



Université
de Toulouse

THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :
Charlotte Marteau

le : mercredi 21 mars 2012

Titre :

Retardateurs de flamme bromés : Métabolites actifs et biomarqueurs
d'exposition chez l'Homme

Ecole doctorale :
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :
INRA UMR 1331 Toxalim - LABERCA, ONIRIS

Directeur(s) de Thèse :
M Laurent Debrauwer
M Jean-Philippe Antignac

Rapporteurs :

Mme Hélène Budzinski
Mme Elena Gomez

Membre(s) du jury :

M Olivier Laprévote
M Christophe Rousselle
M Daniel Zalko

Aux membres du jury de thèse,

Madame Hélène BUDZINSKI, Directeur de recherche au Laboratoire de Physico et Toxicochimie de l'Environnement du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) à l'Université de Bordeaux 1,

Madame Elena GOMEZ, Maître de conférence à l'Université de Montpellier 1,

Monsieur Olivier LAPREVOTE, Professeur à l'Université Paris Descartes Faculté de Pharmacie,

Monsieur Christophe ROUSSELLE, Responsable de l'unité toxicologie à Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)

Monsieur Laurent DEBRAUWER, Ingénieur de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Toulouse,

Monsieur Jean-Philippe ANTIGNAC, Ingénieur de Recherche au Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) à l'École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique,

Monsieur Daniel ZALKO, Chargé de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Toulouse,

Qui m'ont fait l'honneur d'accepter notre invitation à juger ce travail de thèse, et que je remercie pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture critique de ce document.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Jean-Pierre Cravedi et Monsieur Bruno Le Bizec du LABERCA qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires, l'unité « xénobiotiques » devenue en cours de route Toxalim à Toulouse et le LABERCA à Nantes. Ils m'ont permis de bénéficier de deux environnements de travail dynamiques et performants et j'ai pu réaliser ces travaux dans les meilleures conditions matérielles et humaines.

Je remercie ensuite mes directeurs de thèse, Messieurs Jean-Philippe Antignac et Laurent Debrauwer, mais aussi Monsieur Daniel Zalko, qui a eu tenu le même rôle d'encadrant. A vous trois, merci pour votre disponibilité, votre soutien et vos conseils. Chacun dans votre domaine, vous m'avez aidé et avez eu un rôle déterminant dans l'aboutissement de ce travail.

Je remercie également ceux qui ont apporté leur contribution scientifique à ce projet. Le Dr Alain Berrebi du CHU Paule de Viguier ainsi que le personnel hospitalier du service de gynécologie-obstétrique qui a effectué les prélèvements. Je remercie Messieurs Roger Rahmani et Georges de Sousa de l'INRA de Sophia Antipolis pour m'avoir accueillie durant une semaine dans leur laboratoire et pour m'avoir aidé dans les expérimentations *in vitro* sur hépatocytes en culture primaire.

Je remercie mes collègues, de Nantes et de Toulouse qui m'ont aidé et apporté leurs connaissances, Mesdames Sylvie Chevolleau, Laurence Dolo et Elisabeth Perdu et Monsieur Emilien Jamin à l'INRA de Toulouse. Mademoiselle Sophie Durand et Monsieur Ronan Cariou au LABERCA.

Merci aussi à mes collègues intermittents entre les allers-retours et les départs de bureaux pour la bonne humeur et la détente. A Toulouse, j'ai eu la chance de travailler à côté de Mademoiselle Carine Jacques, Monsieur Nicolas Cabaton et les stagiaires Maria-Helena et Aurélie. A Nantes, je remercie Mesdemoiselles Hanane Kadar, Mesdames Fanny Kieken et Zita Zendong, mais aussi les autres collègues de bureau. Je remercie d'une manière plus générale tout le personnel des deux laboratoires pour leur accueil.

Je remercie aussi ma famille et mes amis pour leur soutien. Je me dois de remercier également tous ceux qui m'ont logé à Nantes ou à Toulouse : Anne-Laure, Tristan et Aurélie, Sophie, Blandine et Thomas, et mes coloc des deux derniers mois. Finalement, je remercie aussi Baptiste avec tout mon amour pour son soutien permanent.

Table des matières

Liste des figures	17
Liste des tableaux	26
Liste des abréviations.....	32
Introduction générale.....	38
Chapitre 1 : Les retardateurs de flamme bromés et le risque associé	44
1 - les RFB : Présentation et Contexte d'utilisation.....	46
1.1 - Introduction	46
1.2 - Enjeux socio-économiques.....	47
1.2.1 - Le marché des retardateurs de flamme.....	47
1.2.2 - Le risque incendie	49
1.2.3 - Associations de promotion de l'utilisation des RFB.....	50
1.2.4 - Réglementation.....	51
1.3 - Les retardateurs de flamme bromés	53
1.3.1 - Les PBDE	53
1.3.1.1 - Structure	53
1.3.1.2 - Utilisation.....	54
1.3.1.3 - Toxicité.....	54
1.3.2 - Le TBBPA.....	56
1.3.2.1 - Structure	56
1.3.2.2 - Utilisation.....	57
1.3.2.3 - Toxicité.....	57
1.3.3 - L'HBCD	58
1.3.3.1 - Structure	58
1.3.3.2 - Utilisation.....	59
1.3.3.3 - Toxicité.....	59
1.4 - Conclusion.....	60

2 - Transfert et devenir dans l'environnement, la chaîne alimentaire et chez les êtres vivants	61
2.1 - Niveaux de contamination environnementaux.....	62
2.1.1 - Présence dans les différents compartiments environnementaux.....	62
2.1.1.1 - Dans les sédiments et le sol.....	62
2.1.1.2 - Dans l'air et les poussières.....	63
2.1.2 - Transfert vers la faune, la flore et la chaîne alimentaire.....	63
2.1.2.1 - Transfert du sol vers les plantes.....	63
2.1.2.2 - Niveaux d'imprégnation de la faune.....	64
2.1.2.3 - Présence dans les aliments	65
2.2 - Les RFB chez l'Homme.....	66
2.2.1 - Imprégnation humaine	66
2.2.2 - Voies d'exposition de la population générale.....	66
2.2.3 - Fenêtres d'expositions critiques : exposition fœtale et cas des nouveaux nés.....	67
2.3 - Conclusion	72
3 - Métabolisme des RFB	73
3.1 - Les PBDE.....	73
3.1.1 - Biodisponibilité et distribution.....	73
3.1.2 - Identification des métabolites des PBDE.....	74
3.2 - Le TBBPA.....	80
3.3 - L'HBCD.....	81
3.4 - Conclusions.....	82
4 - Etudes des métabolites des RFB	84
4.1 - Nomenclature des métabolites de PBDE	84
4.2 - Toxicité	85
4.3 - Imprégnation humaine	87
4.4 - Présence dans l'environnement.....	90
4.5 - Polémique sur l'origine des PBDE hydroxylés et méthoxylés	93
4.6 - Conclusion	94
5 - Outils et méthodes analytiques	95
5.1 - Les PBDE.....	95
5.1.1 - Propriétés physico-chimiques	95

5.1.2 - Méthodes d'analyse employées.....	95
5.2 - Le TBBPA.....	97
5.2.1 - Propriétés physico-chimiques	97
5.2.2 - Méthodes d'analyse employées.....	97
5.3 - L'HBCD	98
5.3.1 - Propriétés physico-chimiques	98
5.3.2 - Méthodes d'analyse employées.....	98
5.4 - Les métabolites.....	99
5.5 - Spécificités de l'analyse des composés bromés	100
5.6 - Conclusion.....	101
6 - Conclusion.....	102
 Chapitre 2 : Etude du métabolisme humain des PBDE et du TBBPA	 108
1 - Développements méthodologiques.....	110
1.1 - Synthèse et purification des RFB radiomarquées	110
1.1.1 - [¹⁴ C]-TBBPA.....	110
1.1.2 - [¹⁴ C]-BDE-47	112
1.1.3 - [¹⁴ C]-BDE-209	113
1.2 - Etudes in vitro	114
1.2.1 - Etudes de métabolisation par des hépatocytes en culture primaire	114
1.2.2 - Etudes de métabolisation par différentes lignées cellulaires.....	116
1.2.3 - Etude de métabolisation par des microsomes hépatiques	117
1.3 - Méthodes d'analyse de la radioactivité	118
1.3.1 - Quantification de la radioactivité	118
1.3.2 - Préparation des échantillons en vue de l'analyse par HPLC.....	118
1.3.3 - Profilage des molécules radio-marquées.....	119
1.4 - Méthodes d'identification des métabolites.....	120
1.4.1 - Méthodes appliquées à l'identification des métabolites du TBBPA.....	120
1.4.1.1 - Méthodes biochimiques.....	120
1.4.1.2 - Identification des métabolites par spectrométrie de masse	120
1.4.2 - Identification des métabolites des PBDE par LC-APPI-HRMS	121

1.4.2.1 -	Principe de l'APPI	122
1.4.2.2 -	Etude du comportement des analytes en APPI	123
1.4.2.2.1 -	Les PBDE.....	123
1.4.2.2.2 -	Les OH-PBDE.....	124
1.4.2.2.3 -	Les autres métabolites potentiels	127
1.4.2.3 -	Paramètres influençant l'ionisation des PBDE	128
1.4.2.3.1 -	Le dopant.....	128
1.4.2.3.2 -	La température	130
1.4.2.4 -	Séparation chromatographique	131
1.4.2.5 -	Performances de la méthode développée	134
1.4.2.6 -	Application de la méthode	136
1.5 -	Conclusion	137
2 -	Résultats	138
2.1 -	Métabolisme du TBBPA sur hépatocytes	138
2.1.1 -	Profils des échantillons	138
2.1.2 -	Essais de déconjugaisons enzymatiques	140
2.1.3 -	Identification par LC-MS.....	142
2.1.3.1 -	Identification des métabolites après déconjugaison enzymatique	142
2.1.3.2 -	Identification des métabolites en LC-HRMS.....	143
2.1.4 -	Conclusions sur le métabolisme du TBBPA.....	144
2.2 -	Métabolisme du BDE-47	146
2.2.1 -	Métabolisme sur hépatocytes en culture primaire.....	146
2.2.1.1 -	Profils des échantillons	146
2.2.1.2 -	Identification des métabolites par LC-HRMS	149
2.2.1.2.1 -	Composé parent et PBDE hydroxylés : fractions 5 et 6.....	150
2.2.1.2.2 -	Identification du métabolite de la fraction 4	151
2.2.1.2.3 -	Identification des métabolites des fractions 1 à 3	153
2.2.2 -	Métabolisme sur microsomes hépatiques	155
2.2.3 -	Métabolisme sur lignées cellulaires	156
2.2.4 -	Conclusions sur le métabolisme du BDE-47	157
2.3 -	Métabolisme du BDE-209	159

2.3.1 - Métabolisme sur hépatocytes en culture primaire.....	159
2.3.2 - Métabolisme sur lignées cellulaires	161
2.3.3 - Conclusions sur le métabolisme du BDE-209.....	163

Chapitre 3 : Caractérisation de l'imprégnation de l'Homme aux RFB et à leurs métabolites 166

1 - Introduction..... 168

1.1 - Prélèvements biologiques.....	169
1.2 - Présentation des analytes.....	170
1.2.1 - Sélection des RFB natifs et des métabolites d'intérêt.....	170
1.2.2 - Etude des propriétés physico-chimiques des analytes cibles	171

2 - Matériel et méthodes..... 173

2.1 - Méthode de détection et de mesure par LC-HRMS	173
2.1.1 - Présentation de la méthode.....	173
2.1.2 - Critères d'identification non ambiguë des analytes	176
2.1.3 - Procédure de quantification des analytes	177
2.1.4 - Caractérisation et suivi des performances analytiques.....	178
2.2 - Protocole de préparation des échantillons.....	179
2.2.1 - Réflexions préliminaires et présentation de la stratégie globale.....	179
2.2.2 - Prise d'essai et prétraitement des échantillons.....	180
2.2.3 - Extraction des composés d'intérêts	181
2.2.4 - Purification des extraits.....	182
2.2.4.1 - Fraction lipidique	182
2.2.4.2 - Fraction aqueuse.....	184
2.2.5 - Reconstitution avant injection.....	184
2.3 - Présentation de la méthode finalisée	184
2.3.1 - Adaptation du protocole aux autres matrices	185
2.3.2 - Evaluation de l'efficacité de la méthode	185
2.4 - Conclusion.....	188

3 - Recherche des RFB et de leurs métabolites chez l'homme 189

3.1 - Identification des analytes dans les échantillons.....	190
3.1.1 - Identification ciblée des analytes	190

3.1.2 -	Identification non ciblée.....	193
3.2 -	Concentrations déterminées dans les échantillons	195
3.2.1 -	Le TBBPA.....	197
3.2.2 -	L’HBCD.....	199
3.2.3 -	Métabolites hydroxylés des PBDE	201
3.2.4 -	Métabolites conjugués des PBDE.....	204
3.2.5 -	Métabolites conjugués du TBBPA.....	205
3.3 -	Etude du passage transplacentaire.....	205
3.3.1 -	Le TBBPA.....	206
3.3.2 -	L’HBCD.....	207
3.3.3 -	L’octa-BDE hydroxylé.....	207
3.3.4 -	Les conjugués des tétra-BDE hydroxylés	207
3.4 -	Corrélations entre les valeurs d’imprégnation et les données cliniques	208
3.4.1 -	TBBPA.....	208
3.4.2 -	α -HBCD.....	210
3.4.3 -	PBDE hydroxylés et métabolites conjugués	212
3.5 -	Conclusion	213

Conclusion générale 218

Références bibliographiques 230

Annexes..... 248

1 -	Annexe 1 : Spectres de masse des PBDEs et OH-PBDES obtenus en APPI sur des solutions contenant tout les standards et surchargée en un des composés.....	250
2 -	Annexe 2 : Cahier d’observations « Retardateurs de flamme bromés : métabolites actifs et biomarqueurs d’exposition chez la femme enceinte et le fœtus »	257
3 -	Annexe 3: Protocole de recherche du TBBPA, de l’HBCD, des OH-PBDE et des conjugués	262

Liste des figures

Chapitre 1 : Les retardateurs de flamme bromés et le risque associé

Figure I-1 : Représentation schématique des différentes étapes du cycle du feu (EFRA, 2011a)	46
Figure I-2 : Evolution du marché mondial des retardateurs de flamme (en valeur et en millions de Dollar US)	47
Figure I-3 : Structure du marché en valeur (à gauche) et en volume (à droite) des retardateurs de flamme.....	48
Figure I-4 : Estimation de l'impact du risque incendie (nombre de décès et coût associé) pour différents pays	49
Figure I-5 : Volumes de RFB couverts par le programme VECAP (histogramme) et estimation des émissions environnementales associées (courbe)	51
Figure I-6 : Etiquetage des biens concernés par la Directive DEEE.....	52
Figure I-7 : Structure chimique générale et principaux représentants (congénères majoritaires ou « indicateurs ») des PBDE	53
Figure I-8 : Structure chimique semi-développée du TBBPA	56
Figure I-9 : Structure chimique semi-développée des principaux isomères de l'HBCD (Janak et al., 2008).....	59
Figure I-10 : Schématisation des différentes voies d'exposition de l'Homme aux RFB.....	61
Figure I-12 : Voies métaboliques suivies par les PBDE ; synthèse d'après les études disponibles	79
Figure I-13 : Métabolites du TBBPA observés <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> chez le rat et l'Homme.....	81
Figure I-14 : Structure chimique des PBDE hydroxylés et méthoxylés	85
Figure I-15 : Analogies structurales entre les PBDE hydroxylés, le TBBPA, la thyroxine et l'œstradiol.....	86
Figure I-16 : Massifs isotopiques théoriques en fonction du nombre de brome	101

Chapitre 2 : Etude du métabolisme humain des PBDE et du TBBPA

Figure II-1 : Synthèse du TBBPA	111
Figure II-2 : Synthèse du BDE-47.....	112
Figure II-3 : Gradient utilisé pour la purification par collecte du BDE-47.....	113
Figure II-4 : Synthèse du BDE-209.....	113
Figure II-5 : Méthodes de déconjugaison.....	120
Figure II-6 : Représentation schématique d'une source d'ionisation par photoionisation (APPI) et du principe de fonctionnement associé.	122
Figure II-7 : Spectres de masse APPI obtenus par injection de 1 ng de PBDE sur le LTQ-Orbitrap	124
Figure II-8 : Spectres de masses de 4 OH-PBDE obtenus par injection de 1 ng sur colonne sur le LTQ-Orbitrap	125

Figure II-9 : Spectres de masses de 4 tétra-BDE hydroxylés obtenus par injection de 1 ng sur colonne sur le LTQ-Orbitrap.....	126
Figure II-10 : Zoom sur le massif isotopique des fragments [M-H] ⁻ d'un tétra-BDE-OH et [M-H-HBr] ⁻ d'un penta-BDE-OH (R=60.000). Zoom sur l'ion 498,7 d'un tétra- et d'un penta-BDE-OH coélus, à différentes résolutions	127
Figure II-11 : Abondance des ions diagnostiques des PBDE en fonction du pourcentage de dopant utilisé.....	129
Figure II-12 : Abondance des ions diagnostiques des PBDE en fonction de la température de nébulisation et de la température de capillaire.....	130
Figure II-13: Chromatogrammes obtenus en HRMS pour l'injection de 2,5 µL d'un mélange d'OH-PBDE à 100 pg/µL sur colonne PFP 100 mm.....	133
Figure II-14 : Répartition de la radioactivité observée entre le surnageant, les cellules et la solution de lavage des puits, en fonction des différentes conditions de culture testées.....	138
Figure II-15 : Radio-chromatogrammes des échantillons de surnageant obtenus pour les incubations à 1 µM avec et sans SVF pour les deux espèces	139
Figure II-16 : Histogramme représentant le pourcentage de chacun des métabolites et du TBBPA non métabolisé observés dans les échantillons de surnageant	139
Figure II-17 : Histogrammes représentant le pourcentage de chacun des métabolites et du TBBPA non métabolisé lors des essais de déconjugaison totale sur les échantillons de surnageant	140
Figure II-18 : Histogrammes représentant le pourcentage de chacun des métabolites et du TBBPA non métabolisé lors des essais de déconjugaison spécifique sur les échantillons de surnageant	141
Figure II-19 : Spectre de masse et spectre de masse MS/MS de l'ion majoritaire du métabolite élué à 17,5 minutes en radio-HPLC	142
Figure II-20 : Chromatogrammes d'ions extraits spécifiques des conjugués du TBBPA d'un mélange d'échantillons de surnageant d'incubations avec hépatocytes humains sans SVF à 5 µM	144
Figure II-21 : Identification des métabolites du TBBPA, résumée sur un radio-chromatogramme	145
Figure II-22 : Histogramme représentant le pourcentage des métabolites identifiés dans les échantillons de surnageant des incubations sans SVF	145
Figure II-23 : Répartition de la radioactivité observée entre le surnageant, les cellules et la solution de lavage des puits, en fonction des différentes conditions de culture testées.....	147
Figure II-24 : Histogramme représentant le pourcentage des métabolites et du BDE-47 observés dans les échantillons de surnageant et de cellule des incubations avec hépatocytes humains....	147
Figure II-25 : Identification des fractions collectées sur un radio-chromatogramme.....	149
Figure II-26 : Abondances relatives des différents ions diagnostiques dans les standards et chromatogrammes d'ions extraits des tétra-BDE hydroxylés.....	150
Figure II-27 : Illustration du phénomène de réarrangement 1,2	151
Figure II-28 : Spectre de masse APPI du métabolite observé à 7,5 minutes	152
Figure II-29 : Chromatogrammes d'ions extraits des PBDE hydroxylés, dihydroxylés et dihydrodiols obtenus en LC-APPI-HRMS	153

Figure II-30 : Spectres de masse ESI de métabolites élués entre 1,8 et 5 minutes	154
Figure II-31 : Chromatogrammes d'ions extraits de métabolites conjugués de PBDE hydroxylé, dihydroxylé ou dihydro diol obtenus en LC-ESI-HRMS.....	155
Figure II-32 : Radio-chromatogrammes d'échantillons de cellules obtenus pour les incubations d'H295R avec 1µM de BDE-47.....	156
Figure II-33 : Identification des métabolites du BDE-47 sur un radio-chromatogramme	157
Figure II-34 : Histogramme représentant le pourcentage des métabolites identifiés dans les incubations avec hépatocytes humains.....	158
Figure II-35 : Répartition de la radioactivité observée entre le surnageant, les cellules et la solution de lavage des puits, en fonction des différentes conditions de culture testées	160
Figure II-36 : Répartition de la radioactivité observée entre le surnageant, les cellules et la solution de lavage des puits, en fonction des différentes conditions de culture testées	161
Figure II-37 : Répartition de la radioactivité observée entre le surnageant, les cellules et la solution de lavage des puits, en fonction des différentes conditions de culture testées	162

Chapitre 3 : Caractérisation de l'imprégnation de l'Homme aux RFB et à leurs métabolites

Figure III-1 : Structures chimiques semi-développées des métabolites conjugués du TBBPA et des métabolites hydroxylés des PBDE plus particulièrement étudiés.....	171
Figure III-2 : Spectres de masses LC-ESI-HRMS de deux PBDE hydroxylés (500 pg), du TBBPA (2 ng) et du γ-HBCD (6 ng) obtenus pour l'injection de solutions de calibration sur l'Exactive	174
Figure III-3 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation par chromatographie liquide du TBBPA, des PBDE hydroxylés et de l'HBCD	175
Figure III-4: Chromatogrammes d'ions extraits obtenus pour l'injection de deux solutions standards (phénols à gauche et HBCD à droite) avec le gradient sélectionné sur Hypersil Gold C ₁₈	175
Figure III-5 : Massifs isotopiques des ions quasi-moléculaires du TBBPA et des OH-PBDE...	176
Figure III-6 : Méthode de calcul appliquée pour la quantification des analytes dans les échantillons.....	177
Figure III-7 : Ecart à la moyenne (pourcentage) des contrôles qualité	179
Figure III-8 : Résultat visuel d'une extraction par un mélange acétone/ <i>n</i> -hexane appliquée au lait maternel (5/5/5, v/v/v).....	181
Figure III-9 : Résultat visuel d'une extraction liquide-liquide par un mélange de soude 1N et d'hexane appliquée au sérum	183
Figure III-10 : Schéma du protocole finalisé développé pour le traitement des échantillons biologiques en vue de l'isolement des différentes classes de composés ciblés.	185
Figure III-11 : Age et parité des mères participant à l'étude.	189
Figure III-12 : Distributions de fréquence de l'âge des mères participant à l'étude (à gauche) et du poids de naissance des nouveau-nés (à droite).	190

Figure III-13 : Critères utilisés pour la confirmation de la présence du TBBPA dans deux échantillons de sérum.....	191
Figure III-14 : Chromatogrammes d'ions extraits et spectre de masse correspondant (massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire $[M-H]^+$) de composés octa-OH-BDE (à gauche) et tétra-OH-BDE (à droite), observés pour un standard et un échantillon de sérum.....	193
Figure III-15 : Comparaison du spectre de masse (massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire $[M-H]^+$) théorique du nona-BDE hydroxylé et d'un composé identifié dans un échantillon de sérum	194
Figure III-16 : Fréquence de détection des analytes dans les échantillons de lait maternel et de sérum maternel et de cordon analysés.....	194
Figure III-17 : Concentrations (pg/g) en TBBPA observées dans les échantillons de sérum et de lait de chaque couple mère-enfant	197
Figure III-18 : Concentrations moyennes (pg/g) en TBBPA observées dans le sérum maternel ou le sérum d'adultes	198
Figure III-19 : Concentrations moyennes (pg/g) en TBBPA observées dans le lait maternel....	198
Figure III-20 : Concentrations (pg/g) en α -HBCD observées dans les échantillons de sérum et de lait maternel de chaque couple mère-enfant.	199
Figure III-21: Concentrations (ng/g de matière grasse) en HBCD observées dans le sérum Humain pour des sujets adultes.....	200
Figure III-22 : Concentrations moyennes (pg/g) en α -HBCD observées dans le lait maternel..	201
Figure III-23 : Concentrations moyennes (pg/g) de tétra-BDE hydroxylés observées dans le sérum maternel (M) et de cordon (F)	202
Figure III-24 : Concentrations (pg/g) en octa-BDE hydroxylé observées dans les échantillons de sérum de chaque couple mère-enfant.....	203
Figure III-25 : Concentrations (pg/g) de tétra-BDE hydroxylé après déconjugaison observées dans les échantillons de sérum de chaque couple mère-enfant	204
Figure III-26 : Concentrations (pg/g) en tétra-BDE hydroxylé observées dans les échantillons de sérum de chaque couple mère-enfant.....	205
Figure III-27 : Concentrations (pg/g) en TBBPA mesurées dans le sérum de sang de cordon (en ordonnée) en fonction des concentrations (pg/g) dans le sérum maternel (en abscisse)	206
Figure III-28 : Concentrations (pg/g) en octa-BDE hydroxylé mesurées dans le sérum de sang de cordon (en ordonnée) en fonction des concentrations (pg/g) mesurées dans le sérum maternel (en abscisse)	207
Figure III-29 : Concentrations (pg/g) en TBBPA mesurées dans le sérum maternel (en ordonnée) en fonction de l'âge (années) des sujets (en abscisse)	208
Figure III-30 : Concentrations (pg/g) en TBBPA mesurées dans le sérum maternel (en ordonnée) en fonction de la parité des sujets (en abscisse).....	209
Figure III-31 : Concentrations (pg/g) en TBBPA mesurées dans le sérum maternel (en ordonnée) en fonction de la fréquence de consommation de poissons (repas par semaine) en abscisse	209
Figure III-32 : Concentrations (pg/g) mesurées en α -HBCD dans le sérum maternel (à gauche) et dans le lait maternel (à droite) en ordonnée en fonction de la parité en abscisse	210

Figure III-33 : Concentrations (pg/g) en α -HBCD mesurées dans le sérum maternel en ordonnée en fonction de la fréquence de consommation de poissons (repas par semaine) en abscisse	211
Figure III-34 : Concentrations (pg/g) en α -HBCD mesurées dans le sérum maternel en ordonnée (à gauche) et dans le lait maternel (à droite) en fonction du nombre de semaines d'allaitement en abscisse.....	211
Figure III-35 : Concentrations (pg/g) en α -HBCD observées dans le sérum maternel en ordonnée en fonction de celles observées dans le lait maternel en abscisse	212
Figure III-36 : Concentrations (pg/g) en octa-BDE hydroxylé mesurées dans le sérum maternel en ordonnée en fonction de la fréquence de consommation de poissons (repas par semaine) en abscisse.....	212

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Les retardateurs de flamme bromés et le risque associé

Tableau I-1 : Composition (%) des trois mélanges commerciaux de PBDE (CE, 2001, 2002, 2003)	54
Tableau I-2 : Niveaux de concentration en TBBPA rapportés dans le lait maternel, le sérum maternel et de cordon ombilicaux.....	71
Tableau I-3 : Niveaux de concentration en HBCD rapportés dans le lait maternel, le sérum maternel et de cordon ombilicaux.....	71
Tableau I-4 : Métabolites des PBDE identifiés lors d'études conduites chez l'Homme ou l'animal	78
Tableau I-5 : Niveaux de concentration en OH-PBDE et MeO-PBDE dans le lait maternel, le sérum maternel et de cordon ombilicaux	89
Tableau I-5 : Fréquence d'observation des PBDE hydroxylés et méthoxylés identifiés en fonction de l'organisme étudié ou du système considéré	92
Tableau I-6 : Propriétés physico-chimiques des trois mélanges techniques de PBDE (CE, 2001, 2002, 2003; Riu, 2006)	95
Tableau I-7 : Propriétés physico-chimiques du TBBPA.....	97
Tableau I-8 : Propriétés physico-chimiques des HBCD (CE, 2008)	98

Chapitre 2 : Etude du métabolisme humain des PBDE et du TBBPA

Tableau II-1 : Protocole de purification du TBBPA sur SPE C18.....	111
Tableau II-2 : Protocole de purification du BDE-209 sur SPE C18	114
Tableau II-3 : Protocole d'étude du métabolisme des RFB sur hépatocytes en culture primaire.....	114
Tableau II-4 : Solution de supplémentation des incubations préparées dans le DMSO.....	115
Tableau II-5 : Description des lignées cellulaires utilisées.....	116
Tableau II-6 : Méthodes HPLC.....	119
Tableau II-7 : PBDE inclus dans la méthode.....	123
Tableau II-8 : PBDE hydroxylés inclus dans la méthode	125
Tableau II-9 : Méthodes de séparation chromatographique par HPLC	132
Tableau II-10 : Ions diagnostiques, transitions MRM et limites de détection correspondantes .	135
Tableau II-11 : Formules brute et valeurs de m/z théoriques et observées pour les massifs $[M-H]^-$ du TBBPA et de ses conjugués	143
Tableau II-12 : Quantités estimées en nmol de BDE-47 et de chaque métabolite dans chaque essai (somme des échantillons milieu + cellules)	148
Tableau II-13 : Formules brutes et valeurs de m/z observées et théoriques pour les massifs $[M-H]^-$ des tétra-BDE conjugués	154

Chapitre 3 : Caractérisation de l'imprégnation de l'Homme aux RFB et à leurs métabolites

Tableau III-1 : Valeurs de pKa et de logP estimées pour certains métabolites de RFB.	172
Tableau III-2 : Temps de rétention et valeurs de m/z des ions diagnostiques suivis pour la détection des analytes cibles.	174
Tableau III-3 : Concentrations des analytes (pg/ μ L) dans les différentes solutions de calibration utilisées.	177
Tableau III-4 : Résultats obtenus lors de l'évaluation des performances de la stratégie analytique développée : concentrations (pg/g) calculées après application du protocole et sur la base du système d'étalonnage retenu, pour différents échantillons supplémentés.	187
Tableau III-5: Concentrations en analytes (pg/g) calculées dans les échantillons de lait maternel, de sérum fœtal et de sérum maternel.	196

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile
ACTH : Adrénocorticotrophine
APCI : Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique
APPI : PhotoIonisation à Pression Atmosphérique
BPA : BisPhénol A
CYP : Cytochrome P450
Déca-BDE : Déca-BromoDiphényl Ether
DBP : DiBromoPhénol
DCM : DiChloroMéthane
dpm : Désintégrations par minute
DMSO : DiMéthyleSulfOxyde
ECNI : Ionisation négative par Capture d'électron
EFRA : European Flame Retardant Agency
EI : Ionisation par Impact Electronique
ER : Récepteur aux œstrogènes
ESI : Ionisation par ElectroSpray
FSK : Forskoline
GC : Chromatographie Gazeuse
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HBCD : HexaBromoCycloDodécane
HRMS : Spectrométrie de Masse Haute Résolution
LC : Chromatographie Liquide
LLE : Extraction Liquide/Liquide
MeOH : Méthanol
MeO-PBDE : PolyBromoDiphényl Ether Méthoxylé
MS : Spectrométrie de Masse
MS/MS : Spectrométrie de Masse en tandem
NCI : Ionisation Chimique Négative
Octa-BDE : Octa- BromoDiphényl Ether
OH-PBDE : PolyBromoDiphényl Ether Hydroxylé
PBB : PolyBromoBiphényl
PBDE : PolyBromoDiphényl Ether
PBP : PolyBromoPhénol

PCB : PolyChloroBiphényl

PCDD/F : Polychlorodibenzo-*p*-dioxine/dibenzofurane

Penta-BDE : Penta- BromoDiphényl Ether

POP : Polluant Organique Persistant

RFB : Retardateur de Flamme Bromé

SPE : Extraction sur Phase Solide

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TBG : Thyroxine-Binding Globulin

TBP : TriBromoPhénol

T3 : Iodothyronine

T4 : Thyroxine

TBBPA : TétraBromoBisPhénol A

TSH : Thyréostimuline

TTR : Transthyrétine

Introduction générale

De tout temps, les incendies ont représenté un risque majeur pour la sécurité des personnes et des biens. Si depuis plusieurs siècles le développement des connaissances scientifiques et des techniques a apporté des outils innovants pour prévenir et lutter plus efficacement contre ce type de sinistre, il a également contribué à en accroître la fréquence et la gravité. L'accroissement des quantités de polymères synthétiques, et du nombre d'appareils électriques ou électroniques utilisés dans nos environnements de vie et de travail en sont les raisons principales. Ces types de bien se caractérisent en effet par une inflammabilité importante, et représentent désormais une source fréquente de départ de feu. L'utilisation de composés chimiques appelés « retardateurs de flamme » a ainsi été généralisée, afin de limiter l'inflammabilité de certains matériaux combustibles.

Il existe aujourd'hui de nombreux types de retardateurs de flamme, ayant pour but de diminuer le risque de départ de feu et le cas échéant, de freiner la combustion en agissant par voie chimique ou physique. Parmi ces substances, les retardateurs de flamme bromés (RFB) représentent une famille de composés connus pour leur efficacité dans la protection des polymères synthétiques. Certains de ces produits ont toutefois été retirés du marché ces dernières années, en raison de la mise en évidence de propriétés toxiques préoccupantes. De plus, à l'inverse de ce qui peut être observé pour d'autres familles de polluants organiques persistants (POP), leur présence s'est accrue au cours des dernières décennies dans l'environnement et chez l'Homme. Face à ces données préoccupantes, le manque d'information concernant l'exposition et l'imprégnation humaine, et concernant le métabolisme des RFB, a fait de ces composés une classe de polluants à étudier prioritairement sur le plan de l'évaluation du risque qu'ils représentent.

L'INRA (Unité Toxalim, Toulouse) et le LABERCA (Oniris, Nantes) ont déjà démontré en France la réalité de l'exposition des femmes enceintes et de leur nouveau-nés aux principaux RFB, à savoir le tétrabromobisphénol A (TBBPA), les polybromodiphényl éther (PBDE) et l'hexabromocyclododécane (HBCD), à partir de prélèvements de lait maternel, de sérum maternel, de sérum de sang de cordon ombilical, et de tissu adipeux maternel. L'exposition de ces sous-populations a été caractérisée, notamment pour les PBDE hautement bromés dont le déca-bromodiphényl éther (déca-BDE), composés peu étudiés et supposés jusqu'alors n'être que peu biodisponibles. Ces résultats ont par ailleurs été confortés par l'étude du métabolisme de ces molécules, qui a démontré l'absorption et le passage transplacentaire du déca-BDE *in vivo* chez le rat, avec une localisation spécifique dans certains organes. Par ailleurs, des études ont montré que certains métabolites jouent vraisemblablement un rôle clé dans l'expression de la toxicité des RFB.

Dans ce contexte, et sur la base des acquis des deux laboratoires partenaires, les objectifs du présent travail sont d'étudier plus spécifiquement le métabolisme des RFB afin d'identifier d'éventuels métabolites qui pourraient être recherchés en tant que biomarqueurs d'exposition dans les fluides ou tissus biologiques humains. Le premier chapitre de ce travail est une synthèse bibliographique réalisée préalablement aux phases pratiques, et mise à jour tout au long de ma thèse. Elle présente les enjeux économiques, sociaux, mais aussi environnementaux, relatifs à l'utilisation des RFB en se focalisant sur les trois RFB majoritairement utilisés dans le monde (TBBPA, HBCD, déca-BDE). Un état des lieux sur les études toxicologiques, métaboliques et environnementales menées dans le but de mieux apprécier le risque que représentent ces composés est également dressé dans ce chapitre. Enfin, sont traitées les connaissances relatives aux techniques actuellement disponibles pour l'analyse des RFB et de leurs métabolites. Le second chapitre de cette thèse détaille le résultat de mes études dans le domaine du métabolisme humain des RFB. La caractérisation des métabolites formés a nécessité une importante activité de développement méthodologique. Le développement de ces méthodes, et leur application, sont également présentées dans cette deuxième partie. Le troisième et dernier chapitre présente les résultats que j'ai obtenus quant aux études d'imprégnation de l'Homme, pour les RFB et leurs métabolites. La stratégie et les développements analytiques sont détaillés avant de présenter les résultats obtenus pour l'étude d'un ensemble de prélèvements de lait, de sérum et d'urine prélevés en France chez des couples mère-enfant.

Chapitre 1 : Les retardateurs de flamme bromés et le risque associé

1 - LES RFB : PRESENTATION ET CONTEXTE D'UTILISATION

1.1 - INTRODUCTION

Les retardateurs de flamme (RF) sont des substances chimiques d'origine anthropique, synthétisées en vue de leur incorporation dans différents produits et matériaux, pour limiter leur inflammabilité. Il existe plusieurs classes de retardateurs de flamme, les principaux étant de nature halogénée ou inorganique. Chaque famille est associée à des applications privilégiées, principalement en fonction du rapport coût / efficacité. Les composés phosphorés sont ainsi très utilisés dans les résines, textiles et peintures en raison de leur faible coût. Les autres classes de RF inorganiques sont plutôt utilisées dans la production des matières plastiques et les équipements électriques et électroniques. Les retardateurs de flamme bromés (RFB) sont en particulier très utilisés dans les équipements électriques et électroniques en raison de leur grande efficacité en tant qu'agents ignifugeants. Ils entreraient actuellement dans la production de ce type de biens dans environ un cas sur deux (EFRA, 2004a). Une schématisation du processus de combustion, qui permet d'illustrer le mode d'action de ces composés, est présentée à la figure I-1.

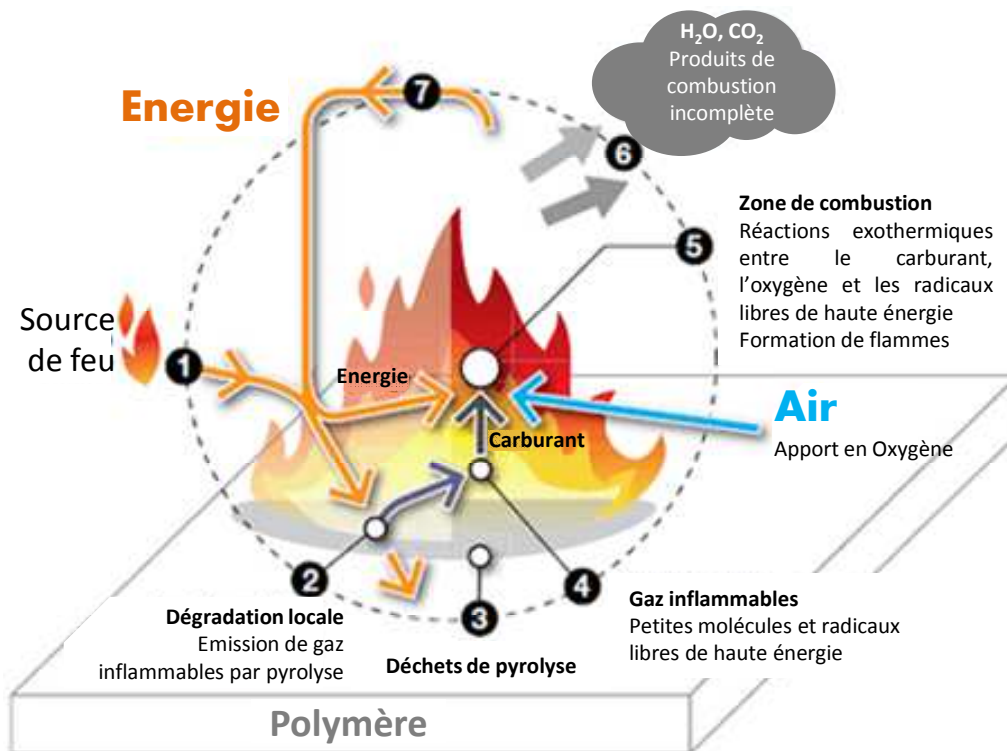


Figure I-1 : Représentation schématique des différentes étapes du cycle du feu (EFRA, 2011a)

Initialement, une source d'énergie (flamme, chaleur, incandescence) (1) va provoquer une dégradation du matériau en contact (2) qui va se décomposer en cendres (3) et en gaz inflammables (4) qui vont réagir avec l'air pour entretenir et amplifier la réaction et provoquer la combustion à proprement parler (5). Celle-ci va entretenir les phénomènes 2 à 5 par un apport d'énergie, et ainsi créer ce qui est appelé « le cycle du feu ». Dans ce processus, les RFB agissent au niveau de la phase gazeuse, en retardant les étapes 4 et 5 du processus de combustion. En présence de la source d'énergie (1), les liaisons Carbone - Brome sont facilement dissociées (2), et le brome va alors se fixer sur les radicaux libres HO^\bullet ou H^\bullet (4, 5). Des gaz de faible énergie, qui ne réagissent pas avec l'oxygène et n'entretiennent pas la combustion, sont ainsi formés en présence de RFB. Il en résulte le ralentissement voire l'arrêt de la réaction de combustion.

1.2 - ENJEUX SOCIO-ECONOMIQUES

1.2.1 - Le marché des retardateurs de flamme

Les retardateurs de flamme représentent un marché important dans le domaine de la chimie, puisqu'il s'agit du plus important groupe d'additifs pour matières plastiques. Ils sont en effet utilisés pour la production de nombreux produits manufacturés, en particulier des biens à forte valeur ajoutée (appareils électroniques, électroménager, etc.). Ce marché est en pleine expansion comme le montre la figure I-2, avec un chiffre d'affaire qui a doublé entre 2001 et 2008, et devrait continuer d'augmenter en même temps que les volumes produits. En effet, cette augmentation en valeur va de paire avec une augmentation en volume. Ainsi, le marché mondial des retardateurs de flamme représentait en 2001 une production d'environ 1,2 millions de tonnes/an (EFRA, 2006), qui serait passé à 1,8 millions de tonnes/an en 2007 (SRI-consulting, 2007).

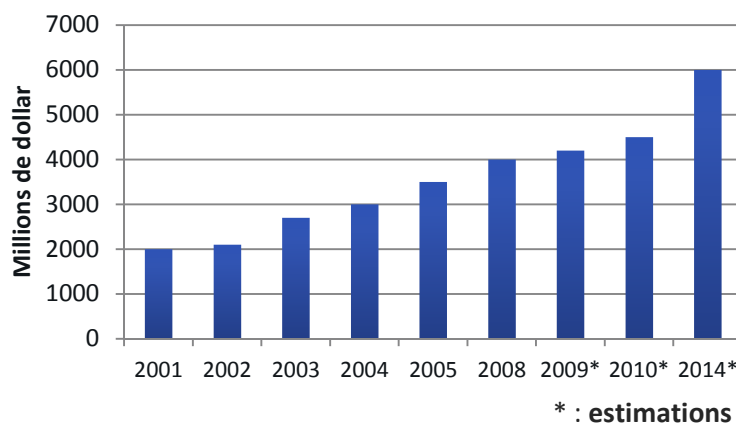


Figure I-2 : Evolution du marché mondial des retardateurs de flamme (en valeur et en millions de Dollar US)

Entre 2004 et 2007, le marché des retardateurs de flamme était dominé par les hydroxydes d'aluminium, qui représentaient 40% du volume produit. Durant cette période, la part des RFB est passée de 12 à 23 %. En valeur, les RFB représentaient 34% du marché en 2007. La répartition du marché en valeur et par région, présentée sur la figure I-3, montre que les RFB sont très utilisés en Asie (73% du marché), avec des proportions moindres en Europe et aux Etats-Unis (EFRA, 2006; SRI-consulting, 2007). Deux raisons peuvent expliquer ces différences. La première est le fait que la plupart des biens électriques sont produits en Asie et la seconde est l'absence de réglementation concernant l'utilisation des RFB dans certains de ces pays.

En Europe, la quantité de RFB utilisée n'a pas significativement évolué depuis 2001 puisqu'elle était de 42 000 tonnes en 2001, de 50 000 en 2005 (EFRA, 2006), et de 45 000 en 2007 (SRI-consulting, 2007).

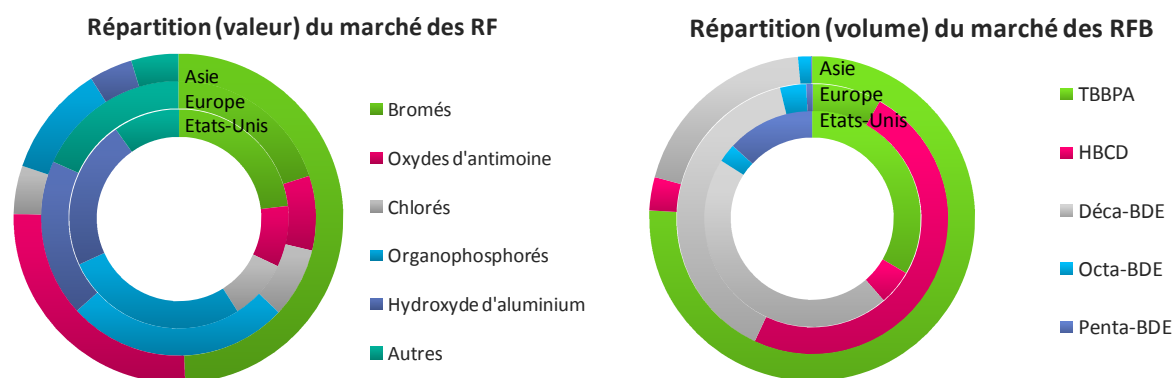


Figure I-3 : Structure du marché en valeur (à gauche) et en volume (à droite) des retardateurs de flamme

Une source différente précise par ailleurs la répartition entre les différents RFB en 2001 par région, montrée sur la figure I-3, en s'intéressant en détail aux trois principales familles de RFB, à savoir les PBDE, le TBBPA et l'HBCD. Des différences importantes sont observées entre les continents, avec une prédominance du TBBPA en Asie, et celle de l'HBCD en Europe. Le déca-BDE est quant à lui largement utilisé sur tous les continents. En Europe, l'utilisation du déca-BDE s'élèverait à 7 600 tonnes, le TBBPA à 11 600 tonnes et l'HBCD à 9 500 tonnes (BSEF, 2003). La figure I-5, présentée plus loin au paragraphe 1.2.3., montre un aperçu de l'évolution de l'utilisation des RFB en Europe durant ces trois dernières années. Celle-ci indique une faible diminution de l'utilisation du déca-BDE et du TBBPA et une stagnation pour l'HBCD (EFRA, 2011b).

Depuis cette date, il est évident que la structure du marché a évolué en Europe, puisque l'octa-BDE et le penta-BDE ont été interdits dans les biens électriques et électroniques en 2002, suivis par le déca-BDE en 2008. Cependant, aucune donnée facilement accessible n'est disponible quant à la structure actuelle du marché des RFB, ces données étant éditées lors d'études de marché monnayées par les sociétés les produisant.

1.2.2 - Le risque incendie

Le risque d'incendie a été de tout temps une préoccupation majeure de l'Homme. C'est encore le cas aujourd'hui, même dans les pays industrialisés, où si celui-ci est globalement bien maîtrisé, il cause encore de nombreux dégâts économiques et humains. La figure I-4 présente ainsi le nombre de décès lié aux incendies et le coût, rapporté au PIB (produit intérieur brut), dans différents pays pour la période 2005-2007. Ces valeurs apparaissent plutôt stables, notamment en France. Le coût direct lié à ces incendies est souvent inférieur à 2 % du PIB pour les pays considérés, mais il s'élève tout de même en France à plus de 3 milliards d'euros (Geneva-Association, 2010).

Il est intéressant de noter que des pays tels que les Etats-Unis, le Royaume-Uni ou la Norvège présentent des résultats mitigés que ce soit en termes de nombre de décès ou en coût associé, alors que les politiques gouvernementales de lutte contre les incendies domestiques y sont très développées, et que les statistiques nationales montrent un effet bénéfique de ces mesures (Emsley et al., 2005).

