, coupled with LC-MS/MS analysis. The concentrations of each PFAS at 1, 5, and 10 $\mu g \cdot kg^{-1}$ were determined, and the mean and standard deviation for each level were calculated. The results presented in **Figure 36** confirm the capabilities of both protocols to deliver quantitative results although a slight dispersion of the quantified values is observed as the concentration of PFASs increases, especially for the QuEChERS method. As illustrated in Figure S3, this dispersion is strongly dependent on the matrix studied. For example, a slight dispersion is observed in crustaceans, unlike in fish, and the same trends were observed for the other PFASs. These results therefore allow us to conclude about the suitability of the QuEChERS protocol to deliver quantitative results for the 28 PFASs in various matrices of animal origin. The next step is to apply this generic sample preparation in a non-targeted workflow involving HRMS acquisition, aiming to evaluate the potential for expanding the chemical space of PFASs accessible for analysis.

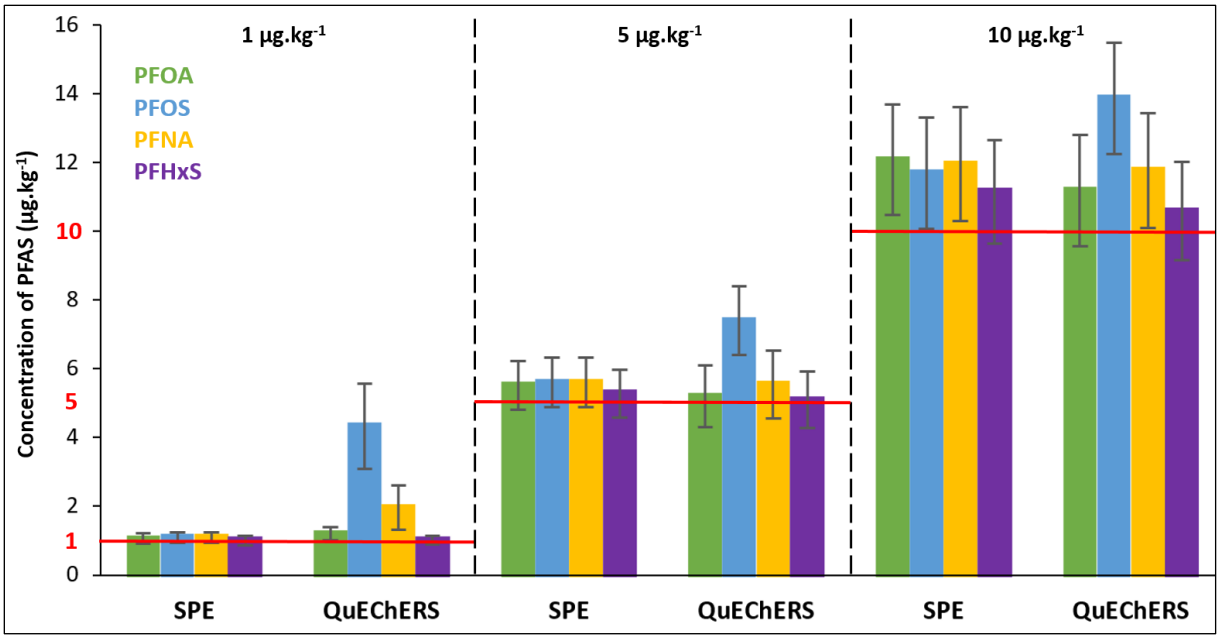


Figure 36. *Concentrations of 4 selected PFASs (PFOA, PFOS, PFNA, PFHxS) measured by LC-MS/MS following the application of either the SPE or QuEChERS extraction protocol, with supplementation at three levels (1, 5, and 10 µg·kg⁻¹, wet weight) across 20 food items*

3.2. Application of the QuEChERS protocol to the search for the presence of additional PFASs

The same twenty food samples of animal origin (3 eggs, 4 molluscs and crustaceans, 5 fish, 5 meats, and 3 dairy products) used for method development, where spiking was necessary, were extracted using the optimized QuEChERS protocol without any spiked compounds. This step aimed to investigate the 'native' PFASs contamination of these samples. In order to continue the comparison between the two extraction protocols to the end, these 20 samples were also extracted by SPE.

3.2.1. Suspect Screening (SS)

The 20 extracts obtained after applying both protocols were analyzed by LC-HRMS and the acquired data first processed by Skyline software. Identification was performed according to an in-house database, including the 28 PFASs.

The characterization of the 20 food items using the suspect screening (SS) approach, i.e. based on QuEChERS extraction and LC-HRMS analysis, led to the establishment of specific contamination profiles for each food category. In total, 2 PFASs (PFBA and PFOA) were detected in meat and dairy samples, 4 in fish (PFBA, PFPeA, PFHpA and PFOA) and shellfish (PFBA, PFPeA, PFHxA and PFOA), and up to 6

(PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA and PFNA) in egg samples. These findings are consistent with existing occurrence data reported in the literature, confirming the higher susceptibility of certain food matrices—particularly eggs and aquatic products—to PFAS contamination (EFSA, 2020). This initial screening phase thus provided a solid basis for further investigation by non-targeted analysis. Further, this approach made it possible to detect some PFASs compounds that were not extracted by the protocol using SPE, such as PFPeA in egg and crustacean samples (**Figure 37**), and PFOA, PFHxA, PFHpA and PFBA in eggs, meat and dairy products samples (Figure S4).

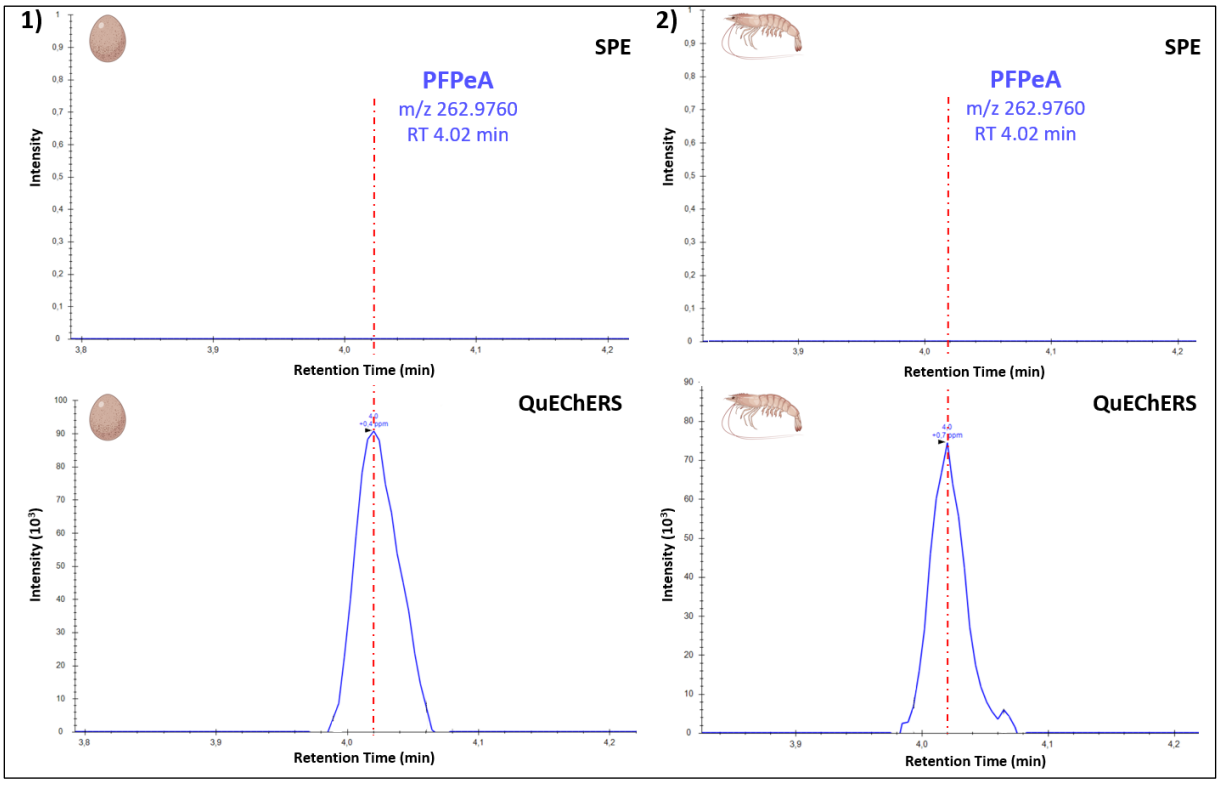


Figure 37. *Chromatographic profiles of PFPeA obtained from (1) an egg sample and (2) a crustacean sample in SS acquisition mode, comparing the extraction protocols: SPE and QuEChERS*

In addition, while QuEChERS demonstrates its broader capacity to extract PFASs compared to SPE, this study also highlights some limitations, particularly for PFASs with higher molecular weights (> 550 g/mol), such as PFNA. These compounds may be adsorbed onto the 10 kDa filter, which has been employed in biological applications (Vergauwen *et al.*, 2017). However, to the best of our knowledge, no previous studies have specifically investigated the impact of this filter on the analysis of PFASs. It thus appears that there is complementarity between QuEChERS, particularly effective for PFASs with

Mw <500 $g.mol^{-1}$, and SPE that would be more suitable for those with higher Mw. As most emerging PFASs are short aliphatic chain (≤ C7) compounds (Capriotti *et al.*, 2013), the QuEChERS protocol developed in the present study shows great potential to address their monitoring and extend the number of relevant PFASs analyzed in foods. Based on these promising results, an NTS approach was initiated, involving specific data processing and prioritization strategy enabling non-targeted search for compounds.

3.2.2. Non-Targeted Screening

To further explore the detection of additional PFASs, a non-targeted data processing strategy was subsequently implemented to prioritise signals to be investigated. Previously acquired LC-HRMS data were processed using Compound Discoverer for automated feature annotation. PFASs prioritization relied on the mass defect associated with fluorine atoms to isolate potential candidates. In this exploratory framework, m/C versus md/C representation and KMD plots (**Figure 38**) proved particularly useful, as they allow the visualization of structurally related compounds with varying masses, facilitating the identification of novel series of PFASs homologues (Kaufmann *et al.*, 2022; Joerss et Menger, 2023).

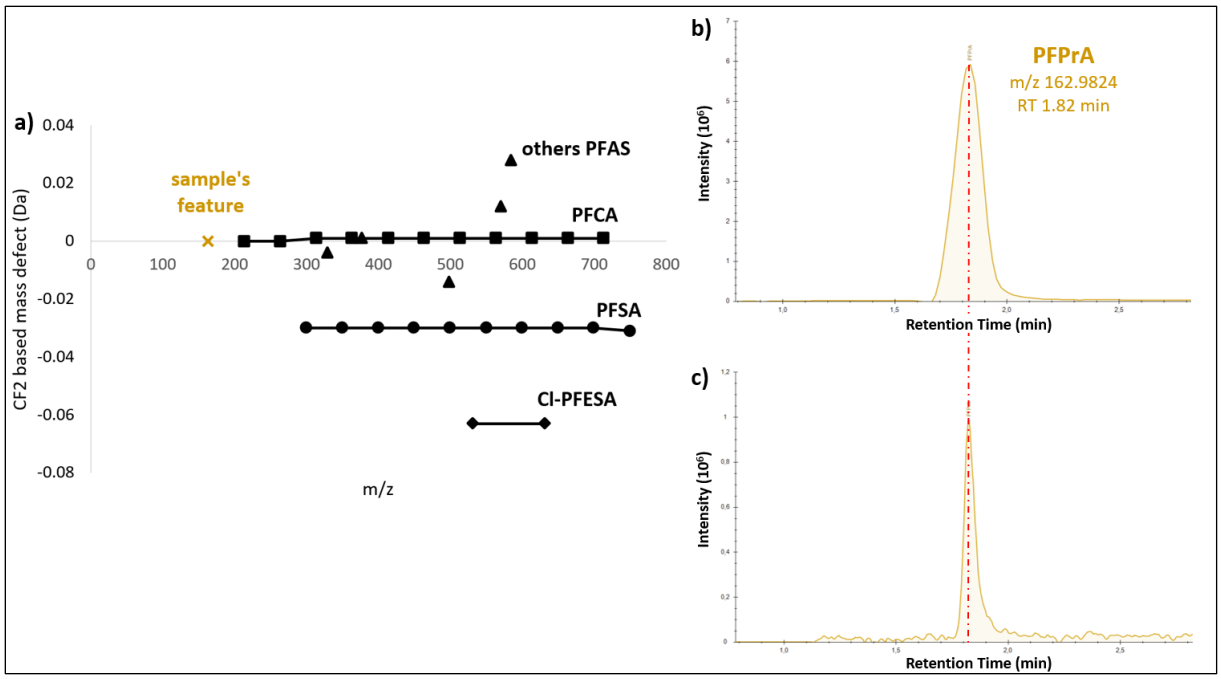


***Figure 38**. a) Kendrick mass defect for CF2 repeating unit vs m/z of 28 PFASs standard listed in our internal database and classified by family: PFCA (n = 11), PFSA (n = 10), Cl-PFESA (n = 2) and others PFASs (n = 5). Homologous series are identified by shifts in the x-axis divisible by 49.9968 (CF2) and the same CF2 normalized mass defect. In yellow, a suspect PFASs signal highlighted by NTS data processing. b) Chromatogram profile for PFPrA standard. c) Chromatogram profile for PFPrA in an egg sample*

The application of the NTS workflow to the different foodstuffs confirmed the suitability of the overall strategy (QuEChERS + HRMS) by successfully detecting PFASs compounds already identified through targeted or SS (e.g., PFOA) approaches (**Figure 38**a).

More importantly, this approach, through the data processing and signal prioritization strategy implemented, led to the detection of a previously unlisted compound (**Figure 38**a). Mass defect plots have thus been used to determine PFASs homologous series. In this case, the masses of the 28 PFASs initially involved in the study were normalized to CF2 leading to the normalized mass defect plot in **Figure 38**a. Visualization in a CF2-based Kendrick mass defect plot easily allows a first overview on the data since compounds belonging to the same class are aligned horizontally. Most of the 28 PFASs could thus be observed across 3 main homologous series based on similar normalized mass defect for a series and mass differences divisible by 49.9968 (CF2). By applying this strategy to the food samples studied in this study, an unknown signal aligned with the perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCA) series was

detected in an egg (***Figure 38***a). Specific study of this signal, in particular the m/z and the associated fragmentation profile, led to the hypothesis that it was perfluoropropanoic acid (PFPrA) (Figure S5). Since this compound was not included in the reference list of the targeted method or our database, it remained undetected in both the targeted and SS approaches. To validate this finding an analytical standard of PFPrA was acquired, allowing its identification to be assigned a confidence level of 1a (***Figure 38***b et c), in accordance with current reference standards in this field (Charbonnet et al. 2022). This study represents the first known detection of Perfluoropropanoic acid (PFPrA) in food, specifically in eggs. Although PFPrA has been previously identified in environmental matrices such as both potable (treated) and non-potable water sources (Lenka, Kah et Padhye, 2022; Liang, Steimling et Chang, 2023), its presence in foodstuffs has not been reported until now. This finding raises important concerns regarding the potential transfer of PFPrA through the food chain, highlighting the need for further investigation into its bioaccumulation and associated health risks.

3.3. Limitations and future directions

- The strategy involved developing a sample preparation method optimized for known PFASs (n = 28) and then applying it to uncover previously unmonitored compounds. This approach successfully led to the identification of perfluoropropanoic acid (PFPrA), a PFAS not typically extracted using standard methods such as SPE. However, one limitation of this strategy is that the method was initially designed based on a selected subset of known PFASs, primarily those regulated or commonly monitored. As a result, it may not have been fully optimized for extracting other PFASs with significantly different physicochemical properties, such as ultra-short-chain PFASs or highly functionalized derivatives. This constraint could have impacted the detection of additional unknown compounds, highlighting the need for further refinement of extraction conditions to encompass an even broader range of PFASs.
- At the end of the sample preparation protocol, an additional purification step was necessary to ensure the removal of residual impurities. A desalting column and an additional filter were

therefore tested. However, studies such as (Taylor et Sapozhnikova, 2022) have highlighted ultracentrifugation as a highly effective purification method. Given its potential to improve the overall process, evaluating ultracentrifugation could be a valuable next step. This approach will be considered in future studies to assess its ability to further enhance the purity and sensitivity of the final samples for PFASs detection.

- Regarding data acquisition, while Data-Dependent Acquisition (DDA) mode is ideal for focusing on the most abundant ions, technical limitations necessitated the use of Data-Independent Acquisition (DIA) mode in our study. DIA however provides comprehensive data by fragmenting all precursor ions across the chromatogram, increasing the likelihood of identifying unknown compounds, including novel PFASs.

4. Conclusion

This aim of this study was to develop a suspect and non-targeted approach to identifying PFASs in addition to those traditionally monitored in foodstuffs. To achieve this topical but difficult objective, several levers were studied and combined: sample preparation, analytical method, and data processing. Sample preparation for the extraction of PFASs in food samples is known as a challenge due to the complexity of the matrix and the presence of these contaminants at low levels. To develop a broader extraction method, such as a QuEChERS-type method supported by the literature, various parameters with a major impact on the extraction and detection of compounds of interest were investigated and optimized. Focusing on 28 targeted PFASs in various commercial foodstuffs (n = 20), our study demonstrated the potential of the QuEChERS protocol to extract PFASs that have not been extracted using the SPE method currently in use.

In addition, this study demonstrates, for one of the first times, the successful application of a non-targeted screening (NTS) strategy—traditionally used for environmental matrices—to the analysis of foodstuffs. By combining an optimized QuEChERS extraction with HRMS data acquisition and advanced prioritization workflows, this approach expands the analytical scope beyond conventional targeted

methods, enabling the detection of both known and previously unlisted PFASs. The identification of perfluoropropanoic acid (PFPrA) in an egg sample highlights the potential of this strategy to uncover overlooked contaminants in the food chain.

These findings open new perspectives for the surveillance and regulatory control of PFASs in food using HRMS-based strategies, supporting risk assessors and public authorities in their efforts to better characterize and mitigate consumer exposure to these persistent contaminants.

Acknowledgments

This work was funded by Anses (EMERGEXPO project) and the Pays de la Loire Region (France) (arrêté 2022-09694). The authors would also like to thank Frédéric Larvor and Rémi Roger, LABERCA, for their technical assistance.

CRediT author statement

Cassandre Jeannot: Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. ***Nicolas Macorps***: Investigation. ***Bruno Le Bizec***: Conceptualization, Funding acquisition. ***Julien Parinet***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Writing - Review & Editing. ***Gaud Dervilly***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Validation, Writing - Review & Editing

Declaration of Competing Interest

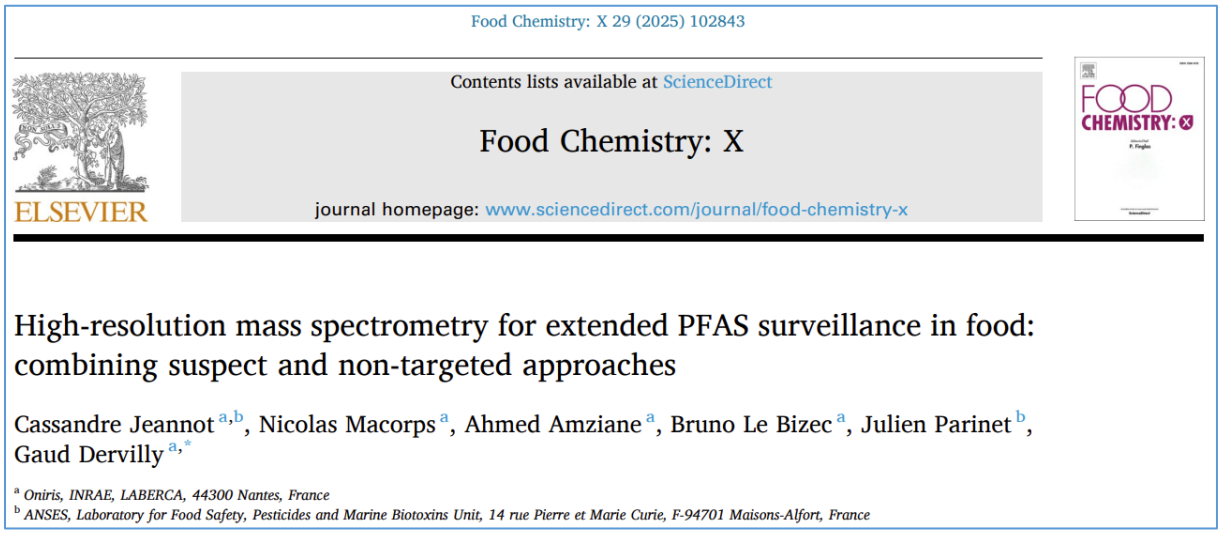
The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

****

Principaux résultats liés aux développements méthodologiques

- Un protocole d'extraction de type QuEChERS a été développé et optimisé pour maximiser l'extraction des PFAS dans des matrices alimentaires modèles complexes. Ce protocole repose sur un mélange ACN/H_2O/FA comme solvant d'extraction, l'ajout de NaCl comme agent salin, suivi d'une étape de purification d-SPE utilisant un mélange $MgSO_4$/C_{18}/GCB.
- Le criblage suspect des 20 DAOA sélectionnées a révélé la présence de jusqu'à 6 PFAS (PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA and PFNA) dans les œufs, 5 (PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA) dans les produits de la pêche et 2 (PFBA and PFOA) dans les viandes et produits laitiers, soulignant une variabilité importante des profils de contamination selon les matrices.
- L'acquisition HRMS combinée à des outils de visualisation avancés dans Compound Discoverer (notamment les représentations KMD plots ou *m/z* vs MD) a permis une priorisation efficace des signaux fluorés, facilitant le tri des jeux de données complexes, et ainsi l'identification de PFAS potentiels.
- L'acide perfluoropropanoïque (PFPrA), un composé non inclus dans la base de données initiale, a été identifié dans un échantillon d'œuf, illustrant la capacité de la stratégie développée à révéler des contaminants émergents absents des listes cibles classiques.
- Cette approche intégrée — combinant extraction non spécifique, analyse HRMS, criblage suspect et non ciblé, et traitement de données performant — permet de couvrir un spectre plus large de PFAS (connus et émergents) que les méthodes ciblées conventionnelles.
- La méthodologie développée constitue un outil de surveillance précoce des contaminants émergents dans l'alimentation, et pourra être déployée sur d'autres matrices alimentaires pour enrichir les connaissances sur l'exposition du consommateur et soutenir les démarches d'évaluation des risques et de gestion sanitaire. Ces résultats font l'objet de l'**Article 2** du manuscrit.

Article 2 : High-resolution mass spectrometry for extended PFAS surveillance in food: Combining suspect and non-targeted approaches



Food Chemistry: X 29 (2025) 102843

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry: X

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/food-chemistry-x

High-resolution mass spectrometry for extended PFAS surveillance in food: combining suspect and non-targeted approaches

Cassandre Jeannot [a,b], Nicolas Macorps [a], Ahmed Amziane [a], Bruno Le Bizec [a], Julien Parinet [b], Gaud Dervilly [a,*]

[a] Oniris, INRAE, LABERCA, 44300 Nantes, France
[b] ANSES, Laboratory for Food Safety, Pesticides and Marine Biotoxins Unit, 14 rue Pierre et Marie Curie, F-94701 Maisons-Alfort, France

Food Chemistry: X. 29, 102843. 2025. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102843 IF 8,2.

Contribution de l'autrice

En complément des échantillons représentatifs de la consommation alimentaire française, ce travail visait également à explorer des matrices plus susceptibles de contenir des PFAS émergents. En effet, bien que les 20 denrées issues de l'étude précédente présentent l'avantage d'être représentatives des habitudes alimentaires nationales, elles se sont révélées globalement peu contaminées, limitant ainsi les possibilités de mise en évidence de nouveaux composés. Afin de renforcer le potentiel de détection, 38 échantillons supplémentaires ont donc été intégrés. Ils proviennent de différents projets de recherche et de surveillance menés dans plusieurs pays sur des zones identifiées comme fortement contaminées par les PFAS. Une partie de ces échantillons a notamment été collectée dans le cadre d'une étude de type EAT réalisée en Algérie, dans le cadre d'un précédent travail doctoral. L'ensemble des échantillons, préalablement lyophilisés, broyés, conditionnés et conservés à température ambiante par les équipes partenaires, a été regroupé et préparé par mes soins en vue de l'analyse.

Pour leur traitement, j'ai appliqué la méthodologie non ciblée développée lors de l'étude précédente, incluant le développement du protocole de préparation d'échantillon par moi-même (QuEChERS), et l'optimisation des étapes d'analyse des extraits (LC-HRMS) et de traitement des données (CD) en collaboration avec Nicolas Macorps. J'ai appliqué cette stratégie de recherche QuEChERS-LC-HRMS-CD à l'ensemble des échantillons de la présente étude.

Concernant la rédaction de l'article, j'ai rédigé une première version complète, incluant le résumé, les points forts, les figures, les tableaux et les informations complémentaires (Supplementary Information). Cette version a d'abord été relue et corrigée conjointement avec les encadrants du projet. Une fois le manuscrit consolidé, il a été soumis à l'ensemble des co-auteurs pour une relecture approfondie et des suggestions de modifications. Le processus de révision en réponse aux commentaires des évaluateurs a suivi la même démarche collaborative.

****

Highlights

- SS/NTS approaches reveals 21 different fluorinated compounds in food samples.
- PFPrA identified for the first time in commercial foods.
- 6:2 FTS, Fipronil and Fipronil sulfone are observed in eggs from hotspot areas.
- Hotspot samples support prioritization of emerging PFAS signals.
- HRMS-based strategy broadens PFAS detection for more accurate risk assessment.

Abstract

Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) are persistent, potentially harmful synthetic chemicals. While they can accumulate in foodstuffs, current monitoring often targets only a few compounds, likely underestimating dietary exposure. In this study, 58 food samples from Europe and North Africa—including commercial products and items from known European contamination hotspots—were analyzed using a validated high-resolution mass spectrometry workflow combining suspect screening (SS) and non-targeted screening (NTS). Seventeen PFAS were confirmed through SS, with up to 15 different PFAS in fish samples from hotspots. While NTS revealed four additional fluorinated substances: Perfluoropropanoic acid (PFPrA) detected in 48 % of samples, 6:2 Fluorotelomer sulfonic acid (6:2 FTS), Fipronil, and Fipronil sulfone. These results highlight the geographical variability of PFAS contamination in food and demonstrate the value of combined SS/NTS approaches in identifying both known and emerging PFAS, supporting more comprehensive, regulation-aligned risk assessments.

Keywords Fluorinated contaminants, Environmental hotspots, Chemical surveillance, Food safety monitoring, Emerging pollutants, Exposure variability

1. Introduction

Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) have been used since the 50s and are widely applied in various industrial and commercial products owing to their unique properties (e.g. excellent thermal and chemical stability) (Glüge *et al.*, 2020). According to the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) definition, PFAS are a large group of synthetic organic chemicals containing at least one fully fluorinated methyl or methylene carbon atom (Wang *et al.*, 2021). The OECD's broadening of the definition of PFAS has made it possible to include a greater number of substances, including new-generation alternatives, but has also led to the inclusion of substances with different uses, such as fluorinated pesticides (Wang *et al.*, 2021). More recently, in order to simplify and include even more compounds in this group, the Environmental Protection Agency (EPA) has introduced a new definition of PFAS that "*removes the requirement that the structure is entirely aliphatic, and only*

requires that the minimal fully fluorinated methyl or methylene group is saturated and aliphatic" (Gaines, Sinclair et Williams, 2023). Certain compounds within this broad class of chemicals are considered persistent organic pollutants (POPs), due to their persistence, bioaccumulation, and toxic properties leading to the inclusion of some of them (such as perfluorooctane carboxylate (PFOA), perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorohexane sulfonate (PFHxS)) in the annexes of the Stockholm Convention. They are further associated with numerous health risks, and recently, the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the Cancer Agency of the World Health Organization (WHO) have highlighted the carcinogenicity of PFOA to humans, and the possible carcinogenicity of PFOS to humans (Zahm *et al.*, 2024). The growing concern over PFAS contamination in food stems from their persistence and potential to bioaccumulate, leading to serious health risks such as immunosuppression, reduced vaccine efficacy. These compounds often escape detection due to limitations in current regulatory frameworks and food safety monitoring programs, which typically target only a narrow subset of PFAS. This gap underscores the urgent need for more comprehensive surveillance and risk-assessment strategies to ensure effective public health protection (Government of France, 2024).

Commonly referred to as legacy PFAS, PFOA and PFOS are long-chain compounds containing eight carbon atoms (C8). Following restrictions on their use, shorter-chain PFAS (C < 8), also known as short-chain PFAS (scPFAS) have been increasingly used as alternative to long-chain PFAS. However, these new PFAS are no less toxic (Zheng, Eick et Salamova, 2023), and PFHxS was included in the Stockholm Convention 13 years after the first two. Despite assumptions related to their smaller molecular size, recent studies have demonstrated that scPFAS are equally persistent and bioaccumulative. Moreover, they exhibit long-range environmental transport potential and have already been detected across various environmental compartments (e.g. indoor dust, air, drinking water, soil, sediment, and aquatic systems) (Zheng, Eick et Salamova, 2023). As a result, these substances are ubiquitous environmental contaminants, commonly detected in humans and food (Ng *et al.*, 2021) one of the primary pathways

of exposure to PFAS (EFSA, 2020). Among food categories, fish, seafood and eggs are regarded as the primary contributors to PFAS exposure through the human diet (EFSA, 2020; Chiumiento *et al.*, 2023).

In 2020, the European Food Safety Authority (EFSA) revised the Toxicological Reference Values for PFAS significantly downwards, and set a tolerable weekly intake (TWI) for the sum of the four (PFOA, PFOS, perfluorononanoic acid (PFNA) and PFHxS) at 4.4 ng/kg bw/week. As a result, maximum levels in certain foodstuffs have been defined for these 4 compounds (European Commission, 2022c). This shift in PFAS risk assessment and risk management in food has been accompanied by efforts to develop more sensitive and specific analytical methods to improve associated monitoring (EFSA, 2020; European Commission, 2022b).

However, and although a few other PFAS are also listed as of interest to be monitored in foods (around twenty), it has to be said that this effort only concerns a minor fraction of the thousands of compounds meeting the PFAS definition. This number is rising steadily, from over 4,700 in 2018 (Wang *et al.*, 2021) to over 7 million PFAS reported in PubChem, 5 years later (Schymanski *et al.*, 2023).

To address the challenge of expanding PFAS surveillance, a shift towards broader analytical coverage was necessary. Recent non-targeted profiling technologies facilitate the global evaluation of the chemical exposome, enabling the detection of a wider range of chemicals. These strategies rely on three main approaches to broaden the PFAS chemical space: non-specific sample preparation methods, such as QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) due to its simplicity and efficiency, high-resolution mass spectrometry (HRMS) data acquisition, and data processing techniques that prioritize fluorinated signals.

HRMS has been increasingly employed to identify novel PFAS (Ren *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022; Feng *et al.*, 2024). There are two primary strategies for PFAS identification: suspect screening (SS) and non-target screening (NTS). SS is the most straightforward approach, especially when reference MS/MS (tandem Mass Spectrometry (MS^2)) spectra are available (Diallo *et al.*, 2023a; Makni *et al.*, 2024). In contrast, NTS is essential for identifying novel PFAS when no suspect list exists, and it relies on

fragment-based and/or homologue-based screening. HRMS plays a crucial role by providing accurate mass data vital for identifying unknown contaminants. Since PFAS typically occur in homologous series, HRMS data, combined with homologue patterns or mass defects, can help identify PFAS homologues, distinguished by their accurate mass, elution order, and characteristic patterns (e.g., CF_2, C_2F_4, CF_2O). Visualization through a CF_2-based Kendrick mass defect (KMD) plot facilitates identification, as compounds from the same class align horizontally (Liu, Pereira et Martin, 2015; Ren *et al.*, 2022). For HRMS data processing, software tools such as Compound Discoverer (CD) and FluoroMatch are commonly used, offering high-performance solutions for signal prioritization and identification of perfluorinated compounds (Ogunbiyi *et al.*, 2023; Stroski *et al.*, 2024).

This broader analytical approach supports improved risk assessment and breaks with conventional targeted approaches. Our previous work (Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025) demonstrated as a proof of concept the effectiveness of a QuEChERS / LC-HRMS (Liquid Chromatography coupled to HRMS) non-targeted workflow in identifying a previously unlisted PFAS in an egg sample, proposing a high-performance strategy to expand PFAS analyzed in foodstuffs. The objective of this study is to apply a combined SS/NTS strategy to a broad range of food samples representative of the European diet, while also extending the investigation to North Africa. PFAS contamination in foodstuffs is well-documented across Europe, particularly in fish and seafood. In this context, it is relevant to explore whether similar contamination patterns exist in other regions. Preliminary data from Algeria (Amziane *et al.*, 2022) also indicate elevated PFAS levels in fish, suggesting potential parallels in environmental and dietary exposure. To enrich the continental-scale analysis, we strategically included a targeted set of food samples collected from private individuals living in well-documented contamination hotspots across Europe. These high-exposure samples were selected not only to evaluate the applicability and robustness of the SS/NTS approach under more extreme conditions, but also to inform signal prioritization strategies. This cross-continental approach with real-life scenarios aims to better characterize regional PFAS contamination patterns, ultimately supporting more comprehensive risk assessment efforts.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Sodium Chloride (NaCl) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany), HF Bond Elut – C_{18} was obtained from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) and Magnesium Sulfate ($MgSO_4$) from ThermoScientific. Acetonitrile (ACN) was from Honeywell, and formic acid (FA) and supelclean ENVI-Carb SPE (solid-phase extraction) tube from Supelco (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Ultrapure water (>14 MΩ.cm) and water for LC-HRMS from VWR (Radnor, PA, USA) were used.

For SS analysis, 28 PFAS compounds along with 15 labelled reference compounds were used as standards and internal standards (Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025). At a later stage, to improve and expand the non-targeted method, additional PFAS standards (17 non-labelled PFAS and 5 isotopically labelled PFAS) were acquired, thereby broadening the analytical scope. All the PFAS standards were sourced from Wellington Laboratories and Cambridge Isotope Laboratories, as detailed in Table S1. A 'PFAS mix' solution containing the 45 analytical standards, was thus prepared in methanol at a concentration of 0.01 ng/µL for each compound. A separate solution containing the 20 labeled PFAS, including 5 additional compounds purchased, used as internal standards was also prepared in methanol at 0.01 ng/µL for each compound. Additionally, a solution of 13C8 PFOS was prepared in methanol (0.01 ng/µL) as an external standard.

2.2. Investigated samples

This study focused on foods known to contribute to consumer exposure to PFAS. **France.** A set of twenty samples whose origin was described in (Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025) was further characterized: 3 eggs, 4 crustaceans, 5 fish, 5 meat products, and 3 dairy products. **Algeria.** A sub set of 20 samples previously characterized using a targeted PFAS approach has been selected as follows: 5 eggs, 10 fish, and 5 meat samples (Amziane *et al.*, 2022). **European contamination hotspots.** Eighteen samples were collected from private individuals living in known PFAS contamination hotspots in Europe: 13 eggs and 5 fish. A total of 58 samples, collected in Europe and North Africa between 2019

and 2021, were thus investigated, and were stored at -20 °C until analysis. **Figure 39** shows the distribution of the 58 food samples by food category, highlighting an apparent over-representation of eggs and fish due to the inclusion of additional samples from individuals living in PFAS-contaminated European hotspots. Detailed information on the samples analyzed, including their origin, is provided in Table S2.

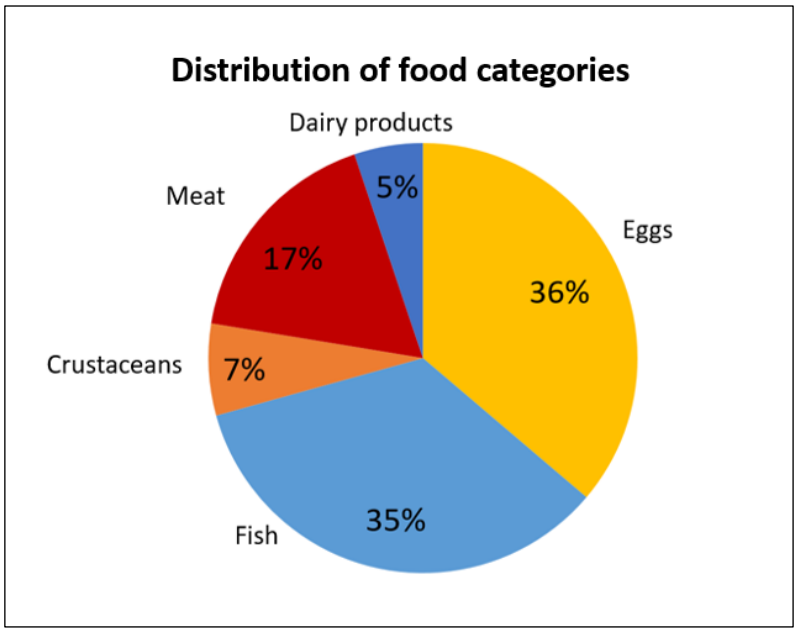


Figure 39. *Distribution of the 58 food samples analyzed, grouped by food category (n = 5), regardless of their origin (France, Algeria, or European hotspots).*

2.3. Sample preparation

All samples were extracted using the QuEChERS protocol described previously (Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025). Briefly, samples (150 mg) were spiked with internal PFAS standards solution (1 $ng.g^{-1}$ wet weight (w.w)), and extracted with H_2O, and ACN containing 1% FA. Then, 600 mg NaCl were added and the sample were stored overnight at -20 °C. Supernatants were evaporated under nitrogen to 1 mL, further cleaned-up by dispersive-SPE (d-SPE) with anh. $MgSO_4$, C_{18} and GCB, and filtered through a 0.22 µm nylon syringe filters. Extracts were dried using nitrogen, reconstituted in MeOH / H_2O, and passed through an Omega 10 kDa membrane into a vial for LC-HRMS analysis.

To assess background PFAS contamination during extraction and analysis processes, an extraction blank sample, without internal standards, was prepared and analyzed identically to the samples.

2.4. Data acquisition and processing

The extracts were analyzed by LC-HRMS for suspect screening (SS) of PFAS for which standards are available (n = 28), and for non-targeted screening (NTS) to identify other potentially present fluorinated substances in the sample.

An Ultimate 3000 UHPLC pumping system coupled to an Orbitrap Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific®, Bremen, Germany) operated in negative electrospray ionization (ESI) mode was used in both full scan and DIA modes. The LC-ESI(-)-HRMS conditions, including the chromatographic column, the phase mobile composition, gradient and some other mass parameters, were previously described (Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025). Briefly, chromatographic separation was performed on a reverse phase C18-column (Hypersil Gold, 100 mm x 2.1 mm i. d., 1.9 µm particle size) equipped with a pre-filter. The total cycle time was 20 min with water 5 mmol.L^{-1} ammonium formate (A) and ACN (B). The injection volume was set to 5 µL, and the elution gradient was as follows: 0-0.5 min, 5 % B; 0.5-8 min, 5-100 % B; 8-14 min, 100 % B; 14-18 min, 100-5 % B; 18-20 min, 5 % B. The temperatures of the column oven and the sample trays were set at 40 °C and 4 °C, respectively.

2.4.1. Suspect screening

In order to identify PFAS included in the database, mass spectra were acquired in full scan mode with a scan range from 65 to 975 m/z at a resolution of 70,000. Some other parameters are detailed in section 2.4.2. Data acquisition was performed by Xcalibur software. SS data analysis was performed using Skyline, a user-friendly open-source software package (MacLean *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2020), for processing raw files acquired in full scan mode and for peak integration, as mentioned in our previous work (Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025).

2.4.2. Non-targeted screening

- Initial Data Processing and Feature Extraction

The full scan raw data were processed using Compound Discoverer 3.3 software to extract candidate compounds, providing information on retention time (RT) and m/z. These candidates were classified by food type and compiled into inclusion lists.

- Data-Independent Acquisition (DIA) for Fragmentation

A second injection was performed to acquire MS/MS spectra in DIA mode using inclusion lists. Acquisition parameters were optimized for efficient fragmentation of up to 30 candidates, with specified source conditions and collision energies as follows: spray voltage 3 kV; s-lens radio frequency 40 AU; sheath gas flow 55 arbitrary units (AU); auxiliary gas flow rate 10 AU; capillary temperature 350 °C; auxiliary gas temperature 300 °C. A stepped normalized collision energy of 10, 30, and 90 electronvolts (eV) was employed. For the first injection, the automatic gain control (AGC) target and the maximum injection time (IT) were set at 1.10^6 and 100 ms, respectively. For the second injection, the AGC target and the maximum IT were set at 2.10^5 and set to auto, respectively. Data acquisition was performed by Xcalibur software.

- Compound Discoverer Workflow

The DIA data were processed using a modified Compound Discoverer workflow adapted from (Kaufmann *et al.*, 2022; Sanchez et Tautenhahn, 2023) (Figure S1). Key nodes included: Input Files → Select Spectra → Align Retention Times → Detect Compounds → Group Compounds. The default settings were used for the Select Spectra and Align Retention Times nodules. The following parameters were used in the Detect Compounds nodes:

(1) General settings.—Mass Tolerance = 5 ppm, Min. Peak Intensity = 1000, Min. # Scans per Peak = 5, Use Most Intense Isotope Only = True
(2) Trace detection.—Max. Number of Gaps to Correct = 2, Min.Number of Adjacent Non-Zeros = 2
(3) Peak detection.—Chromatographic S/N Threshold = 3, Remove Baseline = False, Gap Ratio Threshold = 0.35, Max.Peak Width [min] = 1, Min. Relative Valley Depth = 0.1
(4) Compound detection.—Ions = [M-H]-1; [M+H]+1; [M+Na]+1; $[M+NH_4]+1$, Remove Singlets = True

- Annotation and Library Matching

CD was used to conduct NTS for novel PFAS compounds through the 'Search ChemSpider' and 'Search mzCloud' functions, which allow access to online spectral libraries. In addition, CD facilitated the identification of potential PFAS compounds using the 'Search Mass Lists' and 'Search mzVault' functions, which rely on in-house spectral libraries. These libraries incorporated multiple databases for feature matching, including the US EPA Comptox (PFASTRUCT) database with 10,737 chemicals and the NIST PFAS Suspect List with 4,951 chemicals. In addition to the PFAS already included in our database (n = 28) and used for SS, 17 additional non-labelled PFAS and 5 isotopically labelled PFAS compounds were acquired to cover a broader range of physicochemical properties and to further optimize the non-targeted workflow. An in-house mass list database was also established, comprising 45 PFAS and 20 labeled ones.

- Batch Processing and Blank Subtraction

To control for contamination and improve reliability, blank subtraction was manually performed. Extracts from different food categories were processed within the same batch.

Prioritization strategy for identifying novel PFAS compounds

- Feature Prioritization and Filtering

A custom post-processing script was implemented to calculate key descriptors (e.g., mass normalized to the number of carbon atoms (m/C), mass defect (md) normalized to the number of carbon atoms (md/C), estimated F) for prioritizing fluorinated features, following (Kaufmann *et al.*, 2022; Sanchez et Tautenhahn, 2023; Stroski *et al.*, 2024). To reduce the number of features, the m/C versus md/C space and the KMD plot were represented using the functions included in CD software. The m/C was determined by dividing the measured mass of the monoisotopic peak by the estimated number of carbon atoms (C).

- Confidence Level Assignment

Then, an additional data processing filter, based on the parameters described by (Sanchez et Tautenhahn, 2023), was optimized to retain both PFAS with available standards in our laboratory and other relevant candidates. Only features with the following criteria are investigated: -0.10 ≤ md/C ≤ 0.15; m/C > 35; or maxF(CS) ≥ 3; maxF(ML) ≥ 3; F ≥ 3; Checked: true.Further, additional rules based on experience with PFAS and NTS analysis, such as the inconsistency for a suspected long-chain PFAS compound to exhibit a short retention time, were applied to reduce the number of features by selecting only the most probable compounds (Chu et Letcher, 2024). These different feature prioritization steps allowed the creation of a list of suspect PFAS. Confidence levels for compounds identification were assigned according to the levels of PFAS identification proposed by (Charbonnet *et al.*, 2022), which is based on Schymanski's classification (Schymanski *et al.*, 2014). .

3. Results and discussion

The analytical strategy was applied to a set of food samples (n = 58), selected for their known contribution to dietary exposure to PFAS. The objective was twofold: first, to characterize the occurrence of PFAS included in the suspect list based on available reference standards (SS) and second, to apply a NTS workflow to detect additional fluorinated features potentially present in the samples. The sampling strategy was designed to cover two distinct geographical regions—France and Algeria—in order to provide comparative insights into their respective contamination profiles, and to include additional samples from European hotspots known to be highly contaminated with PFAS. After extraction by the QuEChERS method described in section 2.3., the extracts were analyzed by the LC-ESI(-)-HRMS method described in section 2.4. using full scan and DIA acquisition modes.

3.1. Suspect screening analysis

The availability of 28 PFAS reference standards initially included in our database made it possible to investigate their occurrence in the foods studied using suspected approach. The data acquired from these samples were processed by Skyline software, as described in section 2.4.1. Originally developed

for targeted proteomics, Skyline has proven to be a valuable tool in small molecule analysis workflows, particularly for monitoring signal intensities, assessing chromatographic peak quality, and ensuring the reliability of extracted ion chromatograms (XICs). This allowed for a more accurate inspection of the data, especially for known PFAS, and provided an additional level of confidence in the overall feature extraction and identification strategy. As a first overview, 17 out of the 28 PFAS included in the suspect database could be unambiguously identified across the full set of 58 food samples. All identified compounds were indeed assigned the highest level of confidence (Level 1), based on the PFAS identification confidence scale proposed by (Charbonnet *et al.*, 2022). **Figure 40** presents the detection frequency (in %) of the 17 identified PFAS across various food categories (eggs, fish, shellfish, meat, dairy products), with comparisons between commercial samples from Europe and North Africa—specifically France and Algeria. The dataset also includes a subset of European samples collected from individuals residing in known contamination hotspots, allowing for a more detailed assessment of PFAS occurrence in high-exposure contexts.

	Eggs			Fish			Custaceans	Meat		Dairy products
	Hot Spot	*Commercial*		*Hot Spot*	*Commercial*		*Commercial*	*Commercial*		*Commercial*
	EU (n = 13)	FR (n = 3)	ALG (n = 5)	EU (n = 5)	FR (n = 5)	ALG (n = 10)	FR (n = 4)	FR (n = 5)	ALG (n = 5)	FR (n = 3)
PFOS	100			100		70			20	
PFOA	100	100	100	100	100	60	100	100	100	100
PFNA	100	33	60	80		40			20	
PFHxS	100			100		10			20	
PFBA	100	100	100	40	80	50	100	60	100	67
PFPeA	100	100	100	60	60	20	50		60	
PFHxA	100	100	100	80		30	25		20	
PFHpA	92	67	20	80	20					
PFDoDS	38			20	20		25			
PFDA	100			100						
PFHpS	92			20						
PFUnDA	62			20						
PFBS	62			20						
PFPeS	38									
PFTeDA				20						
PFUnDS				20						
PFNS						10				

Figure 40. *Detection frequencies (%) of 17 PFAS identified from an initial suspect screening database of 28 compounds, across five food categories (n = 58 samples), by geographical origin: France (FR), Algeria (ALG), and European Union (EU) hotspot samples*

In commercial eggs, samples from both North Africa (Algeria) and Europe (France) exhibited comparable PFAS occurrence profiles, with compounds such as PFOA, perfluorobutanoic acid (PFBA), perfluoropentanoic acid (PFPeA), and perfluorohexanoic acid (PFHxA) consistently detected in a large proportion of samples from both regions. However, the subset of European Union (EU) samples collected from individuals living in identified contamination hotspots showed significantly higher detection frequencies across a broader spectrum of PFAS—including PFOS, PFNA, PFHxS, perfluoroheptanoic acid (PFHpA), perfluorodecanoic acid (PFDA), and perfluoroheptane sulfonic acid (PFHpS)—indicating the influence of localized contamination sources on the PFAS profile in this food matrix.

In commercial fish, a rather similar PFAS profile was observed in both French and Algerian samples, with PFOA being the most frequently detected compounds. Again, fish samples collected from EU hot spots exhibited elevated detection frequencies across several PFAS, including PFOA (100%), PFBA (100%), PFHxA (80%), and PFHpA (80%), pointing to intensified contamination levels in specific areas.

In crustaceans, PFOA and PFBA appeared as the most prevalent compounds in French samples (100%), followed by PFPeA, which was also detected, albeit at lower frequencies. These results suggest a more limited PFAS profile in this matrix, but nonetheless indicate that certain legacy PFAS, such as PFOA, remain detectable in seafood products.

In meat, high detection frequencies were observed for PFOA in both French and Algerian samples, with PFBA also commonly detected, indicating that this matrix represents a notable route of PFAS exposure regardless of origin.

In dairy products, PFBA and PFOA were the only compounds consistently detected, reflecting a narrower contamination profile for this food category.

Overall, the heatmap reveals a recurring presence of both short-chain PFAS (e.g., PFBA, PFPeA) and legacy compounds (e.g., PFOA, PFOS) across all food categories. Notably, the European hotspot

samples exhibited a broader and more intense PFAS contamination profile, emphasizing the role of geographical variability and the influence of localized contamination sources in shaping dietary exposure to PFAS.

Regardless of food category or geographic origin—whether from Europe or North Africa—PFOA, PFBA, PFPeA, and PFHxA emerged as the most frequently detected compounds. These four PFAS, along with others among the 17 identified, have previously been reported in a variety of food samples in earlier studies (Genualdi *et al.*, 2022; Chiumiento *et al.*, 2023; Rushing *et al.*, 2023). Among these, only PFOA is one of the four PFAS included in the tolerable weekly intake (TWI) of 4.4 ng/kg body weight established by (EFSA, 2020), and also currently subject to regulatory limits in certain food items (European Commission, 2022c). Nevertheless, the other PFAS identified in this study are among those recommended for monitoring and further investigation (European Commission, 2022b).

Suspect analysis also confirmed the hotspot origin of European samples (**Figure 40**). Compared to eggs and fish from the market, hotspot samples showed a significantly higher number and frequency of PFAS identifications. These results are not surprising, as samples collected from known contamination hotspots are expected to reflect more intense and diverse PFAS contamination. For example, 14 PFAS were detected in hotspot egg samples versus 6 in market ones, and 15 in hotspot fish samples compared to only 5 from the market. Detection frequencies were also notably higher, such as PFNA being found in 100% of hotspot egg samples versus just 33% in those from the market. These observations confirm that hotspot sampling provides a valuable opportunity to detect a broader range of PFAS, including those not routinely monitored, making it a relevant complement to non-targeted screening strategies.

These findings demonstrate the relevance and added value of integrating SS HRMS workflows into routine food safety monitoring. The approach not only enables the detection of a wide spectrum of PFAS—including both legacy and emerging compounds—but also provides a detailed picture of contamination profiles across different food categories and geographical origins.

3.2. Non-targeted screening analysis

In addition to suspect screening, a NTS approach was implemented to broaden the scope of PFAS detection beyond compounds with available analytical standards. This strategy enables the exploration of unknown or emerging fluorinated substances by capturing all detectable features associated with fluorine-specific signatures. The data processing workflow was first optimized, enabling the identification of additional fluorinated compounds, and was finally applied to the characterization of commercial food samples.

3.2.1. Optimizing the processing of data acquired in non-targeted mode for the detection of fluorinated signals

In non-targeted analytical workflows, data processing remains a critical and challenging step, as it is essential for effective feature selection and compound identification while limiting false positives. Data were initially processed using CD software with default parameters, as described by (Kaufmann *et al.*, 2022) and (Sanchez et Tautenhahn, 2023). A PFAS mixture (20 isotopically labelled at 0.007 ng/µL and 45 non-labelled at 0.1 ng/µL) was analyzed to evaluate this workflow. Skyline software (MacLean *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2020) was also used to evaluate and compare the results obtained with CD.

This preliminary evaluation demonstrated that, even without specific parameter optimization, Skyline successfully detected signals corresponding to all PFAS compounds analyzed (n = 45 native + 20 labelled). In contrast, data reprocessed using Compound Discoverer identified only 12 labelled PFAS and 39 native PFAS, thereby revealing a suboptimal parameterization of the initial CD workflow.

An important aspect of the workflow optimization involved refining the mass defect filtering parameter, which plays a key role in suspect screening. As initially configured according to (Sanchez et Tautenhahn, 2023), this filter excluded compounds based on their mass defect, retaining only PFAS with a negative mass defect (md/C < –0.0007). However, this stringent criterion was found to be overly restrictive, potentially discarding relevant PFAS candidates.

To broaden the chemical space and include PFAS with positive or neutral mass defects, the filter range was adjusted to –0.10 < md/C < 0.15, in line with data from (Wang *et al.*, 2021), which showed that

86% of PFAS fall within this interval. This adjustment significantly improved the inclusion of relevant features during data processing.

As a result of this optimized configuration, all 45 native PFAS were successfully detected, since six PFAS compounds previously excluded due to their positive mass defect were now included (3-Perfluoropropyl propanoic acid (FPrPA), 3-Perfluoropentyl propanoic acid (FPePA), 3-Perfluoroheptyl propanoic acid (FHpPA), 6:2 fluorotelomer sulfonamidopropyl betaine (6:2 FTAB), N,N-dimethyl-3-((perfluorohexyl)ethylsulfonyl)aminopropanamine oxide (6:2 FTAA-Ox), and 2-(N-ethylperfluorooctanesulfonamido) acetic acid (N-EtFOSAA)). Furthermore, three additional labelled PFAS (d3-N-MeFOSAA (2-(*N*-methylperfluorooctanesulfonamido) acetic acid), d5-N-EtFOSAA, and 13C4-6:2 diPAP (Bis[2-(perfluorohexyl)ethyl] Phosphate)) were also identified (**Figure 41**).

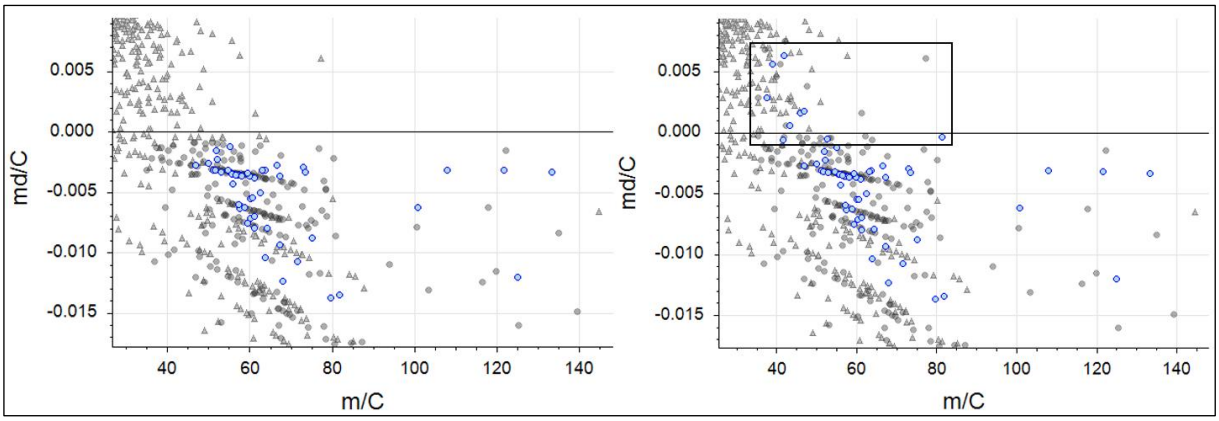


Figure 41. *md/C vs m/C representation of the PFAS standard solution (blue circles) analyzed by LC-(ESI-)-HRMS and processed in Compound Discoverer (CD) software using the additional filter as initially defined in the literature (Kaufmann et al. 2022) (left) and after applying the optimized filter parameter developed in this study (right)*

Nevertheless, the identification of isotopically labelled PFAS remains challenging due to their low isotopic signal intensity, the frequent absence of a carbon count (C = 0), and their lack of representation in reference databases. For instance, fully 13C-labelled standards such as 13C4-PFBA cannot be processed via isotopic pattern recognition (Chu et Letcher, 2024).

Overall, the new mass defect filter parameters allowed the detection of 15 out of 20 labelled PFAS and all 45 native PFAS, significantly enhancing the coverage of the PFAS chemical space and improving the robustness of the suspect screening workflow (**Figure 40**).

3.2.2. Identification of Additional Fluorinated Compounds in hot spot samples through Non-Targeted Screening

Given the constraints associated with the limited availability of reference standards, non-targeted analysis offers valuable potential to uncover additional PFAS that may be present in food. The SS strategy proved effective in highlighting the most contaminated samples—designated as hotspots—which were then prioritized as key matrices for deeper non-targeted investigations. This approach focus non-targeted efforts on informative samples (**Figure 42**). The acquired data were processed using the optimized CD workflow, reducing neatly 10,000 features to approximately 30 suspect fluorinated compounds for DIA confirmation. Manual refinement further filtered these based on known PFAS characteristics.

Four fluorinated compounds, which had not been previously identified through the SS approach, were unequivocally confirmed at level 1 (Schymanski *et al.*, 2014)).

- Among the newly detected compounds, one of the most noteworthy signals was observed in an egg sample, characterized by an m/z of 162.98256 and a RT of 1.823 minutes (**Figure 42**a). This feature exhibited CF_2-normalized KMD values comparable to those of known PFAS belonging to the perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCA) group (**Figure 43**). Moreover, its retention time was even shorter than that of PFBA, the smallest PFCA included in our database, suggesting its structural affiliation with this compound class. An authentic reference standard enabled unambiguous identification of perfluoropropanoic acid (PFPrA, $C_3HF_5O_2$).

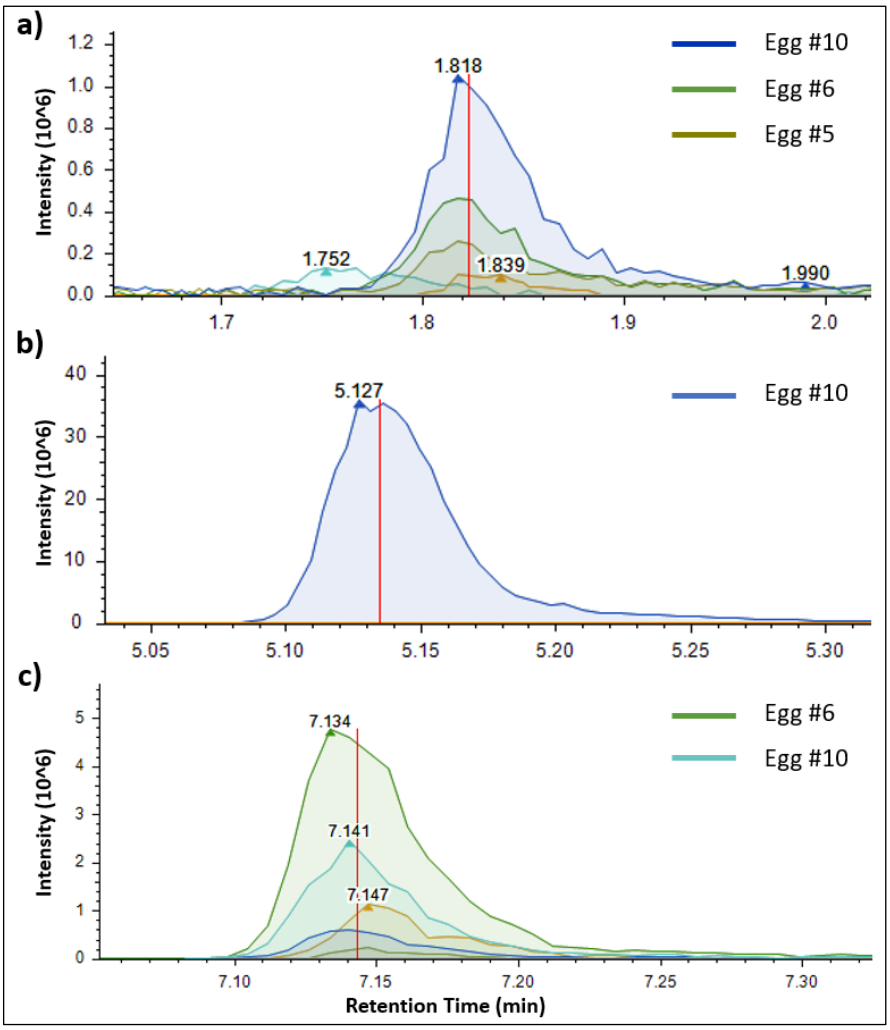


Figure 42. *Chromatographic profile of a) PFPrA in three egg samples, b) 6:2 FTS in an egg sample, and c) Fipronil sulfone in two egg samples from hotspots, analyzed by LC-HRMS using the non-targeted workflow developed in this study. Signals processed with Compound Discoverer.*

Several other egg samples exhibited a chromatographic peak at the same retention time as PFPrA (**Figure 42**a), although this compound was not detected by the CD workflow, probably due to the low intensity of the peaks. PFPrA was unambiguously identified in six other egg samples from European hotspots using the SS approach, but absent from fish. Notably, this compound had already been identified in a previous egg sample during the early development of the non-targeted workflow (Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025).

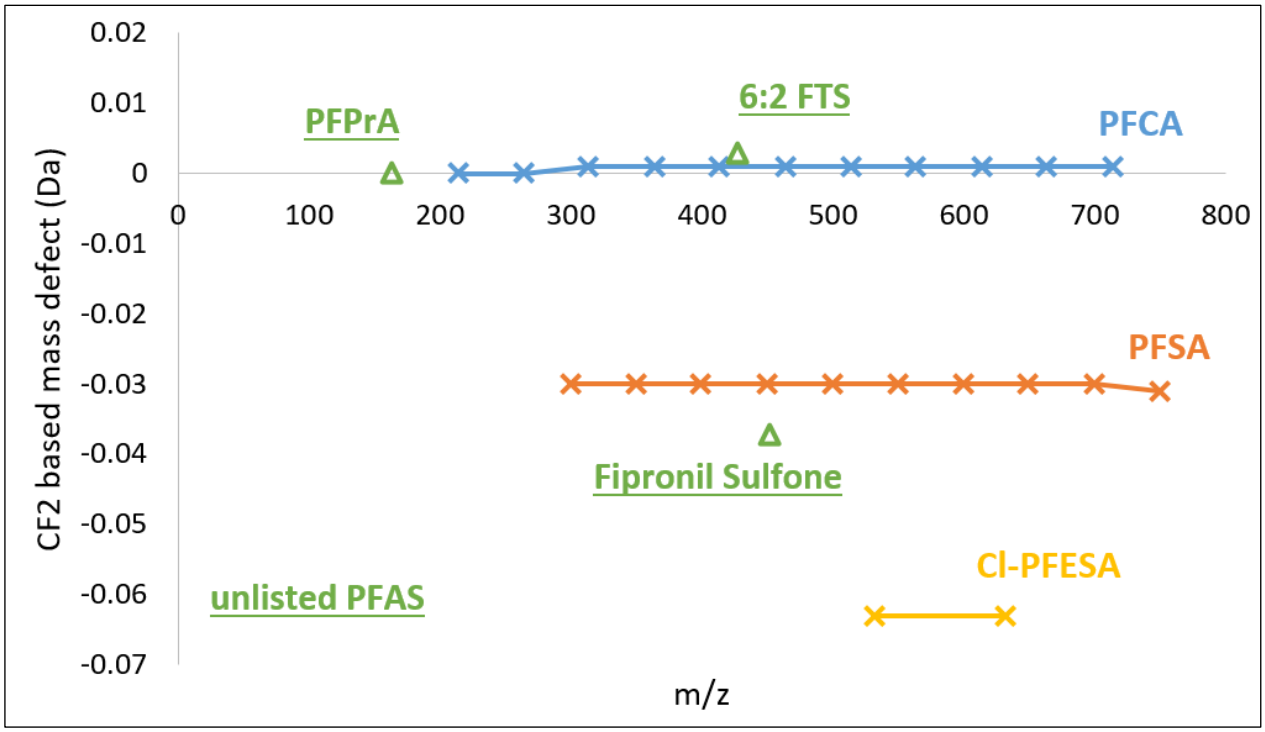


Figure 43. *Kendrick mass defect for CF2 repeating unit vs m/z of certain PFAS standard families listed in our internal database and classified by family: PFCA (n = 11), PFSA (n = 10) and Cl-PFESA (n = 2). Homologous series are identified by shifts in the x-axis divisible by 49.9968 (CF2) and the same CF2 normalized mass defect. In green, three suspect PFAS signals highlighted by NTS data processing (in green).*

To our knowledge, this is the first report documenting the occurrence of PFPrA in foodstuffs, particularly in eggs. While PFPrA is known in various environmental waters (Chow *et al.*, 2021; Lenka, Kah et Padhye, 2022; Liang, Steimling et Chang, 2023), its presence in food products has not been reported so far. To our knowledge, this is the first report documenting the occurrence of PFPrA in foodstuffs, particularly in eggs, raising questions about potential contamination pathways from the degradation of other PFAS and the transfer of scPFAS into the food chain. These findings suggests that food-producing animals could be exposed to environmental PFAS contamination, either through feed or environmental vectors. Given the growing concern around scPFAS and their increasing use, these results underline the importance of including emerging contaminants in future monitoring.

- Another relevant feature was also identified in an egg as 6:2 fluorotelomer sulfonic acid (6:2 FTS) ($C_8H_5F_{13}O_3S$) based on its exact mass m/z 426.96837 and RT 5.183 min (**Figure 42**b and Figure S2). At this stage, the CF_2-normalized KMD approach (**Figure 43**) was not applicable for

annotation support, as no PFAS from the fluorotelomer sulfonates (FTS) family were initially included in our internal database. This compound was confirmed at the highest confidence level, with an authentic 6:2 FTS standard, and was not detected in any other samples collected from hot spot areas.

In recent years, the use of 6:2 FTS has significantly increased particularly as a replacement for long-chain legacy PFAS such as PFOS in consumer products notably as surface treatment agents for textiles or food packaging materials (Hamid, Li et Grace, 2020). Its growing use has led to widespread environmental dissemination, with frequent detection in various water sources worldwide, and in various foodstuffs, such as in marine organisms (Lescord *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2021), in crustacean species such as Mysis (Ren *et al.*, 2022), and more recently in fish and breast milk samples from Algeria (Amziane *et al.*, 2022). These findings highlight the environmental ubiquity of this compound and the potential for bioaccumulation and human exposure through dietary intake. Known biotransformation products—specifically PFBA, PFPeA, and PFHxA (Lenka, Kah et Padhye, 2022; A. Lafond *et al.*, 2023)—were reported in environmental matrices and increasingly detected in food samples. These three compounds were among those identified in eggs via the SS workflow (as discussed in Section 3.1), underlining the need to monitor both parent and degradation products of legacy PFAS and replacement compounds.

- Another noteworthy feature was identified as Fipronil sulfone ($C_{12}H_4Cl_2F_6N_4O_2S$), with m/z 450.92678 and RT 7.143 min in egg samples (**Figure 42**c and Figure S3). Based on the high-quality spectral match and retention time alignment, the compound was initially assigned a confidence level of 2a according to the PFAS identification criteria proposed by to (Charbonnet *et al.*, 2022). The CF_2-normalized KMD approach (**Figure 43**) could not support the annotation, as no structurally related PFAS standards were present in the database of this study. However, this level of confidence was subsequently upgraded to level 1 following confirmation via direct injection of the analytical standard. Fipronil sulfone was detected in 85% of eggs from private

gardens, suggesting possible contamination linked to specific domestic practices. These results also highlight the added value of non-targeted workflows in capturing non-conventional but highly relevant PFAS.

Fipronil sulfone is a major metabolite of fipronil, a widely used phenylpyrazole insecticide. Similar to other fipronil metabolites, it exhibits greater toxicity than its parent compound, and is known for its environmental persistance (Li *et al.*, 2020). Its recurrent detection in various food matrices—including plant-based products, apicultural products, as well as animal-derived products—raises concerns regarding chronic dietary exposure, particularly in regions where fipronil use has been documented (Corrias *et al.*, 2021).

- Given the detection of fipronil sulfone in several samples, a standard of the parent compound fipronil was analyzed under identical LC-HRMS conditions to determine its RT and mass-to-charge ratio (m/z) for accurate inclusion in the SS workflow. Its identification in two egg samples from European hot spots, with the highest confidence level according to (Schymanski *et al.*, 2014), confirms its environmental persistence despite its ban in food production in 2017 (Yao *et al.*, 2021). As with all analytes, its absence was confirmed in procedural blanks, ensuring data reliability.

Fipronil is a commonly used active substance in veterinary products for the control of fleas, lice, and ticks, which is strictly prohibited in animals intended for human consumption and can bioaccumulate in organisms (Romero *et al.*, 2016). The illegal use of this toxic insecticide in poultry farming led to a major contamination scandal in Europe and Asia, notably involving millions of eggs (Yao *et al.*, 2021). Moreover, fipronil residues have been reported in a wide range of food matrices, illustrating its potential for widespread contamination across the food chain (EFSA, 2018b; Liang et al., 2019; Yao *et al.*, 2021; Gasparini *et al.*, 2024).

These findings clearly illustrate the strength of the non-targeted strategy (QuEChERS + HRMS + CD) for broad-spectrum detection of fluorinated substances beyond the conventional scope. This strategy

offers a more comprehensive perspective on chemical contamination applicable in future studies. This is exemplified by the detection of fipronil and its metabolite fipronil sulfone, which, although primarily used as pesticides, have recently been included in the PFAS family under the revised OECD definition (Wang *et al.*, 2021). This evolution in classification reflects the increasing scientific and regulatory recognition of non-traditional PFAS, and highlights the importance of broad-spectrum analytical strategies capable of capturing the full diversity of fluorinated compounds potentially relevant for food safety and risk assessment.

3.2.3. Application of the NTS strategy to the characterization of commercial food samples

The NTS approach presented above led to the discovery of four additional fluorinated compounds absent from our database and not routinely monitored. These compounds, detected in samples from European hot spots, raised concerns about potential consumer exposure. To further investigate this risk, the NTS strategy was extended to all food products included in the study, with a particular focus on commercially available items. Overall, PFPrA emerged as the most frequently detected PFAS, being identified in 48% of the 40 food samples analyzed. It was detected in 3 French (100 %) and 5 Algerian (100 %) eggs, 2 French (40 %; back of cod, and alaska hake fillet) and 1 Algerian fish (10 %; bream), 4 French crustaceans (100 %), 2 French (40 %; white ham with rind, and chipolata) and 1 Algerian (20 %; beef) meat, and 1 French dairy product (33 %; goat's cheese "bûche"). This widespread occurrence across multiple food categories—regardless of their origin (Europe or North Africa) or source (commercial or hotspot)—highlights the ubiquitous presence of PFPrA in the food chain, despite it being a PFAS compound that is not routinely monitored. Given the growing concern about short-chain PFAS and their potential health implications, PFPrA should be prioritized for targeted monitoring. Strengthening surveillance efforts for this compound could provide valuable insights into emerging contamination patterns and support the refinement of risk assessment and regulatory frameworks.

Regardless of geographical origin or food category (eggs, fish, shellfish, meat, or dairy products), 6:2 FTS, Fipronil, and Fipronil sulfone were not detected in any of the commercial food samples analyzed

in the present study. These findings suggest that, at this stage, widespread contamination of foodstuffs by these fluorinated compounds does not appear to be a major concern. Nevertheless, their detection in specific samples from our study highlights the importance of continued monitoring. Regular surveillance of these compounds could help improve our understanding of potential dietary exposure and provide early insights into emerging contamination trends. It is also important to communicate the potential risk of treating domestic chickens with products that may lead to residue presence in eggs, underlining the need for awareness and precaution in household poultry management.