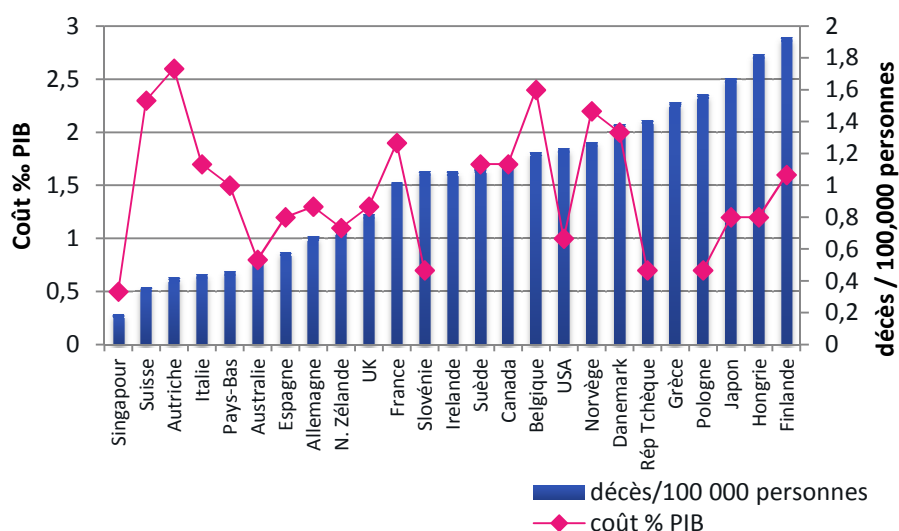


Figure I-4 : Estimation de l'impact du risque incendie (nombre de décès et coût associé) pour différents pays

Hormis ces impacts humains et financiers conséquents, les incendies sont également une source de pollution environnementale, principalement atmosphérique. Divers gaz et composés toxiques sont émis lors de la combustion, notamment du dioxyde et du monoxyde de carbone, mais aussi, selon le matériau combustible, de l'acide cyanhydrique, de l'acide chlorhydrique, des dioxines et/ou des furanes halogénés (PXDD/F), ou encore des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ces deux dernières catégories de composés sont classées comme POP (EFRA, 2004b).

1.2.3 - Associations de promotion de l'utilisation des RFB

Ces faits mettent en avant l'importance de protéger les populations contre les incendies, en légiférant à différents niveaux. Une des mesures principales est ainsi la généralisation des détecteurs de fumées dans les habitations. Une autre mesure est le renforcement des exigences en matière d'ignifugation des matériaux de construction et des biens de consommation. C'est là l'une des raisons à l'utilisation des retardateurs de flamme, notamment bromés, sur laquelle s'appuient les associations de producteurs de retardateurs de flamme afin de promouvoir leur utilisation. Plusieurs associations agissent pour défendre l'utilisation des RFB. Au niveau mondial, le BSEF (Bromine Science and Environmental Forum) regroupe Albemarle Corporation, ICL Industrial Products, Chemtura et Tosoh Corporation, les principaux producteurs de RFB. Au niveau européen, l'« European Brominated Flame Retardant Industry Panel » (EBFRIP) regroupe les mêmes industries (à l'exception de Tosoh Corporation, un groupe japonais) ainsi que des industriels utilisateurs de RFB. Depuis le début 2011, l'EBFRIP fait partie de l'« European Flame Retardants Association » (EFRA) pour l'utilisation des retardateurs de flamme en général. Ces associations ont pour but de défendre la promotion de l'utilisation du TBBPA, du déca-BDE et de l'HBCD, et ne font généralement aucune mention des autres RFB. Ce sont des associations lobbyistes qui interviennent auprès des instances gouvernementales, communiquent sur la gestion du risque et la protection de l'environnement, mais ne publient généralement pas de données scientifiques.

En 1995, via la signature d'un « Voluntary Industry Commitment » avec l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE), les industriels se sont engagés à ne plus produire de polybromobiphényles (PBB), à n'utiliser les polybromodiphenylethers (PBDE) qu'en tant que retardateurs de flamme, à modifier les procédures industrielles afin d'améliorer la pureté du déca-BDE, à limiter les pertes en penta-mix vers l'environnement, et à fournir des informations au sujet de la toxicité de ces composés.

Le BSEF et l'EFRA ont par la suite créé en 2004 un programme nommé « Voluntary Emissions Control Action Programme » (VECAP) dont le but est de contrôler et diminuer les émissions de RFB durant leur utilisation. Initialement appliqué à l'utilisation du déca-BDE au Royaume-Uni, le programme s'est étendu aux autres pays européens et à l'HBCD et au TBBPA depuis 2008. 95% des RFB utilisés en Europe y sont inclus. La figure I-5 présente une estimation des émissions annuelles en fonction du volume de chaque RFB couvert par le VECAP. Les résultats montrent une diminution significative des émissions de RFB vers l'environnement entre 2008 et 2009, mais un retour à la hausse en 2010, limité pour le déca-BDE et l'HBCD, mais plus marqué pour le TBBPA (EFRA, 2011b).

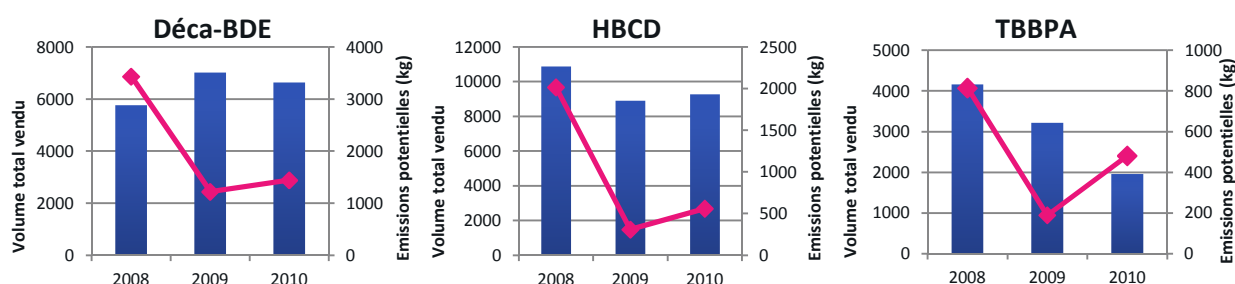


Figure I-5 : Volumes de RFB couverts par le programme VECAP (histogramme) et estimation des émissions environnementales associées (courbe)

1.2.4 - Réglementation

Les organisations internationales comme les Nations Unies à travers leur Programme pour l'Environnement (PNUE) se sont intéressées à ces composés, et en mai 2009 les mélanges industriels penta-mix (contenant des congénères tétra- à penta-BDE) et octa-mix (contenant des congénères hexa- à nona-BDE) ont été ajoutés à l'annexe A de la Convention de Stockholm prévoyant l'interdiction de production et d'utilisation de ces composés par les 151 pays signataires. L'ajout de l'HBCD à cette convention est actuellement à l'étude (UNEP, 2001).

Les RFB sont par ailleurs inclus dans d'autres conventions des Nations Unies. Ils sont notamment concernés depuis 1998 par un texte traitant de la pollution atmosphérique transfrontière à longue distance (CLRTAP) et de l'information des consommateurs (UNEP, 1998). Ils sont également inclus depuis 2003, dans le protocole de Kiev incitant à limiter les émissions de RFB à un seuil inférieur à 1kg par an et par usine. Les RFB sont également inscrits sur la liste de l'initiative OSPAR, impliquant les pays européens bordant la Mer du Nord et l'Océan Atlantique Nord, et qui demande à ces pays d'œuvrer afin de diminuer les taux de divers

produits chimiques dans ces eaux jusqu'à ce qu'ils atteignent des niveaux jugés sans risque pour l'environnement et l'Homme d'ici à 2020 (OSPAR, 1998).

Des dispositions réglementaires viennent appuyer ces conventions. En Europe, les PBB et les PBDE sont interdits d'utilisation par la directive 2003/11/CE. Par ailleurs, la directive 2002/95/CE RoHS (Restriction of the use of certain Hazardous Substances in electrical and electronic equipment) prévoit la limitation de l'utilisation de certains composés toxiques, dont les PBB et les PBDE, à moins de 0,1% du poids du matériau dans les équipements électriques et électroniques. Le déca-BDE est lui concerné par cette directive seulement depuis juillet 2008. Parallèlement, la directive 2002/96/CE impose le recyclage sélectif des Déchets d'Équipements Électriques et Électronique (DEEE) contenant les composés visés par la directive 2002/95/CE, ainsi que d'autres substances dont le TBBPA. Les appareils devant faire l'objet d'un recyclage (figure I-6) sont tous les types d'appareils électriques et électroniques commercialisés.

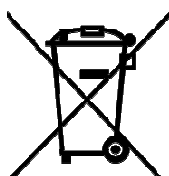


Figure I-6 : Etiquetage des biens concernés par la Directive DEEE

Par ailleurs, le déca-BDE, le TBBPA et l'HBCD sont en cours d'évaluation selon le règlement 793/93 du 23 mars 1993 sur l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques (REACH). Après réalisation des études requises, l'hypothèse d'un retrait de l'HBCD du marché d'ici 5 ans est envisagée, comme ceci a été annoncé en février 2011 par le communiqué de presse IP/11/196 de l'union européenne.

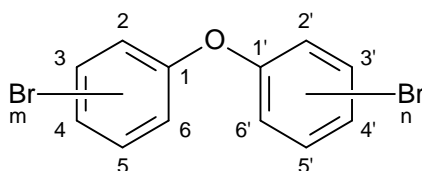
Au niveau mondial, le TBBPA et l'HBCD ne font encore l'objet d'aucune restriction d'utilisation, mais leur cas est à l'étude au sein des agences en charge de l'évaluation du risque dans divers pays. Le déca-BDE ne fait quant à lui l'objet d'aucune restriction en Asie. Aux États-Unis, le BSEF incite ses membres à arrêter son utilisation d'ici fin 2012, et quatre états ont déjà interdit certaines applications du déca-BDE (BSEF, 2010a). Au Canada, le BSEF propose une interdiction du déca-BDE d'ici fin 2013 dans un contexte de grande sensibilisation, à la fois des consommateurs et des pouvoirs publics. En Chine et en Corée, des lois similaires à la directive RoHS ont été adoptées, mais elles ne s'appliquent pas à ce jour au déca-BDE, au TBBPA ou à l'HBCD (BSEF, 2009, 2010a, b).

1.3 - LES RETARDATEURS DE FLAMME BROMES

1.3.1 - Les PBDE

1.3.1.1 - Structure

Les polybromodiphényle éthers (PBDE) forment une famille de substances regroupant 209 congénères théoriques dont la formule chimique est $C_{12}H_{10-x}Br_xO$, avec x compris entre 1 et 10, et $n+m = x$, selon la formule présentée sur la figure I-7. Les atomes de brome peuvent substituer un hydrogène sur n'importe quelle position (2 à 6 et 2' à 6') des cycles. La nomenclature des PBDE est identique à celle utilisée pour les polychlorobiphényles (PCB) et approuvée par l'IUPAC.



Nom abrégé	Nom complet
BDE-28	2,4,4'-tribromodiphényle éther
BDE-47	2,2',4,4'-tétabromodiphényle éther
BDE-99	2,2',4,4',5-pentabromodiphényle éther
BDE-100	2,2',4,4',6-pentabromodiphényle éther
BDE-153	2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphényle éther
BDE-154	2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphényle éther
BDE-183	2,2',3,4,4',5',6-heptabromodiphényle éther
BDE-209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-décabromodiphényle éther

Figure I-7 : Structure chimique générale et principaux représentants (congénères majoritaires ou « indicateurs ») des PBDE

Les PBDE sont synthétisés par réaction de bromation à partir du diphenyle éther. Le degré de bromation moyen résultant dépend des conditions de synthèse, notamment des catalyseurs utilisés. Par ailleurs, la substitution des atomes de carbone est préférentiellement orientée vers les positions ortho et para par rapport à la fonction éther, ce qui explique la prédominance de quelques PBDE parmi les 209 congénères possibles. L'utilisation des PBDE se fait en mélange. Trois formulations techniques à usage industriel, dont la composition est présentée dans le tableau I-1, ont ainsi été ou sont toujours utilisées, à savoir les mélanges **penta-mix**, **octa-mix** et **déca-mix**, dont la dénomination réfère au type de congénère le plus représenté dans ces mélanges respectifs.

Tableau I-1 : Composition (%) des trois mélanges commerciaux de PBDE (CE, 2001, 2002, 2003)

Congénères	Penta-mix	Octa-mix	Déca-mix
Tri-BDE	0 – 1		0,3 – 3
Tétra-BDE	24 – 38		
Penta-BDE	50 – 62	0 – 0,5	
Hexa-BDE	4 – 12	5,5 – 12	
Hepta-BDE		42,3 – 58	
Octa-BDE		26 – 36,1	
Nona-BDE		8 – 14	
Déca-BDE		0 – 3	97 – 98

1.3.1.2 - Utilisation

Les PBDE sont des retardateurs de flamme « additifs », c'est-à-dire qu'ils ne sont pas liés au matériau par des liaisons chimiques, et peuvent donc être relargués sous certaines conditions (Hutzinger and Thoma, 1987). Le penta-mix a été le plus souvent utilisé dans la fabrication de polyuréthane composant des mousses de rembourrage à applications domestiques ou automobiles. D'autres utilisations mineures dans les tissus, les fluides hydrauliques ou des composants électroniques ont également existé (CE, 2001). L'octa-mix a été utilisé à 95% dans les polymères d'acrylonitrile butadiène styrène avec le trioxyde d'antimoine. L'utilisation dans d'autres matières plastiques entrant dans la constitution d'appareils électroménagers, de divers équipements, ou encore de certains jouets a également été rapportée (CE, 2003).

Le déca-mix est quant à lui utilisé dans le High Impact Polystyrène (HIPS), dans les appareils électroniques ou électriques tels que les télévisions, mais il peut être ajouté à une plus large gamme de polymères plastiques avec des applications dans tous les domaines précédemment cités ainsi que dans certains matériaux de construction. Il semble désormais largement utilisé dans les textiles et mousses d'ameublement. Les applications de ce dernier mélange de PBDE encore autorisé sont donc très larges et ne concernent pas uniquement les produits électriques et électroniques couverts par les directives RoHS et DEEE (CE, 2002; BSEF, 2010a).

1.3.1.3 - Toxicité

Au cours des dernières années, plusieurs études toxicologiques, ont apporté des éléments forts suggérant que les PBDE peuvent entraîner l'apparition d'effets délétères aigus ou chroniques, lors d'expositions à basse dose. Ces différentes études, conduites *in vivo* ou *in vitro* ont notamment montré que les effets semblent plus particulièrement marqués lors d'une exposition intervenant pendant les phases critiques de développement. Les PBDE ont ainsi un effet qui a été

démonstré sur le système nerveux, ou encore sur la reproduction, mais une des préoccupations majeures concerne leur effet sur le système thyroïdien.

Chez la souris et le rat, l'exposition néonatale aux BDE-47, -99, -183 ou au penta-mix peut causer des aberrations permanentes du comportement spontané (locomotion, activité en général, comportement) et altérer l'apprentissage et la mémoire chez l'adulte. Ces effets sont en outre dose-dépendants (Eriksson et al., 2001; Branchi et al., 2003). Il a également été montré que suite à une exposition périnatale le BDE-209 peut lui aussi être responsable d'altérations du comportement, de certains délais d'apprentissage chez les souris mâles, et d'une altération de l'activité locomotrice chez les adultes (Rice et al., 2007). Les hypothèses quant aux mécanismes d'action à l'origine de ces observations suggèrent soit une action directe, puisque le penta-mix inhibe la fixation de la glutamine dans les vésicules synaptiques (Mariussen and Fonnum, 2003), soit une action indirecte via une perturbation du système thyroïdien.

Cette dernière hypothèse est privilégiée car plusieurs études ont montré qu'une exposition aux PBDE moyennement bromés induit une diminution du taux de thyroxine (T4) circulante, tandis que les taux de Tri-iodothyronine (T3) et de Thyroïdostimuline (TSH) ne semblent pas affectés. Le BDE-209 aurait quant à lui plutôt tendance à faire diminuer le taux d'hormone T3 (Tseng et al., 2008; Van der Ven et al., 2008c). Plusieurs mécanismes pourraient être à l'origine de ces effets. Une première explication serait que les PBDE peuvent induire une hyperplasie de la thyroïde, comme ceci a été relaté pour le BDE-209 et le penta-mix, la seconde explication avancée serait que les PBDE accélèrent le catabolisme de l'hormone T4. Une autre explication, plus plausible, serait la fixation des PBDE sur la transthyrétine (TTR) qui est le transporteur de l'hormone T4 (Darnerud, 2003; Legler and Brouwer, 2003). Il est important de mentionner que les métabolites des PBDE pourraient être davantage impliqués que les composés parents dans ces processus. En effet, des tests réalisés à partir de PBDE natifs purs (standards) n'ont pas révélé d'effet sur la fixation de la T4 sur la TTR, contrairement à ce qui est observé pour des extraits microsomaux de PBDE, donc après métabolisation de phase I (oxydation). D'autres tests réalisés à partir de différents standards ont par ailleurs confirmé que les polybromophénols (PBP) et les PBDE hydroxylés (OH-PBDE) sont capables de se fixer sur la TTR. Les standards d'OH-PBDE ont été choisis pour leur similarité structurale avec la T3, la T4 et un précurseur (la diiodothyronine), et il s'avère que les deux premiers montrent une activité forte (Meerts et al., 2000).

Par ailleurs, les PBDE pourraient aussi avoir un effet sur la reproduction. Le penta-mix induirait chez le rat un retard de la maturation sexuelle, et des altérations des tissus dont le développement

est dépendant des hormones stéroïdiennes de type androgène chez les mâles. Ce type d'effet n'a toutefois pas été observé pour le BDE-209 (Stoker et al., 2004; Van der Ven et al., 2008b; Van der Ven et al., 2008c). S'agissant d'autres espèces, une différence non significative a été observée chez les femelles étourneaux au niveau du comportement lors de la ponte, et au niveau du poids et de la taille des œufs pondus, suite à une exposition au penta-mix (Van den Steen et al., 2009a). A l'opposé, aucun effet n'a été observé chez les poissons, lors d'études sur le flet et le poisson zèbre (Kuiper et al., 2008). Les effets observés chez le rat pourraient être dus à une interaction des PBDE avec les cytochromes impliqués dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes, notamment les cytochromes P450 17 (CYP17), qui a été notée *in vivo* (Van der Ven et al., 2008b; Van der Ven et al., 2008c). Une étude *in vitro* a par ailleurs montré que le BDE-183, certains métabolites hydroxylés et un métabolite méthoxylé inhibent la synthèse de la déhydroépiandrostérone (DHEA), probablement en intervenant sur le fonctionnement des CYP17 (Canton et al., 2005; Canton et al., 2006). Cependant, les métabolites pourraient ici aussi être pour partie responsables de cet effet, puisqu'il a été montré que les OH-PBDE, mais pas les PBDE méthoxylés (MeO-PBDE), peuvent dans des essais sur microsomes placentaires humains, interagir avec le cytochrome P450 19, responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes (Canton et al., 2008). Les BDE-28 et -38 seraient, comme certains autres métabolites hydroxylés et méthoxylés, des inducteurs de cette enzyme, alors que les BDE-206 et -209 seraient des inhibiteurs dans les cellules surrénales de la lignée H295R (Canton et al., 2005). Par ailleurs, les PBDE ont la capacité de se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes ER, les composés les plus affins étant les BDE-100, -75 et -51, alors que les hexa- et hepta-BDE testés ne se sont pas fixés sur le récepteur. Les trois OH-PBDE testés ont montré une affinité forte pour ces récepteurs (Meerts et al., 2001).

1.3.2 - Le TBBPA

1.3.2.1 - Structure

Le TBBPA est un composé de formule chimique $C_{15}H_{12}Br_4O_2$ dont la structure semi-développée est présentée sur la figure I-8. Il est disponible sous forme de produits commerciaux purs à 98 – 99 % environ.

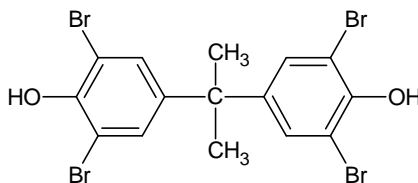


Figure I-8 : Structure chimique semi-développée du TBBPA

Le TBBPA est synthétisé par bromation du Bisphénol A (BPA), un composé connu pour être un œstrogéno-mimétique et qui est utilisé principalement dans la production des polycarbonates et des résines époxy. Ces deux matériaux très répandus trouvent des applications en agro-alimentaire et dans de nombreux biens de consommation courante. De la même manière que les PBDE, le TBBPA agit en limitant les réactions de combustion en phase gazeuse.

1.3.2.2 - Utilisation

Le TBBPA est un retardateur de flamme de type « réactif », c'est-à-dire qu'il est possible de l'intégrer dans les chaînes de polymères tels que ceux formés à partir du BPA. Il est cependant parfois utilisé comme retardateur de flamme additif. Le plus souvent, le TBBPA est polymérisé pour produire des résines époxy ignifugées, et trouve ses applications principales dans le recouvrement des circuits imprimés et les composants électroniques, où il est le RFB utilisé dans 95% des cas. Il est également utilisé dans la production de l'acrylonitrile butadiène styrène (ABS), un polymère très répandu dans les appareils électroménagers, les jouets ou certaines carrosseries automobiles (CE, 2006; BSEF, 2010b).

1.3.2.3 - Toxicité

Les études toxicologiques concernant le TBBPA sont moins nombreuses que celles sur les PBDE, mais elles conduisent également à la suspicion d'effets toxiques, notamment concernant le métabolisme des hormones thyroïdiennes. Cependant, contrairement aux PBDE, le TBBPA n'aurait pas d'effets neurotoxiques, puisqu'aucune perturbation comportementale n'a été observée *in vivo* chez le rat (Eriksson et al., 2001), bien qu'il semble inhiber l'assimilation de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), de la dopamine et du glutamate dans des synaptosomes de cerveau de rat (Mariussen and Fonnum, 2003).

Il a par contre été montré que le TBBPA est un bon compétiteur *in vitro* de la TTR, alors qu'il ne semble pas l'être *in vivo* (Darnerud, 2003; Legler and Brouwer, 2003). Dans les études *in vitro*, ce composé est également un très bon compétiteur de la fixation de la T4 sur la TTR, les auteurs ayant par ailleurs noté une activité croissante en fonction du degré de bromation entre le BPA et le TBBPA (Meerts et al., 2000). Une des hypothèses avancées pour expliquer cette observation est une interaction forte avec la TTR, en raison des analogies structurales entre le TBBPA et les hormones thyroïdiennes. Ceci induit une diminution du taux sérique de T4, qui a été observée

chez le rat (Van der Ven et al., 2008a). L'interaction du TBBPA avec la Thyroxine-binding globulin (TBG) semble par contre très limitée (Marchesini et al., 2008).

Le TBBPA ne semble pas, ou peu, avoir d'effet sur le système stéroïdien (Canton et al., 2006; Van der Ven et al., 2008a). Le BPA présente une forte affinité pour les récepteurs ER, et on note une affinité décroissante avec le degré de bromation entre le BPA et le TBBPA pour ces récepteurs (Meerts et al., 2001; Samuelsen et al., 2001). Par contre, il a été démontré récemment que le TBBPA est un ligand et un activateur des des récepteurs PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ), avec une activité croissante avec le degré de bromation de la molécule de BPA (Riu et al., 2011). En résumé, plus le BPA est halogéné, moins il s'agit d'un perturbateur endocrinien œstrogénique, et plus il est susceptible de perturber le métabolisme lipidique via l'activation de PPAR- γ , le TBBPA étant le composé le plus actif au niveau de ces récepteurs nucléaires.

Plusieurs études ont rapporté une toxicité du TBBPA pour les organismes aquatiques. Chez les larves de xénope (*Xenopus tropicalis*), une exposition au TBBPA induit rapidement des malformations, surtout au niveau des yeux et de la queue des embryons, significatives dès la concentration de 0,01 mg/L en présence de T3. Le fait que la T3 amplifie l'effet du TBBPA suggère que les voies d'action de ce composé impliquent l'axe thyroïdien (Shi et al., 2010). Le TBBPA provoque également des malformations et des anomalies cardiaques, des œdèmes et des hémorragies chez les poissons zèbre suite à une exposition embryonnaire. Il induit un taux de mortalité de 100% pour des doses supérieures à 1,6 mg/L (McCormick et al., 2010).

1.3.3 - L'HBCD

1.3.3.1 - Structure

L'hexabromocyclododécane dont la formule chimique est $C_{12}H_{18}Br_6$ regroupe en fait plusieurs diastéréoisomères dont les majoritaires sont les formes α , β et γ présentées sur la figure I-9. Ces 3 diastéréoisomères sont retrouvés en mélange dans les produits commerciaux, avec une prédominance de la forme gamma, à 70-95%. Dans les standards, les valeurs de fraction énantiomérique (EF) sont proches de 0,5 et donc d'un mélange racémique des 2 énantiomères pour l' α - et le γ -HBCD (Eljarrat et al., 2009).

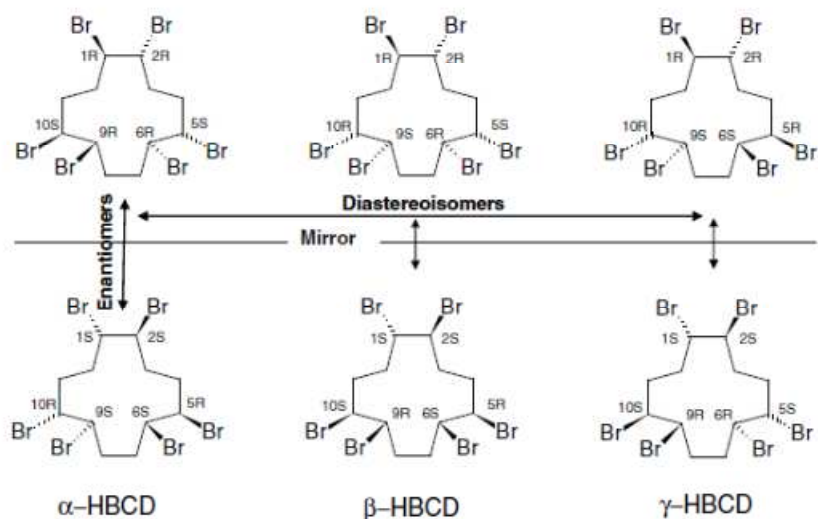


Figure I-9 : Structure chimique semi-développée des principaux isomères de l'HBCD (Janak et al., 2008)

1.3.3.2 - Utilisation

L'HBCD est utilisé principalement dans les polystyrènes extrudés utilisés comme isolants dans la construction, ainsi que dans certains textiles et mousses utilisés en ameublement, et de manière moins répandue dans des composants électriques et électroniques (BSEF, 2009).

1.3.3.3 - Toxicité

Tout comme pour le TBBPA, le faible nombre d'études menées sur la toxicité de l'HBCD ne permet pas toujours de tirer de conclusions claires, mais elles donnent tout de même certaines informations quant à son potentiel toxique.

L'HBCD semble ainsi avoir des effets neurotoxiques. Une étude a rapporté des altérations du comportement et des capacités cognitives à l'âge adulte chez la souris suite à une exposition périnatale, à savoir des altérations du comportement spontané, une hyperactivité, une habitude inférieure, ainsi qu'une diminution des capacités d'apprentissage et de la mémoire (Eriksson et al., 2006). Des altérations de l'audition ont également été rapportées chez le rat (Lilienthal et al., 2009).

Des doses très élevées d'HBCD peuvent induire une hypothyroïdie, faible mais persistante à l'âge adulte, suite à une exposition fœtale et durant l'allaitement chez le rat. Cette hypothyroïdie est accompagnée d'une diminution des taux des hormones T3 et TSH (Saegusa et al., 2009). Une autre étude a rapporté à une dose élevée une diminution du taux sérique de l'hormone T4 chez le rat (Ema et al., 2008). D'autres effets semblent indiquer que l'HBCD a lui aussi un

impact sur le développement ont été observés. Ainsi, une exposition fœtale ou postnatale (généralement via le lait maternel) à des faibles doses d’HBCD chez le rat induit notamment une perte de poids, une diminution de la densité osseuse, et une diminution de la concentration en rétinoïdes, ces molécules étant impliqués dans de nombreuses voies métaboliques dans le foie (Ema et al., 2008; van der Ven et al., 2009).

Par ailleurs, l’HBCD est suspecté d’être un composé cancérigène. En effet, celui-ci, au même titre le BDE-2 et le BDE-12, induit une augmentation de la fréquence de recombinaison dans deux essais sur cellules de mammifères, avec les clones sp5 et SPD8 (Helleday et al., 1999).

1.4 - CONCLUSION

Les RFB sont des produits de synthèse très utilisés pour leur efficacité en tant que produits ignifugeants, dans des produits manufacturés à forte valeur ajoutée. Ces substances sont bénéfiques pour la protection des biens et des personnes vis-à-vis du risque d’incendie, et représentent un marché économique conséquent pour les producteurs et les utilisateurs de ces composés. Cependant, les données toxicologiques disponibles à leur sujet montrent qu’ils pourraient avoir des effets néfastes sur différentes fonction de l’organisme. Des études *in vivo* ou *in vitro* chez l’animal ont montré qu’ils ont une influence sur le développement neurologique, et qu’ils peuvent agir en tant que perturbateurs endocriniens, impactant notamment l’homéostasie des hormones thyroïdiennes ou stéroïdiennes. Ces effets semblent exacerbés si l’exposition intervient durant les périodes de développement fœtal et postnatal, ce qui est une source de préoccupation sur le plan de l’analyse du risque. D’autre part, des métabolites seraient responsables de certains des effets décrits, suggérant que le métabolisme par les êtres vivants mènerait à une activation biologique des RFB. C’est en connaissance de ces conclusions que deux mélanges commerciaux de PBDE ont été récemment classés comme polluants organiques persistants, et interdits dans de nombreux pays. Désormais, les principaux RFB utilisés sont donc le déca-BDE, le TBBPA et l’HBCD. Si la littérature est relativement instructive pour les PBDE dont l’utilisation est maintenant limitée, des données toxicologiques supplémentaires sont en revanche clairement nécessaires pour les trois RFB encore en utilisés.

2 - TRANSFERT ET DEVENIR DANS L'ENVIRONNEMENT, LA CHAÎNE ALIMENTAIRE ET CHEZ LES ÊTRES VIVANTS

L'émission environnementale de RFB à partir de leurs sites de production et d'utilisation industrielle représente la source primaire d'exposition de l'Homme à ces substances, mais le fait que les RFB puissent être directement émis de produits manufacturés n'est pas à négliger. Une fois libérés, les RFB sont disséminés dans l'environnement en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. Il en résulte différentes modalités d'exposition, environnementale ou alimentaire, décrites sur la figure I-10. Un état des lieux de la présence environnementale des RFB, et de l'imprégnation humaine sera détaillé ici, mais il est avant tout important de noter que si la bibliographie s'est enrichie depuis quelques années au sujet des PBDE, et dans une moindre mesure pour l'HBCD, ce n'est pas le cas pour le TBBPA qui est encore très peu étudié. Il est donc difficile de tirer des conclusions au sujet de ce dernier. Un autre point à noter concernant les PBDE est qu'en raison de la complexité de leur analyse, les PBDE hautement bromés (8 à 10 bromes) ne sont souvent pas recherchés, et ainsi bon nombre d'études se limitent à analyser les principaux représentants de cette famille (composés tri- à hepta-BDE les plus abondants, ou « indicateurs ») ce qui aboutit à une sous-estimation globale des niveaux d'exposition.

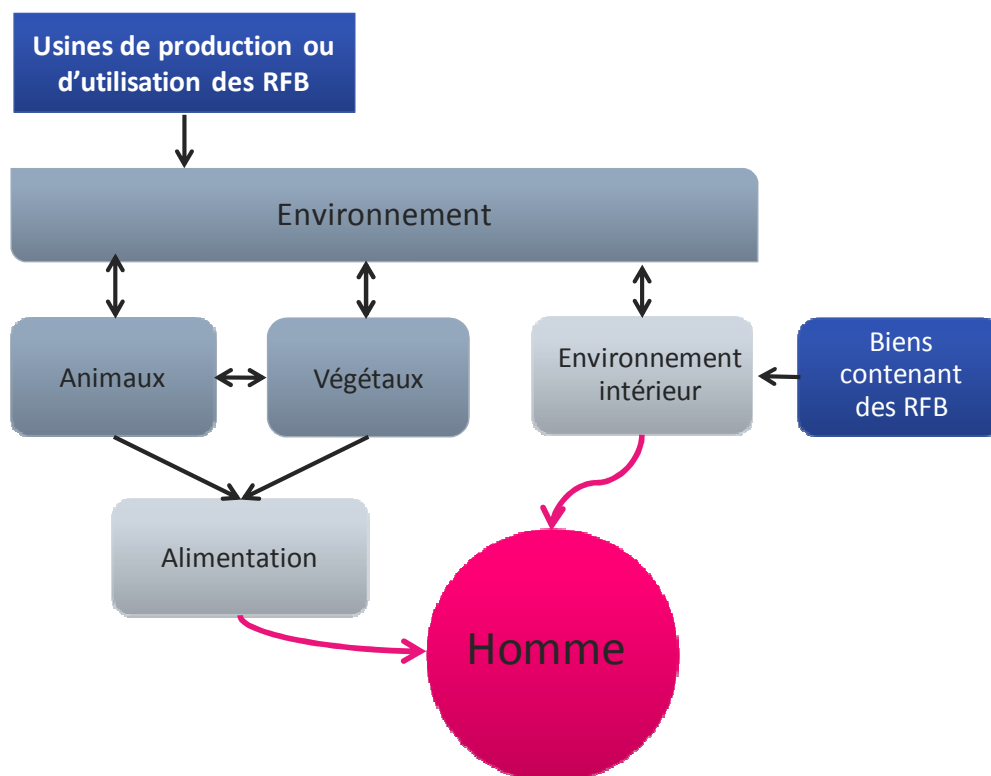


Figure I-10 : Schématisation des différentes voies d'exposition de l'Homme aux RFB

2.1 - NIVEAUX DE CONTAMINATION ENVIRONNEMENTAUX

2.1.1 - Présence dans les différents compartiments environnementaux

2.1.1.1 - Dans les sédiments et le sol

En raison de leur hydrophobicité importante, les RFB s'adsorbent facilement sur les particules. Ils sont donc retrouvés dans la plupart des sols et notamment les terres agricoles. De façon très générale, les PBDE et le TBBPA sont présents dans ce type de matrice à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/kg}$, mais des concentrations plus importantes (de l'ordre du mg/kg) ont déjà été relevées, par exemple pour le TBBPA à proximité de décharges (Hale et al., 2006; Law et al., 2008b; Covaci et al., 2009). En ce qui concerne les sédiments, les concentrations en PBDE rapportées en Europe et en Asie sont également de l'ordre du $\mu\text{g/kg}$, le BDE-209 étant souvent majoritaire, suivi du BDE-47 et du BDE-99. Les concentrations en HBCD, isomère gamma en tête, vont du ng au $\mu\text{g/kg}$, et celles en TBBPA sont de l'ordre du ng/kg . Les concentrations peuvent être ponctuellement accrues, de l'ordre du mg/kg , à proximité de sites industriels utilisant ces composés, de stations d'épuration, ou même de zones habitées. Une décroissance de la contamination est observée avec l'éloignement des sources de pollution (Covaci et al., 2006; Hale et al., 2006; Law et al., 2008b).

Si les RFB sont présents dans les sédiments, ils le sont également dans l'eau. Les PBDE sont ainsi retrouvés à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/kg}$ de matière sèche avec des différences géographiques, les eaux étant par exemple environ 10 fois plus contaminées aux Etats-Unis qu'en Europe. Comme dans le cas des sédiments, le BDE-209 et les composants du penta-mix sont prédominants. Le TBBPA est en général présent à des concentrations relativement faibles, de l'ordre du ng/L . Une étude sur la présence d'HBCD dans l'eau et les sédiments de 9 lacs anglais a rapporté des concentrations comprises entre le pg et le ng/L , le γ -HBCD étant le plus abondant (Hale et al., 2006; Covaci et al., 2009; Harrad et al., 2009).

Les sédiments représentent une matrice de choix afin de caractériser l'évolution temporelle de la pollution environnementale. Ainsi, une étude effectuée sur les sédiments d'un lac Suisse indique que les concentrations en HBCD, en octa-BDE, en nona-BDE et BDE-209 ont été multipliées par un facteur compris entre 5 et 9 selon le composé entre 1974 et 2001 (Kohler et al., 2008). Les lieux éloignés de toute activité humaine ne sont pas épargnés, puisque dans les sédiments d'un lac arctique norvégien la concentration en tétra- à hepta-BDE est en augmentation constante, d'un facteur cinq environ, depuis les années 50, contrairement à la concentration en PCB qui

diminue lentement. Les α - et γ -HBCD sont détectés depuis 1980 environ à des concentrations fluctuantes, mais qui étaient en 1980 onze fois supérieure à celle des PBDE (Evenset et al., 2007). Dans le glacier de Svalbard en Norvège, il a été noté que le BDE-209 est le congénère de PBDE majoritaire, et que sa concentration augmente constamment depuis 1953. Le congénère suivant en quantité est le BDE-49 avec une concentration 75 fois plus faible. L'HBCD est plus abondant que le BDE-209, mais ses concentrations fluctuent (Hermanson et al., 2010).

2.1.1.2 - Dans l'air et les poussières

Les RFB sont également présents dans les poussières. Dans l'air extérieur, ceci équivaut à des concentrations de l'ordre du pg/m^3 , avec comme contaminant majoritaire l'isomère gamma de l'HBCD. Il semble y avoir une diminution de la contamination avec l'éloignement des sources de pollution dépendante du poids moléculaire du composé, mais l'HBCD a été détecté à des concentrations de l'ordre du pg/m^3 dans des régions inhabitées au nord des pays scandinaves ou des Etats-Unis, et le TBBPA a été mesuré à 70 pg/m^3 en Arctique en 2000 (Covaci et al., 2009).

Les atmosphères intérieures sont plus contaminées en RFB, et celles prélevées en Europe et en Asie présentent des taux en PBDE et en HBCD (essentiellement la forme gamma) variant entre quelques dizaines et plusieurs milliers de $\mu\text{g/kg}$ (soit de l'ordre du pg/m^3). Certains auteurs ont noté que l'air des habitations est significativement moins contaminé que celui de bureaux et de l'habitacle des automobiles. Des variations quantitatives et qualitatives (profils de contamination, *i.e.* proportions relatives des différents congénères) des concentrations en PBDE existent d'un pays à l'autre, en fonction de la nature et des quantités de RFB qui y sont et ont été utilisés. De la sorte, les valeurs maximales ont été observées en Amérique du Nord et en Angleterre, probablement à cause de la rigueur des lois de lutte contre les incendies ayant mené à une généralisation des matériaux ignifugés. En Europe, le BDE-209 est souvent le congénère majoritaire (Covaci et al., 2006; Harrad et al., 2008a; Harrad et al., 2008b; Law et al., 2008b). Le TBBPA, lorsqu'il est détecté, est retrouvé à des concentrations allant de quelques pg/m^3 dans les habitations, à plusieurs milliers de pg/m^3 dans les ateliers de recyclage de déchets électriques et électroniques (Covaci et al., 2009).

2.1.2 - Transfert vers la faune, la flore et la chaîne alimentaire

2.1.2.1 - Transfert du sol vers les plantes

Les quelques études disponibles relatives à ce sujet montrent que les RFB présents dans le sol peuvent être absorbés par les plantes. Selon une étude sur l'assimilation des PBDE par trois

plantes (herbe, citrouille et maïs), conduite en milieu naturel à proximité d'une usine de retraitement électronique, les tétra- et penta-BDE sont assimilés plus facilement que le BDE-209. Les PBDE sont ensuite distribués dans tous les tissus des plantes. La citrouille semble davantage accumuler les PBDE, probablement en raison de son taux de lipides plus élevé (Huang et al., 2011). Une étude fait également état de l'assimilation du TBBPA et de l'HBCD par deux plantes (radis et choux), avec là encore une différence entre les espèces. L' α -HBCD est plus facilement absorbé que ses deux autres diastéréoisomères, et l'absorption du TBBPA est quand à elle plus limitée (Li et al., 2011).

Une analyse d'échantillons d'herbe de pâture prélevés au même endroit au Royaume-Uni entre 1930 et 2004 a montré que la contamination des plantes par les RFB a commencé dans les années 70 et a augmenté depuis, même si une variabilité importante existe entre les différents échantillons collectés durant une même année. Depuis 2000, il semble que la contamination en PBDE diminue, excepté pour le BDE-28 dont le taux est toujours en augmentation. Les composés majoritaires sont les composants du penta-mix. (Hassanin et al., 2005).

2.1.2.2 - Niveaux d'imprégnation de la faune

En Europe et en Asie, les niveaux d'exposition interne (imprégnation) sont généralement compris entre quelques $\mu\text{g/kg}$ et plusieurs mg/kg de lipides de PBDE ou d'HBCD. Les résidus de RFB sont principalement retrouvés dans le foie, le tissu adipeux et les muscles, avec une variabilité interindividuelle importante. Il existe également des différences géographiques, les poissons étant plus contaminés en Europe qu'en Amérique du Nord ou en Asie, et les espèces d'eau douce étant plus contaminées que celles d'eau salée. Lorsque le profil en PBDE est caractérisé de façon large (*i.e.* de tri- à décaBDE) celui-ci montre souvent une prédominance des tétra- et penta-BDE et du BDE-209. Cependant, aucune règle claire ne transparaît et il semble y avoir des variations inter-espèces et/ou géographiques déterminantes. En ce qui concerne l'HBCD, contrairement à ce qui est observé pour les matrices abiotiques, la forme majoritaire (et généralement unique) est l' α -HBCD avec souvent un enrichissement énantiomérique (Covaci et al., 2006; Law et al., 2008b).

Plus spécifiquement, les poissons et crustacés de consommation courante présentent des taux en PBDE, en TBBPA ou en HBCD de l'ordre du $\mu\text{g/kg}$ et parfois du mg/kg . Les mammifères marins, y compris des zones inhabitées comme l'Arctique, présentent des concentrations plus élevées, d'une centaine à quelques milliers de $\mu\text{g/kg}$ de lipides pour les PBDE ou l'HBCD. Le

TBBPA est retrouvé en quantités plus faibles puisque les concentrations rapportées sont de l'ordre du $\mu\text{g/kg}$ et que ce dernier n'a pas été retrouvé chez les mammifères de la zone arctique (Johnson-Restrepo et al., 2008; Law et al., 2008b; Harrad et al., 2009; de Wit et al., 2010).

Globalement, ces observations semblent indiquer que ces composés sont sujets à la bioamplification. Ceci a d'ailleurs été confirmé pour les PBDE par quelques études, l'une d'entre elles avançant un facteur supérieur à 100 entre les consommateurs primaires et finaux de deux chaînes alimentaires d'eau douce. Une autre étude menée en Atlantique a indiqué que la bioamplification concernait surtout les congénères comportant de 3 à 7 atomes de bromes, et que celle-ci est significative seulement entre les consommateurs primaires et les espèces carnivores (Law et al., 2008b). Ceci semble également vrai pour les chaînes alimentaires terrestres, puisqu'une bioamplification de tétra- à hexa-BDE a été mise en évidence entre le prédateur final et la flore. Par ailleurs, le BDE-209 serait bioaccumulé, puisque les concentrations notées en 2000-2002 sont supérieures à celles de 1993-1994 (Mariussen et al., 2008).

Certaines espèces animales peuvent être utilisées comme espèce sentinelle, voire comme outil de biomonitoring de la contamination environnementale en RFB. Ainsi, afin de comparer la contamination environnementale en Europe, une étude a comparé les taux en PBDE des œufs de mésanges charbonnières dans 14 pays. La conclusion est qu'il n'y a pas de différence de contamination entre ces pays, mais plutôt en fonction de l'urbanisation, les zones urbaines étant plus contaminées que les zones rurales, qui sont significativement plus contaminées que les zones non peuplées (Van den Steen et al., 2009b). Un autre exemple est une étude menée sur des dauphins et des marsouins retrouvés le long des côtes anglaises. Les résultats montrent une évolution lente du taux d'HBCD entre 1994 et 2001 suivie d'une augmentation très importante en 2002, puis d'une diminution. Ces fluctuations pourraient s'expliquer par la fermeture en 2003 d'un site de production d'HBCD particulièrement polluant (Law et al., 2008a).

2.1.2.3 - Présence dans les aliments

Les RFB sont retrouvés dans l'alimentation humaine du fait de leur omniprésence environnementale. Dans les poissons et crustacés, les concentrations en PBDE sont de l'ordre du ng ou du $\mu\text{g/kg}$, mais peuvent être supérieures d'un ordre de grandeur pour les espèces d'eau douce. Les légumes ou la viande représentent une source d'exposition plutôt minoritaire (Sjodin et al., 2003). L'HBCD a été retrouvé dans moins de la moitié des 31 classes d'aliments d'une étude menée aux Etats-Unis, avec des concentrations maximales de quelques centaines de ng/kg

(Schechter et al., 2010). Le TBBPA est quant à lui retrouvé en faible quantité, et n'est pas détecté systématiquement (Covaci et al., 2009). Les aliments les plus contaminés sont ainsi ceux d'origine marine puis ceux contenant un taux élevé de matière grasse. Néanmoins, des variations importantes sont observées, par exemple en fonction du taux de matière grasse des poissons. Il semblerait par ailleurs que les poissons d'élevage soient plus contaminés que ceux pêchés en pleine mer (Domingo et al., 2008; Frederiksen et al., 2009b).

2.2 - LES RFB CHEZ L'HOMME

2.2.1 - Imprégnation humaine

Les taux sériques ou plasmatiques en PBDE chez l'Homme sont globalement de l'ordre du ng/g de lipides, avec des concentrations nettement supérieures en Amérique du Nord comparé à celles observées pour l'Europe ou l'Afrique. Les autres tissus étudiés, comme le foie ou le tissu adipeux présentent des concentrations du même ordre de grandeur. Les congénères majoritaires sont généralement le BDE-47 et le BDE-153, ainsi que le BDE-209 lorsqu'il est recherché (Frederiksen et al., 2009b; Linderholm et al., 2010).

En Europe, une étude norvégienne a rapporté des taux sériques en TBBPA compris entre 0,4 et 0,7 ng/g de lipides dans des échantillons de sérum prélevés entre 1977 et 1999. Aucune augmentation séculaire claire n'a été observée, bien que le TBBPA ne soit détecté qu'à partir de 1981. Par ailleurs, les auteurs ont noté une exposition accrue des enfants de moins de 4 ans (Thomsen et al., 2002). Une étude américaine a mesuré une valeur moyenne en TBBPA de 48 pg/g de lipides dans le tissu adipeux comprenant une valeur maximale de 464 pg/g de lipides.

Pour l'HBCD, la valeur moyenne était de 333 pg/g de lipides, avec la prépondérance du γ -HBCD à 83% (Johnson-Restrepo et al., 2008). Des valeurs supérieures, aux alentours du ng/g de lipides, sont observées en Europe ou au Japon pour l'HBCD, avec une variabilité importante puisque les valeurs relevées au Japon sont comprises entre 0,85 et 39 ng/g de lipides, avec en générale la présence exclusive d' α -HBCD (Antignac et al., 2008; Isobe et al., 2009).

2.2.2 - Voies d'exposition de la population générale

Il existe plusieurs voies d'exposition de l'Homme aux RFB, dont les deux principales sont l'alimentation (voie orale) et les particules aériennes (voie pulmonaire et orale). La première semble dominer, comme ceci a été montré par une étude menée en Belgique dans le but de mesurer l'impact des différentes voies d'exposition (environnement intérieur, extérieur et

alimentation) aux PBDE et à l'HBCD, sur les différentes classes d'âge de la population. Les auteurs ont ainsi conclu que les enfants entre 1 et 3 ans sont les plus exposés, et que les travailleurs adultes sont en moyenne légèrement plus exposés aux PBDE via les poussières. Cette étude a conclu que l'alimentation est la voie d'exposition majeure, l'environnement (poussières, sol et air) représentant moins de 5% de l'exposition totale. Ces auteurs ont calculé une exposition pour les adultes de 0,7 ng/kg/j de 5 tri- à hexa-BDE, de 1,5 ng/kg/j de BDE-209 et de 1,1 ng/kg/j d'HBCD via l'alimentation (Roosens et al., 2010a).

Différents facteurs peuvent influencer sur l'exposition aux RFB, et en particulier les habitudes alimentaires comme la consommation d'aliments comptant parmi les plus contaminés. Ceci a été mis en évidence au sujet de la consommation de poissons provenant de la mer baltique. Les Suédois ne consommant pas ces produits présentent un taux de PBDE sérique de 0,4 ng/g de lipides, contre 2,2 pour ceux en consommant 12 à 20 fois par mois.

L'exposition environnementale via les poussières, même si elle est mineure, n'est pas à négliger. En effet, il a été montré que l'activité professionnelle est un autre facteur de variation à cause de l'inhalation et du contact direct avec les RFB. Ainsi, les ouvriers d'usines de recyclage de biens électrique et électronique sont exposés à des taux plus de 50 fois supérieurs en PBDE, résultant en des taux sériques significativement supérieurs chez les réparateurs d'appareils électriques et électroniques ou les ouvriers travaillant sur les chaînes de recyclage. Il en est de même pour le TBBPA, qui a été retrouvé à un taux de 30 ng/m³ dans une unité de recyclage électronique, accompagné de la présence de ce composé dans le sang des employés (Sjodin et al., 2003).

2.2.3 - Fenêtres d'expositions critiques : exposition fœtale et cas des nouveaux nés

La période périnatale est identifiée comme une fenêtre d'exposition particulièrement critique pour de nombreux composés, dont les RFB. Ceux-ci pourraient en effet être particulièrement actifs durant les phases de développement, comme l'ont montré les données toxicologiques. De plus, l'exposition des enfants en bas âge est parfois supérieure à celle observée pour les adultes (Roosens et al., 2010a). L'exposition fœtale est souvent mise en évidence par l'analyse du sang maternel et du sang du cordon ombilical au moment de la naissance. Le sang du cordon ombilical est filtré par le placenta, mais certains xénobiotiques peuvent passer cette barrière biologique. L'exposition des nouveau-nés est quant à elle caractérisée par l'analyse du lait maternel.

Lors d'une étude réalisée par les deux laboratoires partenaires codirigeant ce travail de thèse, les PBDE ont été recherchés dans des échantillons de sérum de sang maternel et de sang du cordon ombilical prélevés chez 93 couples mère-enfant en France. Les tri- à hepta-BDE ont été quantifiés avec des valeurs médianes de 0,98 et 0,69 ng/g de lipides et les octa- à déca-BDE ont été retrouvés à des concentrations de 8,85 et 12,34 ng/g de lipides, dans le sérum maternel et du cordon respectivement. Le BDE-209 a été retrouvé dans environ la moitié des échantillons de sérum de sang de cordon et dans 90% des échantillons de sérum maternel. Ceci indique clairement que tous les PBDE passent la barrière placentaire, et que le fœtus y est donc exposé durant son développement (Antignac et al., 2009). Les concentrations en PBDE retrouvées dans ces prélèvements de sérum maternel et de cordon sont similaires à celles constatées en Europe, et environ 10 fois inférieures à celles observées en Amérique du Nord. Cependant, les PBDE hautement bromés ne sont pas toujours inclus dans ces études, et lorsqu'ils sont recherchés les conclusions divergent quelque peu. Par exemple, une étude danoise a rapporté des concentrations médianes en tri- à hepta-BDE de 1,77 ng/g de lipides et 0,96 ng/g de lipides dans les échantillons de sérum maternel et de cordon, respectivement, alors que le BDE-209 n'a pas été détecté. Selon ces auteurs, le BDE-209 serait retenu par le placenta, où il a été identifié comme congénère majoritaire à une concentration de 1,25 ng/g de lipides (Frederiksen et al., 2009a; Frederiksen et al., 2010).

L'exposition après la naissance est également avérée pour le nouveau-né en cours d'allaitement. En France les valeurs mesurées dans le lait maternel sont de 3,93 ng/g de lipides de tri- à hepta-BDE et 3,39 ng/g de lipides d'octa- à déca-BDE dont 1,62 ng/g de lipides de BDE-209, ce dernier étant systématiquement retrouvé. Ces concentrations sont de plus apparues corrélées à celles mesurées dans le tissu adipeux, ce qui indique un transfert depuis cette matrice vers le lait maternel. Sur la base des données issues de cette étude, l'exposition journalière résultante a été estimée à 40 ng de tri- à hepta-BDE et 35 ng d'octa- à déca-BDE (Antignac et al., 2009). Ces valeurs sont similaires à celles estimées lors d'autres études en Europe, même si le BDE-209 est parfois mesuré à des concentrations inférieures au ng/g de lipides. Encore une fois, les valeurs observées en Amérique du Nord sont supérieures à celles observées en Europe. Les congénères principaux sont les BDE-47, -99, -153 et le BDE-209 (Polder et al., 2008a; Polder et al., 2008b; Thomsen et al., 2010). Selon une étude menée en Belgique concernant les PBDE, les nouveau-nés seraient exposés à 12 ng/kg/j des 5 PBDE majoritaires (BDE-47, -99, -200, 153 et -154) et 26 ng/kg/j de DBDE (Roosens et al., 2010a).

L'exposition fœtale au TBBPA est également une réalité. En France, celui-ci a en effet été retrouvé dans le sérum maternel et de cordon ombilical à des concentrations médianes de 16,14 ng/g de lipides et 54,76 ng/g de lipides respectivement dans les sérums de 93 couples mère-enfant (Cariou et al., 2008). Des différences géographiques semblent toutefois exister, avec notamment des valeurs apparemment inférieures rapportées en Asie. En effet, une étude japonaise a mesuré une concentration de 26 pg/g dans des échantillons de sang maternel, une concentration de 16 pg/g dans les cordons ombilicaux mais une absence dans le sang des cordons (à une limite de quantification de 2 pg/g) (Kawashiro et al., 2008).

Le TBBPA est également présent dans le lait maternel. Dans une étude réalisée en France, ce composé a été quantifié dans 34 échantillons sur 77 à des concentrations de l'ordre du ng/g de lipides, menant à une exposition des nourrissons estimée à 40 ng de TBBPA par jour (Cariou et al., 2008). En Chine, les concentrations sont généralement inférieures à 1 ng/g de lipides mais peuvent atteindre 5 ng/g de lipides d'après l'analyse d'échantillons de lait maternel prélevés chez 1237 femmes et regroupées en fonction de la région d'origine (Shi et al., 2009b). En Angleterre, il a été mesuré à des concentrations inférieures au ng/g de lipides. Ces valeurs, plutôt basses par rapport à celles des deux autres études sur le TBBPA dans le lait maternel, mèneraient à une exposition de 1 ng/kg/jour pour les enfants de 1 mois (Abdallah and Harrad, 2011). Une synthèse des différentes études concernant le TBBPA est présentée dans le tableau I-2.

En ce qui concerne l'HBCD, ce sont surtout des données dans le lait maternel qui sont disponibles. En France, ce composé a été retrouvé dans 7 échantillons de lait maternel sur 23, à des concentrations de l'ordre du ng/g de lipides, et à des concentrations similaires dans 50% des échantillons de tissu adipeux analysés (Antignac et al., 2008). En Europe, les taux d'HBCD dans le lait maternel sont de l'ordre du ng/g de lipides, mais ce composé n'est pas systématiquement détecté (Polder et al., 2008a; Polder et al., 2008b; Lignell et al., 2009; Malarvannan et al., 2009; Shi et al., 2009b; Thomsen et al., 2010). Une synthèse des valeurs rapportées dans la littérature pour l'HBCD est présentée dans le tableau I-3. L'exposition journalière a parfois été calculée, elle a par exemple été estimée à 175 ng/kg/jour dans une étude espagnole (Eljarrat et al., 2009). Cette valeur semble néanmoins élevée, et une autre étude a quant à elle avancé la valeur de 35 ng/kg/jour (Abdallah and Harrad, 2011). Une modélisation statistique a calculé la valeur de 3 ng/kg/j ou 15,2 ng/kg/j au 95^e percentile, en incluant la variation de prise alimentaire des nourrissons.

Parmi les diastéréoisomères de l'HBCD, l'isomère α est observé de façon prédominante voire exclusive (Antignac et al., 2008; Kakimoto et al., 2008; Malarvannan et al., 2009; Shi et al.,

2009b; Abdallah and Harrad, 2011). Cependant, dans une autre étude, le γ -HBCD a été identifié comme majoritaire ; ce qui explique d'ailleurs l'exposition journalière élevée mentionnée précédemment (Eljarrat et al., 2009). Il semble par ailleurs qu'il y ait un enrichissement en l'un des deux énantiomères d' α -HBCD (figure I-9), l' α -(-)-HBCD (Eljarrat et al., 2009; Abdallah and Harrad, 2011), alors que dans le cas du γ -HBCD trois cas de figure ont été observés (le mélange racémique ou l'enrichissement en une forme énantiomérique, (-) ou (+)) (Eljarrat et al., 2009). Par ailleurs, des évolutions temporelles ont été notées, l'analyse de pools de laits maternels prélevés entre 1973 et 2006 indique ainsi que l'HBCD est détecté depuis 1984 mais qu'aucune tendance, à la décroissance ou au contraire à la croissance, n'est observée depuis (Kakimoto et al., 2008).

Dans le sérum maternel et de cordons ombilicaux, des concentrations en HBCD inférieures à 1 ng/g de lipides ont été rapportées aux Pays-Bas (Meijer et al., 2008), tandis que deux autres études, française et belge, l'ont recherché mais ne l'ont pas trouvé (Antignac et al., 2008; Roosens et al., 2010b). Ici encore, la disparité des méthodes de mesure employées et de leurs performances, peut expliquer l'absence de convergence.

Tableau I-2 : Niveaux de concentration en TBBPA rapportés dans le lait maternel, le sérum maternel et le cordon ombilical

Matrice	Pays	Année	Concentration en ng/g de lipides (moyenne / médiane)	Concentration en pg/g de poids frais	Fréquence de détection	Référence
Lait maternel	France	2004-2006	4,11 / 0,48		44 %	(Cariou et al., 2008)
Sérum maternel	France	2004-2006	19,87 / 16,14		32 %	(Cariou et al., 2008)
Sérum de cordon	France	2004-2006	103,52 / 54,76		29 %	(Cariou et al., 2008)
Sérum maternel	Japon	2005-2006		26 / 17	67 %	(Kawashiro et al., 2008)
Sérum de cordon	Japon	2005-2006		0	0 %	(Kawashiro et al., 2008)
Cordon ombilicaux	Japon	2005-2006		16 / 15	100 %	(Kawashiro et al., 2008)
Lait maternel	Chine	2007	< 0,06 à 5,12		-	(Shi et al., 2009a)
Lait maternel	Royaume-Uni	-	0,06 / <0,04		36 %	(Abdallah and Harrad, 2011)

Tableau I-3 : Niveaux de concentration en HBCD rapportés dans le lait maternel, le sérum maternel et de cordon ombilicaux

Matrice	Pays	Année	Concentration en ng/g de lipides (moyenne / médiane)			Fréquence de détection	Référence
			α -HBCD	β -HBCD	γ -HBCD		
Lait maternel	Japon	1973-2006	< 0,1 à 1,4	< 0,1	< 0,2 à 2,6	-	(Kakimoto et al., 2008)
Lait maternel	Russie	2000		0,47 / 0,45*		-	(Polder et al., 2008a)
Lait maternel	Russie	2002		0,71 / 0,62*		-	(Polder et al., 2008a)
Lait maternel	Norvège	2000-2002		0,13		10 %	(Polder et al., 2008b)
Sérum maternel	Pays-Bas	2001-2002		-/0,7*		99 %	(Meijer et al., 2008)
Sérum de cordon	Pays-Bas	2001-2002		-/0,2*		33 %	(Meijer et al., 2008)
Lait maternel	Philippines	2004	0,66 / 0,61	0,11 / 0,08	0,29 / 0,18		(Malarvannan et al., 2009)
Lait maternel	France	2004-2005	2,5 - 5	0	0	30 %	(Antignac et al., 2008)
Sérums	France	2004-2005	0	0	0	0 %	(Antignac et al., 2008)
Lait maternel	Norvège	2003-2010		1,7 / 0,86*		57 %	(Thomsen et al., 2010)
Lait maternel	Belgique	2006		-/0,6*		-	(Roosens et al., 2010b)
Lait maternel	Espagne	2006-2007	10,1 / 2,24	0	32,5 / 17,5	90 %	(Eljarrat et al., 2009)
Lait maternel	Chine	2007	< 0,05 à 2,78			-	(Shi et al., 2009a)
Lait maternel	Royaume-Uni	-	4,91 / 3,17	0,32 / 0,30	0,73 / 0,56	100 %	(Abdallah and Harrad, 2011)

* : somme des HBCD

2.3 - CONCLUSION

La principale source d'émission environnementale de RFB correspond aux usines de production ou aux sites d'utilisation. Cependant, les études sur la contamination des différents milieux et sur l'exposition professionnelle montrent que les ateliers de retraitement ou les décharges sont également des points d'émission importants. Dans l'environnement, les RFB peuvent être transportés sur de très longues distances, en dépit de leur poids moléculaire élevé. Le BDE-209 et l'HBCD sont ainsi retrouvés dans des zones éloignées de toute activité humaine comme le cercle polaire Arctique. Les RFB suivent un schéma classique de contamination de la flore et de la faune, et se retrouvent dans les différentes classes d'aliments à des doses variables. L'alimentation constitue ainsi la principale voie d'exposition de l'Homme à ces substances, même si quelques études ont montré que l'exposition via l'environnement intérieur ne doit pas être négligée, notamment pour les classes d'âge les plus jeunes.

Les études s'étant spécifiquement intéressées à l'exposition fœtale et périnatale de l'Homme ont confirmé que ces périodes de la vie constituaient les périodes d'exposition les plus critiques du fait du faible poids du nouveau né et de sa plus grande vulnérabilité vis-à-vis d'une perturbation endocrinienne. Une étude a par exemple avancé les valeurs d'exposition au BDE-209 de 1,5 ng/kg/j et 26 ng/g/j et pour l'HBCD les valeurs de 1,1 ng/g/j et 3 ng/g/j, pour l'adulte et le nouveau-né respectivement (Roosens et al., 2010a). L'exposition fœtale a également été démontrée pour les PBDE et le TBBPA. L'Homme est donc particulièrement exposé durant la vie fœtale et périnatale, que les études toxicologiques avaient désignée comme des périodes durant lesquelles les RFB semblent les plus actifs. Cependant, des données supplémentaires sont requises, en particulier concernant le TBBPA et l'HBCD, afin de caractériser plus clairement l'exposition humaine à ces composés.

3 - METABOLISME DES RFB

La biodisponibilité et le métabolisme des RFB ont été étudiés *in vivo* ou *in vitro* chez l'animal, mais les données sur des systèmes d'origine humaine sont plus rares. Chaque RFB suit un schéma de biotransformation différent selon ses propriétés physico-chimiques, et les tissus cibles de ces composés peuvent également être différents. Le TBBPA, qui est un bisphénol, possède deux fonctions hydroxyles, qui favorisent son métabolisme par des voies dites de phase II (conjugaison). Au contraire, les PBDE et l'HBCD doivent nécessairement subir une première étape de fonctionnalisation (métabolisme oxydatif, de phase I) avant d'être éventuellement conjugués. Quant au BDE-209, dont les carbones sont tous substitués, une première étape de débromation est nécessaire. Les différentes étapes du devenir de chaque famille de RFB seront décrites ici, en particulier les éléments liés à leur absorption, leur distribution et leur excrétion. Pour les PBDE, cette partie sera surtout axée sur le BDE-209 dont l'utilisation est encore autorisée. Des informations essentielles concernant les PBDE indicateurs, encore très présents dans l'environnement, seront également données ici, afin de détailler le cas des métabolites qui pourraient être utilisés comme biomarqueurs de l'exposition (aux PBDE). Pour cette raison, les métabolites identifiés lors des différentes études de métabolisme seront présentés avec une attention particulière.

3.1 - LES PBDE

3.1.1 - Biodisponibilité et distribution

Pendant longtemps, et sur la base d'études assez anciennes, il était considéré que le BDE-209 était relativement peu absorbé et métabolisé. Or, ce PBDE est absorbé à raison de 20% d'une dose de 2 mg/kg chez le rat (voie orale), avec un taux d'excrétion de 80 à 90% principalement par voie fécale. La fraction absorbée est principalement retrouvée dans le foie, les glandes surrénales et les ovaires, qui ont la particularité de présenter des concentrations résiduelles supérieures à celle du foie. La majorité des métabolites sont retrouvés dans les fèces (Morck et al., 2003; Huwe et al., 2008; Riu et al., 2008). Le passage transplacentaire du BDE-209 a également été mis en évidence (Riu et al., 2008). Il en est de même pour les octa- et nona-BDE qui peuvent passer la barrière placentaire, et sont retrouvés dans le lait (Cai et al., 2011). La distribution tissulaire du BDE-209 s'avère être spécifique dans certains organes, ce qui a été mis en évidence par l'analyse comparée de coupes d'organes de rats exposés au BDE-209 par histologie et imagerie par spectrométrie de masse. Le BDE-209 est ainsi situé dans le parenchyme hépatique de manière homogène, dans le cortex des glandes surrénales plus

spécifiquement dans la zone glomérulée, responsable de la production de l'aldostérone et de la corticostérone. Dans les ovaires, les résidus du BDE-209 sont concentrés dans certains corps jaunes (probablement en lien avec leur stade de développement). Cependant, la technique d'imagerie repose sur la cartographie des ions bromure ($[\text{Br}]^-$). Elle est donc peu spécifique et ne permet pas de savoir si le tropisme observé est lié au BDE-209 ou à ses métabolites (Seyer et al., 2010).

Les études réalisées *in vivo* montrent que la plupart des espèces étudiées sont capables de métaboliser les PBDE, mais qu'il existe des différences importantes d'une espèce à l'autre. Chez la souris l'excrétion des tétra- à hexa-BDE est surtout urinaire, et semble, comme chez le rat, dépendante du degré de bromation (Staskal et al., 2006). Chez le poulet, 60% du ^{14}C -BDE-47 administré par voie orale est retrouvé dans les tissus, dans lesquels la concentration de résidus semble être fonction du taux de lipides (Hakk et al., 2010). Par contre, une seconde étude sur les étourneaux suggère que le penta-mix ne serait pas été métabolisé par ces oiseaux (Van den Steen et al., 2009a). Chez les poissons, diverses études indiquent que les PBDE peuvent être retrouvés dans les œufs (Nyholm et al., 2008), et qu'ils se concentrent dans les organes riches en lipides, à savoir le foie et le muscle. Néanmoins, une diminution des taux de PBDE est observée en l'absence d'exposition, suggérant des demi-vies de 30 à 90 jours (Munschy et al., 2011). Des essais réalisés avec des microsomes hépatiques de béluga et d'ours polaires, ont indiqué que les BDE-99, -100 et -154 ne sont pas dégradés par ces microsomes. Les auteurs ont à l'inverse noté une diminution de la quantité de BDE-209 après les incubations, mais n'ont pas détecté de métabolites (McKinney et al., 2011).

3.1.2 - Identification des métabolites des PBDE

Les études qui ont travaillé à l'identification des métabolites des PBDE, ont indiqué que les PBDE subissent différents types de transformations lors de leur métabolisme, les processus de débromation et d'hydroxylation étant les plus couramment observées, comme le montre le schéma récapitulatif de la figure I-11.

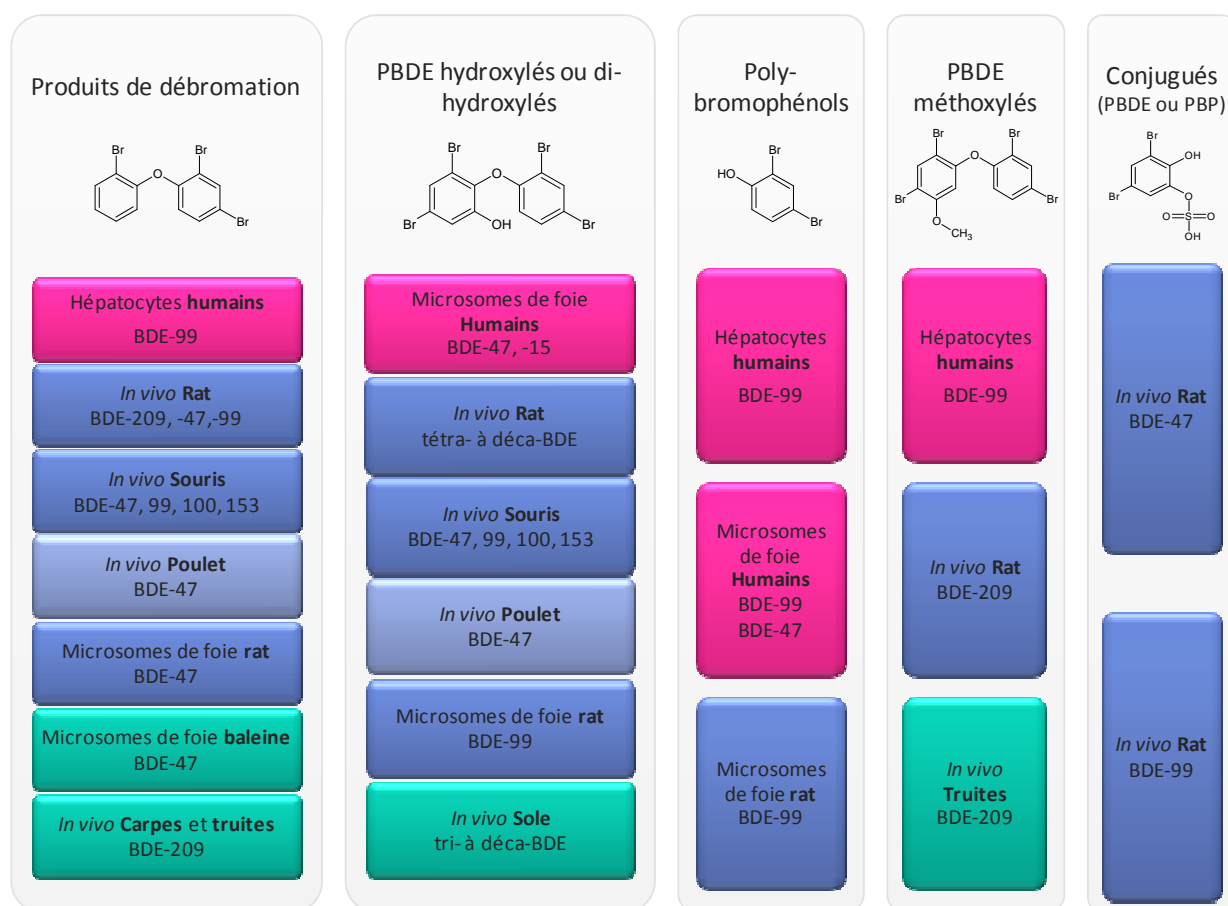


Figure I-11 : Principales classes de métabolites de PBDE identifiées au cours des études de métabolisme chez l'homme (rose), les vertébrés terrestres (bleu) et aquatiques (vert)

Quelques études sur le métabolisme des PBDE réalisées *in vitro* sur des systèmes cellulaires humains ont montré que les PBDE peu bromés sont métabolisés, alors que les hautement bromés ne semblent pas l'être. Une étude sur le métabolisme comparé du BDE-99 et du BDE-209 sur hépatocytes humains en culture primaire a montré que le premier peut être transformé en tribromophénol (TBP), en deux penta-BDE hydroxylés et en un composé tétra-bromé non identifié, alors que le second n'a pas été métabolisé, mais aurait toutefois induit l'expression de certaines enzymes de détoxification (Stapleton et al., 2009). Des études sur microsomes hépatiques rapportent des conclusions parfois contradictoires puisque l'une d'elles indique que le BDE-15 est hydroxylé en trois produits, alors que les BDE-28, -47 et -100 ne sont pas transformés (Cheng et al., 2008). Une autre équipe a mis en évidence la biotransformation du ^{14}C -BDE-47 par des microsomes hépatiques humains en tétra-BDE dihydroxylé et en 2,4-dibromophénol (DBP). Le ^{14}C -BDE-99 a été métabolisé en trois composés : un penta-BDE dihydroxylé, le 2,4,5-tribromophénol (TBP) et le 1,3-dibromobenzène, le composé hydroxylé étant le principal métabolite. Le ^{14}C -BDE-153 n'était quant à lui pas été métabolisé (Lupton et al., 2009, 2010).

Des études *in vivo* viennent compléter ces données. Chez le rat, 65% du ^{14}C -BDE-209 absorbé serait métabolisé par débromation en penta- à hepta-BDE qui sont ensuite hydroxylés et/ou méthoxylés (Morck et al., 2003). Chez des rates gestantes, au moins 7% (10% pour le fœtus et 30% pour les reins) du ^{14}C -BDE-209 des résidus tissulaires du ^{14}C -BDE-209 sont des métabolites issus d'une débromation et probablement d'une hydroxylation, l'identification formelle d'un octa-BDE hydroxylé n'ayant pas pu être confirmée (Riu et al., 2008, ainsi que résultats non publiés). Les PBDE dont le degré de bromation est moindre semblent plus efficacement métabolisés puisque seize métabolites hydroxylés et deux métabolites dihydroxylés ont été détectés chez des rats exposés à un mélange de sept tétra- à hepta-BDE (Malmberg et al., 2005). De plus, la même équipe a identifié les métabolites du BDE-47 dans les fèces de rats comme étant six tétra-BDE hydroxylés et trois tri-BDE hydroxylés (Marsh et al., 2006).

Chez la souris, les BDE-47, -99, -100 et -153 subissent une ou deux réactions d'hydroxylation, parfois accompagnées de débromation (Staskal et al., 2006). D'autres types de métabolites ont été observés. En effet, deux études connexes ont mis en évidence, chez le rat, que le ^{14}C -BDE-47 peut être transformé en conjugués glucuronide et sulfate de dibromophénol et en conjugué glutathion de tétra-BDE, et que le ^{14}C -BDE-99 peut être transformé en conjugués glucuronide et sulfate de tribromophénol, en conjugués glucuronides de penta- et de tétra-BDE ou glutathion de penta-BDE (Chen et al., 2006; Sanders et al., 2006). Il s'agit des deux seules études ayant montré à ce jour une biotransformation de PBDE au travers de voies métaboliques de phase II autre que la méthylation. Le métabolisme de phase I généralement observé pour les PBDE (oxydations) pourrait mener à la formation de produits intermédiaires réactifs, alors de que le métabolisme de phase II, a généralement pour effet de favoriser leur excrétion.

Les PBDE sont également métabolisés par les oiseaux, puisque 35 % du ^{14}C -BDE-47 absorbé par des poulets est retrouvé dans les excréta et 50% dans le foie. Le BDE-47 est transformé en cinq OH-tétra-BDE, deux OH-tri-BDE et un di-BDE (Hakk et al., 2010).

Le métabolisme des PBDE a été plus largement étudié chez les poissons. Malgré des variations inter-espèces assez importantes, il apparaît que les PBDE sont surtout l'objet de débromations. Ainsi, le BDE-209 est totalement transformé en penta- à octa-BDE suite à une exposition de 60 jours de jeunes carpes communes (Stapleton et al., 2004), alors qu'il est seulement partiellement transformé en hepta- à nona-BDE dans les mêmes conditions par les truites arc-en-ciel, une partie du BDE-209 étant bioaccumulée chez cette espèce de poisson (Stapleton et al., 2006). Des phénomènes de méthylation sont aussi observés puisque le BDE-209 est également transformé

en sept tétra- et penta-BDE méthoxylés, mais ces métabolites sont minoritaires comparé aux PBDE (Feng et al., 2010). L'identification formelle des métabolites chez le poisson est délicate car une étude a montré que les PBDE méthoxylés ou hydroxylés ne sont pas forcément des métabolites, dans des conditions qui seront exposées plus loin dans la partie 4.5. Ces auteurs ont néanmoins montré que les PBDE sont faiblement transformés en PBDE hydroxylés par cette espèce de poisson (Munschy et al., 2010).

Enfin, quelques études *in vitro* viennent confirmer ces données. Une étude a indiqué que les microsomes de rats parviennent à métaboliser les PBDE d'un mélange de di- à hepta-BDE alors que ceux de baleine métabolisent préférentiellement le BDE-47. Les métabolites observés sont des congénères plus faiblement bromés et des produits d'hydroxylation (McKinney et al., 2006). En accord avec les résultats *in vivo*, l'identification des métabolites du BDE-99 produits par les microsomes de rat a montré la formation de 3 OH-penta-BDE, et de 2,4,5-TBP (Erratico et al., 2010). Certaines de ces études ont permis d'identifier formellement les métabolites observés, mais cela n'est pas toujours possible en raison des faibles niveaux de concentration de ces métabolites, et du nombre limité de composés standards commercialement disponibles. Le tableau I-4 ci-dessous reprend la liste des métabolites identifiés, en fonction du composé parent étudié, du type d'étude (chez l'Homme ou l'animal, *in vivo* ou *in vitro*) et le nombre de fois où ils ont été identifiés.

Ce tableau montre une prédominance de certains composés, comme le 4'-OH-BDE-47 et le 6-OH-BDE-47. Ceci est d'une part dû au fait que la plupart des études sont appliquées aux mêmes composés mais aussi au fait que le métabolisme des PBDE semble orienté vers l'oxydation préférentielle sur certaines positions des cycles aromatiques. Ainsi, l'analyse des spectres de masse de métabolites observés *in vivo* chez le rat indique que ceux-ci sont principalement hydroxylés en position méta ou para de la fonction éther (Malmberg et al., 2005).

Tableau I-4 : Métabolites des PBDE identifiés lors d'études conduites chez l'Homme ou l'animal

PBDE hydroxylés						
	<i>in vitro</i> Homme		<i>in vivo</i> animal		<i>in vitro</i> animal	
	Nb	Parent(s)	Nb	Parent(s)	Nb	Parent(s)
4'-OH-BDE-49			4	BDE-47 / Mix 1 / DE-71 / Mix 2	1	BDE-47
6-OH-BDE-47			3	BDE-47 / Mix 1 / DE-71	1	BDE-47
3-OH-BDE-47			3	BDE-47 / Mix 1 / DE-71	1	BDE-47
4-OH-BDE-42			3	BDE-47 / Mix 1 / DE-71	1	BDE-47
4'-OH-BDE-17			2	BDE-47 / DE-71		
2'-OH-BDE-28			2	BDE-47 / DE-71		
5-OH-BDE-47			1	BDE-47	1	BDE-47
5'-OH-BDE-99	1	BDE-99			1	BDE-99
2'-OH-BDE-66			1	BDE-47	1	BDE-47
4'-OH-BDE-101			1	Mix 2		
3'-OH-BDE-28			1	BDE-47		
4-OH-BDE-90			1	DE-71	1	BDE-99
6'-OH-BDE-99					1	BDE-99
PBDE méthoxylés						
	<i>in vitro</i> Homme		<i>in vivo</i> animal		<i>in vitro</i> animal	
	Nb	Parent(s)	Nb	Parent(s)	Nb	Parent(s)
6-MeO-BDE-47			1	BDE-209		
2'-MeO-BDE-68			1	BDE-209		
5'-MeO-BDE-100			1	DE-71		
2'-MeO-BDE-28			1	DE-71		
5-MeO-BDE-47			1	BDE-209		
4'-MeO-BDE-103			1	BDE-209		
Produits de clivage						
	<i>in vitro</i> Homme		<i>in vivo</i> animal		<i>in vitro</i> animal	
	Nb	Parent(s)	Nb	Parent(s)	Nb	Parent(s)
2,4,5-TBPhénol	2	BDE-99			1	BDE-99
2,4-DBPhénol	1	BDE-47				
1,3-DBBenzène	1	BDE-99				

Mix1 = BDE-47, -99, -100, -153, -154, -183 et -209

DE-71 (mix commercial) = BDE-47, -85, -99, -100, -153, -154

Mix2 = BDE-28, -47, -99, -100, -153, -209

En résumé, la figure I-12 indique les principales voies de métabolisme des PBDE, où figurent en encadré les métabolites observés *in vitro* chez l'Homme. Il s'agit essentiellement de métabolisme de phase I, menant à la formation de PBDE hydroxylés, de bromophénols ou de produits débromés. Un métabolisme de phase II est parfois observé avec la méthylation de la fonction hydroxyle et l'identification de métabolites conjugués (rapportée par une seule équipe). Un autre phénomène a été observé par quelques auteurs, à savoir le réarrangement 1,2 au cours duquel un atome de brome migre sur un carbone adjacent. Il ne s'agirait pas d'une réaction enzymatique, mais d'un processus induit par l'hydroxylation, qui a déjà été observée pour d'autres composés de structure analogue tels que les PCB (Bergman et al., 1994).

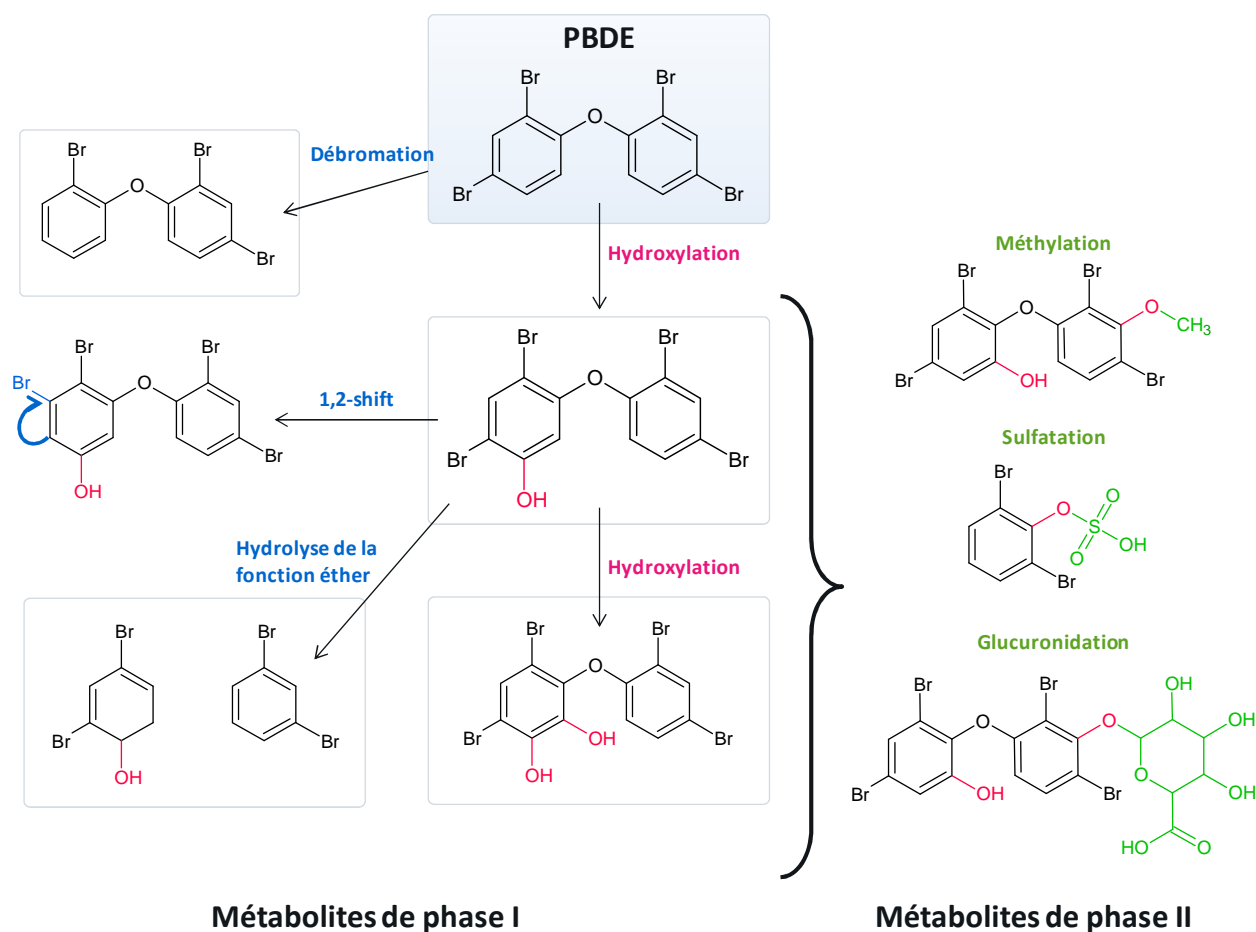


Figure I-12 : Voies métaboliques suivies par les PBDE ; synthèse d'après les études disponibles

Les voies métaboliques impliquées, d'après des études menées chez le rat, seraient principalement liées aux cytochromes P450, comme ceci a initialement été montré pour le pentamix chez le rat, qui induit d'ailleurs l'expression d'activité des cytochromes P450 et de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) (Von meyerinck et al., 1990). Bien qu'il semble peu métabolisé, le BDE-209 peut induire l'activation de cytochromes P450 CYP1A2, 2B ou 3A comme ceci a été constaté à plusieurs reprises (Van der Ven et al., 2008c; Stapleton et al., 2009; Lee et al., 2010), mais aussi l'activation d'autres enzymes telles que EROD, la pentoxyrésorufine-O-dééthylase (PROD) (Van der Ven et al., 2008c) ou une diiodinase et une glutathione-S-transférase (Stapleton et al., 2009). Les mêmes voies sont impliquées dans le métabolisme des autres PBDE (Van der Ven et al., 2008b), avec une activation qui semble dose dépendante pour les enzymes EROD et PROD (Zhou et al., 2001; Stoker et al., 2004; Van der Ven et al., 2008b).

3.2 - LE TBBPA

L'une des premières études consacrée au TBBPA relatait de faibles taux d'absorption chez le rat : plus de 95% du TBBPA administré en une dose unique par voie orale était retrouvé sous forme native dans les fèces. Des études plus récentes montrent que l'absorption serait en fait bien supérieure, mais que le principal produit excrété est le TBBPA parent. En effet, lorsque des rats reçoivent une dose unique de TBBPA, une proportion importante de ce composé est retrouvée inchangée dans les fèces quelle que soit la voie d'administration (Hakk and Letcher, 2003) et malgré que des auteurs aient noté une métabolisation de 51 à 65% du TBBPA administré (voie intra-péritonéale, rat) (Szymanska et al., 2001). Selon une étude sur des rats dont la vésicule biliaire a été canulée ou non, 90% du composé parent est retrouvé dans les fèces des rats non canulés, et 70 % est éliminé via la bile chez les rats canulés. Par ailleurs, ces auteurs ont démontré qu'une grande partie du TBBPA administré passe par le foie où il peut y être métabolisé. Le TBBPA est en fait excrété en grande partie sous forme conjuguée (glucuronide ou sulfate), mais est ultérieurement déconjugué (Hakk et al., 2000). Des travaux effectués à l'INRA ont confirmé ces résultats : le TBBPA est métabolisé dans le foie par les enzymes de phase II avant d'être excrété dans la bile. Par ailleurs, ces travaux ont indiqué que l'exposition fœtale est faible, car le TBBPA et ses métabolites passent peu la barrière placentaire (Riu, 2006). Le fait que le TBBPA soit retrouvé en grande partie inchangé dans les fèces indique qu'il y a déconjugaison lors du passage dans l'intestin, possiblement par la flore intestinale. Il s'agit d'un processus classique pour les xénobiotiques conjugués.

Afin de mettre en regard le métabolisme du TBBPA chez le rat et l'homme, celui-ci a été incubé avec des fractions microsomales et des fractions S9 de foie de rat et d'homme en distinguant mâles et femelles. Il en ressort que les métabolites formés sont des produits issus du clivage oxydatif de la molécule et des produits de conjugaison du TBBPA, issus de l'action des enzymes de phase I et de phase II. Certains de ces métabolites sont présentés sur la figure I-13. Cette étude a mis en évidence le fait que la métabolisation est plus rapide chez le rat que chez l'homme (Zalko et al., 2006). En complément, une étude a montré que 40% du TBBPA est métabolisé en conjugués sulfate ou glucuronide par les hépatocytes de rat en culture primaire (Nakagawa et al., 2007).

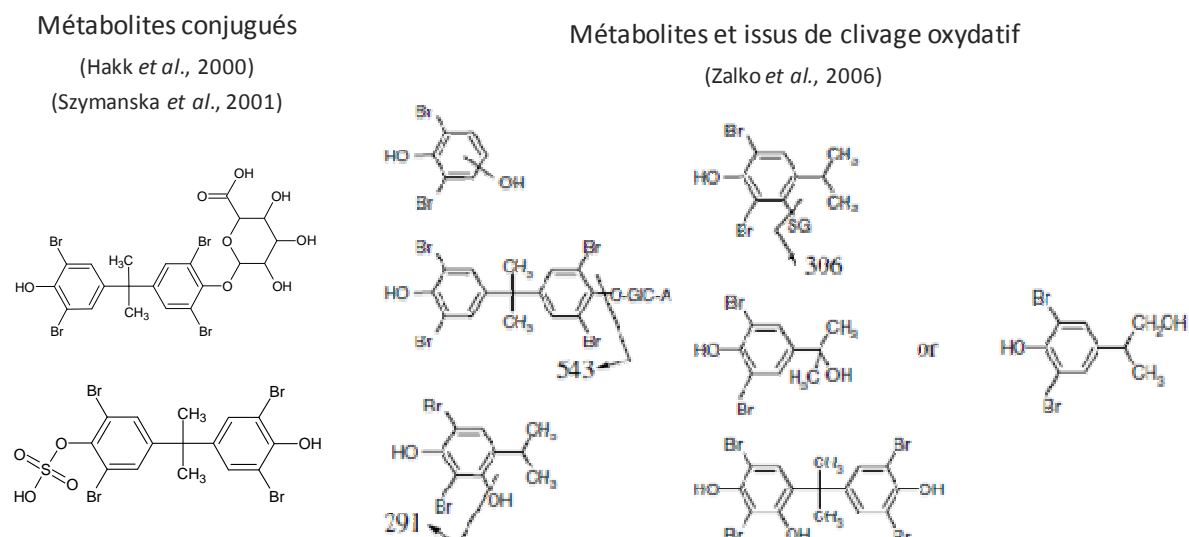


Figure I-13 : Métabolites du TBBPA observés *in vivo* ou *in vitro* chez le rat et l'Homme

Une étude mécanistique a indiqué que les enzymes du métabolisme de phase I ne sont pas activées suite à une exposition au TBBPA, puisqu'aucune induction des CYP1A2/1A2, 2B1/2B2 ou 3A1 ni d'EROD ou PROD n'a été observée chez le rat (Germer *et al.*, 2006) et qu'aucune modulation de l'activité EROD n'a été observée chez le flet européen (*Platichthys flesus*) (Kuiper *et al.*, 2007).

3.3 - L'HBCD

Les 2 premières études sur le métabolisme de l'HBCD, conduite dans les années 80 et en lien avec les industriels producteurs et utilisateurs de ces molécules, rapportent un métabolisme caractérisé par une excrétion de 70% en 72 heures *via* les fèces et 16% *via* l'urine, et une demi-vie résultante de 2 heures environ chez le rat. L'une de ces études, réalisée avec des composés radiomarqués rapporte également la présence de 4 métabolites non identifiés. Par la suite, deux autres études ont amené des conclusions différentes, démentant l'excrétion urinaire et indiquant une excrétion fécale deux fois inférieure (Hakk and Letcher, 2003). Ceci a été confirmé lors d'une étude sur les effets de l'HBCD sur les cellules cérébrales chez le rat qui a montré que l'HBCD reste présent plusieurs jours dans l'organisme suite à l'exposition (Reistad *et al.*, 2006). L'absorption de l'HBCD a par ailleurs été étudiée chez la truite arc-en-ciel. Les résultats indiquent une modification rapide et significative de la distribution des diastéréoisomères qui se stabilise ensuite, à savoir une augmentation des α - et β -HBCD passant de 1,1 à 1,7% et de 4,2 à 11,9% respectivement. Les résultats concernant la distribution tissulaire des HBCD indiquent

une accumulation principalement hépatique 48 heures après l'ingestion, le cerveau et le muscle présentant des concentrations moindres (Haukås et al., 2009).

Comme l'avait indiqué l'une des premières études sur l'HBCD, celui-ci est métabolisé. Ceci a été confirmé par une étude lors de laquelle un mélange équimolaire des 3 isomères principaux a été incubé sur des microsomes de foie de rats induits et de phoques, qui sont tout deux capables de métaboliser le β - et le γ -HBCD mais apparemment pas l' α -HBCD. Les spectres de masse des produits de métabolisation suggèrent qu'il y a hydroxylation des composés parents. Cependant, aucune identification claire n'a pu être apportée à cause de la faible abondance de ces métabolites (Zegers et al., 2005). Une autre étude chez le rat a montré que l'HBCD est effectivement hydroxylé puisque les auteurs ont identifié comme métabolites cinq monohydroxy-HBCD et un dihydroxy-HBCD. Cependant, d'autres mécanismes semblent gouverner le métabolisme de ce composé car quatre composés monohydroxylés issus de tétra- et de penta-bromocyclododécène ont également été identifiés. Ces composés, contenant donc une double liaison sur le cycle carboné pourraient également être des produits de dégradation abiotique ou des impuretés de l'HBCD commercialisé (Brandsma et al., 2009). En ce qui concerne les voies enzymatiques impliquées, une étude a montré que l'exposition à l'HBCD mène, chez le rat, à l'induction de cytochromes P450 2B et 3A ainsi que de PROD chez le mâle, impliqués dans le métabolisme de phase I (Germer et al., 2006). L'HBCD a d'ailleurs un effet plus important que le penta-mix sur les CYP3A (Fery et al., 2009).

3.4 - CONCLUSIONS

Malgré un manque de données concernant l'HBCD et le TBBPA en général, et le métabolisme humain des PBDE en particulier, les études de métabolisme disponibles révèlent quelques informations importantes. Les PBDE, indépendamment de leur degré de bromation, sont absorbés et transmis vers différents organes notamment le foie, le tissu adipeux, les glandes surrénales et les ovaires, avec pour le BDE-209 une localisation tissulaire spécifique. Plusieurs métabolites, essentiellement issus de réactions de phase I, ont été identifiés chez différentes espèces, avec la prédominance des métabolites qui sont suspectés être responsables des effets de perturbation endocrinienne des PBDE. Le TBBPA semble être absorbé et métabolisé dans le foie avant d'être excrété en partie sous forme conjuguée, contrairement à ce qui a été avancé par les premières études à son sujet. Les erreurs d'interprétation des premiers résultats pourraient être dues au fait que le TBBPA est ensuite déconjugué dans l'intestin ou le colon. Le métabolisme du TBBPA ne serait pas seulement lié à des réactions de phase II, mais pourrait également

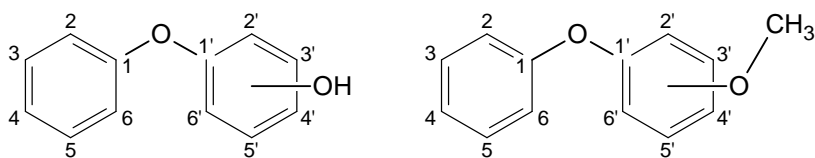
impliquer des processus oxydatifs conduisant à la formation de divers produits de clivage. L'HBCD serait, selon les quelques études disponibles à son sujet, absorbé et partiellement métabolisé avant d'être excrété. L'identification des métabolites de l'HBCD n'est pas suffisamment avancée à l'heure actuelle, mais il semble faire l'objet d'oxydations et de réarrangements.

4 - ETUDES DES METABOLITES DES RFB

L'intérêt de la communauté scientifique pour les PBDE hydroxylés a été déclenché 2000 par la publication d'un article montrant que l'effet des PBDE sur les hormones thyroïdiennes serait en fait dû à leur métabolites (Meerts et al., 2000). Depuis, les études au sujet des métabolites des PBDE se sont multipliées, en particulier ces 5 dernières années. Ces études s'intéressent à leur présence environnementale, à la caractérisation de leurs effets toxiques et à l'imprégnation humaine. Certaines se sont plus précisément penchées sur la problématique de l'origine naturelle ou métabolique des PBDE hydroxylés ou méthoxylés observés chez les organismes marins. Les PBDE hydroxylés et méthoxylés pourraient en effet avoir une origine naturelle, comme l'a montré une étude lors de laquelle la datation au carbone 14 de deux PBDE méthoxylés trouvés dans de la graisse de baleine a prouvé qu'ils avaient été synthétisés à partir d'une source de carbone contemporaine. Ceci implique qu'ils ne peuvent pas provenir des PBDE, qui sont des produits de la pétrochimie (Teuten et al., 2005). Dans ce contexte général, cette partie de notre étude bibliographique décrit les informations disponibles quant à la toxicité, à l'imprégnation et à la présence environnementale des métabolites de PBDE, les données étant quasi-inexistantes pour les métabolites du TBBPA et de l'HBCD, avant de discuter de l'origine naturelle potentielle de ces composés.

4.1 - NOMENCLATURE DES METABOLITES DE PBDE

Les PBDE hydroxylés et méthoxylés sont nommés de la même manière que les PBDE, comme indiqué sur la figure I-14. Les atomes de brome sont numérotés avant le ou les groupements fonctionnels, contrairement à la numérotation conventionnelle qui priorise la numérotation du groupement fonctionnel. Ceci permet de référer immédiatement le métabolite au composé parent correspondant.