4. Conclusion

This study demonstrates the added value of combining SS and NTS strategies for expanding our knowledge of fluorinated compounds. This approach was applied to a wide variety of foodstuffs from five matrix categories, two distinct geographical regions, and two sources: commercial food products and private individuals living in European contamination hotspots. These samples proved valuable for guiding prioritization efforts and played a key role in revealing PFAS beyond those currently targeted by routine monitoring. Four PFAS—confirmed with the highest level of confidence—were identified through this approach. PFPrA emerged as the most frequently detected compound, measured in nearly half of the 58 samples, regardless of food type, origin or source. This finding reinforces the global nature of PFAS contamination, underscores that short-chain compounds like PFPrA are already present across diverse regions, and emphasizes the need to integrate such emerging substances into future surveillance plans. The presence of other substances in hotspot samples underscores the broader detection capacity of the SS/NTS approach, enabling the detection of fluorinated contaminants beyond the strict regulatory definition of PFAS, which is essential for comprehensive chemical exposome characterization.

For future studies, coupling targeted sampling with advanced analytical tools like SS/NTS offers a forward-looking strategy for early detection and improved chemical risk assessment. This approach

should be integrated into future food safety frameworks to help authorities anticipate emerging PFAS threats and strengthen public health protections.

Our findings underscore the importance of comprehensive contaminant monitoring not only for food safety but also within the wider framework of the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs), especially those concerning health, water quality, and sustainable production, thereby contributing to efforts addressing climate change and environmental sustainability.

Acknowledgments

This work was funded by Anses (EMERGEXPO project) and the Pays de la Loire Region (France) (arrêté 2022-09694).

CRediT author statement

Cassandre Jeannot: Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. ***Nicolas Macorps***: Investigation. ***Ahmed Amziane:*** Resources. ***Bruno Le Bizec***: Conceptualization, Funding acquisition. ***Julien Parinet***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Writing - Review & Editing. ***Gaud Dervilly***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Validation, Writing - Review & Editing

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

****

Principaux résultats liés à l'application de la méthodologie de recherche

- La stratégie combinée de criblage suspect et non-ciblé développée au préalable (cf **Article 1**) a été appliquée ici à un ensemble de 58 échantillons alimentaires issus de cinq catégories de matrices différentes. Ces échantillons, collectés en Europe et en Afrique du Nord, comprenaient à la fois des produits issus du commerce et des aliments provenant de zones identifiées comme « hotspots » de contamination par les PFAS.
- Au total, 21 composés fluorés ont été identifiés dont 4 n'appartenant pas à la liste des PFAS classiquement surveillés, soulignant ainsi l'apport de cette étude à l'élargissement du spectre d'investigation.
- Le SS a permis d'identifier 17 PFAS, parmi lesquels les PFOA, PFBA, PFPeA et PFHxA figuraient parmi les plus fréquemment détectés, quelle que soit la catégorie d'aliment ou l'origine

géographique des aliments. Ces résultats confirment le caractère ubiquitaire de ces composés dans la chaine alimentaire. Par ailleurs, les zones de contamination avérées présentent une diversité et une fréquence de détection des PFAS bien supérieures à celles observées dans les produits commerciaux, avec jusqu'à 14 PFAS détectés dans les œufs et 15 dans les poissons, contre respectivement 6 et 5 dans les produits du commerce.

- ❖ L'approche NTS couplée à la priorisation des signaux fluorés (MD, diagrammes KMD) s'est révélée efficace pour isoler et identifier des PFAS connus comme émergents dans des jeux de données complexes.
- ❖ Le PFPrA, un composé à chaîne courte encore peu surveillé dans les aliments, a été détecté dans près de 50 % des échantillons, indépendamment de leur origine géographique, de leur catégorie ou de leur source, soulignant sa présence diffuse dans l'alimentation. Ce résultat plaide en faveur de son inclusion dans les listes de surveillance officielles.
- ❖ Trois autres composés fluorés – le 6:2 FTS, le fipronil et son métabolite le fipronil sulfone – ont été identifiés dans des œufs, démontrant la capacité de la méthodologie à révéler des substances d'intérêt sanitaire au-delà des PFAS couramment surveillés.
- ❖ Ces résultats confirment la pertinence de coupler un échantillonnage stratégique et des approches analytiques avancées (SS et NTS) pour améliorer la détection précoce des contaminants, élargir les listes de surveillance et renforcer l'évaluation des risques alimentaires.
- ❖ Enfin, la présence avérée de PFAS dans les denrées alimentaires, comme celle d'autres contaminants émergents, met en évidence l'intérêt de développer et d'adapter des stratégies similaires à d'autres familles chimiques afin d'améliorer la caractérisation globale de l'exposition chimique des consommateurs. Ces résultats font l'objet de l'**Article 3** du manuscrit.

<u>Analyse complémentaire ciblée des PFAS réglementés dans les échantillons étudiés</u>

En parallèle des travaux présentés dans les deux articles scientifiques précédents, une analyse complémentaire a été réalisée sur l'ensemble des 58 échantillons alimentaires, sans toutefois faire l'objet d'une publication dédiée. Ces échantillons comprenaient, d'une part, des denrées représentatives de la consommation en France, décrites dans l'Article 1, et, d'autre part, des échantillons collectés en Algérie ou dans des zones européennes identifiées comme fortement contaminées par les PFAS (hotspots), analysés dans l'Article 2 à l'aide de la stratégie de criblage non ciblé.

Dans un objectif complémentaire, ces mêmes échantillons ont également été soumis à une analyse ciblée visant à quantifier précisément les quatre PFAS actuellement réglementés dans certaines denrées alimentaires au niveau européen (PFOS, PFOA, PFNA et PFHxS). Cette quantification a été réalisée selon le protocole de la méthode accréditée ISO17025 mise en œuvre par le laboratoire national de référence pour les PFAS dans les aliments au sein du Laberca.

Après extraction par SPE, analyse par LC-MS/MS et traitement des données tel que décrit dans l'Article 1, les concentrations de ces quatre composés ont été déterminées pour chacun des 58 échantillons. Pour faciliter l'interprétation des résultats, les concentrations moyennes ont ensuite été calculées par groupes d'échantillons, classés selon trois critères : le type de matrice alimentaire (œufs, poissons, crustacés, viandes ou produits laitiers), l'origine commerciale (échantillons du commerce ou provenant de hotspots), et l'origine géographique (France, Algérie, Europe). Ces données synthétisées sont présentées dans la **Figure 44**.

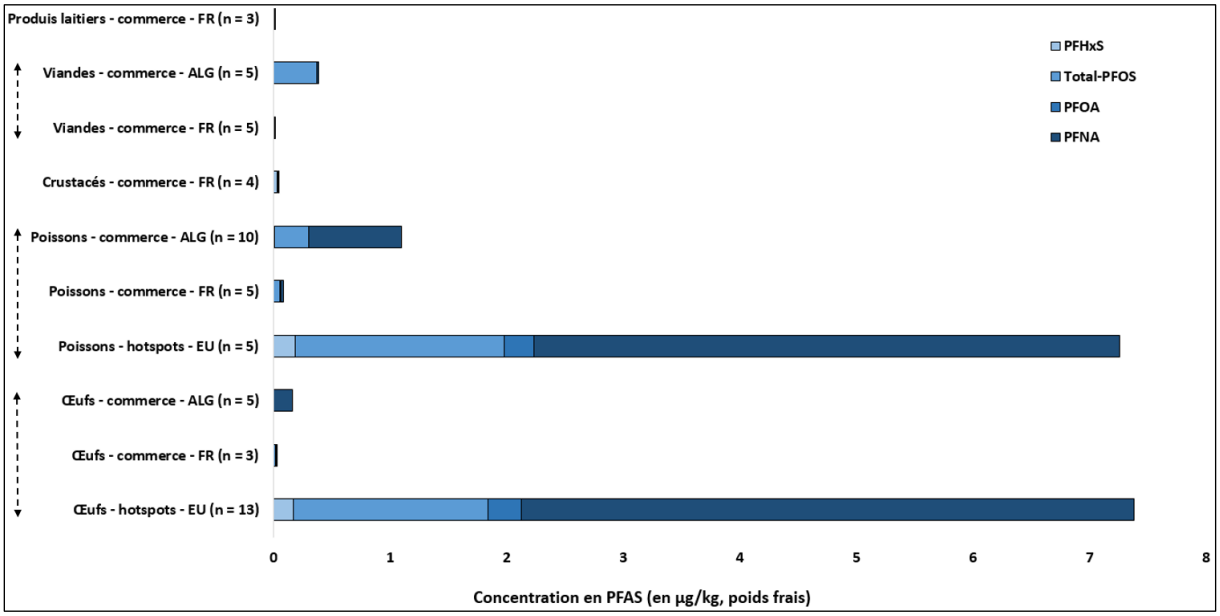


Figure 44. *Concentrations de 4 PFAS (µg/kg, poids frais) mesurées dans les 58 échantillons investigués dans le chapitre II, répartis en cinq catégories alimentaires, comprenant des produits commerciaux provenant de France (FR) et d'Algérie (ALG), ainsi que des échantillons issus de zones de contamination connues (hotspots) en Europe (EU)*

Ces résultats montrent que les échantillons collectés dans des zones européennes fortement contaminées présentent les concentrations les plus élevées, tant pour la somme des quatre PFAS que pour le PFOS, le PFOA et le PFNA pris individuellement, et également qu'ils dépassent les seuils actuellement autorisés. Les échantillons algériens, sélectionnés à partir d'une étude préliminaire présentant des teneurs élevées en PFAS dans les poissons, les œufs et les viandes, indiquent des niveaux plus importants en PFAS que pour les mêmes matrices collectées en France. Par ailleurs, les

concentrations maximales réglementées pour la somme des quatre PFAS — c'est-à-dire de 1,7 µg/kg de poids frais (pf) dans les œufs, de 2 à 45 µg/kg dans les poissons selon les espèces et de 1,3 à 50 µg/kg dans les viandes selon les espèces — ne sont pas dépassées dans les denrées soumises à la réglementation européenne, c'est-à-dire celles collectées dans le commerce en France.

Dans l'étude décrite dans l'Article 2, une priorisation des échantillons avait été mise en œuvre afin de cibler en premier lieu ceux présentant des concentrations élevées en PFAS connus, c'est-à-dire les échantillons issus de hotspots. Cette approche a d'abord permis d'identifier quatre PFAS additionnels, dont un seul (PFPrA) a ensuite été identifié dans des échantillons commerciaux. Si l'inclusion d'échantillons représentatifs de la consommation alimentaire demeure essentielle pour évaluer la présence de PFAS additionnels et mieux estimer l'exposition des consommateurs, l'intégration d'échantillons présélectionnés issus de zones à risque s'avère stratégique pour appliquer efficacement les approches de recherche non ciblée et identifier des PFAS non-habituellement surveillés. Pour ce faire, l'analyse préliminaire de certains PFAS caractéristiques, illustrée dans la **Figure 44**, peut constituer un levier supplémentaire de priorisation.

Chapitre III : Développement et application d'une méthode multi-résidus et contaminants par LC-HRMS pour une meilleure caractérisation des échantillons alimentaires

Dans le chapitre précédent, les PFAS ont été étudiés comme première illustration des défis associés à la détection des contaminants émergents dans les aliments. Cependant, cette famille de composés ne constitue qu'une partie des nombreuses substances préoccupantes susceptibles d'entrer dans la chaine alimentaire. Les CE englobent un large éventail de propriétés physico-chimiques leur permettant de circuler dans différents compartiments de l'environnement, de s'accumuler dans les réseaux trophiques et de représenter un risque potentiel à la fois pour les écosystèmes et pour la santé humaine. Dans ce contexte, et toujours dans l'objectif d'étendre la connaissance de l'exposome chimique alimentaire, le Chapitre III vise à développer une stratégie analytique innovante, capable de couvrir un spectre étendu de résidus et contaminants, puis de générer des données représentatives sur les mélanges de substances présentes dans notre alimentation.

Ce chapitre s'articule en trois parties, répondant ainsi à l'*Objectif 1.B*. de ce travail de thèse. La première partie présente le développement et l'optimisation d'une méthodologie de recherche capable d'identifier une large gamme de substances chimiques en une seule analyse. Dans le but de comprendre les mélanges de substances auxquels les consommateurs peuvent être exposés *via* leur alimentation, les trois parties décrivent l'application de cette approche à des échantillons issus du commerce (Partie 1), un jeu de denrées alimentaires d'origine animale représentatif de la consommation française (Partie 2) et à des échantillons de poissons collectés dans un lac situé à proximité d'une zone agricole intensive (Partie 3), respectivement.

Contexte de l'étude

Les contaminants organiques émergents, aussi appelés *emerging organic contaminants* (EOCs), représentent une catégorie de substances chimiques auxquelles l'être humain peut être exposé quotidiennement, à la fois par son environnement et par son alimentation. Ces substances incluent des produits pharmaceutiques, des produits de soins personnels, des pesticides, des perturbateurs endocriniens, des plastifiants, des retardateurs de flamme, ou encore des PFAS, encore peu surveillées ou récemment identifiées. Ces composés peuvent pénétrer dans les différents compartiments environnementaux — sols, eaux, chaînes alimentaires — et y persister, entraînant leur accumulation progressive dans les organismes vivants. Ils suscitent un intérêt croissant en raison de leurs impacts potentiels sur la santé humaine et les écosystèmes.

L'exposition à ces mélanges de contaminants *via* l'alimentation pourrait contribuer au développement de maladies chroniques, en raison d'effets combinés ou de synergies encore mal compris. Dans le but de mieux caractériser l'exposome chimique alimentaire, il devient essentiel de développer des outils analytiques capables d'appréhender cette complexité. Les approches classiques de recherche ciblée sont limitées suite à la nécessité de disposer de standards analytiques pour chaque composé recherché. À l'inverse, des méthodologies à large spectre, basées sur des technologies telles que la HRMS, permettent d'explorer une gamme bien plus vaste de substances, y compris celles non encore réglementées ou identifiées.

Ainsi, cette partie du manuscrit — portant principalement sur les travaux conduits à l'Anses au cours de la seconde moitié du projet doctoral — s'attache à développer une stratégie innovante de criblage étendu, combinant recherche ciblée et non ciblée, appliquée à des diverses matrices alimentaires (**Figure 45**). L'objectif est de produire de nouvelles données sur les mélanges de substances chimiques afin de mieux caractériser les risques d'exposition pour le consommateur et de contribuer à la compréhension globale de l'exposome alimentaire.

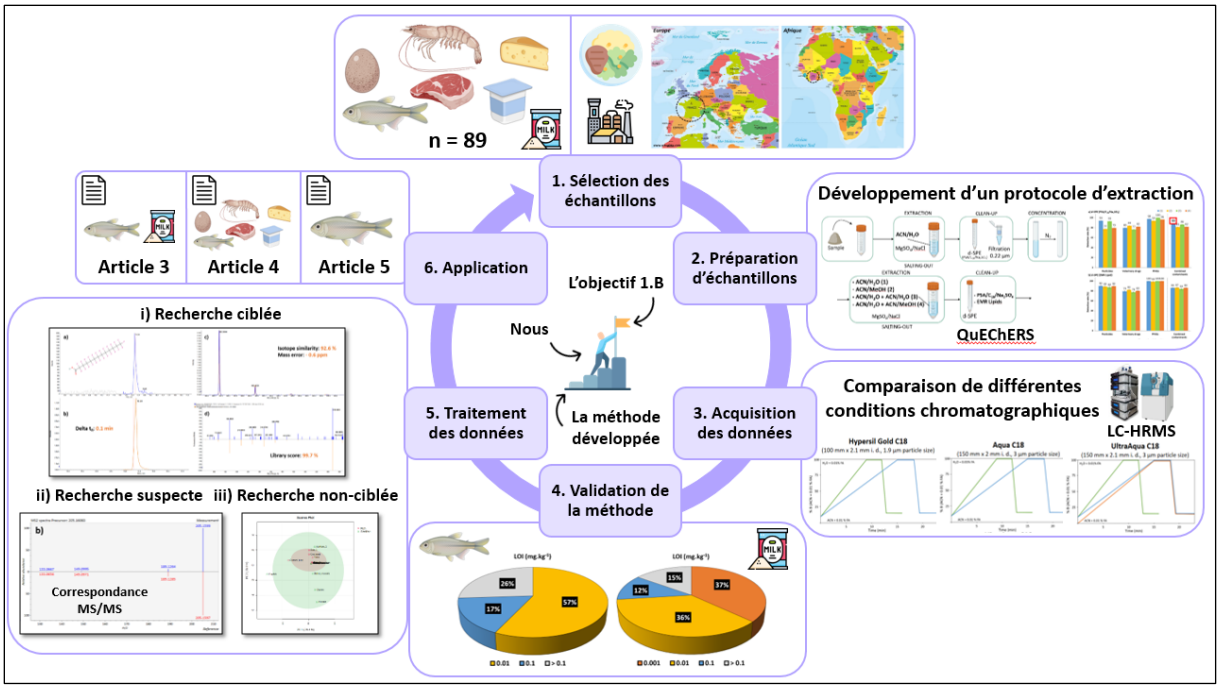


Figure 45. *Schéma récapitulatif des principales étapes méthodologiques décrites dans les articles 3, 4 et 5, incluant la préparation des échantillons, l'analyse par LC-HRMS, la validation de la méthode, le traitement des données, et l'application à diverses matrices alimentaires pour l'identification d'une large gamme de substances chimiques*

Dans ce contexte, la première partie de ce chapitre (Article 3) est consacrée au développement d'une stratégie analytique innovante visant à identifier simultanément un large éventail de résidus et de contaminants dans les denrées alimentaires. Pour cela, une méthode d'extraction a été optimisée en s'appuyant sur un protocole QuEChERS, largement utilisé pour sa simplicité et son efficacité sur des matrices complexes. Parallèlement, différentes conditions chromatographiques ont été comparées afin d'améliorer la séparation et la détection des composés cibles par LC-HRMS. Cette approche combinée (QuEChERS–LC-HRMS) a permis d'atteindre une couverture analytique étendue pour les substances présentes dans notre base de données. En complément, l'intégration d'une approche de SS a permis de dépasser les limites de la recherche ciblée, en particulier la dépendance aux standards analytiques, et ainsi d'ouvrir la voie à l'identification de substances émergentes, et sans *a priori*. Ainsi, ce travail de thèse, réalisée au sein de deux laboratoires différents (LABERCA et ANSES), a bénéficié d'équipements analytiques différents — détaillés dans les Chapitres II et III, respectivement — permettant le développement de stratégies analytiques complémentaires. En l'occurrence, à l'Anses une approche UHPLC-Q-TOF-MS a été mise au point (Article 3).

Cette stratégie analytique a ensuite été appliquée pour explorer les mélanges de composés présents dans différents échantillons alimentaires. Un total de 89 échantillons — présenté au fil du Chapitre III — provenant de France (Europe) et de Côte d'Ivoire (Afrique) a été investigué (**Figure 46**).



Figure 46. *Cartes illustrant les zones d'échantillonnage en Europe (à gauche, France) et en Afrique (à droite, Côte d'Ivoire) investiguée dans le Chapitre III.*

Dans la première partie (*Article 3,* page 176), les produits de la pêche et les produits laitiers — deux matrices alimentaires complexes connues pour leur potentiel d'accumulation de contaminants — sélectionnés pour la validation de la méthode, ont été investigués à l'aide du protocole développé.

Dans la deuxième partie (*Article 4,* page 208), pour maintenir un fil conducteur tout au long de ce projet doctoral, nous avons sélectionné 20 DAOA, caractérisées dans les deux laboratoires par ces différentes approches analytiques. Ces échantillons, déjà étudiés pour la recherche de PFAS émergents dans le chapitre précédent, ont été ré-exploités afin d'élargir la recherche à un spectre plus vaste de résidus et contaminants, et également d'évaluer les performances respectives des méthodes développées. Les résultats de cette comparaison sont présentés dans le Chapitre IV. Cette approche vise à affiner la caractérisation des expositions chimiques alimentaires auxquelles les consommateurs peuvent être soumis, notamment grâce à une identification renforcée obtenue durant une mobilité à l'Université McGill, par une autre approche analytique en vigueur dans ce laboratoire.

Enfin, la troisième partie (*Article 5,* page 224) a porté sur l'étude de poissons benthiques collectés dans le cadre d'une collaboration avec une équipe partenaire en Côte d'Ivoire, collectant les échantillons dans un lac situé à proximité d'une zone d'agriculture intensive. Ce travail visait à explorer la présence potentielle de composés industriels tels que des pesticides, des médicaments vétérinaires ou encore

d'autres substances inattendues. L'approche développée a ainsi démontré sa capacité à détecter un spectre très large de composés chimiques, y compris dans des contextes environnementaux spécifiques.

Ces recherches visaient à mieux documenter les expositions chimiques *via* l'alimentation, en appui à l'évaluation des risques. Par la suite, un objectif complémentaire consister à développer un outil de classification pour soutenir la gestion des risques. Ainsi, au cours de ces études, des ACP ont été réalisées afin d'identifier les mélanges typiques, de repérer les échantillons atypiques, et également susceptibles de révéler une contamination inhabituelle. Les données supplémentaires (*Supplementary data*) des 3 articles sont disponibles dans les parties correspondantes en Annexes.

Article 3 : High-throughput QuEChERS–UHPLC-QTOF-MS method for multi-class food residues and contaminants screening: Application to seafood and dairy products

Food Chemistry

High-throughput QuEChERS–UHPLC-QToF-MS method for multi-class food residue and contaminant screening: application to seafood and dairy

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	FOODCHEM-D-25-12718
Article Type:	Research Article (max 7,500 words)
Keywords:	LC-HRMS; multi-residue and contaminant method; screening method; method validation; QuEChERS
Corresponding Author:	Cassandre Jeannot Laboratory for the Study of Residues and Contaminants in Food Nantes, FRANCE
First Author:	Cassandre Jeannot
Order of Authors:	Cassandre Jeannot
	Bruno Le Bizec
	Gaud Dervilly
	Julien Parinet

Food Chemistry. Soumission le 12/08/2025 *(Article 3)* IF 9,8.

Contribution de l'autrice

Les échantillons analysés durant ce travail étaient issus de deux travaux de doctorat antérieurs. Ils avaient été collectés, broyés si besoin, homogénéisés, conditionnés et conservés à température ambiante pour les laits infantiles et à -20°C pour les produits de la pêche. Je les ai regroupés pour cette étude.

Dans le but de développer un protocole de préparation d'échantillons adapté, j'ai effectué une recherche bibliographique afin de comprendre les méthodes utilisées pour les analyses multi-résidus et contaminants incluant les composés d'intérêt dans diverses matrices alimentaires. Ensuite, j'ai sélectionné les conditions d'extraction les plus pertinentes, que j'ai testées et évaluées. Par la suite, pour la partie analytique, j'ai comparé différentes colonnes chromatographiques et gradients chromatographiques afin d'obtenir une séparation appropriée aux analytes.

J'ai également agrémenté la base de données utilisée lors du processus de recherche ciblée, notamment avec l'ajout de divers PFAS, alcaloïdes et mycotoxines. J'ai ensuite validé la méthode selon les critères retenus pour cette étude. Finalement, j'ai appliqué le processus de recherche ciblé et suspect aux 40 échantillons de ce travail, depuis la préparation d'échantillons jusqu'au retraitement et l'interprétation des données.

Concernant la rédaction de l'article, j'ai rédigé une première version complète, incluant le résumé, les points forts, les figures, les tableaux et les informations complémentaires (Supplementary Information). Cette version a d'abord été relue et corrigée conjointement avec les encadrants du projet. Une fois le manuscrit consolidé, il a été soumis à l'ensemble des co-auteurs pour une relecture approfondie et des suggestions de modifications. Le processus de révision en réponse aux commentaires des évaluateurs a suivi la même démarche collaborative.

****

Abstract

Since food is a major route of exposure to chemical contaminants, this study aimed to develop and apply an innovative method to improve assessment of consumer exposure. Initially, a comprehensive targeted screening method was established for the analysis of residues (pesticides, veterinary drugs, and industrial chemicals) and contaminants (per- and polyfluoroalkyl substances, mycotoxins, and alkaloids) in food matrices, based on QuEChERS extraction coupled with UHPLC-Q-ToF-MS. The

method was validated on 40 samples for 858 chemicals spiked at 0.01, 0.05, and 0.1 $mg \cdot kg^{-1}$, following EU guidelines for pesticide residue analysis. Screening detection limits (SDLs) and limits of identification (LOI) were determined and highlighted the importance of LOI over SDLs. Targeted screening of 872 chemicals in these 40 commercial samples revealed that 63 % contained at least one contaminant, with 31 substances unequivocally identified. Finally, a supplementary suspect screening approach was used and identified 109 chemicals at level 2a, of which six were confirmed at level 1, demonstrating the robustness and added value of the combined strategy.

Keywords

LC-HRMS, multi-residue and contaminant method, screening method, method validation, QuEChERS

1. Introduction

Recurrent exposure to mixtures of contaminants and chemical residues through the environment and diet represents a significant risk factor for the development of various chronic diseases (Breitwieser *et al.*, 2018; Zahm *et al.*, 2024). From a public health perspective, identifying and thoroughly characterizing the full array range of chemical substances to which humans are exposed throughout their life is essential to develop effective prevention strategies. Food, which is one of the main routes of exposure to contaminants, often contains a wide range of synthetic compounds introduced through industrial and agricultural activities. For instance, per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS), extensively used since the 1950s, have been recognized by the European Food Safety Authority (EFSA) as presenting health risks, leading to the establishment of a tolerable weekly intake (TWI) (EFSA, 2020). Certain PFAS have recently been classified as persistent organic pollutants (POPs) under the Stockholm Convention. Reflecting their potential harm, four PFAS have recently been subjected to specific regulatory measures in foodstuffs to protect consumers (EFSA, 2020). However, based on the updated Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) definition of PFAS, over 7 million PFAS compounds are currently cataloged in the PubChem database (Schymanski et al., 2023). In line with these safety thresholds, EFSA recommended intensifying efforts to expand the number of PFAS

included in monitoring programs, a priority that was later reaffirmed in European regulations encouraging the investigation of emerging PFAS (EFSA, 2020; European Commission, 2022b). Similarly, maximum residue limits (MRLs) have been established for other well-known substances, particularly pesticides, which are widely used and may create considerable concerns for human health worldwide (European Parliament, 2005; Ntzani *et al.*, 2013). However, other pesticides or pesticide metabolites remain unregulated and are often overlooked in routine programs. Although they are not explicitly covered by current regulations, metolachlor-ethanesulfonic acid (MESA) and metolachlor-oxanilic acid (MOXA), two metabolites of metolachlor — a widely used herbicide — are frequently detected in environmental samples, particularly in surface and groundwater (Yokley *et al.*, 2002). Other substances of interest, such as veterinary drugs, are now recognized as major classes of emerging contaminants (Samal, Mahapatra et Hibzur Ali, 2022). Once released into the environment, all these bioaccumulative substances predominantly accumulate in marine species (Amziane *et al.*, 2022; Diallo *et al.*, 2023b). Beyond these well-characterized compounds, numerous other chemical residues and contaminants, including non-intentionally added substances (NIAS) (Nerín *et al.*, 2022), can be found in food, highlighting the need for an overall approach to more accurately assess human exposure to these cocktails of substances (Shaw, 2014; Göbölös *et al.*, 2024) through targeted, suspect, and non-targeted screening methods.

In this context, the development of a very broad multiresidue method, including sample preparation, data acquisition, and data processing steps, is essential to obtain the most exhaustive method possible for the analysis of several classes of compounds. The Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) method is a commonly used extraction technique that was initially developed for pesticide extraction and has been the subject of extensive research over the past few years to adapt its protocol to various other contaminants, due to its rapid protocol, reliable results, and accessible cost (Kim *et al.*, 2019). As a result, other methods, not only suitable for pesticide analysis, based on the QuEChERS technique (i.e., containing a solvent salting-out extraction (SOE) step followed by a dispersive-solid phase extraction (d-SPE) step), have been developed. These include the QuEChUP (combination of

QuEChERS and QuPPe) (Diallo *et al.*, 2023b) or QuEChERSER (QuEChERS + efficient and robust) (Taylor et Sapozhnikova, 2022) methods, enabling the extraction of a greater number of compounds. In fact, a QuEChUP method, involving double extraction with acetonitrile (ACN) and an ACN/methanol (ACN/MeOH) mixture, was developed and then validated for pesticide and veterinary drug analysis (n = 850) in seafood products (Diallo *et al.*, 2023b). The QuEChERSER mega-method was initially developed for the analysis of pesticides, veterinary drugs, and environmental contaminants (up to n = 350) in fish and meat samples, subsequently including 33 PFAS analyzed in beef, catfish, chicken, pork, and eggs (Taylor et Sapozhnikova, 2022). Inspired by the QuEChERS method, these approaches involve the use of ACN and/or a mixture ACN/MeOH as extraction solvent for the first step. While these methods perform the salting-out step using a magnesium sulfate/sodium chloride ($MgSO_4$ /NaCl) mixture (4/1; w/w), different d-SPE can be used for the purification step depending on the target compounds and the matrix under study, such as one or a combination of the following compounds: $MgSO_4$, primary and secondary amine (PSA), C_{18}, graphitized carbon black (GCB), sodium sulfate (Na_2SO_4), or Enhanced Matrix Removal–Lipid (EMR-Lipid) (Valsecchi, Rusconi et Polesello, 2013; Al Amin *et al.*, 2020; Taylor et Sapozhnikova, 2022; Diallo *et al.*, 2023b; Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025).

For large-scale screening applications, the methods involve liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) for separation and data acquisition purposes. The selection of the stationary phase, specifically the chromatographic column, can be optimized to develop analytical methods able to cover the widest possible range of compounds. For the analysis of pesticides and veterinary drugs in seafood products, a C18 column (Aqua C18 column (Phenomenex) (Aqua)) is commonly used (Diallo *et al.*, 2023b). Non-targeted analysis of PFAS in food samples is often performed using another C18 column (Hypersil GOLD column (Thermo Fisher Scientific)) (Li *et al.*, 2023; Stroski *et al.*, 2024). To overcome the limitations associated with targeted screening, such as the limited number of compounds analyzed, full-scan techniques based on HRMS, including Orbitrap-based instruments

and time-of-flight (ToF) MS systems, are increasingly popular (Rajski *et al.*, 2021; Chu et Letcher, 2024; Makni *et al.*, 2024).

LC-HRMS is increasingly used due to the simultaneous approaches it enables, such as targeted, suspect, and non-targeted approaches, which extend the number of detectable analytes (Rajski *et al.*, 2021). These new approaches enable increasingly comprehensive exploration of the chemical exposome, without prior presumptions, providing access to knowledge on a wider spectrum of chemical substances. By leveraging advanced software, they overcome the traditional dependence on analytical standards for each compound (Chu et Letcher, 2024; Makni *et al.*, 2024).

The objective of the present study was to develop a broad multi-residue and contaminant approach to increase the number of compounds identified in a single analysis and to generate occurrence data contributing to a better understanding of the food chemical exposome, by applying targeted and suspect methods to a large panel of food samples. First, the targeted method was developed using nearly 400 substances with highly diverse physicochemical properties, including pesticides, veterinary drugs, their transformation products and industrial chemicals, and PFAS. This targeted method was subsequently validated for 858 multi-class chemical contaminants, comprising the previously mentioned substances and additional pesticides, PFAS, alkaloids, and mycotoxins, in various seafood products (n = 20) and dairy products (n = 20), in accordance with the SANTE guidelines for pesticide residue analysis (European Commission, 2021b). To demonstrate its applicability, this large-scale targeted screening method was applied to screen for over 858 chemical contaminants in real food samples. This study presents comprehensive data on the presence of a wide range of multi-class chemical contaminants in these samples. Additionally, a suspect screening approach using MSDial software was applied to extend analytical coverage, enabling the annotation of chemicals beyond those included in the initial validation. Principal component analyses (PCAs) were also carried out to discriminate atypical samples and identify typical mixtures of certain samples.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

The analytical standards of 746 pesticides and industrial chemical standards, divided into five mixtures (5 $mg.L^{-1}$ of each compound in solvent (ACN or MeOH), were obtained from LGC Standards (North Charleston, SC, USA). The analytical standards of 204 LC pesticides, divided into ten mixtures (100 $mg.L^{-1}$ of each compound in ACN), were purchased from Restek Corporation (Les Ulis, France). These pesticides were used to optimize the sample preparation method and were included in the 746 compounds mix presented above. A kit of 180 veterinary drug analytical standards, divided into ten mixtures (10 $mg.L^{-1}$ of each compound in either ACN or MeOH), was obtained from the ANSES Fougères Laboratory (France). The analytical standards of 27 PFAS and 21 alkaloids were obtained from LGC Group. A kit of 41 PFAS analytical standards was purchased from Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). The analytical standards of five mycotoxins were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). All working solution mixtures were prepared by appropriate dilution of intermediate solutions and in the appropriate solvent, and stored at -20°C. Of the initial 994 contaminants, 872 could be successfully identified in solvent at 0.1 $mg.L^{-1}$ and were selected for this work (Table S1): 651 pesticides, 157 veterinary drugs, 39 PFAS, 20 alkaloids, and five mycotoxins. These chemicals are mainly pesticide residues (acaricides, algaecides, fungicides, herbicides, insecticides, nematicides, and rodenticides), some veterinary drugs (antibiotics, antimicrobial agents, and anti-inflammatory drugs), environmental and industrial chemicals, as well as dual-use substances and their transformation products, some PFAS, some alkaloids, and some mycotoxins, and were selected as an appropriate model for representing multi-contaminants.

ACN (HPLC-MS grade ~ 98%), MeOH, and formic acid (FA) (LC-MS grade, ~ 98%) were obtained from Thermo Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Ultrapure water (18.2 MΩ.cm), obtained through a Millipak 40 Gamma Gold Filter (pore size 0.22 µm) with a Milli-Q ultrapure system, was obtained from Merck Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Extraction salt kits containing 1.6 g of $MgSO_4$ and 0.4 g of NaCl, a d-SPE kit containing 50 mg of PSA, 150 mg of C18 end-capped (C18EC),

and 900 mg of Na_2SO_4, and EMR–Lipid d-SPE were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

2.2. Equipment and apparatus

A Genie 2 vortex mixer from Scientific Industries (Bohemia, NY, USA), an Eppendorf 5810 centrifuge from Eppendorf (Hamburg, Germany), a cooled centrifuge Universal 320R model from Hettich Lab Technology (Tuttlingen, Germany), an evaporating unit (Reacti-Vap, model 18780) from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) were used during sample extraction.

A Dionex UltiMate-3000 ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) system, equipped with a binary pump and autosampler from Thermo Fisher Scientific, coupled to a Q-ToF mass spectrometer (TripleTOF 5600^{TM}) from AB Sciex (Darmstadt, Germany) operating in electrospray ionization (ESI) mode was used for samples analysis. All the UHPLC-Q-ToF-MS parameters used for analysis are listed in Table S2.

To develop the analytical method, three columns equipped with the same Aqua® pre-column (4.0 mm × 2.0 mm, 3-µm particle size, Phenomenex Inc, Torrance, CA, USA) were used: an Aqua® C18 column (Aqua) (150 × 2 mm, 3-µm particle size, 125 Å pore diameter; Phenomenex) (column 1), a Hypersil GOLD column (150 × 2.1 mm, 3-µm particle size, 175 Å pore diameter; Thermo Fisher Scientific) (column 2), and an Ultra Aqueous C18 column (UltraAqua) (150 × 2.1 mm, 3-µm particle size, 125 Å pore diameter; Restek Corporation) (column 3).

2.3. Investigated samples

This work focused on the analysis of foods representative of consumer consumption across all age groups, from childhood to adulthood, especially rich in protein. In total, 30 varied foods were purchased in France (local markets (Île-de-France), 2022). Samples were used for protocol development, method validation, and targeted and suspect screening analysis (Table S3). In line with

our previous work (Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025), seafood and dairy products were selected for this study.

To optimize analytical development (sample preparation and analytical method), a pooled fish sample, containing five various fish samples (i.e., lean and fatty fish), was used as a representative and model sample. This pooled fish sample has many advantages, such as ensuring representation of matrix diversity, reduced extraction time and number of injections into the HRMS system, and faster data processing flows. To compare the analytical conditions (columns and gradients), while minimizing the impact of the extraction process, the 20 fish in this study were also extracted, pooled, and spiked with the mix of 397 contaminants. The samples were frozen at -20 °C until analysis and were stored at 4 °C overnight before extraction method.

2.4. Sample preparation

The sample preparation method was applied to 1 g of solid food sample, 1 g of powdered milk, or 1 g of prepared milk in 50-mL polypropylene centrifuge tubes. Milk samples were prepared as consumed: rehydrated, as described on the milk powder pack, i.e., seven doses (31.5 g milk powder) for 210 mL of ultra-pure water, and then heated in the microwave in a glass container.

A mixture of 397 contaminants, including 201 pesticides, 169 veterinary drugs, and 27 PFAS, was used to optimize analytical development (sample preparation and analytical method). These contaminants were selected as they are representative of the wide range of physicochemical properties of the other contaminants, i.e., retention time (Rt) (0.78 to 17.03 min), mass-to-charge ratio (*m/z*) (88.07569 to 958.53699) and dynamic polarity range (LogP) (- 4.2 to 7.7). The solutions of selected contaminants were added to the 1 g sample. For sample preparation development, spiking levels above or close to the respective regulatory concentrations were set as follow: supplementation at a concentration of 0.1 $mg.kg^{-1}$ for pesticides following (European Commission, 2021b), at 0.025 $mg.kg^{-1}$ for veterinary drugs following (Codex Alimentarius Commission, 2021), and at 0.01 $mg.kg^{-1}$ for PFAS following

(European Commission, 2022c). These levels were selected as indicative values, acknowledging that regulatory limits vary between compounds and matrices.

Then, the samples were left in contact with the spiking solutions for 15 min at room temperature, before being mixed. To these samples, 4 mL of ACN and 1 mL of ultra-pure water were added to each tube, and the sample was vortexed for 10 min. A mixture of 800 mg of $MgSO_4$ and 200 mg of NaCl was then added, and the samples were shaken immediately by hand, vortexed for 1 min, and centrifuged for 5 min at 4,000 rpm (4 °C). Then, 3 mL of the supernatant was transferred to a 15 mL centrifuge tube containing 50 mg of PSA, 150 mg of C18EC, and 900 mg of Na_2SO_4. The tube was vortexed for 1 min, and centrifuged for 5 min at 4,000 rpm (4 °C). Supernatants were filtered through 0.2 µm PTFE filters. The extract was evaporated to near dryness under nitrogen and reconstituted in 100 µL of ACN/H_2O (10/90; v/v) for injection into the UHPLC-QToF system.

2.5. UHPLC-QToF-MS conditions

Reversed-phase liquid chromatography separation was performed using an Aqua® C18 column (150 × 2 mm, 3-µm particle size, 125 Å pore diameter; Phenomenex Inc.) (column 1) equipped with an Aqua® pre-column (4.0 mm × 2.0 mm, 3-µm particle size, Phenomenex Inc.). The column oven temperature was set to 50 °C.

A gradient elution with ultrapure water (A) and ACN (B) both containing 0.01 % of FA was used. In this work, three different gradients were tested to optimize the analytical method. For the first (gradient A), the gradient started with 10 % B, increased linearly to 100 % in 9 min (held for 3 min), before returning to 10 % in 1 min (held for 3 min). The total cycle time was 16 min. For the second (gradient B), the gradient started with 10 % B, increased linearly to 100 % in 15 min (held for 3 min), before returning to 10 % in 1 min (held for 4 min). The total cycle time was 23 min. For the last gradient (gradient C), the only difference from gradient B was that the gradient started with 0 % B, for a total run time of 23 min. The flow rate was 0.5 $mL.min^{-1}$ and the injection volume was set at 10 µL. The autosampler was thermo-regulated at 10 °C to prevent sample degradation during analytical runs.

Before each batch, the TripleTOF 5600^{TM} system was systematically tuned and calibrated manually using the atmospheric pressure chemical ionization (APCI) positive or negative calibration solutions for the 5600 system (AB Sciex Technology) in ToF MS and ToF MS/MS in high-resolution and high-sensitivity modes, respectively. Furthermore, automated calibrations were performed within the batch every five samples to avoid as much as possible a mass deviation over 5 ppm during the analytical run. The detection was carried out in positive (ESI +) and negative (ESI -) electrospray ionization modes, in separate injections. ESI source parameters were as follows: ion spray voltage floating (ISVF) = 5.5 kV in ESI+ and -4.5 kV in ESI-, source temperature (TEM) = 500 °C, curtain gas (CUR) = 30 psi, nebulizing gas (GS1) = 40 psi, and heater gas (GS2) = 45 psi.

Data acquisition was performed using a combination of full scan ToF-MS and information-dependent acquisition (IDA) mode. The mass range of full-scan ToF-MS acquisition was 50–1,000 Da at a resolving power of 32,000 at *m/z* 415.2728 in high-resolution mode. The accumulation time was set to 490 ms. The declustering potential (DP) was set at 80 eV in ESI+ and - 80 eV in ESI-, and the collision energy (CE) was 10 eV in ESI+ and - 10 eV in ESI-. In IDA mode (MS/MS data acquisition), including the ten most intense precursor ions (Top10) in high sensitivity mode (i.e., intensity > 50 cps with ion tolerance ≤ 10 ppm), we included a pre-selection of the ions to be fragmented as a priority using a precursor ion list (PIL), containing the retention time (Rt) and the mass-to-charge ratio (*m*/*z*) of the targeted compounds. The DP was set at 80 eV in ESI+ and - 80 eV in ESI-, and the CE was 40 eV in ESI+ and -40 eV in ESI-, with a spread of ± 20 eV (i.e., 20, 40, and 60 eV) in high-resolution mode. Data acquisition with the UHPLC-Q-ToF system was performed using Analyst® software (version 1.7) from AB Sciex.

2.6. Method validation

To develop a comprehensive broad-spectrum analytical method, this study focused on multiple families of chemical compounds representing diverse physicochemical properties and occurrence patterns. By encompassing a wide range of compound classes, the method aimed to enhance detection coverage and applicability across various sample types.

Although validation criteria differ among these molecular families (**Tableau 4**), a uniform set of criteria was applied to all, in order to rapidly evaluate the performance of the developed method. This study contains a majority of a mixture of pesticides including industrial chemicals (75 %), followed by veterinary drugs (18 %), i.e., 93% of validated molecules, PFAS (4 %), and alkaloids and mycotoxins (3 %). In addition, the SDL definition used for pesticide validation shares common features with other validation criteria, such as the false-negative rate applied in the CCβ method 2 from Regulation (EU) 2021/808 (Commission Regulation, 2021), the mass accuracy threshold ≤ 5 ppm for PFAS, or the Rt tolerance of ± 0.1 min for alkaloids and mycotoxins. Although the SANTE guideline criteria are designed for pesticides, their validation criteria are broadly applicable and were applied for all molecules (PFAS, veterinary drugs, alkaloids, and mycotoxins) to ensure consistent and rapid performance assessment. This exploratory study was designed to evaluate the versatility of the method rather than its regulatory applicability.

Tableau 4. *Comparison of validation criteria for molecular families (pesticides, veterinary drugs, PFAS, alkaloids, and mycotoxins) in food matrices*

	Reference text for method validation in foodstuffs	**Validation parameters**	**HRMS identification criteria**
Pesticides	*Document No. SANTE/11312/2021* (European Commission, 2021b)	screening detection limit (SDL) n ≥ 20 samples false-negative rate < 5%	ΔRt ≤ 0.1 min 2 ions with mass accuracy ≤ 5 ppm signal-to-noise (S/N) ratio ≥ 3
Veterinary drugs	*Regulation (EU) 2021/808* (Commission Regulation, 2021)	criteria CCα/β n ≥ 20 blank samples supplemented false-compliant rate (β error) < 5%	ΔRt of ± 0.1 min mass error ≤ 5 ppm
PFAS	*Guidance Document for PFAS in Food and Feed V2.0* (EURL POPS, 2024)	limit of quantification (LOQ) false-negative rate < 5%	Δrelative Rt of the analyte and that of the calibration standard < 1 % 2 ions with mass accuracy ≤ 5 ppm

			S/N ≥ 3
Alkaloids Mycotoxins	*Regulation (EU) 2023/2783* (European Commission, 2023a)	LOQ n ≥ 20 negative control samples and 20 positive control samples false-negative rate < 5%	ΔRt ≤ 0.1 min ΔRt ≤ 0.05 min if internal standard 2 ions with mass accuracy ≤ 5 ppm S/N ≥ 3

Before the validation process, non-spiked (blank) samples were first extracted and analyzed to assess the compounds already present, and to exclude them from the process. The term "detection" was used when a compound satisfied the following criteria: Rt variation ± 0.1 min and accurate mass measurement ± 5 ppm, compared with the standard in the same analysis sequence. The term "identification" was used when a compound satisfied the following criteria: Rt variation ± 0.1 min, accurate mass measurement ± 5 ppm, and a spectral similarity > 70 % between experimental and reference MS/MS fragmentation spectra. The term "false positives" is used to define the number of compounds detected but not identified. The term "false negatives" refers to the failure to detect a compound present in the sample. According to the SANTE guidelines and Regulation 2021/808, the tolerance for this type of error should be kept as low as possible, and should not exceed 5%.

To validate the QuEChERS-LC-HRMS screening method, 20 different seafood products (fish (n = 10) and shellfish (n = 10)) and 10 different infant milks were extracted twice: from the powder (n = 10) and then extracted after rehydration (n = 10), according to the protocol described in Section 2.4, for a total of 40 samples: 20 seafood and 20 dairy products. Before extraction, samples were spiked with a mixture of the 858 contaminants at 0.001, 0.01, and 0.1 $mg.kg^{-1}$ to establish the SDL—previously defined—and the limit of identification (LOI) for all compounds. A mixture of 858 contaminants, including 651 pesticides, 157 veterinary drugs, 39 PFAS, 20 alkaloids, and five mycotoxins, was used to provide a demonstration of its relevance and scope of application over a wide variety of multi-class contaminants. The LOI, not required according to SANTE/11312/2021 guidelines, was established as the lowest concentration for which a compound was correctly identified in at least 95 % of the samples (i.e., 19 out of 20 samples), using the same criteria as for SDL (Rt variation ± 0.1 min and accurate mass

measurement ± 5 ppm) and additionally requiring a spectral similarity > 70 % between experimental and reference MS/MS fragmentation spectra using the FIT algorithm (Makni *et al.*, 2022). This MS/MS search algorithm reflects the degree of similarity of the peaks and intensities of the experimental spectrum with those of the reference spectrum, unaffected by interfering fragment ions.

2.7. Data processing and analysis

A total of 40 samples, including seafood products (n = 20) and dairy products (n = 20), were studied to investigate the presence of a wide range of substances, including both known and potentially unknown compounds of interest, by targeted and suspected approaches.

2.7.1. Target screening

For targeted screening, data were processed using PeakView® software (version 2.2, AB Sciex), which includes the MasterView™ module, as well as the development and optimization of this method, allowing rapid and automated screening of samples from a list of compounds. This module is interconnected to LibraryView™ software (version 1.0.3, AB Sciex) allowing comparison of a compound's experimental fragmentation spectrum with its reference fragmentation spectrum.

For this purpose, a homemade MS/MS library containing all the contaminants and the residues (n = 872) from this study was built using the convenient LibraryView™ software, with the same method as described in a previous study (Diallo *et al.*, 2023b). Their wide range of physicochemical properties and varied fields of use making them ideal for a wide range of applications to assess their occurrence in food samples. Accurate *m*/*z* of the precursor ion, Rt, molecular formulae, the CAS number, isotopic pattern, and the MS/MS fragmentation spectrum of the available compounds were added to the library. In this MS/MS library, the added fragmentation spectra were considered the reference spectra for the automated detection and identification process.

Samples were screened for contaminants at detection and identification levels, according to the same criteria as those detailed in section 2.6.

2.7.2. Suspect screening

For suspect screening analysis (SSA), the acquired data from the AB Sciex instrument (.wiff format) were converted to .mzML format using the conversion tool MSConvert GUI (64 bit) version 3.0.23143 (ProteoWizard, Palo Alto, CA, USA). Data processing was performed using the open-source MSDial software (version 4.9.2), in order to extend screening and annotation to compounds of interest from external MS/MS libraries, and for which analytical standards are unavailable. The annotation feature in MSDial was implemented using MS/MS spectra from the Mass Bank of North America (MoNA), using a total of 99,260 spectra in positive mode and 47,058 in negative mode, as well as a list containing 6,936 MS/MS PFAS spectra in negative mode for screening. Suspect screening was conducted based on the following criteria: (a) well-defined, relative signal-to-noise (> 10), and Gaussian peak shape, (b) an experimental mass error within ± 0.01 Da compared to the theoretical precursor mass to reduce irrelevant features, (c) spectral similarity of over 70 % between experimental and reference MS/MS spectra, and (d) absence or significantly lower signal intensity of the compound in solvent and extraction blanks compared to the samples, with a signal-to-blank ratio greater than 10. The spectral comparison employed the reverse DOT algorithm, similar to the FIT algorithm in MasterView™ software (for targeted analysis in this work). Contaminants satisfying these criteria were considered putatively identified with a confidence level of 2a, according to scale by Schymanski et al. (2014).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the sample preparation protocol

The QuEChERS and QuEChUP methods appear to be the most suitable for extracting a wide range of substances in various food matrices (Taylor et Sapozhnikova, 2022; Diallo *et al.*, 2023b). The choice of extraction solvent is an important step in extraction methods, in agreement with the literature on pesticide, veterinary drug or PFAS extraction (Taylor et Sapozhnikova, 2022; Diallo *et al.*, 2023b). In this work, four different conditions were compared: QuEChERS-based conditions with 4 mL of ACN (1) or 5 mL of ACN/MeOH (4/1, v/v) (2), and QuEChUP-based conditions with double extraction with 4 mL of ACN (3) or 4 mL of ACN followed by 5 mL of ACN/MeOH (4/1, v/v) (4). As with the choice of the

extraction solvent, the purification step is crucial to eliminate interferences in order to improve detection of compounds, while preserving them. Various types of d-SPE are used in QuEChERS and QuEChUP methods as purification steps, but some seem more appropriate depending on the matrices and compounds studied. In this way, two d-SPE were selected: PSA/C_{18}/Na_2SO_4 (A) and EMR–Lipid (B) (Valsecchi, Rusconi et Polesello, 2013; Al Amin *et al.*, 2020; Taylor et Sapozhnikova, 2022; Diallo *et al.*, 2023b; Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025), which should eliminate interfering substances, while preserving the analytes of interest.

To determine the ability of the developed protocol to extract a wide range of compounds, five fish products (oysters, cod fillet, salmon, lobster, and horse mackerel) were pooled to reflect the diversity of seafood matrices. Pooled matrices were supplemented in triplicate with a diverse mixture of contaminants and residues, potentially present in matrices, including 201 pesticides (0.1 $mg \cdot kg^{-1}$), 169 veterinary drugs (0.025 $mg \cdot kg^{-1}$), and 27 PFAS (0.01 $mg \cdot kg^{-1}$), used as model compounds.

The influence of these extraction parameters was compared to maximize the number of compounds detected (detection rates), through eight different tests (**Figure 47**). The performance of the protocol was evaluated based on its effectiveness in extracting a broad spectrum of contaminants under the conditions investigated. The optimal condition was identified, providing the highest detection efficiency for the targeted compounds, with the highest signal-to-noise (S/N) ratios and intensities.

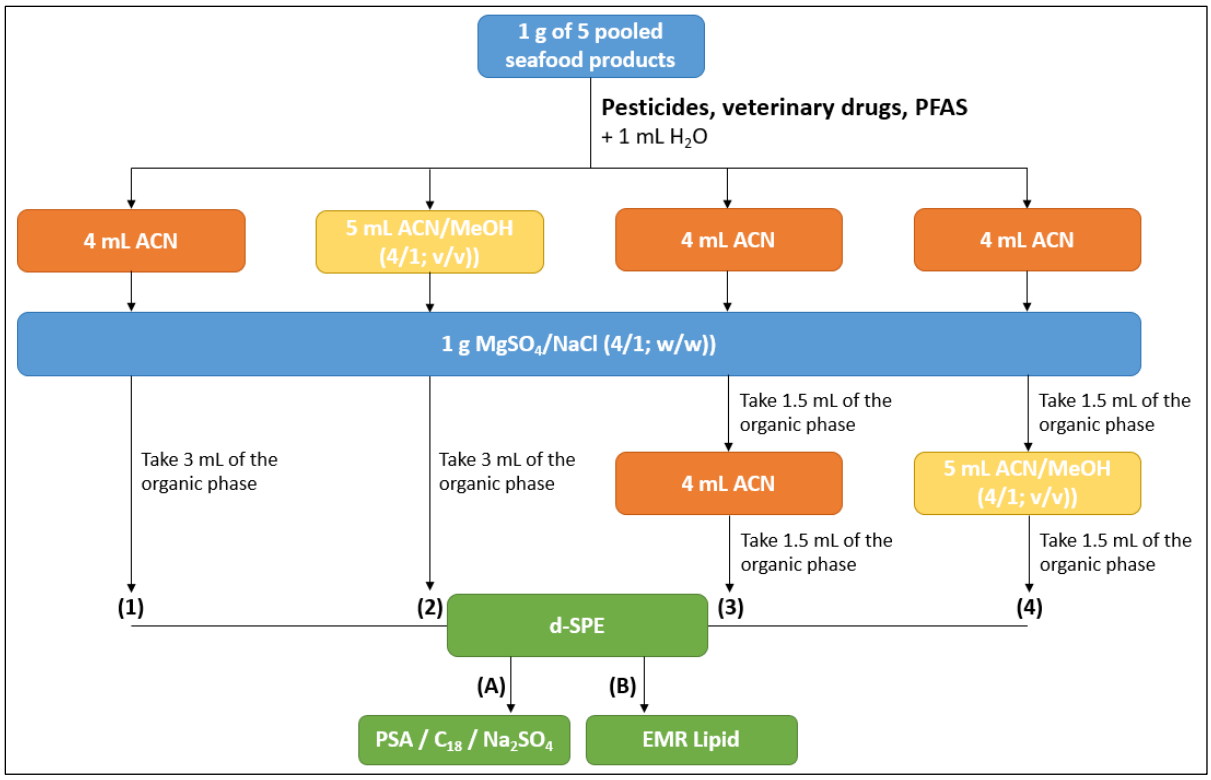


***Figure 47**. Overview of the four sample extraction protocols (1, 2, 3, 4) followed by a puritifcation step using d-SPE (A or B) for the analysis of 397 residues and contaminants (201 pesticides, 169 veterinary drugs, and 27 PFAS) in seafood samples.*

These results were then investigated for each family of compounds, to ensure that the protocol could be adapted to as many compounds as possible (**Figure 48**). For pesticides, the highest detection rates were obtained for extraction conditions 1 (94 %) or 3 (93 %), with a purification step by PSA/C_{18}/Na_2SO_4. For veterinary drugs, condition 2, regardless of the d-SPE used (82 and 84 %; (B) and (A), respectively), and condition 4, with a purification step by PSA/C_{18}/Na_2SO_4 (82 %), provided the best detection rates. Finally, four conditions were able to detect 100 % of the targeted PFAS: conditions 1 and 4 with EMR–Lipid as the d-SPE step, and condition 3 regardless of the d-SPE used. Overall, the detection rates ranged from 81 to 88 % for all experiments and all compounds (**Figure 48**).

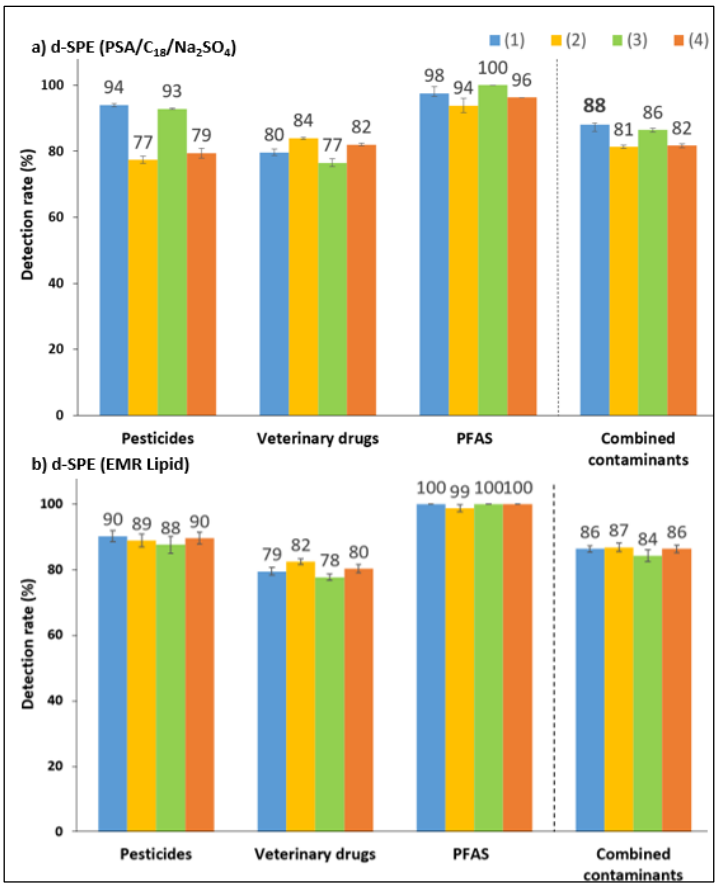


Figure 48. *Detection rates (%) of four extraction methods (1, 2, 3, 4) using two different d-SPE as a purification step PSA/C_{18}/Na_2SO_4 (a) or EMR–Lipid (b), in the pooled fishery products sample supplemented between 0.01 mg·kg^{-1} and 0.1 mg·kg^{-1} with 397 chemicals (201 pesticides, 169 veterinary drugs, and 27 PFAS). The error bars correspond to the standard deviation (SD) (Mean ± SD, n = 3).*

On the basis of these results (**Figure 48**), the addition of MeOH (conditions 2 and 4) enabled more veterinary drugs to be extracted using any d-SPE, unlike pesticides where the identification rate most often decreased. Nevertheless, a two-step extraction process, regardless of the solvents and d-SPE used, does not appear to be necessary to extract a wide range of contaminants. A single extraction provided higher detection rates and faster processing times, while reducing extraction costs.

However, among the eight experiments compared, there was not a single one where the detection rate was the best for all three groups. A compromise must be found to develop a protocol that can be adapted to the greatest number of compounds, also by studying the results of combined contaminants. The best performances (88 %; condition A1) were found using an ACN/H_2O mixture as extraction solvent and d-SPE (PSA/C_{18}/Na_2SO_4) as the purification step. S/N ratios and intensities (**Figure 49**) were

also investigated, leading to the identification of this same condition (A1) as the most optimal choice. These parameters were then selected as the best compromise and used for further method development, validation, and application.

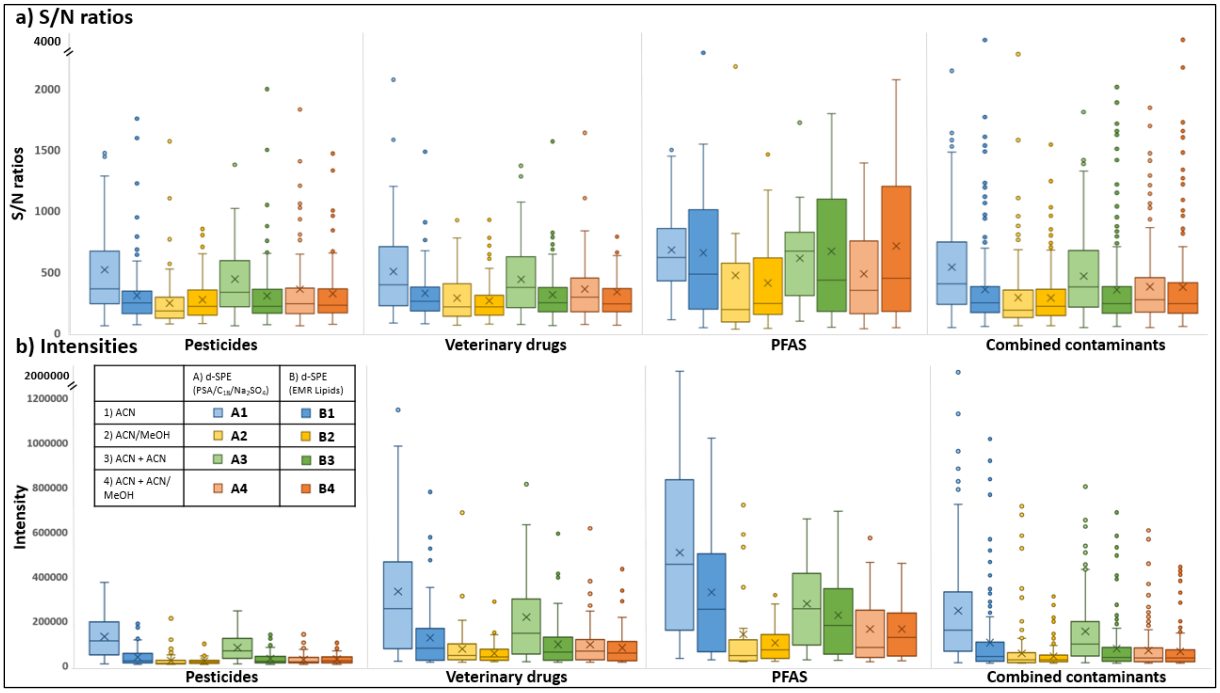


Figure 49. *Boxplot of a) S/N ratios and b) intensities obtained for 397 chemicals (pesticides (n = 201), veterinary drugs (n = 169), PFAS (n = 27)) and the sum of these compounds in pooled fishery products (n = 3) depending of the extraction methods (1, 2, 3, 4) and the d-SPE (A or B) used.*

3.2. Stationary phase and chromatographic gradient selection

The choice of stationary phase and chromatographic gradient is an important step for efficient compound separation of all targeted compounds.

In this work, these two main parameters were tested simultaneously by comparing 3 chromatographic columns (1, 2, 3) widely used for the analysis of pesticides, veterinary drugs, PFAS, and multi-residue methods, and three chromatographic gradients (A, B, C), which are presented in Section 2.5. As a reminder, the columns considered are C18 columns with different properties: Aqua (1) and a Hypersil GOLD (2) based on their widespread use in bibliographic research, and UltraAqua (3) which should enable the detection of a greater number of polar compounds than the Aqua column, thanks to gradient modifications. To assess the impact of increasing the analysis time from 16 (A) to 23 min (B), all columns were tested with gradients A and B. Column C was also tested under another

chromatographic condition (C), as it allows for the chromatographic gradient to begin with a percentage of total aqueous phase. These comparisons were carried out in an extract obtained by the extraction of 20 pooled fish products, which were post-supplemented with the 397 contaminants (0.1 $mg.kg^{-1}$ for pesticides, at 0.025 $mg.kg^{-1}$ for veterinary drugs, and at 0.01 $mg.kg^{-1}$ for PFAS), in triplicate. The results of the percentage of compounds detected, S/N ratios and intensities obtained are shown in **Figure 50** and in **Tableau 5**.

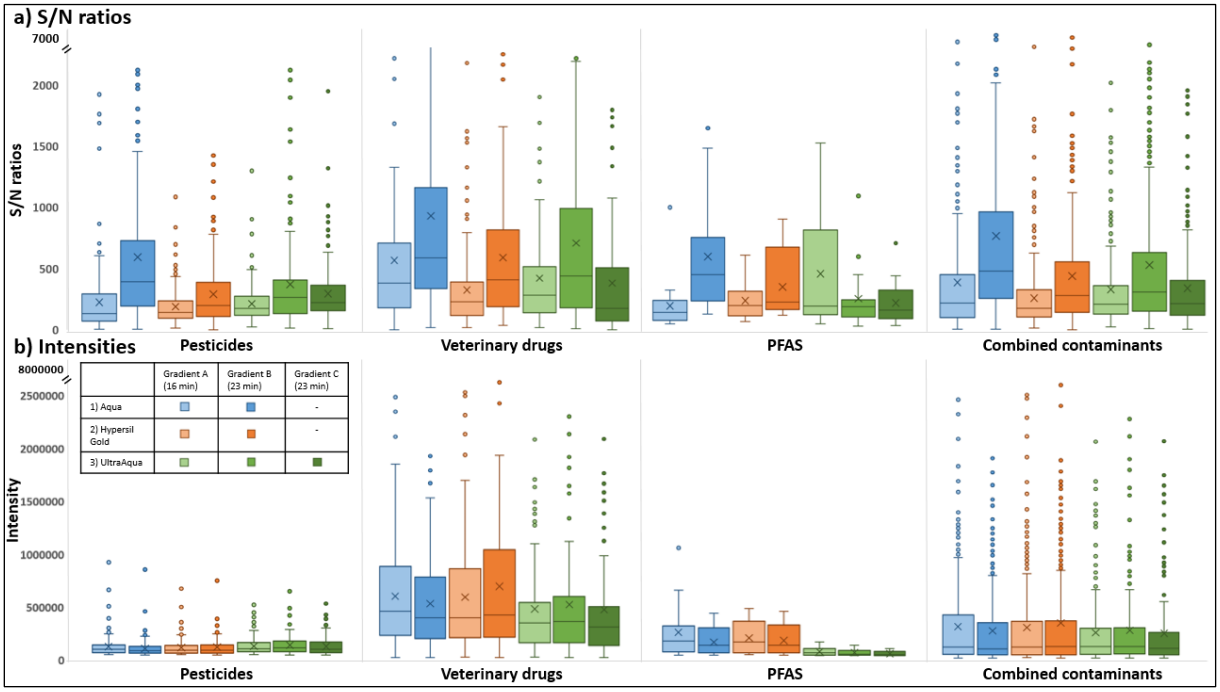


Figure 50. *Boxplot for a) S/N ratios and b) intensities obtained for pesticides (n = 201), veterinary drugs (n = 169), PFAS (n = 27) and the sum of these compounds in 20 pooled fishery products (n = 3) depending on the chromatographic column (1, 2, 3) and gradient (A, B, C) applied.*

Tableau 5. *Percentage of compounds detected according to chromatographic column and gradient used in the extract post-supplemented between 0.01 and 0.1 $mg.kg^{-1}$ with the 397 chemicals.*

	Column 1	***Column 2***	***Column 3***
Gradient A	**98 %**	**98 %**	**96 %**
Gradient B	**99 %**	**98 %**	**97 %**
Gradient C	**-**	**-**	**93 %**

These results indicate that, in most cases, increasing the gradient time led to the detection of more compounds and better S/N ratios, regardless of the column used. Furthermore, column 1 (Aqua), combined with chromatographic gradient B (23 min), provided the highest percentage of compounds detected (99 %) in these seven comparisons (**Tableau 5**). However, this percentage remained high (i.e.,

98 %) using column 2 (Hypersil GOLD), for any gradient (A or B; 16 or 23 min), and column 1 (Aqua) with a shorter gradient (16 min). Column 3 (UltraAqua) presents the lowest detection percentages (i.e., between 93 and 97 %), regardless of the gradient used, and therefore does not appear to be suitable for the analysis of these contaminants.

Comparing the S/N ratio between different conditions is crucial for assessing the sensitivity, reliability, and performance of an analytical method. For this reason, the best analytical condition was established for each compound family according to the S/N ratios obtained (**Figure 50**). For pesticide and veterinary drugs analysis, S/N ratios, and therefore method performance, were higher using column 1 (Aqua) and gradient B (23 min). Focusing on the PFAS analysis, the results show equivalent performance between configurations 1B (Aqua; 23 min) and 3A (UltraAqua; 16 min). Regarding the intensities, no optimal condition could be identified, as all seven conditions exhibited comparable intensity levels (**Figure 50**). As with the development of sample preparation, there was no single, unambiguous condition for these three families of compounds. Thus, it is important to consider these data together with the sum of all targeted compounds in order to reach a conclusion. Regarding all these results, column 1 (Aqua) combined with chromatographic gradient B (23 min) appeared to be the most suitable analytical method for analyzing the contaminants in this study and will be used to validate the method and its application to real samples.

3.3. Method validation

The objective of this part was to validate the developed method, according to the SANTE guidelines (European Commission, 2021b) and the criteria presented previously in Section 2.6. For validation purposes, 20 seafood and 20 dairy products, i.e., 40 different samples, were used separately, as detailed above in Section 2.3.

First, the samples were extracted and analyzed without the addition of compounds, in order to identify naturally occurring substances. In non-spiked seafood samples, 388 residues and contaminants were detected: 328 pesticides, 28 veterinary drugs, 20 PFAS, 5 mycotoxins, and 7 alkaloids (delta mass error

< 5 ppm and ΔRt ± 0.1 min). In these samples, 29 residues and contaminants, including 21 pesticides, 3 veterinary drugs, and 5 PFAS, were consistently identified. The difference between the number of compounds detected and identified highlights the importance of applying identification criteria to minimize false positives. This example also highlights the limitations of MS^1. Consequently, it is essential to establish the LOI rather than the SDL during the validation processes, as LOI are based on the same criteria as identification criteria.

Then, all samples were spiked with the mixture of 858 chemical residues and contaminants at three concentration levels (0.001, 0.01, and 0.1 $mg.kg^{-1}$) and analyzed with their respective non-spiked samples to establish corresponding LOI. The 29 identified compounds in non-spiked samples suggest background contamination and were therefore excluded from the validation process. Consequently, the LOI were established for 829 contaminants instead of 858. The LOI assessed in both types of matrices, including 20 samples in each category, and the individual LOI values obtained for each contaminant are presented in **Figure 51** and Table S1, respectively.

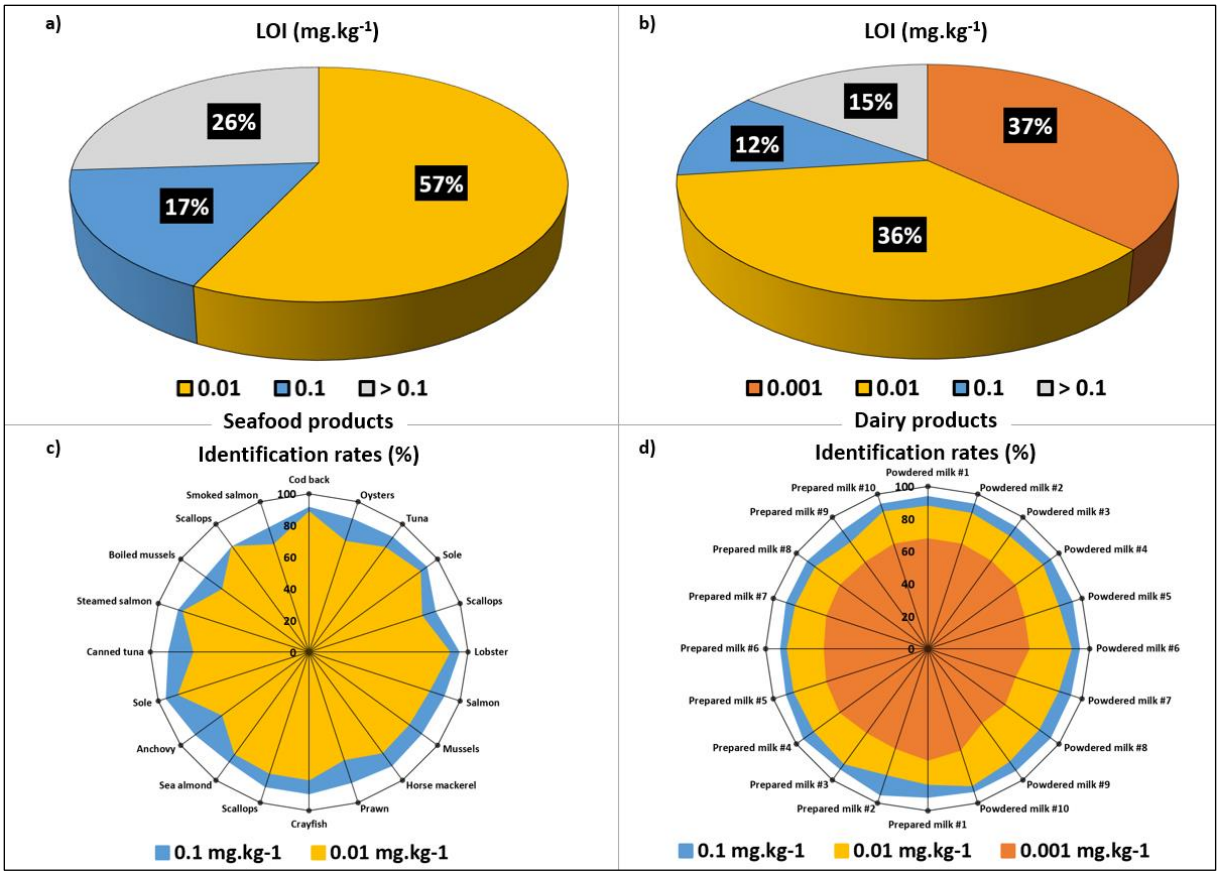


Figure 51. *Percentage of chemicals presenting limits of identification (LOI) at 0.001, 0.01, 0.1, and > 0.1 mg.kg^{-1} obtained in a) 20 seafood products, and b) 20 dairy products and identification rates at 0.1, 0.01, and 0.1 mg.kg^{-1} obtained in c) 20 seafood products, and d) 20 dairy products under optimized conditions.*

The LOI were determined at 0.001 mg.kg^{-1} for 95 contaminants (12 %), at 0.01 mg.kg^{-1} for 367 contaminants (45 %), and at 0.1 mg.kg^{-1} for 140 contaminants (17 %) (**Figure 51**a). In total, 462 chemicals (57 %) had an LOI ≤ 0.01 mg.kg^{-1}. Although some compounds do not satisfy the LOI criteria, the developed method identified them in some samples (n < 19).