Structure générale des PBDE hydroxylés et méthoxylés

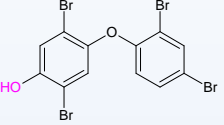
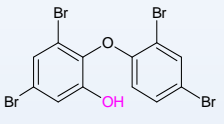
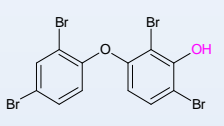
Nom abrégé	Structure	Nom complet
4'-OH-BDE-49		2,5-dibromo-4-(2,4-dibromophenoxy)phenol
6-OH-BDE-47		3,5-dibromo-2-(2,4-dibromophenoxy)phenol
3-OH-BDE-47		2,6-dibromo-3-(2,4-dibromophenoxy)phenol

Figure I-14 : Structure chimique des PBDE hydroxylés et méthoxylés

4.2 - TOXICITE

Suite à l'étude de Meerts *et al.* en 2000, d'autres études *in vitro* sont venues confirmer (Marchesini et al., 2008) ou compléter ces résultats, montrant par exemple que les OH-PBDE et les polybromophénols (PBP) sont des ligands forts de la TBG, une protéine de transport des hormones thyroïdiennes (Marchesini et al., 2008). Par ailleurs, quelques OH-PBDE et PBP peuvent se fixer sur les récepteurs des hormones thyroïdiennes, même si la plupart de ces composés n'ont pas d'effet (Kitamura et al., 2008).

La possibilité que les OH-PBDE soient des perturbateurs de l'homéostasie des hormones stéroïdiennes a également été étudiée. Une étude a ainsi montré que certains OH-PBDE peuvent inhiber *in vitro* le fonctionnement du CYP 19 et donc modifier la synthèse des hormones stéroïdiennes dans les cellules surrénales H295R et les microsomes placentaires humains (Canton et al., 2005; Canton et al., 2008). De plus, les OH-PBDE sont des ligands de faible affinité pour les récepteurs aux œstrogènes ER- α , avec un effet plus marqué pour les composés substitués en position para plutôt que ortho, (Mercado-Feliciano and Bigsby, 2008). Une différence d'affinité pour les récepteurs ER- α et ER- β a aussi été notée par d'autres auteurs (Meerts et al., 2001). A l'inverse de ces effets délétères, des auteurs ont montré que les OH-PBDE peuvent avoir *in vitro* un effet anti-prolifératif sur une lignée cellulaire tumorale

mammaire (Zhang et al., 2008). Il est difficile de dire quels sont, d'une manière générale, les métabolites les plus actifs car les études disponibles incluent en général seulement des composés tétra- et penta-bromés. Cependant, les OH-PBDE identifiés comme métabolites sont généralement inclus dans ces études toxicologiques, et ce sont donc ces composés qui ont une activité biologique.

Une des raisons expliquant ces activités est l'analogie structurale entre les OH-PBDE et les hormones, comme ceci est illustré sur la figure I-15, où est aussi représenté le TBBPA, également perturbateur de l'homéostasie thyroïdienne.

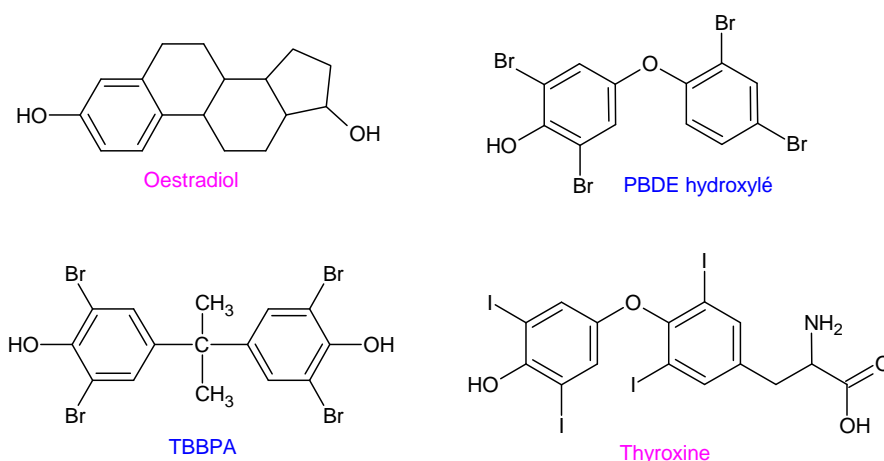


Figure I-15 : Analogies structurales entre les PBDE hydroxylés, le TBBPA, la thyroxine et l'œstradiol

En ce qui concerne la potentiel toxique des PBDE pour les neurones, une étude a montré que les PBDE hydroxylés, contrairement aux PBDE et aux PBDE méthoxylés, induisent la libération de calcium intracellulaire contenu dans le réticulum endoplasmique ou les mitochondries, ce qui a biologiquement pour effet d'augmenter la libération de neurotransmetteurs (Dingemans et al., 2010).

Ces études indiquent également que les MeO-PBDE et les PBDE n'ont pas les mêmes effets que ceux décrits pour les OH-PBDE et les PBP, et auraient tendance à ne pas se fixer sur ces différents récepteurs. En effet, ils n'ont pas ou peu d'effet sur la liaison de la T4 avec la TTR (Marchesini et al., 2008), ne se fixent pas ou peu sur la TBG (Marchesini et al., 2008), sur le récepteur TR (Kitamura et al., 2008) ou sur le CYP 19 dans les cellules surrénales (Canton et al., 2008). Toutefois, une autre étude a montré que les PBDE peu bromés ainsi que le 6-MeO-BDE-47 peuvent être inducteurs du CYP 19 et les nona- et déca-BDE en seraient des inhibiteurs, selon des essais menés sur des microsomes placentaires humains (Canton et al., 2005).

Si la plupart des études ont été menées sur les métabolites des PBDE, une étude récente a apporté quelques informations sur la capacité des métabolites conjugués du TBBPA à se fixer sur certains récepteurs cellulaires, comme les récepteurs ER ou PPAR. Ces essais ont montré que le conjugué sulfate, mais pas le conjugué glucuronide a une affinité pour le récepteur PPAR- γ , et est capable d'activer spécifiquement PPAR- γ (Riu et al., 2011).

4.3 - IMPREGNATION HUMAINE

Quelques études se sont intéressées à la présence des métabolites des PBDE chez l'Homme. Tout d'abord, le 6-OH-BDE-47 a été retrouvé dans un pool de dix échantillons de sérum humain provenant de Suède, (Hovander et al., 2002). En 2008, les OH-PBDE ont été recherchés dans des échantillons de sérum regroupés d'enfants du Nicaragua dont certains travaillant et/ou vivant sur une décharge. Lors de cette étude, les auteurs ont détecté la présence de dix-neuf OH-PBDE dans le sérum de ces enfants particulièrement exposés aux PBDE, mais aussi dans le sérum d'autres enfants. Six OH-PBDE ont été identifiés, les congénères majoritaires étant le 6-OH-BDE-47, le 4'-OH-BDE-17 et le 4'-OH-BDE-49. Parmi les dix-neuf OH-PBDE retrouvés dans ce travail, dix portaient un groupement hydroxyle en position méta, six en position para et un seul en position ortho. Les OH-PBDE quantifiés représentaient moins de 10% des PBDE totaux, avec une concentration totale de quelques pmol/g lipides (Athanasiadou et al., 2008). Une autre étude, réalisée sur seize couples mère-enfant au Japon, a retrouvé du 6-OH-BDE-47 dans 66% des échantillons de sang maternel, de sang de cordon et de cordon ombilical analysés, ainsi que deux autres tétra-BDE hydroxylés (Kawashiro et al., 2008).

Par la suite, ces métabolites ont été retrouvés dans des échantillons de lait maternel prélevés chez onze femmes en Espagne. Onze OH- ou MeO-PBDE ont été détectés dans au moins un échantillon, les plus communs étant le 4'-OH-BDE-17, le 2'-OH-BDE-74 et le 6'-OH-BDE-66. Dans cette étude les OH et MeO-PBDE représentaient respectivement 2,9 et 1,6% des PBDE avec des concentrations variant de quelques dizaines de pg/g lipides à quelques dizaines de ng/g lipides (Lacorte and Ikononou, 2009). Trois PBP (le 2,4-DBP, le 2,4,5-TBP et le 2,4,6-TBP) et sept OH-PBDE (dont les plus abondants sont le 5-OH-BDE-47, le 5'-OH-BDE-99 et le 6-OH-BDE-47) ont également été détectés dans la plupart des échantillons de sérum de vingt-deux femmes enceintes aux Etats-Unis. Les métabolites représentent ici quasiment 85% des PBDE avec des concentrations de l'ordre du ng/g lipide (Qiu et al., 2009). Une autre étude a recherché 10 OH-PBDE, di- à hexa-bromés, dans le sérum de 26 femmes coréennes et dans le sang de cordons ombilicaux. Seul le 6-OH-BDE-47 a été retrouvé, à des concentrations comprises entre

< 4 pg/g et 117 pg/g poids frais dans le sérum maternel et entre <4 pg/g et 127 pg/g dans le sérum de cordons ombilicaux. Les concentrations dans le sérum de cordons ombilicaux étaient globalement significativement supérieures à celles mesurées dans le sérum maternel (Wan et al., 2010a).

Une seule étude a recherché les OH-PBDE hautement bromés. Cette étude menée en Chine a mis en évidence la présence de deux octa-BDE hydroxylés et d'un nona-BDE hydroxylé dans le sérum de 6 ouvriers d'une usine de démantèlement de déchets électroniques. Les composés identifiés sont le 6-OH-BDE-196, le 6-OH-BDE-199 et le 6'-OH-BDE-206 (Yu et al., 2010).

Le tableau I-5 résume la nature des métabolites et les valeurs retrouvées dans les différentes matrices. Ceci permet de voir que la fréquence de détection est très différente d'un échantillon à l'autre et d'un composé à l'autre. Les valeurs moyennes retrouvées sont aussi très différentes, que ce soit entre les échantillons d'une même étude ou d'une étude à l'autre. Lacorte *et al* ont rapporté des concentrations particulièrement élevées dans un seul échantillon, supérieures au ng/g de lipides. Si l'on ne tient pas compte de cet échantillon, il ne reste plus qu'une seule valeur supérieure à 1 ng/g de lipides (les secondes valeurs maximales sans cet échantillon sont entre parenthèse dans le tableau) (Lacorte and Ikononou, 2009). En plus de ces valeurs, il faut également rapporter que le 6-OH-BDE-47 a été recherché dans 90 échantillons de sérum maternel et 9 échantillons de sérum de sang de cordon ombilicaux et n'a été détecté dans aucun de ces échantillons avec une méthode dont la limite de détection a été estimée à 1 pg/g de sérum (Meijer et al., 2008). Aux vues de ces données, il semble que l'imprégnation en OH-PBD Et en MeO-PBDE soit très supérieure sur le continent américain par rapport à l'Asie et l'Europe. Il convient de rappeler que les niveaux de contamination moyens en RFB sont nettement supérieurs sur le continent nord-américain, en rapport avec une utilisation plus importante de ces molécules. Ceci explique peut-être que les niveaux résiduels de certains métabolites soient également supérieurs (Frederiksen et al., 2009b).

Tableau I-5 : Niveaux de concentration en OH-PBDE et MeO-PBDE dans le lait maternel, le sérum maternel et de cordon ombilicaux

Composé	Matrice	Pays	Année	Concentration moyenne (pg/g lipides)	Fréquence de détection	Référence
6-OH-BDE-47	Sérum	Suède	2002	-	-	(Hovander et al., 2002)
	Sérum	Nicaragua	2002	1960	100 %	(Athanasiadou et al., 2008)
	Sérum maternel	Japon	2005-2006	1564 / (8,5 pg/g wet weight)	67 %	(Kawashiro et al., 2008)
	Sang de cordon ombilical	Japon	2005-2006	525 / (1,4 pg/g wet weight)	67 %	(Kawashiro et al., 2008)
	Cordon ombilical	Japon	2005-2006	10030 / (8,4 pg/g wet weight)	100 %	(Kawashiro et al., 2008)
	Lait maternel	Espagne	2000-2003	6,7 [<20,5 à 243]	3 %	(Lacorte and Ikonomidou, 2009)
	Sérum de cordon	Etats-Unis	2003-2004	9900	-	(Qiu et al., 2009)
	Sérum maternel	Etats-Unis	2003-2004	300	-	(Qiu et al., 2009)
	Sérum de cordon	Corée	2008-2009	30,2 (wet weight)	80 %	(Wan et al., 2010a)
	Sérum maternel	Corée	2008-2009	17,5 (wet weight)	42 %	(Wan et al., 2010a)
4'-OH-BDE-17	Sérum	Nicaragua	2002	1650	85 %	(Athanasiadou et al., 2008)
	Lait maternel	Espagne	2000-2003	29,9 [<3,8 à 409]	27 %	(Lacorte and Ikonomidou, 2009)
3-OH-BDE-47	Sérum	Nicaragua	2002	520	50 %	(Athanasiadou et al., 2008)
	Sérum de cordon	Etats-Unis	2003-2004	1600	-	(Qiu et al., 2009)
	Sérum maternel	Etats-Unis	2003-2004	100	-	(Qiu et al., 2009)
5-OH-BDE-47	Sérum de cordon	Etats-Unis	2003-2004	28000	-	(Qiu et al., 2009)
	Sérum maternel	Etats-Unis	2003-2004	1600	-	(Qiu et al., 2009)
4'-OH-BDE-49	Sérum	Nicaragua	2002	1130	100 %	(Athanasiadou et al., 2008)
	Sérum de cordon	Etats-Unis	2003-2004	900	-	(Qiu et al., 2009)
	Sérum maternel	Etats-Unis	2003-2004	300	-	(Qiu et al., 2009)
4-OH-BDE-42	Sérum	Nicaragua	2002	580	64 %	(Athanasiadou et al., 2008)
	Sérum de cordon	Etats-Unis	2003-2004	900	-	(Qiu et al., 2009)
4-OH-BDE-90	Sérum	Nicaragua	2002	3260	85 %	(Athanasiadou et al., 2008)
5'-OH-BDE-99	Sérum de cordon	Etats-Unis	2003-2004	22000	-	(Qiu et al., 2009)
	Sérum maternel	Etats-Unis	2003-2004	2000	-	(Qiu et al., 2009)
6'-OH-BDE-99	Sérum de cordon	Etats-Unis	2003-2004	1900	-	(Qiu et al., 2009)
	Sérum maternel	Etats-Unis	2003-2004	300	-	(Qiu et al., 2009)
2'MeO-BDE 28	Lait maternel	Espagne	2000-2003	4,5 [<4,7 à 62,5]	11 %	(Lacorte and Ikonomidou, 2009)
4'MeO-BDE 17	Lait maternel	Espagne	2000-2003	54,5 [<5,3 à 1744 (93,6)]	13 %	(Lacorte and Ikonomidou, 2009)
2'MeO-6BDE 75	Lait maternel	Espagne	2000-2003	78,8 [<3,6 à 1108]	32 %	(Lacorte and Ikonomidou, 2009)
6 MeO-BDE 47	Lait maternel	Espagne	2000-2003	448,4 [<4,7 à 14985 (401)]	49 %	(Lacorte and Ikonomidou, 2009)
2'MeO-BDE 74	Lait maternel	Espagne	2000-2003	185,6 [<14,3 à 5843 (374)]	16 %	(Lacorte and Ikonomidou, 2009)
6'MeO-BDE 66	Lait maternel	Espagne	2000-2003	140,3 [<4,6 à 1999 (1120)]	22 %	(Lacorte and Ikonomidou, 2009)
2'OH-BDE 75	Lait maternel	Espagne	2000-2003	47,9 [<12,9 à 376]	16 %	(Lacorte and Ikonomidou, 2009)
2'OH-BDE 74	Lait maternel	Espagne	2000-2003	51,4 [<18,2 à 567]	16 %	(Lacorte and Ikonomidou, 2009)
6'OH-BDE 66	Lait maternel	Espagne	2000-2003	47,7 [<17,3 à 889]	8 %	(Lacorte and Ikonomidou, 2009)

Hormis ces études sur les métabolites des PBDE, une étude a été menée sur les produits de dégradation de l'HBCD, qui ont été recherchés dans les poussières d'habitation, puis dans 34 échantillons de lait maternel prélevés en Angleterre. Ainsi, deux isomères de type tétrabromocyclododecadiène (TBCD) ont été retrouvés dans vingt-cinq échantillons et trois des quatre isomères de pentabromocyclododécène (PBCD) ont été retrouvés dans 9 échantillons. Les auteurs ont noté un profil différent de celui observé dans les poussières préalablement analysées (Abdallah and Harrad, 2011).

4.4 - PRESENCE DANS L'ENVIRONNEMENT

La quasi-totalité des études s'intéressant à la présence des métabolites de PBDE dans l'environnement ont été menées sur les échantillons d'origine marine. Tout comme pour les PBDE, il est difficile d'avoir une vue d'ensemble et de comparer les études entre elles car dans la plupart des cas seuls les composés tétra-bromés, et éventuellement penta-bromés, ont été recherchés.

L'une des études les plus anciennes à ce sujet a détecté neuf OH-PBDE et six MeO-PBDE dans le sang de saumons de la mer Baltique, la plupart des métabolites étant substitués en position ortho et certains d'entre eux étant également chlorés (Marsh et al., 2004). Il semble que les MeO-PBDE soient majoritaires par rapport aux OH-PBDE dans les poissons d'eau salée. Les OH-PBDE ont en effet été retrouvés dans du foie de requin à une concentration de 8 ng/g de lipides et les MeO-PBDE de 540 ng/g de lipides (Kato et al., 2009). Dans des échantillons de thon, seuls des MeO-PBDE ont été identifiés à des quelques dizaines de ng/g de lipides (Pena-Abaurrea et al., 2009). A l'inverse, une dernière étude sur des poissons d'eau douce indique que seuls dix OH-PBDE ont été retrouvés à des concentrations de l'ordre du pg/g alors que les MeO-PBDE n'ont pas été détectés (Valters et al., 2005).

Les études sont plus nombreuses et plus instructives pour les mammifères et les oiseaux vivant dans un environnement marin. Tout d'abord, deux OH-PBDE et deux MeO-BDE ont été identifiés dans le tissu adipeux d'ours de l'est du Groenland à des concentrations respectives de 0,9 et 4,3 ng/g, et dans le tissu adipeux de phoque, un OH-tétra-BDE et trois MeO-tétra-BDE ont été retrouvés à des concentrations similaires (Gebbink et al., 2008; Letcher et al., 2009). D'autres études appuient l'existence de ces composés chez les animaux. Par exemple, sur 30 composés recherchés (analogues méthoxylés ou hydroxylés), environ la moitié a été détectée dont trois MeO-PBDE et deux OH-PBDE ont été mesurés à des concentrations de l'ordre du ng/g chez des ours et des mouettes d'Arctique (Verreault et al., 2005).

Chez d'autres animaux marins (mollusques, poissons, oiseaux et mammifères marins) prélevés au Canada, les MeO-PBDE et les OH-PBDE ont été détectés à des concentrations respectives allant jusqu'à 100 ng/g de lipides et inférieure au ng/g de lipides, alors qu'aucun des composés recherchés n'a été retrouvé dans les algues étudiées (Kelly et al., 2008). D'autres auteurs ont cependant retrouvé ces composés dans des algues et des moules de la mer Baltique, à des concentrations moyennes respectives de 10 et 0,4 ng/g (Malmvarn et al., 2008).

Afin de déterminer s'il existe des différences géographiques ou inter-espèces, des échantillons ont été prélevés sur des prédateurs d'écosystèmes marins isolés provenant de 4 océans. Aucune différence géographique n'a été observée, mais des différences inter-espèces existent, puisque les albatros présentaient des concentrations en OH- et MeO-PBDE supérieures à celles observées chez les ours polaires et les thons. Les thons présentaient eux un taux en PBP élevé (Wan et al., 2009). Il semble toutefois y avoir des différences géographiques en relation avec l'urbanisation et donc par extension la pollution en PBDE, puisque les phoques d'une région norvégienne reculée ne présentaient qu'un taux faible en 6-OH-BDE-47, tandis que quatre congénères supplémentaires étaient retrouvés dans ceux de la mer Baltique, à quelques dizaines ou centaines de pg/g, soit moins de 5% de la quantité de PBDE (Routti et al., 2009).

Ces observations sont en cohérence avec le fait que les OH-PBDE sont retrouvés dans l'environnement, et notamment les eaux de surface et la neige, selon une étude canadienne, qui les a détecté à des concentrations comprises entre 17 et 250 pg/L dans l'eau (Ueno et al., 2008).

Un récapitulatif des différents PBDE hydroxylés et méthoxylés identifiés dans les études de métabolisme, chez l'homme et dans divers organismes marins est donnée dans le tableau I-5. En général, les composés les plus souvent identifiés dans les animaux marins sont le 6-OH-BDE-47, le 6-MeO-BDE-47 et le 4'-OH-BDE-49 ainsi que de manière intéressante le 2'-OH-BDE-68 et son analogue méthoxylé qui n'ont jamais été identifié chez l'homme ou dans les études de métabolisme. Ce tableau montre aussi que les PBDE méthoxylés sont plus souvent identifiés dans les organismes marins que chez l'homme ou lors des études de métabolisme. Ceci tend à supposer qu'il existe plusieurs origines pour les PBDE hydroxylés et méthoxylés, comme ceci sera discuté au paragraphe suivant.

Tableau I-5 : Nombre d'études dans lesquelles les PBDE hydroxylés et méthoxylés ont été identifiés en fonction de l'organisme ou du système étudié

Composé	Homme	Métabolisme humain	Métabolisme animal	organismes marins inférieurs	animal marin	environnement autre
PBDE hydroxylés						
6-OH-BDE-47	5		4	1	9	1
4'-OH-BDE-17	3		2		2	
4'-OH-BDE-49	2		5		6	1
3-OH-BDE-47	2		4		6	1
4-OH-BDE-42	2		4		3	1
5'-OH-BDE-99	1	1	1			
5-OH-BDE-47	1		2		3	1
2'-OH-BDE-28	1		2		1	
4-OH-BDE-90	1		1			
6'-OH-BDE-99	1		1			
6-OH-BDE-196	1					
6-OH-BDE-199	1					
6'-OH-BDE-206	1					
6'-OH-BDE-66	1					
2'-OH-BDE-74	1					
2'-OH-BDE-75	1					
2'-OH-BDE-66			2			
4'-OH-BDE-101			1		1	
4'-OH-BDE-103			1			
3'-OH-BDE-28			1			
2'-OH-BDE-68				1	8	1
6-OH-BDE-90				1	3	
6-OH-BDE-99				1	2	
2-OH-BDE-123				1	1	
6-OH-BDE-137				1	1	1
6-OH-BDE-85				1	1	
6'-OH-BDE-49					2	1
PBDE méthoxylés						
2'-MeO-BDE-28	1				4	
4'-MeO-BDE-17	1				2	
2'-MeO-BDE-74	1					
6-MeO-BDE-74	1					
2'-MeO-BDE-75	1					
2'-MeO-BDE-68			3	1	7	
5'-MeO-BDE-100			3		1	
6-MeO-BDE-47			2	1	9	
5-MeO-BDE-47			1		2	
4'-MeO-BDE-49			1		1	
4'-MeO-BDE-101			1			
4'-MeO-BDE-103			1			
6-MeO-BDE-85				1	1	
6-MeO-BDE-137				1		
4-MeO-BDE-42					3	
6'-MeO-BDE-49					3	
6-MeO-BDE-17					2	
6'-MeO-BDE-66					2	
6-MeO-BDE-99					2	
6-MeO-BDE-99					2	
3-MeO-BDE-47					1	
Produits de clivage						
2,4,5-TBP	1	2	2			
2,4-DBP	1	1	1			
2,4,6-TBP	1		1			
1,3-DBBenzène		1				

Les métabolites de l'HBCD sont aussi retrouvés dans l'environnement. En effet, suite à une étude de métabolisme, certains auteurs ont recherché les métabolites qu'ils avaient identifiés dans 3 échantillons issus d'animaux sauvages, et ont retrouvé un monohydroxy-HBCD dans les œufs de Sterne et la graisse de phoque. La présence d'un monohydroxy-pentabromocyclododécène a également été observée en GC, mais non confirmée en LC dans ce dernier échantillon (Brandsma et al., 2009).

4.5 - POLEMIQUE SUR L'ORIGINE DES PBDE HYDROXYLES ET METHOXYLES

Les premières observations de PBDE méthoxylés ou hydroxylés en tant que métabolites potentiels des PBDE dans des échantillons biologiques d'origine marine remontent à moins de dix ans (Marsh et al., 2004; Pettersson et al., 2004), tout comme la première observation de 6-OH-BDE-47 dans du sérum humain (Hovander et al., 2002). L'origine naturelle possible de ces produits a été démontrée, pour deux tétra-BDE méthoxylés prélevés dans du gras de baleine (Teuten et al., 2005) et confortée par le fait que des MeO-PBDE ont été retrouvés dans de l'huile de baleine collectée en 1921 (Teuten and Reddy, 2007).

Antérieurement, des études avaient déjà rapporté la présence de ces composés dans différentes espèces d'éponges, où ils seraient produits en tant qu'agents de défense (antimicrobiens). Les composés identifiés dans ces organismes portent le groupement hydroxyle ou méthoxyle en position ortho, et la distribution des atomes de brome sur les cycles aromatiques, est parfois déséquilibrée entre les deux cycles, alors que les PBDE synthétiques sont bromés de manière plus homogène. Des composés comme le 6-OH-BDE-47 ont également été identifiés dans ce type d'organisme, ainsi que des PBDE dihydroxylés (Handayani et al., 1997; Wiseman et al., 2011). L'origine naturelle de ces composés dans les éponges a été récemment confirmée par une analyse de datation au carbone 14, de 6-OH-BDE-47, de 2'-OH-BDE-68 d'un hexa-BDE dihydroxylé et d'un penta-BDE hydroxylé isolés dans des échantillons d'éponge (Guitart et al., 2011).

En plus de ces études, une équipe s'est appliquée, à partir d'études *in vitro* réalisées sur des microsomes de différentes espèces (poulet, truite et rat), à établir les liens métaboliques possibles entre PBDE, OH-PBDE et MeO-PBDE. Les conclusions indiquent que les OH-PBDE pourraient être des produits du métabolisme des MeO-PBDE, bien que cela n'ait été mis en évidence que pour 3 composés d'un mélange dont le 6-OH-BDE-47 et le 4'-OH-BDE-49. Des PBP sont aussi formés à partir des MeO-PBDE. A l'inverse, les PBDE et les OH-PBDE n'ont pas été métabolisés par les microsomes utilisés (Wan et al., 2009). Par la suite, ils ont montré que le 6-

MeO-BDE-47 est converti en 6-OH-BDE-47 par les microsomes de foie de médaka (*Oryzias latipes*), et inversement que ces poissons, s'ils sont exposés au 6-OH-BDE-47 peuvent transformer celui-ci en 6-MeO-BDE-47. Par contre, les microsomes de foie seuls n'ont encore une fois pas permis la transformation de 6-OH-BDE-47 en 6-MeO-BDE-47 (Wan et al., 2010b). Il a également été montré que deux PBDE ont été métabolisés par les microsomes de foie d'ours (Letcher et al., 2009). Ces travaux indiquent que les PBDE hydroxylés et méthoxylés peuvent avoir deux origines, soit métabolique soit naturelle. Les bromophénols peuvent également avoir plusieurs origines : métabolique, mais aussi naturelle et anthropogénique. Leur synthèse par les organismes marins est avérée, probablement en tant qu'agent antimicrobien, et ils sont aussi connus pour leur qualité aromatique dans la chair de poissons ou de crustacés. Leurs origines synthétiques sont en fait diverses, puisque ce sont des produits intermédiaires de synthèses chimiques et qu'ils sont utilisés comme retardateurs de flamme et comme antifongiques, avec une production annuelle de 9500 tonnes en 2001 (Whitfield et al., 1996; Howe et al., 2005).

4.6 - CONCLUSION

Les études s'étant intéressées aux métabolites des PBDE ont permis de préciser leur rôle dans la toxicité des PBDE. Les PBDE hydroxylés et les PBP semblent effectivement jouer un rôle dans l'effet endocrine des PBDE puisque ces composés sont capables *in vitro* de mimer l'effet des hormones thyroïdiennes en se fixant sur leur transporteur, et ainsi de déséquilibrer l'homéostasie de ces hormones. Les PBDE hydroxylés pourraient également se fixer sur les récepteurs des hormones stéroïdiennes et sur des cytochromes impliqués dans leur synthèse, et modifier de fait le métabolisme de ces hormones. Les PBDE méthoxylés semblent inactifs sur ces voies métaboliques. Depuis 2008, quelques études ont montré que ces composés sont présents chez l'Homme, à l'état d'ultra-traces (de l'ordre du pg/g) dans le sérum ou le lait maternel. Elles indiquent aussi que le nouveau-né et le fœtus y sont exposés.

En parallèle de ces études montrant les effets délétères de ces métabolites, et leur présence chez l'Homme, un débat concernant l'origine naturelle des métabolites des PBDE s'est développé, et il a été prouvé que ces composés peuvent avoir plusieurs origines : métabolique, comme ceci a été montré par les études de métabolisme, naturelles ou liée à des processus industriels. En effet, les PBP sont synthétisés naturellement par de nombreux organismes marins, et les PBDE méthoxylés et/ou hydroxylés peuvent être produits à partir de ces PBP. Les PBP sont par ailleurs utilisées dans d'autres synthèses chimiques. Il apparaît donc nécessaire d'être prudent dans les observations faites, et dans le choix des métabolites qui peuvent être utilisés comme biomarqueurs.

5 - OUTILS ET METHODES ANALYTIQUES

5.1 - LES PBDE

5.1.1 - Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des PBDE varient fortement en fonction de leur nombre d'atomes de brome, comme le montrent les valeurs présentées dans le tableau I-6. Par exemple, leurs points de fusion et d'ébullition augmentent avec le degré de bromation. Les PBDE ont donc des applications différentes en fonction de ces propriétés. Ceci explique également la plus large utilisation du déca-BDE, qui a un effet ignifugeant plus important grâce à son degré de bromation élevé.

Tableau I-6 : Propriétés physico-chimiques des trois mélanges techniques de PBDE (CE, 2001, 2002, 2003; Riu, 2006)

	Penta-mix	Octa-mix	Déca-mix
Masse molaire du BDE associé (g.mol⁻¹)	564,7	801,4	959,2
Point de fusion (°C)	-7 à -3	70 à 257	300 à 310
Point d'ébullition (°C)	> 200		> 320
Pression de vapeur (Pa)	4,69.10 ⁻⁵	6,59.10 ⁻⁵ (21°C)	4,63.10 ⁻⁶ (21°C)
Log Kow	6,57 / 7,88	6,29 / 8,35 à 8,9	6,27 / 9,97
Solubilité dans l'eau (µg.L⁻¹)	13,3	0,5	< 0,1
Solubilité dans le méthanol (g.L⁻¹)	10	2 à 7	0,5
Solubilité dans le toluène (g.L⁻¹)	Soluble	200	3,8
Solubilité dans le DMSO (g.L⁻¹)			3,5
Solubilité dans l'acétonitrile (g.L⁻¹)			0,1

Par ailleurs, les PBDE sont des composés peu hydrosolubles, présentant un coefficient de partage octanol-eau élevé, qui augmente avec le degré de bromation. Le déca-BDE se caractérise également par une solubilité relativement faible dans divers solvants. Il en est de même pour les pressions de vapeur : les composés faiblement bromés ont une pression de vapeur plus élevée, et donc une capacité accrue à être transportés sur de longues distances (CE, 2001, 2002, 2003).

5.1.2 - Méthodes d'analyse employées

L'analyse des RFB en général requiert une grande spécificité, afin d'identifier de manière non ambiguë ces composés pour lesquels de nombreux isomères (PBDE, HBCD) sont en présence, ainsi qu'une grande sensibilité afin de pouvoir mesurer correctement ces composés présents à l'état de trace (de l'ordre du ng/g) voire d'ultra-trace (de l'ordre du pg/g) dans les matrices biologiques complexes.

De ce fait, les techniques de choix et de référence pour l'analyse des PBDE reposent sur l'utilisation de la spectrométrie de masse (MS). Tout comme pour d'autres classes de contaminants environnementaux persistants, tels que les Polychlorodibenzo-*p*-dioxines, les dibenzofuranes (PCDD et PCDF) ainsi que les PCB, la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) ou en tandem (MS/MS) est privilégiée. Trois modes d'ionisation peuvent être utilisés pour l'analyse des PBDE. Le premier est l'ionisation chimique négative (NCI), qui aboutit à une bonne sensibilité de détection mais à une spécificité modérée puisqu'elle est en général basée sur la seule détection d'ions Br⁻ provenant d'une dissociation des PBDE. La capture électronique a également été employée, mais avec des performances également limitées du fait là aussi de la détection majoritaire d'ions Br⁻ produits par capture électronique dissociative. L'impact électronique est plus spécifique, car il conduit à la formation d'ions moléculaires, mais est moins sensible que l'ECNI. Ces trois techniques d'ionisation (ECD, NCI, EI) sont adaptées à un couplage avec la chromatographie gazeuse (GC), et donc à l'analyse de composés apolaires et volatils tels que les PBDE faiblement à moyennement bromés. L'utilisation de la GC capillaire permet par ailleurs d'obtenir une séparation fine des différents congénères.

Cependant, les PBDE hautement bromés (octa- à déca-BDE) sont des composés lourds, peu volatils et thermosensibles, ce qui les rend sujets à débromation aux températures généralement utilisées en GC, et aboutit à des limites de détection souvent supérieures par rapport à celles atteintes pour les autres PBDE (du fg/g ou supérieure au pg/g selon la méthode utilisée et le composé considéré). Ceci explique que la plupart des études sur les PBDE se limitent à l'analyse des principaux congénères les plus abondants (ou indicateurs), de tri- à hepta-BDE, et n'incluent que rarement le BDE-209 et de manière exceptionnelle les octa- et nona-BDE (Cariou et al., 2008; Vonderheide, 2009).

L'analyse des PBDE par le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (LC-MS) était quant à elle considérée il y a quelques années comme inadaptée, puisque les interfaces de type électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) couramment associées à cette technique sont plutôt dédiées à l'analyse de composés polaires à moyennement polaires, et ne permettent pas une ionisation efficace de substances plus apolaires telles que les PBDE. L'apparition en 2001 de la photoionisation à pression atmosphérique (APPI) a toutefois élargi le domaine d'application de la LC-MS en permettant l'ionisation de composés plus apolaires (Robb et al., 2000). L'utilisation de cette technique pour l'analyse des PBDE, par LC-APPI-MS a été proposée à partir de 2005 (Debrauwer et al., 2005; Riu et al., 2006).

En ce qui concerne la préparation des échantillons, la principale difficulté est que ces composés s'accumulent dans la matière grasse. Les méthodes développées sont donc basées sur une extraction, souvent par ASE (Accelerated Solvent Extraction), donc à température et pression élevées (100°C, quelques bars), puis sur la purification de cette fraction lipidique, notamment via la dégradation à l'acide sulfurique, sur colonne de silice activée par exemple, avant analyse par GC-HRMS (Cariou et al., 2008; Vonderheide, 2009). D'une manière générale, l'analyse des RFB est particulièrement délicate, et le risque de contaminations analytiques en raison de leur présence dans les poussières, doit être maîtrisé. Lors de l'analyse des RFB, il faut donc soit travailler dans une salle blanche, soit être extrêmement attentif lors de la préparation des échantillons.

5.2 - LE TBBPA

5.2.1 - Propriétés physico-chimiques

Ce composé présente un point de fusion d'environ 180°C et se décompose entre 200 et 300°C, comme l'indiquent les valeurs présentées dans le tableau I-7. Ces propriétés en font donc un retardateur de flamme efficace, expliquant en partie sa prédominance sur le marché européen des RFB. Par ailleurs, il est relativement peu soluble dans l'eau : de 0,06 à 0,24 mg/L en fonction de la température. Sa solubilité varie également beaucoup en fonction du pH du fait de la présence des fonctions phénol : 0,148 mg/L à pH 5 à 2,3 mg/L à pH 9.

Tableau I-7 : Propriétés physico-chimiques du TBBPA

	TBBPA
Masse molaire (g.mol⁻¹)	543,9
Point de fusion (°C)	178 à 182
Point d'ébullition (°C)	316
Pression de vapeur (Pa)	< 1.19.10 ⁻⁵ (20°C)
Log Kow	5,9
Solubilité dans l'eau à 25°C (mg.L⁻¹) ; pH 5	0,148
Solubilité dans l'eau à 25°C (mg.L⁻¹) ; pH 7	1,26
Solubilité dans l'eau à 25°C (mg.L⁻¹) ; pH 9	2,34
Solubilité dans l'eau pure à 25°C (mg.L⁻¹)	0,24

5.2.2 - Méthodes d'analyse employées

Le TBBPA est le plus souvent analysé par couplage LC-MS, mais le couplage GC-MS peut également être envisagé après dérivatisation des groupements hydroxyles. En LC-MS, les trois sources d'ionisations à pression atmosphérique existantes (ESI, APCI, APPI) peuvent être

utilisées, mais l'électrospray est la plus couramment utilisée. Les techniques de purification employées pour l'isolement du TBBPA à partir de matrices biologiques font intervenir des extractions liquide-liquide, des étapes de purification sur silice et d'hydrolyse à l'acide concentré. L'emploi de cartouches plus spécifiques telles que les OASIS HLB est également parfois observé. Ce type de cartouche SPE a des propriétés mixte hydrophiles et hydrophobes, comme le TBBPA, Cependant, le TBBPA reste un composé relativement peu étudié et le nombre de méthodes analytiques décrites dans la littérature et qui lui sont dédiées est très limité car difficile à étudier, notamment en raison son caractère amphiphile (Covaci et al., 2009; Mascolo et al., 2010).

5.3 - L'HBCD

5.3.1 - Propriétés physico-chimiques

Les diastéréoisomères possèdent des propriétés physico-chimiques différentes, notamment vis-à-vis de l'hydrosolubilité, comme l'indique le tableau I-8 ci-dessous. Des phénomènes de réarrangement, et d'interconversion des diastéréoisomères d'HBCD sont observés pour des températures supérieures à 160°C, et la décomposition des HBCD intervient aux alentours de 240°C (Covaci et al., 2006; Guerra et al., 2011). La formation de bromocyclododécènes, et un enrichissement en isomère alpha peuvent aussi intervenir, si la durée d'exposition à la chaleur est assez longue (supérieure à 10 min). Ces composés sont également assez solubles dans la plupart des solvants organiques (3% dans le chlorobenzène à 34% dans le diméthyle formamide), même s'ils sont peu solubles dans les alcanes et le méthanol (CE, 2008).

Tableau I-8 : Propriétés physico-chimiques des HBCD (CE, 2008)

	α -HBCD	β -HBCD	γ -HBCD
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	641,7		
Point de fusion (°C)	179-181	170-172	207-209
Point d'ébullition (°C)	> 190		
Pression de vapeur (Pa)	6,3. 10 ⁻⁵		
Log Kow (CE, 2008)	5,07	5,12	5,47
Log Kow (Mariussen et al., 2010)	4,45	4,18	4,4
Solubilité dans l'eau (µg.L ⁻¹)	48,8	14,7	2,1

5.3.2 - Méthodes d'analyse employées

L'analyse de l'HBCD est possible par couplage LC-MS ou GC-MS, mais la chromatographie gazeuse n'est pas la plus adaptée à une séparation des différents isomères. De plus, les HBCD sont susceptibles d'être dégradés à cause de leur thermolabilité aux températures d'usage de la

chromatographie gazeuse (Abdallah et al., 2008). L'HBCD est donc généralement analysé par LC-MS afin de pouvoir identifier et quantifier séparément les différents diastéréoisomères, ou par GC-ECNI-MS pour une meilleure sensibilité mais sur la base de l'HBCD total. Le mode d'ionisation appliqué en LC-MS est en règle générale l'ESI ou l'APCI, avec la possibilité d'acidifier les phases mobiles ou d'y ajouter des sels afin d'améliorer la sensibilité (Guerra et al., 2011). En LC-MS, la séparation est souvent réalisée sur des colonnes C18 conventionnelles, mais elle peut également se faire sur une colonne chirale. Ce type de colonne permet la séparation des énantiomères, mais reste relativement peu courante pour l'analyse des échantillons biologiques d'origine humaine (Eljarrat et al., 2009; Abdallah and Harrad, 2011). La technique d'ionisation de choix dans ces conditions est l'ESI, même si l'APPI ou l'APCI ont également été parfois utilisées (Eljarrat et al., 2009; Mascolo et al., 2010). Certaines approches particulières, comme la formation d'adduits au chlore en LC-ESI-MS (Galindo-Iranzo et al., 2009), ou l'attachement anionique en APPI (Ross and Wong, 2010) permettent d'accroître notablement la sensibilité.

La préparation des échantillons en vue de la mesure de l'HBCD inclut généralement une extraction par un solvant apolaire comme l'hexane ou le dichlorométhane par ASE sur échantillon lyophilisé suivie d'une ou plusieurs étapes de purification sur silice ou florisil. Un traitement à l'acide ou sur silice acide est également employé pour l'élimination des lipides. L'extraction par SPE dispersive, c'est-à-dire l'ajout d'une phase stationnaire durant une extraction solide/liquide, a également été rapportée, ainsi que l'extraction simultanée avec le TBBPA (Johnson-Restrepo et al., 2008; Abdallah and Harrad, 2011).

5.4 - LES METABOLITES

Quelques études se sont d'ores et déjà intéressées aux PBDE hydroxylés et méthoxylés, en général en utilisant le couplage GC-MS avec ionisation par impact électronique (Marsh et al., 2003; Marsh et al., 2006; Song et al., 2008; Lacorte and Ikononou, 2009) ou par capture d'électron négative (Morck et al., 2003; Marsh et al., 2004; Malmberg et al., 2005; Athanasiadou et al., 2008; Gebbink et al., 2008; Song et al., 2008; Qiu et al., 2009). L'analyse en GC-MS des OH-PBDE nécessite la dérivation de la fonction hydroxyle, généralement sous forme de dérivés TMS ou méthoxyle. Une étude comparative de l'ionisation des PBDE méthoxylés selon 3 modes d'ionisation différents (EI, ECNI et PCI) indique que l'EI donne des informations sur la position du groupement méthoxylés et l'ionisation chimique positive (PCI) sur le nombre de brome sur chacun des cycles. Si elle est peu spécifique, l'ECNI est la technique la plus sensible en suivant le signal des ions $[Br]^-$ (Athanasiadou et al., 2006). L'utilisation de la LC est moins

courante, mais la LC-APCI-MS/MS a été appliquée à la détection du BDE-47 et du BDE-68 ainsi que de 4 métabolites hydroxylés ou méthoxylés. Elle permet, sans étape spécifique de préparation des échantillons la détection simultanée des 3 types de composés, avec une LOQ inférieure au ng/g pour les composés hydroxylés, de quelques ng à quelques dizaines de ng/g pour les composés méthoxylés et de 80 ng/g pour le BDE-47 (Kato et al., 2009). L'analyse des PBDE hydroxylés a également été réalisée par deux méthodes LC-ESI-MS/MS, avec des limites de quantification de l'ordre du pg injecté, pour des tri- à hexa-BDE hydroxylés. L'une de ces méthodes utilise l'ionisation en mode positif sur des composés dérivatisés au chlorure de dansyl (Chang et al., 2010), tandis que l'autre utilise l'ionisation en mode négatif (Mas et al., 2007). Cette dernière rapporte des différences de fragmentation en fonction de la position du groupement hydroxyle en MS/MS (Mas et al., 2007).

Les modes de purification des métabolites de PBDE sont divers, en fonction de la méthode de détection utilisée et selon que les PBDE hydroxylés et/ou méthoxylés sont recherchés. Les OH-PBDE peuvent être séparés des PBDE par ajout d'une base (KOH 0,5M) puis reprotonés par ajout d'acide en excès (HCl) et transférés dans un solvant pour être purifiés sur cartouche et par acide sulfurique, puis éventuellement dérivatisés avant analyse en GC-MS (Malmberg et al., 2005; Athanasiadou et al., 2008). La séparation entre les composés phénoliques et les composés neutres peut également être effectuée sur colonne de Florisil, avant de repurifier les fractions pour éliminer les lipides (de la Torre et al., 2009). Certains auteurs ont également utilisé la purification par chromatographie de perméation sur gel puis purification sur gel de silice (Marsh et al., 2004).

5.5 - SPECIFICITES DE L'ANALYSE DES COMPOSES BROMES

Deux isotopes stables du brome coexistent naturellement. Le ^{79}Br possède une masse exacte de 78,91833 et une abondance relative de 50,69 % et le ^{81}Br une masse exacte de 80,91628 et une abondance relative de 49,31 %. L'abondance quasi égale des deux isotopes confère aux massifs isotopiques des composés bromés une allure caractéristique, dépendante du nombre de brome de la molécule, comme indiqué sur la figure I-17. Chaque pic isotopique est séparé par 1,998 unité de masse. Ceci constitue un outil précieux pour l'identification des composés bromés, qu'ils soient inconnus ou en comparaison à un standard.

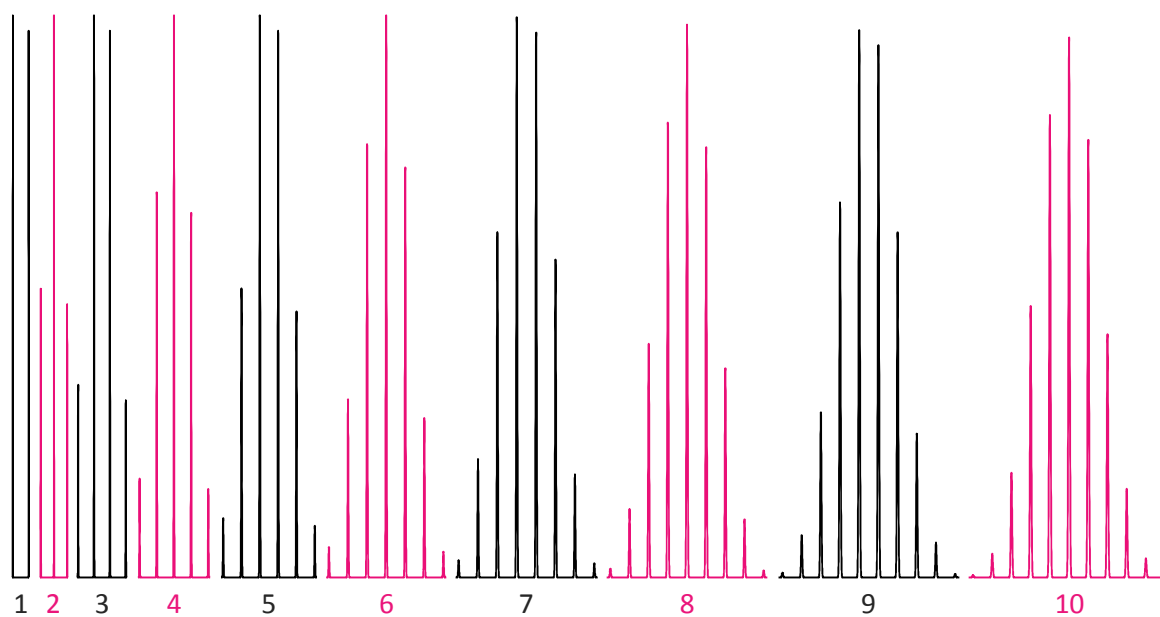


Figure I-16 : Massifs isotopiques théoriques en fonction du nombre de brome

5.6 - CONCLUSION

Les différents RFB ont pour point commun d'être tous particulièrement apolaires. Les PBDE sont les plus hydrophobes, et l'analyse des composés hautement bromés et donc du BDE-209 est particulièrement délicate à cause de la très forte hydrophobicité de ces composés et de phénomènes de dégradation thermiques à des températures d'usage en chimie analytique. Le TBBPA est lui un composé dont les propriétés dépendent du pH, puisqu'en milieu acide il est quasi insoluble dans l'eau alors qu'il est hydrosoluble en milieu basique. L'HBCD est un composé qui présente des propriétés intermédiaires, mais des différences de comportement assez importantes entre les différents isomères complexifient leur analyse. En particulier, l'analyse par GC ne permet pas la séparation des diastéréoisomères. D'autre part la LC-MS était inadaptée à l'analyse des PBDE jusqu'à l'apparition de l'ionisation par APPI au début des années 2000. L'analyse du TBBPA, tout comme celle des métabolites des PBDE est quant à elle possible soit par GC-MS soit par LC-MS. Il en ressort qu'en raison de leurs propriétés physico-chimiques différentes, l'analyse des RFB requiert l'utilisation de différentes méthodes. Les méthodes de préparation des échantillons font en général intervenir les mêmes étapes d'extraction, de délipidation ou de purification. Les propriétés différentes des RFB peuvent aussi être un atout, et les PBDE peuvent par exemple être séparés des PBDE hydroxylés par solubilisation de ces derniers en milieu aqueux basique. En résumé, l'analyse des RFB et de leurs métabolites est donc délicate, en particulier à cause des quantités très faibles à détecter, et de leurs propriétés différentes.