To reduce the false-negative rate, which was strictly set at 5% maximum, we accounted for a variability of ± one sample, an approach aligned with the CCβ concept widely applied in the validation of veterinary drug residue detection methods. This logic was applied to all the compounds, considering that the validation of a compound in 18 out of 20 samples, rather than strictly in 19 samples, is still in line with the 95% reliability principle. This approach provides a balanced framework for assessing the robustness of the method, while reflecting the variability inherent in the analysis of complex samples. Therefore, LOI_{18} were recalculated. These LOI_{18} increased by 6 % (18 %) at 0.001 mg.kg^{-1}, 7 % (52 %) at

0.01 mg.kg^{-1}, and 3 % (20 %) at 0.1 mg.kg^{-1}, showing that some compounds do not satisfy LOI criteria, due to only one sample. It could be beneficial to allow for some variability in the results required to validate an SDL and/or LOI.

Depending on the sample, the identification rates ranged from 80 % to 94 % at 0.1 mg.kg^{-1}, and as expected, decreased to 67 % to 88 % at 0.01 mg.kg^{-1}, and 17 % to 62 % at trace level (0.001 mg.kg^{-1}) (**Figure 51**c). In addition, a slight difference in performance was observed between the studied matrices for all chemicals (**Figure 51**c), and for each chemical family (Fig. S1). The identification rate remained over 80 % for pesticides, PFAS, and alkaloids at 0.01 mg.kg^{-1}, whereas it dropped for veterinary drugs (61 %) and mycotoxins (74 %) (Fig. S1), highlighting the need to analyze results individually for each compound family.

The results of this part of the work demonstrated the good capabilities of the optimized method to indicate the presence of selected contaminants at concentrations up to ten times lower than authorized limits (MRL) for certain pesticides (European Parliament, 2005) and veterinary drugs (Codex Alimentarius Commission, 2021), and in agreement with the maximum levels set for certain PFAS in fishery products (European Commission, 2022c).

Regarding results obtained in dairy product samples, 521 contaminants were detected, while only 18 contaminants, 13 pesticides, 2 veterinary drugs, 2 PFAS, and 1 mycotoxin, were identified in non-spiked samples. As with seafood samples, many false positives were detected, compared with the number of compounds successfully identified. The importance of considering the MS^2 spectrum match, and therefore the need to include LOI criteria in the method validation process, was also demonstrated in this matrix. Details of the results and discussion are provided in Text S1 and in Fig. S2.

These validation results highlight the effectiveness and robustness of the optimized method for the extraction and analysis of seafood and dairy products. The results demonstrate excellent analytical performance, slightly lower than that obtained in a previous study on the same type of matrix (Diallo *et al.*, 2023b), which may be explained by a different sample preparation method and the inclusion of

additional compounds (PFAS, mycotoxins, and alkaloids). However, the resulting identification criteria demonstrated the applicability and efficiency of the screening method, in alignment with the MRLs established by the European Authority to protect consumers. By default, these MRLs are set at 0.01 $mg \cdot kg^{-1}$ for contaminants not specifically listed, enabling the identification of the majority of targeted compounds with the highest level of confidence.

To validate a multi-residue and contaminant method, harmonized criteria should be applied across chemical families. Our recommendations would be to combine the SANTE SDL approach with the CCβ principle from Regulation (EU) 2021/808, allowing up to 5% false negatives (e.g., 19 ± 1 positives out of 20). Additionally, we recommend using ≥ 20 spiked samples per group, plus unspiked matrices to assess background, and to include LOI criteria for MS^2 spectral matching. Maintaining mass accuracy ≤ 5 ppm and ΔRT ≤ 0.1 min is also important. These conditions also apply to PFAS and other contaminants.

3.4. Application to real food samples

3.4.1. Targeted screening analysis

To evaluate the applicability of the developed and validated method, 40 food samples, representing food for all ages, were analyzed. Table S4 summarizes residues and contaminants unequivocally identified in all samples. In total, 31 different residues and contaminants were identified on screening the 40 samples. An industrial chemical (tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP)), used as a flame retardant or plasticizer, and a PFAS (perfluorotridecanoic acid (PFTrDA)) were the most frequently identified compounds (Fig. S3), in 12.5 and 7.5 % of the samples, respectively. TCEP, a typical chlorinated organophosphate ester (OPE), is widely detected in the environment, particularly in surface water and sediments, due to its resistance to biodegradation and persistence through wastewater treatment processes (Zhou *et al.*, 2020), possibly explaining its high presence in the food chain. Similar to other PFAS, PFTrDA is widely detected in aquatic environments, including fish (Abunada, Alazaiza et Bashir, 2020; Teunen *et al.*, 2021). In addition, 9 compounds were identified with an appearance frequency of 5 % (i.e., in two samples) and 20 identified only once (appearance

frequency of 2.5 %). These 31 substances include pesticides (fungicides, insecticides, and herbicides), industrial chemicals (flame retardants and plasticizers), transformation products, and veterinary drugs (anti-parasites and anti-inflammatories), and PFAS.

The results also showed that 25 of the 40 samples contained at least one of the contaminants of interest (Table S5). The samples containing the most substances (n ≥ 3) were a scallop, a mussel, a crayfish (with the maximum n = 5 contaminants), a canned tuna sample, i.e., crustaceans rather than fish among seafood products, and two powdered milks (#4 and #5). In addition, nine fishery products contained between one and two substances, and 10 for dairy products. Focusing on dairy products, although differences in performance were not observed during method validation, the most contaminated samples (n ≥ 3 substances) were milk powders that had not been prepared before sample extraction. All these samples contained a total of 14 identified compounds, while the same prepared milks contained only 6, possibly due to microwave heating, dilution effects, or matrix effects. Furthermore, only two compounds were found in the same powdered and prepared milk: a plasticizer and flame retardant: 2-ethylhexyl diphenyl phosphate, and a metabolite of albendazole (anthelmintic and antiprotozoal): albendazole sulfone. These results highlight the need to evaluate different sample preparation protocols to ensure accurate analysis of the target compounds and to avoid overlooking potential variations (Fig. S4).

3.4.2. Suspect screening analysis

Suspect screening analysis was also carried out to tentatively identify various additional substances for which analytical standards were unavailable, enabling an investigative assessment of the same 40 samples without prior assumptions. In total, 109 different residues and contaminants were tentatively identified by the suspect approach (Table S6), including alkaloids (n = 18), drugs (n = 17), drug metabolites (n = 4), industrial chemicals (n = 55), mycotoxins (n = 5), pesticides (n = 4), PFAS (n = 4), and transformation products (n = 2). The frequency of appearance of each compound is presented in Table S6, showing that most substances (50 %) appear in only one sample (appearance frequency of

2.5 %). In all, 31 % of substances have an appearance frequency between 5 and 10 % (i.e., between 2 and 4 samples), while 19 % of substances have an appearance frequency greater than 10 %. Among these substances, three industrial chemicals were the most tentatively identified: diphenylphosphate, 4-octylphenol, and undecanedioic acid, in 30, 32.5, and 40 % of the samples, respectively (Fig. S5). They are widely used in industry, which could explain their presence in the environment, either through discharge into watercourses after the production plant, or after use, for example *via* a waste disposal site, then soil and watercourses, ending up in fishery products (Asimakopoulos, Thomaidis et Koupparis, 2012; Mitchell *et al.*, 2019). Among all the substances that may be found in seafood, some, such as mycotoxins, deserve particular attention due to their potentially harmful effects on human health. In our study, four of these toxins (chaetoglobosin C, citrinin, enniatin B, and enniatin B1) were detected almost exclusively in seafood samples. Interestingly, these substances have already been reported in fish or seafood matrices, either through environmental exposure or contamination of feed (Prosperini *et al.*, 2017; Albero, Fernández-Cruz et Pérez, 2022; Kamle *et al.*, 2022; De Felice, Spicer et Caloni, 2023). Their presence in these samples can likely be explained by fungal contamination occurring along the food chain, either during aquaculture practices, post-harvest handling, or storage. The detection of another toxin, zearalenone, although less commonly associated with marine products, may reflect similar pathways of contamination, possibly linked to the use of plant-derived ingredients in aquaculture feeds (Caglayan, Şahin et Üstündağ, 2022). These findings highlight the need not only to monitor synthetic contaminants, but also to systematically investigate naturally occurring compounds that may pose toxicological risks. Furthermore, our results confirm the robustness of our analytical method, capable of simultaneously analyzing a broad range of molecules with diverse physicochemical properties. In addition, the availability of standards for some suspect compounds has led to the unequivocal identification (level 1) of various substances: a pesticide (tembotrione), two industrial chemicals (quinoline and tris(1,3-dichlorisopropyl)phosphate (TDCPP)), and three PFAS (perfluorododecanoic acid (PFDoDA), perfluorononanoic acid (PFNA), and PFTrDA), demonstrating the relevance and effectiveness of the proposed results.

Table S7 provides a summary of the number of residues and contaminants tentatively identified in the 40 samples. All samples contain at least two tentatively identified substances. The samples previously identified by the targeted approach as containing the highest number of compounds also exhibited a high number of residues and contaminants ($n \geq 7$), based on the suspect screening approach. Focusing on the 20 seafood products, as with the targeted approach, crustaceans and mollusks, rather than fish, contained the most tentatively identified substances. Furthermore, in the case of dairy products, only 11 substances were identified using both sample preparation protocols. As for the targeted approach, this highlights the importance of combining these two approaches to enhance the range of identified compounds.

During suspect analysis, to reduce false positives arising from the discrepancy between detected and identified compounds during validation, we recommend incorporating MS^2 data directly, rather than relying solely on MS^1. Using MS^2 information helps save time and prevents false leads.

3.4.3. Principal component analysis (PCA)

Alongside the primary focus on chemical characterization for risk assessment, this study also aimed to develop a classification tool to support risk management. This secondary objective shifts the approach from detailed identification to prioritization and decision-making, requiring a distinct methodological framework. A principal component analysis (PCA) was performed to identify typical mixtures and detect atypical samples among 20 seafood product samples, based on the intensity of annotated substances (**Figure 52**). This approach helps pinpoint outliers that may indicate contamination or unusual composition. The results highlight the canned tuna sample as an outlier. Further analysis showed that this is due to the high intensity of specific compounds, primarily industrial chemicals, found exclusively in this sample (Tables S6 and S7). This data processing is essential to build an early warning system through the rapid detection of irregular samples, the identification of unexpected contaminants, and the improvement of quality control by distinguishing between natural variability and contamination.

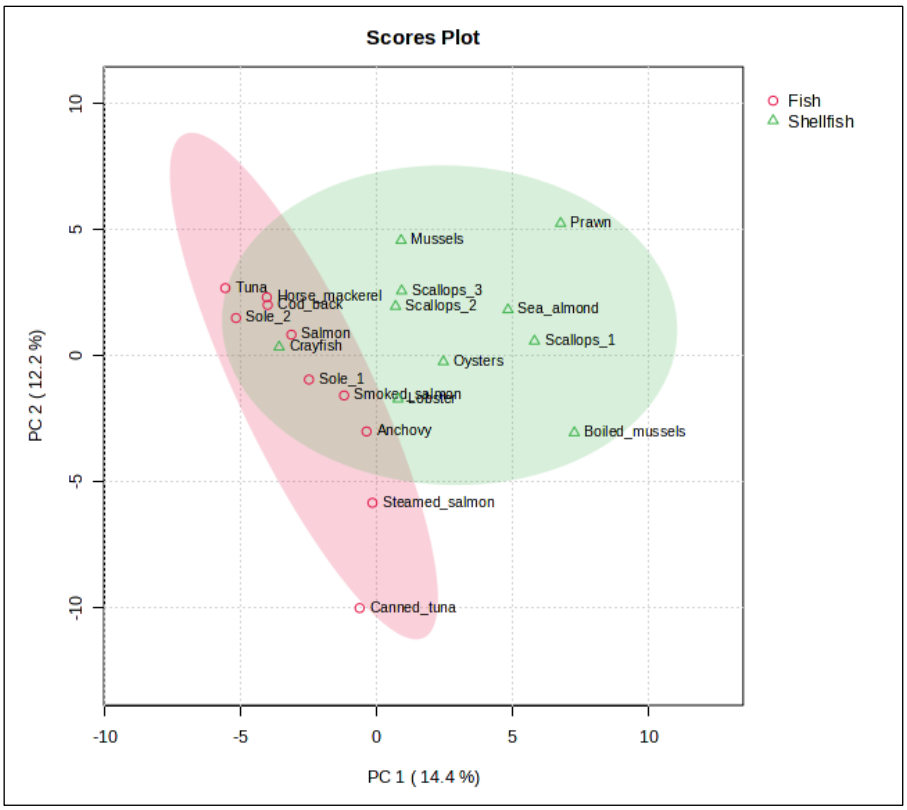


Figure 52. *Principal component analysis (PCA) of the dataset of 20 seafood products, including fish (n = 10) and shellfish (n = 10)*

4. Conclusion

In this study, a broad-spectrum approach was developed to expand the chemical space accessible to the analysis, in seafood and dairy samples. This development allowed for the comparison of various sample preparation protocols based on QuEChERS methodology, including different extraction solvents, extraction repetitions, and d-SPE conditions. Additionally, different chromatographic columns and gradient conditions, commonly used in the literature, were evaluated. The optimized QuEChERS-LC-HRMS method was then validated for over 800 contaminants in 20 seafood samples and 20 dairy product samples, following the SANTE guidelines for screening methods. The results highlighted the importance of considering LOI rather than SDL, even though LOI are not explicitly required by the guidelines. This multi-residue and contaminant method enabled targeted screening of these 40 samples for 872 contaminants with available analytical standards. The detected compounds were unequivocally identified with the highest level of confidence. Seafood, known as a major source of exposure to various chemical contaminants, and dairy products were also analyzed using a suspect

screening approach to further expand analytical coverage. Six tentatively identified substances were confirmed at level 1 (Schymanski *et al.*, 2014) due to the availability of reference standards. The suspect screening approach significantly enhanced the analytical scope by the inclusion of additional substances ((Schymanski *et al.*, 2014), level 2a) extracted using the developed QuEChERS protocol and analyzed by the developed LC-HRMS method. These approaches enable the extraction, detection, and identification of numerous compounds, to better understand consumer exposure to chemical substances. The implementation of PCA allows for more efficient identification of atypical samples and typical mixtures, facilitating the prioritization of analyses and the optimization of control strategies. Looking forward, in addition to studying the impact of sample preparation in milk samples to ensure the detection of all targeted compounds, the effect of heat treatment, such as microwave treatment, could be studied to better understand this process before the extraction step.

Acknowledgments

This work was funded by ANSES (EMERGEXPO project) and the Pays de la Loire Région (France) (Arrêté 2022-09694).

CRediT author statement

Cassandre Jeannot: Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. ***Bruno Le Bizec***: Conceptualization, Funding acquisition. ***Gaud Dervilly***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Validation, Writing - Review & Editing. ***Julien Parinet***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Writing - Review & Editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

****

Principaux résultats liés aux développements méthodologiques

- Une méthode QuEChERS-LC-HRMS a été développée et validée pour l'analyse de plus de 800 résidus et contaminants (pesticides, médicaments vétérinaires, PFAS) sur la base de 20 échantillons de produits de la pêche, puis dans 20 produits laitiers, selon les critères fournis par le guide européen de référence SANTE pour l'analyse des pesticides dans les aliments.
- Durant le développement du protocole de préparation d'échantillon de type QuEChERS, différentes conditions ont été comparées afin d'extraire le maximum de résidus et contaminants : choix du mélange de solvants d'extraction, nombre d'extraction, conditions de purification, avec jusqu'à 88 % des composés détectés pour la condition retenue.
- Une comparaison de trois colonnes chromatographiques et de trois gradients chromatographiques sélectionnés selon la littérature a permis de fixer les conditions analytiques les plus performantes pour maximiser le nombre de composés détectés, ainsi que les rapports signaux sur bruit et les intensités observés.
- Cette étude met en évidence l'importance de prendre en compte les critères d'identification — c'est-à-dire l'inclusion d'une similarité spectrale > 70 % entre les spectres de fragmentation MS/MS de référence et expérimentaux — plutôt que ceux de détection pour améliorer la fiabilité des résultats obtenus.
- Au cours de la validation de la méthode, les limites d'identification (LOI) étaient inférieures ou égales à 0,01 $mg.kg^{-1}$ pour 57 % des substances (pesticides, médicaments vétérinaires, PFAS, alcaloïdes, mycotoxines) dans les produits de la pêche et pour 73 % dans les produits laitiers.
- La méthodologie de recherche ciblée développée a permis d'élargir le nombre de substances recherchées simultanément (n = 872), incluant des pesticides, des médicaments vétérinaires, des produits chimiques industriels, des PFAS, des alcaloïdes et des mycotoxines.
- Ces développements méthodologiques permettent la recherche simultanée de composés aux propriétés physico-chimiques très variées, ce qui constitue une avancée notable par rapport à la littérature existante, où peu d'études ont porté sur un spectre aussi large de composés.

Principaux résultats liés à l'application de la méthodologie de recherche

- Au total, 31 différentes substances ont été identifiées dans les produits de la pêche et les produits laitiers par la recherche ciblée. Notamment, un produit chimique industriel (Tris(2-chloroethyl) Phosphate (TCEP)), utilisé comme retardateur de flamme ou plastifiant, et un PFAS (Perfluorotridecanoic Acid (PFTrDA)) se trouvaient parmi les composés les plus fréquemment identifiés, avec une fréquence de détection de 12,5 et 7,5 %, respectivement.

- La recherche suspecte a de plus permis d'annoter 109 composés issus de différentes classes chimiques— incluant des alcaloïdes, des médicaments, des produits chimiques industriels, des mycotoxines, des pesticides, des PFAS et des produits de transformation —, dont 6 confirmés au niveau de confiance le plus haut grâce à la disponibilité du standard, soulignant la robustesse des résultats obtenus.
- Trois produits chimiques industriels (Diphenylphosphate, 4-Octylphenol et Undecanedioic acid) se trouvaient parmi les composés les plus fréquemment annotés, indiquant leur forte présence dans ces matrices.
- L'ACP a facilité la mise en lumière d'échantillons atypiques — comme le thon en conserve — et la caractérisation de mélanges complexes.
- L'étude suggère d'examiner l'influence de traitements thermiques, comme le passage au micro-ondes pour les laits infantiles, sur la stabilité des contaminants avant l'étape d'extraction.
- Par la suite, les approches de recherche large spectre ciblée et suspecte pourraient être déployées à d'autres catégories d'aliments afin d'élargir la compréhension des expositions chimiques des consommateurs, liées à l'alimentation quotidienne, comme présenté dans l'**Article 4**. Elles pourraient également être appliquées à des échantillons collectés dans des zones spécifiques, permettant ainsi d'étudier des contextes particuliers encore peu documentés, ce qui fait l'objet de l'**Article 5**.

Article 4 : Multi-platform screening strategies for confirmed identification and characterization of chemical diversity in french food

Cassandre Jeannot[1, 2], […], Bruno Le Bizec[2], Gaud Dervilly[2], Julien Parinet[1,*]

[1] ANSES, Laboratory for Food Safety, Pesticides and Marine Biotoxins Unit, F-94701 Maisons-Alfort, France

[2] Oniris, INRAE, LABERCA, 44300, Nantes, France

* Corresponding author at: ANSES, Laboratory for Food Safety, Pesticides and Marine Biotoxins Unit, F-94701 Maisons-Alfort, France. E-mail addresses: camille-julien.parinet.1@ulaval.ca (J.Parinet).

En préparation pour soumission à Food Control.

Contribution de l'autrice

Dans ce travail, j'ai investigué le jeu d'échantillons décrit dans le Chapitre II, représentatif des habitudes alimentaires en France. L'ensemble de ces échantillons a, une nouvelle fois, été extrait et analysé — *via* deux plateformes QTOF (à l'Anses et à l'Université McGill) —, puis les données retraitées et interprétées par mes soins. Différentes substances ont ainsi pu être identifiées grâce à l'approche ciblée ou annotées grâce à la recherche suspecte.

Dans ce contexte, et grâce à l'obtention d'une bourse de mobilité de l'École Doctorale Biologie-Santé (ED BS), j'ai eu l'opportunité de me rendre à l'Université McGill (Canada). En collaboration avec l'équipe du Pr. Stéphane Bayen, j'y ai mis en œuvre une approche complémentaire visant à accroître le niveau de confiance dans l'annotation de certains composés.

Cette mobilité a également contribué à renforcer les échanges scientifiques entre le LABERCA (INRAE/Oniris) et McGill, qui finalisent actuellement un dossier de Laboration International Associé (LIA). Elle a favorisé le développement de collaborations de recherche ainsi que la mobilité d'étudiants entre les deux laboratoires.

Concernant la rédaction de l'article, j'ai rédigé une première version complète, incluant le résumé, les points forts, les figures, les tableaux et les informations complémentaires (Supplementary Information). Cette version a d'abord été relue et corrigée conjointement avec les encadrants du projet. Une fois le manuscrit consolidé, il a été soumis à l'ensemble des co-auteurs pour une relecture approfondie et des suggestions de modifications. Le processus de révision en réponse aux commentaires des évaluateurs a suivi la même démarche collaborative.

****

Abstract

This study aimed to apply a combined targeted and suspect screening strategy to better characterize chemical substances present in food samples representative of French consumer consumption. Building on validated multi-residue methods using QuEChERS extraction and UHPLC-Q-TOF-MS, the approach focused on compounds with available reference standards— including pesticides, veterinary drugs, industrial chemicals, PFAS, mycotoxins, and alkaloids— and others not. Applied to a set of 20 food samples, the targeted screening revealed that 65 % contained at least one substance, with 20 compounds unequivocally identified (Level 1). A suspect screening without prior selection allowed the annotation of 71 additional substances at confidence level 2a. In addition, multi-platform search strategy enabled the identification of four suspect compounds at level 1. In the absence of analytical standards, the Sirius software was also used to predict and support structural annotations, providing a prediction score (from 72 % to 100 %) for 9 previously annotated substances. These comprehensive and complementary strategies provide a more exhaustive overview of chemical contamination in food, and contributes to improving consumer exposure assessment.

Keywords Exposome, Risk assessment, Consumer exposure

1.Introduction

The exposome concept, introduced by Christopher Wild in 2005, provides an integrative framework for understanding all the exposures to which an individual is exposed throughout his or her life (Wild, 2005). This paradigm has shifted the focus of public health research from a primary emphasis on genetic determinants toward a more comprehensive understanding of how environmental, dietary, and behavioral factors contribute to disease risk. In the context of dietary exposure, the exposome encompasses a wide range of non-genetic factors, including microbiological agents and chemical contaminants, highlighting the importance of advancing analytical strategies to characterize these complex exposures.

Through their diet, consumers may be exposed to numerous substances whose adverse effects on human health are already well established. Certain compounds, such as several pesticides and specific per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS), are recognized for their toxicity and may contribute to the development of chronic diseases (OECD, 2019; EFSA, 2020; Panieri *et al.*, 2022; EEA, 2023). To protect consumers, regulatory agencies have established strict limits for some individual substances in food (European Parliament, 2005; European Commission, 2022c). These measures aim to mitigate risks associated with exposure to substances that are already known and systematically monitored.

Beyond these regulated contaminants, there is a growing number of substances that remain insufficiently studied, unmonitored, or entirely unknown, commonly referred to as emerging contaminants (ECs) (EFSA, 2020; Khan *et al.*, 2023; Masinga *et al.*, 2024). This diverse group includes pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), PFAS, endocrine disruptors, industrial chemicals, and nanomaterials, such as pesticides, bisphenol A, antibiotics, dioxins, heavy metals etc. Increasingly detected in the environment, ECs are often persistent, capable of bioaccumulating in the food chain, and may pose novel risks to both ecosystems and human health. Their potential impacts include hormonal disruption, genetic alterations reducing biodiversity, modifications of soil nutrient dynamics, and environmental persistence. For humans, emerging risks involve endocrine disruption, the spread of antimicrobial resistance, neurological impairments, carcinogenic effects, and other long-term outcomes that are still poorly characterized (Li *et al.*, 2024; Masinga *et al.*, 2024).

In addition, these regulations primarily focus on single compounds and do not account for the reality of daily exposure, where consumers are simultaneously exposed to complex mixtures of chemicals. Such combined exposures can lead to so-called "cocktail effects," arising from additive, synergistic, or antagonistic interactions between contaminants, which can have harmful effects on health. These gaps highlight the need for broader approaches to risk assessment that reflect the complexity of real-life dietary exposures (Hernández, Gil et Lacasaña, 2017; Chi *et al.*, 2023; Lai *et al.*, 2024).

To achieve this objective, a QuEChERS-LC-HRMS (QToF) method was previously developed and optimized for the analysis of diverse food samples, enabling the identification of multi-class substances (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). The method relied on a non-specific QuEChERS extraction procedure to capture a broad spectrum of chemical compounds, followed by separation of analytes via liquid chromatography coupled to advanced high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) for large-scale data acquisition.

This broad multi-residue and contaminant screening approach was subsequently validated for the identification of a wide range of compounds — including pesticides, veterinary drugs, PFAS, alkaloids, and mycotoxins — in fishery products and dairy matrices (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). In fishery products, the limits of identification (LOI) were determined at ≤ 0.01 $mg.kg^{-1}$ for 57 % of the substances. In dairy products, the LOI were were determined at ≤ 0.01 $mg.kg^{-1}$ for 73 % of the substances. The strategy was then applied to real samples, where it proved effective for the confident identification of several substances at level 1 on Schymanski's scale (Schymanski *et al.*, 2014). In parallel, to overcome the availability of analytical standards, a complementary suspect screening (SS) data processing step was implemented, leading to the annotation of numerous additional compounds at level 2a. Nevertheless, a key limitation of SS lies in the dependence on analytical standards to further increase confidence levels, particularly for upgrading annotations from level 2a to level 1.

To better understand consumer exposure, this study focused on a dataset of animal-derived foods representative of French consumption (described in (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). A primary objective was to apply the recently developed targeted and suspect screening methodologies to this wide range of food samples. To generate occurrence data, the targeted method was first applied to search for 872 multi-class chemical contaminants, including pesticides, veterinary drugs, their transformation products and industrial chemicals, PFAS, alkaloids, and mycotoxins. Subsequently, a suspect screening approach was implemented to broaden the analytical coverage, enabling the annotation of compounds for which analytical standards were unavailable. In addition, principal

component analysis (PCA) was performed to discriminate atypical samples and to reveal characteristic mixture profiles within specific sample groups. Finally, a collaborative effort allowed the confirmation of several suspect compounds with increased confidence, further highlighting the robustness and reliability of the developed suspect screening approach.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

A mixture of 746 pesticide standards was procured from LGC Standards (North Charleston, SC, USA). A kit of 180 veterinary drug standards was provided by the ANSES Laboratory in Fougères (France). Analytical standards for 41 PFAS compounds were obtained from Cluzeau Ingo Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). A mixture of 21 alkaloid standards was sourced from LGC Group (North Charleston, SC, USA). Standards for five selected mycotoxins were acquired from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Details of all the compounds were presented in our previous work (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025).

Acetonitrile (ACN, HPLC-MS grade, ~98%), methanol (MeOH), and formic acid (FA, LC-MS grade, ~98%) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France). Ultrapure water (18.2 MΩ·cm), generated using a Milli-Q system equipped with a Millipak 40 Gamma Gold filter (0.22 µm pore size), was supplied by Merck Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). A d-SPE clean-up kit containing 50 mg of PSA, 150 mg of end-capped C18 (C18EC), and 900 mg of Na_2SO_4, as well as extraction salt sachets composed of 1.6 g of $MgSO_4$ and 0.4 g of NaCl, were sourced from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

2.2. Investigated samples

This work focused on a selection of 20 food samples collected in France in 2021, chosen for their relevance to consumer exposure. These samples, previously analyzed for PFAS in an earlier study (Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025), are here subjected to a broader exploratory analysis to characterize additional chemical contaminants and expand our

understanding of exposure. Food items were classified into five groups: eggs (n=3), fish — including smoked salmon, sardine, trout fillet, alaskan hake fillet and cod back — (n=5), shellfish — including cooked shrimps, scallops, raw mussels and cooked mussels — (n=4), meat products — including chipolata (pork), butcher's steak (beef), cotelettes (lamb), thigh with skin (chicken), and white ham with rind (pork)—(n=5), and dairy products—including grated emmental, goat's cheese bûche, and plain cow's milk yoghurt—(n=3). All samples were stored at -20°C prior to analysis.

2.3. Sample preparation

Sample preparation step was conducted using a QuEChERS-based method, which was optimized and validated for the detection of a wide range of residues and contaminants in food matrices and fully presented in (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). Briefly, 4 mL of acetonitrile (ACN) and 1 mL of ultra-pure water were added to each sample, followed by vortexing for 10 min. A salt mixture consisting of 800 mg of $MgSO_4$ and 200 mg of NaCl was then added. The tubes were immediately shaken by hand, vortexed for 1 min, and centrifuged at 4000 rpm for 5 min at 4 °C. Subsequently, 3 mL of the supernatant were transferred into 15 mL centrifuge tubes containing 50 mg of PSA, 150 mg of C18EC, and 900 mg of Na_2SO_4. After vortexing for 1 min and a second centrifugation step (4000 rpm, 5 min, 4 °C), the extracts were filtered through 0.2 µm PTFE syringe filters. The extracts were then evaporated to near dryness under a nitrogen stream and reconstituted in 100 µL of ACN/H_2O (10:90, v/v) prior to UHPLC-QTOF analysis.

To assess potential background contamination during the extraction and analysis steps, a blank extraction sample — prepared without food matrices — was analyzed under the same conditions as the food samples.

2.4. Instrumental analysis

Samples were analysed using a Dionex UltiMate-3000 ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) system, equipped with a binary pump and autosampler from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA), coupled to a Q-TOF mass spectrometer (TripleTOF 5600^{TM}) from AB Sciex

(Darmstadt, Germany) operating in electrospray ionisation (ESI) mode. All the UHPLC-Q-ToF-MS parameters used for analysis are listed in Table S1 and also fully described in (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). Briefly, chromatographic separation, which was optimized in a previous work (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025), was achieved using a reversed-phase Aqua® C18 analytical column (150 × 2 mm, 3 µm particle size, 125 Å pore diameter; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA), equipped with an Aqua® C18 guard column (4.0 × 2.0 mm, 3 µm particle size, Phenomenex Inc, USA). The column oven temperature was maintained at 50 °C. Elution was performed using a gradient of ultrapure water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), both containing 0.01% (v/v) formic acid. The total run time was 23 minutes, with a flow rate of 0.5 mL/min and an injection volume of 10 µL. The TripleTOF 5600™ was manually tuned and calibrated before each batch using APCI calibration solutions (positive or negative, AB Sciex) in high-resolution TOF MS and MS/MS modes. In addition, automated intra-batch calibrations were applied every five injections to minimize mass deviations exceeding 5 ppm during analysis. The analyses were performed in both positive (ESI^+) and negative (ESI^-) electrospray ionization modes, using separate injections for each. The source parameters were set as follows: ion spray voltage floating (ISVF) at 5.5 kV for ESI^+ and -4.5 kV for ESI^-, source temperature (TEM) at 500 °C, curtain gas (CUR) at 30 psi, nebulizing gas (GS1) at 40 psi, and heater gas (GS2) at 45 psi. UHPLC-QTOF data acquisition involved both full scan TOF-MS and IDA (Information-Dependent Acquisition). The full scan was acquired over a 50–1000 Da range with a mass resolution of 32,000 FWHM at *m/z* 415.2728. IDA acquisition was conducted in high sensitivity mode, selecting the ten most intense precursor ions per cycle (Top10) with signal intensities above 50 cps and a mass accuracy within ±10 ppm. To prioritize targeted compounds, a precursor ion list (PIL) containing their retention times and accurate m/z values was used to guide fragmentation. A resolution of 20,000 FWHM at *m/z* 415.2728 was used in MS/MS mode. All data were collected using Analyst® software version 1.7 (AB Sciex, Les Ulis, France).

2.5. Data processing

2.5.1. Target screening

Targeted screening was carried out using PeakView® (version 2.2, AB Sciex) and its MasterView™ module, allowing automatic comparison of sample data to a comprehensive list of known contaminants. The screening process was supported by LibraryView™ (version 1.0.3, AB Sciex), which facilitated matching of MS/MS experimental spectra with reference spectra stored in a dedicated database. A homemade MS/MS library containing all standard compounds (n = 993) was used. Each compound record includes the exact mass of the precursor ion, retention time, molecular formula, CAS number, isotopic pattern, and MS/MS fragmentation spectrum, which served as the reference for automated identification process. Data screening was based on identification thresholds: an m/z mass error of ≤ 5 ppm between theoretical (in solvent) and experimental (in matrix) data, retention time variation ≤ 0.1 min (≤ 0.3 min for PFAS), and MS/MS spectral similarity greater than 70% between experimental and reference MS/MS fragmentation spectra. These parameters, validated in previous work (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025), ensure the reliability of the results, in line with SANTE guidelines (European Commission, 2021b). Of the initial 993 residues and contaminants, 872 compounds validate identification critieria in solvent at 0.1 $mg.L^{-1}$: 651 pesticides, 157 veterinary drugs, 39 PFAS, 20 alkaloids, and five mycotoxines, and were investigated in the samples. In addition, in seafood samples, the LOI were determined at 0.001 $mg.kg^{-1}$ for 12 % of the substances, at 0.01 $mg.kg^{-1}$ for 45 %, and at 0.1 $mg.kg^{-1}$ for 17 %. In dairy products, the LOI were determined at 0.001 $mg.kg^{-1}$ for 37 % of the substances, at 0.01 $mg.kg^{-1}$ for 36 %, and at 0.1 $mg.kg^{-1}$ for 12 %.

2.5.2. Suspect screening

Suspect screening was performed following conversion of raw LC-HRMS data (.wiff) to the open .mzML format using MSConvert GUI (64 bit) (ProteoWizard, version 3.0.23143). Data processing and feature annotation were conducted using the open-source MS-DIAL software (version 4.9.2) to extend screening and annotation to compounds of interest from external MS/MS libraries. The suspect screening leveraged three open-source MS/MS spectral libraries from Mass Bank of North America (MoNA): the "LC-MS/MS Positive Mode" database (99,260 spectra) and the "LC-MS/MS Negative

Mode" database (47,058 spectra), in addition to a PFAS-specific library containing 6,936 MS/MS spectra in negative mode. For data pre-processing, peak-picking parameters were configured with an amplitude of 1,000, mass accuracy of 0.01 Da for MS1 and 0.025 Da for MS2, and a slice width of 0.1 Da. Deconvolution used a sigma window of 0.5. Feature validation was based on: (a) well-defined, Gaussian-shaped peaks, and relative signal to noise (> 10) (b) an experimental mass error within ± 0.01 Da compared to the theoretical precursor mass, (c) spectral similarity > 70% between reference and experimental MS/MS spectra, and (d) absence or negligible signals in solvent and extraction blanks (sample-to-blank ratio > 10). Confidence level 2a (Schymanski *et al.*, 2014) was assigned to features fulfilling these criteria, confirming their putative identification.

3.Results and discussion

3.1. Application of the large screening method

3.1.1. Targeted screening

A targeted screening analysis was applied to the 20 food samples to provide insights into consumer exposure to chemical substances in the food supply. This large-scale screening strategy was conducted for more than 800 chemical substances, covering a wide range of physicochemical families, as described in (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). In total, 20 different residues and contaminants—including 6 pesticides residues, 4 PFAS, and 10 veterinary drugs—were unequivocally identified by screening the 20 samples (Table S2). One PFAS, Perfluorooctanesulfonic Acid (PFOS), was the most frequently identified compound, with an occurrence frequency of 30% across the samples, including four seafood products and two dairy products (Figure S1). PFOS is commonly detected in various food products, and is known for its widespread environmental presence (EFSA, 2020). Furthermore, two pesticides (Piperonyl butoxide and Terbutryn) and two veterinary drugs (Rafoxanide and Rifaximin) were identified in 10% to 20% of the 20 samples across all food categories (Figure S1). Among these compounds, the presence of Terbutryn—a substance banned since 2002 in the European Union (EU)—deserves particular attention, as it continues to be reported in the environment despite strict regulatory monitoring (Commission Regulation, 2002; Linke *et al.*, 2021). All other substances were

each identified only once, corresponding to an occurrence frequency of 5% across the samples. Even if their identification rate is low, some substances banned in the EU may still be present in trace amounts due to previous use. Carbaryl was banned in plant protection products in 2007 (Commission Decision, 2007). Carbendazim is a pesticide that was banned in 2014 due to its toxicity, and residues are still detected in food within the EU, possibly because its parent compound, Thiophanate-methyl, is still authorized for agricultural use (PAN Europe, 2020).

The results revealed that 13 out of the 20 food samples contained at least one of the targeted substances (Table S3). All egg and fish samples were contaminated with at least one substance of interest, in contrast to shellfish, meat, and dairy products, where residues and contaminants were identified less frequently. This pattern may reflect the higher propensity of eggs and aquatic organisms to accumulate environmental contaminants such as PFAS, due to factors like lipid content, trophic level, and exposure pathways.

3.1.2. Suspect Screening

A suspect screening analysis was performed, enabling the annotation (confidence level of 2a (Schymanski *et al.*, 2014)) of 71 substances—including 19 alkaloids and their metabolites, 6 pharmaceutical compounds and drug metabolites, 39 industrial chemicals, 2 mycotoxins, 2 pesticide residues, 1 PFAS, and 2 transformation products—for which no analytical standards were available (Table S4). Another pesticide (Terburtryn) annotated through this data processing workflow, was unequivocally identified by confirmation with an analytical standard in the same sample (Table S2). Among all annotated compounds, four, used as industrial additives, were detected in 8 to 9 samples, corresponding to a frequency of occurrence between 40% and 45% (Figure S2). In addition, twelve compounds—including alkaloids, pharmaceuticals or their metabolites, and industrial chemicals—were each found in 20% to 30% of the samples. Some of the compounds were annotated were annotated in 10% to 15% of the samples (19 substances), while the majority of compounds, i.e. 36 substances, were annotated in only one sample each, corresponding to a frequency of 5%. These

findings highlight the widespread presence of various industrial chemicals within the food chain. Beyond the individual toxicity of these compounds, it is essential to characterize potential mixture effects—an effort that must first be supported by confirming their presence through the use of analytical standards.

These results also demonstrate that all analyzed samples contained at least 4 tentatively identified substances, with some samples exhibiting up to 15 substances (Table S5). Similar to the targeted approach, egg samples were among the most contaminated matrices in terms of number of contaminants found, along with crustaceans and dairy products, which were not previously identified as heavily contaminated in the earlier screening step.

These findings demonstrate the reliability and versatility of our analytical method, which is capable of large-scale screening and simultaneous analysis of a wide range of molecules with diverse physicochemical properties. This comprehensive approach not only facilitates the detection of synthetic contaminants but also underscores the critical importance of investigating naturally occurring compounds, such as mycotoxins and alkaloids, due to their potential toxicological impact and their high frequency of occurrence in the samples. Furthermore, the application of suspect screening strategies broadens the scope of annotated compounds, enabling more effective prioritization of substances and matrices of interest for further studies.

3.2. From suspect to confirmed identifications

A robust suspect screening approach is essential for extending the characterization of the food chemical exposome. However, following the annotation of substances, the lack of available analytical standards remains a limitation for increasing the confidence level of the results. To overcome this and further confirm the identity of tentatively annotated compounds from the suspect screening step (confidence level 2a, Schymanski scale), the extracts were reanalyzed using an alternative LC-Q-TOF workflow, made possible through a collaborative effort with colleagues at McGill University. This collaboration provided the opportunity to apply a complementary analytical strategy, enhancing both

the confidence and comprehensiveness of compound identification. This workflow was fully described in Text S1 and according to the method used by Zheng et al. (2025).

In the first step, the availability of analytical standards for some of the annotated compounds enabled unequivocal identification at the highest confidence level of four substances, including one pharmaceutical (progesterone) and three industrial chemicals (4-nitrophenol, bisphenol S (BPS), and lauryl sulfate) (Table S6). Since the method also allows the targeted investigation of other relevant compounds such as bisphenols and plasticizers, the screening was extended to these classes as well as to additional selected candidates. The results, summarized in Table S6, show that a total of 13 substances were identified in these samples, including nine in ESI+ and four in ESI− mode. Among all annotated compounds, caprolactam was selected as an illustrative example of the results obtained (Figure S3). Finally, a complementary suspect screening workflow was applied to strengthen the confidence level for annotated compounds for which analytical standards were unavailable. The Sirius software enabled the annotation of compounds based on predicted molecular formulas, providing prediction scores ranging from 72 % to 100 % for 9 previously annotated substances. The Sirius prediction score reached 100% for one alkaloid (cocaine), one alkaloid metabolite (benzoylecgonine), and two industrial chemicals (4-methylcatechol and trifluoromethanesulfonic acid). For example, the result obtained for benzoylecgonine, for which SIRIUS predicted the same structure at a high matching score, is illustrated in Figure S4. Other compounds with Sirius prediction scores above 72% included two alkaloids (homarine (92 %) and theobromine (99.5 %)), one pharmaceutical (Acamprosate (72 %)), and two industrial chemicals (2,8-Quinolinediol (91 %) and 2-Hydroxybenzonitrile (98 %)). Additionally, two previously annotated compounds received Sirius prediction scores for their isomers: xanthine (an isomer of oxypurinol) scored 100%, while 4-Hydroxy-6-methyl-2-pyrone (an isomer of 3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) scored 91%.

These results not only increase the confidence level of certain composites announced by the suspect approach, but also enhance the confidence in certain annotations, once again demonstrating the robustness of the suspect screening workflow.

3.3. Principal Component Analysis

As a risk management tool, principal component analysis (PCA) serves as a classification method that enables the identification of typical mixtures as well as atypical samples. A PCA was conducted based on the intensities of annotated substances across 20 animal-based food samples. The samples were grouped according to five food matrix categories (**Figure 53**). This approach supports the identification of outliers that could signify contamination or atypical composition. The results reveal two main groups: one consisting of eggs and dairy products, and the other including crustaceans, fish and meat products. These trends may be explained by the high concentrations of specific substances, such as 2,8-Quinolinediol, which is particularly abundant in eggs and dairy products, or Lauryl sulfate and Oxypurinol, which are frequently annotated in fish, crustaceans, and meat samples (Tables S4; S5). This data processing step is crucial for establishing an early warning system by enabling the rapid detection of irregular samples and the identification of unexpected contaminants.

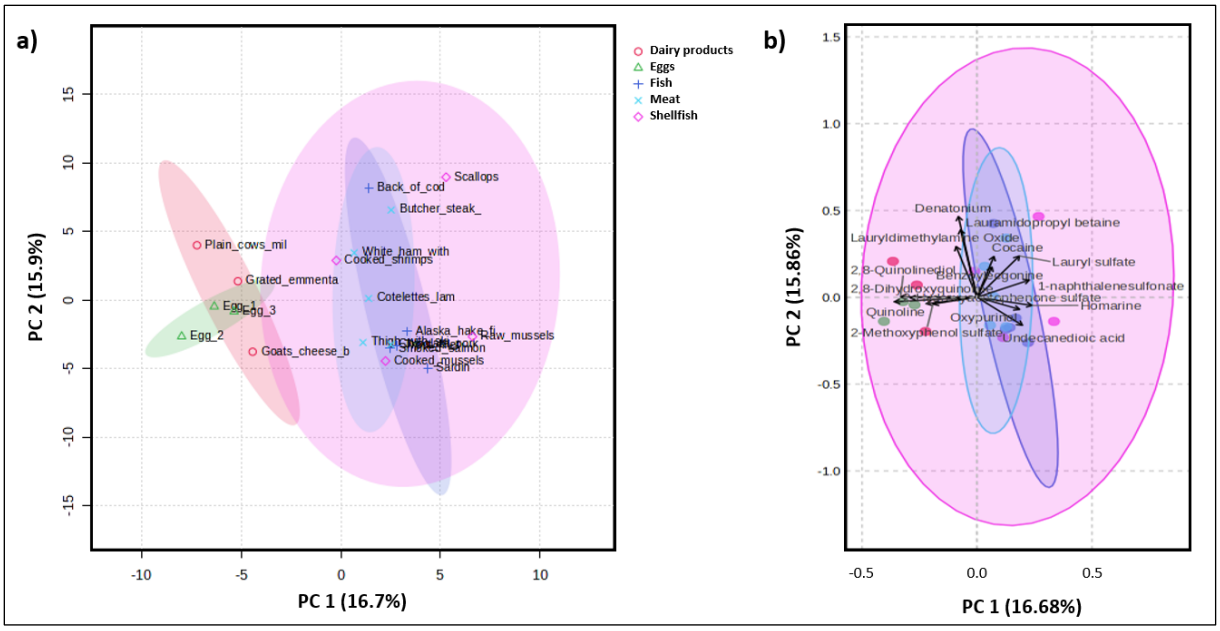


Figure 53. a) *Principal component analysis (PCA) of the dataset of 20 food samples, including eggs (n = 3), fish (n = 5), shellfish (n=4), meat products (n = 5), and dairy products (n = 3) and* ***b)*** *associated biplot showing both samples and contaminant loadings*

4. Conclusion

In this work, a broad-spectrum approach previously developed was applied to a set of foods of animal origin representative of French consumption, to broaden the range of compounds that can be reliably characterized. This approach relied on a QuEChERS-based extraction protocol, followed by LC-HRMS analysis to generate extensive datasets, and specific data-processing workflows encompassing targeted, suspect, and non-targeted screening. The multi-residue and contaminant method enabled targeted screening of 872 compounds for which analytical standards were available, allowing unequivocal identification with the highest confidence level. Across the 20 analyzed samples, a total of 20 residues and contaminants were unequivocally identified, including 10 veterinary drugs, 6 pesticide residues, and 4 PFAS. In parallel, a suspect screening workflow facilitated the annotation of additional compounds without reliance on analytical standards, thereby broadening the analytical coverage. A total of 72 chemicals, including alkaloids and their metabolites, pharmaceutical compounds and drug metabolites, industrial chemicals, mycotoxins, pesticide residues, PFAS, and transformation products, were tentatively identified. Among these compounds, a pesticide was confirmed at level 1 (Schymanski *et al.*, 2014) due to the availability of reference standards. Among

the 71 compounds, the complementary screening approach, made possible through collaboration, enabled the unequivocal identification of four compounds at the highest confidence level. Additionally, a complementary software tool facilitated structural predictions with high confidence for nine compounds, as well as for two isomeric compounds. The application of PCA enables the efficient discrimination of atypical samples from typical mixtures, thereby supporting the prioritization of analytical efforts and the refinement of control strategies. Beyond sample preparation and non-specific data acquisition, these results underscore the critical role of suitable and complementary data processing workflows in expanding our understanding of the chemical food exposome, enabling the detection of compounds that are not routinely monitored.

Acknowledgments

This work was funded by Anses (EMERGEXPO project) and the Pays de la Loire Region (France) (arrêté 2022-09694).

CRediT author statement

Cassandre Jeannot: Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. ***Bruno Le Bizec***: Conceptualization, Funding acquisition. […] ***Gaud Dervilly***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Validation, Writing - Review & Editing. ***Julien Parinet***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Writing - Review & Editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

****

Principaux résultats liés à l'application de la méthodologie de recherche

- Afin d'approfondir la compréhension de l'exposition courante des consommateurs, la méthode QuEChERS couplée à la LC-HRMS, précédemment développée et validée (**Article 3**), a été appliquée à un ensemble de 20 DAOA, initialement analysées uniquement pour les PFAS dans le **Chapitre II** de ce mémoire.
- En appliquant l'approche ciblée développée à l'Anses, 20 substances différentes ont été identifiées dans ces échantillons. Un PFAS (PFOS) se trouvait parmi les composés les plus

fréquemment identifiés, avec une fréquence d'occurrence de 30 %. Ce résultat contraste avec les observations rapportées dans l'**Article 2**, ce PFAS n'ayant pas été mis en avant par l'approche analytique correspondante. Cette comparaison sera approfondie et discutée dans le **Chapitre IV**. Les œufs et les poissons étaient parmi les matrices alimentaires qui contenaient le plus de substances identifiées.

- La recherche suspecte a permis l'annotation de 72 composés variés — incluant des alcaloïdes, des produits pharmaceutiques et industriels, des mycotoxines, des pesticides, des produits de transformation et un PFAS —, dont un pesticide identifié sans équivoque grâce à son standard analytique, révélant, une nouvelle fois, la fiabilité des résultats obtenus par cette approche.
- Quatre additifs industriels, suivis de 12 composés incluant des alcaloïdes, des médicaments et des produits industriels, se trouvaient parmi les composés les plus fréquemment annotés, avec des fréquences d'occurrence entre 40 et 45%, et 20 et 30 %, respectivement.
- Les œufs apparaissaient comme une matrice fortement contaminée, comme démontré par l'approche ciblée, alors que l'approche suspecte a également permis de mettre en lumière la forte contamination des crustacés et des produits laitiers.
- À l'Université McGill, les analyses complémentaires ont permis d'identifier 17 composés, dont 4 avaient été annotés grâce au workflow suspect, et également de renforcer le niveau de confiance dans l'annotation de 11 autres composés.
- L'ACP a souligné des profils de contamination similaires entre les œufs et les produits laitiers, différents des produits de la pêche et des viandes, potentiellement liés à la forte concentration de mélanges de substances spécifiques.
- L'application de cette méthodologie à des échantillons représentatifs de l'alimentation permet d'identifier les composés auxquels les consommateurs sont exposés, et la collaboration mise en place a contribué à lever certains verrous analytiques, au service de la sécurité des aliments.
- Pour les composés émergents présents dans ces échantillons représentatifs de la consommation courante, il serait intéressant de déterminer leurs concentrations, afin d'évaluer l'exposition du consommateur et d'augmenter les données fournies aux gestionnaires du risque, ce qui fait l'objet de l'**Article 6**.

Article 5 : Implementation of non-targeted approaches to a freshwater benthic fish (Machoiron) used as a sentinel species to assess various contaminants present in a lake in Ivory Coast

Cassandre Jeannot[1, 2], […], Bruno Le Bizec[2], Gaud Dervilly[2], Julien Parinet[1,*]

[1] ANSES, Laboratory for Food Safety, Pesticides and Marine Biotoxins Unit, F-94701 Maisons-Alfort, France

[2] Oniris, INRAE, LABERCA, 44300, Nantes, France

* Corresponding author at: ANSES, Laboratory for Food Safety, Pesticides and Marine Biotoxins Unit, F-94701 Maisons-Alfort, France. E-mail addresses: camille-julien.parinet.1@ulaval.ca (J.Parinet).

En préparation pour soumission à Food Additives & Contaminants.

Contribution de l'autrice

Les échantillons investigués dans cette étude proviennent d'un lac situé à proximité d'une zone d'agriculture intensive en Côte d'Ivoire, ce qui justifie l'intérêt porté à ce site. L'ensemble des échantillons a été collecté, lyophilisé, broyé et conditionné par une équipe partenaire, dans le cadre d'une collaboration, afin d'être envoyé à l'Anses pour les analyses.

Pour leur traitement, j'ai appliqué l'entièreté du processus de recherche développé et présenté dans l'Article 3, incluant la préparation d'échantillons, l'analyse des extraits, le traitement des données ciblé et suspect, puis l'interprétation des résultats. Cette dernière étape a été complétée par l'équipe partenaire.

Concernant la rédaction de l'article, j'ai rédigé une première version complète, incluant le résumé, les points forts, les figures, les tableaux et les informations complémentaires (Supplementary Information). Cette version a d'abord été relue et corrigée conjointement avec les encadrants du projet. Une fois le manuscrit consolidé, il a été soumis à l'ensemble des co-auteurs pour une relecture approfondie et des suggestions de modifications. Le processus de révision en réponse aux commentaires des évaluateurs a suivi la même démarche collaborative.

****

Abstract

As a state-of-the-art analytical technique, high-resolution mass spectrometry (HRMS) plays a key role in improving food safety. Comprehensive screening of a wide range of substances, including those for

which there are no reference standards, is made possible, contributing to a more thorough characterization of compounds present in food matrices. Building on a previously developed and validated QuEChERS- UHPLC-Q-TOF-MS method for seafood products, this approach was applied to set of 29 fish samples collected near an area of intensive agricultural activity from Lake Labo (Ivory Coast). This work presents the results of this application to improve consumer exposure assessment. The targeted screening of 872 various residues (pesticides, veterinary drugs, industrial chemicals) and contaminants (PFAS, mycotoxins, alkaloids) led to unequivocal identification of 13 pesticide and veterinary drug residues. Through the suspect screening approach, 49 substances—mainly including industrial chemicals—were tentatively identified at level 2a confidence. The confirmation of one of these compounds using an available analytical standard further underscores the robustness and reliability of the strategy.

Keywords

Suspect screening, targeted screening, fish samples, LC-HRMS

1. Introduction

The pollution of aquatic ecosystems in West Africa is reaching alarming levels, fuelled by the expansion of agricultural and industrial activities, as well as growing demographic pressure. The massive use of pesticides on export crops such as cocoa, coffee and cotton, often with little effective regulation, is making the situation considerably worse. Several recent studies have sounded the alarm: in the Ouémé basin, work by (Zonkpoedjre, Odo et Eyo, 2023) upstream and (Goura *et al.*, 2024) downstream has revealed worrying concentrations of organochlorine pesticides, particularly around the Aguigadji, Ahlan and Sele stations in Togo. Contamination is not limited to pesticides: in the lagoons of south-west Nigeria, (Bassey et Chukwu, 2019) measured dangerous levels of heavy metals (lead, cadmium, chromium) in Chrysichthys nigrodigitatus, far exceeding food safety thresholds, with proven risks for consumers. The consequences for public health are all the more worrying given that, as (Abidemi-Iromini, 2022) have shown in the Ogbese river (Ondo State), these same fish show physiological,

haematological and tissue damage linked to the surrounding agricultural waste. In view of these findings, scientists including (Ouro-Sama *et al.*, 2021) are warning of the dangers of consuming products from contaminated areas such as Lake Togo and the Aného lagoon, where exposure to pollutants represents a well-documented health risk.

The Ivorian economy, largely based on intensive agriculture, relies on sectors where the country positions itself as a major player both globally and across Africa. As the world's leading producer of cocoa and cashew nuts, Ivoiry Coast is also Africa's top exporter of palm oil, the continent's primary rubber producer, and ranks among the top producers of coffee, bananas, and mangoes. Unfortunately, this agricultural dominance comes with excessive pesticide use, causing concerning environmental contamination that particularly affects vulnerable communities. Studies by (Lydie *et al.*, 2022) detected dangerous levels of organophosphate pesticides in Chrysichthys nigrodigitatus fish from the Faé, Kossou and Taabo hydroelectric dams, with average concentrations (0.184 mg/kg) far exceeding safety thresholds (0.01-0.05 mg/kg). The highest contamination was recorded at the Faé dam (0.266 mg/kg), followed by Taabo (0.197 mg/kg) and Kossou (0.089 mg/kg). Methyl parathion (0.130 ± 0.023 mg/kg) was the most frequent compound, while chlorfenvinphos (0.046 ± 0.007 mg/kg) was present in all samples. The effects of chronic exposure are evident, as documented in professional poisoning cases at Yopougon Abidjan University Hospital (Kouassi *et al.*, 2004). In Abengourou, farmers (80% without protective equipment) misuse unapproved pesticides, causing health problems (itching, dizziness) and polluting soil and water through improper disposal (Ouattara et al., 2021). These cases highlight the conflict between economic growth and public health, with communities unintentionally perpetuating pollution that will burden future generations. Sentinel species like Chrysichthys nigrodigitatus, a staple food even used in infant soups, are crucial for risk assessment, demonstrating the urgent need to protect both ecosystems and human health.

Agricultural and industrial activities are major contributors to the release of chemical substances into the environment, which can subsequently contaminate surrounding ecosystems. Aquatic organisms

living in sediment-rich habitats, especially benthic fish species, have long been recognized as effective bioindicators of environmental contamination. Due to their habitat and feeding behavior, these species are particularly exposed to a wide range of pollutants, such as persistent organic pollutants (POPs). (Wilkinson *et al.*, 2018) have shown that benthic invertebrates and sediment-dwelling fish can bioaccumulate pharmaceuticals, personal care products, perfluorinated compounds, and plasticizers, often at concentrations exceeding those measured in surrounding sediments. Furthermore, specific pharmaceuticals—including veterinary drugs—have been detected at measurable levels in sediment and associated biota, indicating both exposure and uptake from contaminated environments (Kim, Lee et Oh, 2017; González-Gaya *et al.*, 2022). Overall, benthic fish serve as sentinel species by integrating sediment exposure and reflecting the accumulation of persistent and bioaccumulative contaminants within aquatic ecosystems.

Monitoring contaminants in food, including fish, traditionally relies on targeted analytical approaches. These methods, although sensitive and robust, are inherently limited as they only quantify a restricted list of prioritized substances, such as regulated pesticides, veterinary drugs, or specific industrial contaminants. Such approaches often overlook emerging or unexpected chemicals, including transformation products, metabolites, or non-intentionally added substances (NIAS) (Nerín *et al.*, 2022), which may also pose risks to human health. To overcome these limitations, suspect screening approach have emerged as essential tools in exposome-oriented research. Suspect screening leverages accurate mass databases to tentatively identify compounds for which analytical standards are not available. This approach provides a broader understanding of the chemical present in various samples, complementing traditional targeted monitoring (Shaw, 2014; Göbölös *et al.*, 2024).

To achieve this, broad-scope sample preparation step is essential to capture the chemical complexity of fish matrices, encompassing both regulated substances and emerging contaminants. In a previous study, we developed and validated multiresidues and contaminants method in seafood products (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). The method based on the QuEChERS extraction protocol,

which integrated an extraction step using an acetonitrile/methanol (ACN/MeOH) mixture. The salting-out extraction (SOE) was performed with a magnesium sulfate/sodium chloride ($MgSO_4$/NaCl) mixture (4:1, w/w), followed by a dispersive solid-phase extraction (d-SPE) cleanup, with sorbents selected according to the compound classes and matrix properties (PSA / C_{18} / Na_2SO_4).

For instrumental analysis, liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) was employed, providing a robust and conclusive analysis method for acquiring broad-spectrum analytical data (Rajski *et al.*, 2021; Chu et Letcher, 2024; Makni *et al.*, 2024). In our previous work, these analyses were performed using an LC-QTOF-MS system, allowing for the simultaneous identification of targeted analyses and tentative identification of various compounds. Suspect screening approach was performed using the open-access MS-DIAL platform, which integrates MS^1 and MS^2 spectral similarity to facilitate the identification of both known and unexpected compounds. These strategies enable a comprehensive and reliable means to characterize chemical contaminants in fish without prior assumptions, providing access to a much broader spectrum of substances than conventional targeted methods and reducing dependence on analytical standards (Rajski *et al.*, 2021) (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025).

In this context, the present study focuses on *Chrysichthys nigrodigitatus* (commonly known as the silver catfish or 'mâchoiron'), a benthic freshwater fish species inhabiting muddy substrates. Specimens were collected from Lake Labo, an artificial waterbody (approx. 3,390 m^2) located in the Lôh-Djiboua region, a forested area of Ivory Coast surrounded by intensive agricultural activities. Due to its benthic lifestyle and feeding habits, this species serves as an excellent bioindicator for assessing chemical contamination in aquatic ecosystems and its potential transfer to humans through consumption. Beyond its ecological role, *Chrysichthys nigrodigitatus* is a dietary staple for local communities, particularly around Lake Labo (southwestern Ivory Coast), where food resources are often limited. As revealed by (N'dohou *et al.*, 2023) in the neighboring Grand-Lahou Lagoon, this abundant, affordable, and nutrient-rich species is one of the most widely consumed, with average PCB concentrations

reaching 311.51 ± 208.46 ng/g wet weight in individuals over 100 g-exceeding the EU's Maximum Residue Limit (MRL) for this category. Analyses of three species (*Chrysichthys nigrodigitatus*, *Mugil curema*, and *Sarotherodon melanotheron*) identified indicator PCBs (CB 138, CB 153, CB 180) as predominant contaminants, with levels ranging from 0.06 to 365.33 ng/g depending on species and size.

A survey was carried out among farmers near this lake, to assess if the chemical substances used were found in the fish investigated. The research methodology applied in this study builds upon a previously developed approach, initially optimized for the targeted detection of over 800 compounds (pesticides, veterinary drugs, PFAS, alkaloids, mycotoxins) in seafood matrices, while also enabling the tentative identification of a broad range of residues and contaminants. This work aimed to highlight the early-warning potential of a suspect screening strategy using an LC-QTOF-MS platform, aimed at detecting unexpected chemicals in samples that may accumulate these substances.

2. Materials and methods

2.1. The *Chrysichthys nigrodigitatus*: an emblematic West African species

The *Chrysichthys nigrodigitatus* is a fascinating fish belonging to the Claroteidae family, although it has long been classified as a Bagridae (Paugy, 2003). It can be found in virtually every aquatic environment in the region, from rivers to lagoons and brackish waters, in Ivoiry Coast as well as in Nigeria, Ghana and Benin (Goli Bi *et al.*, 2019). This wide distribution testifies to its remarkable adaptability. With its elongated, slightly flattened body, broad head and four conspicuous pairs of barbels, the Jawfish has a distinctive silhouette. Its gray-brown coat with silver highlights makes it ideal for camouflaging in its environment. Although some specimens can reach 50 cm in length and weigh 2 kg, the individuals encountered are generally more modest. This fish is particularly fond of calm, shallow waters rich in vegetation and sediment, which are both its larder and refuge (Whenu et al., 2018). The jawfish is what we might call a dietary opportunist: although primarily carnivorous, it adapts its diet according to

available resources, feeding on small fish as well as benthic invertebrates, organic debris and plant matter.

2.2. Investigated samples

This study focused on the *Chrysichthys nigrodigitatus*, a benthic fish living in muddy bottoms, frequently consumed locally and sometimes sold in regional markets. A total of 90 individuals were sampled in November 2024 in Lac Labo (5°54'38 "N, 5°41'38 "W), a 3390 m² artificial lake located in a forested area with a high level of agricultural activity. The fish were all caught during the same period (early dry season) and exclusively in Lake Labo, ensuring homogeneous environmental conditions and similar exposure to potential contaminants. The selected specimens, covering a weight range from 150 to 400 g, were divided into three classes for analysis: 150-250 g fishes (samples #1 to #6), 250-350 g fishes (samples #7 to #12) and 350-400 g fishes (samples #13 to #29), enabling assessment of any variations linked to individual size or age. Immediately after capture, the fish were individually wrapped in aluminum foil and food bags, transported at 4°C to the laboratory, where muscle tissue was frozen at -18°C for 48 hours before freeze-drying. For each fish, 50 to 100 g of dorsal muscle (the part most consumed) were taken to form composite samples to assess consumers' actual exposure. The composites analyzed were made up by mixing three individuals of similar size (30 composite samples), then homogenized to obtain a representative composite sample. Composites were sent to the ANSES food safety laboratory at room temperature in dry form, for extraction, analysis and data processing. On receipt, the freeze-dried composite samples were stored at room temperature until the extraction and analysis stages. Jawfish are appreciated locally, particularly for their firm flesh, and are an accessible source of protein for local populations. Part of the catch is sold on nearby markets, which justifies the assessment of risks linked to possible contaminants.

2.3. Chemicals and reagents

A kit of 746 pesticides and industrial chemical standards was purchased from LGC Standards (North Charleston, SC, USA). A kit of 180 veterinary drugs analytical standards was acquired from the ANSES

Fougères Laboratory (France). The analytical standards of 41 PFAS was purchased from Cluzeau Ingo Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). A kit of 21 alkaloids was obtained from LGC Group (North Charleston, SC, USA). The analytical standards of five mycotoxins was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Full details of the compounds identified and screened in this work are available in our previous study (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025).

Acetonitrile (ACN, HPLC-MS grade, ~98%), methanol (MeOH), and formic acid (FA, LC-MS grade, ~98%) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France). Ultrapure water (18.2 MΩ·cm), produced using a Milli-Q system equipped with a Millipak 40 Gamma Gold filter (0.22 µm pore size), was obtained from Merck Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). A d-SPE kit composed of 50 mg of PSA, 150 mg of end-capped C18 (C18EC), and 900 mg of Na_2SO_4, and an extraction salt kits containing 1.6 g of $MgSO_4$ and 0.4 g of NaCl were obtained from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

2.4. Sample preparation

All samples were extracted using a QuEChERS protocol, developed, validated and applied for the large-scale analysis of residues and contaminants in seafood products (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). As the fish composite samples ranged in mass from 100 to 500 mg, they were re-hydrated to 1 g, in line with the sample mass required for the protocol used. Briefly, samples were extracted with ACN (4 mL) and ultra-pure water (1 mL), and vortexed for 10 min. Then, a mixture of $MgSO_4$ (800 mg) and NaCl (200 mg) was added, and the samples were shaken by hand, vortexed for 1 min, and centrifuged for 5 min at 4000 rpm (4 °C). Supernatants (3 mL) were transferred to a 15 mL centrifuge tube containing 50 mg of PSA, 150 mg of C18EC and 900 mg of Na_2SO_4. The samples were vortexed for 1 min, centrifuged for 5 min at 4000 rpm (4 °C), and filtered through 0.2 µm PTFE filters. Extracts were dried under nitrogen and reconstituted in 100 µL of ACN / H_2O (10/90; v/v) for injection in the UHPLC-QTOF system. To assess background contamination during extraction and analysis steps, an extraction blank sample, was prepared and analyzed identically to the samples.

2.5. Instrumental analysis

Samples analyses were carried out using a Dionex UltiMate 3000 ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), equipped with a binary pump and autosampler, and coupled to a TripleTOF 5600™ Q-TOF mass spectrometer (AB Sciex, Darmstadt, Germany) with an electrospray ionization (ESI) source. Detailed instrument parameters are summarized in Table S1 and fully documented in our previous publication (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025), where the chromatographic conditions were also optimized. Briefly, the separation was performed on an Aqua® C18 column (150 × 2 mm, 3 µm particle size, 125 Å pore diameter; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA), coupled with a C18 pre-column (4.0 × 2.0 mm, 3 µm particle size; Phenomenex Inc, USA), and thermostated at 50 °C. A binary gradient of ultrapure water (eluent A) and acetonitrile (eluent B), both acidified with 0.01% formic acid (v/v), was employed. The chromatographic run lasted 23 minutes with a constant flow rate of 0.5 mL/min. The injection volume was set at 10 µL. Prior to each analytical batch, the TripleTOF 5600™ system was manually tuned and calibrated using APCI positive or negative calibration solutions (AB Sciex) in both TOF MS and TOF MS/MS modes, ensuring high resolution and sensitivity. To maintain mass accuracy within ±5 ppm, automated calibrations were also carried out every five samples throughout the run. Electrospray ionization was performed in both positive and negative modes (ESI^+/ESI^-), with separate runs for each polarity. The mass spectrometer was operated with an ion spray voltage of 5.5 kV (positive) and -4.5 kV (negative), a source temperature of 500 °C, and gas flows set to 30 psi (CUR), 40 psi (GS1), and 45 psi (GS2), respectively. Data acquisition was performed using a combination of full scan TOF-MS and information-dependent acquisition (IDA) modes on the UHPLC-QTOF system. Full scan data were acquired across a mass range of 50–1000 Da, with a resolving power of 32,000 FWHM at *m/z* 415.2728 in high-resolution mode. In parallel, IDA was conducted in high sensitivity mode, selecting the ten most intense precursor ions per cycle (Top10) with intensities above 50 counts per second (cps) and a mass tolerance ≤ 10 ppm. A precursor ion list (PIL), including retention times and accurate m/z values of targeted analytes, was used to prioritize fragmentation of known compounds. A resolution of 20,000

FWHM at *m/z* 415.2728 was used in MS/MS mode. The system was operated using Analyst® software (version 1.7, AB Sciex, Les Ulis, France).

2.6. Data processing

2.6.1. Target Screening

For targeted screening, data were processed using PeakView® software (version 2.2, AB Sciex), along with its integrated MasterView™ module, which enables fast and automated comparison of experimental results with a predefined list of compounds. This module is connected to LibraryView™ software (version 1.0.3, AB Sciex), which allows the comparison of experimental MS/MS spectra to reference spectra. A homemade MS/MS library, described in (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025), contained all the compounds was created. Each compound was documented with its accurate precursor *m/z* of the precursor ion, retention time (Rt), molecular formula, CAS number, isotopic pattern, and reference MS/MS spectrum. These reference spectra were used to support automatic identification during data screening. Screening was conducted using defined criteria for identification. For identification, a tolerance of ± 5 ppm in m/z, a retention time shift of ≤ 0.1 min (≤ 0.3 min for PFAS) and a spectral similarity of more than 70 % between experimental and reference MS/MS spectra were applied. The importance of applying these identification criteria more than detection criteria recommended by SANTE guidelines (European Commission, 2021b) was demonstrated in a previous study (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). Among all available standard compounds, 872 could be successfully identified in solvent at 0.1 $mg.L^{-1}$—including 651 pesticides, 157 veterinary drugs, 39 PFAS, 20 alkaloids, and five mycotoxins—, and were investigated in all samples.

2.6.2. Suspect Screening

For suspect screening analysis (SSA), raw data acquired with the AB Sciex instrument in .wiff format were converted to .mzML files using MSConvert GUI (ProteoWizard version 3.0.23143, 64-bit). The data were then processed using the open-source MS-DIAL software (version 4.9.2) to enable extended annotation based on external MS/MS libraries, particularly for compounds without available analytical

standards. For this purpose, MS/MS reference spectra from the MassBank of North America (MoNA) were downloaded, including 99,260 spectra in positive ion mode and 47,058 in negative mode, along with a list of 6,936 PFAS spectra in negative mode. Peak picking during data pre-processing was carried out with an amplitude threshold of 1,000, and mass accuracies set at 0.01 Da for MS1 and 0.025 Da for MS2, with a mass slice width fixed at 0.1 Da. A sigma window of 0.5 was applied for spectral deconvolution. Suspect compound identification was based on several criteria: (a) a clear Gaussian peak shape with signal-to-noise ratio > 10, (b) a mass error within ± 0.01 Da between experimental and theoretical precursor masses, (c) a spectral similarity score ≥ 70% using the reverse dot product algorithm (similar to the FIT scoring in MasterView™ software, used during target analysis), and (d) the absence of significant signal in blanks (solvent or extraction), with a sample-to-blank ratio greater than 10. Only features fulfilling all criteria were considered putatively identified with a confidence level of 2a according to the Schymanski et al. (2014) identification scale.

3.Results and discussion

3.1. Targeted screening

The targeted data processing approach was applied to 29 fish samples collected in Ivory Coast. All samples tested positive for at least one compound from the chemical families studied (Table S2). In particular, the maximum number of compounds (n = 5) was identified in three samples (#1, #20, #25). In addition, 11 samples contained four different substances, while eight samples contained three. Finally, seven samples contained between one and two of the targeted compounds. On average, the three sample groups contained three target compounds per sample, indicating that there was no apparent relationship between the number of contaminants and fish weight.

By screening the 29 samples, a total of 13 different residues were unequivocally identified (Table S3). Among the compounds identified, eleven were residual pesticides and 2 were veterinary drugs. A veterinary drug (Antipyrine-phenazone) and a pesticide residue (Difenoconazole) were the most frequently identified compounds (Figure S1), in 79 and 76 % of the samples, respectively. Phenazone—

also known as antipyrine—is a widely used analgesic and antipyretic pharmaceutical, frequently detected in surface and drinking waters due to its low removal efficiency in wastewater treatment (Miao *et al.*, 2015). Its biochemical persistence and environmental concentrations make it particularly released into the aquatic environment, which may explain its identification in our fish samples. Difenoconazole was among the compounds reported in a survey conducted with farmers near the lake where the samples were collected. Therefore, its presence in the lake—and consequently in the fish analyzed—is unsurprising. Then, three regularly used pesticides, were identified with an appearance frequency between 34 and 45%, which is expected given that the fish were sampled near an area of intensive agricultural activity involving pesticide use. The other half of these compounds (n = 8) had a lower frequency of appearance of between 3 and 10%, i.e. were identified in up to 3 samples. These findings highlight the importance of monitoring pesticide residues in samples collected near areas of intensive agricultural activity.

Our findings sound a serious alarm for communities living near Lake Labo. The *Chrysichthys nigrodigitatus* a popular local fish sold in markets shows worrying signs of contamination. Recent studies confirm that repeated exposure to pesticide mixtures like those we detected can have severe health impacts, especially for children and pregnant women (Mnif et al., 2011). What's particularly concerning is how easily this bottom-dwelling species accumulates pollutants from sediments, as shown by (Tasselli et al., 2023), risking contamination across the entire food chain. This directly mirrors the effects of intensive farming around the lake, a growing issue well-documented in Ivoiry Coast (Konan *et al.*, 2025). The simultaneous detection of veterinary drug residues and pesticides in our samples is especially alarming, as this complex cocktail remains understudied in Africa. Like (Tahoun, 2023) highlighted in their work on African lakes, this pollution demands urgent action: stricter environmental monitoring, agroecological alternatives, and better wastewater treatment. More research is also critical to assess the risks for regular consumers of this fish.

3.2. Suspect Screening

The suspect screening approach was applied to all fish samples to detect additional compounds of interest for which analytical standards were not available. All samples contained between 12 and 21 tentatively identified substances (Table S4). Sample #25 was among those with the highest number of compounds, in agreement with the findings from the targeted screening. On average, the three groups of samples contained between 15 and 16 compounds per sample, showing no correlation between the number of substances and fish weight, consistent with the results from the targeted analysis.

A total of 49 various residues and contaminants—8 alkaloids, 9 drugs and their metabolites, 27 industrial chemicals, 1 mycotoxin, 2 pesticides and their metabolites, and 2 transformation products—were tentatively identified (level 2a) across the 29 fish samples (Table S5). Among the most frequently detected compounds, three alkaloids, one pharmaceutical, and three industrial chemicals exhibited detection frequencies above 75%. Figure S2 presents the results obtained, including a comparison of the MS2 spectrum with that of the database, for two of these compounds: Norharman and 2-Hydroxy-benzonitrile. Harmalol and Norharman are β-carboline alkaloids with potential toxic effects at high doses. These naturally occurring heterocyclic compounds are found in certain plants, fermented beverages, and processed foods (Herraiz, 2004). Typically formed during high-temperature cooking, their detection in raw fish samples is unexpected but highlights the importance of monitoring them. Other annotated compounds—Deoxyvasicinone, Nateglinide, 2-Hydroxybenzonitrile, Lauryl sulfate, Oleyl sarcosine—are not commonly reported in fish but are often known for their industrial applications. For exemple, Lauryl sulfate, a widely used surfactant, accumulates in aquatic ecosystems, which may explain its presence in these samples (Zicarelli *et al.*, 2024). Additionally, seven substances—including a pharmaceutical, industrial chemicals, a mycotoxin, a pesticide, and a transformation product—were found in 50% to 75% of the samples. For the remaining compounds, seven were identified in 25% to 50% of the samples, while 28 others showed detection frequencies below 25%. Among these substances, Phenazone (pharmaceutical) was unequivocally identified in numerous samples of this study, thanks to the availability of the analytical standard. This result highlights the reliability of the annotated compounds, underscoring the performance of the data

processing workflow. Once again (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025), the suspect screening approach increases the number of annotated substances and provides a strategic basis for prioritizing the purchase of analytical standards for some compounds, with the aim of increasing the confidence level of identification.

3.3. Principal Component Analysis

Principal Component Analysis (PCA) was carried out to explore possible trends or groupings among the fish samples according to their contamination profiles. The analysis took into account the three predefined weight classes (A: 150-250 g; B: 250-350 g; C: 350-400 g) and the compounds identified putatively during suspect screening (49 substances). The PCA results revealed no clear separation or grouping of samples according to weight classes (**Figure 54**). The variance explained by the first two principal components (CP1 and CP2) was 11% and 12.6% respectively, indicating limited differentiation between samples. This suggests that fish weight did not significantly influence their contamination profiles in this study. The homogeneity of the contamination profiles revealed by PCA confirms our initial observations in the targeted and suspect analyses, where no significant correlation was detected between fish size and contaminant load. This consistency could be explained by three main factors: (1) similar environmental exposure for all individuals, linked to their provenance from the same site (Lake Labo) and a single sampling period (Wilkinson *et al.*, 2018); (2) the benthic behavior of *Chrysichthys nigrodigitatus*, which favors permanent contact with contaminated sediments (González-Gaya *et al.*, 2022); and (3) the absence of significant biomagnification of the pesticides and industrial products detected in the weight range studied, an observation consistent with the work of (Kim, Lee et Oh, 2017) on similar species.

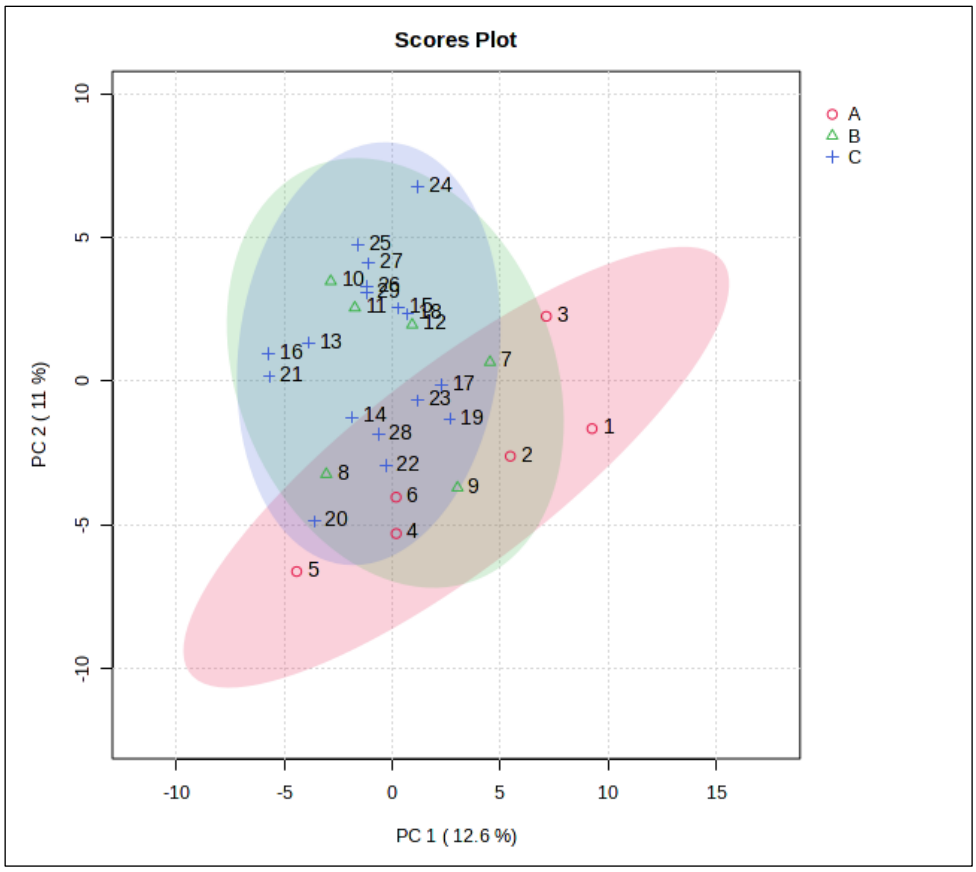


Figure 54. *Principal Components (PCA) of the dataset of 29 fish composite samples*

4. Conclusion

In this study, a broad-spectrum analytical strategy was applied to analyse a wide range of chemical substances in benthic fish samples collected from an artificial lake located in an agriculturally influenced area. Building on a previously optimized methodology, the QuEChERS-LC-HRMS method was applied, enabling the unequivocal identification of 13 targeted chemicals (pesticides and veterinary drugs) in 29 fish samples. A complementary suspect screening workflow was performed through the MS-DIAL software using MS^2 spectral similarity. This approach enabled the tentative identification of 49 compounds (level 2a), with one confirmed at confidence level 1 (Schymanski et al., 2014) thanks to reference standards, demonstrating the reliability of the results obtained by the suspect screening process. Overall, the combined workflow demonstrated the relevance of coupling generic sample preparation with LC-HRMS-based targeted and suspect screening for food and environmental monitoring. This strategy enables the identification of a wide range of substances, including regulated, unregulated, and emerging compounds, contributing to a more comprehensive

understanding of the chemical exposome in benthic species, as sentinel species to better assess the exposure of populations. Once again, the suspect search approach extends the analytical scope to include contaminants for which analytical standards are not available. Beyond synthetic chemicals, the tentative identification of nine mycotoxins and alkaloids underlines the importance of monitoring naturally occurring compounds. Such approaches hold considerable potential as early-warning tools to track the occurrence of chemical mixtures in aquatic ecosystems, support ecological risk assessment, and ultimately evaluate consumer exposure via fish consumption.

Acknowledgments

This work was funded by Anses (EMERGEXPO project) and the Pays de la Loire Region (France) (arrêté 2022-09694).

CRediT author statement

Cassandre Jeannot: Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. ***Bruno Le Bizec***: Conceptualization, Funding acquisition. ***Julien Parinet***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Writing - Review & Editing. ***Gaud Dervilly***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Validation, Writing - Review & Editing

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

****

Principaux résultats liés à l'application de la méthodologie de recherche

- Dans le but d'évaluer l'impact des pratiques agricoles intensives sur l'environnement, la méthode QuEChERS-LC-HRMS, développée et validée à l'Anses (**Article 3**), a été appliquée à une espèce de poissons benthiques (*Chrysichthys nigrodigitatus*) collectée dans un lac artificiel en Côte d'Ivoire.
- Les approches ciblée et suspecte ont permis de rechercher une large gamme de substances chimiques, et ont montré des profils de contamination différents par rapport à ceux des poissons français dans les deux articles précédents (**Articles 3 et 4**).
- Au total, 13 pesticides et médicaments vétérinaires différents ont été identifiés dans ces échantillons. Un médicament (Phenazone) et un pesticide (Difenoconazole) étaient parmi les composés les plus fréquemment identifiés, dans 79 et 76 % des échantillons, respectivement.
- La recherche suspecte a permis l'annotation de 49 composés — incluant des alcaloïdes, des produits pharmaceutiques et industriels, des mycotoxines, des pesticides et des produits de transformation —, dont le Phenazone identifié à l'aide de son standard, confirmant une nouvelle fois la robustesse des résultats obtenus par cette approche.
- Parmi les composés les plus fréquemment annotés par l'approche suspecte, trois alcaloïdes, un produit pharmaceutique et trois produits chimiques industriels ont présenté des fréquences de détection supérieures à 75 %.
- Au-delà des produits chimiques synthétiques, l'annotation de mycotoxines et d'alcaloïdes souligne l'importance de surveiller les composés naturels dans les prochaines études, qui peuvent présenter des risques importants pour la santé humaine.
- L'application de cette méthodologie à des échantillons collectés dans des lieux spécifiques permet d'étudier, sans *a priori*, la présence d'une grande diversité de substances dans des zones encore peu investiguées.

Chapitre IV : Mise en évidence de la complémentarité entre deux approches analytiques pour une analyse étendue des PFAS dans les aliments

Au cours de ces travaux de thèse, deux stratégies analytiques ont été développées, chacune reposant sur les trois mêmes piliers : la préparation des échantillons, la méthode d'analyse et le traitement des données. Bien qu'inscrites dans un objectif global commun (*Objectif 1*), elles répondaient à deux sous-objectifs distincts (*Objectifs 1.A* et *1.B*). La première, développée au sein du laboratoire LABERCA et présentée au chapitre II, était spécifiquement axée sur l'élargissement du spectre de PFAS détectables par des approches suspectes et non ciblées, au-delà des substances déjà couvertes par les méthodes de surveillance classiques. La seconde, menée à l'Anses et détaillée au chapitre III, visait à concevoir une méthode multi-résidus et multi-contaminants permettant l'identification simultanée de nombreuses familles chimiques, incluant les PFAS, sans ciblage *a priori*.

Ainsi, si la famille des PFAS constitue un fil conducteur entre ces deux approches, leurs objectifs analytiques initiaux diffèrent. Cette complémentarité rend pertinente une comparaison de leurs performances spécifiques sur la détection des PFAS, afin d'évaluer la robustesse et les limites de chaque méthodologie. Le présent chapitre (Chapitre IV) est donc dédié à cette mise en perspective, dans l'optique de contribuer au développement de stratégies analytiques intégrées et plus efficaces pour l'étude des contaminants dans les denrées alimentaires.

Article 6 : Optimizing PFAS monitoring: A direct comparison of sample preparation and HRMS workflows on Q-Exactive and Q-ToF instrument

Cassandre Jeannot[1, 2], Bruno Le Bizec[1], Julien Parinet[2], Gaud Dervilly[1,*]

[1] Oniris, INRAE, LABERCA, 44300, Nantes, France

[2] ANSES, Laboratory for Food Safety, Pesticides and Marine Biotoxins Unit, 14 rue Pierre et Marie Curie, F-94701 Maisons-Alfort, France

* Corresponding author at: Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Oniris, Route de Gachet, F-44307, France. E-mail addresses: gaud.dervilly@oniris-nantes.fr, laberca@oniris-nantes.fr (G. Dervilly).

En préparation pour soumission à Talanta.

Contribution de l'autrice

À la suite des développements méthodologiques présentés dans les Chapitres II et III, j'ai comparé les deux approches de recherche développées. Pour se faire, en complément de l'ensemble des échantillons représentatifs des habitudes alimentaires françaises, j'ai analysé d'autres matrices alimentaires pertinentes, préparant les extraits nécessaires pour répondre aux différents objectifs de ce travail. Ensuite, lorsque les données n'avaient pas encore été obtenues, j'ai réalisé l'acquisition des données nécessaires et les processus de traitement des données adaptés. L'ensemble de ces résultats m'a permis d'évaluer la complémentarité des approches testées et de proposer des pistes d'amélioration en vue de futures recherches approfondies.

Concernant la rédaction de l'article, j'ai rédigé une première version complète, incluant le résumé, les points forts, les figures, les tableaux et les informations complémentaires (Supplementary Information). Cette version a d'abord été relue et corrigée conjointement avec les encadrants du projet. Une fois le manuscrit consolidé, il a été soumis à l'ensemble des co-auteurs pour une relecture approfondie et des suggestions de modifications. Le processus de révision en réponse aux commentaires des évaluateurs a suivi la même démarche collaborative.

****

1. Introduction

Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) are a large class of synthetic chemicals, from 4800 (OECD, 2018) to over 7 million (Schymanski *et al.*, 2023) in just a few years. They are widely used in industrial and consumer products due to their unique physicochemical properties, including thermal resistance, hydrophobicity, and surfactant properties. These compounds are found in food packaging, firefighting foams, and pesticides, leading to widespread environmental and food contamination (Glüge *et al.*, 2020). Due to their persistence and potential health risks, regulatory agencies have implemented stringent monitoring requirements for four specific PFAS compounds (perfluorooctane carboxylate (PFOA), perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorononanoic acid (PFNA), and perfluorohexane sulfonate (PFHxS)), in certain food matrices (EFSA, 2020). However, many PFAS remain unregulated, are not routinely screened, or even unknown, necessitating the development of broader analytical approaches and suggesting the need to search for additional compounds (EFSA, 2020; European Commission, 2022b).

In our previous research, we developed and applied a comprehensive workflow—from sample preparation to data processing—for the specific non-targeted analysis of PFAS in food matrices (Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025). These studies not only enabled the characterization of the four PFAS regulated in food (European Commission, 2022b) and the13 PFAS recommended for monitoring, but also expanded the scope by detecting additional compounds rarely included in routine screening, most notably the first reported identification of perfluoropropanoic acid (PFPrA) in food. In addition, among these non-routinely analyzed PFAS which have been highlighted through the implemented strategy, some have known applications as pesticides, underscoring the importance of including such compounds in analytical studies and surveillance strategies aimed at ensuring food safety. The importance of a non-selective sample preparation step, such as the QuEChERS protocol, was demonstrated, along with the effectiveness of high-resolution mass spectrometry (HRMS)—using a Q-Exactive system—and a suitable data processing strategy to identify additional PFAS.

To further broaden the chemical scope of PFAS analysis, we subsequently developed a comprehensive screening method capable of simultaneously detecting other residues and contaminants—specifically pesticides and veterinary drugs—in addition to PFAS (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). In this second study, we developed an optimized another workflow, also combining QuEChERS-based sample preparation and LC-HRMS analysis associated to a tailored data processing.

Given the wide physicochemical diversity of PFAS and the complexity of food matrices, improving analytical sensitivity and reliability is essential to ensure accurate exposure assessment. While EFSA encourages the monitoring of emerging PFAS, it also stresses the urgent need for more robust and sensitive analytical tools. Extraction, purification, and detection conditions can significantly influence compound detectability; thus, comparing analytical strategies is critical to avoid overlooking relevant substances. In particular, assessing the complementarity of different methods offers the potential for broader and more reliable PFAS coverage.

Building on previously developed and published work, this study aims to: 1) compare a PFAS-specific extraction method with a broader non-targeted screening approach across diverse food matrices to rigorously evaluate and benchmark their analytical performance, 2) compare the performances of two high-resolution mass spectrometry (HRMS) platforms—the Q-Exactive (Orbitrap) and the Q-ToF—along with their respective data-processing workflows in terms of sensitivity, selectivity, and PFAS coverage.

Although both sample preparation protocols and HRMS workflows using either Q-Exactive and Q-ToF have been individually validated (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025), no direct side-by-side performance comparison has yet been conducted. Addressing this gap by the relative performance of these approaches under equivalent conditions—constitutes the primary objective of the present study.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

The lists of all chemicals and reagents used in these comparisons are completely identical and available in our previous work, in particular the details used for the specific PFAS method (i.e. QuEChERS A and Analysis method 1) in (Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025) and for the broad spectrum method (i.e. QuEChERS B and Analysis method 2) in (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). The mix of 27 PFAS used for the comparison of extraction protocols on spiked food matrices is presented in (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025).

2.2. Investigated samples

For sample preparation protocol comparison, five different fish samples (i.e., cod back, oysters, lobster, salmon, and horse mackerel), previously used for protocol development (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025), were pooled to ensure a representative sample of matrix diversity while optimizing extraction and analysis time.

Building on our previous work (Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025), this study further applies the developed methods to a set of 20 naturally contaminated food samples, selected for their known relevance to consumer PFAS exposure. These samples were previously collected in France. These food samples were divided into five categories: eggs (n = 3), fish—including smoked salmon, sardine, trout fillet, alaska hake fillet, and back of cod—(n = 5), shellfish—including cooked shrimps, scallops, raw mussels, and cooked mussels—(n = 4), meat—including chipolata (pork), butcher steak (beef), cotelettes (lamb), thigh with skin (chicken), and white ham with rind (pork)—(n = 5), and dairy products—including grated emmental, goat's cheese bûche, and plain cow's milk yoghurt—(n = 3).

2.3. Sample preparation

Two sample preparation protocols were compared to broaden the detection of PFAS in food matrices. Both protocols are based on QuEChERS extraction, referred here as QuEChERS A and QuEChERS B.

QuEChERS A is part of the strategy developed to broaden the range of extracted PFAS as described in (Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025), whereas **QuEChERS B** is a multi-residue and multi-contaminant extraction method that also includes PFAS, as detailed in (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). All parameters -including sample amounts, extraction solvents and clean-up steps- were consistent with those reported in the referenced publications, and are detailed in **Tableau 6**.

Tableau 6. *Detailed information on sample preparation protocols.*

	QuEChERS A	**QuEChERS B**
Amount of sample	150 mg	1 g
Extraction solvents	5 mL of ultra-pure water, 5 mL of ACN and 50 µL of Formic Acid (FA)	4 mL of ACN and 1 mL of ultra-pure water
Agitation	vortexed for 1 min	vortexed for 10 min
Extraction salt(s)	600 mg of NaCl	800 mg of $MgSO_4$ and 200 mg of NaCl
Agitation	vortexed for 1 min	
Centrifugation	10 min at 4000 rpm (4 °C), and stored overnight at -20 °C	5 min at 4000 rpm (4 °C)
	Evaporation of the supernatant under nitrogen to 1 mL	Take 3 mL of the supernatant
Purification (d-SPE)	150 mg of anh. $MgSO_4$, 15 mg of C18 and 7.5 mg of GCB	50 mg of PSA, 150 mg of C18EC and 900 mg of Na_2SO_4
Agitation	vortexed for 1 min	
Centrifugation	10 min at 4000 rpm (4 °C)	5 min at 4000 rpm (4 °C)
Filtration of supernatant	0.22 µm nylon syringe filters	0.2 µm PTFE filters
Evaporation	dried under nitrogen	
Reconstitution in	90 µL of MeOH/H_2O (40/60; v/v)	100 µL of ACN/H_2O (10/90; v/v)
Filtration	Omega 10 kD a membrane	

2.4. Data acquisition and processing

Two strategies were compared for enhanced detection of PFAS using targeted, suspect, and non-targeted workflows. The two LC-HRMS analytical strategies were designated as **Analysis Method 1** for the PFAS-specific method and **Analysis Method 2** for the multi-class method. **Figure 55** provides an overview of the sample preparation and analytical workflows employed in both the PFAS-specific and multi-contaminant methods. Details of the acquisition parameters are summarized in Table S1, highlighting differences in LC parameters (e.g. chromatographic columns, gradient profiles and mobile

phase composition) and mass spectrometry acquisition settings (eg. ion source conditions, scan settings, and polarity modes).

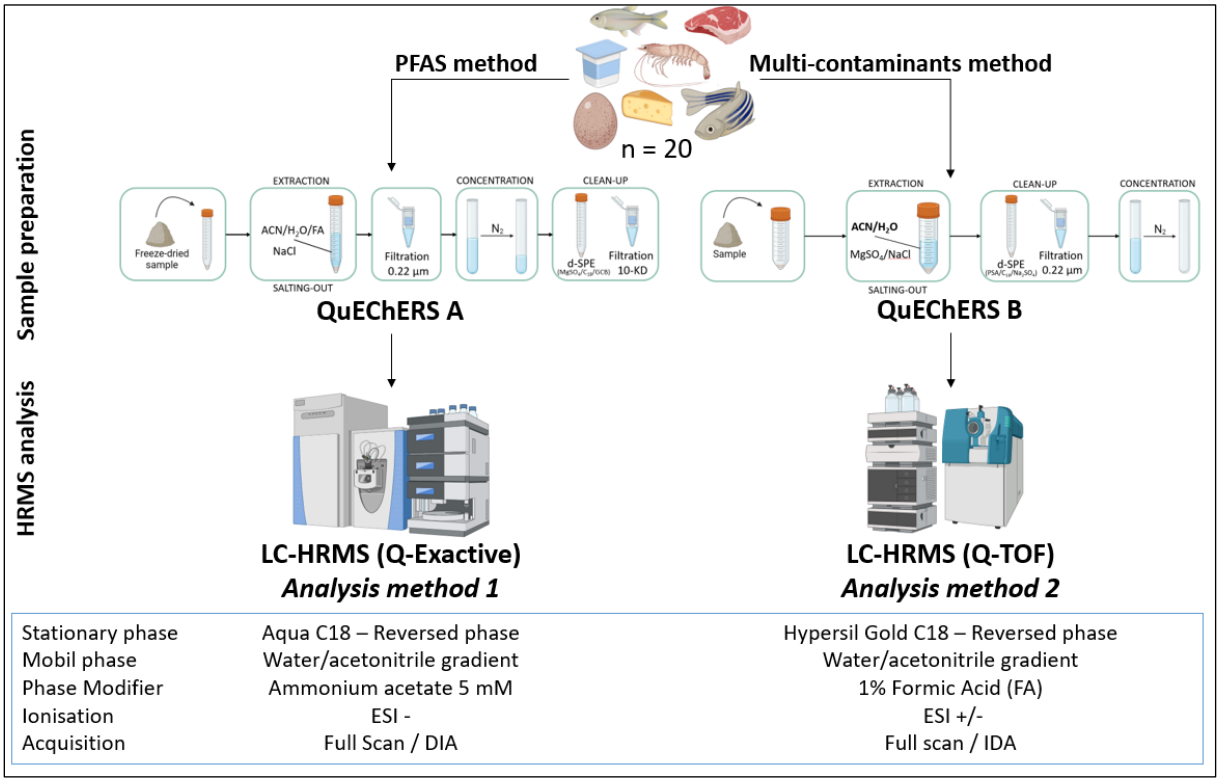


Figure 55. *Overview of the sample preparation methods (QuEChERS A or B) and analytical workflows (Methods 1 or 2) applied in the PFAS-specific and multi-contaminant approaches*

- **Analysis Method 1**, based on a LC-Q-Exactive system, was previously described by (Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025). All parameters used in this work were consistent with those reported in the referenced publications.

Briefly, samples analysis was performed using an ultimate 3000 UHPLC pumping system coupled to an Orbitrap Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific®, Bremen, Germany). The chromatographic separation was performed on a reverse phase C18-column (Hypersil Gold, 100 mm x 2.1 mm, 1.9 µm particle size) equipped with a pre-filter (UHPLC filter 22180; Thermo Scientific, Bremen, Germany). The column ovens temperature was set to 40 °C. The injection volume was set to 5 µl, and the flow rate was 0.4 $mL.min^{-1}$. The total elution gradient time was 20 min, using water 5 $mmol.L^{-1}$ ammonium

formate (A) and acetonitrile (ACN) (B). The Q-Exactive mass spectrometer operated in negative electrospray ionization (ESI) mode.

- While **Analysis Method 2**, using a LC-QToF system, was detailed in (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). All the parameters used in this work were in line with those given in the referenced publication.

Briefly, sample analysis was performed using a Dionex UltiMate-3000 ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) system couled to a Q-ToF mass spectrometer (TripleTOF 5600^{TM}) (AB Sciex, Darmstadt, Germany). The chromatographic separation was performed on a reverse phase C18-column (Aqua® C18, 150 mm × 2 mm, 3 µm particle size, Phenomenex Inc, Torrance, CA, USA) equipped with an Aqua® pre-column (4.0 mm × 2.0 mm, 3-µm particle size, Phenomenex). The column ovens temperature was set to 50 °C. The injection volume was set to 10 µl, and the flow rate was 0.5 mL.min^{-1}. The total elution gradient time was 23 min, using ultrapure water (A) and ACN (B) both containing 0.01 % of FA. The Q-ToF mass spectrometer operated in negative ESI mode.

3. Results and discussion

3.1. Performance assessment of extraction protocols

Previous studies (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025) have demonstrated the ability of both extraction protocols (**QuEChERS A** and **QuEChERS B**) to extract PFAS from various food matrices. To compare their performance and assess their complementarity, these 2 protocols were firstly applied to a pooled seafood spiked with PFAS prior to extraction. Then, 20 food samples with existing, historically-acquired PFAS contamination were analyzed using both extraction methods. **Figure 56** represents the various tests conducted during this work, the results of which are discussed in the following sections.

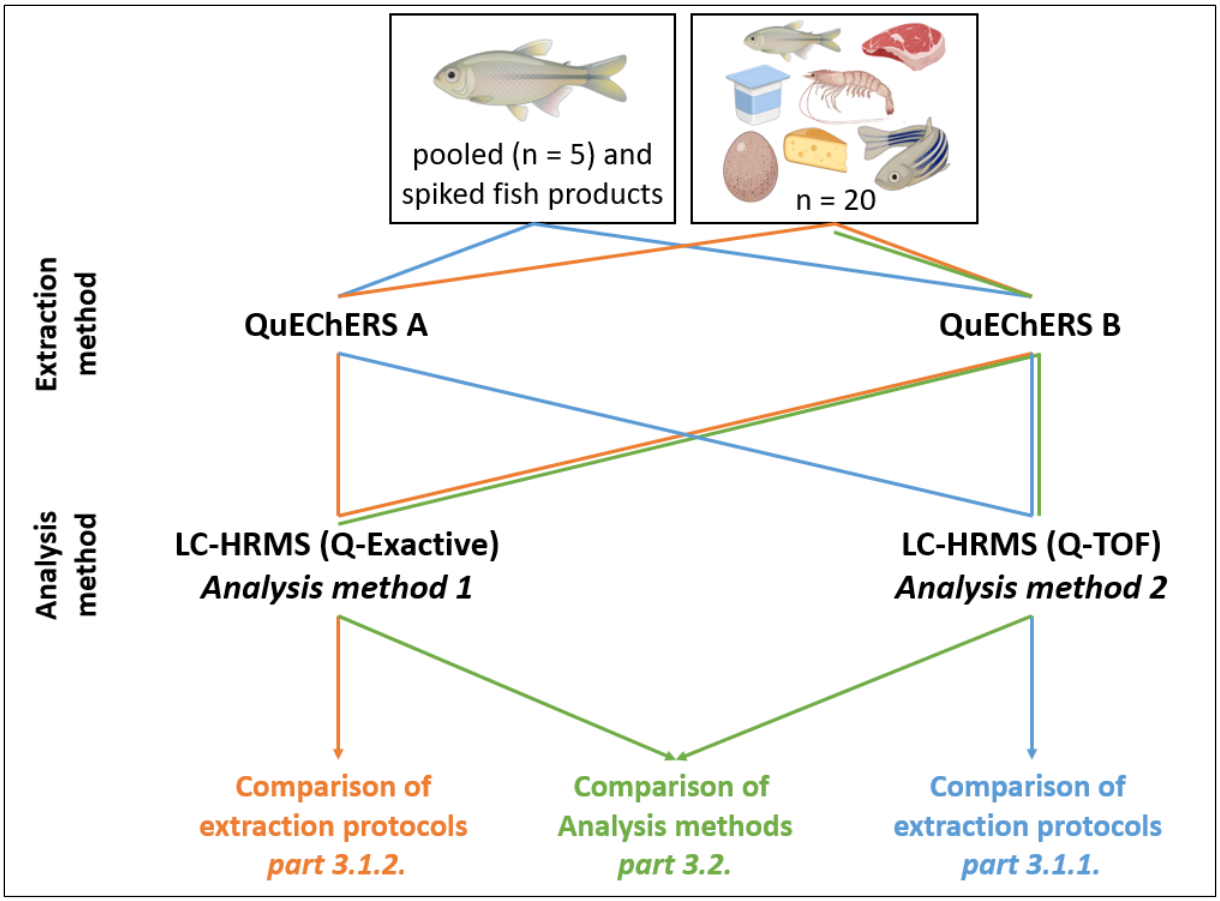


Figure 56. *Schematic overview of the study design. Two sets of samples were processed using two sample preparation protocols (QuEChERS A and B) and two analytical strategies (Method 1 and Method 2). This scheme summarizes the comparative workflows discussed with each comparison detailed in dedicated section of the article*

3.1.1. Application to spiked seafood samples (Figure 56 – Blue workflow)

The five pooled seafood products were spiked with 27 PFAS (0.01 $mg.kg^{-1}$ (wet weight (ww))) and extracted using both extraction methods. To ensure a focused comparison of extraction performance, all samples were analyzed and processed using **Analysis Method 2** (Q-TOF) selected based on the availability of the analytical equipment. This allowed us to isolate and evaluate the extraction protocols independently of analytical variability.

The impact of the extraction protocol was assessed based on three main criteria: the number of detected compounds, the signal-to-noise (S/N) ratio, and the signal intensities of PFAS (**Figure 57**).

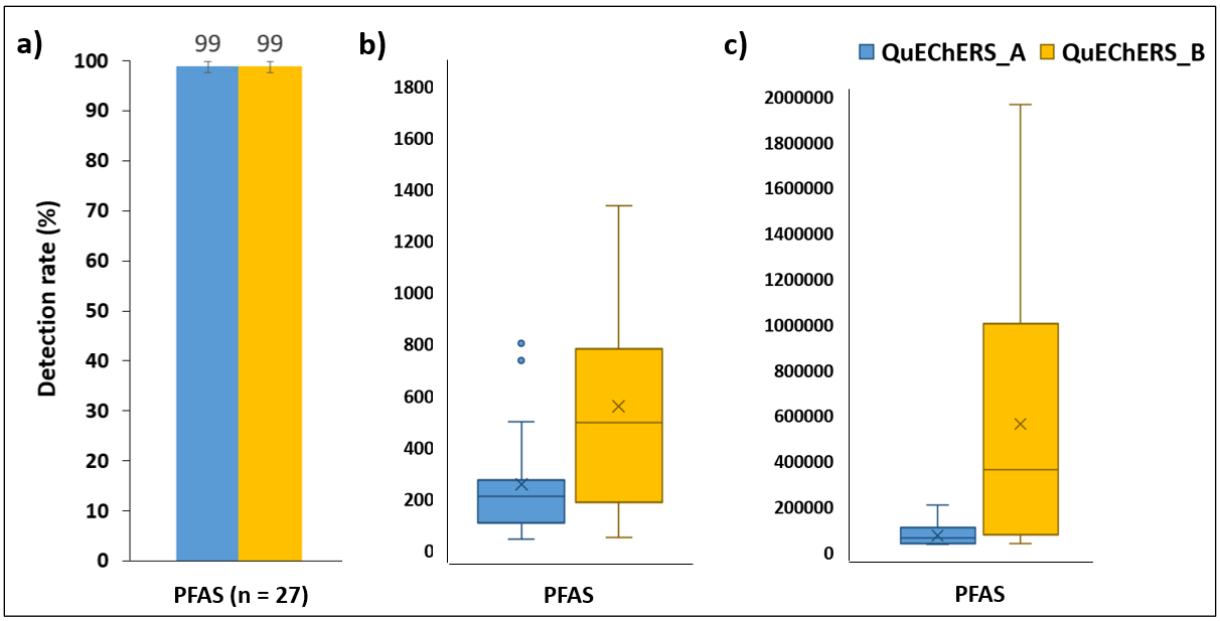


Figure 57. *Caracterization of the pooled fishery products sample supplemented at 0.01 mg.kg^{-1} for each PFAS. The error bars correspond to the standard deviation (SD) (Mean ± SD, n = 3).* ***a)*** *Detection rates,* ***b)*** *boxplot of S/N ratios and* ***c)*** *signal intensities of 27 PFAS using two different QuEChERS protocols (A (in blue) and B (in yellow)),*

The results show that the detection rate of the 27 PFAS (99 %) remains consistent regardless of the extraction method used. However, both the S/N ratios and the signal intensities were found to be 4 to 10 times higher when using the **QuEChERS B** protocol, as illustrated in **Figure 58** for perfluorobutane sulfonic acid (PFBS).

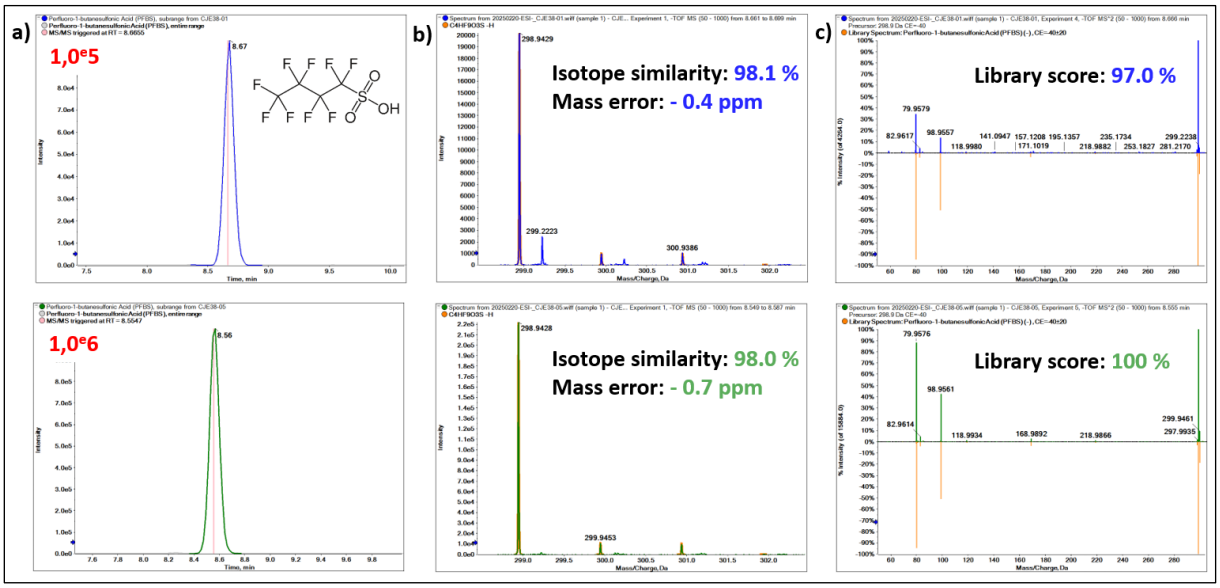


Figure 58. *Comparison of perfluorobutane sulfonic acid (PFBS) signals extracted by QuEChERS A (blue) and QuEChERS B (green).* ***a)*** *Extracted ion chromatogram;* ***b)*** *Isotopic pattern and mass error of the*

precursor ion; ***c)*** *Experimental fragmentation spectrum (in blue or green) matched against the library spectrum produced by the injecting standard in solvent (in orange)*

The intensity of PFBS following extraction using the QuEChERS B method is approximately ten times higher than that obtained with the QuEChERS A method.

Key methodological differences between the two approaches—such as amount of sample, extraction solvents, extraction salts, d-SPE, or the presence of an additional filtration step—are summarized in **Tableau 6**. Considering these factors together, the large screening method demonstrates superior efficiency, notably through higher sensitivity, possibly due to a reduction of matrix effects, and therefore appears to be the most suitable choice for future PFAS studies. Furthermore, the alternative protocol could be further optimized by deleting the additional filtration step, to avoid unintentional loss of PFAS. A more in-depth discussion, along with hypotheses to explain these differences, is provided in section 3.1.3 below.

3.1.2. Application to naturally contaminated food matrices (Figure 56 – Orange workflow)

The 20 animal-derived food samples characterised in this study were previously analyzed in our earlier work (Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Le Bizec, *et al.*, 2025) to identify PFAS compounds, using the initial PFAS-specific protocol (**QuEChERS A**) combined with **Analysis Method 1**. In the present study, these same samples were re-extracted one year later using the broader screening protocol (**QuEChERS B**). All extracts underwent identical HRMS workflows (**Analysis Method 1)**, enabling a direct performance-based comparison of the two extraction approaches in naturally contaminated matrices.

The performance of the two extraction protocols was evaluated based on their efficiency in extracting the maximum number and the widest range of PFAS from these food items. The PFAS and their frequency of identification in the 20 matrices are presented in **Figure 59**.

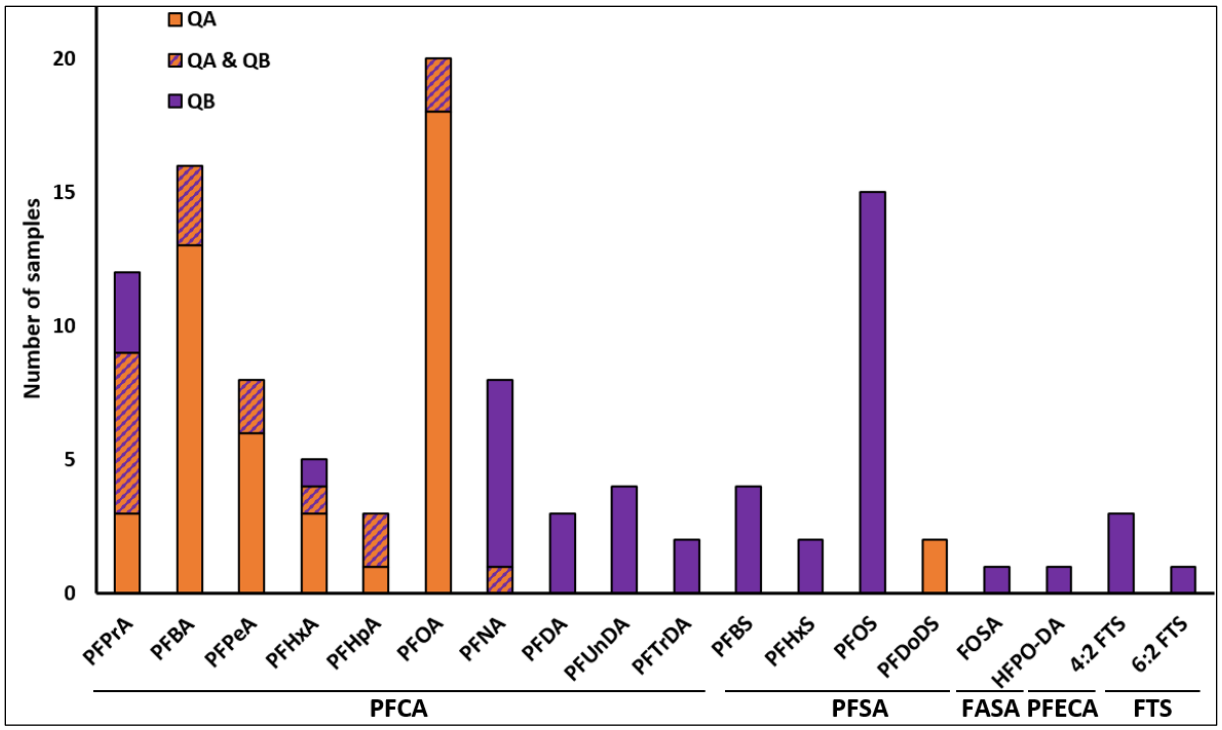


Figure 59. *Frequency of PFAS detection in 20 food samples with pre-existing contamination, broken down by extraction method. Orange bars (QA) indicate compounds detected via QuEChERS A only; purple bars (QB) represent detections via QuEChERS B only. All extracts were analyzed using the same method (Analysis method 1). The striped orange-purple segments show compounds found by both methods. PFAS are grouped by chemical class (PFCAs, PFSAs, FASA, PFECA, FTS), with the y-axis showing the number of samples in which each compound was detected*

A total of 18 PFAS were detected across all food matrices, comprising: 10 perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs), 4 perfluoroalkyl sulfonic acids (PFSAs), 1 perfluoroalkyl sulfonamide (FASA), 1 perfluoroether carboxylic acid (PFECA), and 2 fluorotelomer sulfonates (FTS).

- The QuEChERS A protocol effectively recovered 8 PFAS, predominantly PFCAs—including PFOA, which was consistently found in all samples. This result is highlighted by the orange bars in **Figure 59**.

- The QuEChERS B protocol, extracted 17 PFAS, capturing a broader spectrum of PFCAs than the QuEChERS A method and additionally targeting PFSAs, FASA, PFECA, and FTS. This result is highlighted by the purple bars in **Figure 59**.

In addition, detailed information on the number of PFAS identified in each of the 20 food matrices, according to the extraction method applied, is presented in **Tableau 7**. In this section, both columns must be considered: QuEChERS A and QuEChERS B as well as their analysis using Analytical Method 1.

Tableau 7. *PFAS detected in the 20 food matrices, according to the sample preparation protocol (QuEChERS A or QuEChERS B) and the analytical method applied (Method 1 or Method 2)*

Sample prep – Analytical method		***QuEChERS A – Analytical method 1***	***QUEChERS B – Analytical method 1***	***QUEChERS B – Analytical method 2***
#1	**Egg #1**	PFPrA, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA	PFPrA, PFBA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFOS	PFBA, PFHxS
#2	**Egg #2**	PFPrA, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFOA	PFPrA, PFBA, PFBS, PFHxS, PFNA, PFOS	PFBA, PFHxS, PFOS, PFPrA
#3	**Egg #3**	PFPrA, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA	PFPrA, PFBA, PFHpA, PFHxS, PFNA, PFOS	PFBA, PFHpA, PFHxS, PFOS, PFNA, PFPrA
#4	**Cooked shrimps**	PFPrA, PFBA, PFPeA, PFOA, PFDoDS	PFNA, PFDA, PFOS, PFUnDA	PFOS
#5	**Scallops**	PFPrA, PFBA, PFPeA, PFHxA, PFOA	PFPrA, PFPeA, PFHxA, PFNA, PFOS, PFUnDA, PFTrDA	PFOS, PFTrDA
#6	**Raw mussels**	PFPrA, PFBA, PFOA	PFPrA, PFOS	6:2 FTS, PFOS, PFTrDA
#7	**Cooked mussels**	PFPrA, PFBA, PFOA	PFOS, HFPO-DA	
#8	**Trout fillet**	PFBA, PFOA	PFPrA, PFOS	6:2 FTS, PFOS
#9	**Back of cod**	PFPrA, PFBA, PFPeA, PFOA	PFPeA, PFHxA, PFNA, PFDA, PFOS, PFUnDA, PFTrDA, FOSA	PFOS, PFBS, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA, FOSA
#10	**Alaska hake fillet**	PFPrA, PFBA, PFPeA, PFHpA, PFOA	PFBS, PFOA, PFNA, PFDA, PFOS, PFUnDA	PFUnDA, PFOS, PFOA, PFNA, PFDA
#11	**Smoked salmon**	PFBA, PFPeA, PFOA, PFDoDS	PFBS, PFOS	PFBS, PFOS
#12	**Sardin**	PFOA		
#13	**Butcher steak (beef)**	PFBA, PFOA	PFOS	PFOS
#14	**Cotelettes (lamb)**	PFBA, PFOA	6:2 FTS	6:2 FTS
#15	**White ham with rind (pork)**	PFOA	PFPrA	
#16	**Chipolata (pork)**	PFOA		PFHxS
#17	**Thigh with skin (chicken)**	PFBA, PFOA	PFPrA	
#18	**Grated emmental**	PFBA, PFOA	4:2 FTS, PFOS	PFOS
#19	**Goat's cheese buche**	PFPrA, PFBA, PFOA	PFPrA, 4:2 FTS, PFOS	PFOS

#20	**Plain cow's milk yoghurt**	PFOA	4:2 FTS, PFOS, PFBS, PFNA	PFOS, PFBS, PFNA

These results highlight the ability of protocol B to extract a broader range of PFAS (n = 17), particularly PFSAs, FASA, PFECA, and FTS, compared to the QuEChERS A method (n = 8).

Despite the difference in the number of PFAS identified and the nature of the PFAS, the number of occurrences is similar between the two approaches. As shown in **Tableau 7**, QuEChERS A exhibited 46 occurrences (i.e. the sum of all the orange bars in **Figure 59**: 3 for PFPrA, 13 for PFBA etc.), while Analytical Method 2 showed 47 occurrences (i.e. the sum of all the purple bars in **Figure 59**: 3 for PFBA, 1 for PFHxA etc.), and 17 compounds were commonly identified by both methods ((i.e. the sum of all the striped orange-purple segments in **Figure 59**: 6 for PFPrA, 3 for PFBA etc.). Although the QuEChERS B method extracts a wider range of PFAS, QuEChERS A remains important for its robust recovery of PFCAs across diverse food matrices—a key class of concern due to their persistence and regulatory relevance.

In the previous section (3.1.1), where spiked fish samples were investigated, a difference in sensitivity between the two protocols was highlighted. The analysis of the same PFAS in samples with naturally occurring PFAS now further reveals a difference in selectivity, especially when target concentrations are lower. These observations are consistent with those made in spiked fish samples. However, these findings are extended to more diverse matrices, contaminated at environmentally relevant levels, underscoring the additional complexity of the analyses in this protocol assessment. This highlights the need to refine extraction protocols to combine the ability to capture a broad spectrum of PFAS, as enabled by protocol B, with the ability to detect them at low concentrations, as probably demonstrated by protocol A.

For each matrix, a Venn diagram was generated from these results and is presented in Figure S1, based on results of **Tableau 7**. An example is illustrated for one food matrix (an egg) in **Figure 60**.

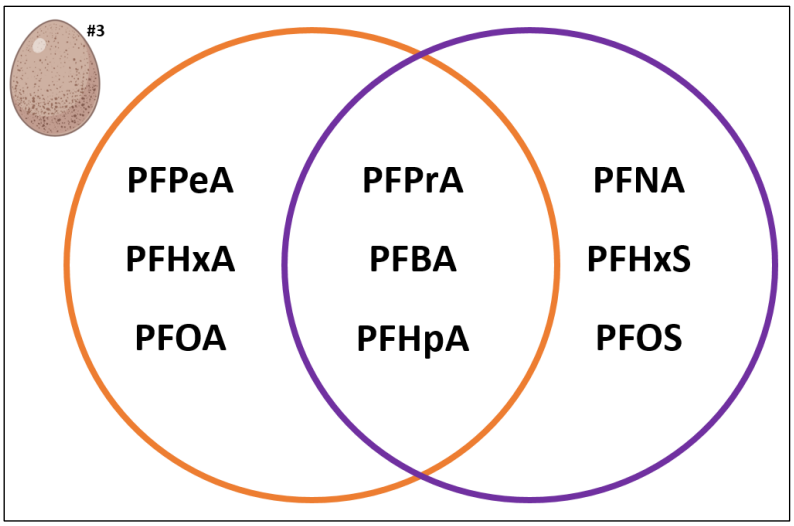


Figure 60. *Venn diagram illustrating the distribution of PFAS identified according to the extraction method used in an egg sample (#3). The orange circle indicates compounds identified via QuEChERS A only; the purple circle represents identifications via QuEChERS B only; The overlap area highlights compounds detected by both methods.*

This representation emphasizes the complementarity of the two extraction protocols. Depending on the parameters applied, each protocol enables the recovery of specific PFAS. Three PFAS (PFPeA, PFHxA, PFOA) were extracted exclusively with protocol QuEChERS A, three (PFNA, PFHxS, PFOS) exclusively with protocol QuEChERS B and three (PFPrA, PFBA, PFHpA) were recovered with both protocols. Since some PFAS are extracted using only one method, these representations highlight the importance of using both extraction protocols to extract a maximum number of PFAS and better characterize these complex food matrices.

3.1.3. Discussion

At first, these results can be attributed to the wide physicochemical diversity of PFAS. Several PFAS characteristics influence their affinity for a given extraction protocol, such as the type of functional group (e.g., carboxylate, sulfonate), the chain length (number of fluorinated and aliphatic carbon atoms), the total number of fluorine atoms, and the molecular geometry (linear versus branched isomers). These structural characteristics directly affect parameters such as polarity, solubility, and log P, which determine how efficiently a compound can be recovered under specific extraction conditions (Buck *et al.*, 2011; Arnesdotter *et al.*, 2025).

Considering extraction methods, among the different steps of the sample preparation workflow, the additional filtration step appeared particularly critical, as preliminary results raised concerns regarding its potential impact on analyte recovery and data quality. Indeed, the reduced signal-to-noise ratios and intensities observed in the study of spiked seafood samples with QuEChERS A can be attributed to the use of an additional filter (Omega 10KD) implemented during its development to prevent cone clogging during analysis. In addition, results for the study of naturally contaminated food matrices show that the QuEChERS A method enables the extraction of a wide range of short PFCAs (C < 9, PFNA) (**Figure 59**).

To further investigate the effect of the filter, a complementary analysis was carried out to better understand the differences observed between extraction protocols. Signal intensities of selected PFAS were compared between the standard QuEChERS A protocol and a modified version of QuEChERS A without the additional filter. Three representative PFAS were evaluated: perfluorobutanoic acid (PFBA) (C4), perfluoroundecanoic acid (PFUnDA) (C11), and perfluorotridecanoic acid (PFTrDA) (C13) (**Figure 61**).

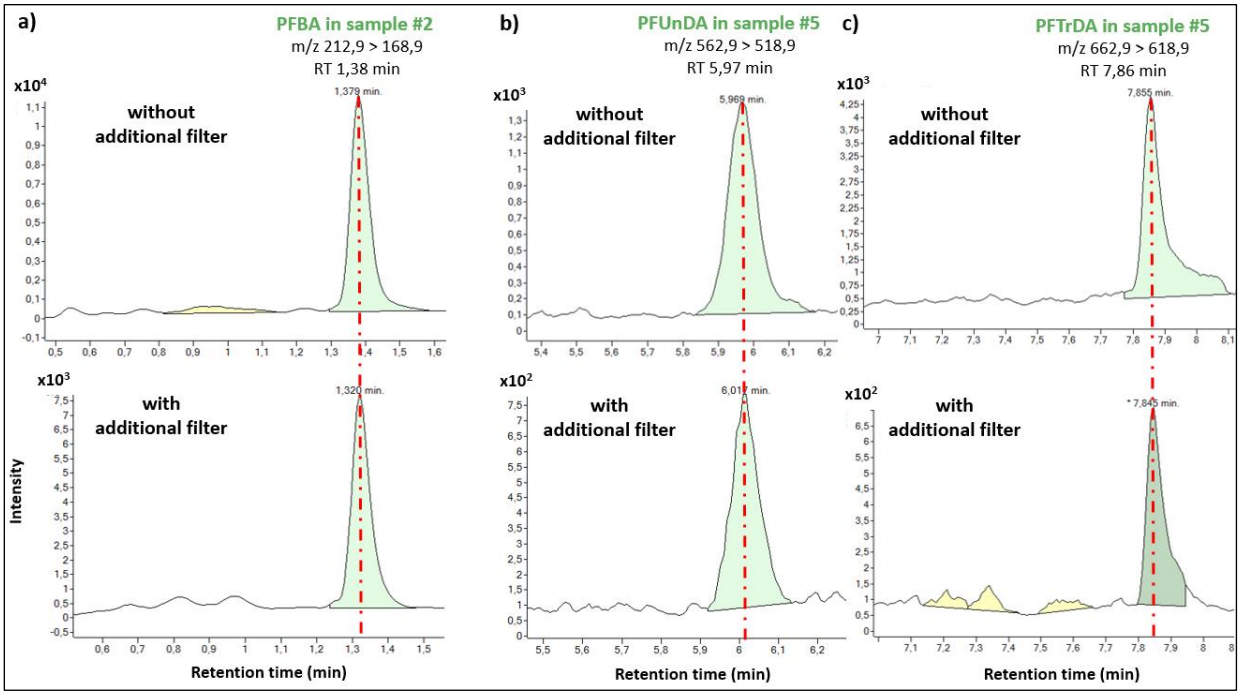


Figure 61. *Comparison of **a)** perfluorobutanoic acid (PFBA), **b)** perfluoroundecanoic acid (PFUnDA), and **c)** perfluorotridecanoic acid (PFTrDA) signal intensities, extracted by QuEChERS A without additional filter (up) and QuEChERS A (including additional filter) (below)*

The comparison revealed a reduction in signal intensity ranging from 1.5-fold to 6.5-fold when the filter is used, with the greatest losses observed for the longest-chain PFAS. These findings suggest that the inclusion of the filter contributes significantly to the reduction in both signal-to-noise ratios and signal intensities, thereby leading to a fewer PFAS being detected. In addition to the filter effect differences in sample size between protocols also appear to play a role. The QuEChERS B protocol uses more than six times the initial sample amount compared to QuEChERS A, which likely enhances the detectability of PFAS present at trace levels, compounds that may be lost or remain undetected during extraction with the QuEChERS A protocol.

These results highlight the complementarity of the two extraction methods and demonstrate that using both protocols expand the number and the range of PFAS analysed. For future studies, various improvement ideas can be considered to extract a wider chemical range of PFAS in one single method, and consequently increase the number of compounds detected.

Notable differences were observed between the two analytical methods, as highlighted above. In the discussion that follows, we propose hypotheses and potential tests based on the distinct parameters of the approaches, aiming to optimize PFAS detection in complex food matrices.

- **Sequential extraction for complex matrices**. Given that PFAS are present in trace amounts and the samples are complex, sequential extraction could enhance compound recovery and signal intensities. Many studies perform a second extraction following the initial one, and subsequently combine the extracts prior to the purification step. For exemple, to ensure broad PFAS coverage during extraction, fish samples have been subjected to two consecutive extractions with acetonitrile, after which the extracts were combined and processed further following the analytical protocol (Nilsen *et al.*, 2024). Although sequential extraction slightly increases the overall sample preparation time, it does not affect instrumental analysis or data processing duration.

The heterogeneity of PFAS—differences in molecular weight, polarity, carbon chain length, isomeric structure, and functional groups—further supports the use of complementary sample preparation protocols. By leveraging the complementarity of extraction methods, the overall analytical workflow could achieve a more comprehensive coverage of the PFAS spectrum, without increasing data acquisition and processing time. For exemple, a two-step sequential extraction (basic methanol followed by acidic methanol) applied to soils impacted by aqueous film-forming foams (AFFF) enabled the recovery of not only the common anionic PFAS (PFCAs, PFSAs) but also cationic and zwitterionic compounds, thereby broadening the analytical coverage (Nickerson *et al.*, 2020).

- **Alternative strategies for simpler matrices**. When the sample is less complex, the dilute-and-shoot strategy can be used as a suitable alternative to multi-step extraction protocols. By minimizing sample handling, this non-specific approach reduces the risk of analyte loss, while significantly decreasing preparation time. Moreover, it maximizes the recovery and detection of a broad range of PFAS, making it particularly advantageous for rapid screening applications. However, in matrices with higher complexity or strong interferences (as matrix effects), the absence of cleanup steps may compromise sensitivity and selectivity, thereby limiting its applicability (Guo *et al.*, 2020; Hajeb *et al.*, 2022b). Some studies use simplified sample preparation protocols involving a minimum of purification steps, such as solvent extraction followed by centrifugation (Sapozhnikova *et al.*, 2025).

- **Critical parameters affecting QuEChERS performance**. Several parameters critically influence the performance of QuEChERS extraction in complex matrices, particularly when applied to complex matrices. Notably, the choice of extraction solvent, the type and quantity of buffering salts to adjust pH and drive phase separation, and the selection of dispersive sorbents for cleanup (such as PSA, C18, or graphitized carbon black) significantly affect analyte recovery and matrix interference suppression (Casado, Morante-Zarcero et Sierra, 2022). For exemple, in this work, the addition of formic acid to the extraction solvent in QuEChERS method A likely

explains the increased detection of PFCAs. This enhancement is attributed to the modification of the solvent pH, which promotes the protonated form of PFCAs, increasing their polarity and solubility in the extraction phase. Since PFCAs are strong acids with pKa values typically below 1, they exist predominantly in their dissociated form under acidic conditions — unlike in their ionic form in alkaline or neutral environments—, facilitating more efficient extraction (Goss, 2008; Zhou *et al.*, 2019). Many authors have observed improved recovery of targeted PFAS using an acidified extraction solvent during QuEChERS protocol in food samples (Zhou *et al.*, 2019; Casado, Morante-Zarcero et Sierra, 2022). So, it would be interesting to study different extraction and purification conditions to assess how they affect the distribution of extracted PFAS, and therefore better define the parameters that should be used to cover a wide range of compounds. However, the results of these tests remain dependent on the number and diversity of PFAS standards available. With the aim of advancing scientific research, sharing of standards and collaborative efforts could be envisaged to develop broader analytical methods, capturing a wider physicochemical diversity of PFAS.

3.2. Performance assessment of LC-HRMS approaches

Following sample preparation, data acquisition and processing are critical steps in the detection of PFAS. To comparatively evaluate the detection performance of two LC-HRMS approaches, including data acquisition and data processing — previously applied in earlier studies (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025; Jeannot, Macorps, Amziane, *et al.*, 2025) — 20 food samples extracted using the QuEChERS B method were analyzed using approaches. The first, referred to as **Analysis Method 1**, was employed in the development and application of a non-targeted PFAS screening workflow. The second, **Analysis Method 2**, was used for the development, validation and application of a large-scale targeted and suspect screening workflow.

3.2.1. Application to food matrices (Figure 56 – Green workflow)

The performance of both data acquisition and processing processes was evaluated based on their efficiency in detecting the maximum number and the widest range of PFAS from these naturally contaminated samples. The PFAS and their frequency of identification in the 20 food matrices are illustrated in **Figure 62**, and detailed information is available in **Tableau 7**. In this section, both columns must be considered: QuEChERS B as well as its analysis using Analytical Method 1 and 2.

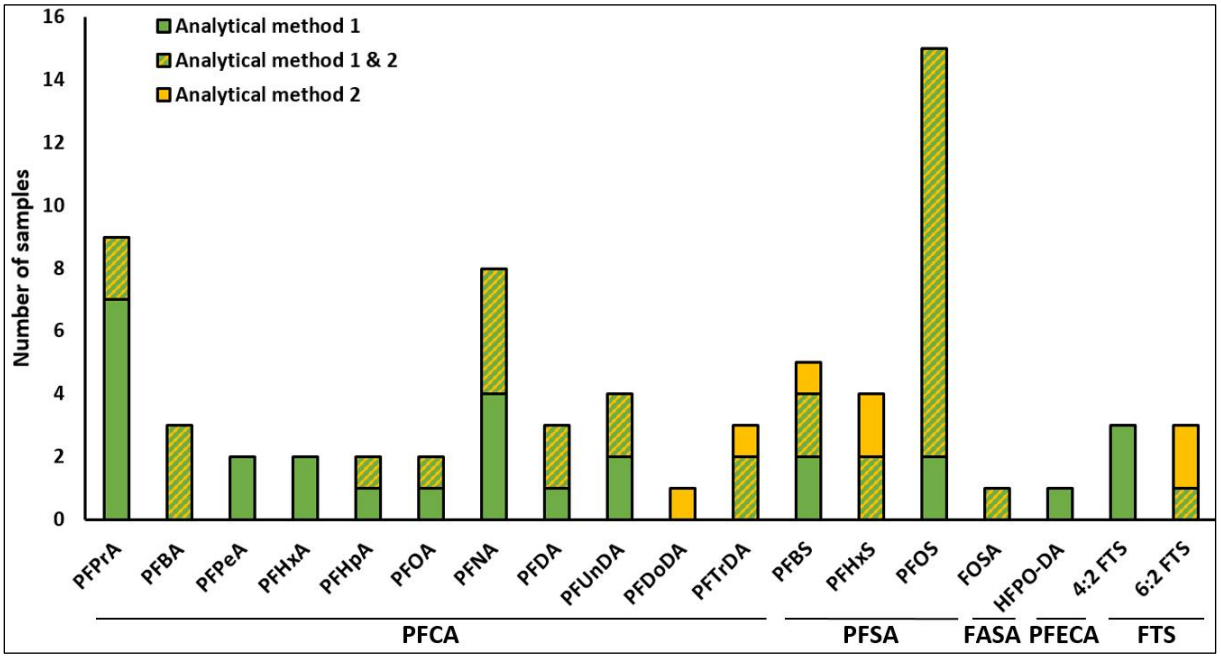


Figure 62. *Frequency of PFAS detection in 20 food samples with pre-existing contamination, broken down by analysis method. Green bars indicate compounds detected via Analytical method 1 only; yellow bars represent detections via Analytical method 2 only. The striped green-yellow segments show compounds found by both methods. PFAS are grouped by chemical class (PFCAs, PFSAs, FASA, PFECA, FTS), with the y-axis showing the number of samples in which each compound was detected.*

A total of 18 different PFAS were detected across the twenty food matrices, comprising: 11 PFCA, 3 PFSA, 1 FASA, 1 PFECA and 2 FTS.

- **Analytical method 1** allowed the detection of 17 PFAS compounds, including 10 from the PFCA family. This result is highlighted by the green bars in **Figure 62**.
- **Analytical method 2** revealed 14 PFAS compounds, from different families. This result is highlighted by the yellow bars in **Figure 62**.

Although the total number of PFAS detected is rather similar between the two approaches (17 VS 14), the distribution of chemical families covered differs. As shown in **Tableau 7**, Analytical Method 1 exhibited 28 occurrences (i.e. the sum of all the green bars in **Figure 62**: 7 for PFPrA, 2 for PFPeA etc.), while Analytical Method 2 showed 7 occurrences (i.e. the sum of all the green bars in **Figure 62**: 1 for PFDoDA, 1 for PFTrDA etc.), and 36 compounds were commonly identified by both methods ((i.e. the sum of all the striped green-yellow segments in **Figure 62**: 2 for PFPrA, 3 for PFBA etc.).

To represent these results, Venn diagrams were generated for each matrix and are presented in Figure S2. For illustration, one example of these diagrams is detailed in **Figure 63** for a fish sample.

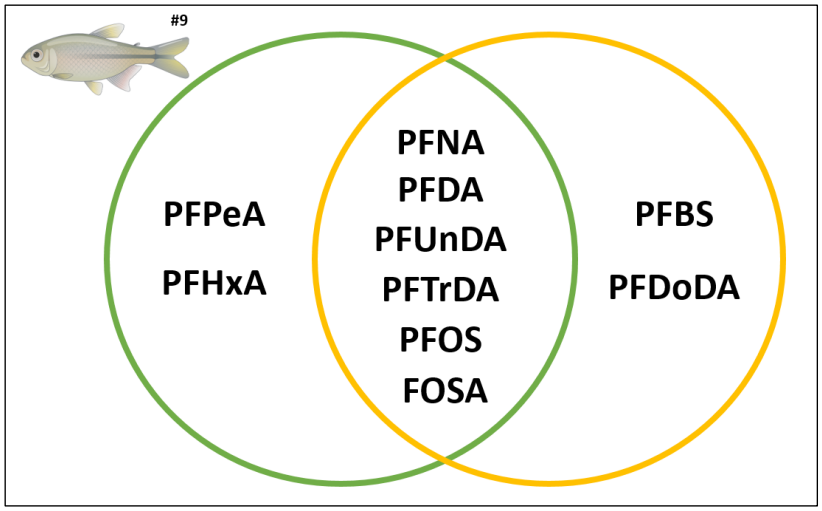


Figure 63. *Venn diagram illustrating the distribution of PFAS identified according to the analytical method used in a fish sample (#9). The green circle indicates compounds identified via Analytical method 1 only; the yellow circle represents identifications via Analytical method 2 only; The overlap area highlights compounds found by both methods.*

This representation highlights the complementarity of the approaches, as both analytical methods enabled the identification of 8 PFAS, with only 6 (PFNA, PFDA, PFUnDA, PFTrDA, PFOS, FOSA) being common to both. In addition, Analytical method 1 allowed the identification of 2 PFAS (PFPeA and PFHxA) not detected by Analytical method 2, while conversely, Analytical method 2 identified 2 PFAS (PFBS and PFDoDA) that were not identified by Analytical method 1.

These observations can be explained by a difference in signal intensities between the two approaches. Among compounds detected by both methods, direct comparisons of signal intensities naturally present in the samples were performed. For exemple, PFBA in sample #1 and PFOS in sample #8 exhibited signals that were between 24- and 150-fold higher when analyzed with Analytical method 1 (**Figure 64**).

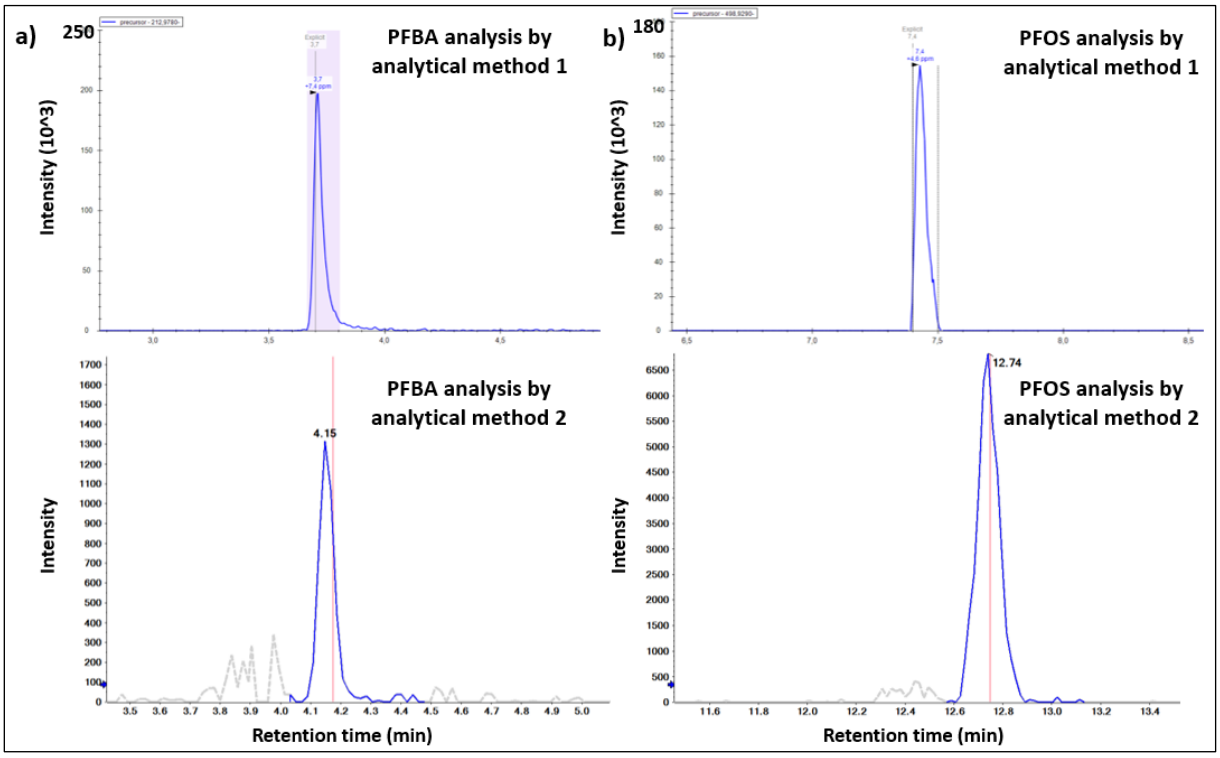


Figure 64. *Comparison of **a)** perfluorobutanoic acid (PFBA) signals in sample #1 and **b)** perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) in sample #8 after extraction of samples by QuEChERS B method and analysis by Methods 1 & 2.*

3.2.2. Discussion

The difference observed can be attributed to specific distinctions between the two analytical methods. From a chromatographic separation perspective, the choice of stationary phase, gradient conditions, and mobile phase composition differed between the methods, representing some of the key parameters influencing PFAS retention, resolution, and detection sensitivity.