6 - CONCLUSION

Les RFB sont des composés très utilisés dans de nombreux produits manufacturés, trois composés représentant la très grande majorité du marché, à savoir le TBBPA, le déca-BDE et l'HBCD. L'intérêt de leur utilisation dans la protection des biens et des personnes contre les dégâts des incendies est évident, mais depuis quelques années, des études ont attiré l'attention sur ces produits, qui auraient des propriétés toxiques en relation avec le développement du système nerveux, et agiraient en tant que perturbateurs endocriniens au niveau des axes thyroïdien et stéroïde. Les informations suffisamment abondantes au sujet des PBDE moyennement bromés, ont mené au classement du penta-mix et de l'octa-mix (tétra- à octa-BDE) sur la liste des polluants organiques persistants de l'UNEP, où figurent également des polluants comme les PCDD/F, les PCB ou certains pesticides organochlorés. Par contre, les données sont nettement moins nombreuses pour le BDE-209, le TBBPA et l'HBCD.

Ces produits sont présents et persistants dans l'environnement, et peuvent être transportés sur de très longues distances. Ceci est particulièrement vrai pour l'HBCD et le déca-BDE, qui sont retrouvés dans des endroits éloignés de toute activité humaine, comme l'Arctique. Ils sont en conséquence retrouvés tout au long de la chaîne alimentaire. Diverses études ont caractérisé l'imprégnation de la population humaine et désigné deux populations particulièrement exposées et vulnérables, à savoir le fœtus et l'enfant en bas-âge, deux périodes où l'exposition rapportée au poids de l'individu est supérieure à ce qu'elle est pour le reste de la population. Il s'agit également de périodes cruciales du développement durant lesquels les effets des RFB seraient particulièrement délétères, provoquant des retards de développement et des modifications de l'homéostasie, en lien avec la perturbation des régulations hormonales thyroïdiennes et stéroïdiennes. Une fois présents dans un organisme vivant, les RFB sont métabolisés avec des différences notoires en fonction de la structure du composé étudié, mais aussi de l'espèce exposée. Les différentes études montrent de façon générale que les RFB sont absorbés et dégradés. Les PBDE peuvent être notamment métabolisés en composés qui s'avèrent être responsables de l'activité de perturbation endocrinienne observée lors des études de toxicologie et attribuée en première intention aux PBDE parents. Les quelques données actuellement disponibles sur les métabolites des PBDE (PBDE hydroxylés et méthoxylés) indiquent d'ailleurs que ces composés sont eux aussi présents dans l'environnement et chez l'Homme, notamment dans le lait maternel ou le sérum de cordons ombilicaux.

Cependant, le nombre d'études consacrées au métabolisme des RFB et à l'occurrence des métabolites chez l'Homme est encore limité, malgré quelques travaux parus depuis 3 ans, qui ont

montré que les PBDE pouvaient être métabolisés par des systèmes cellulaires humains, ainsi que la présence des métabolites de PBDE dans divers fluides biologiques humains. Plusieurs questions restent donc posées en termes de devenir et d'effets de ces composés.

Dans ce contexte, ce projet de thèse a été initié afin d'apporter des éléments de réponse supplémentaires sur le métabolisme des PBDE et du TBBPA. Pour cela, différentes expérimentations *in vitro* ont été mises en place avec des systèmes *in vitro* d'origine humaine, à savoir des hépatocytes en culture primaire, des microsomes hépatiques et des lignées cellulaires. Elles ont été réalisées avec des composés parents marqués au carbone 14, afin de faciliter la recherche et la quantification des métabolites. En ce qui concerne le TBBPA, les études *in vivo* sur modèles animaux ont démontré l'absorption et la métabolisation de ce RFB au niveau du foie. Son devenir chez l'Homme a donc été exploré à l'aide d'hépatocytes humains en culture primaire, qui est le modèle cellulaire le plus proche des conditions de métabolisme hépatique *in vivo*. Dans notre travail, des hépatocytes de rat ont également été utilisés, car la plupart des études de métabolisme sont effectuées chez le rat, et il est donc intéressant de savoir si les capacités de ces deux espèces sont comparables.

En ce qui concerne les PBDE, deux composés ont été étudiés : le BDE-209 qui est encore utilisé et le BDE-47 qui est majoritairement retrouvé dans des échantillons biologiques, et qui serait l'un des PBDE les plus efficacement métabolisés. Pour les PBDE, les protocoles expérimentaux ont été étendus à d'autres modèles cellulaires que le foie, à l'aide de lignées cellulaires. En effet, il a été montré que le BDE-209 est entre autre retrouvé en quantités importantes dans les glandes surrénales et les ovaires. Le métabolisme du BDE-47 et du BDE-209 a donc également été exploré avec différentes lignées cellulaires humaines, d'origine surrénalienne, ovarienne et hépatocytaire.

La seconde partie de ce projet a eu pour but de compléter les données sur l'occurrence des métabolites des RFB chez l'Homme. Les résultats des études de métabolisme des PBDE ont été utilisés, avec comme objectif d'identifier des métabolites qui puissent être utilisés de façon pertinente comme indicateurs de l'imprégnation aux RFB. La recherche de ces métabolites avait également pour but d'apporter des réponses quant à la métabolisation effective des RFB par l'Homme, en complément des études de métabolisme.

Les études toxicologiques présentées au cours de ce premier chapitre indiquent que les RFB pourraient exprimer leurs effets toxiques préférentiellement au cours de la période périnatale (vie

foetale et période néonatale). Les études sur l'imprégnation humaine ont montré que le fœtus et le nouveau-né allaité sont exposés aux PBDE et au TBBPA. Nous avons donc décidé d'orienter ce projet vers ces deux populations particulièrement vulnérables. Les échantillons dans lesquels les métabolites ont été recherchés ont donc été prélevés, selon les règles éthiques, chez des couples mère-enfant. Les jeux d'échantillons, prélevés au CHU de Toulouse, comportent du lait maternel, du sérum maternel et du sérum de cordons ombilicaux (plus spécifiquement du sérum de sang de cordon ombilical), les premières urines des nouveau-nés et du tissu adipeux maternel.

Le choix des métabolites à rechercher dans les échantillons biologiques humains a été définitivement arrêté après étude des résultats de notre première phase de travail dédiée au métabolisme des RFB. Néanmoins, la bibliographie au sujet des métabolites des PBDE a aussi été utilisée pour orienter le choix des métabolites à rechercher. En particulier, il a été prouvé que les sources de MeO-PBDE et d'OH-PBDE sont multiples, naturelles (organismes marins) ou liées au métabolisme des RFB synthétisés pour leurs propriétés ignifuges. En ce qui concerne les observations chez l'Homme, il apparaît raisonnable de penser que la source principale est métabolique. En effet, si ces composés sont présents à l'état de trace dans les organismes marins, l'exposition à ces MeO- et OH-PBDE naturels ne suffit pas à expliquer les niveaux de résidus habituellement observés dans les échantillons humains. Le problème est plus complexe pour les bromophénols qui sont présents en plus grande quantité dans les organismes marins, mais peuvent également être produits par dégradation d'autres composés ou provenir de réactifs utilisés dans diverses synthèses chimiques.

Nous avons donc orienté notre choix vers les métabolites biologiquement actifs, à savoir les PBDE hydroxylés. C'est en effet à ces composés que sont en partie attribués les effets des PBDE. Les bromophénols, qui semblent eux aussi être biologiquement actifs, n'ont pas été retenus à cause des multiples sources et origines possibles pour ces composés. Enfin, les PBDE méthoxylés, qui semblent n'être que peu ou pas biologiquement actifs, et pourraient être d'origine naturelle, ont été également écartés, sauf dans l'éventualité de leur identification lors des études de métabolisme réalisées dans la première partie du projet.

Chapitre 2 : Etude du métabolisme humain des PBDE et du TBBPA

1 - DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES

La première partie de ce travail est consacrée à l'étude du métabolisme des RFB. Les travaux, effectués à l'INRA de Toulouse au sein de l'équipe « Métabolisme des xénobiotiques », ont eu pour but de préciser les connaissances au sujet du métabolisme des PBDE et du TBBPA par des systèmes cellulaires d'origine humaine. Pour cela, différents types d'études *in vitro* ont été réalisées avec des composés radio-marqués. Les avantages liés à l'utilisation des composés radioactifs pour les études de métabolisme sont multiples. Tout d'abord la solubilisation du composé parent peut être contrôlée rapidement, tout au long des travaux. Ensuite, la distribution des composés, parent ou métabolites, peut être facilement déterminée dans les cellules et/ou dans le milieu de culture. Enfin, il est possible à partir des composés radiomarqués d'établir des profils métaboliques sur lesquels le composé parent et ses métabolites peuvent être sélectivement détectés et quantifiés.

Afin de réaliser ces études de métabolisme, le TBBPA, le BDE-47 et le BDE-209 marqués au carbone 14 ont été synthétisés et purifiés au laboratoire. Ces composés radio-marqués ont ensuite été incubés avec différents systèmes cellulaires, choisis en fonction de leur pertinence pour l'étude du métabolisme humain et en fonction du comportement des RFB observé *in vivo*. L'analyse des produits des incubations a été réalisée à l'aide de systèmes chromatographiques adaptés à l'étude de composés radioactifs (radio-HPLC), en développant une méthode spécifique pour chaque composé parent. Des méthodes d'identification biochimique et par spectrométrie de masse ont par ailleurs été utilisées ou développées pour l'identification des métabolites.

1.1 - SYNTHÈSE ET PURIFICATION DES RFB RADIOMARQUÉES

Les différents composés radio-marqués ont été synthétisés et purifiés selon des protocoles adaptés à chaque composé. Après purification, la vérification des solutions a été effectuée par radio-HPLC, avec les méthodes décrites plus loin dans ce chapitre. Nous nous sommes fixés comme critère d'utilisation des composés, une radio-pureté supérieure à 99 %. Une vérification de la radio-pureté a également été effectuée avant l'utilisation de ces solutions pour les essais *in vitro*, et une nouvelle purification a été effectuée quand cela s'est avéré nécessaire.

1.1.1 - [¹⁴C]-TBBPA

Le [¹⁴C]-TBBPA a été synthétisé par bromation partielle de [¹⁴C]-Bisphénol A, marqué de façon homogène sur les carbones des cycles aromatiques. La réaction, présentée sur la figure II-1, se produit dans un mélange méthanol (MeOH)/eau (1/1, v/v) à température ambiante pendant 1 heure. Le TBBPA est ensuite récupéré dans le dichlorométhane par extraction liquide/liquide

(LLE). Pour cette synthèse, l'emploi de BPA non radiomarké (en surcharge) est nécessaire, afin de travailler avec des quantités suffisantes de produit (Riu, 2006).

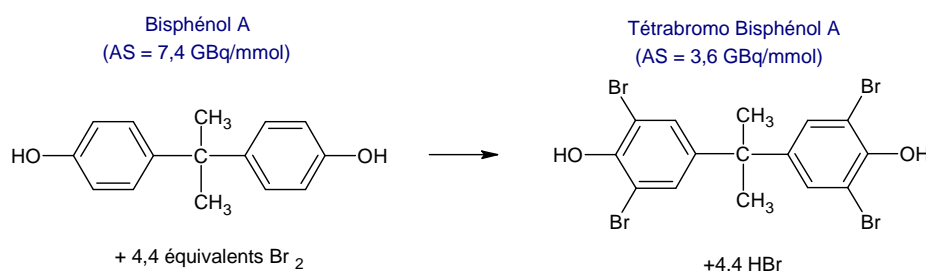


Figure II-1 : Synthèse du TBBPA

Le rendement de cette réaction étant de 50 à 75 %, il est nécessaire de séparer le TBBPA de ses coproduits de réaction, à savoir les bisphénol A mono- à tri-bromés, et les résidus de BPA non bromé. Selon la quantité de produit à purifier, cette opération est réalisée soit par extraction en phase solide (SPE) soit par collecte HPLC. La SPE est en effet efficace pour purifier jusqu'à 150 µg de produit contre 25 µg pour la collecte HPLC, qui permet en contrepartie une meilleure purification, car la séparation des différents produits de bromation du BPA n'est pas optimale sur cartouches.

La purification SPE est réalisée sur cartouches de type phase inverse avec un greffage par une chaîne octadécyle (C₁₈) de 1 g. La solution à purifier est diluée dans 4 mL de mélange phase A/B (60/40, v/v) avec A = eau/acétonitrile (95:5, v:v) avec 0,1% d'acide acétique, et B = acétonitrile (ACN). La solution est déposée sur la cartouche puis éluée en plusieurs fractions contenant le bisphénol A et ses analogues bromés jusqu'au TBBPA, selon le protocole décrit dans le tableau II-1.

Tableau II-1 : Protocole de purification du TBBPA sur SPE C18

Etape	Solvants	Mélange (v/v)	Volume (mL)	Composés élués
Conditionnement	MeOH	100 %	4	BPA, mono à tri-BBPA
Conditionnement	Phase A/ACN	60/40	4	
Dépôt	Phase A/ACN	60/40	4	
Lavage	Phase A/ACN	50/50	4	
Elution 1	Phase A/ACN	50/50	4	
Elution 2	Phase A/ACN	50/50	4	
Elution 3	Phase A/ACN	50/50	4	TBBPA
Elution 4	Phase A/ACN	45/55	4	
Elution 5	Acétonitrile	100 %	4	
Elution 6	Acétonitrile	100 %	4	
Elution 7	Acétonitrile	100 %	4	

Les fractions sont récupérées dans des tubes silanisés, afin de limiter la perte en composés, qui pourraient se fixer par adsorption sur du verre non silanisé ou du plastique. Le TBBPA purifié à 100% est récupéré dans les fractions d'élution 5 à 7, mais une petite partie peut être éluée dans la fraction d'élution 4. La purification par collecte a également été effectuée, afin d'affiner celle effectuée sur SPE, juste avant l'utilisation du [^{14}C]-TBBPA pour les incubations. Cette opération se fait sur colonne C_8 (Fluofix 250 x 4,6 mm, 5 μm) en phase inverse par un mélange eau/acétonitrile. La purification est plus efficace sur ce système car les pics chromatographiques des bromobisphénol A sont totalement résolus en HPLC.

1.1.2 - [^{14}C]-BDE-47

Le [^{14}C]-BDE-47 est synthétisé par bromation ménagée de [^{14}C]-diphényl éther, marqué de façon uniforme au niveau des cycles aromatiques. La réaction, présentée sur la figure II-2, est effectuée à l'aide de dibromure de fer. Le BDE-47 est ensuite récupéré par extraction liquide/liquide. Seul du diphényl éther radiomarké (sans surcharge de composé non marqué) est utilisé dans ce cas, pour obtenir une activité spécifique la plus élevée possible.

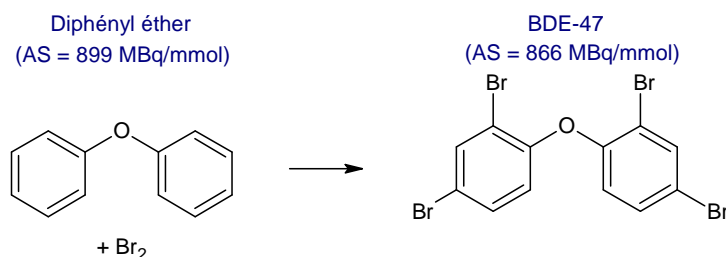


Figure II-2 : Synthèse du BDE-47

Lors de la première synthèse de BDE-47, le rendement était de 70%. Les coproduits de réaction étant d'autres tétra-BDE ou des tri- et penta-BDE, il a été nécessaire d'effectuer la purification du BDE-47 par collecte HPLC. La séparation a été effectuée sur colonne Nucléodur C18 (Macherey Nagel, 250 x 4 mm, 5 μm), à une température de 30°C et un débit de 1 mL/min. Le gradient eau/MeOH appliqué est présenté sur la figure II-3. Jusqu'à 500 μg de produits peuvent être purifiés en une collecte selon ce protocole, car les pics chromatographiques sont mieux résolus que dans le cas du TBBPA. Un collecteur branché en sortie de colonne récupère quatre fractions par minute entre la 15^{ème} et la 34^{ème} minute, et un nettoyage au méthanol du système est effectué durant 2 à 3 heures après chaque collecte afin d'éliminer la radioactivité résiduelle.

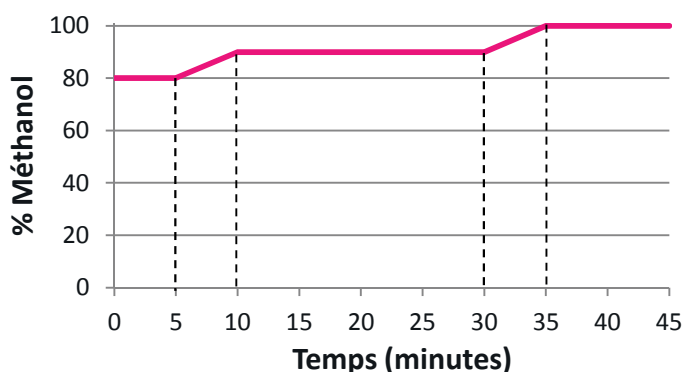


Figure II-3 : Gradient utilisé pour la purification par collecte du BDE-47

1.1.3 - [^{14}C]-BDE-209

Le [^{14}C]-BDE-209 est également synthétisé à partir de [^{14}C]-diphényl éther. La réaction, présentée sur la figure II-4, est effectuée par réaction avec du dibrome en excès et en présence d'aluminium. Plusieurs ajouts de brome sont effectués, sur une durée de 2 heures en chauffant à 50°C puis 70°C. Le BDE-209 est ensuite récupéré par extraction liquide/liquide au toluène. Seul du diphényl éther radiomarqué est utilisé, de façon à obtenir une activité spécifique élevée (Riu, 2006).

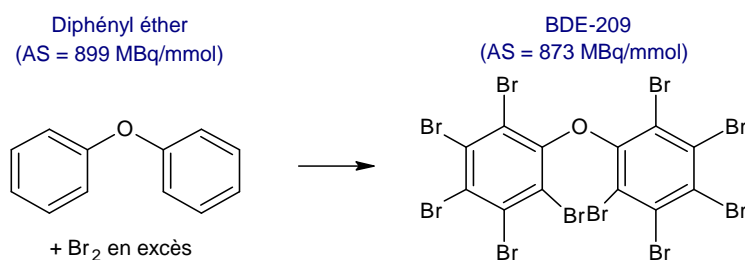


Figure II-4 : Synthèse du BDE-209

Le rendement de cette synthèse est proche de 100%, mais une étape de purification demeure nécessaire. Une méthode par SPE a ainsi été développée pour éliminer les nona-BDE résiduels en cas de bromation incomplète. La purification par collecte HPLC est difficilement envisageable pour le BDE-209 à cause de sa faible solubilité dans le méthanol et de son insolubilité dans l'eau. La purification est donc réalisée par SPE sur cartouches verre C18 de 1 g. La solution à purifier, contenant 100 à 350 µg de BDE-209, est diluée dans 4 mL d'eau/ACN (20/80, v/v) avant d'être déposée sur la cartouche. Le protocole présenté dans le tableau II-2 présente de nombreuses étapes car la séparation des nona-BDE et du déca-BDE est particulièrement délicate sur ces systèmes plus adaptés à des composés polaires. De la même manière que précédemment, les fractions sont récupérées dans des tubes silanisés, et la pureté de chaque fraction doit être vérifiée car des variations sont observées d'une cartouche à l'autre, à

cause de l'élution très proche des nona-BDE et du BDE-209, qui sont par ailleurs tout aussi difficiles à séparer en HPLC.

Tableau II-2 : Protocole de purification du BDE-209 sur SPE C18

	Volume (mL)	Solvants	Mélange (v/v)	Composés élués
Conditionnement	4	MeOH	100%	
Conditionnement	4	Eau/ACN	20:80	
Dépôt	4	Eau/ACN	20:80	
Lavage	4	Eau/ACN	20:80	
Elution 1	4	Eau/ACN	10:90	BDE-209 + nona-BDE
Elution 2	4	Eau/ACN	10:90	
Elution 3	4	Eau/ACN	8:92	
Elution 4	1	Eau/ACN	8:92	
Elution 5	1	Eau/ACN	8:92	BDE-209 + résidus de nona-BDE possible
Elution 6	1	ACN	100%	
Elution 7	1	ACN	100%	BDE-209
Elution 8	4	Toluène	100%	
Elution 9	4	Toluène	100%	
Elution 10	4	Toluène	100%	

1.2 - ETUDES IN VITRO

1.2.1 - Etudes de métabolisation par des hépatocytes en culture primaire

Le métabolisme des RFB a été étudié sur des hépatocytes en culture primaire, à savoir des cellules en survie directement isolées de biopsies de foies et cryopréservées. Les incubations ont été réalisées dans l'équipe « Toxicologie cellulaire, moléculaire des xénobiotiques » de l'Unité TOXALIM, basée à Sophia-Antipolis. Un plan d'expérience complet, dont les conditions sont présentées dans le tableau II-3, a été construit pour aboutir à une étude de métabolisme comparé Homme / rat.

Tableau II-3 : Protocole d'étude du métabolisme des RFB sur hépatocytes en culture primaire

Composé cible	BDE-209, BDE-47 ou TBBPA
Espèce	Humain ou rat
Concentration	1 ou 5 nmol/mL
Source de protéines	Avec ou sans SVF
Répliquats	Humain : ♀, 82 ans - ♀, 31 ans - ♂, 64 ans Rat : deux males, une femelle

Les trois RFB synthétisés ont été incubés à deux concentrations (1 et 5 nmol/mL, soit 1 et 5 µM), qui sont les concentrations minimales étudiables compte tenu des contraintes techniques relatives à l'activité spécifique des molécules synthétisées. Il s'agit en effet de rechercher le profil métabolique pour chaque incubation, puis de disposer d'assez de composé pour chaque

échantillon, en vue de l'identification des métabolites. Ces faibles concentrations visent aussi à éviter autant que faire se peut la saturation des enzymes de biotransformation, et à rapprocher les conditions d'exposition cellulaire des niveaux circulants connus pour les PBDE. L'influence de la présence ou non de sérum de veau fœtal (SVF) dans les incubations a également été testée. Le SVF présent dans le milieu de culture cellulaire est en effet très riche en protéines, facteurs de croissance, stéroïdes, etc. et pourrait influencer la biodisponibilité des molécules mises à incuber. Enfin, pour chacune de ces conditions, les hépatocytes provenant de trois individus ont été utilisés.

Les cellules cryopréservées ont été dans un premier temps décongelées en suivant un protocole limitant la mort des cellules. En pratique, cela revient à diluer progressivement les cellules dans du milieu L-15 agrémenté de Diméthylsulfoxyde (DMSO) et de SVF, puis à nettoyer plusieurs fois les cellules avec du milieu L-15 contenant du SVF. L'utilisation d'un milieu spécifique permet ensuite d'éliminer les cellules mortes, avant de placer les cellules vivantes dans les boîtes de culture dont le fond des puits a été tapissé de collagène, pour l'adhésion des cellules au fond du puits. Finalement, les cellules sont placées 24 heures dans une étuve à CO₂ à 37°C pour finaliser leur différenciation (Sousa et al., 1996).

L'incubation des hépatocytes avec les composés radioactifs intervient après l'étape de mise en culture des cellules. Pour cela, le milieu L-15 est remplacé par 1 mL de milieu William's, avec ou sans SVF, comme décrit dans le tableau II-3, contenant 0,5% de pénicilline/streptomycine et 0,1 UI/ml d'insuline. Les RFB radiomarqués solubilisés dans 5 µL de DMSO (voir le tableau II-4) sont ajoutés. Les cellules sont ensuite incubées durant 24 heures dans une étuve à 37°C sous atmosphère contenant 5% CO₂.

Tableau II-4 : Solution de supplémentation des incubations préparées dans le DMSO

Solution	Radioactivité en dpm/5µL	Radioactivité en Becquerel/5µL	Concentration (nmole/5µL)
BDE-209 – 1 µM	55910	931	1,07
BDE-209 – 5 µM	276105	4602	5,27
BDE-47 – 1 µM	50200	837	0,97
BDE-47 – 5 µM	271025	4517	5,24
TBBPA – 1 µM	213190	3553	1,00
TBBPA – 5 µM	193305	3222	0,90 - 4,50*

* : la solution TBBPA 5 µM a été préparée avec 1 µM de TBBPA marqué et 4 µM non marqué

A la fin de la période d'incubation, les milieux sont prélevés, les cellules récupérées en grattant le fond des puits avec un mélange eau/acétonitrile (50/50, v/v), et les puits nettoyés à l'acétonitrile. Tous les échantillons sont stockés dans des tubes silanisés à -20°C.

1.2.2 - Etudes de métabolisation par différentes lignées cellulaires

Le métabolisme du BDE-47 et du BDE-209 a ensuite été étudié sur différentes lignées cellulaires humaines présentées dans le tableau II-5 et disponibles au laboratoire. Ces lignées sont issues de différents tissus. Les cellules surrénaliennes H295R ont été utilisées car il a été montré sur cette lignée que certains PBDE pouvaient avoir un effet sur la stéroïdogénèse (Canton et al., 2005; Canton et al., 2008). De plus, il a été démontré que le BDE-209 était spécifiquement accumulé dans la zone corticale de la surrénale, impliquée dans la stéroïdogénèse (Seyer et al., 2010). Les cellules d'ovaires HO-23 ont été utilisées car il s'agit là encore d'un organe où les PBDE se concentrent (Morck et al., 2003; Seyer et al., 2010). Les hépatocytes HepG2 ont été utilisés pour comparaison avec l'étude faite sur les hépatocytes en culture primaire. Les cellules du côlon LS174T ont été choisies parce que la voie orale (exposition alimentaire) est l'une des voies majeures d'exposition aux PBDE, et que les cellules intestinales possèdent des cytochromes P450 et peuvent donc être impliquées dans le métabolisme de xénobiotiques.

Tableau II-5 : Description des lignées cellulaires utilisées

Nom	Organe	Origine	Caractéristiques
H295R	Surrénales	Carcinome cortical féminin	Exprime toutes les enzymes de la stéroïdogénèse. Utilisée pour étudier l'effet de xénobiotiques sur la stéroïdogénèse.
HO-23	Ovaires	Cellules de la granulosa immortalisées	Utilisée pour étudier l'effet de xénobiotiques sur la stéroïdogénèse dans les ovaires (Tajima et al., 2002).
HepG2	Hépatocytes	Carcinome hépatocellulaire	Utilisée pour étudier le métabolisme et comme modèle pour les échanges intracellulaires
LS174T	Côlon	Adénocarcinome colorectal	Utilisée pour étudier le métabolisme et l'absorption par les cellules intestinales

Tout les essais ont été effectués en ajoutant aux cellules le BDE-47 ou le BDE-209 à la concentration finale de 1 µM après solubilisation dans du DMSO. Les solutions de BDE radiomarké dans le DMSO ont été préparées à la concentration de 891 Bq/5µL de BDE-209 et 872 Bq/5µL de BDE-47 pour des concentrations dans les incubations de 1,02 et 1,01 µM de BDE-209 et BDE-47 respectivement. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 24 heures dans une étuve à CO₂ à 37°C. Le milieu de culture a été supplémenté de manière adéquate selon

les souches de cellules utilisées, mais ne contenait pas de sérum. Des compositions différentes du milieu de culture ont été utilisées pour les cellules H295R et pour les cellules HO-23.

Les cellules surrénaliennes H295R ont été incubées avec un milieu de culture :

- Conventionnel : Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)
- Contenant de l'adrénocorticotrophine (ACTH)
- Contenant de la forskoline (FSK)
- Contenant de l'ACTH et de l'Insulin-Transferrin-Selenite (ITS), un mélange de nutriments permettant d'accroître la croissance cellulaire.

Les cellules ovariennes HO-23 ont été incubées avec un milieu conventionnel (DMEM) et un milieu contenant de l'ACTH. L'ACTH est connu pour être un régulateur de la synthèse des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse qui sont naturellement localisées dans la zone corticale des surrénales. Sa présence stimule *in vivo* les zones corticales des surrénales (Simpson and Waterman, 1988). Dans les incubations *in vitro* avec les cellules H295R ou HO-23, il devrait donc induire la synthèse de ces enzymes que nous savons influencées par les PBDE (Van der Ven et al., 2008c), et que nous pensons être impliquées dans le métabolisme des PBDE. La forskoline devrait avoir un effet similaire à celui de l'ACTH, car il a été montré qu'elle est notamment capable d'induire certains cytochromes comme le CYP19 dans la lignée cellulaire H295R (Watanabe and Nakajin, 2004).

Après incubation, les échantillons ont été traités de la même façon que pour les hépatocytes humains.

1.2.3 - Etude de métabolisation par des microsomes hépatiques

Des incubations ont également été réalisées avec des microsomes hépatiques humains et de rat. Les microsomes de rat ont été préparés par ultracentrifugation différentielle d'homogénat de foie. Les microsomes hépatiques humains provenaient de chez Tebu (France). Les microsomes sont des fractions subcellulaires riches en enzymes membranaires dont les monooxygénases à cytochromes P450. Pour cette raison, les microsomes sont particulièrement utilisés pour étudier les étapes métaboliques et préciser l'implication des enzymes de phase I. Ces essais ont été réalisés afin de compléter les résultats obtenus avec les incubations sur hépatocytes en culture primaire. Le BDE-47 ou le BDE-209 marqués ont été solubilisés dans 5 µL de DMSO aux concentrations de 842 ou 4312 Bq/5 µL pour le BDE-209 et 917 ou 4400 Bq/5 µL pour le BDE-47. Les concentrations finales dans les incubations étaient alors de 0,96 µM ou 4,94 µM pour le BDE-209 et 1,06 ou 5,11 µM pour le BDE-47. Les incubations ont été réalisées avec 2 mg de protéines microsomales, dans 1 mL de tampon phosphate 0,1M pH7,4 contenant un système

générateur de NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, glucose 6 Phosphate et glucose 6 Phosphate deshydrogénase), fournissant l'énergie nécessaire au fonctionnement des microsomes. Après 2 heures d'incubation sous agitation à 37°C, la réaction a été stoppée par précipitation des protéines par 3 volumes de méthanol à 4°C. La solution a enfin été centrifugée et le surnageant récupéré et conservé à -20°C après comptage de la radioactivité.

1.3 - METHODES D'ANALYSE DE LA RADIOACTIVITE

1.3.1 - Quantification de la radioactivité

Les mesures de la radioactivité contenue dans les échantillons ont été réalisées, après mélange avec du liquide scintillant (Ultima Gold, Perkin Elmer Life Sciences, Courtabœuf, France), par comptage direct dans un compteur à scintillation liquide (Tricarb 2200C Packard, Meriden, Connecticut). Pour les analyses en radio-HPLC, la détection de radioactivité a été effectuée en ligne après la sortie de la colonne HPLC sur un compteur (Flo-one A500 Radiomatic, Perkin Elmer Life Sciences, Courtabœuf, France) par addition de liquide scintillant (Flo-Scint II, Perkin Elmer Life Sciences, Courtabœuf, France). Un détecteur UV peut être installé en ligne pour une double détection en sortie de colonne, qui a été mise en place lorsque cela était nécessaire.

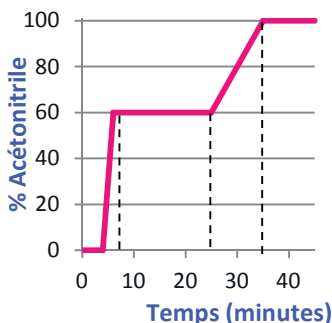
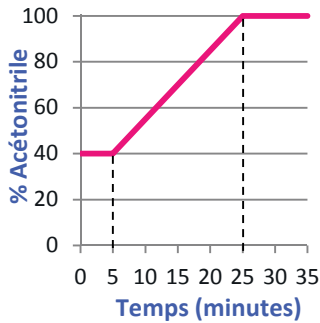
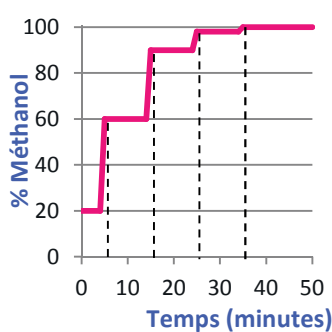
1.3.2 - Préparation des échantillons en vue de l'analyse par HPLC

Comme les étapes de solubilisation, la préparation des échantillons d'incubation des RFB pour leur analyse en radio-HPLC est délicate du fait de leurs propriétés physico-chimiques. Il s'agit en effet d'extraire ces composés et leurs métabolites d'un milieu aqueux où ils sont très peu solubles. L'extraction liquide/liquide est généralement proscrite car il y a un risque de partition du composé parent et de ses métabolites, qui ne peuvent alors pas être injectés ensemble pour générer un profil complet. La stratégie employée a été de précipiter les débris cellulaire et les protéines par trois fois le volume de milieu ou de solution de lyse des cellules, de récupérer le surnageant et de l'évaporer sous azote, à 35°C. La reprise pour injection a été effectuée avec un mélange contenant au moins 50% de solvant organique (MeOH ou ACN), pour assurer la solubilisation des composés parents. Pour le BDE-209 et le BDE-47, il s'est avéré nécessaire d'effectuer la reprise avec quelques μL de toluène, le méthanol n'étant pas efficace, comme le suggèrent les valeurs de solubilité présentées dans le tableau I-6. Le volume d'injection était de 100 μL pour le TBBPA, tandis que pour les PBDE nous avons été contraints d'utiliser une boucle de 500 μL afin d'améliorer la reprise des composés parents.

1.3.3 - Profilage des molécules radio-marquées

Pour les analyses en radio-HPLC, un gradient d'élution différent a été utilisé pour chaque composé parent, comme rapporté dans le tableau II-6. Dans le cas du TBBPA et du BDE209, les gradients utilisés ont été précédemment développés au laboratoire (Zalko et al., 2006; Riu et al., 2008). Celui pour l'analyse du BDE-209 permet la séparation du BDE-209 et du BDE-206 (un nona-BDE métabolite potentiel du BDE-209), particulièrement difficile en HPLC. Pour le BDE-47, nous avons développé un gradient qui favorise la séparation chromatographique d'éventuels métabolites plus polaires, comme les composés hydroxylés.

Tableau II-6 : Méthodes HPLC

	TBBPA	BDE-47	BDE-209																																																				
Colonne	Nucléodur C8 (Macherey 250 x 4mm, 5 µm)	Nucléodur C18 (Macherey 250 x 4 mm, 5 µm)	Nucléodur C18 (Macherey 250 x 4 mm, 5 µm)																																																				
Phases mobiles	A : Eau+acide acétique 0,1%/ACN (95/5, v/v) B : Acétonitrile	A : Tampon acétate 20 mM pH3/ACN (90/10, v/v) B : Acétonitrile	A : Eau B : Méthanol																																																				
Débit	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min																																																				
Four	35 °C	30 °C	35 °C																																																				
Gradient																																																							
	<table><tr><th>Temps gradient 1</th><th>Temps gradient 2</th><th>% ACN</th></tr><tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>4</td><td>4</td><td>0</td></tr><tr><td>6</td><td>6</td><td>60</td></tr><tr><td>30</td><td>25</td><td>60</td></tr><tr><td>50</td><td>35</td><td>100</td></tr><tr><td>64</td><td>45</td><td>100</td></tr></table>	Temps gradient 1	Temps gradient 2	% ACN	0	0	0	4	4	0	6	6	60	30	25	60	50	35	100	64	45	100	<table><tr><th>Temps</th><th>% ACN</th></tr><tr><td>0</td><td>40</td></tr><tr><td>5</td><td>40</td></tr><tr><td>25</td><td>100</td></tr><tr><td>35</td><td>100</td></tr></table>	Temps	% ACN	0	40	5	40	25	100	35	100	<table><tr><th>Temps</th><th>% MeOH</th></tr><tr><td>0</td><td>20</td></tr><tr><td>4</td><td>20</td></tr><tr><td>5</td><td>60</td></tr><tr><td>14</td><td>60</td></tr><tr><td>15</td><td>90</td></tr><tr><td>24</td><td>90</td></tr><tr><td>25</td><td>98</td></tr><tr><td>34</td><td>98</td></tr><tr><td>35</td><td>100</td></tr><tr><td>50</td><td>100</td></tr></table>	Temps	% MeOH	0	20	4	20	5	60	14	60	15	90	24	90	25	98	34	98	35	100	50
Temps gradient 1	Temps gradient 2	% ACN																																																					
0	0	0																																																					
4	4	0																																																					
6	6	60																																																					
30	25	60																																																					
50	35	100																																																					
64	45	100																																																					
Temps	% ACN																																																						
0	40																																																						
5	40																																																						
25	100																																																						
35	100																																																						
Temps	% MeOH																																																						
0	20																																																						
4	20																																																						
5	60																																																						
14	60																																																						
15	90																																																						
24	90																																																						
25	98																																																						
34	98																																																						
35	100																																																						
50	100																																																						

1.4 - METHODES D'IDENTIFICATION DES METABOLITES

1.4.1 - Méthodes appliquées à l'identification des métabolites du TBBPA

1.4.1.1 - Méthodes biochimiques

L'étape suivant le profilage des échantillons de milieu de culture ou de cellules est l'identification des métabolites. L'hydrolyse enzymatique apporte des informations concernant la nature des métabolites conjugués, en complément de l'identification structurale par spectrométrie de masse ou par résonnance magnétique nucléaire (RMN). Cette approche a été utilisée dans le cas des métabolites du TBBPA. Le schéma II-5 présente les méthodes biochimiques appliquées aux échantillons. Les systèmes enzymatiques qui ont été utilisés pour effectuer ces déconjugaisons sont le suc d'*Helix pomatia*, contenant de nombreuses enzymes incluant une activité sulfatase et glucuronidase, la β -glucuronidase de foie bovin et l'aryl sulfatase d'*Aerobacter aerogenes*. Après déconjugaison, la préparation de l'échantillon en vue de l'injection en radio-HPLC est identique à celle précédemment décrite au paragraphe 1.3.2.

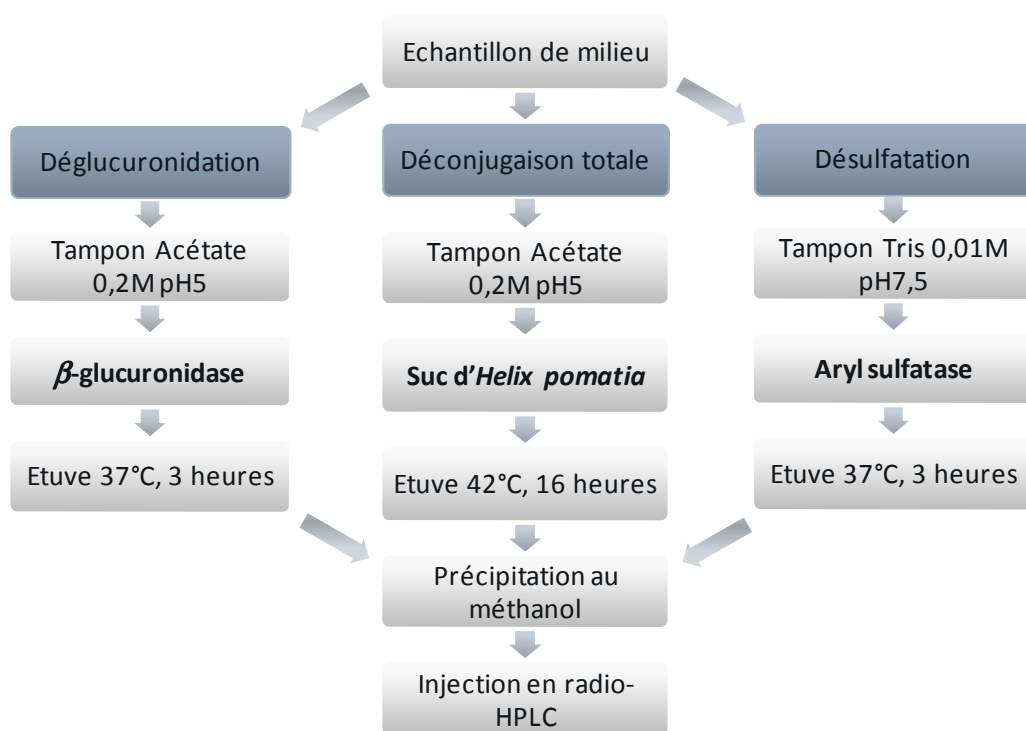


Figure II-5 : Méthodes de déconjugaison

1.4.1.2 - Identification des métabolites par spectrométrie de masse

L'identification structurale des métabolites du TBBPA a également été effectuée par spectrométrie de masse. Les conditions chromatographiques utilisées sont les mêmes qu'en radio-HPLC. Cependant, une colonne différente a été utilisée, de façon notamment à pouvoir

travailler à un débit faible (250 $\mu\text{L}/\text{min}$), plus proche des conditions optimales de fonctionnement de la source d'ionisation par électrospray (ESI). La colonne utilisée a été une colonne Gold C8 100 x 2,1 mm x 1,9 μm (Thermo Fisher Scientific), en appliquant le même gradient qu'en radio-HPLC (tableau II-5), mais à une température de 40°C.

Les injections ont été réalisées en LC-ESI-MS sur un spectromètre de masse à trappe d'ions (LCQ-déca, Thermo Fisher Scientific), ou un spectromètre hybride haute résolution (LTQ-Orbitrap, Thermo Fisher Scientific). Le mode d'ionisation choisi est l'ESI négatif, bien adapté à l'analyse du TBBPA et de ses métabolites, du fait de la polarité de ces composés (Zalko et al., 2006). Les acquisitions LC-MS sur le LCQ ont été effectuées en utilisant le mode « data dependant », alternant l'acquisition d'un spectre complet entre $m/z = 300$ et $m/z = 1200$, puis d'un spectre de fragmentation en MS/MS effectué sur l'ion majoritaire du spectre précédent. Sur le LTQ-Orbitrap, les injections ont été effectuées en spectre complet entre $m/z = 200$ et $m/z = 1200$, à un pouvoir de résolution de 60,000. Les échantillons injectés étaient des surnageants d'incubations, dont certains ayant subi une déconjugaison enzymatique, qui ont été préparés selon le protocole décrit précédemment au paragraphe 1.3.2. Les échantillons ainsi préparés ont été injectés soit directement, soit après collecte des fractions correspondant aux différents métabolites repérés sur les radio-chromatogrammes.

1.4.2 - Identification des métabolites des PBDE par LC-APPI-HRMS

Pour les expériences réalisées sur les PBDE, compte tenu des quantités disponibles limitées en termes de radioactivité, les expériences de déconjugaisons enzymatiques n'ont pas été envisagées et l'identification des métabolites a été réalisée uniquement par spectrométrie de masse. De plus, dans le cas des PBDE, les métabolites conjugués n'étaient pas les plus probables, puisque seule une équipe a relaté à ce jour la formation de métabolites conjugués à partir de PBDE (Chen et al., 2006; Sanders et al., 2006). Ceci a contribué à orienter notre développement méthodologique vers une méthode privilégiant l'identification des métabolites hydroxylés.

L'analyse des PBDE et de leurs métabolites hydroxylés est, comme ceci a été vu dans le premier chapitre, généralement réalisée en GC-MS séparément pour les deux familles de composés. Nous avons quant à nous cherché dans ce travail à développer une méthode pour l'analyse simultanée des PBDE et des OH-PBDE, en tirant parti de l'expérience du laboratoire dans le domaine de l'analyse des PBDE par LC-APPI-MS. Le détail des travaux de développement de la méthode d'identification des métabolites est présenté ici.

1.4.2.1 - Principe de l'APPI

L'APPI comme source d'ionisation en LC-MS a été introduite en 2000 (Robb et al., 2000). Elle a été appliquée pour la première fois à l'analyse des PBDE en 2005 (Debrauwer et al., 2005; Riu et al., 2006). Ces travaux initiés par le laboratoire de Toulouse ont été prolongés dans le cadre de cette thèse, afin de développer et de mettre au point une méthode pour l'analyse simultanée des PBDE et de leurs métabolites hydroxylés. Cette méthode a fait l'objet d'un développement approfondi, d'une part car l'ionisation APPI fait intervenir de nombreux phénomènes (échange de proton, transfert de charge, etc.) pas toujours bien compris et difficiles à anticiper, et d'autre part car l'utilisation de l'APPI pour l'analyse LC-MS des PBDE hydroxylés n'avait jamais été explorée. Nous avons donc cherché à évaluer le potentiel de cette technique afin de l'exploiter au mieux pour l'identification des métabolites.

La source d'ionisation par APPI et son principe de fonctionnement sont présentés en figure II-6. Cette technique est particulièrement adaptée aux PBDE, qui sont des composés apolaires et de poids moléculaire faible ou moyen.

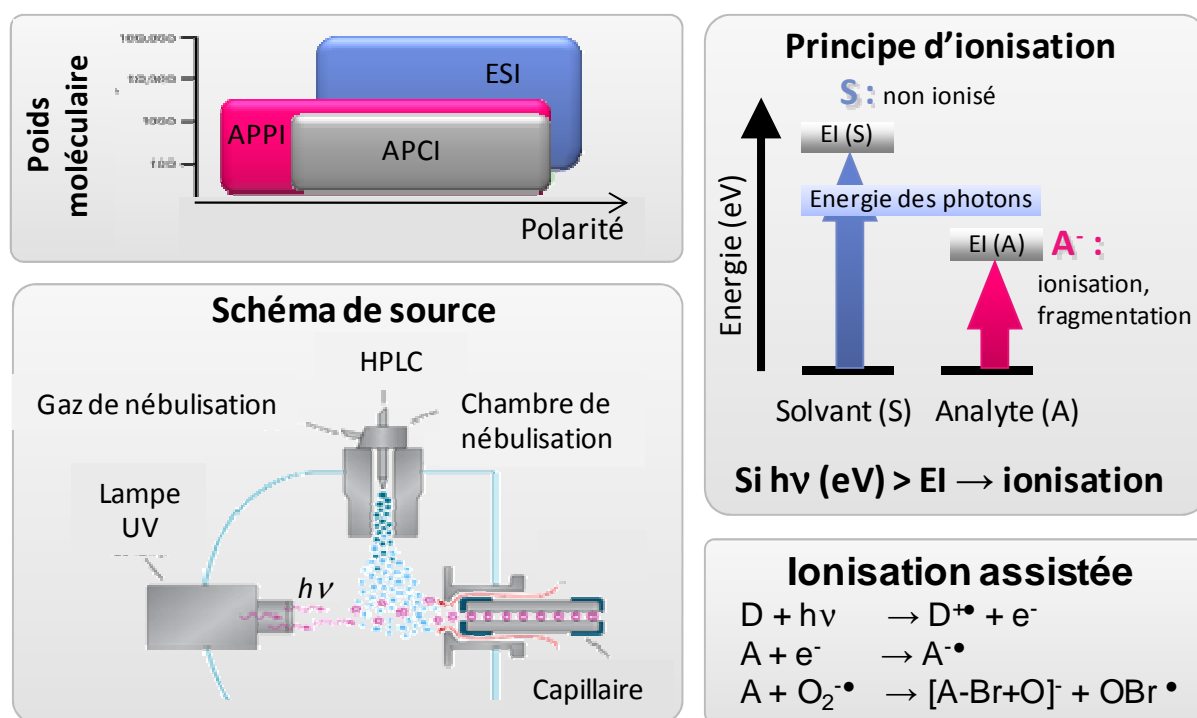


Figure II-6 : Représentation schématique d'une source d'ionisation par photoionisation (APPI) et du principe de fonctionnement associé.

En APPI, les analytes sont ionisés par des photons émis par une lampe à décharge avant d'être focalisés et dirigés vers l'analyseur. L'ionisation est directe pour les composés dont l'énergie d'ionisation (EI) est inférieure celle des photons. Les lampes généralement utilisées, et notamment dans notre cas, sont des lampes à Krypton émettant des photons à 10,0 eV et 10,6 eV

dans un rapport 4:1. Le choix de cette lampe permet d'éviter l'ionisation des solvants (S) généralement utilisés en LC tels que le méthanol (EI=10,84 eV), l'acétonitrile (EI=12,20 eV) ou l'eau (EI=12,62 eV). Cependant, certains analytes (A) présentent eux aussi une énergie d'ionisation supérieure à 10 eV. Il faut alors travailler en ionisation assistée, c'est-à-dire en utilisant un solvant, appelé dopant (D), qui puisse être ionisé directement par les photons, et qui interagisse ensuite avec les analytes pour les ioniser. Quelques exemples de réactions majeures ayant lieu en mode d'ionisation négatif sont présentées en figure II-6. L'ionisation en APPI reste toutefois un processus complexe et de nombreuses réactions peuvent avoir lieu, dépendantes des conditions chimiques mais aussi physiques. Par exemple, la configuration géométrique de la source peut avoir une influence importante dans l'ionisation APPI et donc sur la nature des ions produits (Bagag, 2008; Marchi et al., 2009).

1.4.2.2 - Etude du comportement des analytes en APPI

1.4.2.2.1 - Les PBDE

Le développement de notre méthode a été réalisé à partir d'un mélange de standards commerciaux de tétra- à déca-BDE présenté dans le tableau II-7. Il s'agit des tétra- à hepta-BDE les plus souvent retrouvés dans l'environnement, de trois octa-BDE, ainsi que des trois nona-BDE et du déca-BDE.

Tableau II-7 : PBDE inclus dans la méthode

Nombre de brome	Congénères sélectionnés
Tetra-BDE	BDE-47
Penta-BDEs	BDE-99 et BDE-100
Hexa-BDEs	BDE-153 et BDE-154
Hepta-BDEs	BDE-183 et BDE-184
Octa-BDEs	BDE-201, BDE-202 et BDE-204
Nona-BDEs	BDE-206, BDE-207 et BDE-208
Deca-BDE	BDE-209

L'ionisation APPI des PBDE peut conduire à la formation de plusieurs types d'ions. La formation d'ions phénoxydes $[M-Br+O]^-$ a été rapportée par tous les auteurs, comme étant les ions majoritaires pour la plupart des PBDE. Nous avons toutefois remarqué que ceci pouvait dépendre de la source utilisée. En effet, nous avons eu l'occasion de travailler avec trois sources APPI de configurations différentes, et avons observées des différences d'ionisation. Avec deux de ces sources la formation d'ions phénoxydes a été observée de façon majoritaire, alors qu'avec la troisième, utilisée pour les identifications de métabolites, les ions majoritairement formés correspondaient à des espèces $[M-Br]^-$, notamment pour les hepta- à déca-BDE, comme

l'indiquent les spectres de la figure II-7 où un ion $[M-Br+O]^-$ est visible de façon minoritaire seulement sur le spectre du BDE-184.

Ces spectres indiquent aussi la présence d'ions bromophénolates $[C_6Br_xO_{5-x}]^-$, issus du clivage de la fonction éther des PBDE, qui encore une fois ne sont pas observés de manière similaire avec toutes les sources. D'après les travaux déjà publiés dans le domaine, la formation de ces ions est observée de façon majoritaire seulement pour les nona- et déca-BDE alors qu'ils sont absents pour les autres PBDE. Comme l'indique la figure II-7, ces ions ont été observés de façon majoritaire pour la plupart des congénères, y compris les plus faiblement bromés.

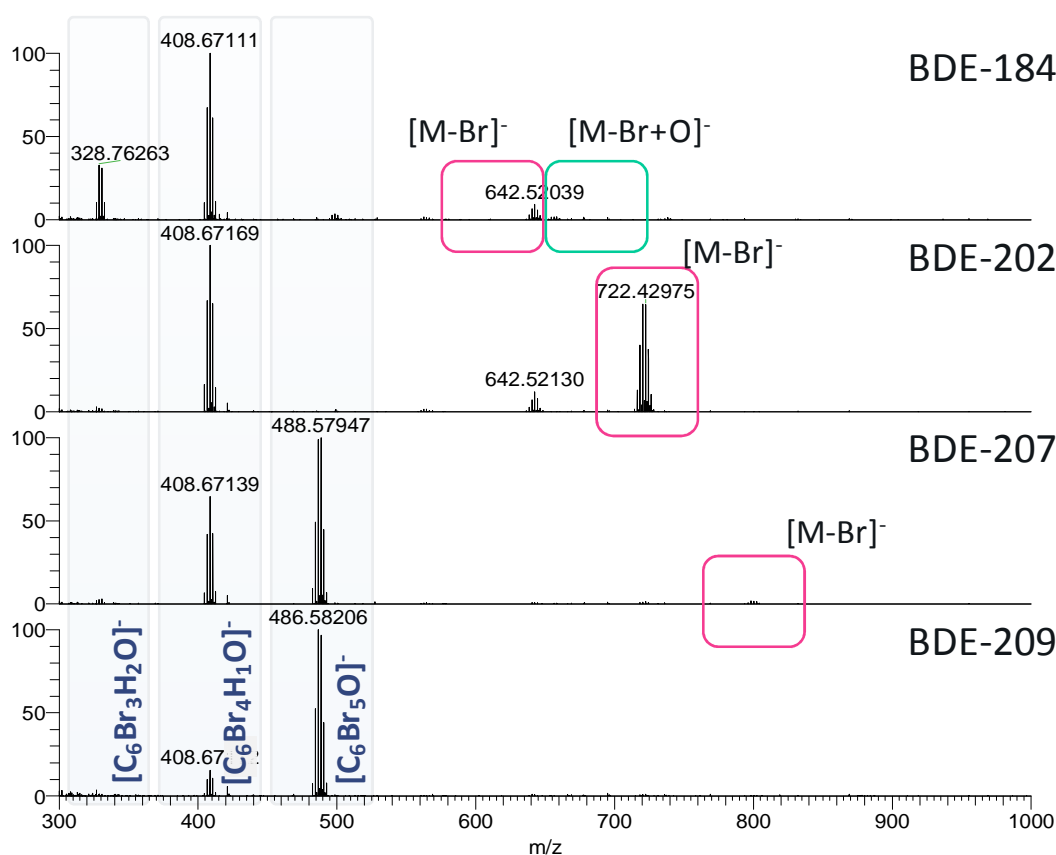


Figure II-7 : Spectres de masse APPI obtenus par injection de 1 ng de PBDE sur le LTQ-Orbitrap

1.4.2.2.2 - Les OH-PBDE

Comme évoqué précédemment, nous avons cherché à développer une méthode basée sur le couplage LC-APPI-MS pour pouvoir analyser simultanément les PBDE et les PBDE hydroxylés. Après avoir réévalué le comportement des PBDE en APPI avec une configuration de source différente de celle utilisée lors de précédents travaux au laboratoire (Riu et al., 2006), nous avons étudié le comportement des OH-PBDE. Pour cela nous nous sommes basés sur une série de composés standards commercialement disponibles, présentés dans le tableau II-8. Il s'agit de composés tétra- à octa-bromés, dont les 3 congénères possibles de BDE-47 hydroxylé.

Tableau II-8 : PBDE hydroxylés inclus dans la méthode

Nombre de brome	Congénères sélectionnés
Tetra-BDE hydroxylés	3-OH-BDE-47, 5-OH-BDE-47, 6-OH-BDE-47 et 4'-OH-BDE-49
Penta-BDEs hydroxylés	5'-OH-BDE-99 et 3-OH-BDE-100
Hexa-BDEs hydroxylés	3'-OH-BDE-154
Hepta-BDEs hydroxylés	6-OH-BDE-180, 4-OH-BDE-187 et 4-OH-BDE-188
Octa-BDEs hydroxylés	4'-OH-BDE-201

Les résultats obtenus montrent que le comportement des OH-PBDE vis-à-vis de l'ionisation APPI est différent de celui des PBDE puisque ni les ions phénoxydes ni les ions bromophénolates ne sont observés. Le massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$ est quant à lui toujours observé, tandis que les autres ions formés sont issus de processus de débromation. Selon les composés, l'ion quasi-moléculaire peut être majoritaire, comme par exemple pour le 6-OH-BDE-180, mais le plus souvent le pic de base correspond à un ion issu d'une débromation, comme le montre la figure II-8.

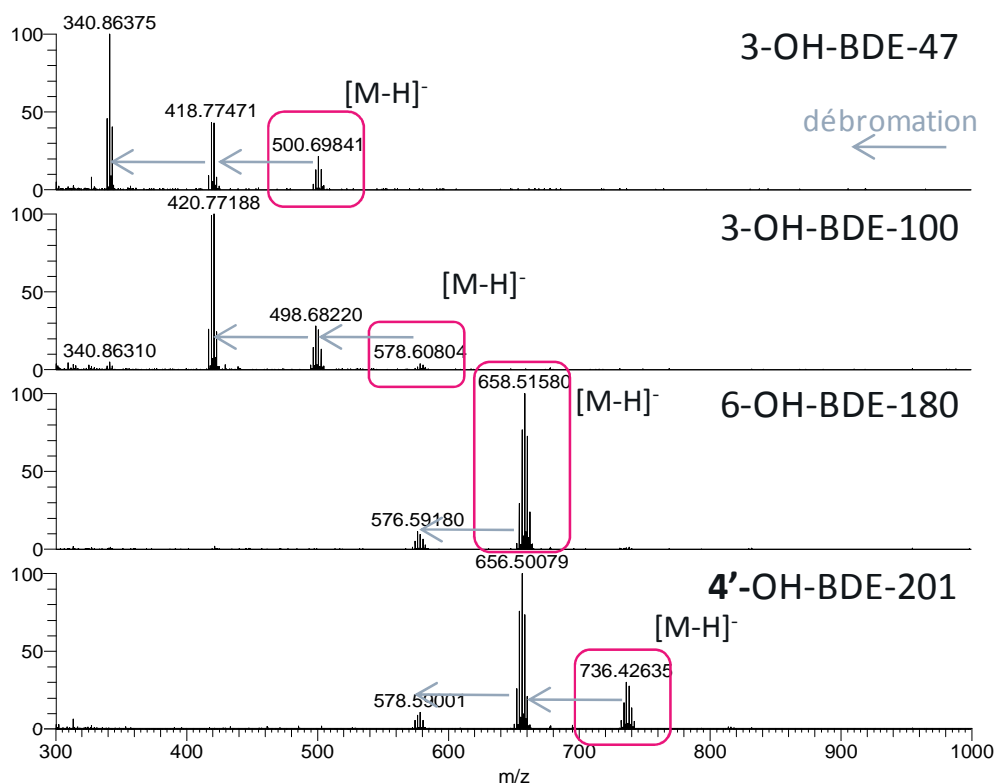


Figure II-8 : Spectres de masses de 4 OH-PBDE obtenus par injection de 1 ng sur colonne sur le LTQ-Orbitrap

La position du groupement hydroxyle a une influence importante sur le comportement des OH-PBDE en APPI, comme ceci est illustré par les spectres des quatre tétra-BDE hydroxylés à notre disposition présentés sur la figure II-9. En effet, si l'ion $[M-H]^-$ est présent dans tous les cas,

certaines congénères (6-OH-BDE-47 ou 4'-OH-BDE-49 par exemple) présentent des ions issus de débromation par perte d'un atome de brome, alors que des débromations par perte d'HBr à partir de l'ion $[M-H]^-$, sont observées pour d'autres congénères isomères comme le 3-OH-BDE-47 ou le 5-OH-BDE-47.

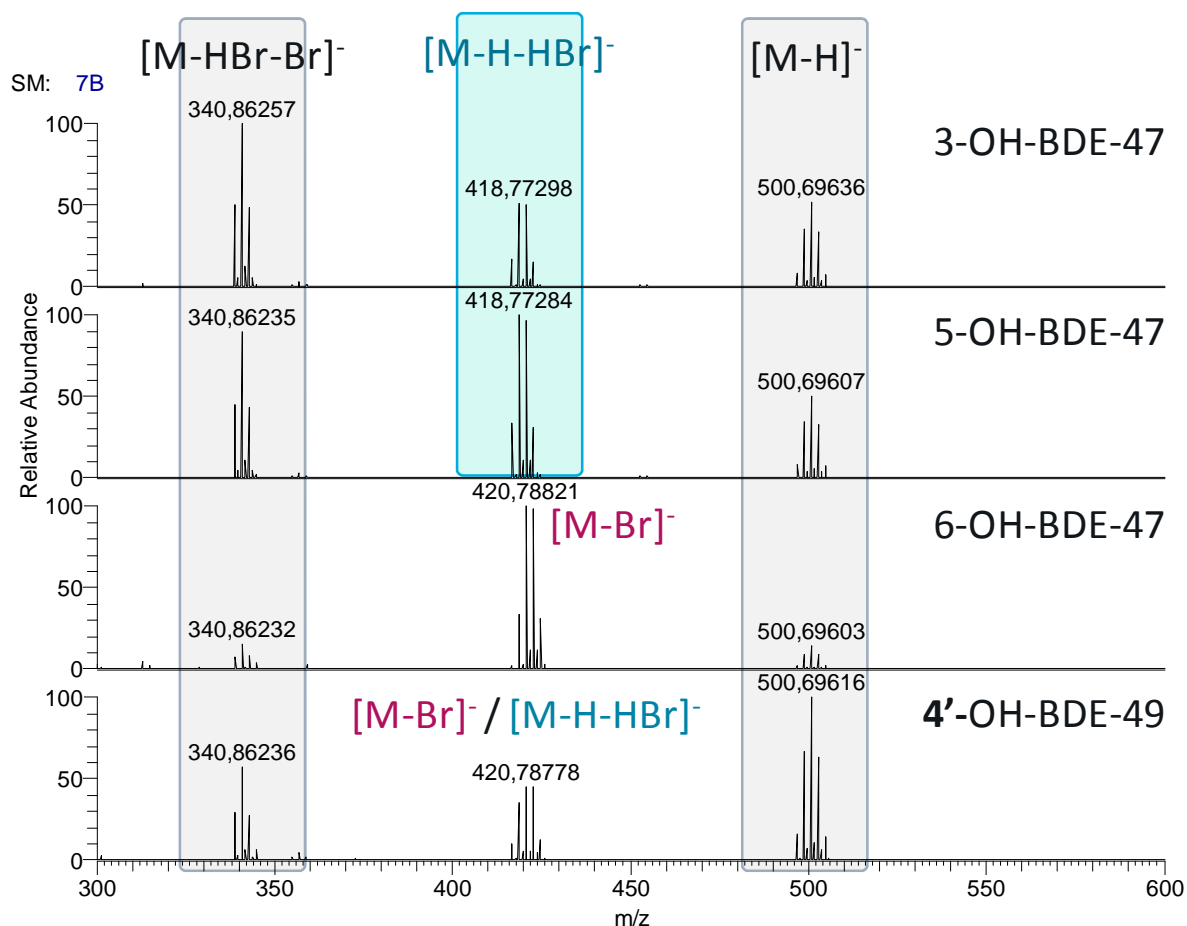


Figure II-9 : Spectres de masses de 4 tétra-BDE hydroxylés obtenus par injection de 1 ng sur colonne sur le LTQ-Orbitrap

Ces schémas d'ionisation différents rendent l'interprétation des spectres observés complexe mais ils constituent aussi un atout pour l'identification des différents congénères, notamment en cas de coélution chromatographique, grâce à la présence d'ions spécifiques à certains composés et au rapport des intensités entre les différents ions produits. Cependant, en raison de la multiplicité des isotopomères de ces composés polybromés, l'utilisation de la haute résolution est indispensable pour différencier par exemple les ions $[M-Br]^-$ et $[M-H-HBr]^-$ dont la formule brute diffère de deux hydrogènes. Le cas est identique pour des ions $[M-H]^-$ d'un BDE-hydroxylé et les ions $[M-H-HBr]^-$ des BDE-hydroxylés comportant un atome de brome supplémentaire. En effet, bien que ces ions présentent des pics monoisotopiques à des rapports m/z différents, la séparation de leurs isotopomères respectifs nécessite l'utilisation de la haute

résolution, comme le montre la figure II-10 à titre d'illustration. Les zooms, sur la gauche, sur les massifs isotopiques de l'ion $[M-H]^-$ d'un OH-tétra-BDE et de l'ion $[M-H-HBr]^-$ d'un OH-penta-BDE montrent une différence de 2 unités de masse environ entre les deux espèces mono-isotopiques. Sur la droite, un zoom sur les ions de $m/z = 498,7$ d'un OH-tétra-BDE et d'un OH-penta-BDE coélués indiquent que le pouvoir de résolution doit être au minimum de 60,000 pour différencier l'ion de $m/z = 498,680$ du penta-BDE de l'ion de $m/z = 498,697$ du penta-BDE. Cette différenciation est possible grâce au défaut de masse des atomes d'hydrogène, dont la masse est de 1,00794 u.m.a., et à la différence de défaut de masse entre les isotopes 79 et 81 du brome qui est de 0,00206 u.m.a., ce qui fait une différence de défaut de masse théorique de 0,01794 u.m.a. entre les deux ions de la figure II-10, cohérente avec le défaut de masse de 0,017 que nous avons observé expérimentalement.

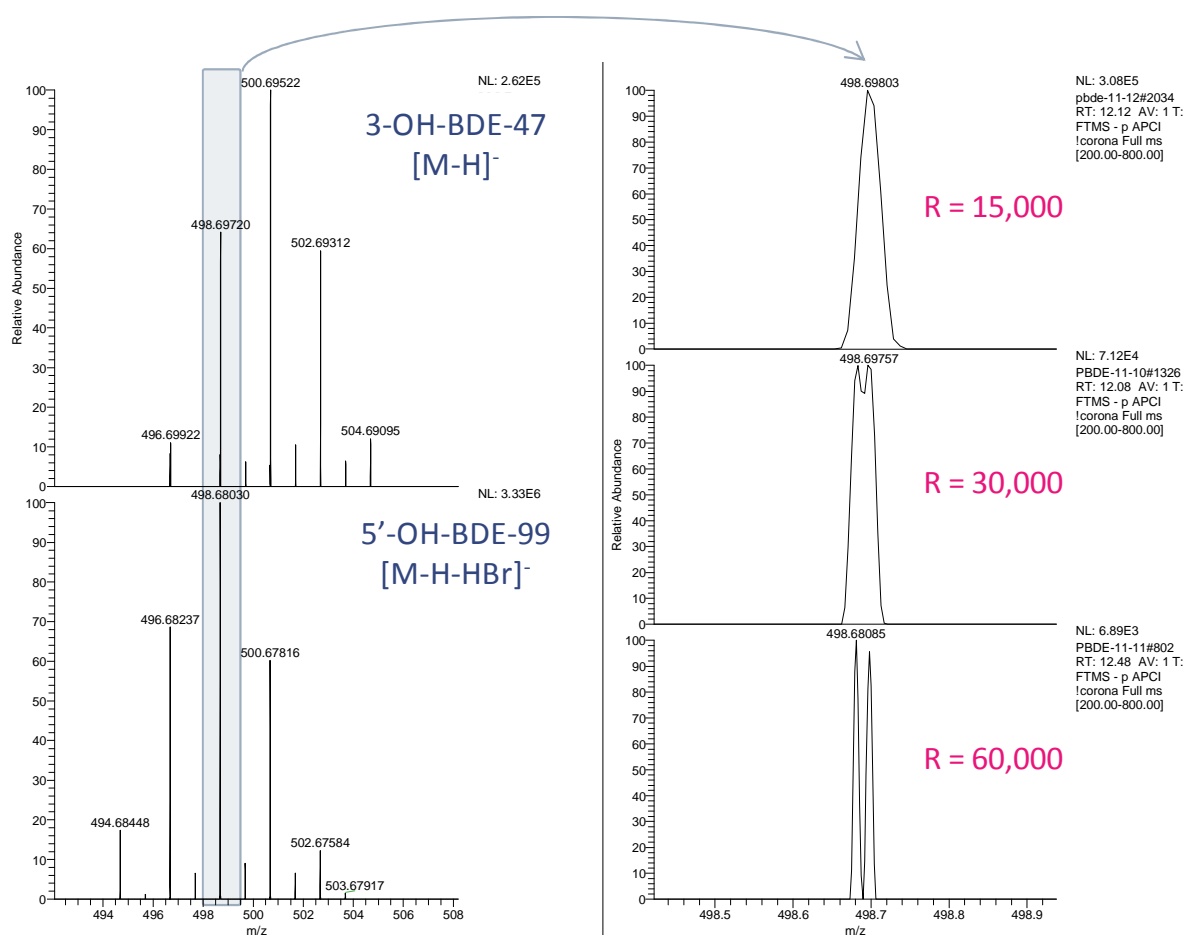


Figure II-10 : Zoom sur le massif isotopique des fragments $[M-H]^-$ d'un tétra-BDE-OH et $[M-H-HBr]^-$ d'un penta-BDE-OH ($R=60.000$). Zoom sur l'ion 498,7 d'un tétra- et d'un penta-BDE-OH coélués, à différentes résolutions

1.4.2.2.3 - Les autres métabolites potentiels

Notre objectif principal était de développer une méthode LC-APPI-MS pour l'analyse simultanée des PBDE et de leurs dérivés hydroxylés. Cependant, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la formation d'autres métabolites comme les bromophénols ou les méthoxy-PBDE, était également envisageable, et nous nous sommes donc intéressés à la possibilité d'ioniser ces autres métabolites des PBDE en APPI. Ceci a été fait à partir de composés synthétisés au laboratoire, à savoir des BDE-47 méthoxylés et un mélange de synthèse de PBDE hydroxylés contenant des bromophénols en tant que produits secondaires de la réaction. Ces composés n'ont toutefois pas été inclus dans la méthode finale pour les raisons évoquées au chapitre 1.

Ces deux familles de composés sont effectivement ionisées en APPI. Les bromophénols produisent des ions de type $[M-H]^-$ et $[M-Br]^-$, correspondant aux mêmes ions que les ions bromophénolates formés par rupture de la liaison éther des PBDE. L'ionisation par APPI des MeO-PBDE est quant à elle complexe, et de nombreuses espèces sont observées sur les spectres, issues notamment de débromations simples, de pertes de HBr, mais aussi de la perte du groupement méthyle ou encore de l'oxydation du composé.

1.4.2.3 - Paramètres influençant l'ionisation des PBDE

Afin d'optimiser les paramètres de fonctionnement de l'instrument, l'impact de certains facteurs sur l'ionisation des analytes a été évalué. Les paramètres étudiés sont la nature et le pourcentage de dopant, ainsi que les températures du dispositif de nébulisation et du capillaire de transfert chauffé. L'effet du débit de phase mobile a également été étudié, et les résultats montrent qu'il a un effet mineur sur l'intensité des ions diagnostiques. Il a donc été fixé à partir du système chromatographique (diamètre et granulométrie de colonne) utilisé. Pour des raisons de disponibilité des instruments, les étapes d'optimisation de ces différents paramètres ont été réalisées sur un triple quadrupôle (TSQ Quantum, Thermo Fisher Scientific) avec une source APPI Ion Max. L'ensemble des résultats a ensuite été confirmé sur le LTQ-Orbitrap, équipé de la même source d'ionisation.

1.4.2.3.1 - Le dopant

La lampe utilisée est une lampe à Krypton émettant des photons de 10 eV (voir paragraphe 1.4.2.1.). Les PBDE étant en général analysés par ionisation assistée, les performances de trois dopants ont été testées : l'acétone (EI = 9,70 eV), le toluène (EI = 8,83 eV) et l'anisole (EI = 8,20 eV). Les essais ont été réalisés par injection directe (FIA) de 10 ng d'un mélange d'hexa- à déca-BDE, avec un débit de phase mobile (eau/méthanol, 20/80, v/v) de 200 μ L/min, et un débit

de dopant ajouté avec un pousse-seringue variant de 1 à 15%. Pour chaque condition testée, 5 injections successives ont été réalisées. La figure II-11 montre la moyenne des abondances des ions diagnostiques des différents PBDE en fonction de conditions de dopant.

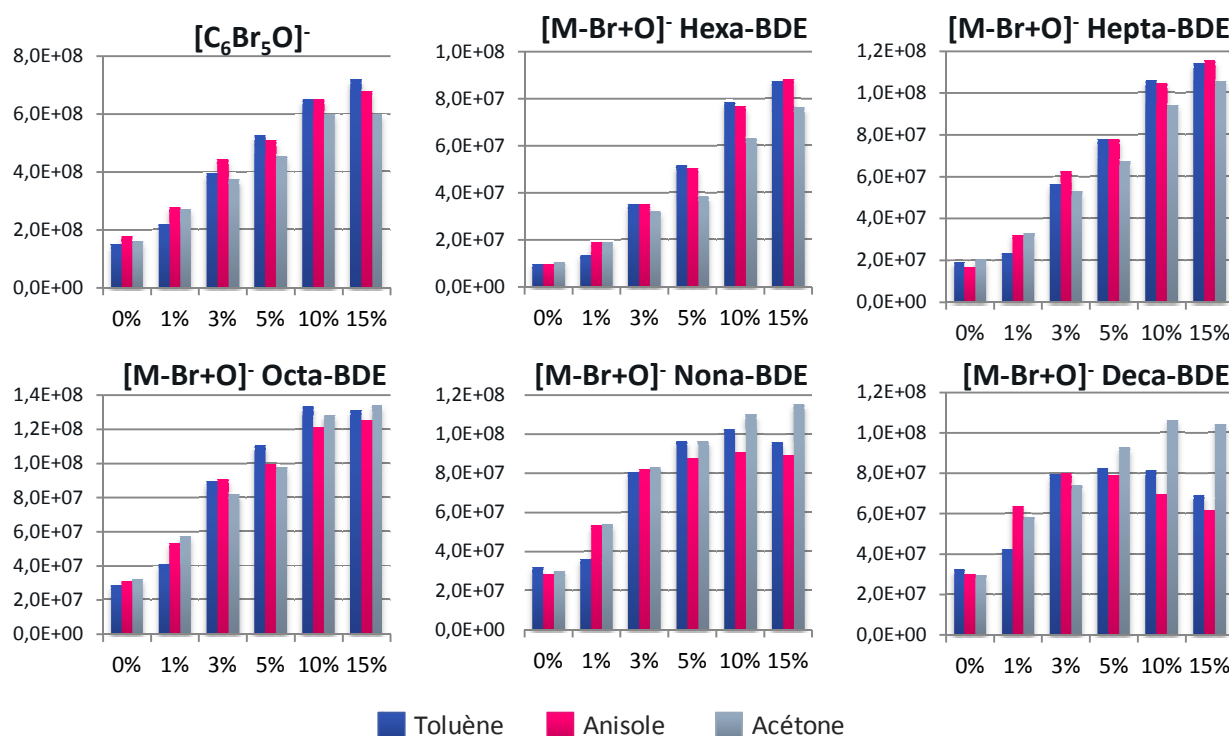


Figure II-11 : Abondance des ions diagnostiques des PBDE en fonction du pourcentage de dopant utilisé

Ces résultats montrent que l'ajout de dopant favorise l'ionisation des analytes, même si le gain semble moins important pour les ions hautement bromés. Les trois dopants ont un impact similaire, mais l'utilisation de l'acétone semble plus efficace pour ioniser les composés hautement bromés. Ces résultats ont été obtenus en utilisant une source de configuration orthogonale aimablement prêtée par le Prof J.C. Tabet (Université P. M. Curie, Paris VI), et ont été confirmés sur la source IonMax, utilisée lors de l'application de la méthode, par la suite. Ceci montre que l'influence de la nature et du pourcentage de dopant est similaire pour les différentes configurations de source utilisées.

Parmi les trois dopants étudiés, l'acétone présente l'avantage d'être hydrosoluble et peut donc être facilement ajouté aux phases mobiles aqueuses que nous utilisons, à savoir l'eau et le méthanol. En effet nous avons constaté que l'addition du dopant directement dans la phase mobile induisait une meilleure efficacité d'ionisation qu'un ajout post-colonne, probablement en raison d'une proximité plus importante du dopant et des analytes. A l'issue de ces essais, nous avons retenu comme dopant l'acétone, additionnée à raison de 10% dans les phases mobiles.

1.4.2.3.2 - La température

Deux températures peuvent avoir une influence sur les spectres obtenus : la température de nébulisation et la température du capillaire de transfert des ions de la zone à pression atmosphérique vers le vide de l'analyseur. L'influence de ces deux températures a donc été testée, de façon à maîtriser ce paramètre pour des composés thermosensibles comme les PBDE. Pour chaque condition, 5 injections d'un mélange de PBDE à la concentration de 50 pg/μL ont été effectuées. Le signal de chaque ion diagnostique a ensuite été extrait, et la moyenne des 5 injections calculée pour construire la figure II-12, qui représente l'abondance de différents ions diagnostiques (essentiellement des ions $[M-Br]^-$ et non $[M-Br+O]^-$) en fonction de la température de nébulisation pour les 4 températures de capillaire testées.

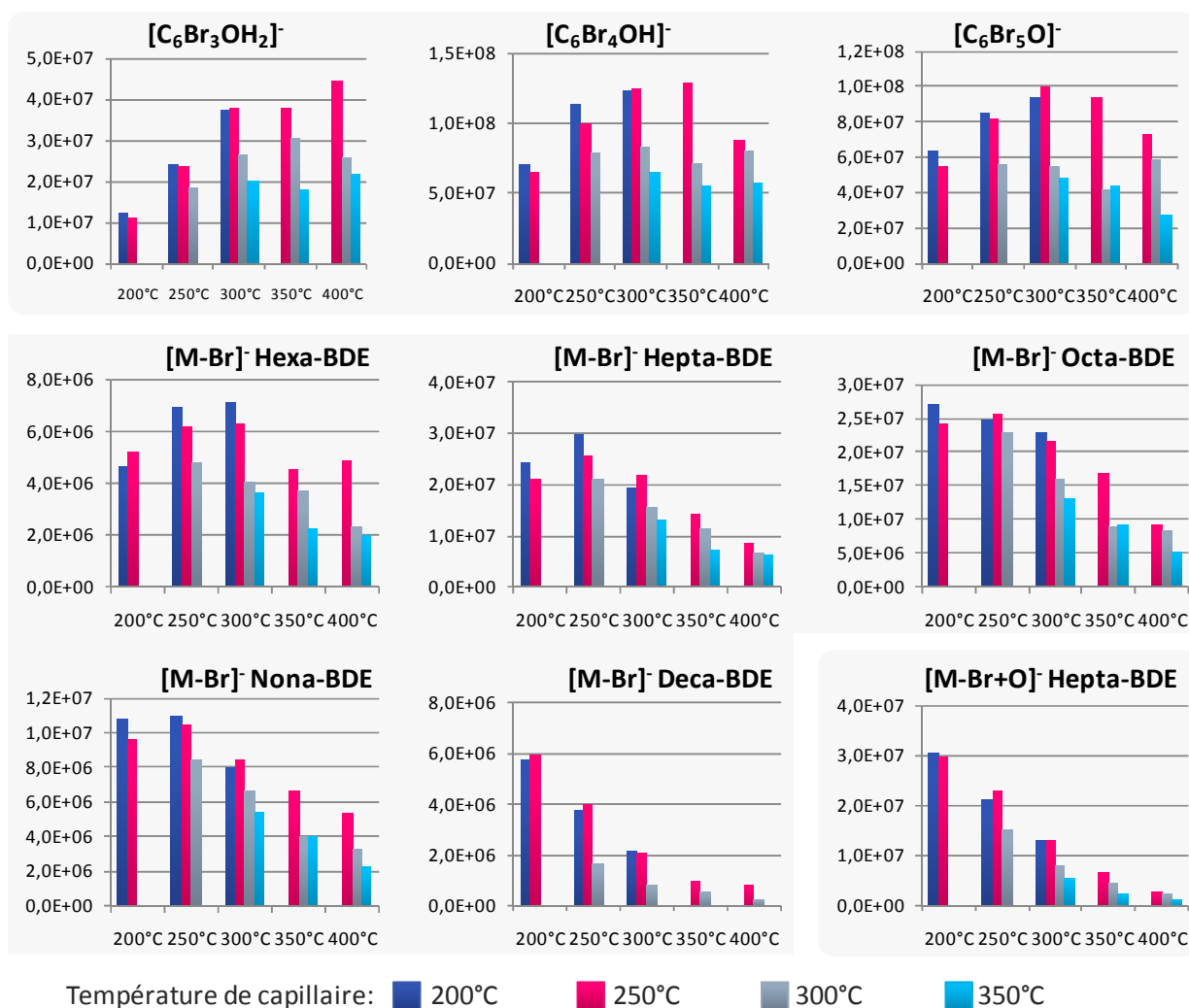


Figure II-12 : Abondance des ions diagnostiques des PBDE en fonction de la température de nébulisation et de la température de capillaire

Comme l'indique la figure II-12, la température de capillaire de transfert a une influence sur l'abondance des ions et doit être maintenue basse, aux alentours de 200 ou 250°C. La

température de nébulisation a quant à elle un effet sur la nature des ions formés, puisque son augmentation favorise la formation des ions bromophénolates issus de la fragmentation des composés au dépend des ions $[M-Br]^-$ et $[M-Br+O]^-$. L'effet de la température est d'autant plus important que le degré de bromation des composés est élevé, ce qui est en accord avec les résultats observés lors de l'analyse par GC-MS des PBDE, qui indique que les composés hautement bromés sont les plus sensibles aux températures élevées.

Des essais similaires ont été réalisés sur les OH-PBDE. Pour ces composés, l'effet de la température sur les ions formés est apparu moins marqué que pour les PBDE. Au vu de l'ensemble de ces résultats, les températures de fonctionnement choisies sont donc 250°C pour la température du capillaire de transfert et 300°C pour la température de nébulisation, en prenant le parti de maximiser la sensibilité en favorisant la formation des ions bromophénolates majoritaires qui seront alors utilisés comme ions diagnostiques pour la recherche des PBDE.

1.4.2.4 - Séparation chromatographique

Deux types de colonnes ont été testés, portant soit un greffage par une chaîne octadécyle (C_{18}), soit un greffage de type PentaFluoroPhenyl (PFP : C_6F_5). Les colonnes C_{18} sont les plus communément utilisées, elles font principalement intervenir des interactions du type Van Der Walls, et liaisons hydrogènes. Les colonnes PFP ont été récemment développées afin d'offrir une alternative aux colonnes C_{18} , et sont notamment bien adaptés à la séparation de composés halogénés. La présence de greffons fluorés permet en effet d'apporter d'autres facteurs de sélectivité par des interactions de type dipôles-dipôles, π - π , ou par transfert de charges.

Au total, quatre colonnes ont été testées :

- Hypersil Gold C_{18} 100 x 2,1 mm x 1,9 μ m (Thermo Fisher Scientific)
- Kinetex C_{18} 150 x 2,1 mm x 2,6 μ m (Phenomenex)
- Hypersil Gold PFP 150 x 2,1 mm x 1,9 μ m (Thermo Fisher Scientific)
- Hypersil Gold PFP 100 x 2,1 mm x 1,9 μ m (Thermo Fisher Scientific)

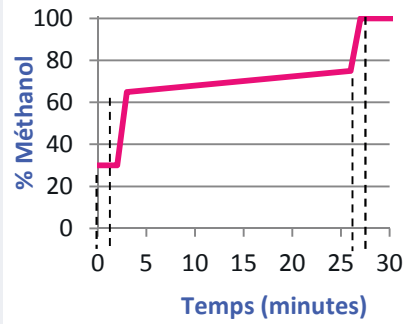
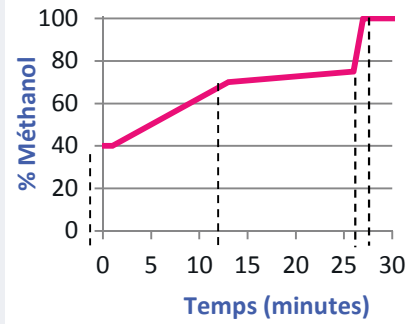
Les phases mobiles utilisées sont des mélanges eau/méthanol avec 10 % d'acétone. Les objectifs du développement étaient de bâtir un gradient d'élution avec lequel la séparation des 3 isomères nona-BDE et du déca-BDE soit totale, ainsi que la séparation des PBDE et des OH-PBDE en fonction de leur nombre de brome.

L'utilisation des colonnes C_{18} a été rapidement abandonnées car nous n'avons jamais pu obtenir sur ce type de support une séparation correcte des trois nona-BDE dans un temps raisonnable, en raison de la forte rétention de ces composés nécessitant un pourcentage de méthanol très élevé

pour être élués. De plus, nous avons constaté que la présence d'acétone dans la phase mobile était néfaste à la résolution des pics correspondant aux OH-PBDE.

Au vu de la complexité de séparation des PBDE sur colonne C18, nous nous sommes initialement orientés vers une colonne PFP de 150 mm de longueur, mais il s'est avéré ultérieurement qu'une colonne de 100 mm était suffisante. Par rapport aux colonnes C₁₈, ce type de colonne fournit une rétention plus faible mais plus sélective pour les PBDE et les PBDE hydroxylés. Notamment il est possible de séparer efficacement les nona-BDE et le déca-BDE en un temps d'analyse raisonnable. Après optimisation, le gradient présenté dans le tableau II-9 a été sélectionné, offrant un bon compromis entre une séparation satisfaisante et un temps d'analyse limité.

Tableau II-9 : Méthodes de séparation chromatographique par HPLC

	TBBPA	PBDE																																				
Débit	200 µL/min	250 µL/min																																				
Phases mobiles	A : Eau/MeOH/Aco 80/10/10 B : MeOH/Aco 90/10	A : Eau/MeOH/Aco 80/10/10 B : MeOH/Aco 90/10																																				
Four	40 °C	40 °C																																				
Gradient	 <table><thead><tr><th>Temps</th><th>% B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>30</td></tr><tr><td>2</td><td>30</td></tr><tr><td>3</td><td>65</td></tr><tr><td>26</td><td>75</td></tr><tr><td>27</td><td>100</td></tr><tr><td>32</td><td>100</td></tr><tr><td>35</td><td>30</td></tr><tr><td>40</td><td>30</td></tr></tbody></table>	Temps	% B	0	30	2	30	3	65	26	75	27	100	32	100	35	30	40	30	 <table><thead><tr><th>Temps</th><th>% B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>40</td></tr><tr><td>1</td><td>40</td></tr><tr><td>13</td><td>70</td></tr><tr><td>26</td><td>75</td></tr><tr><td>27</td><td>100</td></tr><tr><td>32</td><td>100</td></tr><tr><td>35</td><td>40</td></tr><tr><td>40</td><td>40</td></tr></tbody></table>	Temps	% B	0	40	1	40	13	70	26	75	27	100	32	100	35	40	40	40
	Temps	% B																																				
0	30																																					
2	30																																					
3	65																																					
26	75																																					
27	100																																					
32	100																																					
35	30																																					
40	30																																					
Temps	% B																																					
0	40																																					
1	40																																					
13	70																																					
26	75																																					
27	100																																					
32	100																																					
35	40																																					
40	40																																					

La figure II-13 montre la séparation obtenue à partir d'un mélange de 13 PBDE et 8 OH-PBDE. Comme l'indique cette figure, une séparation satisfaisante peut être obtenue en un peu plus de vingt minutes. En raison de la présence de plusieurs ions fragments sur leur spectre APPI, la plupart des composés répondent sur plusieurs canaux de détection d'ions diagnostiques sélectionnés en HRMS. Nos objectifs de résolution sont atteints pour les nona- et déca-BDE, puisqu'ils sont correctement séparés avec le gradient développé. Cependant, certains problèmes de coélution n'ont pu être résolus pour le mélange étudié. Ainsi, le BDE-183, non inclus dans le

mélange présenté sur la figure II-13, est coélué avec le BDE-153 et le BDE-184. Le 5-OH-BDE-47, non présent dans le mélange de la figure II-13, est élué entre le 6-OH-BDE-47 et le 4'-OH-BDE-49, et est donc partiellement coélué avec ces deux composés qui eux sont correctement séparés comme le montre la figure. Cependant, des ions diagnostiques différents peuvent être utilisés afin de les différencier. D'autres coélutions souvent partielles, sont observées, mais elles sont moins problématiques car l'identification des pics est possible grâce à l'analyse des spectres haute résolution. Par exemple, les deux composés élués sous le pic c de la figure II-13 peuvent être différenciés par la présence spécifique de l'ion $[M-Br-HBr]^-$ de $m/z = 340,862$ pour le 4'-OH-BDE-49 et la présence de l'ion $[M-H]^-$ de $m/z = 578,606$ pour le 3-OH-BDE-100. En cas de coélution de BDE hydroxylés comportant le même nombre de brome, il faut alors effectuer une analyse détaillée du spectre de masse.

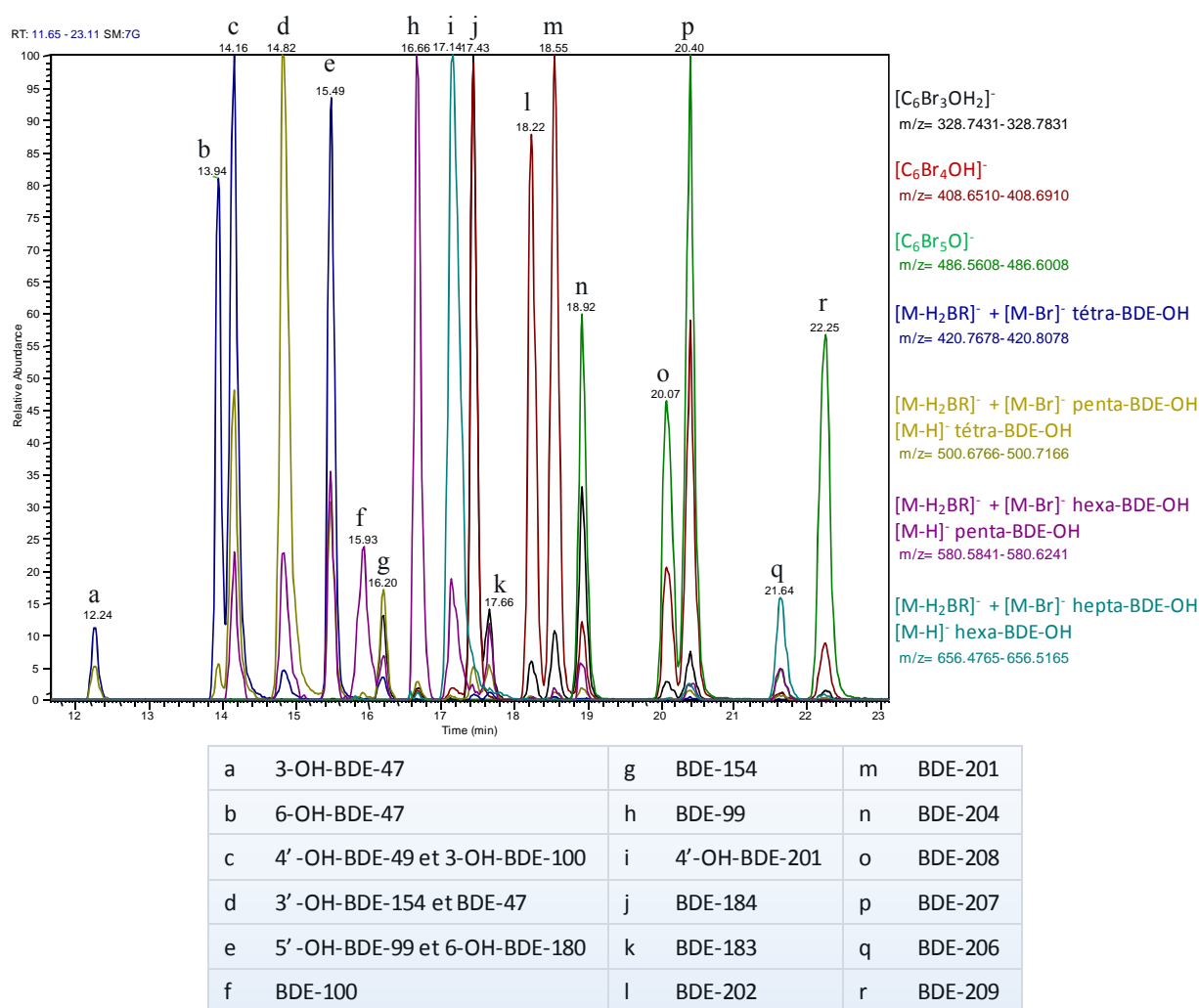


Figure II-13: Chromatogrammes obtenus en HRMS pour l'injection de 2,5 μ L d'un mélange d'OH-PBDE à 100 pg/ μ L sur colonne PFP 100 mm

1.4.2.5 - Performances de la méthode développée

En parallèle de la méthode HRMS, une méthode basée sur la spectrométrie de masse en tandem a été développée afin de comparer les performances de ces appareils, le triple quadropôle constituant l'instrument de référence en matière de sensibilité pour la détection ciblée multi-composés. Après analyse des spectres obtenus, les ions diagnostiques et les transitions sélectionnés en HRMS et en MS/MS respectivement sont présentés dans le tableau II-10. L'ensemble des spectres obtenus en HRMS pour les PBDE et OH-PBDE sont quant à eux reportés en Annexe 1. En ce qui concerne la méthode MS/MS, des pseudo-transitions, à savoir des transitions où l'ion fragment recherché est l'ion parent, avec une énergie de collision nulle appliquée ont été utilisés. Cette pratique peu spécifique s'est avérée efficace pour une détection sensible dans le cas de composés dont la fragmentation en MS/MS était difficile.

Bien qu'elles ne soient pas destinées à une application quantitative dans ce travail, les deux méthodes ont été comparées sur la base de leur limite de détection. Les limites de détection de ces deux méthodes ont été calculées en injectant des solutions de concentration croissante (0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 pg injectés) des différents composés. Une droite de régression linéaire a été calculée à partir des rapports signal / bruit (S/N) obtenus en fonction de la quantité injectée. L'équation de la droite a été utilisée pour calculer la quantité d'analyte correspondant à un $S/N = 3$. Les résultats, présentés dans le tableau II-10, montrent des performances similaires entre les deux appareils pour les PBDE et une meilleure sensibilité en haute résolution pour les OH-PBDE.

Tableau II-10 : Ions diagnostiques, transitions MRM et limites de détection correspondantes

	Ion précurseur (M')	Masse exacte (m/z)	(m/z)	Ion fragment	(m/z)	Composés suivis	LOD HRMS (pg)	LOD MS/MS (pg)	LOD APCI (pg)
Tétra-BDEs	[M-H-Br ₂ +O] ⁻	340,8623 / 338,8568	340,9	[Br] ⁻ M	80,9 340,9	BDE-47	3,87		
	[M-H-Br ₂ +O ₂] ⁻	356,8570 / 354,8591							
Penta-BDEs	[M-Br+O] ⁻	500,6964 / 498,6987	498,8	[M'-HBr] ⁻ M	418,8 498,8	BDE-99	4,58		
	[M-H-Br ₂ +O ₂] ⁻	436,7655 / 434,7675				BDE-100	1,41		
Hexa-BDEs	[C ₆ Br ₃ H ₂ O] ⁻	330,7601 / 328,7624	328,8	[Br] ⁻ M	80,9 328,8	BDE-153	0,81	3,80	
						BDE-154	1,93	3,27	
Hepta- et Octa-BDEs	[C ₆ Br ₄ H ₁ O] ⁻	408,6705 / 406,6726	408,7	[Br] ⁻ M	80,9 408,7	BDE-183	0,64		
						BDE-184	0,09	0,39	54,13
						BDE-201	0,18	0,42	37,79
						BDE-202	0,65	0,70	29,56
Octa-, Nona- et Deca-BDEs	[C ₆ Br ₅ HO] ⁻	488,5785 / 486,5804	488,7	[Br] ⁻ M	80,9 488,7	BDE-204	0,34	0,40	63,93
						BDE-206	2,30	5,95	34,69
						BDE-207	1,21	0,19	34,42
						BDE-208	1,09	0,78	
OH-Tétra-BDEs	[M-HBr-Br] ⁻	340,8623 / 338,8568	340,9	[Br] ⁻ M	80,9 340,9	3-OH-BDE-47	1,03	25,10	
	[M-Br] ⁻	420,7877 / 422,7858	420,9	[Br] ⁻ M	80,9 420,9	6-OH-BDE-47	1,78	20,90	
	[M-H] ⁻	500,6964 / 498,6987	498,8	[M'-HBr] ⁻ M	418,8 498,8	4'-OH-BDE-49	1,52	24,36	
OH-Penta-BDEs	[M-H] ⁻	578,6064 / 580,6043	578,8	[Br] ⁻ M	80,9 578,8	5'-OH-BDE-99	0,67	15,89	
	[M-H-HBr] ⁻	498,6809 / 496,6831	498,8	[M'-HBr] ⁻ M	418,8 498,8	3-OH-BDE-100	0,87	18,46	
OH-Hexa-BDE	[M-Br ₃] ⁻	418,7730 / 420,7708	420,9	[Br] ⁻ M	80,9 420,9	3'-OH-BDE-154	0,92	18,71	
OH-Hepta-BDE	[M-Br] ⁻	658,5146 / 656,5170	658,7	[M'-HBr] ⁻ M	578,8 658,7	6-OH-BDE-180	0,89	18,61	
OH-Octa-BDE	[M-Br ₄] ⁻	498,6809 / 496,6831	498,8	[M'-HBr] ⁻ M	418,8 498,8	4'-OH-BDE-201	2,43	26,29	

Comme le montre cette application, l'utilisation d'une méthode hautement spécifique telle que la spectrométrie de masse à haute résolution ne se fait donc pas au détriment de la sensibilité. Ce critère était important dans notre travail puisque les métabolites à identifier peuvent être présents en quantités très faibles. Dans la méthode LC-APPI-HMRS finale, l'acquisition est réalisée en mode spectre complet entre m/z 200 et 1000. La résolution a été fixée à 60,000 pour les raisons évoquées précédemment et illustrées sur la figure II-10.