Reverse-phase (RP) chromatography with a non-polar C18 stationary phase is the most widely employed approach for the separation of PFAS (Ogunbiyi *et al.*, 2023). For exemple, among the available options, the Hypersil Gold column (Rivière *et al.*, 2014; Pignotti *et al.*, 2017), the Luna Omega

PS C18 column (Chiumiento *et al.*, 2023), the Kinetex XB-C18 column (Moretti *et al.*, 2024) or the BEH C18 column (Awad *et al.*, 2020; Genualdi *et al.*, 2024) were widely used. The Hypersil Gold column — used in Analytical method 1 — is equipped with a polar endcapped C18 phase (Hypersil GOLD aQ), enhancing the retention of polar analytes, enabling more efficient separation of polar PFAS, which are typically difficult to resolve on conventional C18 columns. During the development of the broad-screening method, we compared the performance of the Hypersil Gold column with that of an alternative C18 column (Aqua) used in analysis method 2 (Jeannot, Le Bizec, Dervilly, *et al.*, 2025). This comparison was performed using two chromatographic gradients (16 and 23 min). The results showed that, regardless of the gradient duration, the number of PFAS detected, as well as their signal intensities and S/N ratios, remained comparable for the targeted PFAS. In addition, column dimensions, including length, internal diameter, and particle size, also critically influence separation efficiency, with longer columns or smaller particles enhancing analyte-stationary phase interactions, improving peak resolution and detection sensitivity. These findings could be further explored by evaluating these columns on an alternative HRMS system or by testing lower PFAS concentrations to better assess the sensitivity achieved.

Moreover, for both investigated columns (i.e., Hypersil Gold and Aqua), PFAS signal intensities were comparable between the 16- and 23-min gradients. Whereas the signal-to-noise ratios increased with the longer gradient time, for the two columns. Extending the chromatographic gradient generally enhances the separation of complex mixtures, as a slower elution profile reduces co-elution and improves peak resolution and sensitivity. This principle also applies to PFAS analysis, where the wide diversity of compounds and the presence of matrix interferences make chromatographic resolution particularly critical. For example, official method developed by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA), such as EPA 533, which is widely applied for monitoring PFAS in drinking water, employ relatively long gradients (typically exceeding 25 minutes) to ensure adequate separation and reliable quantification of multiple PFAS (EPA, 2019, p. 533). The differences observed in this study can be

attributed to the longer gradient employed in Analysis Method 2, which extended the ramp to 100% solvent B from 7 minutes in Method 1 to 15 minutes in Method 2.

The choice of mobile phase solvents, which differed between the two methods, significantly influences the separation and therefore the detection of PFAS. The addition of formic acid in Analytical method 2 decreases the pH of the mobile phases. While PFAS remain fully deprotonated due to their very low pKa values, the lower pH influences their retention and detection by modifying interactions with the stationary phase, as well as modifying peak shape and overall sensitivity. Optimizing solvent composition is therefore crucial to maximize sensitivity and resolution in LC-HRMS analyses. This difference may contribute to explaining the variation in PFAS detection observed between the two analytical methods.

Beyond chromatographic separation, the detection step also differed between the two analytical methods compared in this study. Analysis method 1 was performed on a Q-Exactive Orbitrap system, whereas Analysis method 2 employed a Q-TOF instrument. These two high-resolution mass spectrometers rely on distinct fragmentation strategies: in method 1, a full-scan combined with data-independent acquisition (DIA) was applied, enabling systematic fragmentation of all ions within predefined m/z windows and ensuring broad coverage of potential analytes. In contrast, method 2 relied on information-dependent acquisition (IDA), where the instrument selectively fragments the most intense precursor ions detected in real time.

The choice of HRMS platform is critical for accurate molecular formula assignment and the identification of PFAS, particularly in complex food matrices where these compounds may be present at trace levels. HRMS instruments with high resolving power (RP > 30,000) are strongly recommended for this purpose, making Orbitrap-based systems often more advantageous compared with Q-TOF instruments, which typically achieve a resolving power of around 8,000 (Ogunbiyi *et al.*, 2023). Consequently, differences in both resolving power and acquisition strategy can directly influence the

number and type of PFAS detected, also able to explain the differences observed between these two analytical strategies.

These results underline the importance of combining several analytical strategies to better cover the PFAS chemical space and obtain a more complete picture of their presence in samples. Indeed, the use—or at least the testing—of different chromatographic columns, chromatographic gradient, mobile phase compositions, ionization methods, and data acquisition modes could be considered to optimize PFAS analysis. Furthermore, future studies could explore comparisons under identical chromatographic conditions to assess the impact of the choice of mass spectrometer on the PFAS detected.

3.3. Complementary QuEChERS-LC-HRMS methods for PFAS analysis

The comparative analysis highlights the limited overlap between extraction and analytical configurations, underscoring the importance of broad-spectrum and sensitive methods. Only three PFAS—PFBA in all three egg samples, PFPrA in two eggs, and PFOA in the Alaska hake fillet—were consistently detected across the three tested configurations (**Figure 56**) in naturally contaminated samples, regardless of sample preparation and analytical method (**Tableau 7**). All other PFAS detections demonstrate that each approach contributes unique information. The use of QuEChERS A combined with analytical method 1 (configuration 1; blue workflow) resulted in 64 PFAS detection events across all the matrices. Similarly, QuEChERS B with analysis method 1 (configuration 2; orange workflow) yielded 64 detection events, while QuEChERS B with analytical method 2 (configuration 3; green workflow) led to 49 PFAS detection events. Taken together, the complementarity of these three approaches increases the overall detection outcome to 123 events.

A concrete example is provided by sample #18 (**Tableau 7**): two PFAS (PFBA, PFOA) were detected with configuration 1, two PFAS (4:2 Fluorotelomer Sulfonate (4:2 FTS), PFOS) with configuration 2, and one PFAS (PFOS) with configuration 3. When integrated, these complementary results reveal a total of four

distinct PFAS in this sample, highlighting the added value of combining different extraction and analytical strategies.

4. Conclusion

This comparative study highlighted the complementarity of the two developed approaches for expanding the chemical space of PFAS that can be analyzed. To develop more sensitive methods for PFAS analysis, and in line with the results presented in this study, recommendations for complementary investigations have been proposed for future research.

At the sample preparation step, further optimization of different extraction protocols could be deepened to maximize PFAS recovery. Studies could evaluate the impact of key extraction parameters on target compound recovery, explore less specific purification approaches where the matrix allows it, and investigate complementary extraction protocols that could be pooled prior to purification or analysis.

At the analytical step, experiments could systematically assess the influence of individual chromatographic parameters and perform large-scale testing of multiple columns and chromatographic conditions, including gradients and mobile phase compositions. From a detection perspective, more in-depth comparisons between HRMS platforms could also be undertaken. To support broader scientific advancement, collaborative studies and inter-laboratory comparisons could facilitate these large-scale evaluations. Indeed, all of these investigations require considerable financial, temporal, and personnel resources.

Beyond optimizing sample preparation and LC-HRMS analytical workflows, complementary approaches can be integrated to expand the range of PFAS analyzed, responding to the recommendations of the European Commission (European Commission, 2022b).

In particular, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) is widely employed for the analysis of PFAS in complex matrices. Volatile and semi-volatile PFAS, such as fluorotelomer alcohols (FTOHs), as

well as neutral PFAS, can be effectively analyzed using GC-MS with either chemical ionization (CI) or electron ionization (EI), typically in selected ion monitoring (SIM) mode. GC-MS enables simultaneous separation and detection of these PFAS in diverse matrices, including air and food samples, providing a complementary approach to LC-MS for capturing PFAS that are less amenable to liquid chromatography-based analysis (Nakayama *et al.*, 2019; Al Amin *et al.*, 2020; Ogunbiyi *et al.*, 2023; Iannone *et al.*, 2024). For example, a QuEChERSER method, based on QuEChERS protocol, was developed to generate two fractions from the same sample: one fraction analyzed by LC-HRMS and the other by GC-MS/MS with an additional purification strategy, thereby broadening the range of PFAS and other compounds that can be characterized (Taylor et Sapozhnikova, 2022).

In addition, complementary chromatographic techniques such as supercritical fluid chromatography (SFC) and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) offer valuable alternatives for challenging analytes, including highly mobile ultra-short chain PFAS (Joerss et Menger, 2023). SFC is gaining attention as a third chromatographic approach alongside LC and GC, enabling the analysis of a broad spectrum of compounds from non-polar to highly polar, including PFAS, thanks to advances in stationary phases and separation performance. For example, an UHPSFC-MS/MS method has been developed for PFAS analysis in food matrices, providing rapid, high-efficiency separation and serving as a viable alternative to conventional LC-MS/MS (Amziane *et al.*, 2022). Reversed-phase liquid chromatography (RPLC) is widely used for PFAS analysis due to its robustness and excellent separation of nonpolar and moderately polar compounds, however, highly polar PFAS, such as ultrashort-chain species, are often insufficiently retained. HILIC has thus emerged as a promising alternative, offering efficient retention and separation of highly polar and hydrophilic analytes. HILIC employs polar stationary phases, where the aqueous portion of the mobile phase forms a water-rich layer that enhances interactions with polar compounds while using MS-compatible buffers to reduce electrostatic effects. This technique enables rapid, reproducible separations and has been successfully applied to improve the detection of challenging PFAS species in complex matrices (Serafimov *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024). The comparison of all the HILIC columns, particularly those with anion-

exchange functionality, was impossible, which likely limited performance in the study of (Wang *et al.*, 2024). It is therefore recommended that future studies evaluate HILIC columns incorporating anion-exchange properties to enhance PFAS retention and separation. To this end, collaborative studies could once again prove valuable.

LC-ion mobility spectrometry (IMS)-HRMS is emerging as a powerful tool for PFAS analysis, providing an additional separation dimension based on an ion's shape, size, and charge, which enhances confidence in peak annotation. By calculating collision cross section (CCS) values from mobility measurements, IMS can distinguish closely eluting isomers, such as linear and branched PFAS, and link structural differences to specific m/z values. Studies have demonstrated that CCS, combined with retention time and accurate mass, allows for the characterization of branching positions and emerging PFAS species, and can increase throughput by separating isomers on a millisecond timescale compared to conventional LC-MS methods. While IMS has been successfully applied to environmental samples, its use for resolving isomeric PFAS in complex food matrices remains limited, representing an opportunity for future methodological development (Joerss et Menger, 2023; Ogunbiyi *et al.*, 2023).

Finally, to improve the number of PFAS detected—especially those for which analytical standards are unavailable—suspect screening (SS) and non-targeted screening (NTS) techniques can be employed as complementary approaches to targeted analysis. Suspect screening allows the annotation of compounds based on predicted or previously reported structures, even in the absence of reference standards, while non-targeted screening provides an unbiased approach to detect unknown PFAS or emerging species (Pourchet *et al.*, 2020; Manz *et al.*, 2023; Lai *et al.*, 2024). These strategies have already demonstrated their effectiveness in identifying PFAS in complex food matrices (Ren *et al.*, 2022; Chu et Letcher, 2024), thereby expanding the chemical space that can be monitored and improving overall exposure assessment.

Acknowledgments

This work was funded by Anses (EMERGEXPO project) and the Pays de la Loire Region (France) (arrêté 2022-09694).

CRediT author statement

Cassandre Jeannot: Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. ***Bruno Le Bizec***: Conceptualization, Funding acquisition. ***Julien Parinet***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Writing - Review & Editing. ***Gaud Dervilly***: Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Validation, Writing - Review & Editing

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

****

Principaux résultats liés à l'évaluation de la complémentarité des approches

- La complémentarité des deux stratégies analytiques développées dans les **Chapitres II et III** a été évaluée dans le cadre de ce travail, en se concentrant exclusivement sur les PFAS.
- Pour approfondir cette comparaison, différents échantillons — naturels ou supplémentés — ont été analysés.
- La complémentarité des méthodes d'extraction a été démontrée, la méthode B permettant d'extraire des PFAS appartenant à différentes familles, tandis que la méthode A s'est révélée plus adaptée à la détection de PFCAs présents à des concentrations plus faibles.
- Les deux méthodes d'analyse (LC-QEx et LC-QToF) ont montré leur performance pour identifier différents types de PFAS.
- Les fréquences d'occurrence des composés ont été établies pour les trois combinaisons de méthodes d'extraction et d'analyse, soulignant l'intérêt de les combiner pour explorer plus en profondeur la contamination des échantillons alimentaires.
- Cette comparaison a mis en évidence à la fois la complémentarité et les limites des méthodes, tout en ouvrant des pistes d'hypothèses et d'amélioration pour optimiser les stratégies analytiques intégrées et affiner l'identification des PFAS dans des matrices alimentaires complexes.
- Peu d'études se sont attachées à comparer de manière détaillée les paramètres spécifiques de différentes méthodes analytiques appliquées aux PFAS. Les travaux présentés ici contribuent à combler cette lacune en évaluant la complémentarité des approches depuis l'extraction jusqu'à l'analyse des données, permettant ainsi de tirer parti des points forts de chaque workflow. Cette comparaison approfondie constitue une base solide pour le développement de stratégies analytiques plus performantes.

Chapitre V : Évaluation de l'exposition des consommateurs

Les chapitres précédents ont présenté le développement de méthodes analytiques innovantes permettant d'identifier un large éventail de substances chimiques, souvent encore non réglementées, présentes dans les aliments. Ces avancées contribuent à l'amélioration de l'analyse des risques chimiques, notamment en renforçant la première étape du processus d'évaluation du risque (**Figure 5**) : l'identification du danger.

La deuxième étape du processus, la caractérisation du danger, vise à établir des relations dose-effet permettant de définir des VTR. Cette tâche, complexe et nécessitant des données toxicologiques approfondies, relève de la compétence d'agences d'évaluation telles que l'Anses ou l'EFSA. Elle n'entrait pas dans le périmètre du présent travail de thèse.

En revanche, l'étape suivante — l'évaluation de l'exposition — bien que ne constituant pas l'objectif principal de ce travail, il a toutefois semblé pertinent d'en tenter l'exercice dans le cadre de cette thèse. Ce chapitre propose donc, à titre purement exploratoire, une estimation de l'exposition du consommateur adulte à certaines substances identifiées dans les denrées alimentaires mais non encore encadrées réglementairement. L'objectif n'est pas d'aboutir à une évaluation définitive des risques, mais plutôt d'illustrer, à travers un cas d'étude, comment les données analytiques générées peuvent être mobilisées pour alimenter une réflexion méthodologique en matière d'évaluation des risques sanitaires.

Dans ce chapitre, l'exposition alimentaire est calculée, comme présentée dans la partie Évaluation de l'exposition (3) (page 32), selon l'équation :

$$Exposition\ alimentaire = \frac{\sum(Concentration\ chimique\ dans\ l'aliment \times Quantité\ consommée)}{Poids\ corporel}$$

Avec l'exposition alimentaire en mg contaminant/kg poids corporel, la concentration de la substance dans l'aliment en mg contaminant/kg aliment, et le poids corporel en kg.

L'évaluation de l'exposition alimentaire a été conduite selon une approche maximaliste, basée sur les concentrations observées dans les œufs étudiés. Cette approche ne prend pas en compte la variabilité réelle des concentrations, les différences de consommation dans la population et le régime alimentaire complet, qui seraient modélisés par des distributions probabilistes permettant d'obtenir des estimations plus réalistes et des probabilités d'exposition spécifiques à différents groupes d'individus.

Un composé particulier, le PFPrA (**Figure 65**), a été identifié au cours de ce projet grâce aux développements analytiques réalisés. Ce PFAS, encore peu documenté et absent de la liste des substances traditionnellement surveillées au moment du lancement de l'étude, illustre l'intérêt de

stratégies analytiques élargies. Sa mise en évidence souligne la pertinence d'explorer au-delà des composés déjà réglementés afin de mieux caractériser la diversité des PFAS présents dans les matrices alimentaires et d'anticiper de potentiels enjeux de surveillance future.

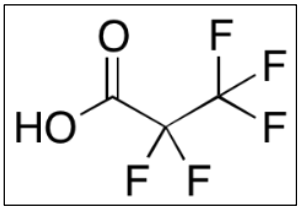


Figure 65. *Structure chimique de l'acide perfluoropropanoïque (PFPrA)*

1. Calcul de la concentration du PFPrA dans un aliment

Pour estimer l'exposition alimentaire d'un adulte à ce PFAS, il convient d'abord de déterminer sa concentration dans les denrées concernées. Pour ce cas d'étude, les œufs ont été choisis, à la fois parce qu'ils font partie des aliments couramment consommés et parce que la présence de PFPrA y a été mise en évidence. Le PFPrA ainsi que les 4 PFAS réglementés dans l'UE (PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS) dans diverses matrices alimentaires ont été quantifiés dans 6 œufs, selon 2 scénarios :

- Les trois premiers œufs (#1 à #3) proviennent d'un supermarché (scénario a)
- Les trois autres (#4 à #6) proviennent d'un jardin individuel proche d'une zone industrielle contaminée (scénario b).

La quantification de ces cinq PFAS a été réalisée à l'aide d'une approche basée sur l'utilisation d'étalons internes marqués au carbone-13, signifiant qu'une partie (ou la totalité) des atomes de carbone (^{12}C) de la molécule a été remplacée par l'isotope carbone-13 (^{13}C). Une gamme d'étalonnage externe a été réalisée en augmentant les concentrations des composés natifs (c'est-à-dire non marqués au ^{13}C), tout en ajoutant une quantité constante d'étalons internes (^{13}C PFAS). Pour chaque PFAS, le rapport des aires du composé natif sur l'aire de l'étalon interne correspondant a été tracé en fonction du rapport des concentrations correspondantes, permettant d'obtenir une droite d'étalonnage fiable (**Figure 68**, en Annexes). Dans les échantillons d'œufs, les étalons internes marqués ont été ajoutés dès la préparation d'échantillons, ce qui permet de corriger les variations liées aux étapes d'extraction, aux effets de matrice et aux fluctuations instrumentales. Les concentrations des PFAS natifs ont ainsi été calculées à partir du rapport des aires mesurées, en s'appuyant sur les courbes d'étalonnage obtenues. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. *Concentration (en µg/kg de pf) du PFPrA et des 4 PFAS réglementés dans l'UE (PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS) mesurées dans 3 œufs provenant du commerce en France (#1 à #3) et 3 autres prélevés dans des « points chauds » en Europe (#4 à #6). Les valeurs en gras dépassent les limites réglementaires fixées entre 0,3 et 1 µg/kg de poids frais selon le PFAS (PFOS, PFOA, PFNA et PFHxS) et 1,7 µg/kg pour la somme de ces 4 PFAS.*

	PFOS	PFOA	PFNA	PFHxS	∑4 PFAS	PFPrA
Œuf #1	0,002	0,044	0,085	< 0,002	0,131	0,389
Œuf #2	0,036	0,038	0,152	< 0,002	0,226	0,355
Œuf #3	0,007	0,047	0,081	< 0,002	0,135	0,846
Œuf #4	**3,012**	**0,577**	**0,956**	**0,514**	**5,060**	0,842
Œuf #5	**2,955**	0,172	0,221	**0,518**	**3,866**	0,730
Œuf #6	**5,259**	0,216	0,486	0,256	**6,217**	1,193

2. Conformité des échantillons

Les concentrations de ces cinq PFAS ayant été déterminées dans les échantillons afin d'estimer l'exposition alimentaire, il est intéressant dans un premier temps et dans la mesure du possible, de les confronter aux limites réglementaires existantes.

Pour les œufs, le Réglement 2022/2388 de la Comission Européenne impose une valeur maximale de 1 µg/kg de pf pour le PFOS, de 0,3 µg/kg pour le PFOA, de 0,7 µg/kg pour le PFNA, de 0,3 µg/kg pour le PFHxS, et de 1,7 µg/kg pour la somme de ces 4 PFAS (European Commission, 2022c). Les autres PFAS n'ont pas de limites maximales. Concernant ces 4 PFAS soumis à la réglementation européenne, les valeurs individuelles ou collectives dépassant ces limites ont été mis en lumière en gras dans le **Tableau 8**. Les PFAS quantifiés dans les œufs provenant de supermarché ne dépassent pas les limites maximales autorisées. Cependant, dans les œufs collectés dans des « points chauds », la moitié des valeurs individuelles et la somme des 4 PFAS dans tous les œufs dépassent ces limites.

Concernant le PFPrA, aucune donnée toxicologique spécifique n'est disponible, ce qui implique qu'aucune VTR n'a encore été établie et, par conséquent, qu'aucune limite maximale pour ce PFAS n'est définie dans les matrices alimentaires.

3. Évaluation de l'exposition du consommateur

Pour estimer l'exposition alimentaire, les quantités d'œufs consommées ont été évaluées à partir des données de consommation issues du rapport sur la consommation d'œufs à domicile entre 2019 et 2022 publié par l'institut technique des filières avicole, cunicole et piscicole (ITAVI). Selon ces données, un consommateur français moyen ingère environ 220 œufs par an, soit près de 4 œufs par semaine (ITAVI, 2023). Un œuf pesant entre 55 et 65 g, la valeur moyenne retenue pour ce calcul est de 60 g /

œuf. Dans cette étude, la quantité d'œuf consommée par semaine est donc considérée à 240 g, soit 0,240 kg d'œuf / semaine.

Pour ces estimations, un poids corporel de 70 kg a été retenu ; valeur couramment utilisée pour représenter un adulte moyen. Par exemple, l'évaluation des risques alimentaires à certains PFAS basée sur les données de l'EAT 2 considérait un poids moyen adulte de 68,9 kg (Rivière *et al.*, 2014).

À partir de ces informations, l'exposition alimentaire hebdomadaire au PFPrA d'un adulte de 70 kg *via* la consommation d'œufs selon les deux scénarios a été calculée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 9** ci-dessous. Pour se faire, les moyennes des concentrations de chacun des 5 PFAS dans les 3 œufs des 2 scénarios — c'est-à-dire œufs #1 à #3 pour (a) et œufs #4 à #6 pour (b) — ont été calculées.

Tableau 9. *Estimation de l'exposition alimentaire hebdomadaire d'un adulte de 70 kg à cinq PFAS (PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS et PFPrA) via la consommation de quatre œufs par semaine, comparée à la DHT fixée par l'EFSA pour les 4 PFAS réglementés*

	Scenario (a)					***Scenario (b)***				
	PFOS	**PFOA**	**PFNA**	**PFHxS**	**PFPrA**	**PFOS**	**PFOA**	**PFNA**	**PFHxS**	**PFPrA**
Concentration chimique moyenne dans l'aliment (mg/kg)	0,015	0,043	0,106	-	0,530	3,742	0,322	0,554	0,429	0,922
Quantité consommée (kg / semaine)	0,240	0,240	0,240	0,240	0,240	0,240	0,240	0,240	0,240	0,240
Poids corporel (kg)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
Exposition alimentaire (ng/kg de pc / semaine) par PFAS	**0,1**	**0,1**	**0,4**	**-**	**1,8**	**12,8**	**1,1**	**1,9**	**1,5**	**3,2**
Somme des expositions alimentaires (ng/kg de pc / semaine)	0,6				-	17,3				-
DHT par l'EFSA (ng/ kg de pc / semaine)	4,4				-	4,4				-

Ainsi, dans le scénario (a), cet adulte aura une exposition alimentaire au PFPrA de 1,8 ng de PFPrA / kg de pc par semaine, et de 0,6 ng/kg de pc par semaine pour la somme des 4 PFAS réglementés. Dans le scénario (b), cet adulte aura une exposition de 3,2 ng de PFPrA / kg de pc par semaine, et de 17,3 ng/kg de pc par semaine pour la somme des 4 PFAS réglementés.

En 2020, l'EFSA a publié un document fixant la DHT à 4,4 ng / kg de pc par semaine pour la somme du PFOS, PFOA, PFNA et PFHxS. Dans le scénario (a), la somme des expositions alimentaires aux quatre PFAS reste bien en dessous de cette DHT, tandis que dans le scénario (b), elle la dépasse d'un facteur quatre. Ce dépassement de la VTR suggère un risque accru pour le consommateur, nécessitant une attention particulière et des mesures de surveillance renforcées pour limiter l'exposition. En comparant la DHT avec celle de l'exposition au PFPrA obtenue, dans le cas où l'individu est le moins

exposé au PFPrA, son exposition à ce seul PFAS représente déjà 41 % (scénario a) de la somme recommandée pour la somme des 4. Dans le cas où l'individu est le plus exposé (c'est-à-dire par la consommation d'œufs provenant de jardin individuel dans des zones spécifiques), son exposition représente 73 % de la somme recommandée (scénario b). Le PFPrA n'est pas encore soumis à une réglementation spécifique, mais ces résultats soulignent un risque potentiel pour le consommateur et le besoin d'un approfondissement des connaissances toxicologiques.

Cette estimation d'exposition constitue un exercice exploratoire, limité à un seul PFAS (le PFPrA) dans une seule matrice (les œufs). Néanmoins, même ce cas unique permet déjà de questionner les niveaux d'exposition. Cet exercice, bien que limité, illustre la pertinence des données générées dans les chapitres précédents et montre concrètement comment ces informations peuvent être exploitées pour informer les pouvoirs publics. Il met également en lumière l'importance d'intégrer ce type de composés émergents dans les programmes de surveillance alimentaire et souligne la nécessité de poursuivre les évaluations toxicologiques du PFPrA afin d'orienter les politiques de protection des populations, en particulier pour les denrées fréquemment consommées et dans les zones potentiellement contaminées.

Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion

Dans le cadre général de l'analyse des risques liés aux substances chimiques présentes dans l'alimentation, les organismes internationaux d'évaluation et de gestion des risques préconisent le développement de méthodes avancées pour une caractérisation plus fine de l'exposome alimentaire des consommateurs, afin d'optimiser le processus d'évaluations des risques. Dans cette perspective, les travaux présentés dans ce projet doctoral se sont attachés à développer et appliquer des approches analytiques innovantes, adaptées à la complexité des matrices alimentaires. Un schéma résumant les principaux travaux réalisés au cours de ce projet doctoral est présenté dans la **Figure 66**. Ce schéma met en évidence la contribution des différentes étapes du projet aux phases clés de l'évaluation des risques, depuis la collecte et l'analyse des données d'exposition jusqu'à l'amélioration de la caractérisation des risques associés aux substances chimiques dans les matrices alimentaires.

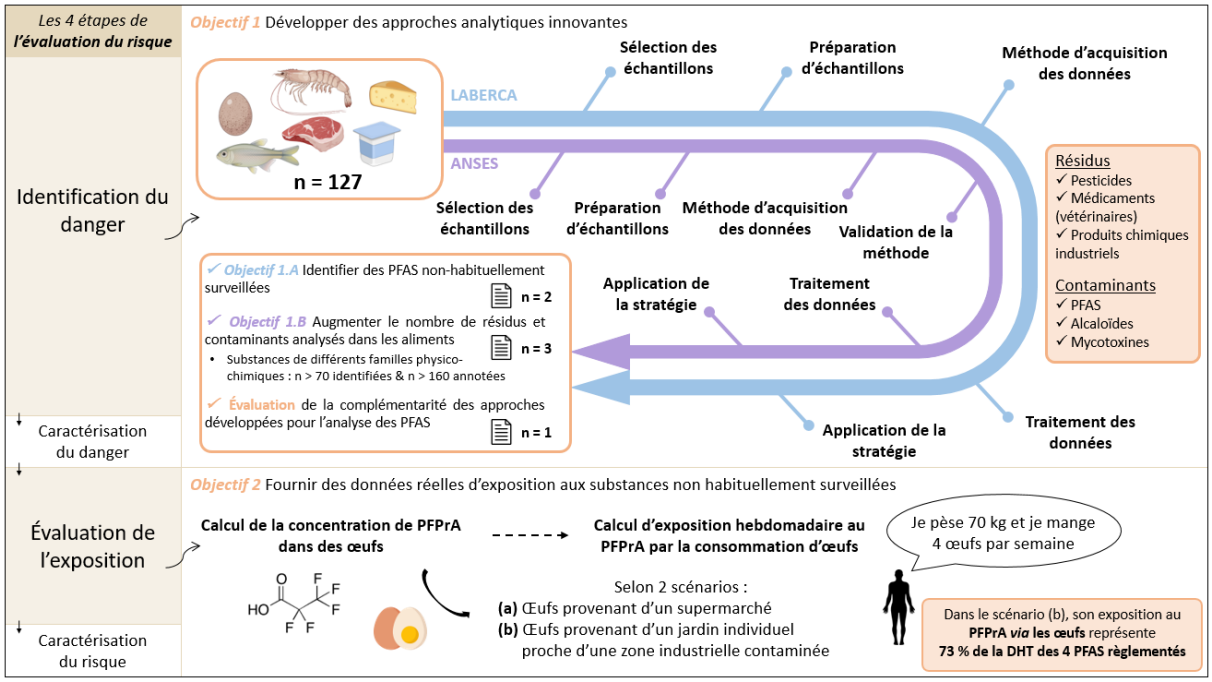


Figure 66. *Schéma récapitulatif des travaux réalisés dans le cadre de ce projet de doctorat, en lien avec les différents aspects de l'évaluation des risques chimiques dans les aliments*

Ainsi, dans un premier temps, les objectifs se sont concentrés sur la mise au point de méthodes permettant d'augmenter le nombre de résidus et contaminants analysés simultanément dans des matrices variées (***Objectif 1***). Dans ce cadre, une recherche bibliographique approfondie a permis de sélectionner les méthodes de préparation d'échantillons et d'analyse par LC-HRMS les plus pertinentes, en tenant compte des contraintes liées à la diversité des matrices et à la complexité des extraits. L'implémentation d'approches suspectes et non ciblées — supportée par la mise en place d'un système d'alerte précoce face aux contaminants émergents — a été essentielle pour mieux caractériser l'exposome alimentaire. L'analyse des échantillons sans *a priori* permet en effet

d'identifier des composés inattendus, en accord avec les recommandations européennes visant à élargir le spectre des substances surveillées.

Tout d'abord, un effort particulier a été porté sur l'analyse des PFAS (***Objectif 1.A***). Une approche de recherche non ciblée a été développée en optimisant trois leviers clés : une préparation d'échantillons de type QuEChERS, une méthode d'acquisition des données par LC-HRMS et une stratégie de priorisation des données spécifiquement adaptée aux composés fluorés. Grâce à ces développements méthodologiques, la présence de PFAS au-delà de ceux habituellement surveillés a pu être mise en évidence dans diverses matrices alimentaires, avec parfois des fréquences de détection élevées. Les résultats obtenus ont souligné la pertinence de la stratégie de priorisation des échantillons, qui, en ciblant les zones déjà identifiées comme fortement exposées aux PFAS, a favorisé la découverte de nouveaux composés fluorés. De plus, notre approche a montré que les poissons et les œufs — matrices déjà bien connues pour leur forte contamination par les PFAS dits « historiques » — accumulent également ces substances émergentes, ce qui renforce et complète les observations rapportées dans la littérature internationale et par les agences d'évaluation des risques. Ces résultats confirment l'intérêt de combiner des approches analytiques non-ciblées à une stratégie d'échantillonnage guidée, afin d'améliorer la détection de contaminants émergents pour répondre aux recommandations européennes concernant la sécurité des aliments.

Pour répondre à l'***Objectif 1.B***, une méthode multi-résidus et contaminants couvrant plus de 800 composés (pesticides, médicaments vétérinaires, PFAS, alcaloïdes et mycotoxines) a été développée et optimisée. Comme pour l'objectif précédent, l'accent a été mis sur l'optimisation de la préparation d'échantillons et de l'analyse par LC-HRMS afin de prendre en compte la grande diversité des propriétés physico-chimiques des substances d'intérêt. Parallèlement, une approche robuste et automatisée de recherche suspecte a été mise en œuvre, permettant de rechercher sans *a priori* des composés pour lesquels aucun étalon analytique n'était disponible. Appliquée à une grande diversité de matrices alimentaires, cette stratégie a conduit à l'identification ($n > 70$) et à l'annotation ($n > 160$) de nombreuses substances, incluant des pesticides, médicaments, PFAS, produits de soin personnel, produits de transformation, contaminants industriels, alcaloïdes et mycotoxines. Ces travaux ont permis non seulement de mettre en évidence des profils de contamination distincts entre les échantillons, mais aussi d'élargir l'espace chimique caractérisable, au-delà des substances habituellement surveillées ou considérées comme prioritaires. Lorsque les étalons analytiques étaient disponibles, le niveau de confiance dans l'identification a pu être renforcé, confirmant ainsi la robustesse de l'approche.

En résumé, les travaux menés dans chacun des deux laboratoires, correspondant aux deux sous-objectifs de l'***Objectif 1***, ont permis de développer et comparer des approches analytiques complémentaires, avec les PFAS comme fil conducteur. La comparaison approfondie de ces méthodes a mis en évidence leur complémentarité et a démontré l'intérêt de combiner différentes méthodes d'extraction et les performances spécifiques des plateformes analytiques pour identifier divers types de PFAS. Cette étude a également permis de mettre en lumière les limites de chaque approche et de proposer des pistes d'amélioration pour optimiser les stratégies d'analyse des PFAS. Peu d'études s'étant attachées à comparer de manière détaillée les paramètres spécifiques de différentes méthodes appliquées aux PFAS, ce travail apporte une contribution originale en évaluant leur complémentarité, et fournit une base solide pour développer de stratégies analytiques plus performantes, adaptées à l'étude de contaminants émergents dans des matrices alimentaires complexes.

Dans un second temps, en s'appuyant sur les résultats obtenus dans la première partie, ce travail de thèse a eu pour ambition de générer des données d'exposition aux substances encore peu ou non surveillées à ce jour (***Objectif 2***). Bien que l'évaluation de l'exposition ne fût pas l'objectif principal, cet exercice méthodologique illustre comment les données analytiques produites peuvent être utilisées pour nourrir la réflexion sur l'exposition alimentaire et contribuer aux approches de gestion du risque sanitaire. Un exercice exploratoire d'évaluation de l'exposition alimentaire à un PFAS peu surveillé, le PFPrA, a ainsi été réalisé. Deux scénarios ont été envisagés pour un adulte de 70 kg consommant quatre œufs par semaine : d'une part, des œufs issus de la distribution commerciale (scénario a), et d'autre part, des œufs provenant d'un jardin individuel situé à proximité d'une zone industrielle contaminée (scénario b).

Dans un premier temps, la concentration du PFPrA a été évaluée dans des œufs, en parallèle des quatre PFAS réglementés dans l'UE (PFOS, PFOA, PFNA et PFHxS). Pour le PFPrA, aucune donnée toxicologique spécifique n'étant encore disponible, aucune VTR ni limite maximale n'a été définie dans les denrées alimentaires, soulignant le besoin d'études supplémentaires pour évaluer le risque lié à ce composé émergent. Les concentrations individuelles et cumulées des quatre PFAS réglementés ont ensuite été calculées dans les mêmes matrices. Dans le scénario (a), ces niveaux sont restés inférieurs aux limites fixées par la Commission européenne, indiquant une situation conforme. En revanche, dans le scénario (b), les concentrations individuelles et cumulées des quatre PFAS réglementés dépassaient parfois les seuils européens, la somme de ces quatre PFAS atteignant jusqu'à plus de trois fois la limite de 1,7 µg/kg d'œuf frais.

Dans un second temps, les niveaux d'exposition ont été estimés et comparés à la VTR disponible. Dans le scénario (a), pour les quatre PFAS réglementés, l'exposition hebdomadaire d'un adulte *via* la

consommation d'œufs reste inférieure à la DHT établie par l'EFSA (c'est-à-dire 4,4 ng/kg de poids corporel par semaine), tandis que l'exposition au PFPrA seul représentait environ 41 % de cette valeur de référence. Dans le scénario (b), l'exposition hebdomadaire aux PFAS réglementés *via* la seule consommation d'œufs dépassait jusqu'à quatre fois la DHT, et l'exposition au PFPrA seul atteignait 73 % de la valeur de référence, soulignant le rôle significatif que pourrait jouer ce composé émergent dans l'exposition alimentaire humaine.

2. Limites et perspectives de ces travaux

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont démontré que la combinaison de protocoles analytiques complémentaires permet d'élargir la couverture chimique et de détecter un spectre étendu de contaminants, avec les PFAS comme fil conducteur. L'exploitation des points forts respectifs des méthodes développées a mis en évidence leur complémentarité, tout en soulignant leurs limites et en proposant des pistes d'optimisation pour améliorer l'identification et la quantification des substances dans des matrices alimentaires complexes. Parmi ces perspectives, afin d'optimiser les protocoles analytiques utilisés, l'intégration de l'IMS dans les stratégies non-ciblées apparaît particulièrement prometteuse, offrant un niveau supplémentaire de séparation et contribuant ainsi à renforcer la robustesse des analyses.

L'extension des développements analytiques à d'autres familles de contaminants, comme d'autres polluants halogénés, et à une plus grande diversité de matrices alimentaires apparaît essentielle pour mieux refléter la complexité physico-chimique des composés présents dans l'alimentation et renforcer la pertinence des évaluations d'exposition. Dans cette perspective, l'étude d'espèces sentinelles constituerait un atout majeur pour mieux caractériser l'exposition aux contaminants émergents. La complémentarité entre analyses LC et GC-HRMS constitue également une dimension prometteuse pour couvrir l'ensemble des substances polaires, modérément polaires et non polaires, et compléter les stratégies analytiques développées. De plus, l'émergence d'outils basés sur l'intelligence artificielle apporte une contribution précieuse, par exemple à travers des modèles capables de prédire des temps de rétention, renforçant ainsi l'annotation des composés et plus globalement le développement d'approches non-ciblées.

Cette thèse a également amorcé l'évaluation de l'exposition, notamment pour certains PFAS dans les œufs, et a montré l'importance de poursuivre cette quantification sur d'autres composés et matrices. La validation et la comparaison des méthodes de quantification avec des approches traditionnelles (LC-MS/MS) permettront de renforcer la fiabilité des résultats et de faciliter leur interprétation par rapport aux valeurs réglementaires (LM) et toxicologiques (VTR). De plus, la disponibilité limitée et le coût élevé de certains EI constituent un défi majeur pour la quantification précise de tous les contaminants. Ces

quantifications sont indispensables pour évaluer l'exposition humaine aux substances chimiques, étape clé du processus d'évaluation des risques. Par la suite, l'exploitation approfondie des ACP amorcées dans ce travail pourrait constituer une base méthodologique solide pour développer des modèles de classification. Ces outils statistiques offriraient une aide à la gestion des risques en permettant de hiérarchiser les contaminants et les matrices prioritaires, et ainsi d'orienter plus efficacement les stratégies de surveillance.

Enfin, le développement de collaborations scientifiques, à l'instar de celle établie avec l'Université McGill apparait crucial pour lever les contraintes techniques et financières, et déployer des stratégies analytiques plus efficaces. Ces partenariats ouvrent la voie à une approche multidisciplinaire et harmonisée de l'exposome chimique alimentaire, combinant chimie analytique, évaluation toxicologique et modélisation de l'exposition, tout en permettant un suivi temporel et géographique des contaminants émergents. Les résultats générés pourraient être intégrés dans des bases de données ouvertes, afin de favoriser leur exploitation par la communauté scientifique et les autorités sanitaires. Une telle valorisation contribuerait à éclairer la réglementation, notamment en alimentant l'actualisation des limites maximales réglementaires applicables aux PFAS et autres contaminants émergents.

En conclusion, cette thèse apporte des outils méthodologiques innovants contribuant à renforcer la surveillance des PFAS et autres contaminants émergents, à alimenter les bases de données scientifiques et réglementaires et, *in fine*, à améliorer la protection des populations face aux risques chimiques liés à l'alimentation. Elle pose ainsi les fondations d'une chimie analytique proactive, capable d'anticiper et de répondre aux défis futurs de la sécurité sanitaire des aliments.

Références bibliographiques

Cette liste inclut les références citées dans les cinq chapitres de ce manuscrit.

Abidemi-Iromini (2022) « Evaluation of Gut Contents of Selected Fish Species in Oluwa River, Igbokoda Delta Region, Ondo State, Nigeria », *East African Scholars Journal of Agriculture and Life Sciences* [Preprint].

Abunada, Z., Alazaiza, M.Y.D. et Bashir, M.J.K. (2020) « An Overview of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in the Environment: Source, Fate, Risk and Regulations », *Water*, 12(12), p. 3590. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/w12123590.

Acosta-Dacal, A. *et al.* (2020) « Supporting dataset on the optimization and validation of a QuEChERS-based method for the determination of 218 pesticide residues in clay loam soil », *Data in Brief*, 33, p. 106393. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106393.

Acosta-Tlapalamatl, M. *et al.* (2022) « Metabolomics: A New Approach in the Evaluation of Effects in Human Beings and Wildlife Associated with Environmental Exposition to POPs », *Toxics*, 10(7), p. 380. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/toxics10070380.

Adamopoulos, I. *et al.* (2025) *A One Health Assessment of PFAS Soil Pollution: Distribution, Trophic Transfer, and Remediation Strategy Evaluation*. Disponible sur: https://doi.org/10.20944/preprints202507.1131.v1.

Adams, K.J. *et al.* (2020) « Skyline for Small Molecules: A Unifying Software Package for Quantitative Metabolomics », *Journal of Proteome Research*, 19(4), p. 1447-1458. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00640.

Aguilera-Luiz, M.M. *et al.* (2013) « Wide-scope analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(20), p. 6543-6553. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00216-013-7060-5.

Aker, A. *et al.* (2023) « Associations between dietary profiles and perfluoroalkyl acids in Inuit youth and adults », *Science of The Total Environment*, 857, p. 159557. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159557.

Akinboye, A.J. *et al.* (2023) « Alkaloids in food: a review of toxicity, analytical methods, occurrence and risk assessments », *Food Science and Biotechnology*, 32(9), p. 1133-1158. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s10068-023-01295-0.

Aktar, W., Sengupta, D. et Chowdhury, A. (2009) « Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards », *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), p. 1-12. Disponible sur: https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7.

Al Amin, Md. *et al.* (2020) « Recent advances in the analysis of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS)—A review », *Environmental Technology & Innovation*, 19, p. 100879. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100879.

A. Lafond, J. *et al.* (2023) « Bacterial transformation of per- and poly-fluoroalkyl substances: a review for the field of bioremediation », *Environmental Science: Advances*, 2(8), p. 1019-1041. Disponible sur: https://doi.org/10.1039/D3VA00031A.

Albero, B., Fernández-Cruz, M.L. et Pérez, R.A. (2022) « Simultaneous Determination of 15 Mycotoxins in Aquaculture Feed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry », *Toxins*, 14(5), p. 316. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/toxins14050316.

Alengebawy, A. *et al.* (2021) « Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications », *Toxics*, 9(3), p. 42. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/toxics9030042.

Ali, A.M. *et al.* (2021) « Legacy and emerging per- and polyfluorinated alkyl substances (PFASs) in sediment and edible fish from the Eastern Red Sea », *Environmental Pollution*, 280, p. 116935. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116935.

Almazrouei, B. *et al.* (2023) « Steroid hormones in wastewater: Sources, treatments, environmental risks, and regulations », *Emerging Contaminants*, 9(2), p. 100210. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.emcon.2023.100210.

Amziane, A. *et al.* (2022) « Optimization and validation of a fast supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of a large set of PFASs in food matrices and human milk », *Journal of Chromatography B*, 1210, p. 123455. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123455.

Amziane, A. (2023) *Evaluation de l'exposition du consommateur algérien aux polluants organiques persistants historiques et émergents*. These de doctorat. Nantes, Ecole nationale vétérinaire. Disponible sur: https://theses.fr/2023ONIR177F (Consulté le: 4 septembre 2025).

Anastassiades, M. *et al.* (2003a) « Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce », *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 86(2), p. 412-431. Disponible sur: https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412.

Anastassiades, M. *et al.* (2003b) « Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce », *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 86(2), p. 412-431. Disponible sur: https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412.

ANSES (2014) *AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'actualisation des indicateurs de risque alimentaire lié aux résidus de pesticides - Saisine n°2013-SA-0138*. Disponible sur: https://www.anses.fr/fr/system/files?file=AUT2013sa0138.pdf (Consulté le: 14 août 2025).

ANSES (2019) *Les études de l'Alimentation Totale (EAT) | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*. Disponible sur: https://www.anses.fr/fr/content/les-etudes-de-lalimentation-totale-eat (Consulté le: 6 septembre 2025).

ANSES (2023) *Intégration de l'exposome dans les travaux de l'Anses - Avis de l'Anses - Rapport du Conseil scientifique*. Disponible sur: https://www.anses.fr/fr/system/files/AUTRE2022METH0197Ra.pdf (Consulté le: 18 juillet 2025).

ANSES, anses (2011) *Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) - Tome 1*. Disponible sur: https://www.anses.fr/fr/system/files/PASER2006sa0361Ra1.pdf (Consulté le: 21 juillet 2025).

Arnesdotter, E. *et al.* (2025) « Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): immunotoxicity at the primary sites of exposure », *Critical Reviews in Toxicology*, 55(4), p. 484-504. Disponible sur: https://doi.org/10.1080/10408444.2025.2501420.

Arp, H.P.H. *et al.* (2024) « The Global Threat from the Irreversible Accumulation of Trifluoroacetic Acid (TFA) », *Environmental Science & Technology*, 58(45), p. 19925-19935. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.4c06189.

Asimakopoulos, A.G., Thomaidis, N.S. et Koupparis, M.A. (2012) « Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol », *Toxicology Letters*, 210(2), p. 141-154. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.07.032.

ATSDR (2022) « Toxicological Profile for DDT, DDE, and DDD ».

Awad, R. *et al.* (2020) « Emerging per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in human milk from Sweden and China », *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22(10), p. 2023-2030. Disponible sur: https://doi.org/10.1039/D0EM00077A.

Baduel, C. *et al.* (2015) « Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices », *Journal of Chromatography A*, 1426, p. 33-47. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.040.

Barola, C. *et al.* (2025) « Determination of ten emerging poly- and perfluoroether carboxilates and sulfonates in food: Method development and validation », *Food Chemistry*, 492, p. 145273. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.145273.

Bassey, B. et Chukwu, A. (2019) « Health Risk Assessment of Heavy Metals in Fish (Chrysichthys Nigrodigitatus) from Two Lagoons in Southwestern Nigeria », *Journal of Toxicology and Risk Assessment*, 5. Disponible sur: https://doi.org/10.23937/2572-4061.1510027.

Baygi, S.F. *et al.* (2021) « Nontargeted Discovery of Novel Contaminants in the Great Lakes Region: A Comparison of Fish Fillets and Fish Consumers », *Environmental Science & Technology*, 55(6), p. 3765-3774. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.0c08507.

Bedi, M. *et al.* (2023) « Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) measured in seafood from a cross-section of retail stores in the United States », *Journal of Hazardous Materials*, 459, p. 132062. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132062.

Berendsen, B.J.A. *et al.* (2013) « Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43, p. 229-239. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.019.

Beser, M.I. *et al.* (2019) « Determination of 21 perfluoroalkyl substances and organophosphorus compounds in breast milk by liquid chromatography coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry », *Analytica Chimica Acta*, 1049, p. 123-132. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.033.

Beyer, A. et Biziuk, M. (2008) « Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food », *Food Chemistry*, 108(2), p. 669-680. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.024.

Bhagat, J., Singh, N. et Shimada, Y. (2024) « Southeast Asia's environmental challenges: emergence of new contaminants and advancements in testing methods », *Frontiers in Toxicology*, 6. Disponible sur: https://doi.org/10.3389/ftox.2024.1322386.

Breitwieser, M. *et al.* (2018) « What is the relationship between the bioaccumulation of chemical contaminants in the variegated scallop *Mimachlamys varia* and its health status? A study carried out on the French Atlantic coast using the Path ComDim model », *Science of The Total Environment*, 640-641, p. 662-670. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.317.

Buck, R.C. *et al.* (2011) « Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: Terminology, classification, and origins », *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7(4), p. 513-541. Disponible sur: https://doi.org/10.1002/ieam.258.

Bugsel, B., Zweigle, J. et Zwiener, C. (2023) « Nontarget screening strategies for PFAS prioritization and identification by high resolution mass spectrometry: A review », *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 40, p. e00216. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.teac.2023.e00216.

Caglayan, M.O., Şahin, S. et Üstündağ, Z. (2022) « Detection Strategies of Zearalenone for Food Safety: A Review », *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52(2), p. 294-313. Disponible sur: https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1797468.

Campbell, K.S. *et al.* (2024) « Comprehensive Determination of 28 PFAS Compounds in Oyster Tissue: A QuEChERS Sample Preparation Coupled with UPLC-MS/MS », *Analytical Letters*, 57(17), p. 2813-2829. Disponible sur: https://doi.org/10.1080/00032719.2024.2302399.

Capriotti, A.L. *et al.* (2013) « High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of perfluorinated acids in cow milk », *Journal of Chromatography A*, 1319, p. 72-79. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.029.

Casado, N., Morante-Zarcero, S. et Sierra, I. (2022) « Application of the QuEChERS Strategy as a Useful Sample Preparation Tool for the Multiresidue Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Food and Feed Samples: A Critical Overview », *Applied Sciences*, 12(9), p. 4325. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/app12094325.

Charbonnet, J.A. *et al.* (2022) « Communicating Confidence of Per- and Polyfluoroalkyl Substance Identification via High-Resolution Mass Spectrometry », *Environmental Science & Technology Letters*, 9(6), p. 473-481. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.estlett.2c00206.

Chen, H. *et al.* (2018) « Distribution, bioaccumulation and trophic transfer of chlorinated polyfluoroalkyl ether sulfonic acids in the marine food web of Bohai, China », *Environmental Pollution*, 241, p. 504-510. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.087.

Chen, Z. *et al.* (2023) « Bioaccumulation and risk mitigation of legacy and novel perfluoroalkyl substances in seafood: Insights from trophic transfer and cooking method », *Environment International*, 177, p. 108023. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108023.

Chi, Z.H. *et al.* (2023) « Characterization of different contaminants and current knowledge for defining chemical mixtures in human milk: A review », *Environment International*, 171, p. 107717. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107717.

Chiumiento, F. *et al.* (2023) « A new method for determining PFASs by UHPLC-HRMS (Q-Orbitrap): Application to PFAS analysis of organic and conventional eggs sold in Italy », *Food Chemistry*, 401, p. 134135. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134135.

Chow, S.J. *et al.* (2021) « Detection of ultrashort-chain and other per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in U.S. bottled water », *Water Research*, 201, p. 117292. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117292.

Chu, S. et Letcher, R.J. (2024) « A targeted and non-targeted discovery screening approach for poly- and per-fluoroalkyl substances in model environmental biota samples », *Journal of Chromatography A*, 1715, p. 464584. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464584.

Cladière, M. *et al.* (2018) « Multi-class analysis for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, process-induced toxicants and packaging contaminants in tea », *Food Chemistry*, 242, p. 113-121. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.108.

Codex Alimentarius Commission (2021) *Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods (CAC/MRL 2-2021). FAO/WHO.* Disponible sur: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/it/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXM%2B2%252FMRL2e.pdf (Consulté le: 13 mai 2025).

Commission Decision (2007) *COMMISSION DECISION of 21 May 2007 concerning the non-inclusion of carbaryl in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing that substance.pdf*. Disponible sur: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007D0355 (Consulté le: 27 juin 2025).

Commission Recommendation (2010) « Commission Recommendation of 17 March 2010 on the monitoring of perfluoroalkylated substances in foodText with EEA relevance (2010/161/EU) ».

Commission Regulation (2002) *COMMISSION REGULATION (EC) No 2076/2002 of 20 November 2002 extending the time period referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC and concerning the non-inclusion of certain active substances in Annex I to that Directive and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing these substances.pdf*. Disponible sur: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002R2076 (Consulté le: 27 juin 2025).

Commission Regulation (2021) *Commission implementing regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC*. Disponible sur: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R0808 (Consulté le: 13 mai 2025).

Cooper, B. et Yang, R. (2024a) « An assessment of AcquireX and Compound Discoverer software 3.3 for non-targeted metabolomics », *Scientific Reports*, 14(1), p. 4841. Disponible sur: https://doi.org/10.1038/s41598-024-55356-3.

Cooper, B. et Yang, R. (2024b) « An assessment of AcquireX and Compound Discoverer software 3.3 for non-targeted metabolomics », *Scientific Reports*, 14(1), p. 4841. Disponible sur: https://doi.org/10.1038/s41598-024-55356-3.

Corrias, F. *et al.* (2021) « Fipronil and Fipronil Sulfone Distribution in Chicken Feathers and Eggs after Oral and Dermal Exposure », *Foods*, 10(12), p. 3077. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/foods10123077.

Costa, F.P., Caldas, S.S. et Primel, E.G. (2014) « Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in canned and fresh peach », *Food Chemistry*, 165, p. 587-593. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.099.

Council Decision (EU) (2025) *COUNCIL DECISION (EU) 2025/868 of 23 April 2025 on the position to be taken on behalf of the European Union at the twelfth meeting of the Conference of the Parties to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants as regards the requests for extension of specific exemptions and the proposals for amendment of Annex A to that Convention*. Disponible sur: https://eur-lex.europa.eu/eli/dec/2025/868/oj/eng (Consulté le: 7 août 2025).

Crimmins, B.S. *et al.* (2014) « A targeted/non-targeted screening method for perfluoroalkyl carboxylic acids and sulfonates in whole fish using quadrupole time-of-flight mass spectrometry and MSe », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(5), p. 1471-1480. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00216-013-7519-4.

Cui, D. *et al.* (2023) « Evaluating non-targeted analysis methods for chemical characterization of organic contaminants in different matrices to estimate children's exposure », *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 33(4), p. 589-601. Disponible sur: https://doi.org/10.1038/s41370-023-00547-9.

Dai, Q., Tang, S. et Dai, C. (2025) « Recent Advances in Pretreatment Methods and Detection Techniques for Veterinary Drug Residues in Animal-Derived Foods », *Metabolites*, 15(4), p. 233. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/metabo15040233.

Das, R., Ananthanarasimhan, J. et Rao, L. (2024) « "PFAS" Exploring the Origins, Impact, Regulations and Remediation Technologies—An Overview », *Journal of the Indian Institute of Science*, 104(4), p. 827-840. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s41745-024-00442-8.

De Felice, B., Spicer, L.J. et Caloni, F. (2023) « Enniatin B1: Emerging Mycotoxin and Emerging Issues », *Toxins*, 15(6), p. 383. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/toxins15060383.

De Silva, A.O. *et al.* (2021) « PFAS Exposure Pathways for Humans and Wildlife: A Synthesis of Current Knowledge and Key Gaps in Understanding », *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(3), p. 631-657. Disponible sur: https://doi.org/10.1002/etc.4935.

Dewapriya, P. *et al.* (2023) « Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in consumer products: Current knowledge and research gaps », *Journal of Hazardous Materials Letters*, 4, p. 100086. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.hazl.2023.100086.

Diallo, T. *et al.* (2023a) « Wide-scope screening of multi-class contaminants in seafood using a novel sample preparation (QuEChUP) procedure coupled with UHPLC-Q-TOF-MS: Application for semi-quantitation of real seafood samples », *Food Chemistry*, 426, p. 136572. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136572.

Diallo, T. *et al.* (2023b) « Wide-scope screening of multi-class contaminants in seafood using a novel sample preparation (QuEChUP) procedure coupled with UHPLC-Q-TOF-MS: Application for semi-quantitation of real seafood samples », *Food Chemistry*, 426, p. 136572. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136572.

Dr Martin Juneau, M. D., F. (2022) « Effets nocifs de l'exposition aux « produits chimiques éternels » sur la santé », *Observatoire de la prévention de l'Institut de Cardiologie de Montréal*, 8 juillet. Disponible sur: https://observatoireprevention.org/2022/07/08/effets-nocifs-de-lexposition-aux-produits-chimiques-eternels-sur-la-sante/ (Consulté le: 16 juillet 2025).

Dubocq, F. *et al.* (2020) « Characterization of the Chemical Contents of Fluorinated and Fluorine-Free Firefighting Foams Using a Novel Workflow Combining Nontarget Screening and Total Fluorine

Analysis », *Environmental Science & Technology*, 54(1), p. 245-254. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05440.

Dürig, W. *et al.* (2023) « What is in the fish? Collaborative trial in suspect and non-target screening of organic micropollutants using LC- and GC-HRMS », *Environment International*, 181, p. 108288. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108288.

Eaton (2008) *Full article: Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment*. Disponible sur: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408440802272158 (Consulté le: 6 août 2025).

EEA (2019) *The unknown territory of chemical risks*. Disponible sur: https://www.eea.europa.eu/en/analysis/maps-and-charts/the-unknown-territory-of-chemical-risks-soer-2020-visuals (Consulté le: 6 septembre 2025).

EEA (2023) *How pesticides impact human health and ecosystems in Europe*, *European Environment Agency*. Disponible sur: https://www.eea.europa.eu/publications/how-pesticides-impact-human-health/how-pesticides-impact-human-health (Consulté le: 5 août 2025).

EFSA (2006) *EFSA evaluates ochratoxin A in food and derives a Tolerable Weekly Intake | EFSA*. Disponible sur: https://www.efsa.europa.eu/en/news/efsa-evaluates-ochratoxin-food-and-derives-tolerable-weekly-intake (Consulté le: 17 août 2025).

EFSA (2007) *Definition and description of "emerging risks" within the EFSA's mandate*. Disponible sur: https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/2021-07/escoemriskdefinition.pdf (Consulté le: 4 septembre 2025).

EFSA (2011) *Zearalenone in food | EFSA*. Disponible sur: https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2197 (Consulté le: 17 août 2025).

EFSA (2018a) *Appropriateness to set a group health-based guidance value for fumonisins and their modified forms | EFSA*. Disponible sur: https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5172 (Consulté le: 17 août 2025).

EFSA (2018b) *Occurrence of residues of fipronil and other acaricides in chicken eggs and poultry muscle/fat | EFSA*. Disponible sur: https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5164 (Consulté le: 18 décembre 2024).

EFSA (2018c) *Risk to human health related to the presence of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid in food | EFSA*. Disponible sur: https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5194 (Consulté le: 29 août 2023).

EFSA, (2020) « Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food », *EFSA Journal*, 18(9), p. e06223. Disponible sur: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6223.

EFSA (2024) *Mycotoxins | EFSA*. Disponible sur: https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins (Consulté le: 17 août 2025).

EFSA, E.F.S. (2023) « Statement concerning the testing strategy and timelines proposed by the applicant for the assessment of the endocrine disruption properties of acibenzolar-S-methyl in the context of the review of the approval of the active substance », *EFSA Journal*, 21(4), p. e07968. Disponible sur: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7968.

EFSA, E.F.S. *et al.* (2025) « 2024 EFSA Annual Report Emerging Risks and Horizon Scanning Activities », *EFSA Supporting Publications*, 22(5), p. 9475E. Disponible sur: https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2025.EN-9475.

EFSA et FAO (2011) « Towards a harmonised Total Diet Study approach: a guidance document », *EFSA Journal*, 9(11), p. 2450. Disponible sur: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2450.

EPA (2019) « Method 533: Determination of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Drinking Water by Isotope Dilution Anion Exchange Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry ».

Escher, B.I. *et al.* (2017) « From the exposome to mechanistic understanding of chemical-induced adverse effects », *Environment International*, 99, p. 97-106. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.029.

EURL POPS (2024) *Guidance Document PFAS V2.0 (incl. Annex V2.0).pdf*. Disponible sur: https://eurl-pops.eu/user/pages/05.news/44.Guidance-Document-PFAS/Guidance%20Document%20PFAS%20V2.0%20(incl.%20Annex%20V2.0).pdf?g-97b04736 (Consulté le: 10 juillet 2025).

European Commission (2010) « Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin », (470).

European Commission (2021a) *COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS*. Disponible sur: https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:a1c34a56-b314-11eb-8aca-01aa75ed71a1.0001.02/DOC_1&format=PDF (Consulté le: 14 août 2025).

European Commission (2021b) « SANTE/11312/2021 ».

European Commission (2022a) *COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2022/1428.pdf*. Disponible sur: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1428 (Consulté le: 29 mai 2024).

European Commission (2022b) *Commission recommendation (EU) 2022/1431 of 24 August 2022 on the monitoring of perfluoroalkyl substances in food*. Disponible sur: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022H1431 (Consulté le: 25 mars 2024).

European Commission (2022c) *Commission regulation (EU) 2022/2388 of 7 December 2022 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of perfluoroalkyl substances in certain foodstuffs*. Disponible sur: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R2388 (Consulté le: 20 mars 2024).

European Commission (2023a) « Commission Implementing Regulation (EU) 2023/2783 of 14 December 2023 laying down the methods of sampling and analysis for the control of the levels of plant toxins in food and repealing Regulation (EU) 2015/705 ».

European Commission (2023b) *COMMISSION REGULATION (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006*. Disponible sur: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915 (Consulté le: 14 août 2025).

European Environment Agency (EEA) (2023) *Emerging chemical risks in Europe — 'PFAS' — European Environment Agency*. Disponible sur: https://www.eea.europa.eu/publications/emerging-chemical-risks-in-europe (Consulté le: 29 août 2023).

European Environment Agency (EEA) (2025) *Mycotoxin exposure in a changing European climate*. Disponible sur: https://www.eea.europa.eu/en/analysis/publications/mycotoxin-exposure-in-a-changing-european-climate (Consulté le: 15 août 2025).

European Medicines Agency (EMA) (2009) *Maximum residue limits (MRL) | European Medicines Agency (EMA)*. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory-overview/research-development-veterinary-medicines/maximum-residue-limits-mrl (Consulté le: 15 août 2025).

European Parliament (2005) *Regulation (EC) N°396/2005.pdf*. Disponible sur: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0396 (Consulté le: 3 décembre 2024).

European Parliament (2020) *DIRECTIVE (EU) 2020/2184 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption*. Disponible sur: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020L2184 (Consulté le: 4 septembre 2025).

Evich, M.G. *et al.* (2022) « Per- and polyfluoroalkyl substances in the environment », *Science*, 375(6580), p. eabg9065. Disponible sur: https://doi.org/10.1126/science.abg9065.

Eze, C.G. *et al.* (2024) « Emerging contaminants in food matrices: An overview of the occurrence, pathways, impacts and detection techniques of per- and polyfluoroalkyl substances », *Toxicology Reports*, 12, p. 436-447. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.03.012.

Fabregat-Palau, J. *et al.* (2025) « Modeling PFAS Sorption in Soils Using Machine Learning », *Environmental Science & Technology*, 59(15), p. 7678-7687. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.4c13284.

Falk, S., Gassmann, M. et Stahl, T. (2024) « Influence of age on the concentrations of perfluoroalkyl acids (PFAA) in the tissues of perch (*Perca fluviatilis*) », *Environmental Pollution*, 359, p. 124512. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124512.

Fan, C. *et al.* (2025) « Ultra-convenient fabrication of low-melting mixture solvent-based defect-rich MOF-808 composite for simultaneous determination of 13 perfluoroalkyl substances in milk powder », *Journal of Food Composition and Analysis*, 147, p. 108049. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.108049.

FAO of the United Nations, WHO et Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Application of Risk Management to Food Safety Matters, I. (1997) *Risk management and food safety : report of a Joint FAO/WHO Consultation, Rome, Italy, 27 to 31 January 1997*. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible sur: http://archive.org/details/riskmanagementfo00food (Consulté le: 15 juillet 2025).

Feng, C. *et al.* (2024) « Suspect, Nontarget Screening, and Toxicity Prediction of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in the Landfill Leachate », *Environmental Science & Technology*, 58(10), p. 4737-4750. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.3c07533.

Figuière, R. *et al.* (2025) « An Overview of Potential Alternatives for the Multiple Uses of Per- and Polyfluoroalkyl Substances », *Environmental Science & Technology*, 59(4), p. 2031-2042. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.4c09088.

Fisher, C.M., Croley, T.R. et Knolhoff, A.M. (2021) « Data processing strategies for non-targeted analysis of foods using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 136, p. 116188. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116188.

Frenich, A.G., Romero-González, R. et del Mar Aguilera-Luiz, M. (2014) « Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 63, p. 158-169. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.020.

Fu, Y. *et al.* (2017) « Nontargeted screening of chemical contaminants and illegal additives in food based on liquid chromatography–high resolution mass spectrometry », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 96, p. 89-98. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.014.

Fujii, Y. *et al.* (2025) « Human exposure and toxicity of per- and polyfluoroalkyl substances: Narrative review and perspectives », *Chemosphere*, 385, p. 144508. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2025.144508.

Gaines, L.G.T., Sinclair, G. et Williams, A.J. (2023) « A proposed approach to defining per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) based on molecular structure and formula », *Integrated Environmental Assessment and Management*, 19(5), p. 1333-1347. Disponible sur: https://doi.org/10.1002/ieam.4735.

Garrido Frenich, A. *et al.* (2010) « Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry », *Analytica Chimica Acta*, 661(2), p. 150-160. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.016.

Gasparini, M. *et al.* (2024) « Sustainable dairy farming and fipronil risk in circular feeds: insights from an Italian case study », *Food Additives & Contaminants: Part A*, 41(12), p. 1582-1593. Disponible sur: https://doi.org/10.1080/19440049.2024.2414954.

Genualdi, S. *et al.* (2022) « Analysis of per- and poly-fluoroalkyl substances (PFAS) in processed foods from FDA's Total Diet Study », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(3), p. 1189-1199. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00216-021-03610-2.

Genualdi, S. *et al.* (2024) « Analyte and matrix method extension of per- and polyfluoroalkyl substances in food and feed », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416(3), p. 627-633. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00216-023-04833-1.

Gilbert-López, B. *et al.* (2010) « Multi-residue determination of pesticides in fruit-based soft drinks by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry », *Talanta*, 81(4), p. 1310-1321. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.026.

Glüge, J. *et al.* (2020) « An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) », *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22(12), p. 2345-2373. Disponible sur: https://doi.org/10.1039/D0EM00291G.

Göbölös, B. *et al.* (2024) « The Cocktail Effects on the Acute Cytotoxicity of Pesticides and Pharmaceuticals Frequently Detected in the Environment », *Toxics*, 12(3), p. 189. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/toxics12030189.

Goli Bi, K. *et al.* (2019) « The first data on the population parameters of the main fish species in man-made Lake Buyo (River Sassandra, Côte d'Ivoire) », *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23(2), p. 585-597. Disponible sur: https://doi.org/10.21608/ejabf.2019.34788.

González-Gaya, B. *et al.* (2022) « Effects of aquaculture waste feeds and antibiotics on marine benthic ecosystems in the Mediterranean Sea », *The Science of the Total Environment*, 806(Pt 2), p. 151190. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151190.

Goss, K.-U. (2008) « The pKa Values of PFOA and Other Highly Fluorinated Carboxylic Acids », *Environmental Science & Technology*, 42(13), p. 5032-5032. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/es8011904.

Goura, R. *et al.* (2024) « An Alternate, Efficient Synthetic Process for a Hemolytic Anemia Drug: Mitapivat Sulfate », *Organic Process Research & Development*, 28(11), p. 4024-4033. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.oprd.4c00319.

Government of France (2024) *Interministerial Plan on PFAS. Ministry of Health and Ministry of Ecology.pdf*. Disponible sur: https://www.ecologie.gouv.fr/sites/default/files/documents/2024.04.05_Plan_PFAS.pdf (Consulté le: 28 avril 2025).

Granby, K. *et al.* (2024) « Per- and poly-fluoroalkyl substances in commercial organic eggs via fishmeal in feed », *Chemosphere*, 346, p. 140553. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140553.

Gray, L.E., Conley, J.M. et Bursian, S.J. (2024) « Dose Addition Models Accurately Predict the Subacute Effects of a Mixture of Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctanoic Acid on Japanese Quail (Coturnix japonica) Chick Mortality », *Environmental Toxicology and Chemistry*, 43(1), p. 97-104. Disponible sur: https://doi.org/10.1002/etc.5758.

Guo, Z. *et al.* (2020) « Recent advances in non-targeted screening analysis using liquid chromatography - high resolution mass spectrometry to explore new biomarkers for human exposure », *Talanta*, 219, p. 121339. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121339.

Hajeb, P. *et al.* (2022a) « Sample preparation techniques for suspect and non-target screening of emerging contaminants », *Chemosphere*, 287, p. 132306. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132306.

Hajeb, P. *et al.* (2022b) « Sample preparation techniques for suspect and non-target screening of emerging contaminants », *Chemosphere*, 287, p. 132306. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132306.

Hamid, H., Li, L.Y. et Grace, J.R. (2020) « Effect of substrate concentrations on aerobic biotransformation of 6:2 fluorotelomer sulfonate (6:2 FTS) in landfill leachate », *Chemosphere*, 261, p. 128108. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128108.

Hedgespeth, M.L. *et al.* (2023) « Ecological characteristics impact PFAS concentrations in a U.S. North Atlantic food web », *Science of The Total Environment*, 880, p. 163302. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163302.

Hensema, T.J., Berendsen, B.J.A. et van Leeuwen, S.P.J. (2021) « Non-targeted identification of per- and polyfluoroalkyl substances at trace level in surface water using fragment ion flagging », *Chemosphere*, 265, p. 128599. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128599.

Hernández, A.F., Gil, F. et Lacasaña, M. (2017) « Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update », *Archives of Toxicology*, 91(10), p. 3211-3223. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00204-017-2043-5.

Herraiz, T. (2004) « Relative exposure to β-carbolines norharman and harman from foods and tobacco smoke », *Food Additives & Contaminants*, 21(11), p. 1041-1050. Disponible sur: https://doi.org/10.1080/02652030400019844.

Iannone, A. *et al.* (2024) « There's Something in What We Eat: An Overview on the Extraction Techniques and Chromatographic Analysis for PFAS Identification in Agri-Food Products », *Foods*, 13(7), p. 1085. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/foods13071085.

Ibor, O.R. *et al.* (2025) « Biomagnification of per-and polyfluoroalkyl substances in aquatic food species from a tropical lagoon ecosystem », *Marine Environmental Research*, 208, p. 107117. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2025.107117.

INRAE (2021) *L'exposome, empreinte des expositions d'une vie | INRAE*. Disponible sur: https://www.inrae.fr/actualites/lexposome-empreinte-expositions-dune-vie (Consulté le: 15 juillet 2025).

IPCS (2004) *IPCS risk assessment terminology*. World Health Organization. Disponible sur: https://iris.who.int/handle/10665/42908 (Consulté le: 21 juillet 2025).

ITAVI (2023) *ITAVI : La consommation d'œufs à domicile entre 2019 et 2022. Evolution et profils des consommateurs*. Disponible sur: https://www.itavi.asso.fr/publications/la-consommation-d-oeufs-a-domicile-entre-2019-et-2022-evolution-et-profils-des-consommateurs?utm_source=chatgpt.com (Consulté le: 7 septembre 2025).

Jahnke, A. et Berger, U. (2009) « Trace analysis of per- and polyfluorinated alkyl substances in various matrices—How do current methods perform? », *Journal of Chromatography A*, 1216(3), p. 410-421. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.098.

Jamari, N.L.A. *et al.* (2019) « Novel non-targeted analysis of perfluorinated compounds using fluorine-specific detection regardless of their ionisability (HPLC-ICPMS/MS-ESI-MS) », *Analytica Chimica Acta*, 1053, p. 22-31. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.11.037.

Jaus, A., Rhyn, P. et Valentini, J. (2023) « Trace Level Analysis of Per- and Polyfluorinated Substances in Fish from Various Regions in Switzerland », *Toxics*, 11(11), p. 909. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/toxics11110909.