A l'occasion du développement de cette méthode, nous avons aussi investigué les autres modes d'ionisation, car certains auteurs ont noté que grâce aux développements technologiques permanents, l'ionisation des PBDE est également possible en APCI et peut donner des méthodes aussi sensibles que l'APPI. Nous avons donc développé une méthode LC-APCI-HRMS, et établi les limites de détection pour les PBDE. Ces limites de détection, présentées dans le tableau II-10, se sont avérées comprises entre 30 et 60 pg injectés sur colonne, des valeurs nettement supérieures à celles observées en APPI. Par ailleurs, des essais d'analyse par couplage APCI/APPI ont été effectués, et il semble qu'un gain très léger soit observé. Nous avons cependant décidé de travailler en APPI simple car ce gain n'est que léger, et que la sensibilité de la méthode LC-APPI-HRMS est déjà très satisfaisante.

1.4.2.6 - Application de la méthode

La préparation des échantillons en vue de l'identification par LC-HRMS est identique à celle appliquée pour l'analyse en radio-HPLC présentée au paragraphe 1.3.2., mais une étape supplémentaire de purification sur colonne a été ajoutée. Nous avons en effet réalisé une collecte de fractions basée sur le système radio-HPLC développé, puis reconstitué l'échantillon en regroupant les différentes fractions contenant des métabolites. L'intérêt de cette étape supplémentaire est l'élimination de composants du milieu de culture qui, s'ils ne gênaient pas la détection de radioactivité, pourraient provoquer d'éventuels phénomènes de suppression d'ions ou de formation d'ions adduits en spectrométrie de masse, et par conséquent compliquer la caractérisation structurale des métabolites.

Dans les échantillons, la recherche des métabolites sera effectuée par le suivi des ions diagnostiques et sur le temps rétention. L'identification formelle des métabolites hydroxylés sera effectuée en vérifiant d'une part la présence et la forme du massif isotopique de l'ion, d'autre part en étudiant le spectre complet et les différents ions formés pour les OH-PBDE, puisqu'ils ont des spectres très caractéristiques, comme ceci a été montré sur la figure II-9. Il apparaît par ailleurs nécessaire de toujours se référer aux spectres des standards.

1.5 - CONCLUSION

Les études de métabolisme font intervenir différentes approches basées sur des techniques, biologiques, biochimiques et chimiques. Tout au long des études de métabolisme, il est important dans le cas des composés étudiés de prêter une attention particulière à la solubilisation des composés parents, et à leur reprise, lors des processus d'extraction. Ce sont en effet des composés très peu solubles dans des milieux aqueux, ce qui pose un problème immédiat lors des études réalisées avec des systèmes cellulaires. Une fois cette étape franchie, et contrôlée à l'aide du radio-marquage, ils doivent en être réextraits pour procéder aux analyses structurales. Avant la réalisation des études, quelques essais ont été effectués sur la solubilisation des composés parents dans le DMSO, dans le milieu de culture ainsi que sur l'extraction, afin de vérifier la faisabilité des essais de culture *in vitro*. Des précautions d'emploi ont ainsi été fixées pour la réalisation des essais biologiques et biochimiques. Les méthodes chimiques ont été spécifiquement développées pour l'analyse des RFB et de leurs analytes. Certaines d'entre elles avaient été développées lors de précédents travaux menés au laboratoire sur les RFB, et n'ont pas été modifiées afin de garder une homogénéité dans les résultats obtenus au laboratoire sur ces composés. D'autres méthodes ont été adaptées et améliorées, afin de diminuer le temps d'analyse, ou d'étendre leur champ d'application. C'est le cas de la méthode d'identification par LC-APPI-MS, qui avait été mise au point pour l'analyse seule des PBDE, et qui a été modifiée en une méthode plus spécifique par LC-APPI-HRMS pour l'analyse ciblée des PBDE et des OH-PBDE, et l'analyse non ciblée des autres familles de métabolites des PBDE.

2 - RESULTATS

2.1 - METABOLISME DU TBBPA SUR HEPATOCYTES

2.1.1 - Profils des échantillons

Les comptages de radioactivité des milieux de culture, immédiatement après dépôt du TBBPA, ont indiqué que la solubilisation de ce composé dans les milieux d'incubation était voisine de 100%. En fin d'incubation, la quantité de radioactivité a de nouveau été mesurée dans les échantillons de milieu (surnageant), mais aussi dans les extraits cellulaires et les lavages. La figure II-14 montre les bilans de radioactivité obtenus à partir des incubations réalisées sur hépatocytes humains et sur hépatocytes de rat, pour trois individus, avec les deux concentrations testées, à la fois avec et sans SVF. La majorité de la radioactivité, à hauteur de 90% en moyenne, est retrouvée dans le surnageant, le contenu cellulaire représentant les 10% restants. La fraction de lavage des puits ne contient qu'une quantité très faible de radioactivité.

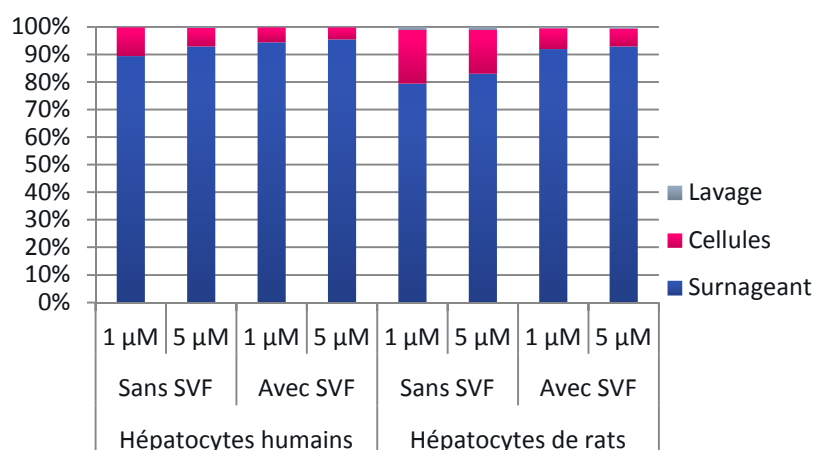


Figure II-14 : Répartition de la radioactivité observée entre le surnageant, les cellules et la solution de lavage des puits, en fonction des différentes conditions de culture testées

Les différents échantillons de surnageant ont par la suite été analysés afin d'établir les profils métaboliques par radio-HPLC. A titre d'illustration, quatre exemples de profils sont présentés sur la figure II-15. Ces radio-chromatogrammes font apparaître des différences quantitatives entre les incubations réalisées avec et sans sérum, ainsi qu'entre les deux espèces étudiées. Dans tous les cas, la biotransformation du TBBPA est totale ou quasi-totale, et cinq pics de métabolites sont observés, à des temps de rétention compris entre 10 et 17,5 minutes. Deux de ces pics coéluent partiellement dans les conditions chromatographiques utilisées, présentées dans le paragraphe 1.3.3.

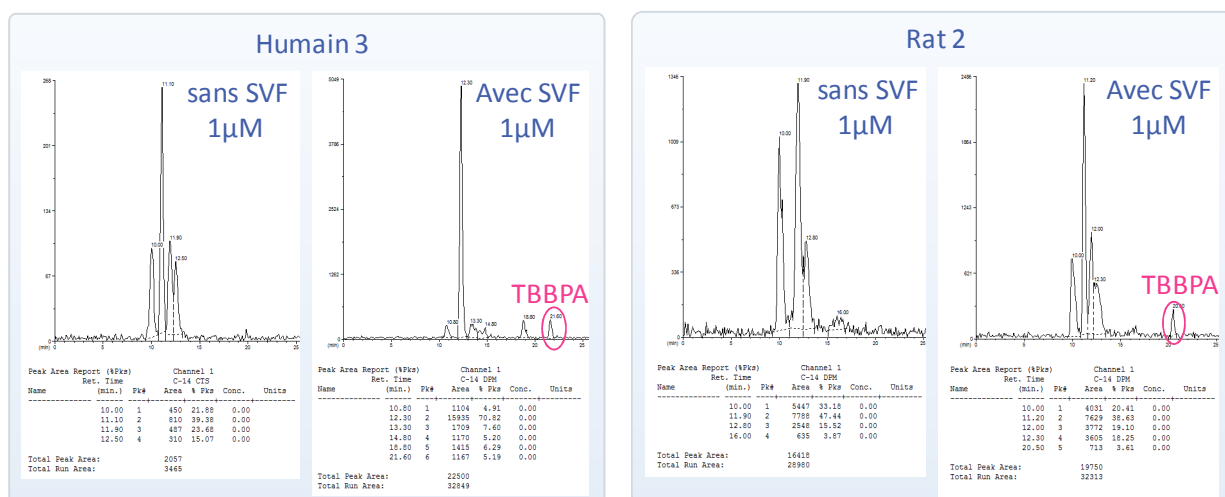


Figure II-15 : Radio-chromatogrammes des échantillons de surnageant obtenus pour les incubations à 1 µM avec et sans SVF pour les deux espèces

La radioactivité a été quantifiée sous chaque pic pour l'ensemble des profils. La figure II-16, présente le pourcentage de chaque métabolite et du TBBPA résiduel pour chacun des échantillons.

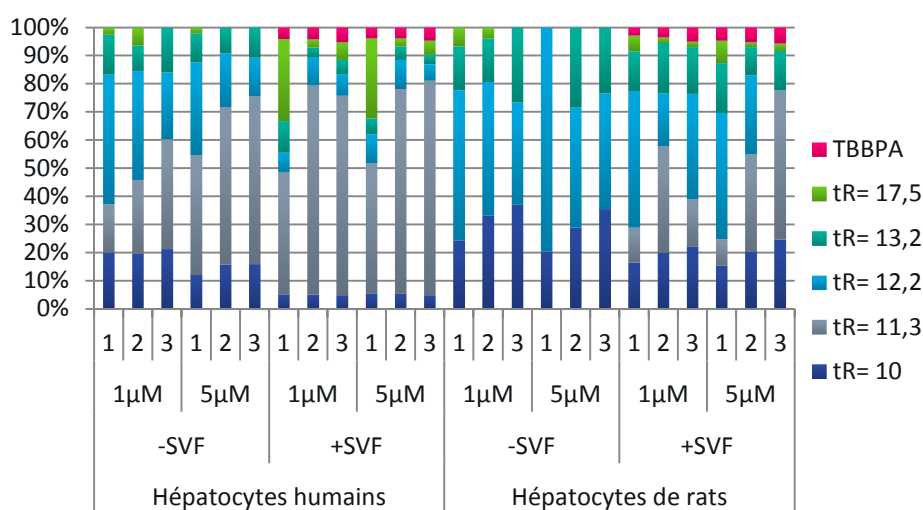


Figure II-16 : Histogramme représentant le pourcentage de chacun des métabolites et du TBBPA non métabolisé observés dans les échantillons de surnageant

Les résultats montrent la présence de TBBPA non métabolisé uniquement dans les incubations avec sérum, ce qui valide l'hypothèse que celui-ci influe sur le métabolisme des cellules, en diminuant le taux de métabolisation et en orientant le métabolisme vers la formation des composés de temps de rétention de 11,3 minutes et 17,5 minutes. Il est vraisemblable que les protéines sériques modifient la biodisponibilité du TBBPA vis-à-vis des enzymes hépatiques, plus qu'elles n'influencent les capacités de biotransformation de l'hépatocyte. Par ailleurs, des différences inter-espèces ont été observées, puisque le métabolite à 11,3 minutes n'est pas synthétisé par les hépatocytes de rat dans les incubations sans SVF. Des différences mineures ont

également été observées entre les incubations à 1 et à 5 μM , avec notamment une production plus importante du métabolite ayant un temps de rétention de 11,3 minutes dans les incubations à 5 μM . Le métabolisme est par ailleurs plutôt homogène entre les trois individus pour chaque espèce.

En résumé, ces résultats indiquent donc une métabolisation extensive du TBBPA, selon les conditions d'incubation, menant à la formation de 5 métabolites chez l'homme.

2.1.2 - Essais de déconjugaisons enzymatiques

Puisque pour les 2 espèces testées, les 3 individus ont montré un métabolisme qualitativement similaire, les échantillons ont été regroupés avant d'effectuer des tests de déconjugaison enzymatique pour chacune des conditions de culture (espèce x présence de SVF x concentration). Pour chaque déconjugaison, un blanc sans enzyme de déconjugaison a été réalisé sur le même échantillon, afin de vérifier que les résultats présentés sur la figure II-17 sont spécifiquement dus à la déconjugaison enzymatique. Ce graphique représente la proportion de chaque métabolite et du TBBPA dans les échantillons de milieu après déconjugaison par le suc d'*Helix pomatia*.

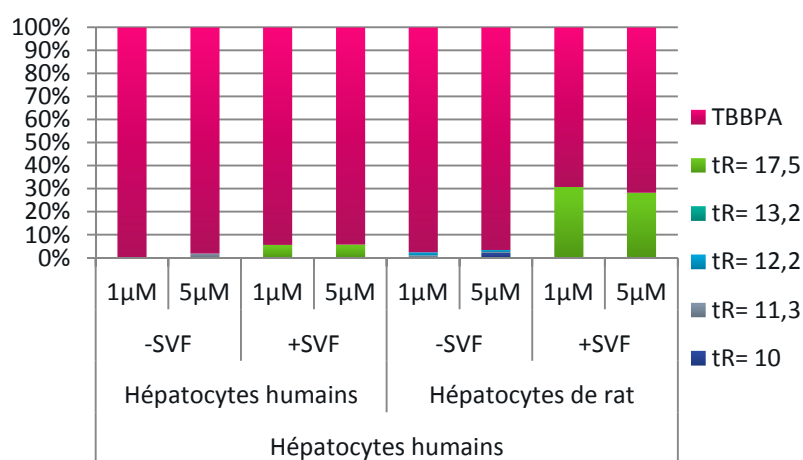


Figure II-17 : Histogrammes représentant le pourcentage de chacun des métabolites et du TBBPA non métabolisé lors des essais de déconjugaison totale sur les échantillons de surnageant

Selon ces résultats, il semble que les métabolites observés dans les échantillons sans sérum soient des conjugués. En effet, bien que 1 à 3% de métabolites restent présents dans certains échantillons, tous les métabolites présents sur la figure II-16 ont été affectés par la déconjugaison. Par contre, dans les incubations avec sérum, le métabolite à 17,5 minutes n'a apparemment pas été pris en charge par les enzymes et son pourcentage a même augmenté dans les surnageants des incubations réalisées avec des hépatocytes de rat. L'explication la plus

évidente est qu'il ne s'agisse pas d'un conjugué. Cependant, ce métabolite était aussi présent en faible quantité dans les incubations sans sérum où il a été déconjugué par le suc d'*Helix pomatia*. Il est donc possible que, puisque le sérum a une influence sur le métabolisme du TBBPA, il ait également gêné la déconjugaison de ce composé par le suc d'*Helix pomatia*. Par ailleurs, le fait que la proportion du métabolite à 17,5 minutes ait augmenté indique que dans le surnageant certains métabolites présenteraient un groupement conjugué, et un autre substituant, identique à celui du métabolite initial à 17,5 minutes.

Des tests de déconjugaisons plus spécifiques par la β -glucuronidase ou l'aryl sulfatase ont donc été réalisés afin de préciser ces conclusions. Les résultats sont présentés sur la figure II-18, montrant la proportion de chaque métabolite pour un témoin et pour les deux essais de déconjugaison.

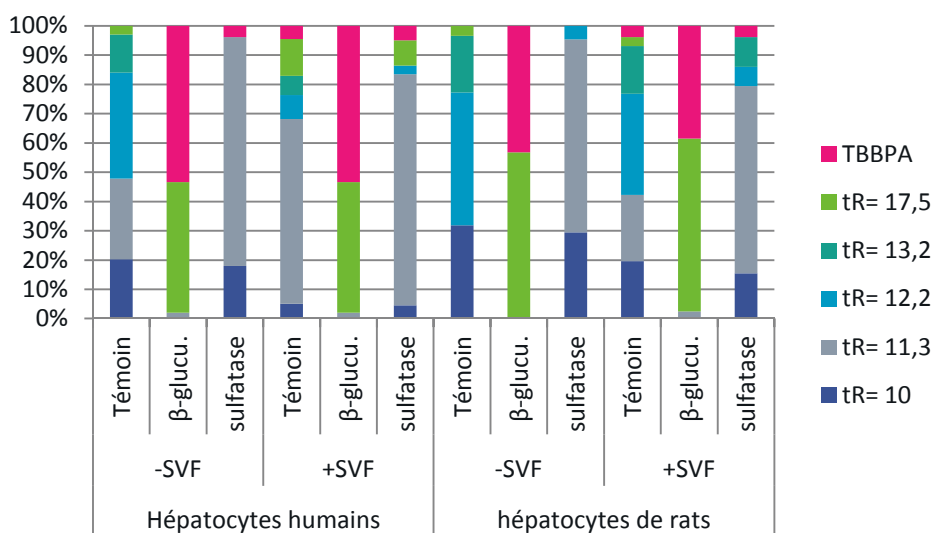


Figure II-18 : Histogrammes représentant le pourcentage de chacun des métabolites et du TBBPA non métabolisé lors des essais de déconjugaison spécifique sur les échantillons de surnageant

Les déconjugaisons par la β -glucuronidase ont montré une augmentation importante de la proportion du métabolite élué à 17,5 minutes, qui n'est donc pas un conjugué à l'acide glucuronique. L'ensemble des autres métabolites sont quant à eux des conjugués glucuronides puisqu'ils sont hydrolysés par la β -glucuronidase. Les déconjugaisons par l'aryl sulfatase indiquent que les métabolites à 10 et à 11,3 minutes n'ont pas été affectés et ne sont donc pas des conjugués sulfates. Les métabolites coélus à 12,2 et à 13,2 minutes sont des conjugués sulfate qui après désulfatation semblent redonner le métabolite à 11,3 minutes, d'après l'essai sur les incubations sans SVF. Le métabolite à 17,5 minutes a été hydrolysé dans l'essai sur les hépatocytes de rat sans SVF mais pas dans celui sur hépatocytes humains avec SVF.

En résumé les métabolites à 10 et 11,3 minutes, hydrolysés par la glucuronidase mais pas la sulfatase sont vraisemblablement des conjugués glucuronides. Celui à 12,2 minutes, hydrolysé par les deux enzymes, devrait correspondre à un double conjugué glucuronide et sulfate. Le métabolite à 13,2 minutes serait lui aussi un double conjugué glucuronide-sulfate. Le métabolite à 17,5 minutes, est probablement un conjugué sulfate, car les essais à la glucuronidase ont augmenté la proportion de ce pic, par hydrolyse des conjugués glucuronide-sulfates. Des identifications en LC-MS ont donc été effectuées pour confirmer ces hypothèses.

2.1.3 - Identification par LC-MS

2.1.3.1 - Identification des métabolites après déconjugaison enzymatique

Des identifications par LC-MS ont été effectuées sur une trappe d'ions tridimensionnelle (LCQ-Deca), en mode electrospray négatif à partir des échantillons hydrolysés à la β -glucuronidase, afin d'identifier en premier lieu le métabolite à 17,5 minutes, et de confirmer les résultats biochimiques. Les spectres de masse MS et MS/MS enregistrés en mode « data dependant » pour ce métabolite sont présentés sur la figure II-19.

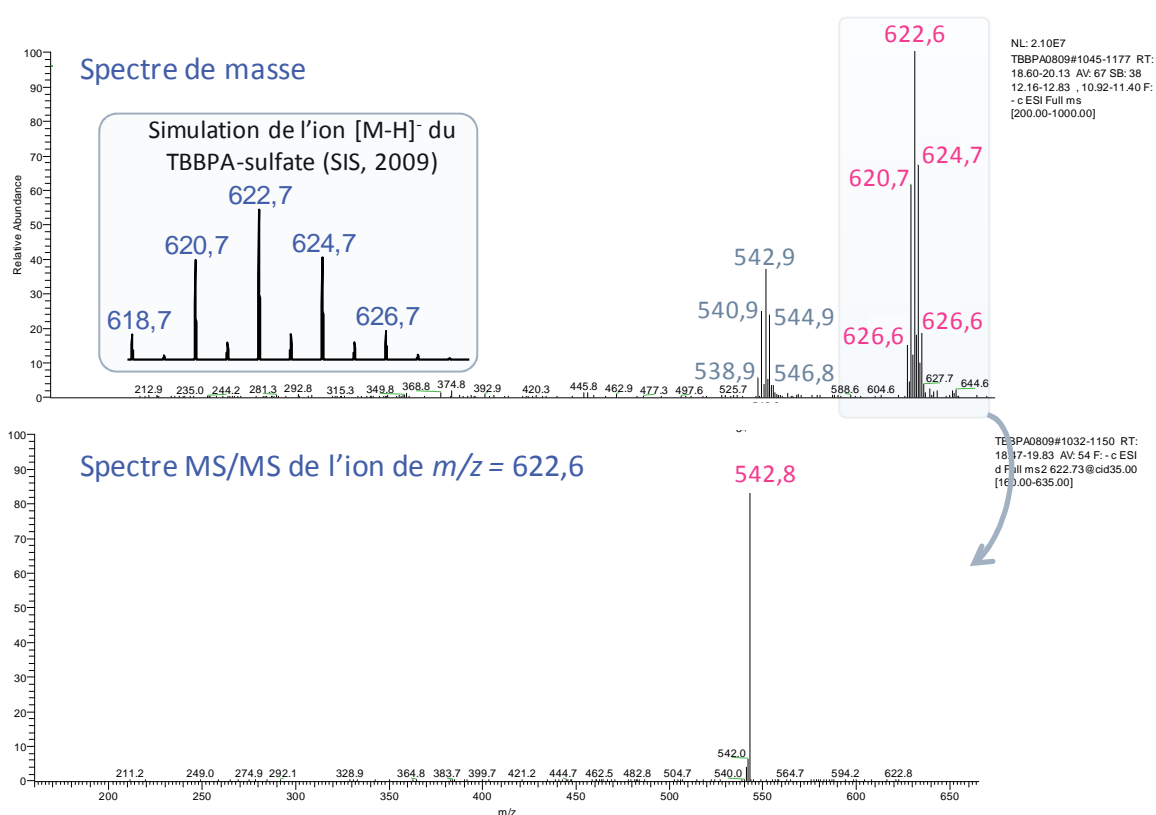


Figure II-19 : Spectre de masse et spectre de masse MS/MS de l'ion majoritaire du métabolite élué à 17,5 minutes en radio-HPLC

Le spectre de masse MS obtenu fait apparaître deux massifs, l'un centré sur l'ion $m/z = 623$ et le second centré sur $m/z = 543$, concordant avec l'ion $[M-H]^-$ du TBBPA. L'ion $m/z = 623$ a été identifié comme étant l'ion $[M-H]^-$ du TBBPA-sulfate par comparaison avec le massif théorique calculé pour ce composé. Ceci est confirmé par le spectre MS/MS de l'ion $m/z = 623$ qui montre un seul ion fragment à $m/z = 543$, correspondant à la perte d'un groupement sulfate.

Le métabolite observé sur les radio-chromatogrammes à 17,5 minutes est donc bien le TBBPA-sulfate. Cette identification confirme également la présence de TBBPA-glucuronide-sulfate à 12,2 et 13,2 minutes. Les deux pics observés sont en fait un seul composé élué en deux pics, probablement en raison de la coexistence de deux états d'ionisation différents avec le système chromatographique utilisé décrit au paragraphe 1.3.3.

2.1.3.2 - Identification des métabolites en LC-HRMS

Ces résultats ont été complétés par des identifications en LC-HRMS réalisées en mode spectre complet sur le LTQ-Orbitrap. Sur la base des hypothèses émises à l'issue des tests biochimiques, les chromatogrammes des ions quasi-moléculaires des différents métabolites ont été extraits. Les différentes valeurs de m/z sont présentées dans le tableau II-11, ainsi que les valeurs de m/z théoriques et la différence de masse en ppm observée.

Tableau II-11 : Formules brute et valeurs de m/z théoriques et observées pour les massifs $[M-H]^-$ du TBBPA et de ses conjugués

Composé	Formule Brute	tR (min)	m/z observé	m/z théorique	Delta ppm
TBBPA	$C_{15}H_{11}O_2Br_4$	10,35	542,7445	542,7452	-0,209
TBBPA-glucuronide	$C_{21}H_{19}O_8Br_4$	7,05	718,7757	718,7773	-1,393
TBBPA-sulfate	$C_{15}H_{11}O_5SBr_4$	7,85	622,7007	622,7020	-1,169
TBBPA-double glucuronide	$C_{27}H_{27}O_{14}Br_4$	6,35	894,8070	894,8094	1,999
TBBPA-glucuronide-sulfate	$C_{21}H_{19}O_{11}Br_4$	6,60	798,7326	798,7341	1,146

Dans ce tableau figurent les valeurs de m/z mesurées précisément pour l'ion majoritaire du massif isotopique des ions quasi-moléculaires observés et les valeurs théoriques calculées à partir d'une formule brute proposée pour ces ions. Les spectres de masse des différents composés ont également été examinés, afin de vérifier la présence et la concordance du massif isotopique avec le massif théorique calculé pour les différents métabolites conjugués. Un exemple de chromatogramme LC-HRMS présente sur la figure II-20 la réponse aux différents signaux diagnostiques du tableau II-10.

Ces chromatogrammes confirment la présence des 4 métabolites identifiés, à savoir les conjugués simples glucuronides et sulfates et les conjugués double glucuronide et glucuronide-

sulfate. Le pic à 6,3 minutes du TBBPA-glucuronide-sulfate est particulièrement large par rapport aux trois autres pics, et élué dans ce système avant le TBBPA-glucuronide ce qui confirme que les conditions chromatographiques sont mal adaptées à ce composé. Cette situation pourrait être améliorée en travaillant par exemple avec des phases mobiles tamponnées au lieu d'une phase simplement acidifiée. Cependant, nous avons considéré que ceci ne gênait pas la quantification des différents métabolites et qu'il n'était pas nécessaire de retravailler sur le système séparatif utilisé pour générer les profils radio-HPLC.

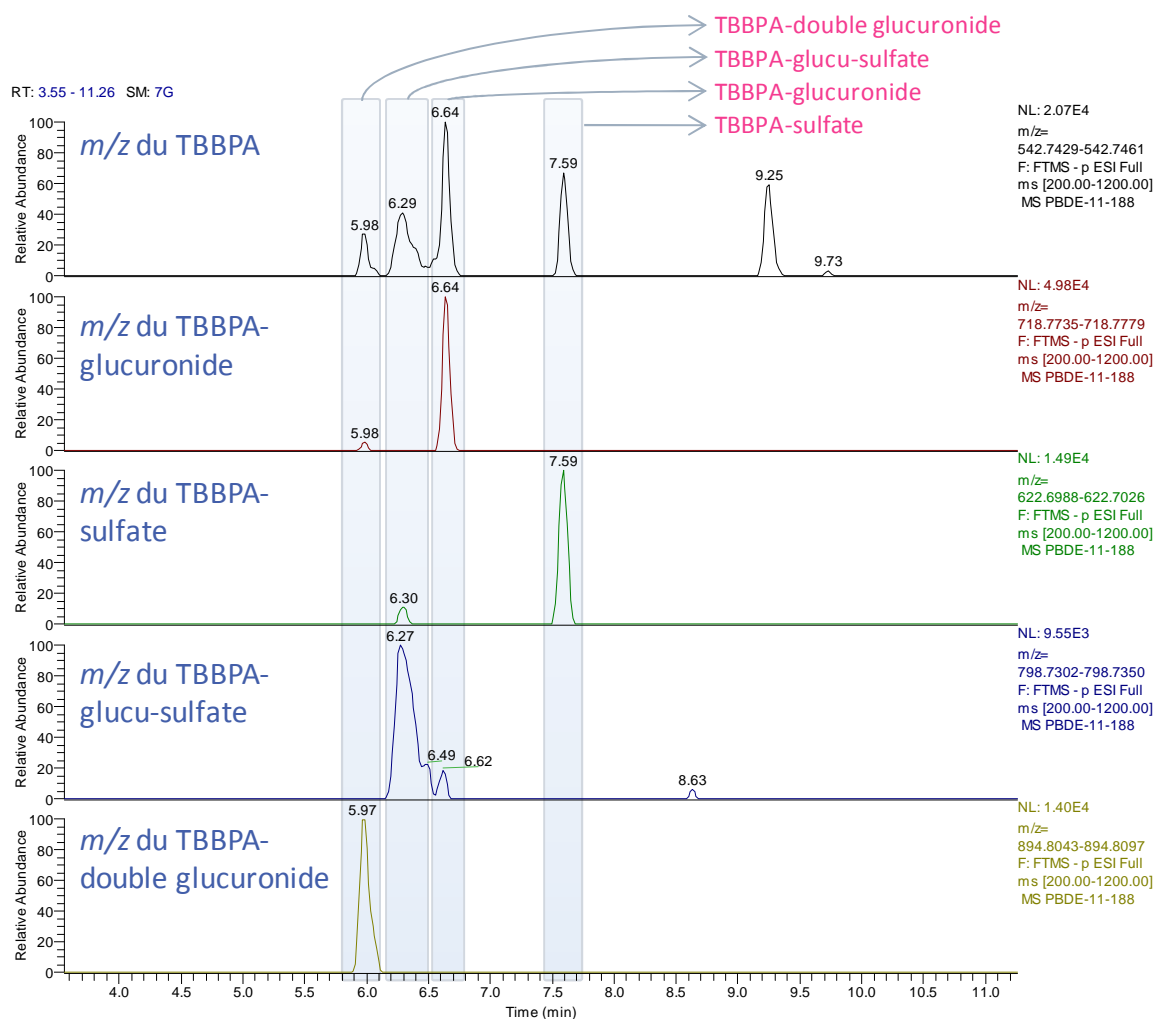


Figure II-20 : Chromatogrammes d'ions extraits spécifiques des conjugués du TBBPA d'un mélange d'échantillons de surnageant d'incubations avec hépatocytes humains sans SVF à 5 μM

2.1.4 - Conclusions sur le métabolisme du TBBPA

Les différents pics observés sur les radio-chromatogrammes ont été identifiés comme indiqué sur la figure II-21, à savoir les conjugués TBBPA-glucuronide et TBBPA-sulfate, et les conjugués TBBPA-double glucuronide et TBBPA-glucuronide-sulfate.

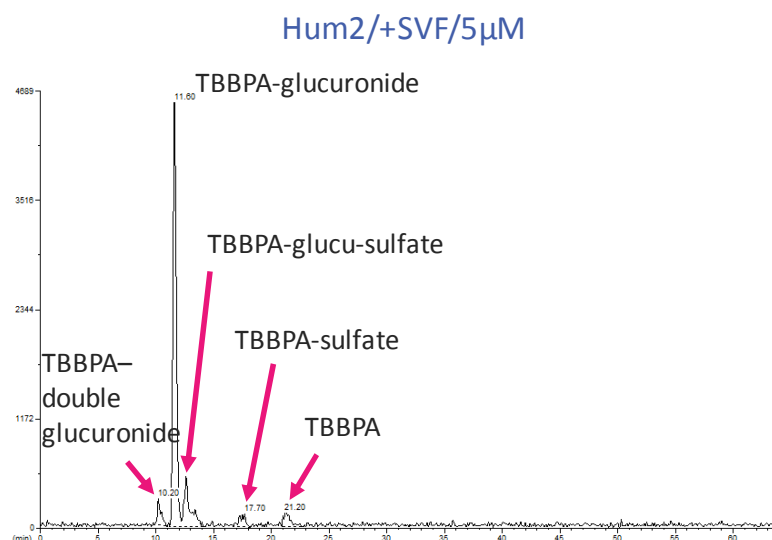


Figure II-21 : Identification des métabolites du TBBPA, résumée sur un radio-chromatogramme

La comparaison des incubations effectuées avec et sans sérum de veau fœtal a montré des différences au niveau qualitatif. La présence de sérum favorise apparemment la formation de conjugués glucuronides, et augmente la proportion de TBBPA conjugué. L'ajout de sérum avait au départ été proposé afin de favoriser la solubilisation du composé parent. Dans le cas du TBBPA, et au vu des différences observées, ces essais ne seront pas retenus pour la comparaison du métabolisme des deux espèces et des trois individus. La figure II-22 présente ainsi la proportion de chaque métabolite identifié dans les incubations réalisées sans SVF.

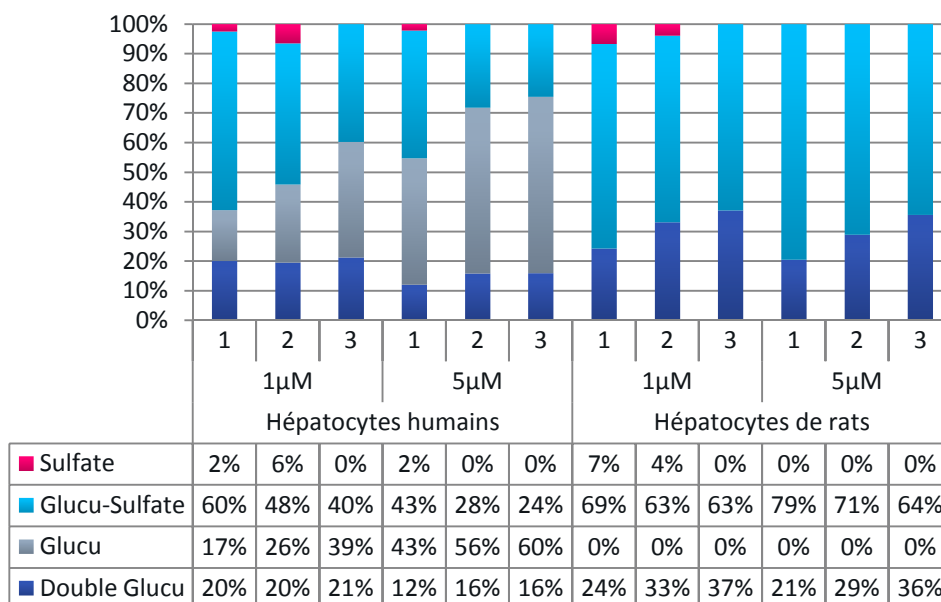


Figure II-22 : Histogramme représentant le pourcentage des métabolites identifiés dans les échantillons de surnageant des incubations sans SVF

En conclusion la métabolisation du TBBPA est totale sur les hépatocytes en culture primaire, et fait intervenir des enzymes de phase II. Les métabolites formés chez l'homme sont le TBBPA-

glucuronide, le TBBPA-glucuronide-sulfate, le TBBPA double glucuronide et le TBBPA-sulfate. Chez le rat, seuls les trois derniers sont produits, puisque les conjugués glucuronides simples n'ont pas été observés. La conjugaison semble donc plus efficace que chez l'homme, puisque 93 à 100% des métabolites observés sont des doubles conjugués, contre 60 à 80 % chez l'homme. Chez les deux espèces, le métabolite majoritaire est le conjugué glucuronide-sulfate, et chez l'homme le conjugué simple glucuronide est le second métabolite présent quantitativement.

Pour les incubations sur hépatocytes humains, la sulfatation semble par ailleurs plus efficace chez les individus 1 et 2 (deux femmes) pour lesquels du TBBPA-sulfate est observé ainsi qu'une proportion du TBBPA-glucuronide-sulfate supérieure par rapport à l'individu 3 (un homme). Les incubations à 5 μ M montrent des résultats différents dans le sens où la sulfatation a été moins efficace puisque le pourcentage de TBBPA-glucuronide est supérieur à celui observé dans les incubations à 1 μ M. Il convient de rappeler que la variabilité habituellement constatée chez l'être humain, pour les capacités métaboliques des hépatocytes, est bien plus importante que celle constatée pour les animaux de laboratoire. Ceci est lié non seulement à une plus grande variabilité génétique, mais également à une possible modulation des activités enzymatiques par des traitements médicamenteux, des habitudes alimentaires, ou l'exposition chronique à des xénobiotiques, pour lesquels les données ne sont généralement pas disponibles.

2.2 - METABOLISME DU BDE-47

2.2.1 - Métabolisme sur hépatocytes en culture primaire

2.2.1.1 - Profils des échantillons

Dans le cas du BDE-47, l'intérêt de la présence du SVF pour la solubilisation du composé parent dans le milieu de culture est, comme cela pouvait être anticipé, très marqué. La solubilisation obtenue a été de 23 et 37% dans les incubations sans SVF et de 85 ou 92% dans les incubations avec SVF, à 1 et 5 μ M respectivement. La quantité de radioactivité moyenne (en désintégrations par minute : dpm) obtenue pour les incubations des trois individus présente dans les différentes fractions récupérées après incubation est représentée en figure II-23.

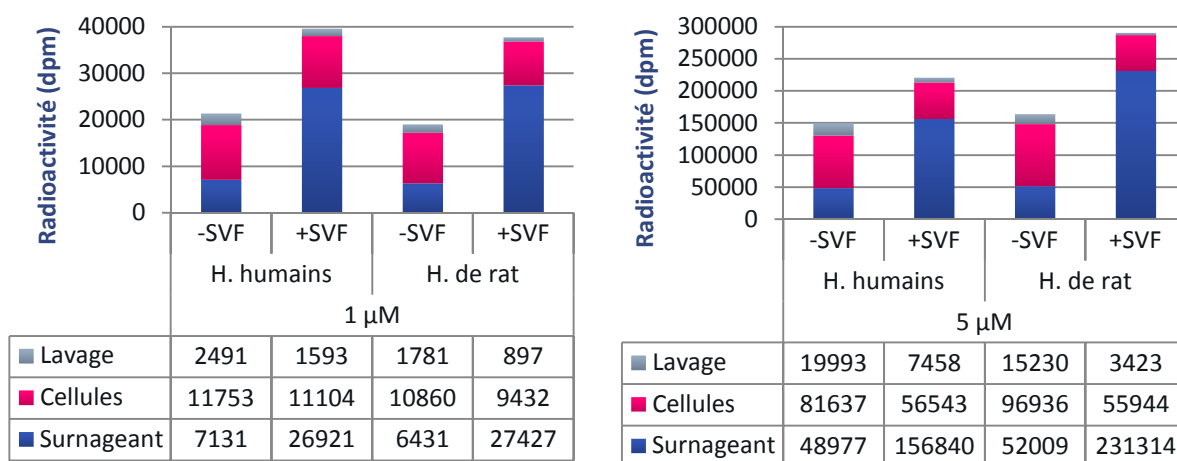


Figure II-23 : Répartition de la radioactivité observée entre le surnageant, les cellules et la solution de lavage des puits, en fonction des différentes conditions de culture testées

Des différences importantes ont été observées entre les incubations avec et sans SVF, avec une quantité de radioactivité récupérée dans le surnageant supérieure pour les incubations avec SVF. Dans les incubations à 5 µM, la quantité de radioactivité est plus faible pour les cellules issues des incubations avec sérum. Ceci indique que soit le BDE-47 est resté dans le milieu de culture à cause de la présence de sérum, soit la métabolisation a été plus efficace et que les métabolites ont été excrétés dans le milieu extracellulaire.

L'examen des proportions de chaque métabolite obtenu par profilage radio-HPLC des échantillons de surnageant et de cellules, dont un bilan est présenté sur la figure II-24, fait apparaître une différence inter-espèce majeure puisqu'aucun métabolite n'a été observé pour les incubations avec les hépatocytes de rat. A l'inverse, des métabolites ont été observés pour deux des trois donneurs d'hépatocytes humains.

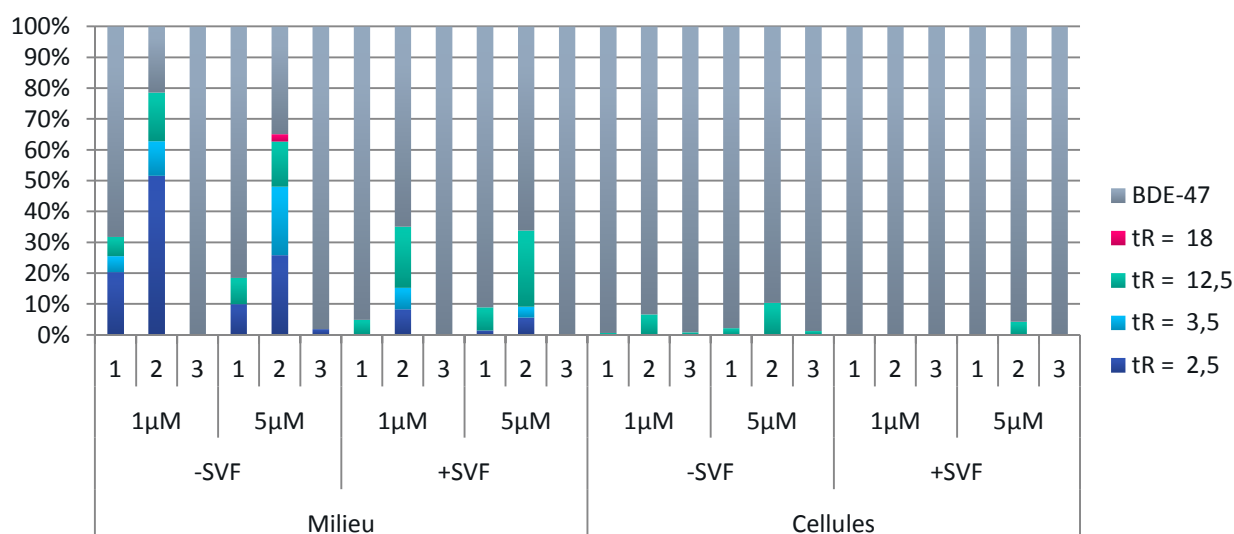


Figure II-24 : Histogramme représentant le pourcentage des métabolites et du BDE-47 observés dans les échantillons de surnageant et de cellule des incubations avec hépatocytes humains

Dans les échantillons de surnageant, quatre pics chromatographiques ont été attribués à des métabolites, élués à des temps de rétention de 2,5 ; 3,7 ; 12,5 et 18,0 minutes, le BDE-47 étant élué à 27 minutes. Le métabolite élué à 12,5 minutes a également été observé en petite quantité dans les extraits de cellules. Afin de comparer les différentes incubations, la quantité de chaque métabolite et de BDE-47 a été calculée, et les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau II-12. Ces valeurs ont été obtenues sur la base de la quantité de BDE-47 ajoutée, c'est-à-dire la quantité de BDE-47 dans les solutions de DMSO utilisées dans les incubations, multipliée par le pourcentage de radioactivité représenté par chaque pic dans le radio-chromatogramme.

Tableau II-12 : Quantités estimées en nmol de BDE-47 et de chaque métabolite dans chaque essai (somme des échantillons milieu + cellules)

			Temps de rétention (minutes)				BDE-47	Total
			2,5	3,7	12,5	18		
-SVF	1µM	Moyenne Ecart-type	0,079 (9%) 0,094	0,018 (2%) 0,020	0,039 (5%) 0,047		0,718 (84%) 0,137	0,855 0,031
	5µM	Moyenne Ecart-type	0,212 (5%) 0,229	0,135 (3%) 0,233	0,257 (6%) 0,274	0,015 (0,3%) 0,026	3,924 (86%) 0,664	4,542 0,120
+SVF	1µM	Moyenne Ecart-type	0,018 (2%) 0,032	0,015 (2%) 0,027	0,054 (6%) 0,068		0,843 (91%) 0,132	0,932 0,011
	5µM	Moyenne Ecart-type	0,087 (2%) 0,107	0,043 (1%) 0,074	0,411 (8%) 0,494		4,524 (89%) 0,676	5,065 0,015

La figure II-24 et le tableau II-11 mettent en évidence plusieurs facteurs de variation. En ce qui concerne les conditions de culture, la métabolisation est accrue dans les cultures sans SVF, attestant une fois de plus que s'il améliore la dissolution des composés, il limite également leur prise en charge par les cellules. De plus, bien que les quantités absolues de métabolites formés soient supérieures dans les incubations à 5 µM, le taux de métabolisation est plus important dans les incubations à 1 µM. Ceci est probablement dû à une saturation des enzymes de métabolisation à la concentration la plus forte.

Les différences inter-individus sont importantes, puisque les hépatocytes de l'individu 3 n'ont quasiment pas métabolisé le BDE-47, et que le taux de métabolisation du BDE-47 par les hépatocytes de l'individu 2 est deux fois plus important que pour l'individu 1. Le troisième individu semble déficient pour les enzymes prenant en charge le BDE-47. Si l'on se rapporte aux résultats observés pour le TBBPA pour lequel aucune différence notable n'était apparue, cela indique que les voies métaboliques impliquées sont probablement différentes pour ces deux composés. Ceci est cohérent avec les données bibliographiques qui indiquent que les PBDE subissent un métabolisme oxydatif, alors que nous venons de montrer que, sur hépatocytes, le TBBPA était exclusivement métabolisé par des enzymes de phase II (enzymes de conjugaison). Par ailleurs, les différences de métabolisation entre les individus avait déjà été observées lors de

précédentes études menées au laboratoire de Toulouse sur les mêmes hépatocytes et ayant suggéré que ces différences pouvaient être attribuées à l'âge et au sexe (Dumont et al., 2011).

2.2.1.2 - Identification des métabolites par LC-HRMS

Les identifications structurales des métabolites ont été effectuées à partir des échantillons de surnageant provenant des incubations à 5 μ M des individus 1 et 2, de façon à disposer du maximum de matériel. Deux essais ont été effectués, le premier selon le protocole indiqué dans le paragraphe 1.3.3., le second en appliquant un gradient d'élution différent, tous les composés n'ayant pas pu être identifiés lors des premiers essais. Pour la deuxième partie des essais, une collecte de fractions a été effectuée en appliquant un gradient Eau/ACN croissant de 5 à 100 % d'ACN en 30 minutes, à partir duquel 6 fractions contenant de la radioactivité ont été récupérées. L'identification de ces fractions sur un radio-chromatogramme est présentée sur la figure II-25. Le gradient utilisé pour la collecte étant différent de celui utilisé pour les profils, l'assignation des fractions 1 à 3 n'est pas claire. Nous verrons par la suite que ceci n'est toutefois pas trop problématique pour l'interprétation de nos résultats.

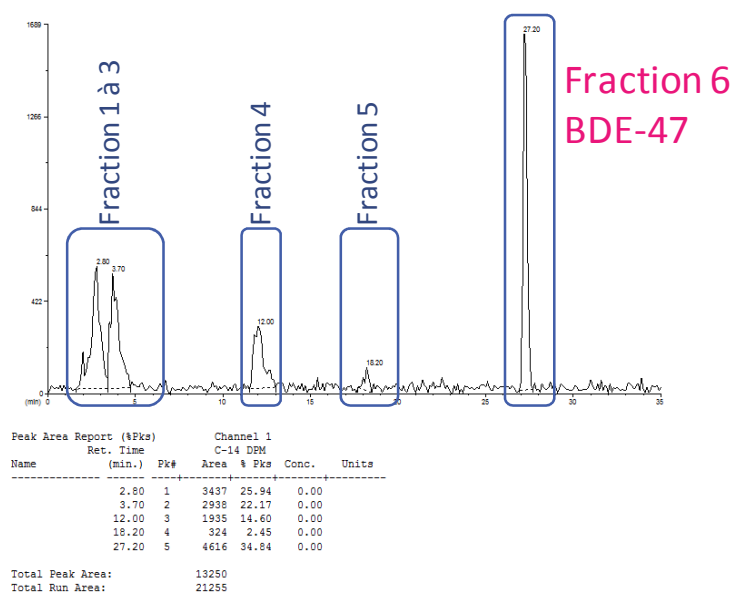


Figure II-25 : Identification des fractions collectées sur un radio-chromatogramme

Ces fractions ont été injectées en LC-APPI-HRMS, selon la méthode développée pour l'analyse simultanée des PBDE et des OH-PBDE, présentée au paragraphe 1.4.2. Les injections ont été effectuées séparément pour chaque fraction de collecte puis après regroupement de façon à reconstituer un profil complet. Nous présentons ici les résultats de ces dernières analyses. Les identifications en LC-APPI-HRMS ont été complétées par des analyses en LC-ESI-HRMS en raison de la nature de certains métabolites.