Jeannot, C., Macorps, N., Le Bizec, B., *et al.* (2025) « Advancing PFASs monitoring in food: from targeted SPE-LC-MS/MS to non-targeted QuEChERS-LC-HRMS approaches », *Food Chemistry: X*, 29, p. 102674. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102674.

Jeannot, C., Macorps, N., Amziane, A., *et al.* (2025) « High-resolution mass spectrometry for extended PFAS surveillance in food: combining suspect and non-targeted approaches », *Food Chemistry: X*, 29, p. 102843. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102843.

Jeannot, C., Le Bizec, Dervilly, G., *et al.* (2025) « High-throughput QuEChERS–UHPLC-QTOF-MS method for multi-class food residues and contaminants screening: Application to seafood and dairy products », *Food Chemistry* [Preprint].

Jeong, Y. *et al.* (2022) « Occurrence and contamination profile of legacy and emerging per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in Belgian wastewater using target, suspect and non-target screening approaches », *Journal of Hazardous Materials*, 437, p. 129378. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129378.

Joerss, H. et Menger, F. (2023) « The complex 'PFAS world' - How recent discoveries and novel screening tools reinforce existing concerns », *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 40, p. 100775. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2023.100775.

Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission (éd.) (2007) *Principes de travail pour l'analyse des risques en matière de sécurité sanitaire des aliments destinés à être appliqués par les gouvernements*. 1st ed. Rome: World Health Organization : Food and Agriculture Organization of the United Nations (Codex alimentarius).

Kamle, M. *et al.* (2022) « Citrinin Mycotoxin Contamination in Food and Feed: Impact on Agriculture, Human Health, and Detection and Management Strategies », *Toxins*, 14(2), p. 85. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/toxins14020085.

Karlsson, O. (2023) « Chemical safety and the exposome », *Emerging Contaminants*, 9(2), p. 100225. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.emcon.2023.100225.

Kaufmann, A. (2012) « The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(5), p. 1233-1249. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00216-011-5629-4.

Kaufmann, A. *et al.* (2022) « Simplifying Nontargeted Analysis of PFAS in Complex Food Matrixes », *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 105(5), p. 1280-1287. Disponible sur: https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsac071.

Kesic, R. *et al.* (2023) « Perfluoroalkyl Substances in Seabird Eggs from Canada's Pacific Coast: Temporal Trends (1973–2019) and Interspecific Patterns », *Environmental Science & Technology*, 57(29), p. 10792-10803. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.3c02965.

Khalid, N.K. *et al.* (2024) « Occurrence of 80 per and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) in muscle and liver tissues of marine mammals of the St. Lawrence Estuary and Gulf, Quebec, Canada », *Frontiers in Environmental Chemistry*, 5. Disponible sur: https://doi.org/10.3389/fenvc.2024.1403728.

Khalifa, H.O. *et al.* (2024) « Veterinary Drug Residues in the Food Chain as an Emerging Public Health Threat: Sources, Analytical Methods, Health Impacts, and Preventive Measures », *Foods*, 13(11), p. 1629. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/foods13111629.

Khan, N.A. *et al.* (2023) « A state-of-art-review on emerging contaminants: Environmental chemistry, health effect, and modern treatment methods », *Chemosphere*, 344, p. 140264. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140264.

Kienzler, A. *et al.* (2016) « Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 80, p. 321-334. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.05.020.

Kim, H.-Y., Lee, I.-S. et Oh, J.-E. (2017) « Human and veterinary pharmaceuticals in the marine environment including fish farms in Korea », *The Science of the Total Environment*, 579, p. 940-949. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.039.

Kim, L. *et al.* (2019) « Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals », *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 22, p. e00063. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00063.

Knolhoff, A.M. et Fisher, C.M. (2021) « Strategies for data reduction in non-targeted screening analysis: The impact of sample variability for food safety applications », *Food Chemistry*, 350, p. 128540. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128540.

Koelmel, J.P. *et al.* (2020) « Toward Comprehensive Per- and Polyfluoroalkyl Substances Annotation Using FluoroMatch Software and Intelligent High-Resolution Tandem Mass Spectrometry Acquisition », *Analytical Chemistry*, 92(16), p. 11186-11194. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01591.

Koelmel, J.P. *et al.* (2022) « FluoroMatch 2.0—making automated and comprehensive non-targeted PFAS annotation a reality », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(3), p. 1201-1215. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00216-021-03392-7.

Koloka, O. *et al.* (2025) « PFAS residue analysis in fish and fish feed by applying a modified QuEChERS method in combination with LC-HRMS detection », *Emerging Contaminants*, 11(2), p. 100467. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.emcon.2025.100467.

Konan, Y.J.R. *et al.* (2025) « Challenges and lessons from a vector control campaign targeting Glossina palpalis palpalis in an isolated protected forest area in Abidjan, Côte d'Ivoire », *Parasite*, 32, p. 25. Disponible sur: https://doi.org/10.1051/parasite/2025017.

Kouassi, B. *et al.* (2004) « Profil épidémiologique et microbiologique des malades tuberculeux en situation d'échec ou de rechute à Abidjan. »

Lacina, O. *et al.* (2011) « Simple, high throughput ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry trace analysis of perfluorinated alkylated substances in food of animal origin: Milk and fish », *Journal of Chromatography A*, 1218(28), p. 4312-4321. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.061.

Lai, Y. *et al.* (2024) « High-Resolution Mass Spectrometry for Human Exposomics: Expanding Chemical Space Coverage », *Environmental Science & Technology*, 58(29), p. 12784-12822. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.4c01156.

Lankova, D. *et al.* (2013) « The determination of perfluoroalkyl substances, brominated flame retardants and their metabolites in human breast milk and infant formula », *Talanta*, 117, p. 318-325. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.040.

Le Monde (2024a) « Les députés votent une première interdiction des « polluants éternels », mais épargnent les ustensiles de cuisine », 4 avril. Disponible sur: https://www.lemonde.fr/planete/article/2024/04/04/les-deputes-votent-une-interdiction-des-polluants-eternels-sauf-dans-les-ustensiles-alimentaires_6226016_3244.html (Consulté le: 7 septembre 2025).

Le Monde (2024b) « Pesticides : la France continue à exporter des substances interdites… qui reviennent ensuite dans les fruits et légumes importés », 24 septembre. Disponible sur: https://www.lemonde.fr/planete/article/2024/09/24/pesticides-la-france-continue-a-exporter-des-substances-interdites-qui-reviennent-dans-l-assiette-des-francais_6330678_3244.html (Consulté le: 4 septembre 2025).

Lehotay, S.J. *et al.* (2010) « Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables », *Journal of Chromatography A*, 1217(16), p. 2548-2560. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044.

Lenka, S.P., Kah, M. et Padhye, L.P. (2022) « Occurrence and fate of poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) in urban waters of New Zealand », *Journal of Hazardous Materials*, 428, p. 128257. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128257.

Léon, A. *et al.* (2019) « HaloSeeker 1.0: A User-Friendly Software to Highlight Halogenated Chemicals in Nontargeted High-Resolution Mass Spectrometry Data Sets », *Analytical Chemistry*, 91(5), p. 3500-3507. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05103.

Leong, M.-I., Fuh, M.-R. et Huang, S.-D. (2014) « Beyond dispersive liquid–liquid microextraction », *Journal of Chromatography A*, 1335, p. 2-14. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.021.

Lescord, G.L. *et al.* (2015) « Perfluorinated and Polyfluorinated Compounds in Lake Food Webs from the Canadian High Arctic », *Environmental Science & Technology*, 49(5), p. 2694-2702. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/es5048649.

Li, X. *et al.* (2020) « Determination of residual fipronil and its metabolites in food samples: A review », *Trends in Food Science & Technology*, 97, p. 185-195. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.018.

Li, X. *et al.* (2023) « Non-targeted analysis for the screening and semi-quantitative estimates of per- and polyfluoroalkyl substances in water samples from South Florida environments », *Journal of Hazardous Materials*, 452, p. 131224. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131224.

Li, X. *et al.* (2024) « Comprehensive review of emerging contaminants: Detection technologies, environmental impact, and management strategies », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 278, p. 116420. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116420.

Liang et al. (2019) « Fipronil residues and risk assessment of Chinese marketed fruits and vegetables: A long-term investigation over 6 years | Request PDF », *ResearchGate* [Preprint]. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106734.

Liang, S.-H., Steimling, J.A. et Chang, M. (2023) « Analysis of ultrashort-chain and short-chain (C1 to C4) per- and polyfluorinated substances in potable and non-potable waters », *Journal of Chromatography Open*, 4, p. 100098. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2023.100098.

Linke, F. *et al.* (2021) « Sources and pathways of biocides and their transformation products in urban storm water infrastructure of a 2 ha urban district », *Hydrology and Earth System Sciences*, 25(8), p. 4495-4512. Disponible sur: https://doi.org/10.5194/hess-25-4495-2021.

Liu, T. *et al.* (2022) « Non-target and target screening of per- and polyfluoroalkyl substances in landfill leachate and impact on groundwater in Guangzhou, China », *Science of The Total Environment*, 844, p. 157021. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157021.

Liu, T. *et al.* (2025) « Efficient extraction of perfluoroalkyl carboxylic acids from food samples using a fluorinated magnetic metal-organic framework adsorbent », *Food Chemistry*, 492, p. 145624. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.145624.

Liu, X. *et al.* (2023) « 6:2 Chlorinated Polyfluoroalkyl Ether Sulfonates Exert Stronger Thyroid Homeostasis Disruptive Effects in Newborns than Perfluorooctanesulfonate: Evidence Based on Bayesian Benchmark Dose Values from a Population Study », *Environmental Science & Technology*, 57(31), p. 11489-11498. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.3c03952.

Liu, Y. *et al.* (2018) « Nontarget Mass Spectrometry Reveals New Perfluoroalkyl Substances in Fish from the Yangtze River and Tangxun Lake, China », *Environmental Science & Technology*, 52(10), p. 5830-5840. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00779.

Liu, Y. *et al.* (2019) « High-resolution mass spectrometry (HRMS) methods for nontarget discovery and characterization of poly- and per-fluoroalkyl substances (PFASs) in environmental and human samples », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 121, p. 115420. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.021.

Liu, Y., Pereira, A.D.S. et Martin, J.W. (2015) « Discovery of C5–C17 Poly- and Perfluoroalkyl Substances in Water by In-Line SPE-HPLC-Orbitrap with In-Source Fragmentation Flagging », *Analytical Chemistry*, 87(8), p. 4260-4268. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00039.

Lydie, K.K. *et al.* (2022) « Status of Contamination of the Jawfish (Chrysichthys nigrodigitatus, (Lapécède, (1803)) by Organophosphorus Residues in the Hydroelectric Dams of Faé, Kossou and Taabo (Ivory Coast) », *Asian Journal of Physical and Chemical Sciences*, 10(3), p. 35-44.

MacLean, B. *et al.* (2010) « Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments », *Bioinformatics*, 26(7), p. 966-968. Disponible sur: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054.

Makni, Y. *et al.* (2022) « Improving the monitoring of multi-class pesticides in baby foods using QuEChERS-UHPLC-Q-TOF with automated identification based on MS/MS similarity algorithms », *Food Chemistry*, 395, p. 133573. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133573.

Makni, Y. *et al.* (2024) « A proof-of-concept study on the versatility of liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry to screen for various contaminants and highlight markers of floral and geographical origin for different honeys », *Food Chemistry*, 436, p. 137720. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137720.

Manimekalai, M. *et al.* (2019) « Development, Optimization, and Validation of Methods for Quantification of Veterinary Drug Residues in Complex Food Matrices Using Liquid-Chromatography—A Review », *Food Analytical Methods*, 12. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s12161-019-01512-9.

Manz, K.E. *et al.* (2023) « Non-targeted analysis (NTA) and suspect screening analysis (SSA): a review of examining the chemical exposome », *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 33(4), p. 524-536. Disponible sur: https://doi.org/10.1038/s41370-023-00574-6.

Martínez Vidal, J.L. *et al.* (2009) « Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods », *Journal of Chromatography A*, 1216(40), p. 6767-6788. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.013.

Masinga, P. *et al.* (2024) « Emerging organic contaminants in the soil–plant-receptor continuum: transport, fate, health risks, and removal mechanisms », *Environmental Monitoring and Assessment*, 196(4), p. 367. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s10661-023-12282-7.

McCord, J. et Strynar, M. (2019) « Identification of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in the Cape Fear River by High Resolution Mass Spectrometry and Nontargeted Screening », *Environmental Science & Technology*, 53(9), p. 4717-4727. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06017.

McDonough, C.A., Guelfo, J.L. et Higgins, C.P. (2019) « Measuring total PFASs in water: The tradeoff between selectivity and inclusivity », *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 7, p. 13-18. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.08.005.

Melnyk, L.J. *et al.* (2024) « One Health assessment of persistent organic chemicals and PFAS for consumption of restored anadromous fish », *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 34(6), p. 1035-1044. Disponible sur: https://doi.org/10.1038/s41370-023-00620-3.

Meng, P., DeStefano, N.J. et Knappe, D.R.U. (2022) « Extraction and Matrix Cleanup Method for Analyzing Novel Per- and Polyfluoroalkyl Ether Acids and Other Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Fruits and Vegetables », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(16), p. 4792-4804. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07665.

Metz, T.O. *et al.* (2017) « Integrating Ion Mobility Spectrometry Into Mass Spectrometry-Based Exposome Measurements: What Can it Add and How Far Can it Go? », *Bioanalysis*, 9(1), p. 81-98. Disponible sur: https://doi.org/10.4155/bio-2016-0244.

Meyyazhagan, A. *et al.* (2023) « Nutrition paves the way to environmental toxicants and influences fetal development during pregnancy », *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 89, p. 102351. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2023.102351.

Miao, H.-F. *et al.* (2015) « Degradation of phenazone in aqueous solution with ozone: Influencing factors and degradation pathways », *Chemosphere*, 119, p. 326-333. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.082.

Mitchell, C.A. *et al.* (2019) « Diphenyl Phosphate-Induced Toxicity During Embryonic Development », *Environmental Science & Technology*, 53(7), p. 3908-3916. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07238.

Mnif et al. (2011) *Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review*. Disponible sur: https://www.mdpi.com/1660-4601/8/6/2265 (Consulté le: 4 septembre 2025).

Moretti, S. *et al.* (2024) « Occurrence and pattern of legacy and emerging per- and Poly-FluoroAlkyl substances (PFAS) in eggs of loggerhead turtle *Caretta caretta* from western Mediterranean », *Environmental Pollution*, 343, p. 123257. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.123257.

Mostafalou et Abdollahi (2017) *Pesticides: an update of human exposure and toxicity | Archives of Toxicology*. Disponible sur: https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-016-1849-x (Consulté le: 5 août 2025).

Mu, H. *et al.* (2024) « Suspect and nontarget screening of per- and polyfluoroalkyl substances based on ion mobility mass spectrometry and machine learning techniques », *Journal of Hazardous Materials*, 461, p. 132669. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132669.

Naidu, R. *et al.* (2021) « Chemical pollution: A growing peril and potential catastrophic risk to humanity », *Environment International*, 156, p. 106616. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106616.

Nakayama, S.F. *et al.* (2019) « Worldwide trends in tracing poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) in the environment », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 121, p. 115410. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.011.

Nason, S.L. *et al.* (2021) « Software Comparison for Nontargeted Analysis of PFAS in AFFF-Contaminated Soil », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 32(4), p. 840-846. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/jasms.0c00261.

Nason, S.L. *et al.* (2025) « Communicating with Stakeholders to Identify High-Impact Research Directions for Non-Targeted Analysis », *Analytical Chemistry*, 97(5), p. 2567-2578. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c04801.

N'dohou, E.H.N. *et al.* (2023) « Spatial and seasonal distribution of pesticides in the waters of Azagny area (Grand Lahou, Cote d'Ivoire) », *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(5), p. 626. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s10661-023-11179-9.

Nerín, C. *et al.* (2022) « Guidance in selecting analytical techniques for identification and quantification of non-intentionally added substances (NIAS) in food contact materials (FCMS) », *Food Additives & Contaminants: Part A*, 39(3), p. 620-643. Disponible sur: https://doi.org/10.1080/19440049.2021.2012599.

Ng, C. *et al.* (2021) « Addressing Urgent Questions for PFAS in the 21st Century », *Environmental Science & Technology*, 55(19), p. 12755-12765. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03386.

Nickerson, A. *et al.* (2020) « Enhanced Extraction of AFFF-Associated PFASs from Source Zone Soils », *Environmental Science & Technology*, 54(8), p. 4952-4962. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00792.

Nicolopoulou-Stamati, P. *et al.* (2016) « Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture », *Frontiers in Public Health*, 4. Disponible sur: https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148.

Nilsen, E. *et al.* (2024) « Target and suspect *per*- and polyfluoroalkyl substances in fish from an AFFF-impacted waterway », *Science of The Total Environment*, 906, p. 167798. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167798.

Nobile, M. *et al.* (2024) « Occurrence of perfluoroalkyl substances in canned tuna and their impact on food safety », *Food Control*, 159, p. 110301. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110301.

Ntzani, E.E. *et al.* (2013) « Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects », *EFSA Supporting Publications*, 10(10), p. 497E. Disponible sur: https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2013.EN-497.

OECD (2013) *OECD/UNEP Global PFC Group, Synthesis paper on per- and polyfluorinated chemicals (PFCs), Environment, Health and Safety, Environment Directorate, OECD*. Disponible sur: https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-management/synthesis-paper-on-per-and-polyfluorinated-chemicals.htm (Consulté le: 17 avril 2023).

OECD (2018) *Summary report on the new comprehensive global database of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs), OECD Series on Risk Management of Chemicals, OECD Publishing, Paris*, *OECD*. Disponible sur: https://doi.org/10.1787/1a14ad6c-en (Consulté le: 11 juin 2025).

OECD (2019) *Pharmaceutical Residues in Freshwater: Hazards and Policy Responses*. OECD (OECD Studies on Water). Disponible sur: https://doi.org/10.1787/c936f42d-en.

O'Flynn, D. *et al.* (2021) « A review of pharmaceutical occurrence and pathways in the aquatic environment in the context of a changing climate and the COVID-19 pandemic », *Analytical Methods*, 13(5), p. 575-594. Disponible sur: https://doi.org/10.1039/D0AY02098B.

Ogunbiyi, O.D. *et al.* (2023) « Analytical approaches for screening of per- and poly fluoroalkyl substances in food items: A review of recent advances and improvements », *Environmental Pollution*, 329, p. 121705. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121705.

Okuthe, G.E., Dube, E. et Mafunda, P.S. (2025) « Effects of Pharmaceuticals and Endocrine-Disrupting Chemicals on Reproductive Biology of Aquatic Fauna: Penguins as Sentinel Species », *Journal of Xenobiotics*, 15(4), p. 110. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/jox15040110.

Olasupo, A., Corbin, D.R. et Shiflett, M.B. (2024) « Trends in low temperature and non-thermal technologies for the degradation of persistent organic pollutants », *Journal of Hazardous Materials*, 468, p. 133830. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133830.

Oltmanns, J. *et al.* (2019) « Final Report: Applying a tested procedure for the identification of potential emerging chemical risks in the food chain to the substances registered under REACH - REACH 2: External scientific report. OC/EFSA/SCER/2016/01-CT1 », *EFSA Supporting Publications*, 16. Disponible sur: https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1597.

Ouattara et al. (2021) *Assessment of Phytosanitary Practices in Peri-Urban Agriculture and Associated Environmental and Health Impacts in Developing Countries: Case of Abengourou City (Côte d'Ivoire)*. Disponible sur: https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=110143 (Consulté le: 4 septembre 2025).

Ouro-Sama, K. *et al.* (2021) « Spatial and seasonal variation of trace elements contamination in the sediments of a tropical lagoon ecosystem: the Lake Togo-Lagoon of Aného complex (southern Togo) », *Environmental Earth Sciences*, 80(4), p. 154. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s12665-021-09390-3.

Ozaki, S. *et al.* (2025) « Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and heavy metals in the egg of peregrine falcon (Falco peregrinus) populations in West England, United Kingdom ». Research Square. Disponible sur: https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-6681039/v1.

Padioleau, A. (2024) *Exploration du concept d'espèce sentinelle pour une meilleure caractérisation de l'exposome chimique de l'Homme : application à la détection de contaminants halogénés émergents dans la chaîne alimentaire*. These de doctorat. Nantes, Ecole nationale vétérinaire. Disponible sur: https://theses.fr/2024ONIR192F (Consulté le: 4 septembre 2025).

PAN Europe (2020) *Report_Banned pesticides in EU food_Final.pdf*. Disponible sur: https://www.pan-europe.info/sites/pan-europe.info/files/public/resources/press-releases/PR%20with%20LIFE%20logo/Report_Banned%20pesticides%20in%20EU%20food_Final.pdf?utm_source=chatgpt.com (Consulté le: 27 juin 2025).

PAN Europe (2025) *Spain exported 17,000 tons of pesticides banned in the EU in one year*, *PAN Europe*. Disponible sur: https://www.pan-europe.info/blog/spain-exported-17000-tons-pesticides-banned-eu-one-year (Consulté le: 4 septembre 2025).

Pan, Y. *et al.* (2020) « Analysis of emerging per- and polyfluoroalkyl substances: Progress and current issues », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124, p. 115481. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.013.

Panieri, E. *et al.* (2022) « PFAS Molecules: A Major Concern for the Human Health and the Environment », *Toxics*, 10(2), p. 44. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/toxics10020044.

Paugy (2003) *The Fresh and Brackish Water Fishes of West Africa, vols 1 & 2 - Scientific Publications of the Muséum national d'Histoire naturelle, Paris*. Disponible sur: https://sciencepress.mnhn.fr/en/collections/faune-et-flore-tropicales/poissons-d-eaux-douces-et-saumatres-de-l-afrique-de-l-ouest-vol-1-2 (Consulté le: 4 septembre 2025).

Persson, L. *et al.* (2022) « Outside the Safe Operating Space of the Planetary Boundary for Novel Entities », *Environmental Science & Technology*, 56(3), p. 1510-1521. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04158.

Peters, R.J.B. *et al.* (2009) « Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, 1216(46), p. 8206-8216. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.027.

Pignotti, E. *et al.* (2017) « Seasonal variations in the occurrence of perfluoroalkyl substances in water, sediment and fish samples from Ebro Delta (Catalonia, Spain) », *Science of The Total Environment*, 607-608, p. 933-943. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.025.

Polder, A. *et al.* (2016) « Dioxins, PCBs, chlorinated pesticides and brominated flame retardants in free-range chicken eggs from peri-urban areas in Arusha, Tanzania: Levels and implications for human health », *Science of The Total Environment*, 551-552, p. 656-667. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.021.

Popli, S. *et al.* (2022) « Persistent organic pollutants in foods, their interplay with gut microbiota and resultant toxicity », *Science of The Total Environment*, 832, p. 155084. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155084.

Pourchet, M. *et al.* (2020) « Suspect and non-targeted screening of chemicals of emerging concern for human biomonitoring, environmental health studies and support to risk assessment: From promises to challenges and harmonisation issues », *Environment International*, 139, p. 105545. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105545.

Powley, C.R. *et al.* (2008) « Polyfluorinated chemicals in a spatially and temporally integrated food web in the Western Arctic », *Chemosphere*, 70(4), p. 664-672. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.067.

Prosperini, A. *et al.* (2017) « A Review of the Mycotoxin Enniatin B », *Frontiers in Public Health*, 5, p. 304. Disponible sur: https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00304.

Rajski, Ł. *et al.* (2021) « Improving the simultaneous target and non-target analysis LC-amenable pesticide residues using high speed Orbitrap mass spectrometry with combined multiple acquisition modes », *Talanta*, 228, p. 122241. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122241.

Rappaport and Smith (2010) *Epidemiology. Environment and Disease Risks'. Science 330 (6003): 460–61*. Disponible sur: https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.1192603?casa_token=cuZ5KseenT0AAAAA%3AK-

pG7NKBGWi-WyENCka0DKBOdmST3z3waqpqJ_10Fuxehl1ZLYrk3M94l-5eDAok7cIYnlkVlxTE6Q (Consulté le: 18 juillet 2025).

Ren, J. *et al.* (2022) « Suspect Screening and Nontargeted Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in a Lake Ontario Food Web », *Environmental Science & Technology*, 56(24), p. 17626-17634. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.2c04321.

Renai, L. *et al.* (2022) « Development of a comprehensive two-dimensional liquid chromatographic mass spectrometric method for the non-targeted identification of poly- and perfluoroalkyl substances in aqueous film-forming foams », *Analytica Chimica Acta*, 1232, p. 340485. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340485.

Riaz, R. *et al.* (2024) « First insights into per-and polyfluoroalkyl substance contamination in edible fish species of the Indus water system of Pakistan », *Chemosphere*, 349, p. 140970. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140970.

Righetti, L. *et al.* (2016) « Recent Advances and Future Challenges in Modified Mycotoxin Analysis: Why HRMS Has Become a Key Instrument in Food Contaminant Research », *Toxins*, 8(12), p. 361. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/toxins8120361.

Rivière, G. *et al.* (2014) « Food risk assessment for perfluoroalkyl acids and brominated flame retardants in the French population: Results from the second French total diet study », *Science of The Total Environment*, 491-492, p. 176-183. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.104.

Roberts, J., McNaughtan, M. et de las Heras Prieto, H. (2023) « Unwanted Ingredients—Highly Specific and Sensitive Method for the Extraction and Quantification of PFAS in Everyday Foods », *Food Analytical Methods*, 16(5), p. 857-866. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s12161-023-02451-2.

Rockström, J. *et al.* (2009) « A safe operating space for humanity », *Nature*, 461(7263), p. 472-475. Disponible sur: https://doi.org/10.1038/461472a.

Romero, A. *et al.* (2016) « Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants », *Toxicology Letters*, 252, p. 42-49. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.04.005.

Roviaro, A. *et al.* (2025) « A Method for Determining PFAS in Bovine Meat and Tuna Fish by UHPLC-HRMS Orbitrap », *Journal of mass spectrometry: JMS*, 60(7), p. e5151. Disponible sur: https://doi.org/10.1002/jms.5151.

Ruan, T. et Jiang, G. (2017) « Analytical methodology for identification of novel per- and polyfluoroalkyl substances in the environment », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 95, p. 122-131. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.024.

Ruffle, B. *et al.* (2020) « Perfluoroalkyl Substances in U.S. market basket fish and shellfish », *Environmental Research*, 190, p. 109932. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109932.

Rushing, R. *et al.* (2023) « Occurrence of Per- and Polyfluoroalkyl Substance Contamination of Food Sources and Aquaculture Organisms Used in Aquatic Laboratory Experiments », *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(7), p. 1463-1471. Disponible sur: https://doi.org/10.1002/etc.5624.

Sadighara, P. *et al.* (2024) « Optimization of clean-up in QuEChERS method for extraction of mycotoxins in food samples: A systematic review », *Microchemical Journal*, 197, p. 109711. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109711.

Salangad, O. *et al.* (2025) « Occurrence and patterns of legacy and emerging per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in bones of white-beaked dolphin (*Lagenorhynchus albirostris*) using target, suspect, and non-target screening », *Environmental Research*, 283, p. 122114. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.122114.

Samal, K., Mahapatra, S. et Hibzur Ali, M. (2022) « Pharmaceutical wastewater as Emerging Contaminants (EC): Treatment technologies, impact on environment and human health », *Energy Nexus*, 6, p. 100076. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100076.

Sanchez, J.M. et Tautenhahn, R. (2023) « A comprehensive software workflow for non-targeted analysis of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) by high-resolution mass spectrometry (HRMS) ». Disponible sur: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-001826-lsms-pfas-analysis-workflow-compound-discoverer-an001826-na-en.pdf.

Santana-Mayor, Á. *et al.* (2019) « Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, p. 214-235. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.018.

Sapozhnikova, Y. *et al.* (2025) « Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) accumulation in fish occupying different trophic positions from East Canyon Creek, a seasonally effluent-dominated river, Utah, USA », *Environmental Research*, 266, p. 120480. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.120480.

Scholz, S. *et al.* (2022) « The Eco-Exposome Concept: Supporting an Integrated Assessment of Mixtures of Environmental Chemicals », *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(1), p. 30-45. Disponible sur: https://doi.org/10.1002/etc.5242.

Schymanski, E.L. *et al.* (2014) « Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence », *Environmental Science & Technology*, 48(4), p. 2097-2098. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/es5002105.

Schymanski, E.L. *et al.* (2023) « Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in PubChem: 7 Million and Growing », *Environmental Science & Technology*, 57(44), p. 16918-16928. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.3c04855.

Serafimov, K. *et al.* (2024) « Solving the retention time repeatability problem of hydrophilic interaction liquid chromatography », *Journal of Chromatography A*, 1730, p. 465060. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465060.

Shafer, T.J., Meyer, D.A. et Crofton, K.M. (2005) « Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs », *Environmental Health Perspectives*, 113(2), p. 123-136. Disponible sur: https://doi.org/10.1289/ehp.7254.

Shaw, I.C. (2014) « Chemical residues, food additives and natural toxicants in food – the cocktail effect », *International Journal of Food Science and Technology*, 49(10), p. 2149-2157. Disponible sur: https://doi.org/10.1111/ijfs.12606.

Silva, V. *et al.* (2019) « Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded », *Science of The Total Environment*, 653, p. 1532-1545. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441.

Soudani, M. *et al.* (2024) « Determination of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in six different fish species from Swiss lakes », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416(28), p. 6377-6386. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00216-024-05524-1.

Squadrone, S. *et al.* (2015) « Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA): emerging contaminants of increasing concern in fish from Lake Varese, Italy », *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(7), p. 438. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s10661-015-4686-0.

Steeves, K., Cahill, L.S. et Jobst, K.J. (2024) « Emerging perfluoroalkyl substances in environmental waters revealed by non-targeted screening », *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 37, p. 100531. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.coesh.2024.100531.

Stockholm Convention (2024) *Listing of POPs in the Stockholm Convention*. Disponible sur: https://www.pops.int/TheConvention/ThePOPs/AllPOPs/tabid/2509/Default.aspx (Consulté le: 7 août 2025).

Stroski, K.M. *et al.* (2024) « Non-targeted analysis of per- and polyfluorinated substances in consumer food packaging », *Chemosphere*, 360, p. 142436. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142436.

Stroski, K.M. et Sapozhnikova, Y. (2023) « Analysis of per- and polyfluoroalkyl substances in plastic food storage bags by different analytical approaches », *Journal of Chromatography Open*, 4, p. 100106. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2023.100106.

Szabo, D. *et al.* (2024) « Online and Offline Prioritization of Chemicals of Interest in Suspect Screening and Non-targeted Screening with High-Resolution Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 96(9), p. 3707-3716. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c05705.

Sznajder-Katarzyńska, K. *et al.* (2018) « The perfluoroalkyl substances (PFASs) contamination of fruits and vegetables », *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(9), p. 1776-1786. Disponible sur: https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1502477.

Tahoun, U. (2023) « Chapter 14 - Microbial pollution in African lakes », in M. El-Sheekh et H.E. Elsaied (éd.) *Lakes of Africa*. Elsevier, p. 403-427. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95527-0.00006-3.

Tajvidi, M. (2023) « PFAS (per- and polyfluoroalkyl substance)-free molded fiber: The future is already here », *Biointerphases*, 18(4), p. 048501. Disponible sur: https://doi.org/10.1116/6.0002756.

Taliantzis, K. et Ellinas, K. (2025) « Green hydrophobic and superhydrophobic coatings and surfaces for water related applications: A review », *Advances in Colloid and Interface Science*, 343, p. 103566. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.cis.2025.103566.

Taniyasu, S. *et al.* (2003) « A Survey of Perfluorooctane Sulfonate and Related Perfluorinated Organic Compounds in Water, Fish, Birds, and Humans from Japan », *Environmental Science & Technology*, 37(12), p. 2634-2639. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/es0303440.

Tasselli et al. (2023) *Legacy Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) Pollution in a River Ecosystem: Sediment Contamination and Bioaccumulation in Benthic Invertebrates*. Disponible sur: https://www.mdpi.com/2071-1050/15/8/6493 (Consulté le: 4 septembre 2025).

Taylor, R.B. et Sapozhnikova, Y. (2022) « Comparison and validation of the QuEChERSER mega-method for determination of per- and polyfluoroalkyl substances in foods by liquid chromatography with high-resolution and triple quadrupole mass spectrometry », *Analytica Chimica Acta*, 1230, p. 340400. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340400.

Teunen, L. *et al.* (2021) « PFAS accumulation in indigenous and translocated aquatic organisms from Belgium, with translation to human and ecological health risk », *Environmental Sciences Europe*, 33(1), p. 39. Disponible sur: https://doi.org/10.1186/s12302-021-00477-z.

Tian, L. *et al.* (2020) « Non-targeted screening of plastic-related chemicals in food collected in Montreal, Canada », *Food Chemistry*, 326, p. 126942. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126942.

T. Miaz, L. *et al.* (2020) « Temporal trends of suspect- and target-per/polyfluoroalkyl substances (PFAS), extractable organic fluorine (EOF) and total fluorine (TF) in pooled serum from first-time mothers in Uppsala, Sweden, 1996–2017 », *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22(4), p. 1071-1083. Disponible sur: https://doi.org/10.1039/C9EM00502A.

Tolonen, H. *et al.* (2022) « Health information for human biomonitoring studies », *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 246, p. 114051. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114051.

TradeImex (2023) *What Country is the Leading Producer of Chemicals: Chemical Exports by Country*, *Infinite*. Disponible sur: https://www.tradeimex.in/blogs/what-country-producer-of-chemicals (Consulté le: 5 septembre 2025).

UNEP (2019) *Global Chemicals Outlook II: From Legacies to Innovative Solutions | UNEP - UN Environment Programme*. Disponible sur: https://www.unep.org/resources/report/global-chemicals-outlook-ii-legacies-innovative-solutions (Consulté le: 28 août 2025).

US EPA, O. (2025) *EPA EcoBox Tools by Exposure Pathways - Exposure Pathways In ERA*. Disponible sur: https://www.epa.gov/ecobox/epa-ecobox-tools-exposure-pathways-exposure-pathways-era (Consulté le: 7 septembre 2025).

Valsecchi, S., Rusconi, M. et Polesello, S. (2013) « Determination of perfluorinated compounds in aquatic organisms: a review », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(1), p. 143-157. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00216-012-6492-7.

Van Leeuw, V. *et al.* (2024) « Per- and polyfluoroalkyl substances in food and beverages: determination by LC-HRMS and occurrence in products from the Belgian market », *Chemosphere*, 366, p. 143543. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143543.

Vázquez Loureiro, P. *et al.* (2024) « Identification and quantification of per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) migrating from food contact materials (FCM) », *Chemosphere*, 360, p. 142360. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142360.

Vergauwen, G. *et al.* (2017) « Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research », *Scientific Reports*, 7, p. 2704. Disponible sur: https://doi.org/10.1038/s41598-017-02599-y.

Villar-Pulido, M. *et al.* (2011) « Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry », *Talanta*, 85(3), p. 1419-1427. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.036.

Wang, B., Xie, K. et Lee, K. (2021) « Veterinary Drug Residues in Animal-Derived Foods: Sample Preparation and Analytical Methods », *Foods*, 10(3), p. 555. Disponible sur: https://doi.org/10.3390/foods10030555.

Wang, X. *et al.* (2020) « Non-target and suspect screening of per- and polyfluoroalkyl substances in Chinese municipal wastewater treatment plants », *Water Research*, 183, p. 115989. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115989.

Wang, Y. *et al.* (2024) « Fast analysis of short-chain and ultra-short-chain fluorinated organics in water by on-line extraction coupled to HPLC-HRMS », *Science of The Total Environment*, 943, p. 173682. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173682.

Wang, Y.-Q. *et al.* (2022) « Per- and polyfluoralkyl substances (PFAS) in drinking water system: Target and non-target screening and removal assessment », *Environment International*, 163, p. 107219. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107219.

Wang, Z. *et al.* (2021) « A New OECD Definition for Per- and Polyfluoroalkyl Substances », *Environmental Science & Technology*, 55(23), p. 15575-15578. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06896.

Whenu et al. (2018) *Morphometric and meristic characteristics of silver catfish Chrysichthys nigrodigitatus (Lacepède, 1803) (Siluriformes: Claroteidae) from Epe Lagoon, Lagos, Southwest Nigeria | Brazilian Journal of Biological Sciences*. Disponible sur: https://www.bjbs.com.br/index.php/bjbs/article/view/296 (Consulté le: 4 septembre 2025).

WHO (2011) *WHO Human Health Risk Assessment Toolkit: Chemical Hazards*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization.

WHO et FAO (2008) « Consultations and workshops : dietary exposure assessment of chemicals in food : report of a joint FAO/WHO consultation, Annapolis, Maryland, USA, 2-6 May 2005 », p. 80.

Wild (2005) *Complementing the Genome with an "Exposome": The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology | Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention | American Association for Cancer Research*. Disponible sur: https://aacrjournals.org/cebp/article/14/8/1847/258124/Complementing-the-Genome-with-an-Exposome-The (Consulté le: 18 juillet 2025).

Wild (2012) *The exposome: from concept to utility | International Journal of Epidemiology | Oxford Academic*. Disponible sur: https://academic.oup.com/ije/article/41/1/24/650703 (Consulté le: 18 juillet 2025).

Wilkinson, J.L. *et al.* (2018) « Spatial (bio)accumulation of pharmaceuticals, illicit drugs, plasticisers, perfluorinated compounds and metabolites in river sediment, aquatic plants and benthic organisms », *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 234, p. 864-875. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.090.

Wilkowska, A. et Biziuk, M. (2011) « Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology », *Food Chemistry*, 125(3), p. 803-812. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.094.

Winchell, L.J. *et al.* (2021) « Analyses of *per*- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) through the urban water cycle: Toward achieving an integrated analytical workflow across aqueous, solid, and gaseous matrices in water and wastewater treatment », *Science of The Total Environment*, 774, p. 145257. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145257.

Xing, Y. *et al.* (2023) « The sources and bioaccumulation of per- and polyfluoroalkyl substances in animal-derived foods and the potential risk of dietary intake », *Science of The Total Environment*, 905, p. 167313. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167313.

Yang, H. *et al.* (2024) « Bio-accumulation and health risk assessments of per- and polyfluoroalkyl substances in wheat grains », *Environmental Pollution*, 356, p. 124351. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124351.

Yao, J. *et al.* (2021) « Lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of fipronil and its metabolites in food samples », *Food Chemistry*, 356, p. 129710. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129710.

Yokley, R.A. *et al.* (2002) « Analytical Method for the Determination of Metolachlor, Acetochlor, Alachlor, Dimethenamid, and Their Corresponding Ethanesulfonic and Oxanillic Acid Degradates in Water Using SPE and LC/ESI-MS/MS », *Analytical Chemistry*, 74(15), p. 3754-3759. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/ac020134q.

Zabaleta, I. *et al.* (2015) « Simultaneous determination of perfluorinated compounds and their potential precursors in mussel tissue and fish muscle tissue and liver samples by liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, 1387, p. 13-23. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.089.

Zahm, S. *et al.* (2024) « Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid », *The Lancet Oncology*, 25(1), p. 16-17. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/S1470-2045(23)00622-8.

Zhang, W. et Liang, Y. (2023) « The wide presence of fluorinated compounds in common chemical products and the environment: a review », *Environmental Science and Pollution Research*, 30(50), p. 108393-108410. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s11356-023-30033-6.

Zhao, W. *et al.* (2021) « Screening and Analysis of Multiclass Veterinary Drug Residues in Animal Source Foods using UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS », *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 107(2), p. 228-238. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00128-021-03273-w.

Zheng, G., Eick, S.M. et Salamova, A. (2023) « Elevated Levels of Ultrashort- and Short-Chain Perfluoroalkyl Acids in US Homes and People », *Environmental Science & Technology*, 57(42), p. 15782-15793. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.2c06715.

Zheng, J. *et al.* (2025) « Simultaneous targeted and non-targeted analysis of contaminants in fertilizers in Quebec, Canada », *Science of The Total Environment*, 958, p. 177970. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177970.

Zhou, X. *et al.* (2020) « Biotransformation of Tris(2-chloroethyl) Phosphate (TCEP) in Sediment Microcosms and the Adaptation of Microbial Communities to TCEP », *Environmental Science & Technology*, 54(9), p. 5489-5497. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07042.

Zhou, Y. *et al.* (2019) « Determination of 20 perfluoroalkyl substances in greenhouse vegetables with a modified one-step pretreatment approach coupled with ultra performance liquid chromatography

tandem mass spectrometry(UPLC-MS-MS) », *Chemosphere*, 227, p. 470-479. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.034.

Zhou, Z. *et al.* (2024) « A Fully Plant-Based Water- and Oil-Resistant Paper Composite », *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 12(50), p. 18043-18057. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.4c06079.

Zicarelli, G. *et al.* (2024) « Effects of a Common Surfactant Sodium Lauryl Sulfate on Early Life Stages of Two Fish and One Amphibian Species », *Water, Air, & Soil Pollution*, 235(12), p. 807. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s11270-024-07639-8.

Zonkpoedjre, S., Odo, G.E. et Eyo, J.E. (2023) « Physiochemical characteristics and organochlorine pesticides In surface water and fish, and potential health risk in lower Delta of Ouémé River, Bénin Republic, West Africa », *Animal Research International*, 20(1), p. 4705-4725.

Zweigle, J. *et al.* (2024) « PFΔScreen — an open-source tool for automated PFAS feature prioritization in non-target HRMS data », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416(2), p. 349-362. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/s00216-023-05070-2.

Zweigle, J., Bugsel, B. et Zwiener, C. (2022) « FindPFΔS: Non-Target Screening for PFAS–Comprehensive Data Mining for MS2 Fragment Mass Differences », *Analytical Chemistry*, 94(30), p. 10788-10796. Disponible sur: https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01521.

Annexes

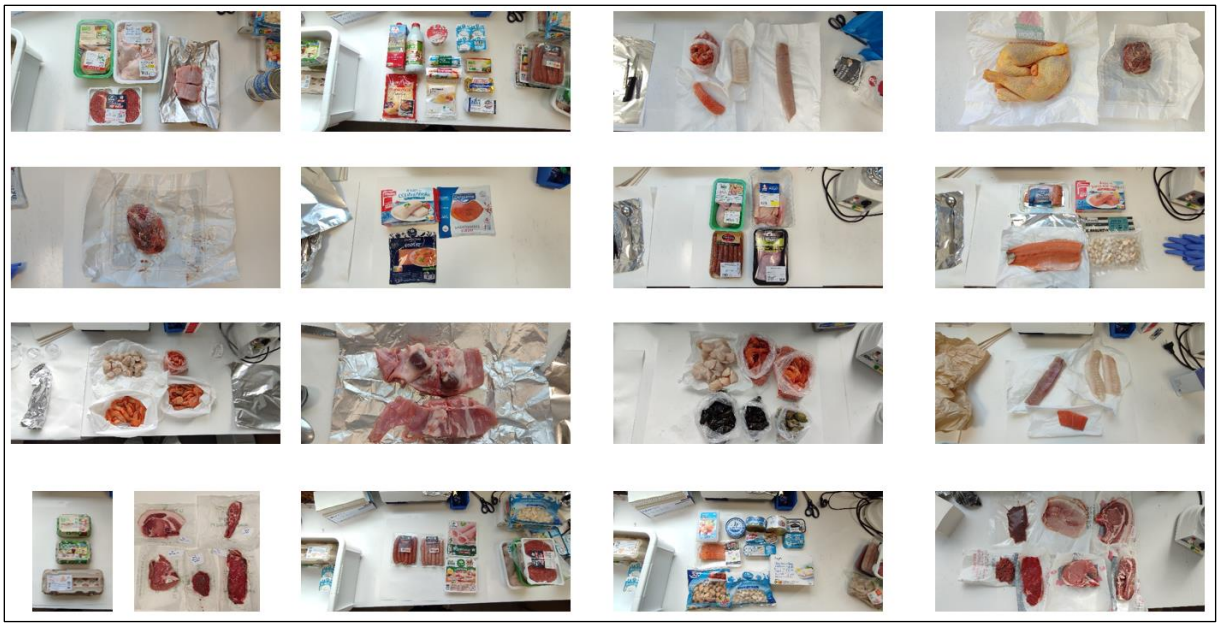


Figure 67. *Photographie des 51 denrées alimentaires d'origine animale (DAOA) après achat dans le cadre du projet de thèse d'Antonin Padioleau*

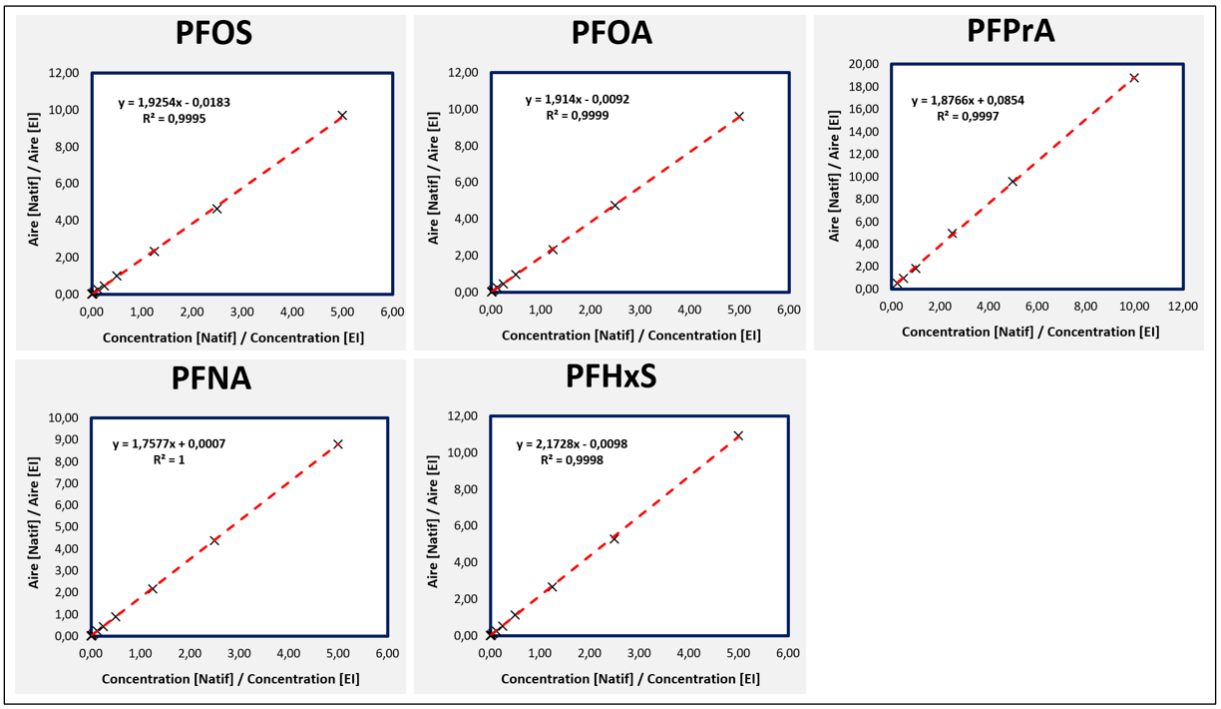


Figure 68. *Courbes d'étalonnage obtenues pour les 5 PFAS quantifiés (PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS, PFPrA) dans une gamme en solvant par LC-HRMS*

Tableau 10. Synthèse de l'étude bibliographique concernant les méthodes d'analyse des PFAS dans diverses matrices alimentaires, avec les méthodes de traitement de données communément utilisées : recherche dans des bases de données, identification de fragments MS/MS, détection de séries homologues.

*SE: Solvent extraction / FA: formic acid / AA: acetic acid / HA: hydrochloric acid

Number of PFAS	Matrix	Extraction method	Purification method	Analysis method	Reference
2	Fish muscle	SE (NaOH + MeOH)	SPE (Oasis Wax)	LC-MS/MS	(Squadrone *et al.*, 2015)
5	Fish, tomato and milk	SE (ACN)	MSPE (Fe_3O_4@ZIF-8&F_{13})	LC-MS/MS	(Liu *et al.*, 2025)
13	Dairy products	SE (ACN)	d-SPE (LoMMS/dMOF-808)	UPLC-QTOF	(Fan *et al.*, 2025)
13	Fish	MeOH / NH_3	SPE (Envi-Carb) + d-SPE	LC-MS/MS	(Melnyk *et al.*, 2024)
21	Invertebrates and fishes	Alkaline digestion (MeOH / KOH)	SPE (Oasis Wax)	HPLC-MS/MS	(Chen *et al.*, 2018)
11	Fish	SE (ACN / water) + QuEChERS salts	SPE (Oasis Wax)	LC-MS/MS	(Falk, Gassmann et Stahl, 2024)
14	Fish	QuECHERS (water + ACN + FA) SOE : $MgSO_4$/NaCl	d-SPE (EMR Lipid) + $MgSO_4$/NaCl	(LC-LTQ/Orbitrap HRMS	(Koloka *et al.*, 2025)
17	Eggs	QuEChERS (ACN + AA) $MgSO_4$/NaCl	Supelclean ENVI-18	LC-MS/MS	(Kesic *et al.*, 2023)
15	Fish	QUECHERS (water + ACN + FA) $MgSO_4$ / NaCl	d-SPE ($MgSO_4$ PSA)	LC-MS/MS	(Soudani *et al.*, 2024)
28	Oysters	QUECHERS		LC-MS/MS	(Campbell *et al.*, 2024)
25	Food	QUECHERS (water + ACN + NH_4OH) $MgSO_4$/NaCl	SPE (SupelClean ENVI-Carb + PSA) SPE (Bond Elut PFAS WAX)	LC-HRMS	(Van Leeuw *et al.*, 2024)
54	Fish	Alkaline digestion (MeOH/KOH)	SPE (Oasis WAX)	UHPLC-Q/Orbitrap HRMS	(Riaz *et al.*, 2024)
35	Fish	SE (ACN / water)		LC-MS/MS	(Sapozhnikova *et al.*, 2025)
66	Eggs of turtle	SE (ACN)	Cartouche SPE (Strata X-AW)	LC-HRMS	(Moretti *et al.*, 2024)
14	fish	FUSLE (ACN/water)	SPE (WAX and Envi-Carb)	LC-MS/MS	(Zabaleta *et al.*, 2015)
16	EAT	SE (MeOH)	SPE (C18 and Envi-Carb)	LC-MS/MS	(Rivière *et al.*, 2014)
	EAT	QuECHERS (ACN + water + FA) SO ($MgSO_4$ et NaCl)	d-SPE ($MgSO_4$, PSA, GCB)		(Genualdi *et al.*, 2022)

13	Egg of peregrine falcon	SE (ACN)	Activated carbon	LC-MS/MS	(Ozaki *et al.*, 2025),
20	Bovine meat and tuna fish	QuEChERS	d-SPE + SPE	UHPLC-HRMS	(Roviaro *et al.*, 2025)
18	eggs	QuEChERS (water + ACN) SOE : $MgSO_4$, sodium citrate, dosium chloride, odium hydrogen citrate sesquihydrate	SPE (Strata X-AW)	UHPLC-HRMS (Q-Orbitrap)	(Chiumiento *et al.*, 2023)
45	Fruits and vegetables	SE (basic MeOH)	SPE (WAX)		(Meng, DeStefano et Knappe, 2022)
15	Fish	Alkaline digestion (sodium hydroxide) SLE (ACN + HA)	SPE (WAX) cartouche	HPLC-MS/MS	(Jaus, Rhyn et Valentini, 2023)
18	Canned tuna	SE (ACN)	SPE (Strata)	UHPLC-Obirtrap-HRMS	(Nobile *et al.*, 2024)
20	Bovine meat and tuna	QuECHERS	d-SPE + SPE	UHPLC-Ortbitrap-HRMS	(Roviaro *et al.*, 2025)
10	Eggs, vegetables, meat	SE (ACN)	SPE (Oasis WAX) + d-SPE (Envi-Carb, AA)	HPLC-Q-Orbitrap-HRMS	(Barola *et al.*, 2025)
26	Fish, shellfish	Digestion + SPE		UPLC-MS/MS	(Ruffle *et al.*, 2020)
24	Marine species	Alkaline digestion	SPE (ENVI-Carb)	UHPLC-MS/MS	(Hedgespeth *et al.*, 2023)
15	Fish	SE (NaOH, hydrochloric acid)	SPE	HPLC-MS/MS	(Jaus, Rhyn et Valentini, 2023)
37	Fish	SE (MeOH, ammonium formate)	HybridSPE		(Ibor *et al.*, 2025)
30	Wheat grains	SE (sodium carbonate solution, MTBE, TBAS	ENVI-Carb	UHPLC-MS/MS	(Yang *et al.*, 2024)
30	TDS samples	QuEChERS (water + ACN + FA) $MgSO_4$, NaCl	d-SPE ($MgSO_4$, PSA, GCB) + SPE (Strata XL-AW)	LC-MS/MS LC-Q-Orbitrap-HRMS	(Genualdi *et al.*, 2024)
80	Marine mammals	SE (MeOH)	SPE (ENVI-Carb)	UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS)	(Khalid *et al.*, 2024)
	Eggs	QUECHERS (CAN) SOE + d-SPE : $MgSO_4$, NaCl, Discovery® DSC-18, ENVI-Carb		UPLC-MS/MS	(Granby *et al.*, 2024)

Tableau 11. Synthèse de l'étude bibliographique concernant i) les méthodes d'analyse non-ciblée des PFAS dans les aliments et ii) incluant des méthodes utilisées au cours de l'analyse non-ciblée de PFAS dans d'autres matrices.

*AFFFs: Aqueous film-forming foams / TDS: Total Diet Study / FCM: Food contact material

Number of PFAS	Matrix	Extraction method	Purification method	Analysis method	Data analysis	Reference
Aliments						
Fish	NTS	SE (ammonium hydroxide MeOH)	SPE (Oasis WAX)	UPLC-Q-Orbitrap-HRMS	Compound Discoverer	(Kaufmann *et al.*, 2022)
Polar bear liver and egg	TS, NTS	SE (ACN + FA)	SPE (WAX)	UPLC-QqQ-MS/MS UPLC-Q-Orbitrap-HRMS	Trace Finder Compound Discoverer	(Chu et Letcher, 2024)
Fish	TS , NTS	SE (MeOH, ACN, NaOH	Envi-Carb + glacial acetic acid	UPLC-QToF	Kendrick plots	(Crimmins *et al.*, 2014)
Fish	SS, NTS	SE (ACN, FA)	SPE (WAX)	UPLC-QToF-MS	IPDC algorithm + KMD + post processing	(Ren *et al.*, 2022)
Fish	NTS	SE (ACN, FA)	SPE (WAX)	HPLC-HRMS		(Liu *et al.*, 2018)
Food	NTA			LC-HRMS	Compound Discoverer : KMD, diagramme de Van Krevelen	(Cui *et al.*, 2023)
Fish	TS, SS	SE (ACN)	freeze	HPLC-MS/MS HPLC-QToF-MS/MS	database	(Nilsen *et al.*, 2024)
Autres matrices						
Bones of dolphin	TS, SS, NTS	SE (ACN)	ENVI-Carb in glacial AA	UHPLC-MS/MS UHPLC-QToF-HRMS	Agilent Mass Profiler Agilent MassHunter PFΔ*Screen*	(Salangad *et al.*, 2025)
AFFF	TS, NTS	-	-	LC-MS/MS LC-QToF TF, IF	XCMS online, MD plots	(Dubocq *et al.*, 2020)
Landfill Leachate	SS, NTS				CD, MSDIAL	(Feng *et al.*, 2024)
Surface water	NTS	SPE (WAX)		UPLC-Q-Orbitrap	FIF, MD, homologous series detection	(Hensema, Berendsen et van Leeuwen, 2021)
River water	NTA	SPE (Oasis WAX)		HPLC-ICPMS/MS-ESI-MS		(Jamari *et al.*, 2019)

Wastewater	TS, SS, NTS	SPE (HLB + WAX)	UHPLC-MS/MS UHPLC-QToF-MS	MassHunter MS-DIAL FluoroMatch Data base, homologue analysis	(Jeong *et al.*, 2022)
Leachate, foam	SS, NTS		UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS	FluoroMatch	(Koelmel *et al.*, 2020)
water	NS	Online SPE (Oasis WAX)	LC-Q-Orbitrap-HRMS	FluoroMatch CD	(Li *et al.*, 2023)
Landfill leachate !!	TS, SS, NTS		HPLC-QTOF-MS	Database HS Diagnostic fragment KMD	(Liu *et al.*, 2022)
water	NTS		LC-QTOF-MS	ProFinder MassHunter MassProfiler	(McCord et Strynar, 2019)
Soil	NTS		HRMS	FluoroMatch CD	(Nason *et al.*, 2021)
AFFF	NTS		LCxLC-Q-Orbitrap-HRMS	KMD	(Renai *et al.*, 2022)
Food packaging	NTS		HPLC-Q-Exactive	CD	(Stroski *et al.*, 2024)
FCM	TS, SS		LC-MS/MS UHPLC-Orbitrap-HRMS	CD	(Vázquez Loureiro *et al.*, 2024)
wastewater	SS, NTS		IMS-QToF-HRMS	UNIFI software Suspect list CCS in HS	(Mu *et al.*, 2024)
FCM	TS, SS		LC-MS/MS LC-Orbitrap-HRMS	CD	(Stroski et Sapozhnikova, 2023)
serum	TS, SS, NTS		UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS	CD	(T. Miaz *et al.*, 2020)

Annexes de l'Article 1 (Supplementary data) : Advancing PFASs monitoring in food: From targeted SPE-LC-MS/MS to non-targeted QuEChERS-LC-HRMS approaches

Table S1. PFASs compounds listed and their acquisition parameters (SRM transitions and CE voltage) in LC-MS/MS targeted analysis

PFAS	Transition 1	collision energy 1 (eV)	Transition 2	Collision energy 2 (eV)
PFBA	213>169	10		
PFBA $^{13}C_4$	217>172	10		
PFPeA	263>219	10		
PFPeA $^{13}C_3$	266>222	10		
PFHxA	312,9>118,9	10	312,9>268,9	10
PFHxA $^{13}C_2$	314,9>118,9	10		
PFHpA	362,9>318,9	10	362,9>168,9	15
PFHpA $^{13}C_4$	366,9>321,9	10		
PFOA	412,9>368,9	10	412,9>169,1	15
PFOA $^{13}C_4$	416,9>371,9	10		
PFNA	462,9>418,9	10	462,9>168,9	15
PFNA $^{13}C_5$	467,9>422,9	10		
PFDA	512,9>468,9	10	512,9>168,9	15
PFDA $^{13}C_2$	514,9>469.9	10		
PFUnDA	562,9>518,9	10	562,9>268,9	20
PFUnDA $^{13}C_2$	564,9>519,9	10		
PFDoDA	612,9>568,9	10	612,9>168,9	25
PFDoDA $^{13}C_2$	614,9>569,9	10		
PFTrDA	662,9>618,9	10	662,9>168,9	25
PFTeDA	712,9>668,9	10	712,9>168,9	25
PFBS	299 > 80	30	299 > 99	30
PFBS $^{13}C_3$	302 > 80	30		
PFPeS	349>80	30	349>99	30
PFHxS	399 > 80	30	399 > 99	30
PFHxS $^{18}O_2$	403 > 84	30		
PFHpS	449 > 80	35	449 > 99	35
PFOS	499 > 80	40	499 > 99	40
PFNS	549>80	45	549>99	40

PFDS	599 > 80	45	599 > 99	40
PFUnDS	648,9>80	50	648,9>99	45
PFDoDS	698,9>80	50	698,9>99	50
PFTrDS	748,9>80	50	748,9>99	50
PFOS $^{13}C_4$	503 > 80	40		
PFOS $^{13}C_8$	507 > 80	40		
HPFO-DA	285>169	5	285>185	15
NaDONA	376,8>84,8	25	376,8>250,8	10
9Cl-PF3ONS	530,9>350,8	25	530,9>82,8	25
11Cl-PF3OUdS	630,9>450,7	30	630,9>82,7	30
HPFO-DA $^{13}C_3$	287>169	5		

Table S2. Illustration, for a set of compounds representing different physico-chemical properties, of the detection performance (signal-to-noise ratio (S/N)) associated with the different parameters tested during optimisation of the QuEChERS method and LC-MSMS measurement

	PFOA	**PFNA**	**PFOS**	**PFHxS**	**PFHxA**	**PFDA**	**PFTeDA**	**PFBS**	**PFNS**	**PFTrDS**
Transition	412.9>368.9	462.9>418.9	498.9>80	398.9>80	312.9>118.9	512.9>468.9	712.9>668.9	298.9>80	548.9>80	748.9>80
Retention time (min)	3.88	4.36	4.41	3.56	3.04	5.06	8.03	2.53	5.10	8.02
Part 3.1.1. QuEChERS optimization – Solvents - Milk										
ACN/H_2O	714	3285	6886	5191	20	10669	486	799	3335	6636
ACN/FA	2531	5137	1428	5357	422	1182	1545	1555	982	201
ACN/H_2O/FA	3002	5007	5843	3809	538	13167	448	1292	3579	3023
MeOH	990	1689	2350	1980	30	4130	333	261	1586	2967
MTBE/H_2O	2163	5651	5931	1751	36	16312	355	36	5365	3187
Part 3.1.1. QuEChERS optimization – Solvents - Fish										
ACN/H_2O/FA	166	166	973	2051	403	988	592	597	189	187
MeOH KOH	491	1232	163	155	292	379	133	247	41	15
Part 3.1.2. . QuEChERS optimization – Extraction salts										
NaCl	1352	5413	6163	11413	33	15359	665	1273	7638	4308
NaCl/$MgSO_4$	714	3285	6886	5191	20	10669	486	799	3335	6636
4°C	373	624	115	159	22	472	18	725	93	6
-20°C	161	339	152	153	38	307	18	744	40	8
Part 3.1.4. . QuEChERS optimization – Additional purification step										
Without purification	161	339	152	153	38	307	18	744	40	8
PD-10 + filter 10 KD	174	296	129	105	13	264	27	167	60	5
Filter 10 KD	464	214	212	90	50	719	20	1200	60	3

Figure S1. Concentration levels of four PFASs (ng/mg) in spiked milk (10 ng/mL milk, i.e. 0.067 ng/mg milk powder) extracted using QuEChERS, compared across five different solvents: ACN/H_2O (grey), ACN/FA (red), ACN/H_2O/FA (blue), MeOH (yellow) and MTBE/H_2O (purple)

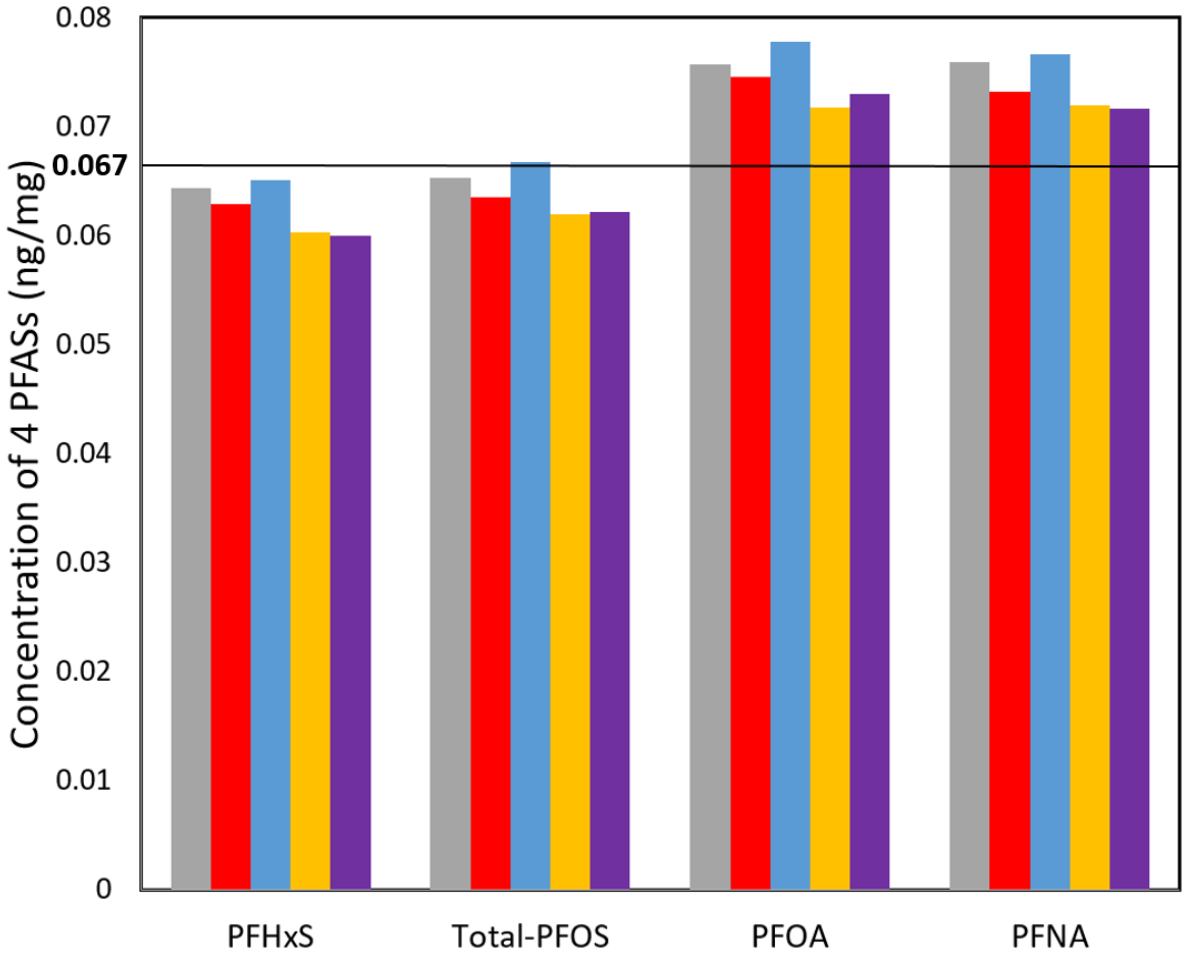


Figure S2. Representative TICs acquired by LC-(ESI-)MS/MS for PFASs (SRM) spiked in a) milk (10 ng/mL / 0.067 ng/mg milk powder) and b) fish (0.02 ng/mg) samples without purification method (green), with d-SPE putification (blue) or purified by DLLME (orange)

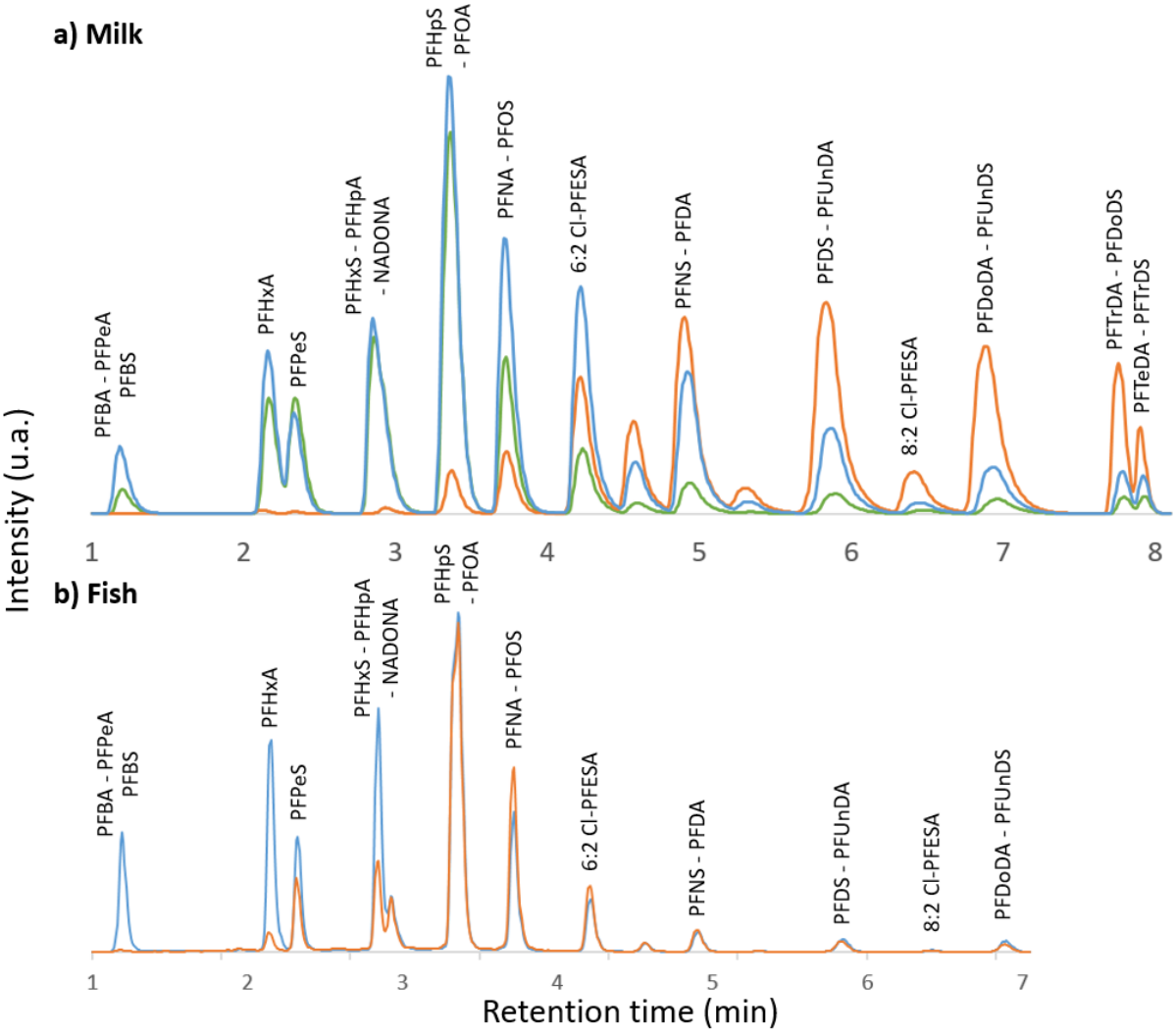


Figure S3. Concentrations of 4 selected PFASs (PFOA, PFOS, PFNA, PFHxS) measured by LC-MS/MS following the application of either the SPE or QuEChERS extraction protocol, with supplementation at three levels (1, 5, and 10 µg·kg⁻¹, wet weight) in a) crustaceans and b) fish samples

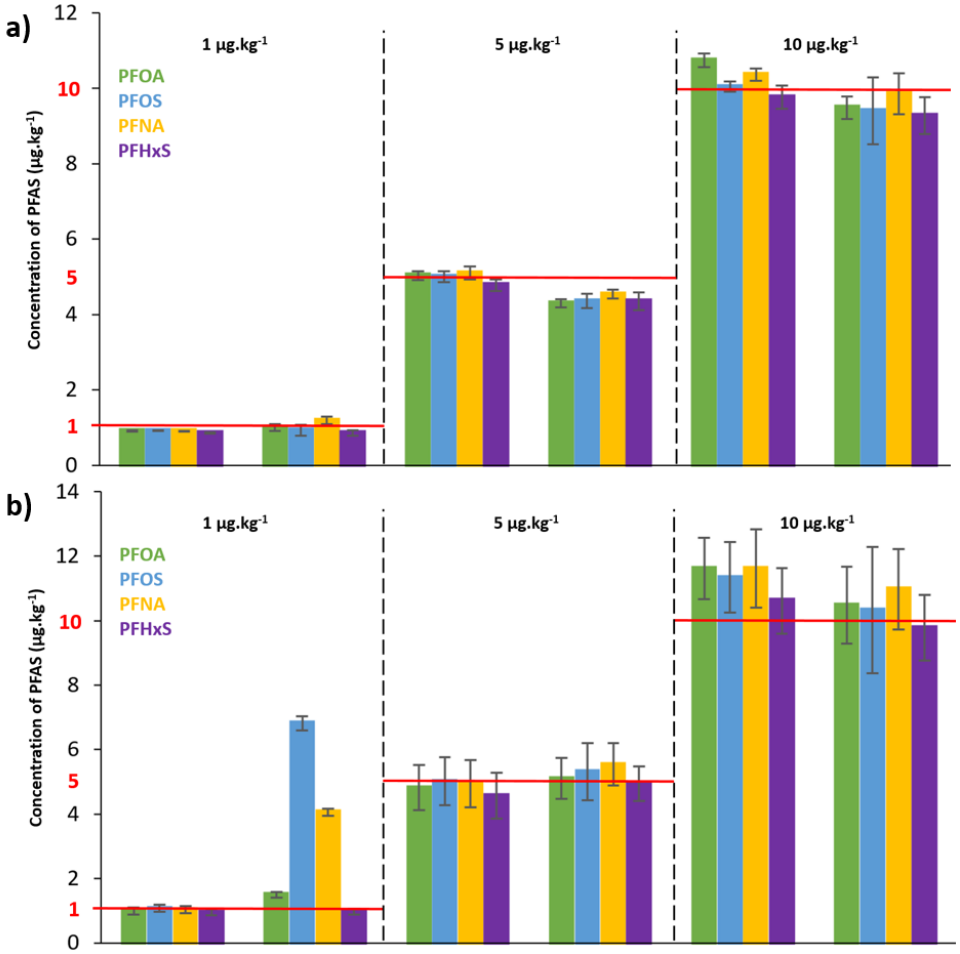
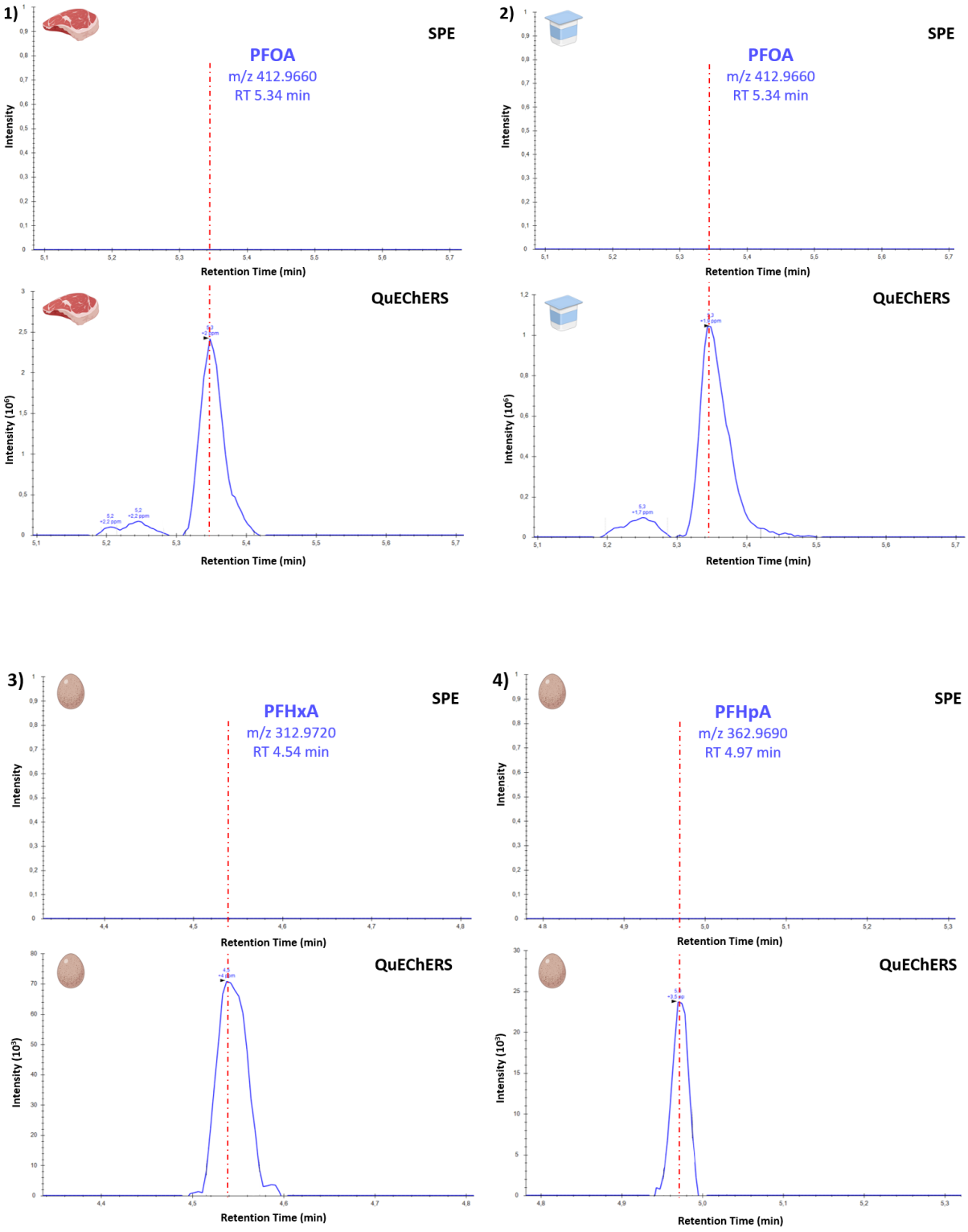


Figure S4. Chromatograms profiles obtained for 1) PFOA in a meat sample, 2) PFOA in a dairy product sample, 3) PFHxA in an egg sample, 4) PFHpA in an egg sample, and 5) PFBA in meat sample, in SS acquisition depending on the extraction protocol used: SPE or QuEChERS



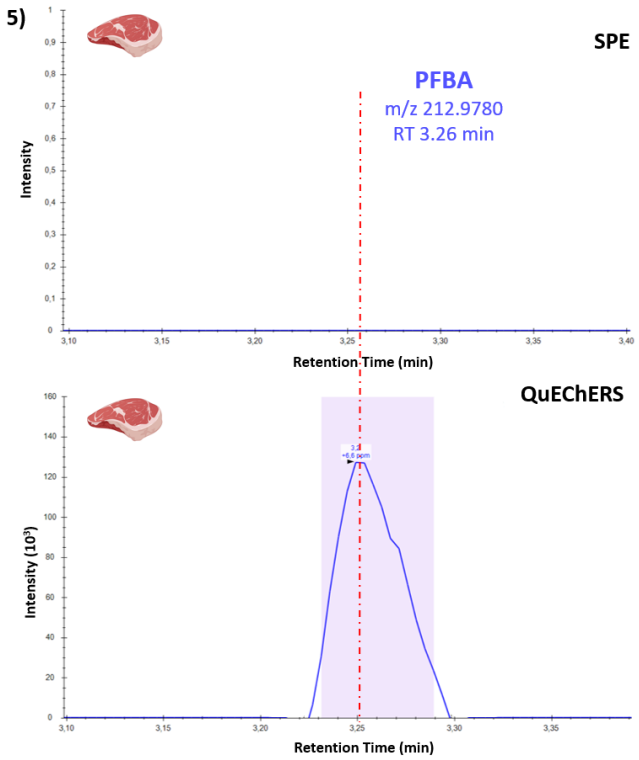
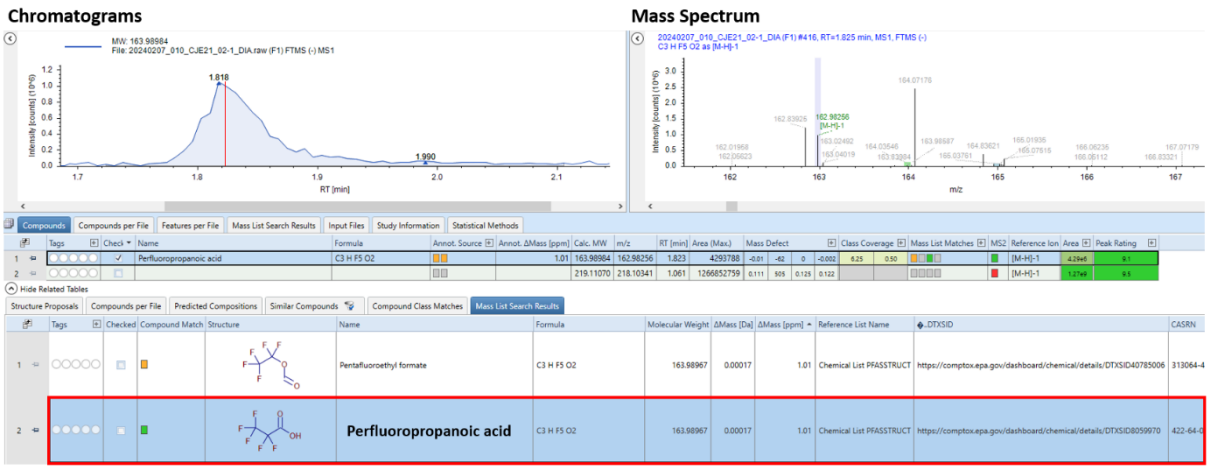


Figure S5. Screenshot of the Compound Discoverer window associated to the identification of PFPrA in an egg (ion chromatogram, mass spectrum)



Annexes de l'Article 2 (Supplementary data) : High-resolution mass spectrometry for extended PFAS surveillance in food: Combining suspect and non-targeted approaches

Table S1. List of PFAS reference standards available

Family	PFAS	Formula	Monoisotopic mass [M-H]	Supplier
Labelled PFAS (n = 20)				
PFCA	13C4-PFBA	[13]$C_4HF_7O_2$	216.9920	Wellington
PFCA	13C2-PFHxA	[13]$C_4C_2HF_{11}O_2$	314.9780	Wellington
PFCA	13C4-PFOA	[13]$C_4C_4HF_{15}O_2$	416.9790	Wellington
PFCA	13C5-PFNA	[13]$C_4C_5HF_{17}O_2$	467.9790	Wellington
PFCA	13C2-PFDA	[13]$C_8C_2HF_{19}O_2$	514.9670	Wellington
PFCA	13C2-PFUnDA	[13]$C_9C_2HF_{21}O_2$	564.9640	Wellington
PFCA	13C2-PFDoDA	[13]$C_{10}C_2HF_{23}O_2$	614.9590	Wellington
PFSA	18O2-PFHxS	C_6HF_{13}[18]OO_2S	402.9450	Wellington
PFSA	13C4-PFOS	[13]$C_4C_4HF_{17}O_3S$	502.9430	Wellington
PFSA	13C8-PFOS	[13]$C_8HF_{17}O_3S$	506.9560	Wellington
PFCA	13C3-PFPeA	[13]$CC_3HF_9O_3S$	265.9860	Wellington
PFCA	13C4-PFHpA	[13]$C3C_4HF_{13}O_2$	366.9820	Wellington
PFSA	13C3-PFBS	[13]$CC_3HF_9O_3S$	301.9520	Wellington
FASAA	d3-N-MeFOSAA	C_{11}[2]$H_3H_3F_{17}NO_4S$	572.9850	Wellington
FASAA	d5-N-EtFOSAA	C_{12}[2]$H_3H_5F_{17}NO_4S$	589.0140	Wellington
FASA	13C8-FOSA	[13]$C_8H_2F_{17}NO_2S$	505.9720	Wellington
PFECA	13C3-HFPO-DA	[13]$C_3C_3HF_{11}O_3$	331.9778	Wellington
FTS	13C2-8:2 FTS	[13]$C_8C_2H_5F_{17}O_3S$	528.9682	Wellington
FTS	13C2-6:2 FTS	[13]$C_6C_2H_5F_{13}O_3S$	428.9746	Wellington
diPAP	13C4-6:2 diPAP	[13]$C_{12}C_4H_9F_{26}O_4P$	792.9885	Wellington
PFAS (n = 45)				
PFCA	PFBA	$C_4HF_7O_2$	213.9865	Wellington
PFCA	PFPeA	$C_5HF_9O_2$	263.9833	Wellington
PFCA	PFHxA	$C_6HF_{11}O_2$	313.9801	Wellington
PFCA	PFHpA	$C_7HF_{13}O_2$	363.9769	Wellington
PFCA	PFOA	$C_8HF_{15}O_2$	413.9737	Wellington
PFCA	PFNA	$C_9HF_{17}O_2$	463.9705	Wellington
PFCA	PFDA	$C_{10}HF_{19}O_2$	513.9673	Wellington
PFCA	PFUnDA	$C_{11}HF_{21}O_2$	563.9641	Wellington
PFCA	PFDoDA	$C_{12}HF_{23}O_2$	613.9609	Wellington
PFCA	PFTrDA	$C_{13}HF_{25}O_2$	663.9577	Wellington
PFCA	PFTeDA	$C_{14}HF_{27}O_2$	713.9545	Wellington
PFSA	PFBS	$C_4HF_9O_3S$	299.9503	Wellington
PFSA	PFHxS	$C_6HF_{13}O_3S$	399.9439	Wellington
PFSA	PFHpS	$C_7HF_{15}O_3S$	449.9407	Wellington
PFSA	PFOS	$C_8HF_{17}O_3S$	499.9375	Wellington
PFSA	PFDS	$C_{10}HF_{21}O_3S$	599.9311	Wellington
PFSA	PFPeS	$C_5HF_{11}O_3S$	349.9471	Wellington

PFSA	PFNS	$C_9HF_{19}O_3S$	549.9343	Wellington
PFSA	PFUnDS	$C_{11}HF_{23}O_3S$	649.9279	Wellington
PFSA	PFDoDS	$C_{12}HF_{25}O_3S$	699.9247	Wellington
PFSA	PFTrDS	$C_{13}HF_{27}O_3S$	749.9215	Wellington
FASA	FOSA	$C_8H_2F_{17}NO_2S$	498.9535	Wellington
FASAA	N-MeFOSAA	$C_{11}H_6F_{17}NO_4S$	570.9746	Wellington
FASAA	N-EtFOSAA	$C_{12}H_7F_{17}NO_4S$	583.9830	Wellington
Cl-PFESA	9Cl-PF3ONS	$C_8HClF_{16}O_4S$	531.9029	Wellington
Cl-PFESA	11Cl-PF3UnDS	$C_{10}HClF_{20}O_4S$	631.8965	Wellington
PFECA	ADONA	$C_7H_2F_{12}O_4$	377.9761	Wellington
PFECA	HFPO-DA	$C_6HF_{11}O_3$	329.9750	Wellington
FTS	4:2 FTS	$C_6H_5F_9O_3S$	327.9816	Wellington
FTS	6:2 FTS	$C_8H_5F_{13}O_3S$	427.9752	Wellington
FTS	8:2 FTS	$C_{10}H_5F_{17}O_3S$	527.9688	Wellington
FTS	10:2 FTS	$C_{12}H_5F_{21}O_3S$	627.9624	Wellington
PFECHS	PFECHS	$C_8HF_{15}O_3S$	461.9407	Wellington
FTCA	FPePA	$C_8H_5F_{11}O_2$	342.0114	Wellington
DiPAP	6:2 diPAP	$C_{16}H_9F_{26}O_4P$	789.9823	Wellington
diPAP	8:2 diPAP	$C_{20}H_9F_{34}O_4P$	989.9696	Wellington
FTCA	FPrPA	$C_6H_5F_7O_2$	242.0178	Wellington
FTCA	FHpPA	$C_{10}H_5F_{15}O_2$	442.0050	Wellington
PFESA	PFEESA	$C_4HF_9O_4S$	315.9452	Wellington
PFECA	PFMPA	$C_4HF_7O_3$	229.9814	CIL
PFECA	PFMBA	$C_5HF_9O_3$	279.9782	CIL
PFECA	PFDHA	$C_5HF_9O_4$	295.9731	CIL
PFCA	PFPrA	$C_3HF_5O_2$	163.9897	CIL
FTAB	6:2 FTAB	$C_{15}H_{19}F_{13}N_2O_4S$	570.0858	Wellington
FTAA	6:2 FTAA-Ox	$C_{13}H_{17}F_{13}N_2O_3S$	528.0752	Wellington

Table S2. Overview of the samples analyzed by food category and geographical origin (France, Algeria, or European (EU) hot spots)

Categories	Origin	Number	Samples
Egg (n = 21)	French	3	
	Algerian	5	
	EU hot spots	13	
Fish (n = 20)	French	5	Trout fillet (n = 1), back of cod (n = 1), alaska hake fillet (n = 1), smoked salmon (n = 1) and sardine (n = 1)
	Algerian	10	Tuna (n = 4), bream (n = 2), swordfish (n = 3) and whiting (n = 1)
	EU hot spots	5	Eel (n = 3) and zander (n = 2)
Shellfish (n = 4)	French	4	cooked shrimps (n = 1), scallops (n = 1), raw mussels (n = 1) and cooked mussels (n = 1)
Meat (n = 10)	French	5	Butcher steak (Beef) (n = 1), cotelettes (Lamb) (n = 1), white ham with rind (Pork) (n = 1), chipolata (Pork) (n = 1) and thigh with skin (Chicken) (n = 1)
	Algerian	5	Mutton (n = 2) and beef (n = 3)

Dairy products (n = 3)	French	3	Grated Emmental (n = 1), goat's cheese buche (n = 1) and plain cow's milk yoghurt (n = 1)

Fig. S1. Workflow tree used in Compound Discoverer for non-targeted data analysis.

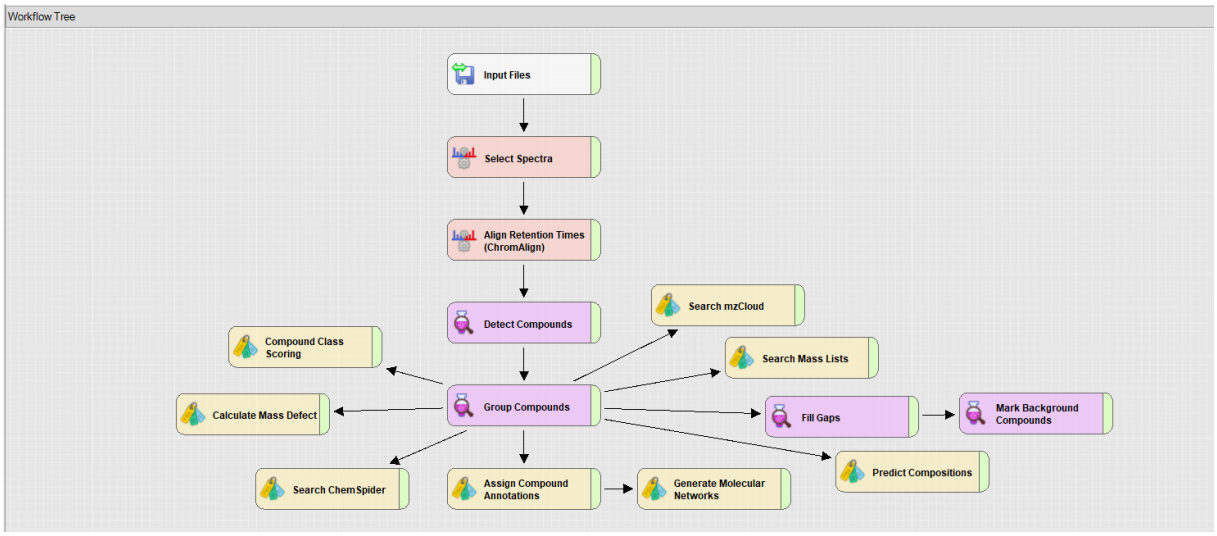


Fig. S2. Chromatographic profile and mass spectrum of 6:2 FTS in an egg sample from a hotspot, analyzed by LC-HRMS using the non-targeted workflow developed in this study. Signal processed with Compound Discoverer.

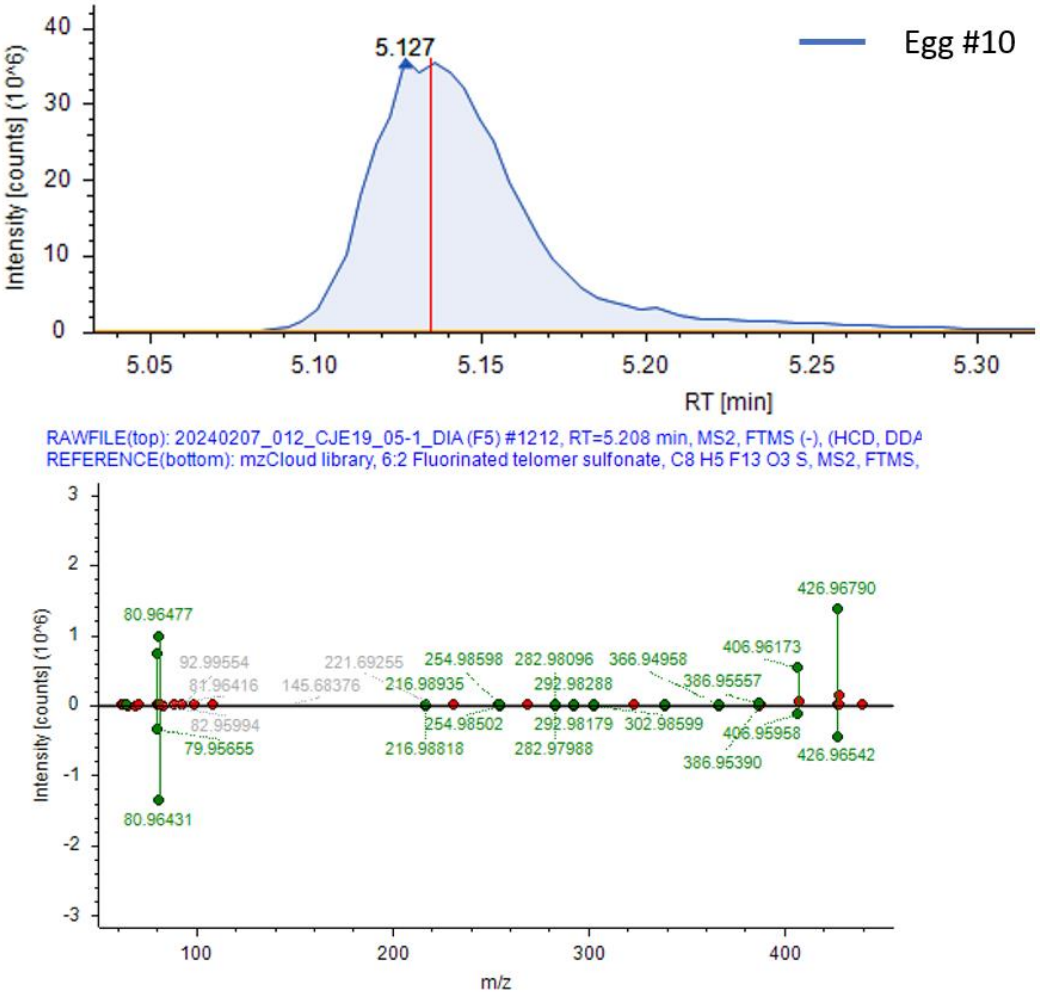
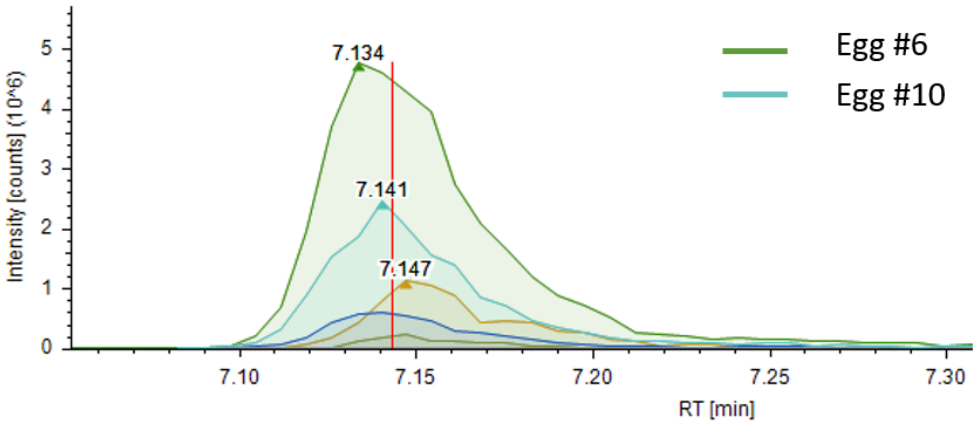
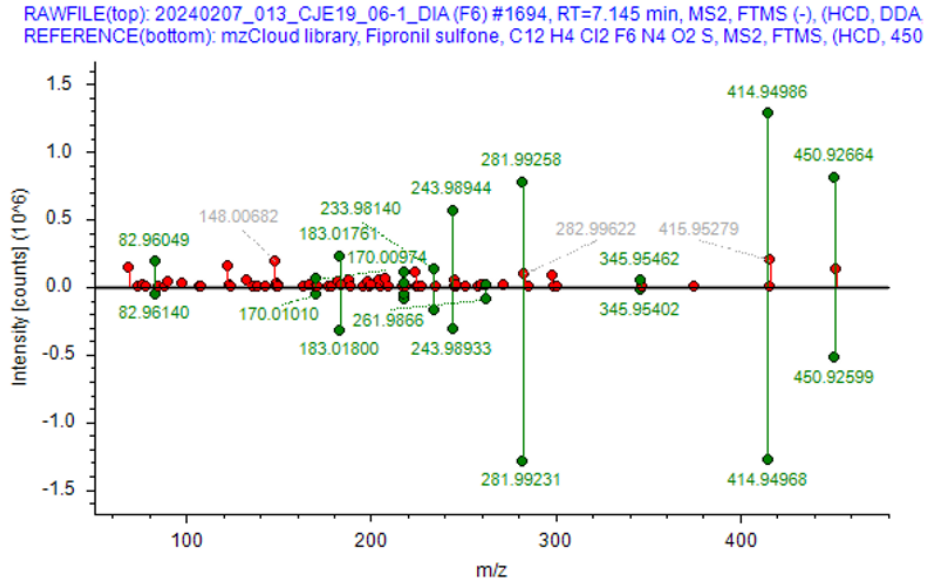


Fig. S3. Chromatographic profile and mass spectra of Fipronil sulfone in two egg samples from hotspot areas, analyzed by LC-HRMS using the non-targeted workflow developed in this study. Signals were processed using Compound Discoverer.


Egg #6
Egg #10
7.134
7.141
7.147
Intensity [counts] (10^6)
RT [min]


RAWFILE(top): 20240207_013_CJE19_06-1_DIA (F6) #1694, RT=7.145 min, MS2, FTMS (-), (HCD, DDA
REFERENCE(bottom): mzCloud library, Fipronil sulfone, C12 H4 Cl2 F6 N4 O2 S, MS2, FTMS, (HCD, 450
Intensity [counts] (10^6)
m/z
414.94986
450.92664
281.99258
243.98944
233.98140
148.00682
183.01761
82.96049
170.00974
282.99622
415.95279
345.95462
82.96140
170.01010
261.9866
345.95402
183.01800
243.98933
450.92599
281.99231
414.94968

Annexes de l'Article 3 (Supplementary data) : High-throughput QuEChERS–UHPLC-QTOF-MS method for multi-class food residues and contaminants screening: Application to seafood and dairy products

Table S1. List of the 964 targeted contaminants correctly detected in solvent, and individual LOI values obtained for each contaminant in seafood and dairy products

Table S2. Analytical parameters

Instrument	Parameter	Condition		
UHPLC	Column temperature	50 °C		
	Injection volume	10 µL		
	Flow rate	0.5 mL.min^{-1}		
	Mobile phase	A: H_2O containing 0.01% formic acid		
		B: ACN containing 0.01% formic acid		
		Time (min)	% A	% B
		0	90	10
		15	0	100
		18	0	100
		19	90	10
		23	90	10
Q-TOF-MS (ESI+/ESI-)	Ion source type	ESI		
	Ion spray voltage floating (ISVF)	(+) 5500 V, (-) 4500 V		
	Source temperature (TEM)	500 °C		
	Curtain gas (CUR)	30 psi		
	Nebulizing gas (GS1)	40 psi		
	Heater gas (GS2)	45psi		
	Declustering potential (DP)	(+/-) 80 eV		
	Acquisition mode	IDA		
	TOF MS range (Da)	50-1000		
	Full scan collision energy (CE)	(+/-) 10 eV		
	MS accumulation time (ms)	490		
	TOF MS/MS range (Da)	50-1000		
	Collision energy (CE) for MS/MS	(+/-) 40 ± 20 eV		
	MS/MS accumulation time (ms)	40		
	Cycle time (ms)	940		

Table S3. List of 40 samples (20 seafood products and 20 dairy products) used for method validation, and targeted and suspect screening analysis, and five fish samples used for protocol development (in bold)

Matrices	Sample	Matrices		Sample
Seafood	**Cod back**	**Dairy products**	Milk #1	Powdered milk #1
	Oysters			Prepared milk #1
	Tuna		Milk #2	Powdered milk #2
	Sole			Prepared milk #2
	Scallops		Milk #3	Powdered milk #3
	Lobster			Prepared milk #3
	Salmon		Milk #4	Powdered milk #4
	Mussels			Prepared milk #4
	Horse mackerel		Milk #5	Powdered milk #5
	Prawn			Prepared milk #5
	Crayfish		Milk #6	Powdered milk #6
	Scallops			Prepared milk #6
	Sea almond		Milk #7	Powdered milk #7
	Anchovy			Prepared milk #7
	Sole		Milk #8	Powdered milk #8
	Canned tuna			Prepared milk #8
	Steamed salmon		Milk #9	Powdered milk #9
	Boiled mussels			Prepared milk #9
	Scallops		Milk #10	Powdered milk #10
	Smoked salmon			Prepared milk #10

Table S4. List of residues and contaminants (n = 31) unequivocally identified with their frequency of occurrence in 40 samples (20 seafood products and 20 dairy products) by targeted screening

Type of chemical	Compound	Usage	Frequency of appearance (%)	Sample(s)
Industrial chemical	2-ethylhexyl Diphenyl Phosphate	Plasticizer and flame retardant	5	Powdered milk #10 / Prepared milk #10
	Tris(1,3-dichlorisopropyl)phosphate (TDCPP)	Flame retardant	2.5	Crayfish
	Tris(2-chloroethyl) Phosphate	Plasticizer, flame retardant and viscosity regulator	12.5	Cod back / Sole / Canned tuna / Powdered milk #4 / Prepared milk #3
Pesticide residues	1,3-diphenylurea	Cytokinin	2.5	Prepared milk #7
	Carbendazim	Fungicide / biocide	2.5	Prepared milk #10
	Difenoconazole	Fungicide	2.5	Powdered milk #10
	Emamectin	Insecticide	2.5	Smoked salmon

Type of chemical	Compound	Usage	Frequency of appearance (%)	Sample(s)
	Fenpropidin	Fungicide	5	Mussels / Boiled mussels
	Fenpropimorph	Fungicide	5	Oysters / Mussels
	Flutriafol	Fungicide	2.5	Powdered milk #5
	N,n-diethyl-m-toluamide	Insecticide	5	Scallops / Powdered milk #4
	Phenylurea	Herbicide	2.5	Powdered milk #9
	Piperonyl Butoxide	Synergist	2.5	Powdered milk #1
	Pirimiphos Methyl	Insecticide / Acaricide	5	Prepared milk #5 / Steamed salmon
	Propiconazol	Fungicide	2.5	Oysters
	Sebuthylazin	Herbicide	2.5	Powdered milk #8
	Spiroxamine	Fungicide	2.5	Mussels
	Tebuconazol	Fungicide	2.5	Powdered milk #5
	Tembotrione	Herbicide	2.5	Crayfish
Transformation products (TPs)	Albendazole sulfone	Metabolite of albendazole (anthelmintic and antiprotozoal)	5	Powdered milk #5 / Prepared milk #5
	Albendazole sulfoxyde	Metabolite of albendazole (anthelmintic and antiprotozoal)	2.5	Powdered milk #5
Veterinary drugs (VDs)	Flubendazole	Antiparasitic and anthelmintic	2.5	Scallops
	Quinoline	Antibacterial, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, and analgesic	5	Anchovy / Powdered milk #3
PFAS	2-(perfluorohexyl)ethane-1-sulfonic Acid Sodium Salt (6:2 FTS)		2.5	Powdered milk #4
	Heptafluorobutyric Acid (PFBA)		5	Tuna / Scallops
	Perfluorononanoic Acid (PFNA)		2.5	Sole
	Perfluorodecanoic Acid (PFDA)		2.5	Cod back
	Perfluorododecanoic Acid (PFDoDA)		5	Crayfish / Canned tuna
	Perfluorotridecanoic Acid (PFTrDA)		7.5	Crayfish / Canned tuna / Powdered milk #7
	Perfluorotetradecanoic Acid (PFTeDA)		2.5	Crayfish
	Perfluorooctanesulfonamide (PFOSA)		2.5	Sole

Table S5. Results of the targeted screening of unequivocally identified residues and contaminants in the 40 samples

Sample	Number of identified residues and contaminants	Unequivocally identified residues and contaminants

Cod back	**2**	Perfluorodecanoic Acid (PFDA); Tris(2-chloroethyl) Phosphate
Oysters	**2**	Fenpropimorph; Propiconazol
Tuna	**1**	Heptafluorobutyric Acid (PFBA)
Sole	**2**	Perfluorooctanesulfonamide (PFOSA); Tris(2-chloroethyl) Phosphate
Scallops	**3**	Heptafluorobutyric Acid (PFBA); Flubendazole; N,n-diethyl-m-toluamide
Lobster	**0**	
Salmon	**0**	
Mussels	**3**	Fenpropidin; Spiroxamine; Fenpropimorph
Horse mackerel	**0**	
Prawn	**0**	
Crayfish	**5**	Perfluorododecanoic Acid (PFDoDA); Perfluorotridecanoic Acid (PFTrDA); Perfluorotetradecanoic Acid (PFTeDA); Tembotrione; Tdcpp
Scallops	**0**	
Sea almond	**0**	
Anchovy	**1**	Quinoline
Sole	**1**	Perfluorononanoic Acid (PFNA)
Canned tuna	**3**	Perfluorododecanoic Acid (PFDoDA); Perfluorotridecanoic Acid (PFTrDA); Tris(2-chloroethyl) Phosphate
Steamed salmon	**1**	Pirimiphos Methyl
Boiled mussels	**1**	Fenpropidin
Scallops	**0**	
Smoked salmon	**2**	Emamectin
Powdered milk #1	**1**	Piperonyl Butoxide
Powdered milk #2	**0**	
Powdered milk #3	**1**	Quinoline
Powdered milk #4	**3**	2-(perfluorohexyl)ethane-1-sulfonic Acid Sodium Salt (6:2 FTS); Tris(2-chloroethyl) Phosphate; N,n-diethyl-m-toluamide
Powdered milk #5	**4**	Albendazole sulfone; Albendazole sulfoxyde; Tebuconazol; Flutriafol
Powdered milk #6	**0**	
Powdered milk #7	**1**	Perfluorotridecanoic Acid (PFTrDA)
Powdered milk #8	**1**	Sebuthylazin
Powdered milk #9	**1**	Phenylurea
Powdered milk #10	**2**	2-ethylhexyl Diphenyl Phosphate; Difenoconazole
Prepared milk #1	**0**	
Prepared milk #2	**0**	
Prepared milk #3	**1**	Tris(2-chloroethyl) Phosphate
Prepared milk #4	**0**	
Prepared milk #5	**2**	Albendazole sulfone; Pirimiphos Methyl
Prepared milk #6	**0**	
Prepared milk #7	**1**	1,3-diphenylurea
Prepared milk #8	**0**	
Prepared milk #9	**0**	

Prepared milk #10	**2**	Carbendazim; 2-ethylhexyl Diphenyl Phosphate

Table S6. List of residues and contaminants (n = 109) tentatively identified (level 2a) with their frequency of occurrence on 40 samples (20 seafood products and 20 dairy products) by suspected screening

Type of chemical	Compound	Frequency of appearance (%)	Sample(s)
Alkaloids	1-acetyl beta carboline	**5**	Powdered milk #9 ; Prepared milk #9
	Anabaenopeptin A	**2.5**	Boiled mussels
	Caffeine	**7.5**	Powdered milk #1 ; Powdered milk #2 ; Powdered milk #4
	Dehydrosalsolidine	**2.5**	Scallops
	Guan-fu base Y	**2.5**	Mussels
	Harman	**7.5**	Scallops ; Anchovy ; Boiled mussels
	Harmane	**2.5**	Powdered milk #3
	Harmol	**5**	Powdered milk #1 ; Powdered milk #5
	Homarine	**22.5**	Oysters ; Scallops ; Lobster ; Mussels Prawn ; Scallops ; Sea almond ; Boiled mussels ; Scallops
	Humantenine	**2.5**	Prepared milk #5
	L-Oxonoreleagnine	**2.5**	Prawn
	Lupanine	**15**	Sole ; Sole ; Powdered milk #2 ; Powdered milk #4; Powdered milk #6; Prepared milk #6
	Norharman	**17.5**	Scallops ; Anchovy ; Steamed salmon ; Boiled mussels ; Powdered milk #4 ; Powdered milk #5; Prepared milk #3
	Piperine	**5**	Steamed salmon ; Powdered milk #2
	Reticulol	**2.5**	Powdered milk #5
	Sinapine	**2.5**	Powdered milk #8
	Theobromine	**12.5**	Powdered milk #1 ; Powdered milk #2 ; Powdered milk #4; Powdered milk #5; Prepared milk #4
	Theophylline	**2.5**	Sea almond
Drugs	4-Acetamidophenol	**2.5**	Powdered milk #7
	Acamprosate	**7.5**	Lobster ; Sea almond; Boiled mussels
	Acetaminophen	**5**	Prawn ; Scallops
	Acetylleucine	**2.5**	Smoked salmon
	Antipyrine	**5**	Mussels ; Prawn
	Crotetamide	**2.5**	Canned tuna
	Didanosine	**2.5**	Horse mackerel
	Ibuprofen	**2.5**	Steamed salmon
	Nandrolone	**5**	Oysters ; Canned tuna

	Norethindrone	**17.5**	Oysters ; Sea almond ; Canned tuna ; Steamed salmon ; Boiled mussels ; Scallops ; Powdered milk #3
	Norgestrel	**2.5**	Prepared milk #8
	Paracetamol	**5**	Sea almond ; Powdered milk #8
	Progesterone	**2.5**	Prepared milk #2
	Quinoline	**15**	Scallops ; Prawn ; Sea almond ; Powdered milk #3 ; Powdered milk #4; Prepared milk #1
	Salicylamide	**5**	Sea almond ; Boiled mussels
	Stavudine	**5**	Oysters ; Scallops
	VALPROIC ACID	**2.5**	Powdered milk #6
Drug metabolites	4-Acetamidoantipyrin	**2.5**	Mussels
	4-Acetamidophenol sulfate	**17.5**	Powdered milk #2 ; Powdered milk #5 ; Powdered milk #6; Prepared milk #2; Prepared milk #4; Prepared milk #5; Prepared milk #6
	5-Methoxysalicylic acid sulfate	**2.5**	Powdered milk #3
	Oxypurinol	**27.5**	Cod back ; Oysters ; Tuna ; Salmon ; Mussels ; Horse mackerel ; Crayfish ; Scallops ; Sea almond ; Sole ; Scallops
Industrial chemicals	1,10-Phenanthroline monohydrate	**2.5**	Powdered milk #1
	1,4-Cyclohexanedicarboxylic acid	**10**	Salmon ; Canned tuna ; Smoked salmon ; Powdered milk #7
	1,5-Naphthalenediamine	**7.5**	Prepared milk #5 ; Prepared milk #8 ; Prepared milk #10
	1-Dodecyl-2-pyrrolidinone	**2.5**	Sole
	1-Methoxy-3-carbaldehyde	**2.5**	Oysters
	1-naphthalenesulfonate	**17.5**	Tuna ; Sole ; Scallops ; Mussels ; Horse mackerel ; Sole ; Boiled mussels
	2,4,6-Trimethylbenzoic acid	**5**	Prepared milk #3 ; Prepared milk #4
	2,6-Di-tert-butyl-4-nitrophenol	**5**	Sole ; Powdered milk #8
	2,8-Dihydroxyquinoline	**17.5**	Powdered milk #1 ; Powdered milk #2 ; Powdered milk #4; Powdered milk #5; Powdered milk #6; Prepared milk #1; Prepared milk #2;
	2,8-Quinolinediol	**20**	Oysters ; Powdered milk #1 ; Powdered milk #2; Powdered milk #3; Powdered milk #4; Prepared milk #4; Prepared milk #5; Prepared milk #6
	2-Aminoacetophenone	**10**	Horse mackerel ; Powdered milk #2 ; Powdered milk #3 ; Prepared milk #8
	2-Aminophenol	**2.5**	Boiled mussels
	2-Hydroxy-4-methylpentanoic acid	**7.5**	Scallops ; Scallops ; Powdered milk #4
	2-Hydroxyacetophenone sulfate	**17.5**	Powdered milk #2; Powdered milk #3; Powdered milk #4; Powdered milk #5; Powdered milk #6; Prepared milk #1; Prepared milk #6
	2-Hydroxyanthraquinone	**2.5**	Scallops
	2-Hydroxybenzonitrile	**12.5**	Scallops ; Prawn ; Boiled mussels ; Powdered milk #5 ; Prepared milk #3

	2-Hydroxybenzothiazole	**5**	Prepared milk #1 ; Prepared milk #9
	2-Hydroxyisocaproic acid	**2.5**	Powdered milk #6
	2-Hydroxyoctanoic Acid	**15**	Tuna ; Anchovy ; Scallops ; Powdered milk #7 ; Powdered milk #10; Prepared milk #8
	2-Isopropylthioxanthone	**5**	Prepared milk #3 ; Prepared milk #4
	2-Methoxyphenol sulfate	**2.5**	Powdered milk #5
	2-Methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone	**7.5**	Powdered milk #2 ; Prepared milk #4 ; Prepared milk #5
	2-Naphthalenesulfonic acid	**5**	Lobster ; Crayfish
	2-Naphthylamine	**22.5**	Cod back ; Horse mackerel ; Prawn ; Sole ; Steamed salmon ; Powdered milk #4 ; Powdered milk #6; Prepared milk #7; Prepared milk #8
	2-Phenylacetamide	**5**	Oysters ; Scallops
	3-Hydroxy-2-Methyl-4-Pyrone	**7.5**	Powdered milk #5 ; Powdered milk #7 ; Prepared milk #5
	3-Methylbenzoic acid	**2.5**	Scallops
	4,4'-Bipyridine	**2.5**	Prawn
	4,4'-Sulfonyldiphenol	**2.5**	Tuna
	4-Aminophenol	**12.5**	Canned tuna ; Powdered milk #5 ; Powdered milk #8; Powdered milk #9; Powdered milk #10
	4-Hydroxycyclohexanecarboxylic Acid	**5**	Tuna ; Steamed salmon
	4-Methoxycinnamic acid	**2.5**	Canned tuna
	4-Methylcatechol	**10**	Powdered milk #1 ; Powdered milk #2 ; Powdered milk #4; Powdered milk #5
	4-Octylphenol	**32.5**	Oysters ; Salmon ; Mussels ; Horse mackerel ; Steamed salmon ; Powdered milk #4 ; Powdered milk #6; Powdered milk #7; Prepared milk #3; Prepared milk #4; Prepared milk #6; Prepared milk #8 Prepared milk #9
	4-Phenyl-3-buten-2-one	**2.5**	Powdered milk #7
	4-tert-Butylcatechol	**2.5**	Powdered milk #7
	5-Methyl-1H-benzotriazole	**2.5**	Prepared milk #5
	Benzamide	**2.5**	Prepared milk #4
	Benzophenone-4	**2.5**	Salmon
	Bisphenol S	**12.5**	Cod back ; Tuna ; Salmon ; Sole ; Scallops
	Capryloyl Glycine	**2.5**	Scallops
	Cyclamate	**2.5**	Cod back
	Diphenylphosphate	**30**	Sole ; Scallops; Lobster ; Prawn ; Canned tuna ; Steamed salmon ; Powdered milk #8 ; Powdered milk #9 ; Prepared milk #1; Prepared milk #2; Prepared milk #4; Prepared milk #10
	Ethylparaben	**2.5**	Powdered milk #3
	Isophorone	**2.5**	Boiled mussels
	Lauryl diethanolamide	**5**	Steamed salmon ; Boiled mussels

	Methylparaben	**5**	Powdered milk #5 ; Prepared milk #5
	Myristamine Oxide	**2.5**	Powdered milk #2
	Oleyl sarcosine	**10**	Cod back ; Tuna ; Lobster ; Crayfish
	Phenylbenzimidazole sulfonic acid	**2.5**	Prawn
	Sulfanilic acid	**2.5**	Scallops
	Triphenylphosphate	**2.5**	Powdered milk #8
	Tris(1,3-dichlorisopropyl)phosphate (TDCPP)	**2.5**	Prepared milk #2
	Undecanedioic acid	**40**	Cod back ; Oysters; Tuna; Sole; Scallops ; Salmon ; Mussels ; Horse mackerel ; Prawn ; Crayfish ; Scallops ; Sea almond ; Boiled mussels ; Scallops ; Smoked salmon ; Powdered milk #7
	Velvione	**5**	Canned tuna ; Prepared milk #1
Mycotoxins	Chaetoglobosin C	**2.5**	Horse mackerel
	Citrinin	**2.5**	Scallops
	Enniatin B	**12.5**	Canned tuna ; Powdered milk #5 ; Powdered milk #7; Powdered milk #9; Prepared milk #7
	Enniatin B1	**2.5**	Canned tuna
	Zearalenone	**2.5**	Tuna
Pesticides	Cyromazine	**5**	Mussels ; Prawn
	DEET	**2.5**	Powdered milk #4
	Dinoterb	**2.5**	Scallops
	Tembotrione	**2.5**	Crayfish
PFAS	Perfluorododecanoic acid (PFDoDA)	**2.5**	Crayfish
	Perfluorononanoic acid (PFNA)	**2.5**	Sole
	Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS)	**7.5**	Sole ; Horse mackerel ; Sole
	Perfluorotridecanoic acid (PFTrDA)	**5**	Crayfish ; Canned tuna
Transformation products (TPs)	Chlorothalonil-4-hydroxy	**2.5**	Powdered milk #4
	Ritalinic acid	**5**	Prawn ; Sea almond

Table S7. Results of the suspected screening of tentatively identified (2a) residues and contaminants in the 40 samples

Sample	Number of identified residues and contaminants	Tentatively identified residues and contaminants
Cod back	**6**	2-Naphthylamine; Bisphenol S; Cyclamate; Oleyl sarcosine; Oxypurinol; Undecanedioic acid

Oysters	**10**	1-Methoxy-3-carbaldehyde; 2,8-Quinolinediol ; 2-Phenylacetamide ; 4-Octylphenol ; Homarine ; Nandrolone ; Norethindrone ; Oxypurinol ; Stavudine; Undecanedioic acid
Tuna	**9**	1-naphthalenesulfonate ; 2-Hydroxyoctanoic Acid ; 4,4'-Sulfonyldiphenol; 4-Hydroxycyclohexanecarboxylic Acid; Bisphenol S ; Oleyl sarcosine ; Oxypurinol ; Undecanedioic acid ; Zearalenone
Sole	**7**	1-Dodecyl-2-pyrrolidinone ; 1-naphthalenesulfonate ; 2,6-Di-tert-butyl-4-nitrophenol; Diphenylphosphate; Lupanine; Perfluorooctanesulfonic acid ; Undecanedioic acid
Scallops	**13**	1-naphthalenesulfonate; 2-Hydroxyanthraquinone; 2-Hydroxybenzonitrile; 2-Phenylacetamide; Citrinin ; Dehydrosalsolidine ; Dinoterb ; Diphenylphosphate ; Harman ; Homarine ; Quinoline ; Stavudine ; Undecanedioic acid
Lobster	**5**	2-Naphthalenesulfonic acid ; Acamprosate ; Diphenylphosphate ; Homarine; Oleyl sarcosine
Salmon	**6**	1,4-Cyclohexanedicarboxylic acid ; 4-Octylphenol ; Benzophenone-4 ; Bisphenol S; Oxypurinol; Undecanedioic acid
Mussels	**9**	1-naphthalenesulfonate ; 4-Acetamidoantipyrin ; 4-Octylphenol ; Antipyrine ; Cyromazine; Guan-fu base Y; Homarine; Oxypurinol; Undecanedioic acid
Horse mackerel	**9**	1-naphthalenesulfonate ; 2-Aminoacetophenone ; 2-Naphthylamine ; 4-Octylphenol ; Chaetoglobosin C; Didanosine; Oxypurinol; Perfluorooctanesulfonic acid ; Undecanedioic acid
Prawn	**13**	2-Hydroxybenzonitrile ; 2-Naphthylamine ; 4,4'-Bipyridine ; Acetominophen ; Antipyrine ; Cyromazine ; Diphenylphosphate ; Homarine ; L-Oxonoreleagnine ; Phenylbenzimidazole sulfonic acid ; Quinoline ; Ritalinic acid ; Undecanedioic acid
Crayfish	**7**	2-Naphthalenesulfonic acid ; Oleyl sarcosine ; Oxypurinol; Perfluorododecanoic acid (PFDoDA) ; Perfluorotridecanoic acid (PFTrDA) ; Tembotrione ; Undecanedioic acid
Scallops	**7**	2-Hydroxy-4-methylpentanoic acid ; 3-Methylbenzoic acid; Homarine; Norharman; Oxypurinol; Sulfanilic acid; Undecanedioic acid
Sea almond	**10**	Acamprosate ; Homarine ; Norethindrone ; Oxypurinol ; Paracetamol ; Quinoline ; Ritalinic acid ; Salicylamide ; Theophylline ; Undecanedioic acid
Anchovy	**3**	2-Hydroxyoctanoic Acid ; Harman ; Norharman
Sole	**7**	1-naphthalenesulfonate ; 2-Naphthylamine ; Bisphenol S ; Lupanine; Oxypurinol; Perfluorononanoic acid; Perfluorooctanesulfonic acid
Canned tuna	**11**	1,4-Cyclohexanedicarboxylic acid ; 4-Aminophenol ; 4-Methoxycinnamic acid; Crotetamide; Diphenylphosphate; Enniatin B; Enniatin B1; Nandrolone ; Norethindrone; Perfluorotridecanoic acid (PFTrDA) ; Velvione
Steamed salmon	**9**	2-Naphthylamine ; 4-Hydroxycyclohexanecarboxylic Acid ; 4-Octylphenol ; Diphenylphosphate ; Ibuprofen ; Lauryl diethanolamide ; Norethindrone ; Norharman ; Piperine
Boiled mussels	**13**	1-naphthalenesulfonate ; 2-Aminophenol ; 2-Hydroxybenzonitrile ; Acamprosate ; Anabaenopeptin A; Harman; Homarine; Isophorone; Lauryl diethanolamide; Norethindrone; Norharman; Salicylamide; Undecanedioic acid
Scallops	**9**	2-Hydroxy-4-methylpentanoic acid ; 2-Hydroxyoctanoic Acid; Acetaminophen; Bisphenol S; Capryloyl Glycine; Homarine; Norethindrone; Oxypurinol; Undecanedioic acid
Smoked salmon	**3**	1,4-Cyclohexanedicarboxylic acid ; Acetylleucine ; Undecanedioic acid
Powdered milk #1	**7**	1,10-Phenanthroline monohydrate ; 2,8-Dihydroxyquinoline ; 2,8-Quinolinediol ; 4-Methylcatechol ; Caffeine ; Harmol ; Theobromine
Powdered milk #2	**12**	2,8-Dihydroxyquinoline ; 2,8-Quinolinediol ; 2-Aminoacetophenone ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 2-Methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone ; 4-Acetamidophenol sulfate ; 4-Methylcatechol ; Caffeine ; Lupanine ; Myristamine Oxide ; Piperine ; Theobromine

Powdered milk #3	**8**	2,8-Quinolinediol ; 2-Aminoacetophenone ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 5-Methoxysalicylic acid sulfate; Ethylparaben; Harmane; Norethindrone; Quinoline
Powdered milk #4	**14**	2,8-Dihydroxyquinoline; 2,8-Quinolinediol; 2-Hydroxy-4-methylpentanoic acid; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 2-Naphthylamine ; 4-Methylcatechol ; 4-Octylphenol ; Caffeine ; Chlorothalonil-4-hydroxy ; DEET ; Lupanine ; Norharman ; Quinoline ; Theobromine
Powdered milk #5	**14**	2,8-Dihydroxyquinoline ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 2-Hydroxybenzonitrile ; 2-Methoxyphenol sulfate ; 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Pyrone ; 4-Acetamidophenol sulfate ; 4-Aminophenol ; 4-Methylcatechol ; Enniatin B ; Harmol ; Methylparaben ; Norharman ; reticulol ; Theobromine
Powdered milk #6	**8**	2,8-Dihydroxyquinoline ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 2-Hydroxyisocaproic acid ; 2-Naphthylamine ; 4-Acetamidophenol sulfate ; 4-Octylphenol ; Lupanine ; Valproic Acid
Powdered milk #7	**9**	1,4-Cyclohexanedicarboxylic acid ; 2-Hydroxyoctanoic Acid ; 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Pyrone ; 4-Acetamidophenol ; 4-Octylphenol ; 4-Phenyl-3-buten-2-one ; 4-tert-Butylcatechol ; Enniatin B ; Undecanedioic acid
Powdered milk #8	**6**	2,6-Di-tert-butyl-4-nitrophenol ; 4-Aminophenol ; Diphenylphosphate ; Paracetamol ; Sinapine ; Triphenylphosphate
Powdered milk #9	**4**	1-acetyl beta carboline ; 4-Aminophenol ; Diphenylphosphate ; Enniatin B
Powdered milk #10	**2**	2-Hydroxyoctanoic Acid ; 4-Aminophenol
Prepared milk #1	**6**	2,8-Dihydroxyquinoline ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 2-Hydroxybenzothiazole ; Diphenylphosphate ; Quinolone ; Velvione
Powdered milk #2	**5**	2,8-Dihydroxyquinoline ; 4-Acetamidophenol sulfate ; Diphenylphosphate ; Progesterone ; Tris(1,3-dichlorisopropyl)phosphate (TDCPP)
Powdered milk #3	**5**	2,4,6-Trimethylbenzoic acid ; 2-Hydroxybenzonitrile ; 2-Isopropylthioxanthone ; 4-Octylphenol ; Norharman
Powdered milk #4	**9**	2,4,6-Trimethylbenzoic acid ; 2,8-Quinolinediol ; 2-Isopropylthioxanthone ; 2-Methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone; 4-Acetamidophenol sulfate ; 4-Octylphenol ; Benzamide ; Diphenylphosphate ; Theobromine
Powdered milk #5	**8**	1,5-Naphthalenediamine ; 2,8-Quinolinediol ; 2-Methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone; 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Pyrone; 4-Acetamidophenol sulfate; 5-Methyl-1H-benzotriazole ; Humantenine ; Methylparaben
Powdered milk #6	**5**	2,8-Quinolinediol ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 4-Acetamidophenol sulfate; 4-Octylphenol; Lupanine
Powdered milk #7	**2**	2-Naphthylamine ; Enniatin B
Powdered milk #8	**6**	2-Hydroxyoctanoic Acid ; 1,5-Naphthalenediamine ; 2-Aminoacetophenone ; 2-Naphthylamine; 4-Octylphenol; Norgestrel
Powdered milk #9	**3**	1-acetyl beta carboline ; 2-Hydroxybenzothiazole ; 4-Octylphenol
Powdered milk #10	**2**	1,5-Naphthalenediamine ; Diphenylphosphate

Fig. S1. Identification rates obtained in 20 seafood products spiked at 0.01 and 0.1 mg.kg^{-1} under optimised conditions.

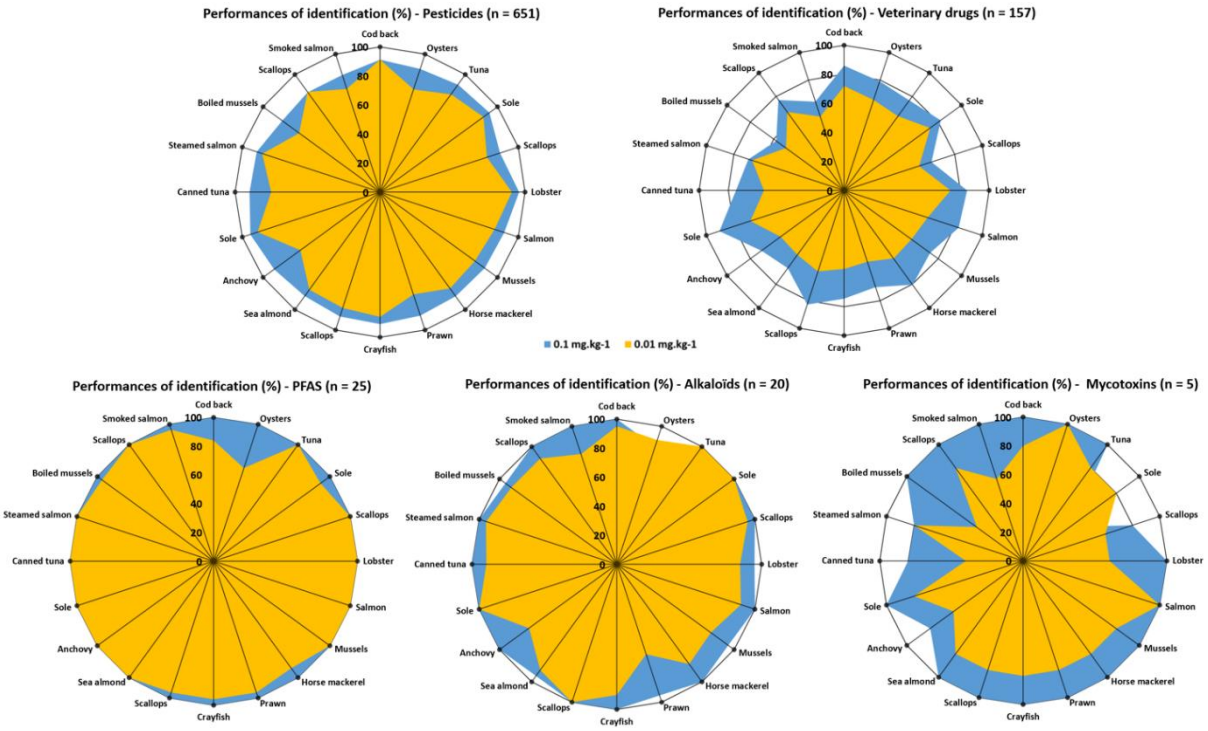


Fig. S2. Identification rates obtained in 20 dairy products spiked at 0.001, 0.01 and 0.1 mg.kg^{-1} under optimised conditions.

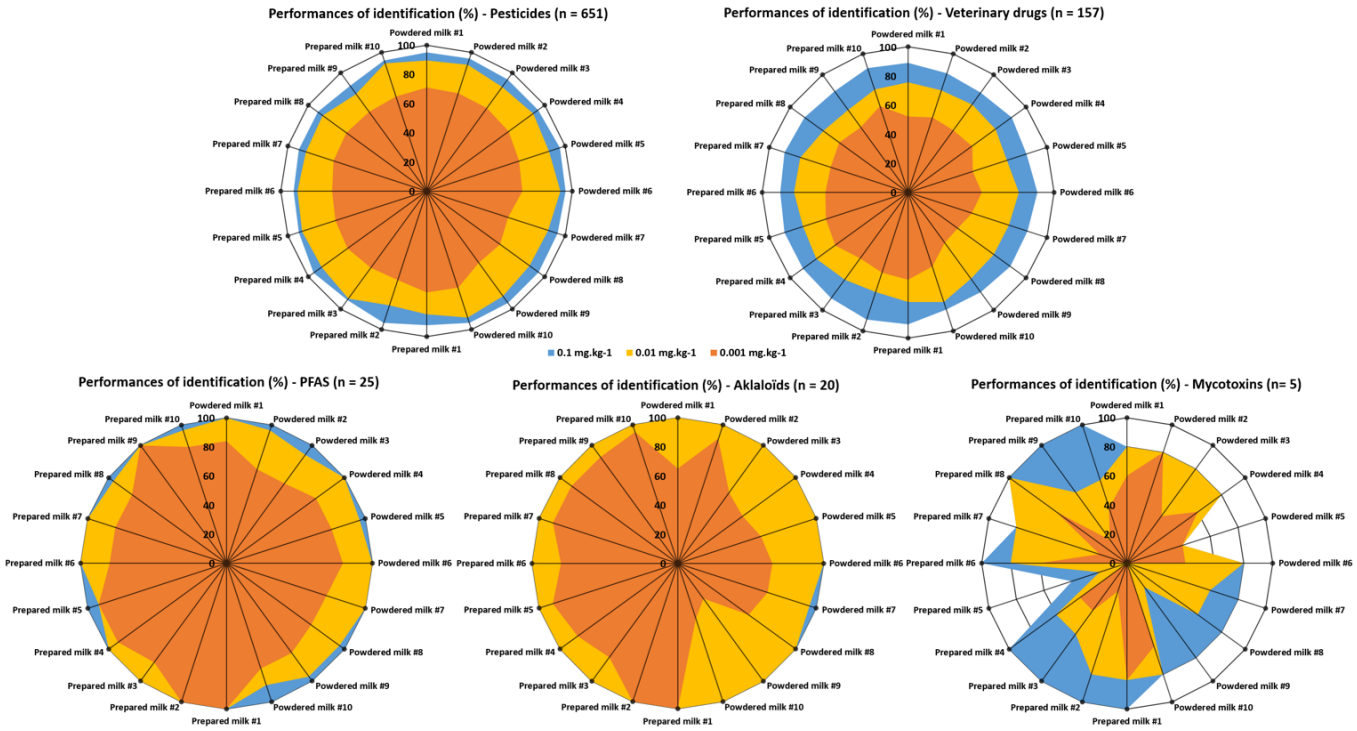


Fig. S3. Identification of Tris(2-chloroethyl) Phosphate) and Perfluorotridecanoic Acid (PFTrDA) in fish samples by targeted screening. **a)** Extracted ion chromatogram; **b)** Extracted ion chromatogram of standard; **c)** Isotopic pattern and mass error of the precursor ion; **d)** Experimental fragmentation spectrum (in blue) matched against the library spectrum produced by the injecting standard in solvent (in orange).

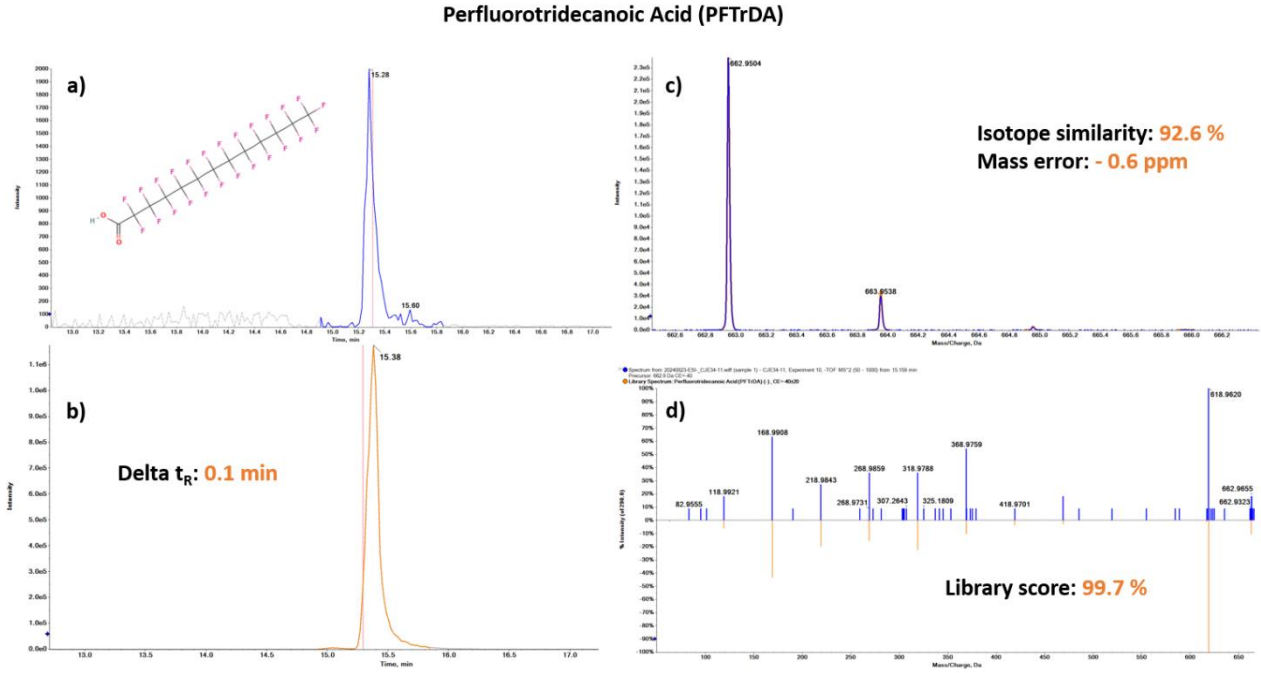
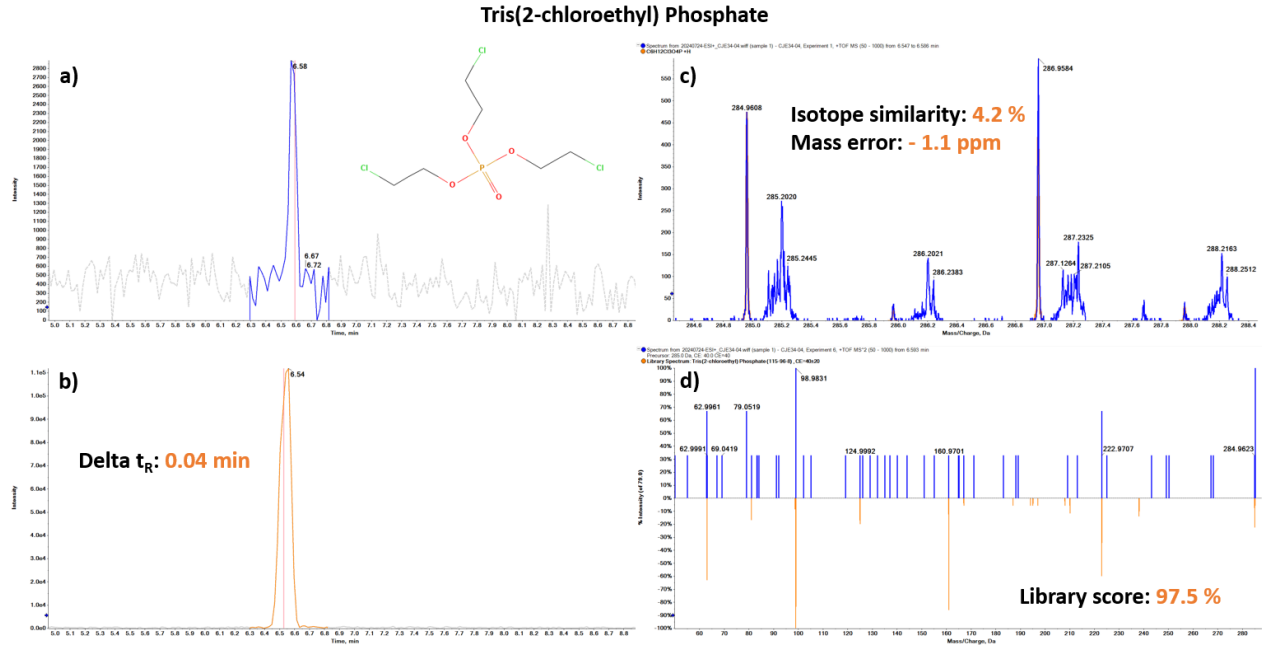


Fig. S4. Intensities of identified compounds (n = 18) in milk samples, prepared either from powdered milk (powdered) or as consumed before extraction (prepared). The data illustrate the impact of the preparation method on compound intensities.



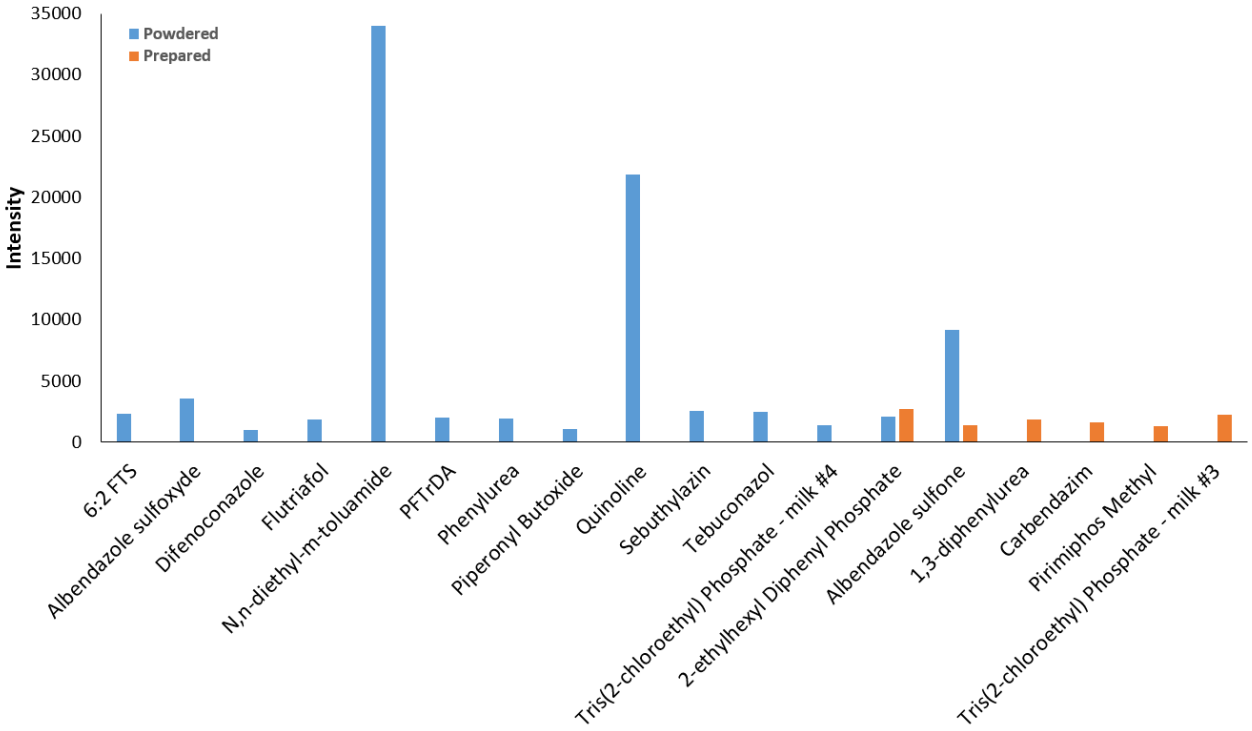
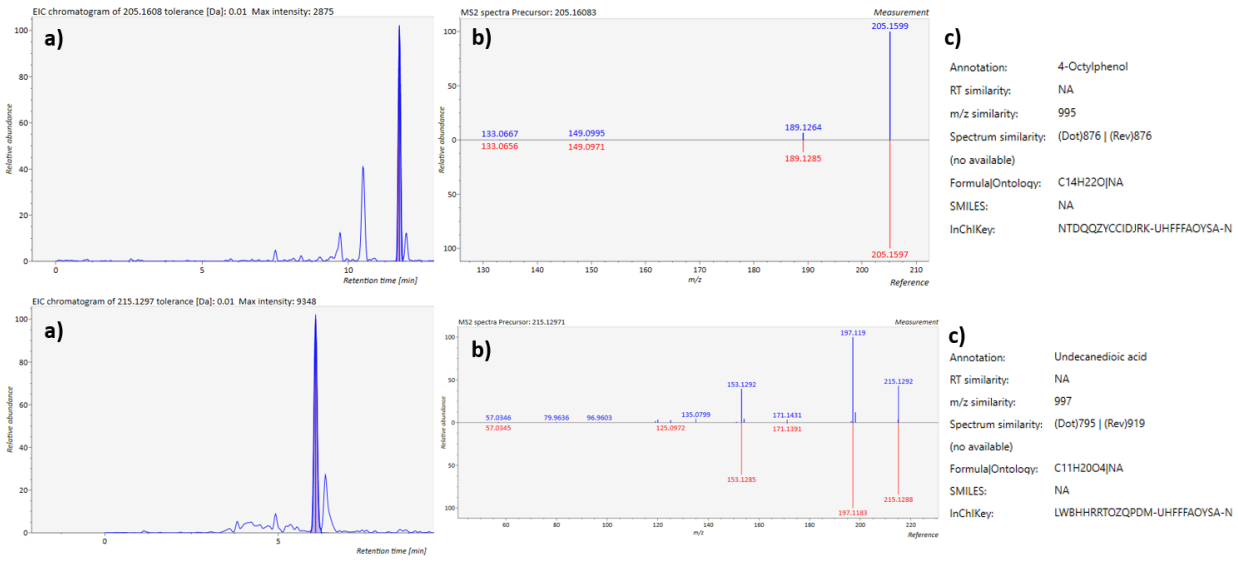


Fig. S5. Tentative identification of 4-Octylphenol and Undecanedioic acid in fish sample by suspected screening**. a)** Extracted ion chromatogram; **b)** Experimental fragmentation spectrum (in blue) matched against an available fragmentation spectrum acquired in other analytical conditions (in red); **c)** Additional information on the compound



Texte S1. Detailed results and discussion on the validation of substances in dairy products

These contaminants identified in non-spiked samples were excluded from validation process, and the LOI were therefore established for 840 contaminants instead of 858. The LOI were determined to be equal to 0.001 mg.kg^{-1} for 308 contaminants (37 %), at 0.01 mg.kg^{-1} for 301 contaminants (36 %), and at 0.1 mg.kg^{-1} for 102 contaminants (12 %) (**Figure 51**b). In total, 609 chemicals (73 %) had an LOI ≤ 0.01 mg.kg^{-1}. However, the method was able to identify certain compounds in most samples (n < 19). These LOI_{18} show an increase in the number of compounds of 6 % at 0.001 mg.kg^{-1}, 4 % at 0.01 mg.kg^{-1} and 2 % at 0.1 mg.kg^{-1}, for a total of 43 %, 40 % and 14 %, respectively, showing once again that only one sample affects the method's performance.

Depending on the sample, the identification rates ranged from 90 % to 95 % at 0.1 mg.kg^{-1}, 81 % to 89 % at 0.01 mg.kg^{-1}, and decreased to 57 % to 69 % at trace level (0.001 mg.kg^{-1}) (**Figure 51**d). No significant difference was observed in identification performance between powdered milk and the same milk prepared prior to extraction and analysis, showing that milk does not need to be prepared for analysis of these contaminants down to trace levels. However, looking at the range of compounds, the identification rates at 0.01 mg.kg^{-1} for veterinary drugs (74 %) and mycotoxins (67 %) are lower than those for pesticides (88 %), PFAS (97 %) and alkaloids (100 %), as for seafood products (Fig. S2). The results of this part of the work demonstrated the good capabilities of this method to warn of the presence of selected contaminants up to trace concentrations.

Annexes de l'Article 4 : Multi-platform screening strategies for confirmed identification and characterization of chemical diversity in french food

Table S1. Analytical parameters

Instrument	Parameter	Condition		
UHPLC	Column temperature	50 °C		
	Injection volume	10 µL		
	Flow rate	0.5 $mL.min^{-1}$		
	Mobile phase	A: H_2O containing 0.01% formic acid		
		B: ACN containing 0.01% formic acid		
		Time (min)	% A	% B
		0	90	10
		15	0	100
		18	0	100
		19	90	10
		23	90	10
Q-TOF-MS (ESI+/ESI-)	Ion source type	ESI		
	Ion spray voltage floating (ISVF)	(+) 5500 V, (-) 4500 V		
	Source temperature (TEM)	500 °C		
	Curtain gas (CUR)	30 psi		
	Nebulizing gas (GS1)	40 psi		
	Heater gas (GS2)	45psi		
	Declustering potential (DP)	(+/-) 80 eV		
	Acquisition mode	IDA		
	TOF MS range (Da)	50-1000		
	Full scan collision energy (CE)	(+/-) 10 eV		
	MS accumulation time (ms)	490		
	TOF MS/MS range (Da)	50-1000		
	Collision energy (CE) for MS/MS	(+/-) 40 ± 20 eV		
	MS/MS accumulation time (ms)	40		
	Cycle time (ms)	940		

Table S2. List of residues and contaminants (n = 20) unequivocally identified with their frequency of occurrence in 20 food samples by targeted screening

Type of chemical	Compound	Frequency of appearance (%)	Sample(s)
Pesticide residues	Carbaryl	**5**	**Cooked mussels**
	Carbendazim	**5**	**Back of cod**
	Hexaflumuron	**5**	**Cooked mussels**
	Piperonyl butoxide	**10**	**Egg #1 ; Egg #3**
	Terbutryn	**20**	**Egg #2 ; Back of cod ; Butcher steak (beef) ; Plain cow's milk yoghurt**
	Thiabendazole	**5**	**Butcher steak (beef)**
PFAS	Heptafluorobutyric Acid (PFBA)	**5**	**Egg #1**
	Perfluoro-1-butanesulfonic Acid (PFBS)	**5**	**Smoked salmon**
	Perfluorooctanesulfonic Acid (PFOS)	**30**	**Cooked shrimps ; Trout fillet ; Back of cod** ; **Alaska hake fillet ; Grated Emmental ; Plain cow's milk yoghurt**
	Perfluoroundecanoic Acid (PFUnDA)	**5**	**Alaska hake fillet**
Veterinary drugs	Closantel	**5**	**Sardin**
	Flubendazole	**5**	**Egg #2**
	Hydroxy flubendazole	**5**	**Egg #2**
	Nigericin	**5**	**Egg #3**
	Oxfendazole	**5**	**Plain cow's milk yoghurt**
	Quinine	**5**	**Trout fillet**
	Rafoxanide	**20**	**Egg #1 ; Egg #3 ; Trout fillet ; Sardin**
	Rifaximin	**10**	**Egg #3 ; Cooked shrimps**
	Salinomycin	**5**	**Egg #3**
	Sulfadimerazine	**5**	**Egg #2**

Table S3. Results of the targeted screening of unequivocally identified residues and contaminants in the 40 samples

Sample	Number	Unequivocally identified residues and contaminants
Egg #1	**3**	Heptafluorobutyric Acid (PFBA); Rafoxanide; Piperonyl butoxide
Egg #2	**4**	Flubendazole; Hydroxy flubendazole; Sulfadimerazine; Terbutryn
Egg #3	**5**	Nigericin; Rafoxanide; Rifaximin; Salinomycin; Piperonyl butoxide
Cooked shrimps	**2**	Perfluorooctanesulfonic Acid (PFOS); Rifaximin
Scallops	**0**	
Raw mussels	**0**	
Cooked mussels	**2**	Carbaryl; Hexaflumuron
Trout fillet	**3**	Perfluorooctanesulfonic Acid (PFOS); Quinine; Rafoxanide
Back of cod	**3**	Perfluorooctanesulfonic Acid (PFOS); Carbendazim; Terbutryn
Alaska hake fillet	**2**	Perfluoroundecanoic Acid (PFUnDA); Perfluorooctanesulfonic Acid (PFOS)
Smoked salmon	**1**	Perfluoro-1-butanesulfonic Acid (PFBS)
Sardin	**2**	Closantel; Rafoxanide
Butcher steak (beef)	**3**	Thiabendazole; Terbutryn; Thiabendazole
Cotelettes (lamb)	**0**	
White ham with rind (pork)	**0**	
Chipolata (pork)	**0**	
Thigh with skin (chicken)	**0**	
Grated emmental	**1**	Perfluorooctanesulfonic Acid (PFOS)
Goat's cheese buche	**0**	
Plain cow's milk yoghurt	**3**	Perfluorooctanesulfonic Acid (PFOS); Oxfendazole; Terbutryn

Table S4. List of residues and contaminants (n = 72) tentatively identified (level 2a) with their frequency of occurrence in 20 food samples by suspected screening

Type of chemical	Compound	Frequency of appearance (%)	Sample(s)
Alkaloid metabolites	2-Hydroxypyridine	**5**	White ham with rind (pork)
	Benzoylecgonine	**10**	Scallops; Back of cod
	Ecgonine	**5**	Butcher steak (beef)
Alkaloids	1-acetyl beta carboline	**5**	Cooked mussels
	Caffeine	**10**	White ham with rind (pork); Plain cow's milk yoghurt
	Cocaine	**15**	Cooked shrimps; Scallops; Back of cod
	Harmol	**5**	Grated emmental
	Homarine	**20**	Scallops; Raw mussels; Cooked mussels; Sardin
	Norharmane	**5**	Back of cod
	Piperanine	**5**	Chipolata (pork)
	Piperidine	**5**	Plain cow's milk yoghurt
	Piperine	**20**	Scallops; Butcher steak (beef); White ham with rind (pork); Chipolata (pork)
	Piperyline	**5**	Chipolata (pork)
	Quinoline	**25**	Egg #1; Egg #2; Egg #3; Cooked mussels; Butcher steak (beef)
	Reticuline	**5**	Chipolata (pork)
	Rhoeadine	**5**	Egg #3
	Theobromine	**15**	White ham with rind (pork); Chipolata (pork); Plain cow's milk yoghurt
	Theophylline	**5**	Egg #3
	Trigenelline	**5**	Cooked mussels
Drug metabolites	4-Acetamidophenol sulfate	**10**	Egg #3; Grated emmental
	Oxypurinol	**25**	Raw mussels; Trout fillet; Sardin; Butcher steak (beef); Thigh with skin (chicken)
Drugs	Acamprosate	**20**	Scallops; Raw mussels; Cooked mussels; Sardin
	Acetaminophen	**5**	Cotelettes (lamb)
	Nateglinide	**5**	Grated emmental
	Progesterone	**10**	Egg #1; Egg #2
Industrial chemicals	1,10-Phenanthroline monohydrate	**5**	Plain cow's milk yoghurt
	1-naphthalenesulfonate	**45**	Cooked shrimps; Scallops; Raw mussels; Trout fillet; Alaska hake fillet; Smoked salmon; Butcher steak (beef); Cotelettes (lamb); White ham with rind (pork)
	2,4-Di-tert-butylphenol	**10**	Back of cod; Butcher steak (beef)
	2,6-Di(butan-2-yl)phenol	**5**	Scallops

	2,8-Quinolinediol	**40**	Egg #1; Egg #2; Egg #3; Cooked shrimps; Cotelettes (lamb); Grated Emmental; Goat's cheese buche; Plain cow's milk yoghurt
	2-Aminophenol	**20**	Raw mussels; Cooked mussels; Butcher steak (beef); Cotelettes (lamb)
	2-Hydroxyacetophenone sulfate	**30**	Egg #1; Egg #2; Egg #3; Grated Emmental; Goat's cheese buche; Plain cow's milk yoghurt
	2-Hydroxybenzonitrile	**15**	Cooked mussels; Butcher steak (beef); Goat's cheese buche
	2-Methoxyphenol sulfate	**15**	Egg #1; Egg #2; Egg #3
	2-Methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone	**20**	Egg #2; Egg #3; Raw mussels; Butcher steak (beef)
	2-naphthalenesulfonate	**10**	Back of cod; Thigh with skin (chicken)
	2-Naphthylamine	**5**	Goat's cheese buche
	2-Phenylacetamide	**15**	Cooked mussels; Thigh with skin (chicken); Plain cow's milk yoghurt
	3-Hydroxy-2-Methyl-4-Pyrone	**5**	Plain cow's milk yoghurt
	3-Hydroxy-2-naphthoic o-anisidide	**5**	Scallops
	4-Acetoxyphenol	**10**	Cooked mussels; Smoked salmon
	4-Hydroxycyclohexanecarboxylic acid	**5**	Sardin
	4-Methoxy-2-methylaniline	**5**	Scallops
	4-Methylcatechol	**5**	Plain cow's milk yoghurt
	4-Nitrophenol	**5**	Egg #1
	4-tert-Butylcatechol	**5**	Chipolata (pork)
	Benzyl alcohol sulphate	**10**	Egg #2; Egg #3
	Bisphenol S	**20**	Trout fillet; Scallops; Butcher steak (beef); Cotelettes (lamb)
	Denatonium	**45**	Egg #1; Cooked shrimps; Scallops; Back of cod; Butcher steak (beef); Cotelettes (lamb); White ham with rind (pork); Grated Emmental; Plain cow's milk yoghurt
	Dicyclohexylurea	**5**	Cooked shrimps
	Diphenylamine	**5**	Egg #2
	Ethyl sulfate	**10**	Egg #1 ; Sardin
	Lauramidopropyl betaine	**40**	Egg #3; Cooked shrimps; Scallops; Back of cod; Butcher steak (beef); White ham with rind (pork); Grated Emmental; Plain cow's milk yoghurt
	Lauryl sulfate	**30**	Egg #3; Scallops; Raw mussels; Back of cod; Alaska hake fillet; Butcher steak (beef)
	Lauryldimethylamine Oxide	**30**	Egg #1; Egg #2; Scallops; Back of cod; Butcher steak (beef); Plain cow's milk yoghurt
	Methyl trans-styryl ketone	**15**	Trout fillet; Alaska hake fillet; Smoked salmon

	N-Butylbenzenesulfonamide	**5**	Grated emmental
	Potassium sorbate	**10**	Cooked mussels; Goat's cheese buche
	Sulfanilic acid	**5**	Scallops
	Trifluoromethanesulfonic acid	**10**	Thigh with skin (chicken); Plain cow's milk yoghurt
	Triphenylphosphine oxide	**10**	Egg #2 ; Egg #3
	Undecanedioic acid	**30**	Raw mussels; Alaska hake fillet; Smoked salmon; Sardin; Cotelettes (lamb); Chipolata (pork)
	Velvione	**5**	Cooked shrimps
	Zeranol	**5**	Chipolata (pork)
Mycotoxins	Kojic Acid	**5**	Sardin
	Scopoletin	**5**	Grated emmental
Pesticides	Bentazone	**5**	Alaska hake fillet
	Dinoterb	**15**	Egg #2; Egg #3; Butcher steak (beef)
	Terbutryn	**5**	Back of cod
PFAS	6:2 Fluorotelomer sulfinyl amido sulfonic acid (6:2 FTSAS)	**5**	Trout fillet
Transformation products (TPs)	2-Methylhippuric acid	**5**	Smoked salmon
	Chlorothalonil-4-hydroxy	**5**	Goat's cheese buche

Table S5. Results of the suspected screening of tentatively (level 2a) identified residues and contaminants in the 40 samples

Sample	Number	Tentatively identified residues and contaminants
Egg #1	**9**	2,8-Quinolinediol ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 2-Methoxyphenol sulfate ; 4-Nitrophenol ; Ethyl sulfate ; Denatonium ; Lauryldimethylamine Oxide ; Progesterone ; Quinoline
Egg #2	**12**	2,8-Quinolinediol ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 2-Methoxyphenol sulfate ; Benzyl alcohol sulphate ; Dinoterb ; 2-Methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone ; Diphenylamine ; Lauryldimethylamine Oxide ; Progesterone ; Quinoline ; Triphenylphosphine oxide
Egg #3	**13**	2,8-Quinolinediol ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 2-Methoxyphenol sulfate ; 4-Acetamidophenol sulfate ; Benzyl alcohol sulphate ; Dinoterb ; Lauryl sulfate ; Theophylline ; 2-Methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone ; Lauramidopropyl betaine ; Quinoline ; Rhoeadine ; Triphenylphosphine oxide
Cooked shrimps	**7**	1-naphthalenesulfonate ; 2,8-Quinolinediol ; Cocaine ; Denatonium ; Dicyclohexylurea ; Lauramidopropyl betaine ; Velvione
Scallops	**15**	1-naphthalenesulfonate ; 2,6-Di(butan-2-yl)phenol ; 3-Hydroxy-2-naphthoic o-anisidide ; Acamprosate ; Bisphenol S ; Lauryl sulfate ; Sulfanilic acid ; 4-Methoxy-2-methylaniline ; Benzoylecgonine ; Cocaine ; Denatonium ; Homarine ; Lauramidopropyl betaine ; Lauryldimethylamine Oxide ; Piperine
Raw mussels	**8**	1-naphthalenesulfonate ; 2-Aminophenol ; Acamprosate ; Lauryl sulfate ; Oxypurinol ; Undecanedioic acid ; 2-Methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone ; Homarine

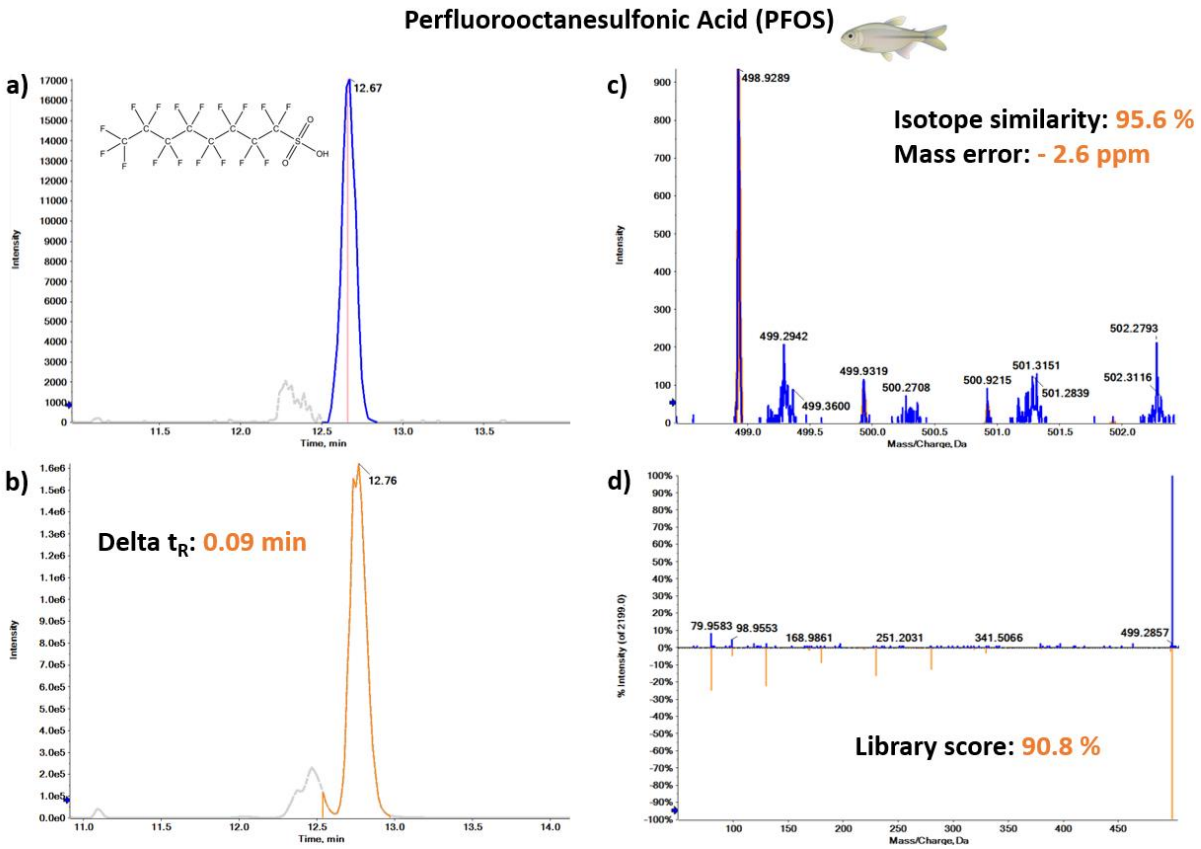
Cooked mussels	**10**	2-Aminophenol ; 4-Acetoxyphenol ; Acamprosate ; 1-acetyl beta carboline ; 2-Hydroxybenzonitrile ; 2-Phenylacetamide ; Homarine ; Potassium Sorbate ; Quinoline ; Trigenelline
Trout fillet	**5**	1-naphthalenesulfonate ; 6:2 Fluorotelomer sulfinyl amido sulfonic acid ; Oxypurinol ; Methyl trans-styryl ketone
Back of cod	**10**	2,4-Di-tert-butylphenol ; 2-naphthalenesulfonate ; Lauryl sulfate ; Benzoylecgonine ; Cocaine ; Denatonium ; Lauramidopropyl betaine ; Lauryldimethylamine Oxide ; Norharmane ; Terbutryn
Alaska hake fillet	**5**	1-naphthalenesulfonate ; Bentazone ; Lauryl sulfate ; Undecanedioic acid ; Methyl trans-styryl ketone
Smoked salmon	**5**	1-naphthalenesulfonate ; 2-Methylhippuric Acid ; 4-Acetoxyphenol ; Undecanedioic acid ; Methyl trans-styryl ketone
Sardin	**7**	4-Hydroxycyclohexanecarboxylic Acid ; Acamprosate ; Ethyl Sulfate ; Oxypurinol ; Undecanedioic acid ; Homarine ; Kojic Acid
Butcher steak (beef)	**15**	1-naphthalenesulfonate ; 2,4-Di-tert-butylphenol ; 2-Aminophenol ; Bisphenol S ; Dinoterb ; Ecgonine ; Lauryl sulfate ; Oxypurinol ; 2-Hydroxybenzonitrile ; 2-Methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone ; Denatonium ; Lauramidopropyl betaine ; Lauryldimethylamine Oxide ; Piperine ; Quinoline
Cotelettes (lamb)	**7**	1-naphthalenesulfonate ; 2,8-Quinolinediol ; 2-Aminophenol ; Bisphenol S ; Undecanedioic acid ; Acetaminophen ; Denatonium
White ham with rind (pork)	**7**	1-naphthalenesulfonate ; 2-Hydroxypyridine ; Caffeine ; Denatonium ; Lauramidopropyl betaine ; Piperine ; Theobromine
Chipolata (pork)	**8**	Undecanedioic acid ; Zeranol ; 4-tert-Butylcatechol ; Piperanine ; Piperine ; Piperyline ; Reticuline ; Theobromine
Thigh with skin (chicken)	**4**	2-naphthalenesulfonate ; Oxypurinol ; Trifluoromethanesulfonic acid ; 2-Phenylacetamide
Grated emmental	**10**	2,8-Quinolinediol ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 4-Acetamidophenol sulfate ; Nateglinide ; N-Butylbenzenesulfonamide ; Denatonium ; Harmol ; Lauramidopropyl betaine ; Scopoletin
Goat's cheese buche	**7**	2,8-Quinolinediol ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; Chlorothalonil-4-hydroxy ; 2-Hydroxybenzonitrile ; 2-Naphthylamine ; Potassium Sorbate
Plain cow's milk yoghurt	**14**	2,8-Quinolinediol ; 2-Hydroxyacetophenone sulfate ; 4-Methylcatechol ; Trifluoromethanesulfonic acid ; 1,10-Phenanthroline monohydrate ; 2-Phenylacetamide ; 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Pyrone ; Caffeine ; Denatonium ; Lauramidopropyl betaine ; Lauryldimethylamine Oxide ; Piperidine ; Theobromine

Table S6. List of chemicals (n = 17) identified (level 1) by complementary targeted screening

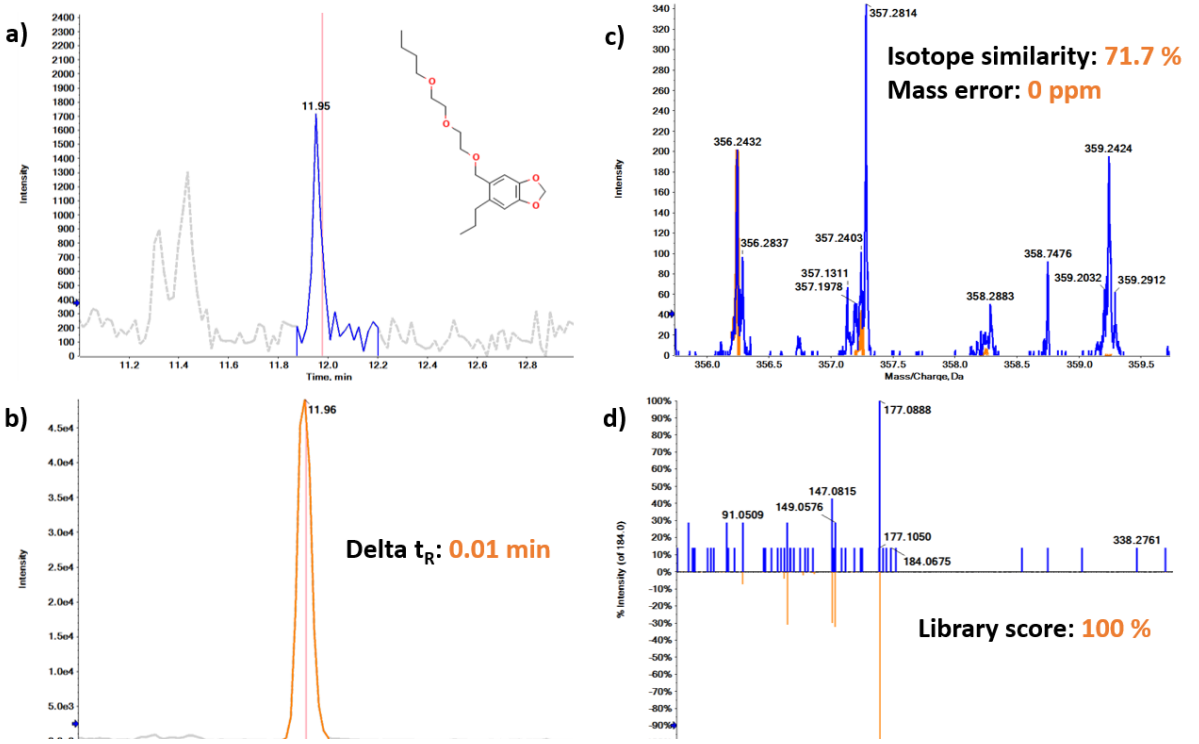
ESI	Name	Abbreviation	RT in sample (min)	Formula	m/z
Unequivocally identified from suspect list					
ESI+	Progesterone	Progesterone	17,44	C21H30O2	315,2319
ESI-	4-Nitrophenol	4-Nitrophenol	12,379	$C_6H_5NO_3$	138,0196
ESI-	Bisphenol S	BPS	11.904	$C_{12}H_{10}O_4S$	249,0224
ESI-	Lauryl sulfate	Lauryl sulfate	15,781	$C_{12}H_{26}O_4S$	265,1479
Unequivocally identified					
ESI+	Dibutyl phthalate	DBP	17.107	$C_{16}H_{22}O_4$	279,1596
ESI+	Diisobutyl phthalate	DiBP	16.907	$C_{16}H_{22}O_4$	279,1596
ESI+	Bis(2-ethylhexyl) adipate	DEHA	18.663	$C_{22}H_{42}O_4$	371,3162
ESI+	di(2-ethylhexyl) phthalate	DEHP	18.666	$C_{24}H_{38}O_4$	391,2848
ESI+	Bis(2-propylheptyl) phthalate	DPHP	19.426	$C_{28}H_{46}O_4$	447,3482

ESI+	N-(p-Toluenesulfonyl)-N'-(3-p-toluenesulfonyloxyphenyl) urea	PF-201	14,836	$C_{21}H_{20}N_2O_6S_2$	461,0836
ESI+	Caprolactam	Caprolactam	9,105	$C_6H_{11}NO$	114,0916
ESI+	Triethylene glycol	Triethylene glycol	5,791	$C_6H_{14}O_4$	151,0966
ESI+	Tetraethylene glycol	Tetraethylene glycol	7,356	$C_8H_{18}O_5$	195,1231
ESI-	4-(4-Isopropoxyphenylsulfonyl)phenol	D-8	14.928	$C_{15}H_{16}O_4S$	291,069
ESI-	2,2'-Diallyl-4,4'-sulfonyldiphenol	TGSA	15.090	$C_{18}H_{18}O_4S$	329,0848
ESI-	Benzenesulfonamide	NKK-1304	15,138	$C_{19}H_{17}N_3O_3S$	366,0918
ESI-	Bisphenol A	BPA	14.561	$C_{15}H_{16}O_2$	227,1068

Figure S1. Identification of Perfluorooctanesulfonic Acid (PFOS) in a fish sample (Back of cod), Piperonyl butoxide and Rafoxanide in an egg sample (#3) by targeted screening. **a)** Extracted ion chromatogram; **b)** Extracted ion chromatogram of standard; **c)** Isotopic pattern and mass error of the precursor ion; **d)** Experimental fragmentation spectrum (in blue) matched against the library spectrum produced by the injecting standard in solvent (in orange).



Piperonyl butoxide



Rafoxanide

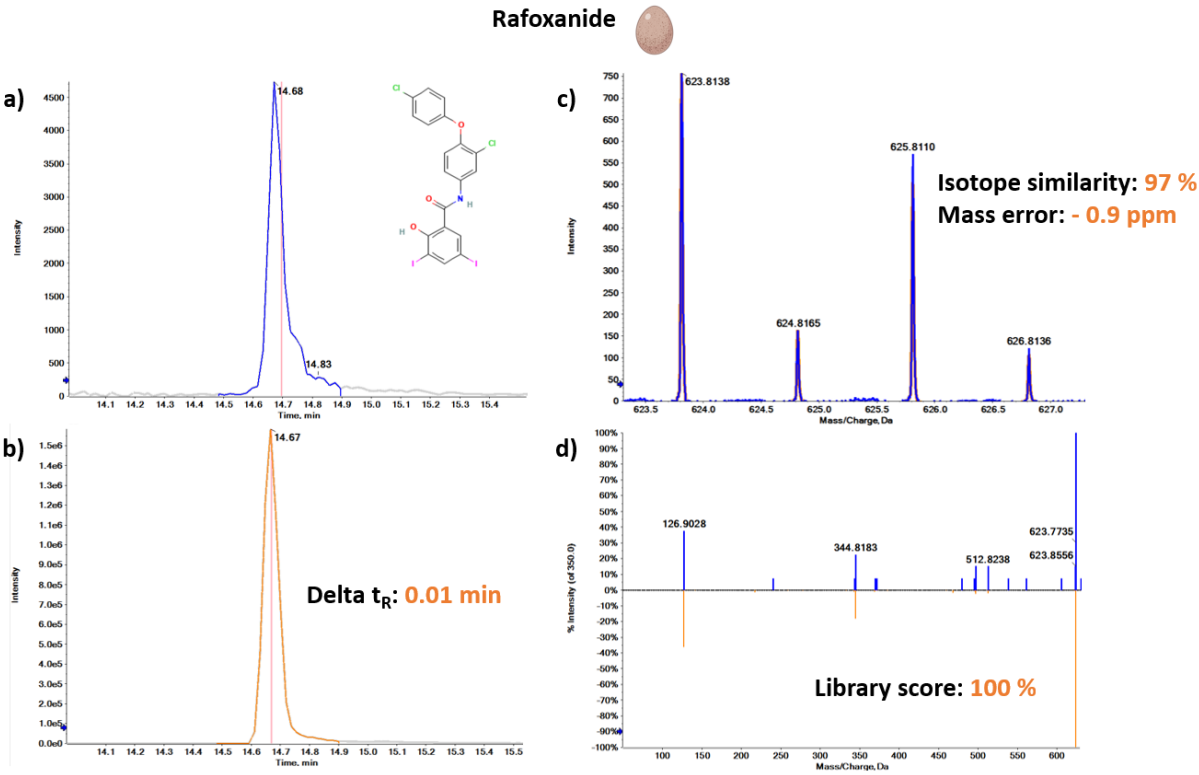


Figure S2. Tentative identification of 1-naphtalenesulfonate in a scallop sample and 2,8-Quinolinediol in an egg sample (#2) by suspected screening**. a)** Extracted ion chromatogram; **b)** Experimental fragmentation spectrum (in blue) matched against an available fragmentation spectrum acquired in other analytical conditions (in red); **c)** Additional information on the compound

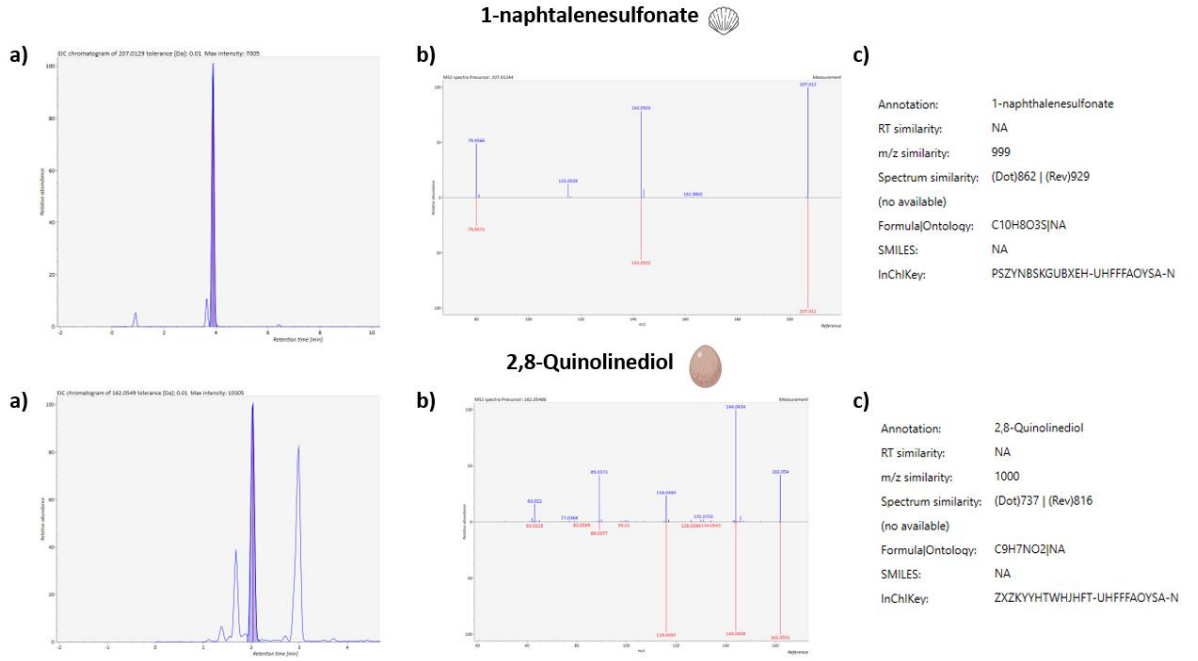


Figure S3. Identification of Camprolactam in sample #15. **a)** Extracted ion chromatogram of standard and extract; **b)** Experimental fragmentation spectrum matched against the spectrum of the injecting in solvent

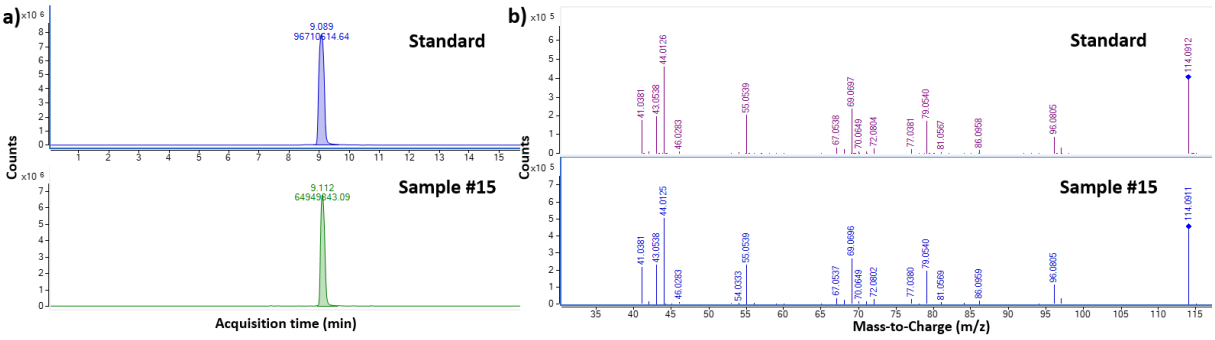
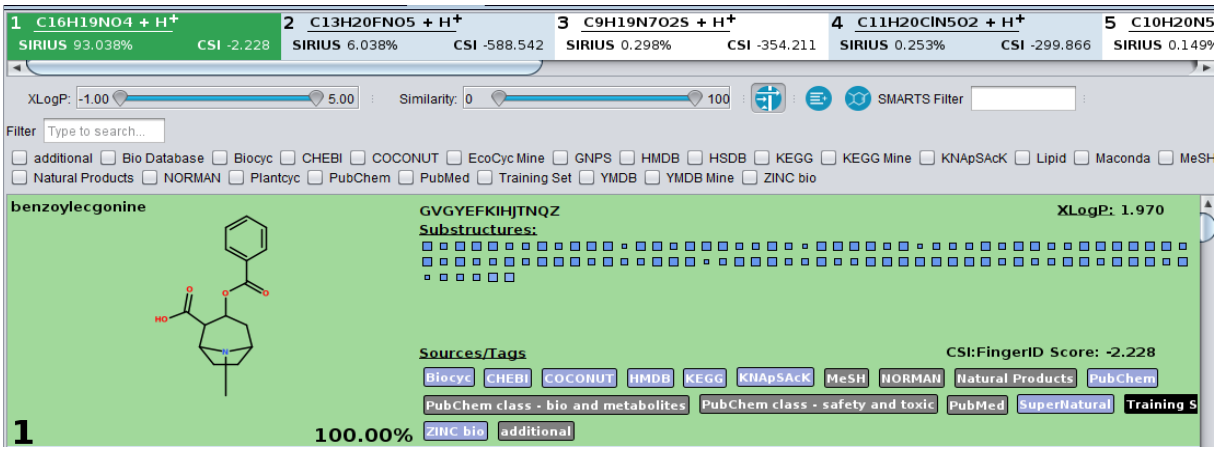


Figure S4. A screenshot of benzoylecgonine with 100% Siruis prediction score



Text S1. Description of the analytical and data processing workflow

Data acquisition: The Liquid Chromatography (LC) separation was performed using a Poroshell 120 Phenyl Hexyl analytical column (Agilent Technologies; 100 mm × 3.0 mm, particle size 2.7 µm), with a Poroshell 120 Phenyl Hexyl guard column (Agilent Technologies; 10 mm × 3.0 mm, particle size 2.7 µm), utilizing gradient elution with a flow rate set at 0.2 mL/min. The column temperature was consistently maintained at 20 °C. The mobile phase consisted of water (solvent A) and methanol (solvent B), each containing 5 mM ammonium acetate. The specified elution gradient was as follows: an initial 5% B (0–1 min), linear increase to 100% B (1–15 min), sustaining at 100% B (15–20 min), and then followed by a restoration to 5% B over 5 minutes (20–25 min). The sample injection volume was 10 µL.

The 6545 QToF-MS system was operated under both positive (ESI+) and negative (ESI-) electrospray ionization modes. The targeted analysis was conducted respectively in ESI- and ESI+ modes. The drying gas flow rate, utilizing nitrogen at 325 °C, was established at 5 L min^{-1}. Data collection was performed in both centroid and profile modes using a full scan mode with fragmentor energies of 150 V (ESI-) and 100 V (ESI-), across a mass-to-charge ratio (*m/z*) that ranged from 50 to 1700. To maintain continuous accuracy, mass recalibration was carried out using reference ions (*m/z* at 121.0508 and 922.0098 in ESI+; 112.9856 and 1033.9881 in ESI-) sourced from the API-TOF reference mass solution (Agilent Technologies).

The MS/MS data pertaining to the non-targeted suspects list were acquired through a targeted MS/MS methodology, employing three different collision energies of 10, 20, and 40 V. Detailed information includes: spectral parameters settings, with a mass range for MS at *m/z* 70–1700, with an acquisition rate of 5 spectra per second, and a mass range for MS/MS at *m/z* 40–1700, with an acquisition rate of 4 spectra per second; regarding the targeted list settings, the charge state (Z) was set at 1, the delta retention time was set at 0.4 minutes, and the Iso. Width was set as narrow (1.3 *m/z*).

Prior to sample injections, the instrument underwent tuning. A mass calibration check was performed for TOF, in both ESI+ and ESI- modes, within the mass range of 50–1700 *m/z*. Signal intensities were recorded, and in instances where significant deviations from previous batch signals were detected, prompt maintenance of the instrument was duly conducted.

Data processing: Workflow 1: Suspect screening analysis of MS-full scan data was performed using the software MassHunter Profinder B.10.00 from Agilent Technologies. Suspect screening of all data including blanks was conducted in the "Batch Targeted Feature Extraction" mode (RT tolerance ± 0.15 min, mass tolerance ± 10 ppm, absolute height threshold ≥ 300 counts, score ≥ 80), using the library *Extractables & Leachables PCDL* (Agilent Technologies). Three suspected compounds that have standard available in the lab were selected for MS/MS fragmentation and comparison with analytical standards.

Workflow 2: Suspect screening analysis of MS-full scan data was performed using the software MassHunter Profinder B.10.00 from Agilent Technologies. Suspect screening of all data including blanks was conducted in the "Batch Targeted Feature Extraction" mode (RT tolerance ± 0.15 min, mass tolerance ± 10 ppm, absolute height threshold ≥ 300 counts, score ≥ 80), using chemical formula of the 74 suspect compounds from Sciex LC-QTOF-MS. The suspected compounds that have similar abundance distribution with data from Sciex LC-QTOF-MS were selected for MS/MS fragmentation followed by structure prediction by SIRIUS [1,2].

1 Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A.A., Melnik, A.V., Meusel, M., Dorrestein, P.C., Rousu, J., Böcker, S., 2019. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. Nature Methods 16, 299–302. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8

2 Schmid, R., Heuckeroth, S., Korf, A., Smirnov, A., Myers, O., Dyrlund, T.S., Bushuiev, R., Murray, K.J., Hoffmann, N., Lu, M., Sarvepalli, A., Zhang, Z., Fleischauer, M., Dührkop, K., Wesner, M., Hoogstra, S.J., Rudt, E., Mokshyna, O., Brungs, C., Ponomarov, K., Mutabdžija, L., Damiani, T., Pudney, C.J., Earll, M., Helmer, P.O., Fallon, T.R., Schulze, T., Rivas-Ubach, A., Bilbao, A., Richter, H., Nothias, L.-F., Wang, M., Orešič, M., Weng, J.-K., Böcker, S., Jeibmann, A., Hayen, H., Karst, U., Dorrestein, P.C., Petras, D., Du, X., Pluskal, T., 2023. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. Nature Biotechnology 41, 447–449. https://doi.org/10.1038/s41587-023-01690-2

Annexes de l'Article 5 : Implementation of non-targeted approaches to a freshwater benthic fish (Machoiron) used as a sentinel species to assess various contaminants present in a lake in Ivory Coast

Table S1. Analytical parameters

Instrument	Parameter	Condition		
UHPLC	Column temperature	50 °C		
	Injection volume	10 µL		
	Flow rate	0.5 $mL.min^{-1}$		
	Mobile phase	A: H_2O containing 0.01% formic acid		
		B: ACN containing 0.01% formic acid		
		Time (min)	% A	% B
		0	90	10
		15	0	100
		18	0	100
		19	90	10
		23	90	10
Q-TOF-MS (ESI+/ESI-)	Ion source type	ESI		
	Ion spray voltage floating (ISVF)	(+) 5500 V, (-) 4500 V		
	Source temperature (TEM)	500 °C		
	Curtain gas (CUR)	30 psi		
	Nebulizing gas (GS1)	40 psi		
	Heater gas (GS2)	45psi		
	Declustering potential (DP)	(+/-) 80 eV		
	Acquisition mode	IDA		
	TOF MS range (Da)	50-1000		
	Full scan collision energy (CE)	(+/-) 10 eV		
	MS accumulation time (ms)	490		
	TOF MS/MS range (Da)	50-1000		
	Collision energy (CE) for MS/MS	(+/-) 40 ± 20 eV		
	MS/MS accumulation time (ms)	40		
	Cycle time (ms)	940		

Table S2. Results of the targeted screening of unequivocally identified residues and contaminants in the 29 samples

Group	Sample	Number of compounds	Unequivocally identified residues and contaminants
A	**#1**	**5**	1,3-Diphenylurea ; Esbiol ; Formetanate HCl ; Difenoconazole ; Antipyrine-phenazone
	#2	**3**	Fuberidazole ; Difenoconazole ; Antipyrine-phenazone
	#3	**2**	Difenoconazole ; Antipyrine-phenazone
	#4	**1**	Difenoconazole ; Antipyrine-phenazone

	#5	**3**	Formetanate HCl ; Pyrimethanil ; Antipyrine-phenazone
	#6	**2**	Esbiol ; Difenoconazole
B	**#7**	**2**	Difenoconazole ; Antipyrine-phenazone
	#8	**2**	Pyrimethanil ; Antipyrine-phenazone
	#9	**4**	3,4 Dichloroaniline ; Formetanate HCl ; Difenoconazole ; Antipyrine-phenazone
	#10	**4**	Fuberidazole ; Difenoconazole ; Pyrimethanil ; Antipyrine-phenazone
	#11	**4**	Difenoconazole ; Pyrimethanil ; Antipyrine-phenazone ; N,N-Dimethylformamide (DMF)
	#12	**4**	Esbiol ; Formetanate HCl ; Fenpropimorph ; Antipyrine-phenazone
C	**#13**	**4**	Esbiol ; Difenoconazole ; Pyrimethanil ; Antipyrine-phenazone
	#14	**4**	Esbiol ; Difenoconazole ; Propoxur ; Antipyrine-phenazone
	#15	**2**	Formetanate HCl ; Antipyrine-phenazone
	#16	**4**	3,4 Dichloroaniline ; Esbiol ; Difenoconazole ; Pyrimethanil
	#17	**3**	Formetanate HCl ; Fuberidazole ; Difenoconazole
	#18	**4**	Esbiol ; Difenoconazole ; Fenpropimorph ; Antipyrine-phenazone
	#19	**4**	1,3-Diphenylurea ; Esbiol ; Difenoconazole ; Doramectin
	#20	**5**	1,3-Diphenylurea ; Formetanate HCl ; Fenpropimorph ; Pyrimethanil ; Antipyrine-phenazone
	#21	**4**	Formetanate HCl ; Difenoconazole ; Antipyrine-phenazone ; N,N-Dimethylformamide (DMF)
	#22	**3**	Esbiol ; Formetanate HCl ; Antipyrine-phenazone
	#23	**4**	Formetanate HCl ; Difenoconazole ; Pyrimethanil ; Antipyrine-phenazone
	#24	**1**	Difenoconazole
	#25	**5**	Esbiol ; Formetanate HCl ; Difenoconazole ; Pyrimethanil ; Antipyrine-phenazone
	#26	**3**	Formetanate HCl ; Difenoconazole ; Antipyrine-phenazone
	#27	**3**	Difenoconazole ; Tebutam ; Antipyrine-phenazone
	#28	**3**	Esbiol ; Formetanate HCl ; Difenoconazole
	#29	**3**	Difenoconazole ; Pyrimethanil ; Antipyrine-phenazone

Table S3. List of residues and contaminants (n = 13) unequivocally identified with their frequency of occurrence in 29 food samples by targeted screening

Type of chemical	Compound	Frequency of appearance (%)	Sample(s)
Pesticide residues	1,3-Diphenylurea	**10**	1 ; 19 ; 20
	3,4 Dichloroaniline	**7**	9 ; 16
	Esbiol	**38**	1 ; 6 ; 12 ; 13 ; 14 ; 16 ; 18 ; 19 ; 22 ; 25 ; 28

Type of chemical	Compound	Frequency of appearance (%)	Sample(s)
	Formetanate HCl	**45**	1 ; 5 ; 9 ; 12 ; 15 ; 17 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 25 ; 26 ; 28
	Fuberidazole	**10**	2 ; 10 ; 17
	Difenoconazole	**76**	1 ; 2 ; 3 ; 6 ; 7 ; 9 ; 10 ; 11 ; 13 ; 14 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 21 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29
	Doramectin	**3**	19
	Fenpropimorph	**10**	12 ; 18 ; 20
	Propoxur	**3**	14
	Pyrimethanil	**34**	5 ; 8 ; 10 ; 11 ; 13 ; 16 ; 20 ; 23 ; 25 ; 29
	Tebutam	**3**	27
Veterinary drugs	Antipyrine-phenazone	**79**	1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 18 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 25 ; 26 ; 27 ; 29
	N,N-Dimethylformamide (DMF)	**7**	11 ; 21

Table S4. Results of the suspected screening of tentatively (level 2a) identified residues and contaminants in the 29 samples

Group	Sample	Number of compounds	Group	Sample	Number of compounds
A	**#1**	**14**	**C**	**#13**	**12**
	#2	**12**		**#14**	**21**
	#3	**17**		**#15**	**17**
	#4	**12**		**#16**	**17**
	#5	**19**		**#17**	**14**
	#6	**15**		**#18**	**16**
B	**#7**	**13**		**#19**	**15**
	#8	**14**		**#20**	**17**
	#9	**13**		**#21**	**17**
	#10	**17**		**#22**	**17**
	#11	**17**		**#23**	**15**
	#12	**16**		**#24**	**20**
				#25	**19**
				#26	**15**
				#27	**18**
				#28	**14**
				#29	**14**

Table S5. List of residues and contaminants (n = 49) tentatively identified (level 2a) with their frequency of occurrence in 29 food samples by suspected screening

Type of chemical	Compound	Frequency of appearance (%)	Sample(s)
Alkaloids	Deoxyvasicinone	**90**	1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 29
	Napelline	**3**	9
	Pilocarpine	**7**	3 ; 10
	Quinoline	**14**	5 ; 7 ; 22 ; 28
	Harmalol	**79**	2 ; 5 ; 6 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 13 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29
	Harman	**14**	20 ; 21 ; 23 ; 24
	Harmane	**34**	3 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 14 ; 15 ; 17 ; 25 ; 29
	Norharman	**100**	1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29
Drugs (and metabolites)	Acamprosate	**7**	26 ; 28
	Nateglinide	**93**	1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 29
	Paracetamol	**14**	3 ; 12 ; 22 ; 25
	Salicylamide	**28**	3 ; 5 ; 8 ; 9 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23
	Antipyrine	**10**	3 ; 24 ; 26
	Fexofenadine	**24**	4 ; 5 ; 16 ; 20 ; 21 ; 22 ; 28
	Meperidine	**17**	1 ; 2 ; 6 ; 23 ; 24
	Terfenadine	**34**	1 ; 5 ; 9 ; 10 ; 15 ; 17 ; 19 ; 20 ; 27 ; 28
	Oxypurinol	**59**	1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 7 ; 12 ; 15 ; 17 ; 18 ; 19 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28
Industrial chemicals	1-naphthalenesulfonate	**48**	1 ; 2 ; 4 ; 5 ; 6 ; 8 ; 9 ; 12 ; 14 ; 15 ; 18 ; 19 ; 20 ; 23
	2,4,6-Trimethylbenzoic acid	**21**	5 ; 7 ; 11 ; 14 ; 15 ; 22
	2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP)	**3**	2
	2,6-Di(butan-2-yl)phenol	**45**	4 ; 5 ; 6 ; 8 ; 13 ; 14 ; 16 ; 20 ; 21 ; 25 ; 26 ; 28 ; 29
	2-Amino-5-methylbenzenesulfonic acid	**62**	6 ; 7 ; 9 ; 10 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 18 ; 19 ; 21 ; 22 ; 24 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29
	2-Hydroxybenzonitrile	**86**	1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 6 ; 7 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29

	2-Hydroxyoctanoic acid	**14**	10 ; 24 ; 25 ; 29
	2-Naphthalenesulfonic acid	**14**	21 ; 24 ; 25 ; 27
	4-Nitrophenol	**28**	3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 11 ; 14 ; 23
	Lauryl sulfate	**76**	2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 7 ; 8 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 16 ; 17 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 24 ; 25 ; 27 ; 28 ; 29
	Oleyl sarcosine	**97**	1 ; 2 ; 3 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29
	Propylparaben	**3**	10
	Sulfanilic acid	**69**	1 ; 2 ; 3 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 11 ; 12 ; 14 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 22 ; 24 ; 25 ; 27
	1,5-Naphthalenediamine	**3**	19
	2-Isopropylthioxanthone	**3**	14
	2-Naphthalenol	**3**	29
	2-Phenylacetamide	**3**	6
	4,4'-Bipyridine	**62**	3 ; 5 ; 7 ; 8 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 15 ; 16 ; 18 ; 20 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 29
	4-Methylphthalic anhydride	**3**	5
	Benzamide	**7**	1 ; 25
	Diphenylamine	**3**	18
	Galaxolidone	**3**	14
	Laurocapram	**7**	1 ; 3
	N-(n-octyl)-2-pyrrolidinone	**17**	1 ; 8 ; 10 ; 16 ; 27
	Phthalic acid	**3**	17
	Triethylcitrate	**3**	24
	Tri-isobutylphosphate	**48**	5 ; 10 ; 11 ; 12 ; 14 ; 15 ; 16 ; 18 ; 19 ; 21 ; 23 ; 26 ; 27 ; 28
Mycotoxines	Echinulin	**72**	4 ; 5 ; 6 ; 8 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27
Pesticides (and metabolites)	4,6-Dinitro-o-cresol	**3**	14
	3-Phenoxybenzoic acid	**72**	4 ; 6 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 27
Transformations products (TPs)	Chlorothalonil-4-hydroxy	**7**	11 ; 14
	2-Hydroxyfluorene	**55**	1 ; 3 ; 7 ; 11 ; 13 ; 14 ; 15 ; 16 ; 18 ; 21 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29

Figure S1. Identification of Antipyrine-phenazone and Difenoconazole in fish sample (#7) by targeted screening. **a)** Extracted ion chromatogram; **b)** Extracted ion chromatogram of standard; **c)** Isotopic pattern and mass error of the precursor ion; **d)** Experimental fragmentation spectrum (in blue) matched against the library spectrum produced by the injecting standard in solvent (in orange).

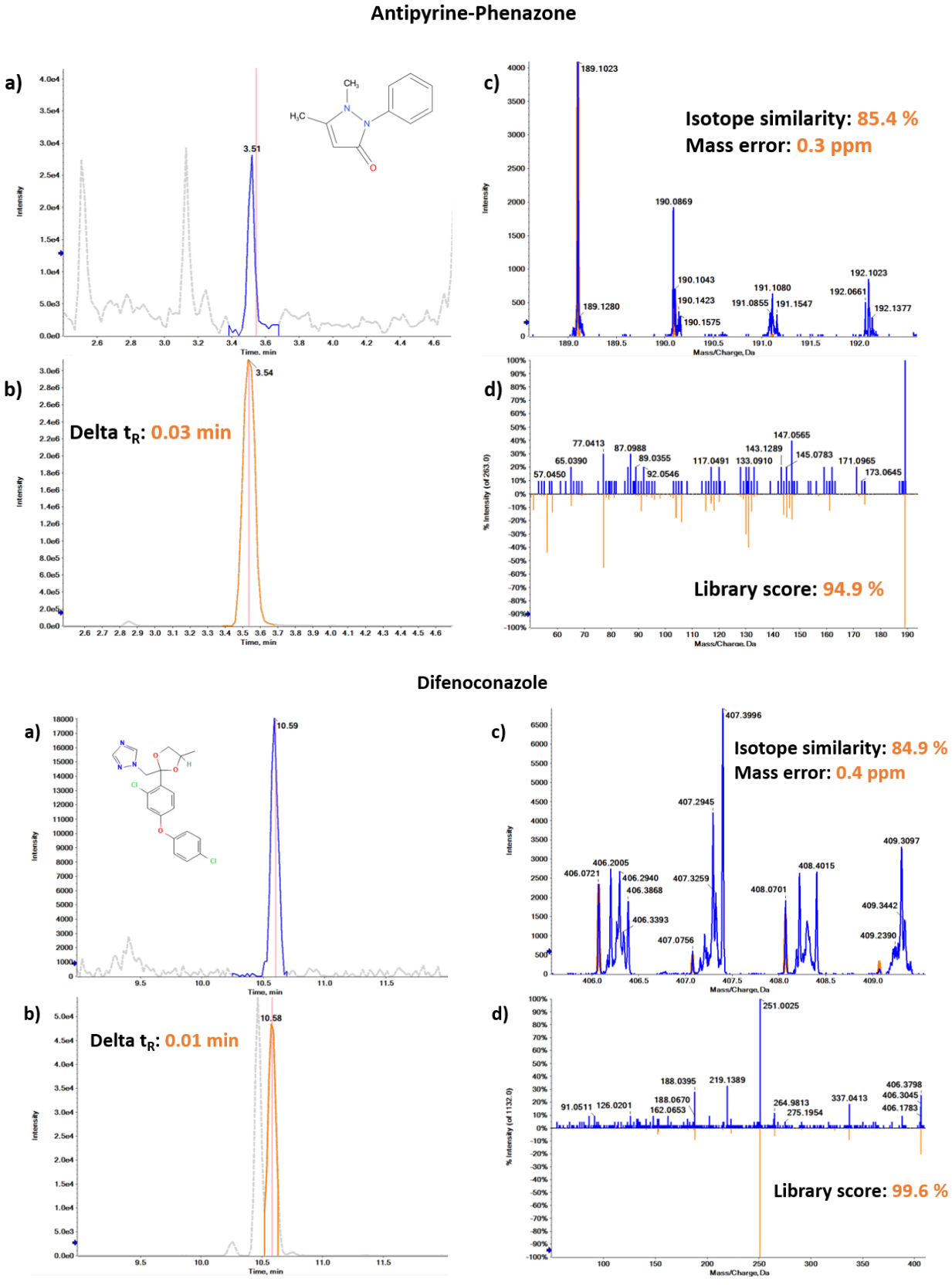
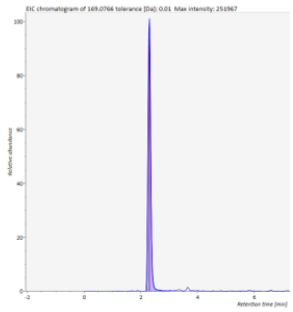


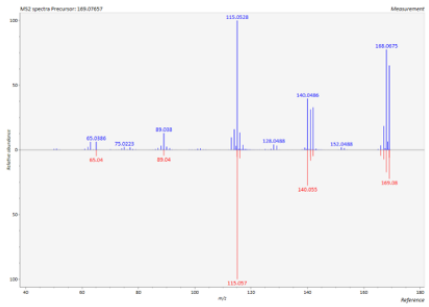
Figure S2. Tentative identification of Norharman in sample #13 and 2-Hydroxybenzonitrile in sample #1 by suspected screening**. a)** Extracted ion chromatogram; **b)** Experimental fragmentation spectrum (in blue) matched against an available fragmentation spectrum acquired in other analytical conditions (in red); **c)** Additional information on the compound

Norharman

a)



b)

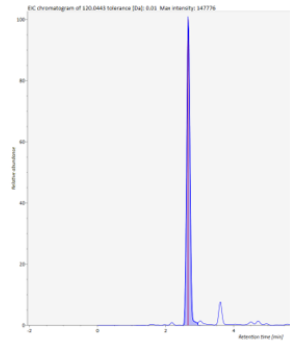


c)

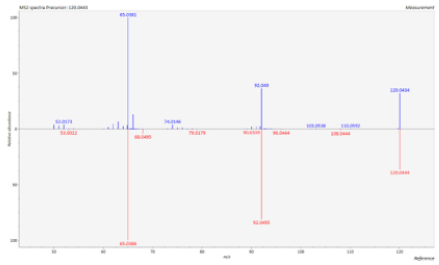
Annotation:	Norharman
RT similarity:	NA
m/z similarity:	998
Spectrum similarity:	(Dot)803 | (Rev)924
(no available)	
Formula|Ontology:	C11H8N2|NA
SMILES:	NA
InChIKey:	AIFRHYZBTHREPW-UHFFFAOYSA-N

2-Hydroxybenzonitrile

a)



b)



c)

Annotation:	2-Hydroxybenzonitrile
RT similarity:	NA
m/z similarity:	1000
Spectrum similarity:	(Dot)720 | (Rev)897
(no available)	
Formula|Ontology:	C7H5NO|NA
SMILES:	NA
InChIKey:	CHZCERSEMVWNHL-UHFFFAOYSA-N

Annexes de l'Article 6 : Optimizing PFAS monitoring: A direct comparison of sample preparation and HRMS workflows on Q-Exactive and Q-ToF instrument

Table S1. Detailed information on analytical methods.

Parameter	Analytical method 1			Analytical method 2		
Column	Hypersil Gold C18 column (150 × 2.1 mm, 3-µm particle size, 175 Å pore diameter; ThermoScientific)			Aqua® C18 column (Aqua) (150 × 2 mm, 3-µm particle size, 125 Å pore diameter; Phenomenex Inc, Torrance, CA, USA)		
Column temperature	40 °C			50 °C		
Injection volume	5 µL			10 µL		
Flow rate	0.4 $mL.min^{-1}$			0.5 $mL.min^{-1}$		
Mobile phase	A: H_2O with 5 $mmol.L^{-1}$ ammonium formate			A: H_2O containing 0.01% formic acid		
	B: Acetonitrile (ACN)			B: ACN containing 0.01% formic acid		
Gradient	Time (min)	% A	% B	Time (min)	% A	% B
	0-0.5	95	5	0	90	10
	7.5	0	100	15	0	100
	13.5	0	100	18	0	100
	17.5	95	5	19	90	10
	20	95	5	23	90	10
Instrument	Q-Exactive			Q-TOF-MS		
Ion source type	ESI			ESI		
Ion spray voltage floating (ISVF)	(-) 3000 V			(+) 5500 V, (-) 4500 V		
Additional informations	sheath gas flow = 55 arbitrary units (AU), auxiliary gas flow rate = 10 AU, auxiliary gas temperature = 300 °C, capillary temperature = 350 °C, s-lens radio frequency = 40 AU.			Source temperature (TEM): 500 °C, Curtain gas (CUR): 30 psi, Nebulizing gas (GS1): 40 psi, Heater gas (GS2): 45 psi, Declustering potential (DP) : (+/-) 80 eV		
Acquisition mode	Full scan and DIA			IDA		
	A MS1 full scan mode : 65 – 975 m/z at a resolving power of 70,000 at m/z 200 (acquisition window = 0–14 min), Automatic gain control (AGC target) : 1.10^6, maximum injection time (IT) : 100 ms			TOF MS range (Da) : 50-1000, Full scan collision energy (CE) : (+/-) 10 eV, MS accumulation time (ms) : 490		
	DIA mode. mass-resolving power : 35000, with a precursor ion list (PIL) (including the retention time and the mass-to-charge ratio), a stepped normalized collision energy : 10, 30, and 90 electronvolts (eV), the AGC target : 2.10^5, the maximum IT : set to auto			TOF MS/MS range (Da) : 50-1000, Collision energy (CE) for MS/MS : (+/-) 40 ± 20 eV, MS/MS accumulation time (ms) : 40, Cycle time (ms) : 940		

Figure S1. Venn diagrams illustrating the distribution of PFAS identified according to the extraction method used in all food samples (from #1 to #20). The orange circle indicates compounds identified via QuEChERS A only; the purple circle represents identifications via QuEChERS B only; The overlap area highlights compounds found by both methods.

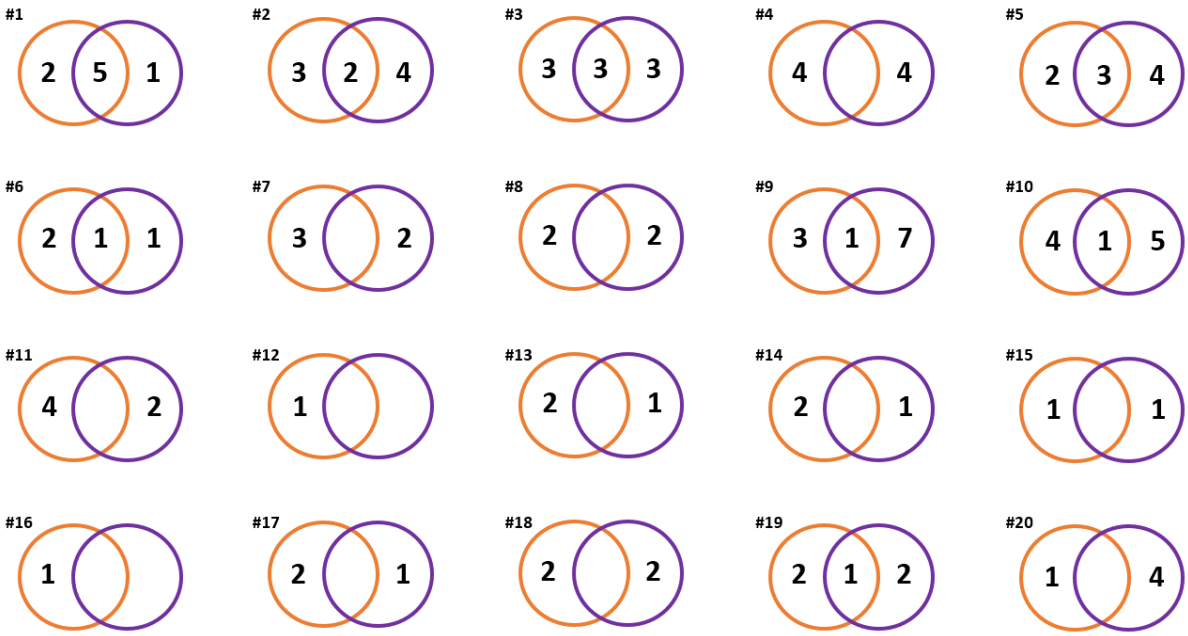
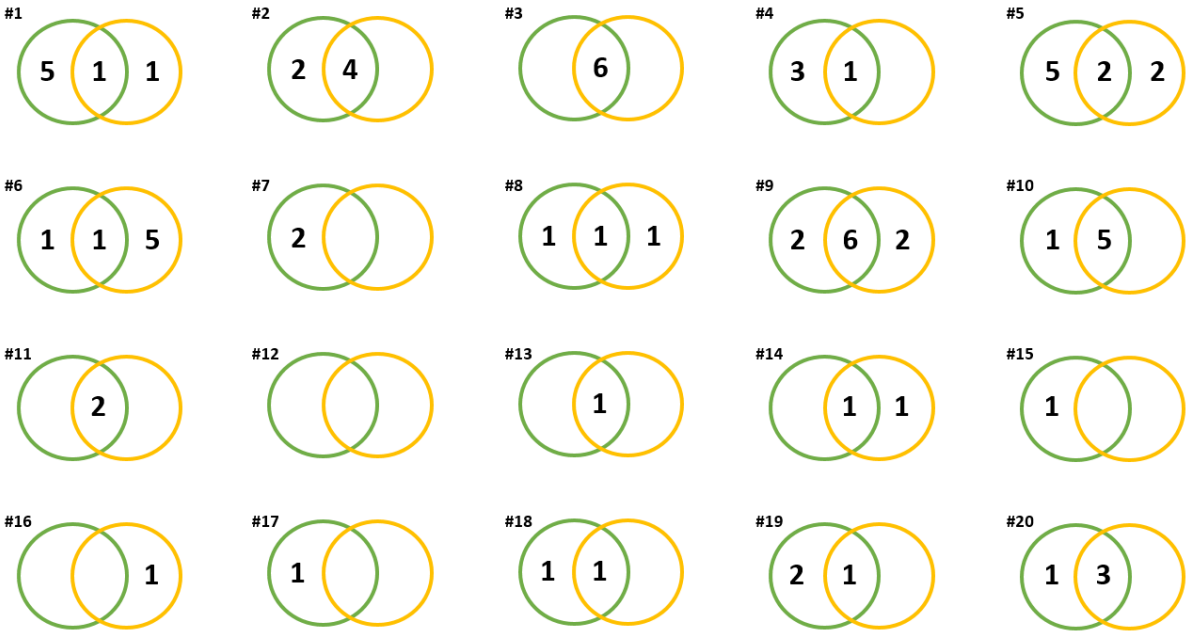


Figure S2. Venn diagrams illustrating the distribution of PFAS identified according to the analytical method used in all food samples (from #1 to #20). The green circle indicates compounds identified via Analytical method 1 only; the yellow circle represents identifications via Analytical method 2 only; The overlap area highlights compounds found by both methods.



Titre : Développement et application de stratégies de type Suspect Screening (SS) et Non-Targeted Screening (NTS) basées sur la spectrométrie de masse multidimensionnelle et très haute résolution pour étendre la connaissance de l'exposome dans un contexte d'évaluation du risque chimique dans les aliments

Mots-clés : Exposome chimique alimentaire, Contaminants émergents, PFAS, Approche suspecte et non ciblée (SS/NTS), Spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS), Évaluation de l'exposition

Résumé : L'exposition chronique à des mélanges complexes de contaminants et résidus présents dans l'alimentation constitue un enjeu majeur de santé publique, susceptible de contribuer au développement de pathologies à long terme. Si certaines substances comme les pesticides ou quelques composés per- et polyfluoroalkylées (PFAS) font déjà l'objet de réglementations strictes, de nombreuses autres, émergentes ou non réglementées, restent insuffisamment caractérisées. Face à cette diversité chimique, il devient nécessaire de développer des outils analytiques plus performants pour mieux évaluer l'exposition des consommateurs.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette dynamique, en combinant les avancées récentes en spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) avec des stratégies d'analyse innovantes, fondées sur des approches suspectes (SS) et non ciblées (NTS). Une stratégie multi-contaminants a ainsi été développée, reposant sur une préparation des échantillons de type QuEChERS, une acquisition LC-HRMS à large spectre et un traitement avancé des données selon les approches SS et NTS. Appliquées à une large gamme de denrées d'origine animale ces approches ont permis d'identifier un ensemble étendu de substances – connues ou émergentes – parfois jamais signalées dans les aliments. En complément, un exercice d'estimation de l'exposition alimentaire à certaines substances identifiées a été mené, illustrant comment ces données peuvent enrichir l'évaluation du risque chimique. Cette approche renforce la compréhension des expositions alimentaires aux polluants chimiques et soutient les politiques sanitaires.

Title: Development and application of Suspect Screening (SS) and Non-Targeted Screening (NTS) strategies based on multidimensional and very high resolution mass spectrometry to extend the knowledge of the exposome in a context of chemical risk assessment in food

Keywords: Food chemical exposome, Emerging contaminants, PFAS, Suspicious and untargeted approach (SS/NTS), High resolution mass spectrometry (HRMS), Exposure assessment

Abstract: Chronic exposure to complex mixtures of contaminants and residues in food is a major public health concern, and may contribute to the development of long-term diseases. While some substances, such as pesticides and some per- and polyfluoroalkyl compounds (PFAS), are already subject to strict regulations, many others, whether emerging or unregulated, remain insufficiently characterized. Given this chemical diversity, it is becoming necessary to develop more effective analytical tools to better assess consumer exposure.

This thesis work is part of this dynamic, combining recent advances in high-resolution mass spectrometry (HRMS) with innovative analysis strategies, based on suspect (SS) and non-targeted (NTS) approaches. A multi-contaminant strategy has been developed, based on QuEChERS-type sample preparation, broad-spectrum LC-HRMS acquisition and advanced data processing using SS and NTS approaches. Applied to a wide range of animal-origin foodstuffs, these approaches have enabled the identification of a wide range of substances - both known and emerging - sometimes never before reported in foodstuffs. In addition, an exercise to estimate dietary exposure to certain identified substances was carried out, illustrating how these data can enrich chemical risk assessment. This approach enhances our understanding of dietary exposure to chemical pollutants and supports health policies.