2.2.1.2.1 - Composé parent et PBDE hydroxylés : fractions 5 et 6

En se basant sur la méthode développée au paragraphe 1.4.2., des PBDE hydroxylés ont été identifiés dans les échantillons de surnageant. La figure II-26 présente à titre d'exemple certains chromatogrammes d'ions sur lesquels nous nous sommes appuyés pour l'identification de ces métabolites. Il s'agit de chromatogrammes d'ions observés à partir du mélange des échantillons de surnageant des deux individus métabolisant le BDE-47 (individus 1 et 2). Les métabolites ont été identifiés sur la base de leur temps de rétention et de leur spectre de masse par comparaison aux standards disponibles, comme indiqué sur la figure II-26.

Abondance relative des différents massifs sur standards

	3-OH-BDE-47	5-OH-BDE-47	6-OH-BDE-47	4'-OH-BDE-49
Temps de rétention	12,2	14,1	13,9	14,2
[M-Br-HBr] ⁻	338.8662	100	85	10
[M-H-HBr] ⁻	416.7767	50	100	15
[M-Br] ⁻	418.7923	5	3	100
[M-H] ⁻	496.7029	55	60	100

Chromatogrammes d'ions extraits d'un mélange « Hépatocyte humains 1 et 2 sans SVF à 5µM »

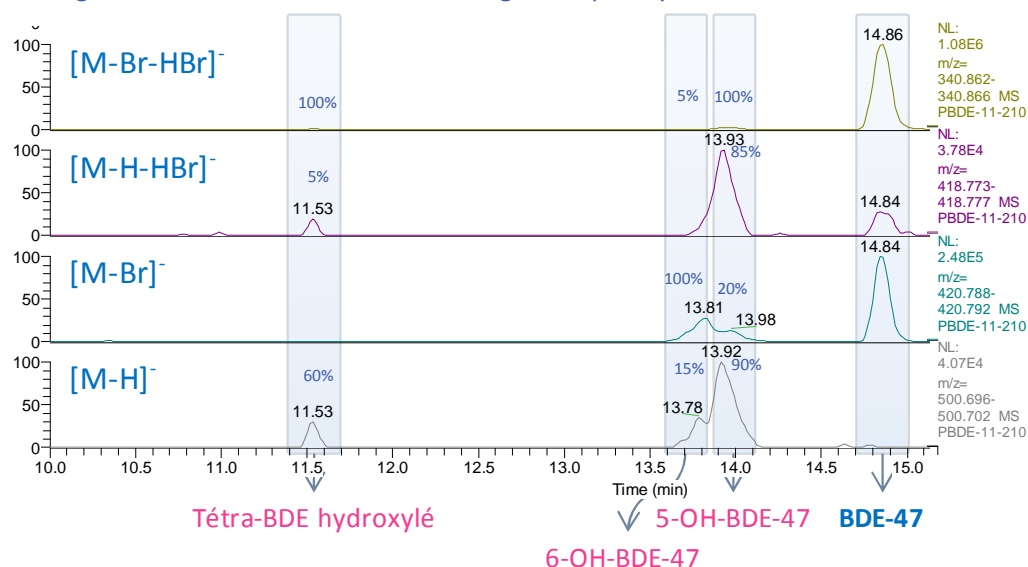


Figure II-26 : Abondances relatives des différents ions diagnostiques dans les standards et chromatogrammes d'ions extraits des tétra-BDE hydroxylés

Le BDE-47 a été identifié à 14,8 minutes sur cette figure, qui montre par ailleurs la présence de trois métabolites hydroxylés. Le métabolite à 13,8 minutes a été identifié comme étant le 6-OH-BDE-47 grâce à son temps de rétention et la présence très majoritaire de l'ion [M-Br]⁻ considérée comme caractéristique de ce métabolite (voir spectre en Annexe 1 et sur la figure II-9). Le métabolite à 13,9 minutes a été identifié comme le 5-OH-BDE-47 grâce à son temps de rétention et aux abondances relatives des quatre ions diagnostiques, similaires à celles du standard. Le

métabolite à 11,5 minutes n'a pas pu être formellement identifié. Il présente des abondances relatives des différents ions proches de celles du 3-OH-BDE-47, mais son temps de rétention ne concorde pas avec celui du standard.

Trois tétra-BDE hydroxylés ont donc été détectés, dont au moins un qui ne peut correspondre à l'une des trois formes hydroxylées possibles du BDE-47. Il peut se former via un mécanisme faisant intervenir une hydroxylation par les cytochromes P450 suivie d'un réarrangement 1,2. Ce genre de phénomène est parfois observé sur les composés portant un cycle aromatique halogéné. Il s'agit du déplacement d'un atome de brome d'un carbone du cycle phénolique vers un carbone adjacent. Ce type de métabolite a déjà été décrit *in vivo* chez des rats exposés au BDE-47. Les auteurs ont en effet observé un BDE-49 hydroxylé (2,2',4,5'-tétra-BDE) lors d'une étude sur le BDE-47 (2,2',4,4'-tétra-BDE), montrant qu'une migration 1,2 d'un atome de brome (ici de la position 4' vers la position 5') est possible sur les PBDE (Marsh et al., 2006).

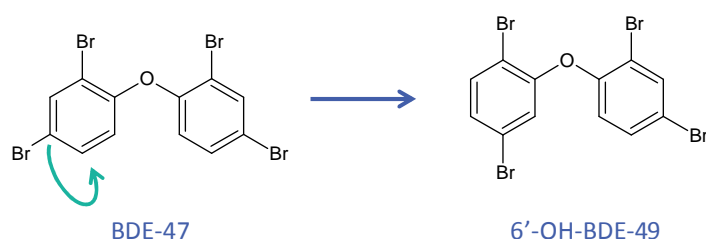
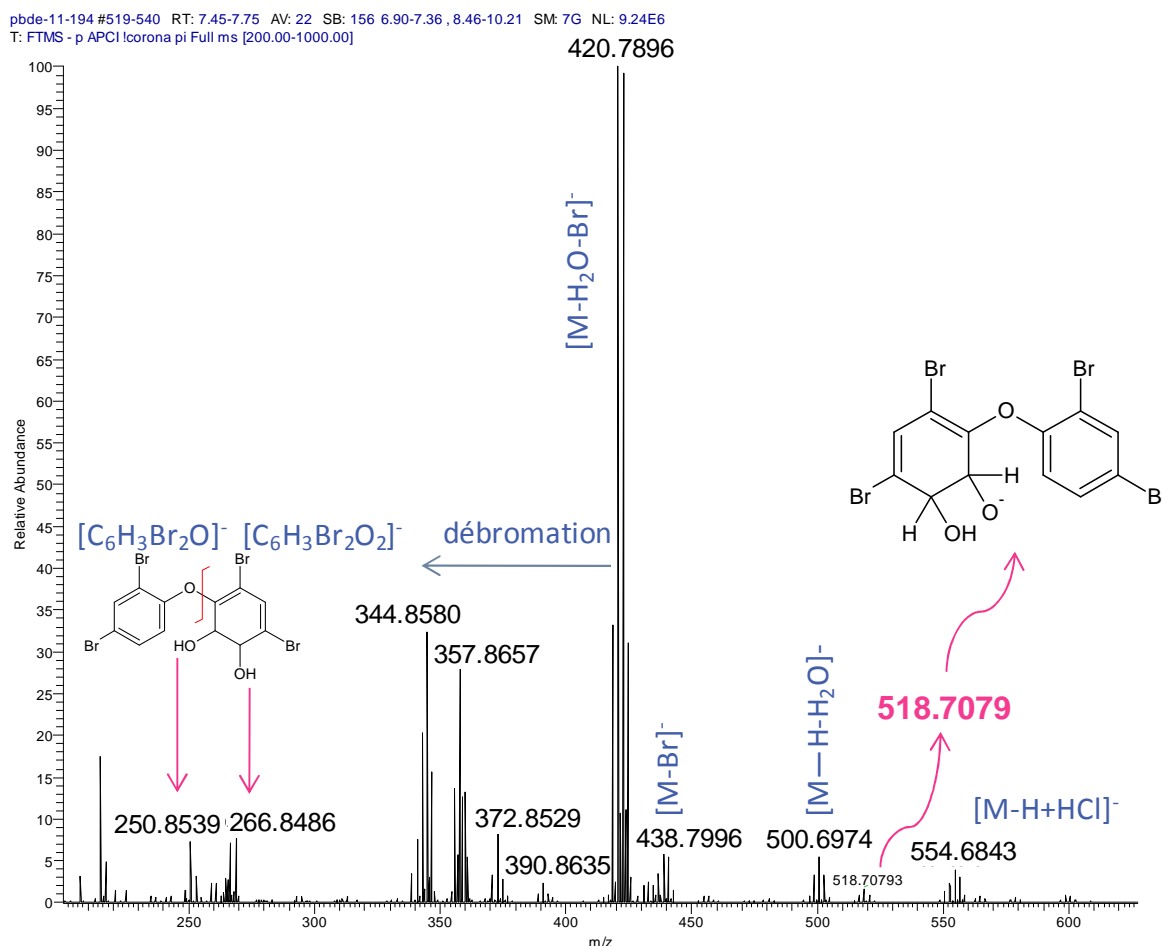


Figure II-27 : Illustration du phénomène de réarrangement 1,2

2.2.1.2.2 - Identification du métabolite de la fraction 4

Le suivi des ions diagnostiques des PBDE hydroxylés a servi à détecter un autre métabolite, élué dans la quatrième fraction de collecte, et possédant un temps de rétention de 7,5 minutes en LC-APPI-HRMS. La figure II-28 montre le spectre de masse APPI ce composé.



Ce spectre de masse, relativement complexe, laisse apparaître des ions et un schéma de débromation caractéristique des OH-PBDE. Le massif peu abondant centré autour de $m/z = 518,7079$ a été attribué à l'ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$ d'un tétra-BDE dihydrodiol, par comparaison avec le massif isotopique théorique calculé pour la formule brute $C_{12}H_7O_3Br_4$, et la valeur théorique de l'ion $C_{12}H_7O_3^{79}Br_2^{81}Br_2$ qui est de 518,7083. Ceci est conforté par la présence d'un massif centré sur $m/z = 554,6843$, dont la masse et la structure du massif isotopique correspondent à un adduit HCl de m/z calculé = 554,6849. L'ion $m/z = 438,7996$ correspond à l'ion $[M-Br]^-$ dont la valeur de m/z théorique est 438,7998. Deux massifs sont également observés à $m/z = 250,8539$ (m/z calculé = 250,8530) et $m/z = 266,8486$ (m/z calculé = 266,8474), et correspondent à la coupure de la molécule entre l'oxygène du pont éther et le cycle dihydroxylé. L'identification de ce composé a par ailleurs été confirmée par l'enregistrement d'un spectre ESI sur lequel l'ion quasi-moléculaire est prédominant. L'ensemble de ces résultats valident l'identification ce métabolite comme un tétra-BDE dihydrodiol, très probablement le BDE-47 dihydrodiol. Ce type métabolite n'avait jamais encore été décrit pour les PBDE. En revanche, le processus de dihydroxylation accompagné d'une perte d'aromaticité a déjà été observé sur les HAP (DePierre and Ernster, 1978).

2.2.1.2.3 - Identification des métabolites des fractions 1 à 3

Les métabolites des fractions 1 à 3 ont été eux aussi facilement détectés en APPI, par l'intermédiaire de signaux diagnostiques des PBDE hydroxylés. Dans le système chromatographique utilisé, ces métabolites sont élués entre 1,5 et 5 minutes, comme le montre la figure II-29, où certains de ces métabolites sont visibles, ainsi que le tétra-BDE dihydrodiol précédemment identifié.

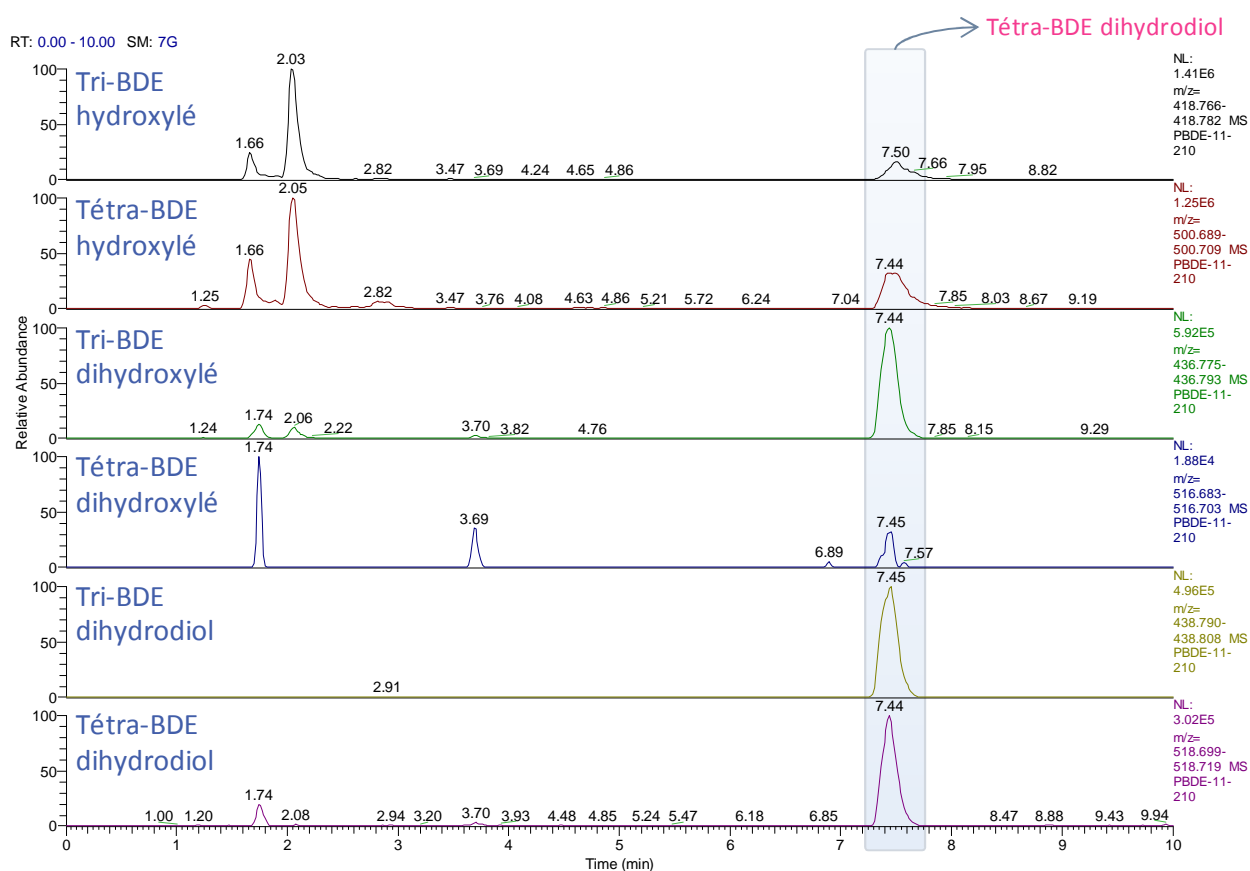


Figure II-29 : Chromatogrammes d'ions extraits des PBDE hydroxylés, dihydroxylés et dihydrodiols obtenus en LC-APPI-HRMS

Notre première hypothèse s'est orientée vers l'identification de ces métabolites comme étant des PBDE dihydroxylés, car comme le montre la figure II-28 certains composés possèdent dans leur spectre de masse l'ion $[M-H]^-$ des tétra-BDE dihydroxylés. Toutefois, cette hypothèse semblait peu plausible car les temps de rétention de ces composés indiquent qu'il s'agit de composés très polaires. L'étude des spectres de masse APPI de ces composés n'a montré que la présence des ions diagnostiques des PBDE hydroxylés, dihydroxylés ou dihydrodiol. Des analyses complémentaires en LC-ESI-HRMS ont été réalisées, et les spectres de masse ESI, présentés sur la figure II-30, montrent en général deux massifs isotopiques : celui déjà mis en évidence en

APPI, et un second massif tétra-bromé situé à des rapports m/z plus élevés, et qui ont été identifiés à des massifs isotopiques d'ions quasi-moléculaires, spécifique de différents hydroxy-PBDE conjugués.

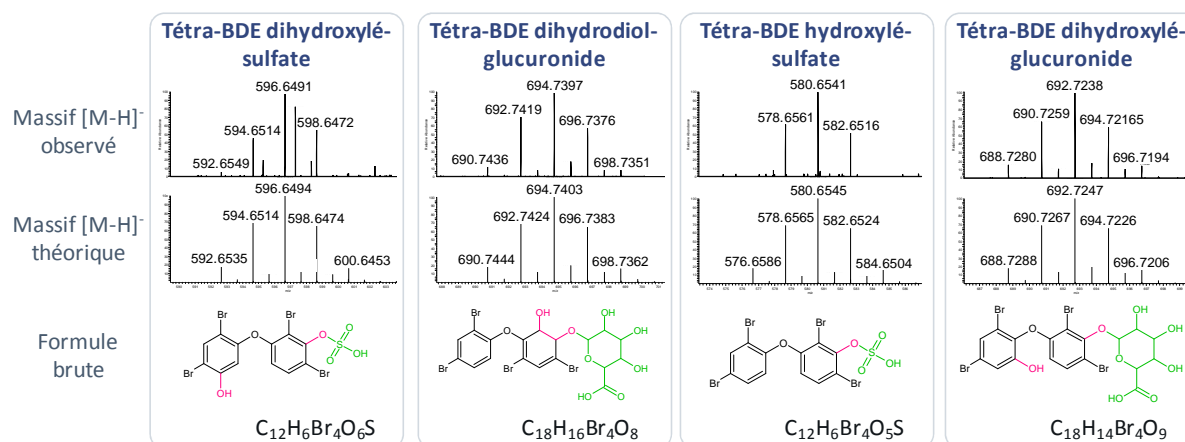


Figure II-30 : Spectres de masse ESI de métabolites élués entre 1,8 et 5 minutes

La comparaison des massifs isotopiques de ces composés avec les massifs théoriques calculés pour ces différents métabolites, présentés sur la figure II-30, ainsi que les valeurs de m/z observés et calculés accompagné de la différence entre ces valeurs en ppm consignés dans le tableau II-13, confirment ces identifications.

Tableau II-13 : Formules brutes et valeurs de m/z observées et théoriques pour les massifs $[M-H]^-$ des tétra-BDE conjugués

Métabolite	Formule brute $[M-H]^-$	tR (min)	m/z observé	m/z théorique	Delta ppm
Tétrabromodihydrodiol-glucuronide	$C_{18}H_{16}O_9Br_4$	2.3	694.7409	694.7403	-0,872
		2.7	694.7409		-0,958
Tétrabromohydroxylé-glucuronide	$C_{18}H_{14}O_8Br_4$	2.6	676.7297	676.7298	-0,814
		3.3*	676.7297		-1,390
		3.5	676.7297		-1,450
Tétrabromodihydroxylé-glucuronide	$C_{18}H_{14}O_9Br_4$	3.9*	692.7247	692.7247	-1,726
		4.3	692.7247		-1,192
Tétrabromodihydrodiol -sulfate	$C_{12}H_8O_6SBr_4$	1.8	598.6650	598.6656	-1,173
		4.1*	598.6650		-2,736
		4.3*	598.6650		-2,802
Tétrabromohydroxylé-sulfate	$C_{12}H_6O_5SBr_4$	2.4	580.6545	580.6545	-0,719
Tétrabromodihydroxylé-sulfate	$C_{12}H_6O_6SBr_4$	2.7	596.6494	596.6494	-0,456

Cinq types de métabolites conjugués ont ainsi pu être identifiés : il s'agit de conjugués sulfate de tétra-BDE hydroxylé et dihydroxylé, et de conjugués glucuronides respectivement de tétra-BDE hydroxylé, dihydroxylé et dihydrodiol. Les chromatogrammes d'ions extraits pour les ions quasi-moléculaires de chacun de ces types de métabolites sont présentés sur la figure II-31.

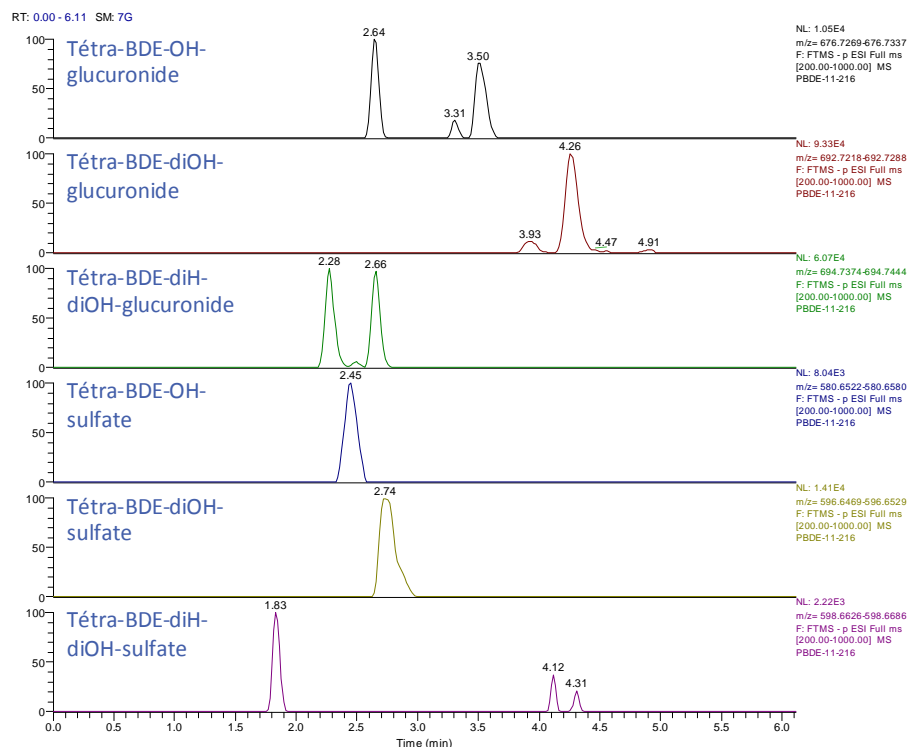


Figure II-31 : Chromatogrammes d'ions extraits de métabolites conjugués de PBDE hydroxylé, dihydroxylé ou dihydro diol obtenus en LC-ESI-HRMS

L'ion quasi-moléculaire du conjugué sulfate du tétra-BDE-dihydrodiol a également été recherché, mais la présence de ce métabolite n'a pas été confirmée. En effet, si des signaux ont été détectés au rapport m/z correspondant à la formule brute de ces métabolites ($C_{12}H_7O_6SBr_4$), le massif isotopique caractéristique d'un composé tétra-bromé n'a été clairement visualisé pour aucun des trois pics détectés, en première intention visibles sur le chromatogramme d'ions extraits de la figure II-31, en raison d'un signal trop faible.

L'utilisation de deux techniques d'ionisation complémentaires a permis de mettre en évidence la présence de métabolites conjugués. Il s'agit de la première fois que des métabolites conjugués sont identifiés pour le BDE-47. Auparavant, des conjugués de bromophénols avaient été observés *in vivo* chez des rats exposés au BDE-47 et des PBDE conjugués avaient été observés *in vivo* chez des rats exposés au BDE-99 (Chen et al., 2006; Sanders et al., 2006).

2.2.2 - Métabolisme sur microsomes hépatiques

En complément de ces travaux sur hépatocytes humains, le métabolisme du BDE-47 a été exploré à l'aide de microsomes hépatiques, afin notamment de vérifier l'implication des enzymes de phase I dans le métabolisme de ce composé par les hépatocytes humains, et pour confirmer les différences inter-espèces observées. Pour cela, des incubations ont été réalisées avec des

microsomes hépatiques humains et de rat. Seul un métabolite a été observé pour les microsomes humains, et aucun lorsque les incubations ont été réalisées avec des microsomes de rat, confirmant les différences de métabolisme entre les deux espèces déjà observées avec les hépatocytes en culture primaire. Ce métabolite a été identifié en LC-APPI-HRMS comme étant le tétra-BDE dihydrodiol, sur la base de ses temps de rétention, en radio-HPLC et en LC-APPI-HRMS, ainsi que de son spectre de masse identique à celui présenté sur la figure II-28.

2.2.3 - Métabolisme sur lignées cellulaires

Le métabolisme du BDE-47 a également été étudié sur quatre lignées cellulaires humaines : la lignée surrénalienne H295R, la lignée hépatocytaire HepG2, la lignée ovarienne HO-23, et la lignée intestinale LS174T, choisies car ce sont des cibles des PBDE. L'étude de la répartition de la radioactivité a montré que la quasi-totalité du BDE-47 était présent dans les cellules après incubation. La réalisation de profils en radio-HPLC avec la même méthode que pour les incubations sur hépatocytes humains a montré la présence d'un seul métabolite dans les incubations avec des cellules surrénaliennes différenciées à l'ACTH ou à la FSK, ayant un temps de rétention de 18 minutes, comme le montre la figure II-32.

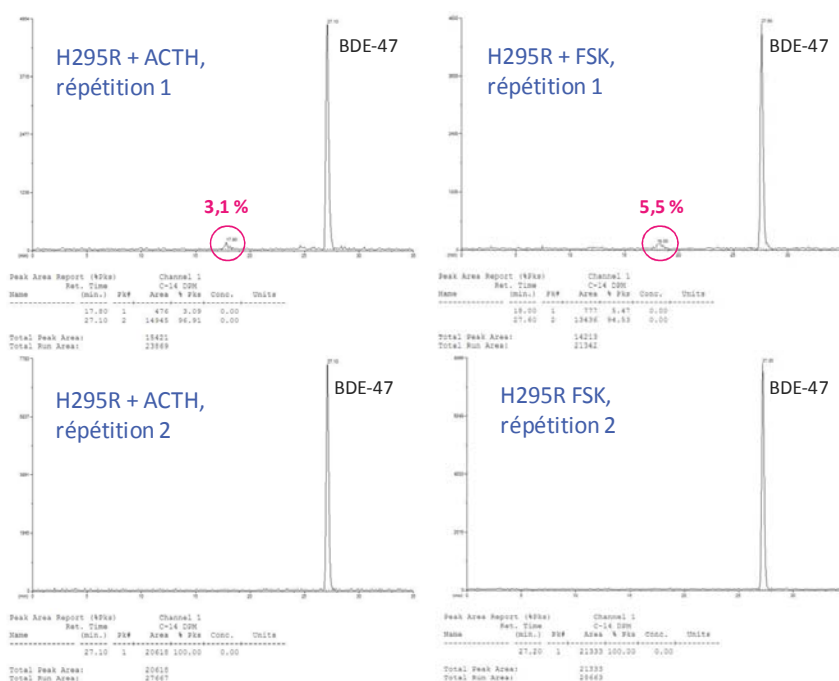


Figure II-32 : Radio-chromatogrammes d'échantillons de cellules obtenus pour les incubations d'H295R avec 1µM de BDE-47

D'après les résultats des incubations sur hépatocytes humains, il peut s'agir de tétra-BDE hydroxylé à ce temps de rétention. Cependant, la formation de métabolite hydroxylé n'a pas été confirmée. En effet, aucun métabolite n'a été observé lors des incubations réalisées dans les

mêmes conditions en duplicat et en triplicat. Comme le montre la figure II-32, la proportion de ce métabolite est de l'ordre de quelques pourcents. Cette faible occurrence pourrait expliquer que ce métabolite n'a été observé que dans l'une des trois répétitions. Les quantités de ce métabolite étant trop faibles, l'identification n'a pas été confirmée en LC-APPI-HRMS.

Les essais sur les autres lignées cellulaires n'ont pas montré de métabolisme du BDE-47. L'absence de métabolisme sur HepG2 montre que les résultats obtenus sur les hépatocytes en culture primaire ne sont pas transposables à cette lignée cellulaire.

2.2.4 - Conclusions sur le métabolisme du BDE-47

Le métabolisme du BDE-47 a été étudié pour la première fois sur plusieurs lignées cellulaires humaines, et sur des hépatocytes humains et de rat en culture primaire ainsi que sur microsomes hépatiques des deux espèces. Seuls les hépatocytes humains en culture primaire et les microsomes hépatiques humains ont métabolisé le BDE-47, et nos résultats confortent et complètent ceux obtenus sur microsomes hépatiques par Lupton *et al.* qui avaient observé la dihydroxylation du BDE-47 (Lupton *et al.*, 2009). A partir des identifications structurales, nous avons caractérisé le métabolisme du BDE-47 par les hépatocytes humains comme étant un métabolisme à la fois de fonctionnalisation (phase I) et de conjugaison (phase II). Afin de quantifier les différents métabolites, les pics observés sur les radio-chromatogrammes ont été assignés à partir des résultats d'identification en LC-HRMS comme indiqué sur la figure II-33, prenant pour exemple l'incubation avec les hépatocytes de l'individu 2 à 5 μ M.

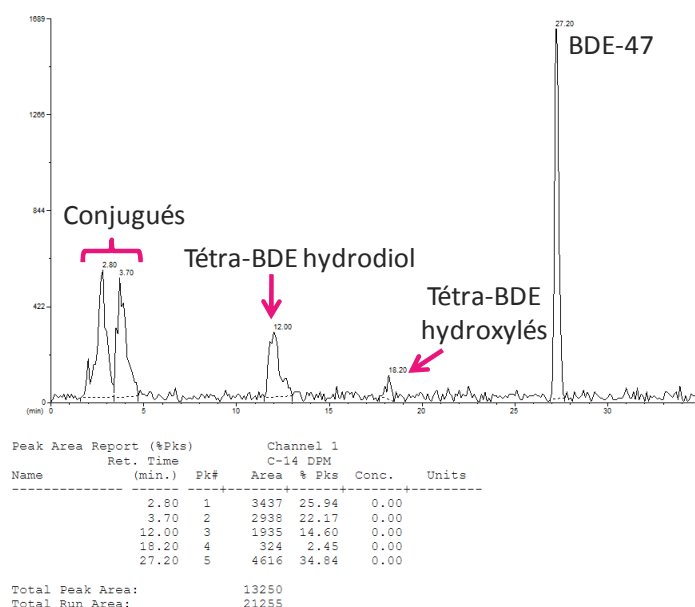


Figure II-33 : Identification des métabolites du BDE-47 sur un radio-chromatogramme

Il apparaît sur ce radio-chromatogramme que les différents conjugués identifiés ne sont que partiellement séparés avec le système chromatographique utilisé pour les profilages radio-HPLC. Cependant, le choix qui a été fait est celui d'un système radio-HPLC permettant de quantifier le composé parent, les métabolites de polarité intermédiaire (OH-PBDE) et les métabolites beaucoup plus hydrosolubles (conjugués). De plus, la radioactivité était un facteur limitant dans ces essais. La concentration de 5 μM facilite l'identification structurale puisqu'une quantité suffisante de métabolites est produite pour réaliser leur identification structurale, mais il s'agit de la concentration maximum techniquement utilisable pour le BDE-47. En effet, il n'est pas possible, pour des raisons de solubilité dans les tampons d'incubation, d'envisager de travailler à des concentrations plus élevées. La concentration de 1 μM est quant à elle la plus faible concentration techniquement envisageable pour une étude de métabolisme du BDE-47, compte tenu de sa faible activité spécifique. Une stratégie de marquage au tritium aurait pu mener à une activité spécifique supérieure, mais n'était pas envisageable (une perte de radioactivité interviendrait par exemple lors des hydroxylations). Toutes ces raisons ont limité la quantité de matériel disponible, en termes de radioactivité, pour réaliser une optimisation poussée de notre gradient radio-HPLC, et nous avons choisi de privilégier l'utilisation des échantillons en vue des identifications structurales. Ces contraintes techniques ne sont pas spécifiques à notre étude, et il sera donc difficile, pour ces raisons, d'optimiser davantage ce type d'approche *in vitro* pour des composés tels que les PBDE.

La quantification a donc été effectuée par groupes de pics regroupant des familles de métabolites. La proportion de chaque famille de métabolite identifié pour chaque incubation est ainsi présentée sur la figure II-34, en prenant en compte les valeurs du tableau II-11

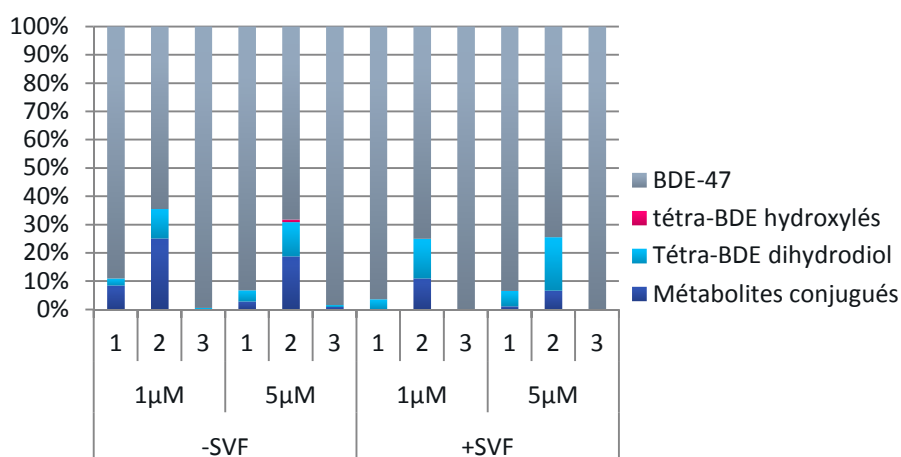


Figure II-34 : Histogramme représentant le pourcentage des métabolites identifiés dans les incubations avec hépatocytes humains

Ce graphique met en valeur le fait que les métabolites qui étaient attendus, à savoir les tétra-BDE hydroxylés, sont présents seulement à hauteur de 1% pour un individu, dans l'incubation à 5µM, alors que les métabolites nouvellement identifiés sont les plus abondants. En particulier, le tétra-BDE dihydrodiol représente 1 à 10% de la radioactivité dans les incubations sans SVF à 1µM, et les conjugués 0, 8 et 25 % de la radioactivité dans ces mêmes incubations. Les incubations avec SVF présentent un taux de métabolisation plus faible, et une proportion de métabolites conjugués nettement inférieure aux incubations sans SVF. Ces métabolites conjugués sont d'ailleurs prédominants.

Auparavant, Stapleton *et al.* ont étudié le métabolisme du BDE-99 sur hépatocytes humains et avaient identifié en tant que métabolites des PBDE hydroxylés, des bromophénols et un composé non identifié. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces résultats apparemment discordants. Tout d'abord, la dihydroxylation du BDE-99 est probablement plus limitée que celle du BDE-47 car il existe seulement deux carbones libres adjacents sur le composé parent. En ce qui concerne les métabolites conjugués, les auteurs ont effectué une extraction liquide/liquide sur les échantillons avec un mélange MTBE/hexane qui a pu empêcher la reprise de ces composés polaires avec les PBDE hydroxylés. Dans ce cas ils n'auraient donc pas pu identifier ces métabolites car seule la fraction apolaire de l'extraction liquide/liquide a été analysée (Stapleton et al., 2009). Cette hypothèse est plausible car les PBDE conjugués avaient auparavant été identifiés dans une étude *in vivo* de métabolisme du BDE-99 chez le rat (Chen et al., 2006).

La présence de composés de type bromophénols était également anticipée, car ces composés avaient été observés sur microsomes humains, et sur hépatocytes humains en culture primaire avec le BDE-99 (Lupton et al., 2009; Stapleton et al., 2009). La présence de bromophénols a effectivement été observée en LC-HRMS, mais il s'agissait de dérivés tri et tétra-bromés, dont les structures ne sont à priori pas compatibles avec des métabolites du BDE-47. Les origines de ces composés pouvant être diverses et les processus de bromation des PBDE par voie métabolique étant hautement improbable, nous ne considérons pas, en l'état, que ces composés soient des métabolites du BDE-47.

2.3 - METABOLISME DU BDE-209

2.3.1 - Métabolisme sur hépatocytes en culture primaire

Dans le cas du BDE-209, la solubilisation dans le milieu de culture est, comme dans le cas du BDE-47, une étape délicate qui ne peut pas s'affranchir de la présence de SVF. Cette solubilisation a été de 45 et 51 % dans les incubations sans SVF et de 73 et 78% dans les

incubations avec SVF, à 1 et 5 μM respectivement. Des différences sont aussi visibles sur le schéma de répartition de la radioactivité de la figure II-35.

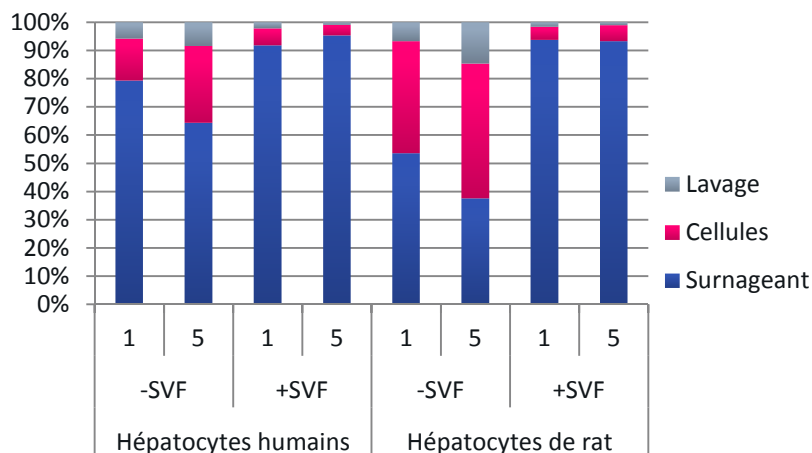


Figure II-35 : Répartition de la radioactivité observée entre le surnageant, les cellules et la solution de lavage des puits, en fonction des différentes conditions de culture testées

Dans les incubations sans sérum, la radioactivité est répartie équitablement entre les cellules et le surnageant pour les incubations avec hépatocytes de rat, alors qu'elle est retrouvée principalement dans le surnageant pour celles hépatocytes humains. En présence de SVF, la radioactivité se trouve en majorité dans le surnageant, en fin d'incubation. Il semblerait donc que le SVF limite l'absorption du BDE-209 par les cellules.

Si ces résultats laissent au départ supposer un métabolisme différent entre les deux espèces, les profils réalisés en radio-HPLC ont montré qu'en fait, aucune des deux espèces n'a métabolisé le BDE-209. Compte tenu de la quantité de radioactivité injectée pour enregistrer ces profils qui est de 13 000 dpm en moyenne, et de la sensibilité de la méthode qui permet de détecter une radioactivité minimum de 300 dpm, seuls les métabolites représentant plus de 2 ou 3 % de la radioactivité totale étaient détectables. Encore une fois, pour des études en radio-HPLC, il sera difficile de dépasser ces limites. Toutefois, on ne peut exclure que pour des concentrations inférieures, une biotransformation limitée du BDE-209 soit possible. En raison des mêmes limitations techniques que pour le BDE-47, concernant l'activité spécifique de la molécule radio-marquée, il serait impossible de quantifier cette biotransformation par radio-HPLC. L'absence de biotransformation constatée, est par ailleurs parfaitement en accord avec les résultats de Stapleton *et al.* en 2009 sur le métabolisme du BDE-209 sur hépatocytes humains en culture primaire, au cours desquelles aucun métabolisme n'a été observé. Cependant, nous avons observé dans les incubations à 5 μM que le BDE-209 avait un effet toxique visible au microscope sur les cellules humaines, et dans une moindre mesure sur les cellules de rat.

2.3.2 - Métabolisme sur lignées cellulaires

Les essais sur cellules surrénaliennes ont été effectués sur 4 réplicats, dans trois conditions de culture différentes : à savoir avec des cellules non différenciées, ou différenciées soit à la forskoline (FSK), soit à l'adrénocorticotrophine (ACTH), afin de stimuler la production d'enzymes du métabolisme des hormones stéroïdiennes. Un seul essai a été effectué avec de l'ACTH et de l'ITS, un facteur de croissance. Le comptage des trois fractions récupérées montre une répartition de la radioactivité équilibrée entre le surnageant et les cellules, comme le montre la figure II-36. L'incubation avec l'ITS fait exception, car ce mélange, tout comme le SVF avec les hépatocytes, favorise la dissolution du BDE-209 qui reste alors dans le surnageant. Des résultats similaires aux incubations sans ITS ont été observés pour les autres lignées cellulaires, à savoir la lignée hépatocytaire HepG2, la lignée ovarienne HO-23, et la lignée intestinale LS174T.

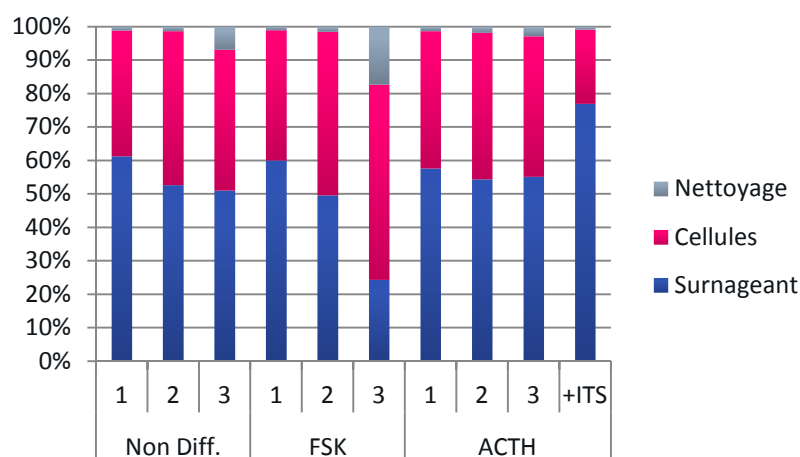


Figure II-36 : Répartition de la radioactivité observée entre le surnageant, les cellules et la solution de lavage des puits, en fonction des différentes conditions de culture testées

L'enregistrement des profils radio-HPLC a montré la présence d'autres composés que le BDE-209 dans des échantillons de cellules, élués respectivement à 32 et 41 minutes dans le système chromatographique utilisé, présenté dans le paragraphe 1.3.3. Cependant, ces mêmes composés ont également été observés dans un blanc d'incubation sans cellules, comme indiqué sur la figure II-37 représentant le pourcentage de ces métabolites et du BDE-209 dans les incubations (somme surnageant + cellules). Sur cette figure, le maximum de l'échelle de l'axe des ordonnées est fixé à 20%, afin de mieux apprécier la faible proportion des métabolites. Les résultats sont présentés pour les cellules H295R et les cellules ovariennes HO23.

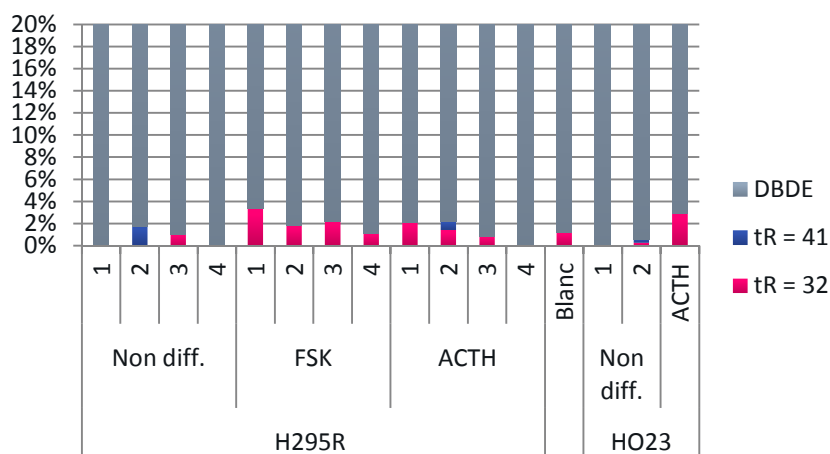


Figure II-37 : Répartition de la radioactivité observée entre le surnageant, les cellules et la solution de lavage des puits, en fonction des différentes conditions de culture testées

Dans ces incubations, plus de 96% de la radioactivité correspond au BDE-209 inchangé. L'essai blanc, également présenté sur ce graphique fait référence à la troisième incubation. Un composé est systématiquement détecté dans les incubations avec forskoline, avec un temps de rétention de 32 minutes, dans trois incubations sur quatre avec ACTH et dans une seule incubation sur cellules non différenciées. Le composé au temps de rétention de 41 minutes correspond probablement au BDE-206, par comparaison aux mélanges de synthèse non purifiés. Cependant, il n'est pas certain qu'il s'agisse d'un métabolite. En effet, la quantité de BDE-209 ajoutée aux incubations correspond à 50 000 dpm, et la récupération du BDE-209 depuis le surnageant ou le mélange eau/ACN de récupération des cellules est très difficile. Malgré les précautions, la perte de BDE-209 à l'étape de reprise est de 50% environ, et les profils ont été réalisés sur 14 000 dpm en moyenne, avec une variabilité importante. Les composés plus polaires sont probablement mieux repris, et leur proportion par rapport au composé parent augmente donc, ce qui pourrait expliquer qu'ils ne soient pas visibles dans les solutions avant leur utilisation, mais le soient sur certains profils. Les variations entre les différentes incubations peuvent provenir du fait que les composés autres que le BDE-209 sont présents à des quantités proches de la limite de détection, et que leur observation est donc très dépendante de la quantité de radioactivité injectée. Il est donc préférable, au vu des quantités très faibles, de la présence de ce produit dans un blanc, et des raisons évoquées ci-dessus de considérer qu'il s'agit d'impuretés plutôt que de métabolites. Les essais sur les autres lignées cellulaires n'ont pas non plus montré de métabolisme du BDE-209, même si le composé à 32 minutes a parfois été observé dans des proportions du même ordre de grandeur.

2.3.3 - Conclusions sur le métabolisme du BDE-209

Malgré nos efforts et la mise en œuvre de systèmes *in vitro* hépatiques et extra-hépatiques incluant des modèles issus des cibles tissulaires connues du BDE-209 que sont les ovaires et les surrénales (Riu et al., 2008; Seyer et al., 2010), il n'a pas été possible de mettre en évidence la débromation de ce RFB. En ce qui concerne les hépatocytes en culture primaire, il est envisageable que des effets cytotoxiques du BDE-209 soient responsables de l'absence de métabolisme observée. Pour toutes les incubations, il est clair que la solubilité extrêmement limitée du BDE-209 dans les milieux aqueux entraîne une très mauvaise biodisponibilité pour les enzymes du métabolisme, ce qui peut expliquer ces résultats. Il était toutefois important de vérifier, en particulier au niveau du foie, des surrénale et des ovaires, si une prise en charge métabolique pouvait se produire.

Cette absence de métabolisme sur les hépatocytes en culture primaire et sur les lignées cellulaires, qui est en accord avec les tentatives précédentes d'autres équipes (Stapleton et al., 2009), ne prouve toutefois par de manière non équivoque la non métabolisation du BDE-209 par des systèmes *in vitro*, d'autant que le métabolisme du BDE-209 a été observé *in vivo* chez le rat et le poisson. Chez le rat, il a été montré que le processus de débromation pouvant mener jusqu'à la perte de cinq atomes de brome existait, ainsi que les processus d'hydroxylation et de méthoxylation (Morck et al., 2003; Riu et al., 2008). Chez le poisson seule la débromation a été observée (Stapleton et al., 2004; Stapleton et al., 2006). Ce constat, accompagné de la preuve que des PBDE moyennement bromés sont métabolisés par des hépatocytes et des microsomes humains (Cheng et al., 2008; Lupton et al., 2009; Stapleton et al., 2009), nous font penser que le métabolisme du BDE-209 chez l'être humain est très probable. L'absence de résultats *in vitro*, est selon nous plutôt due aux problèmes liés à la solubilisation du BDE-209 en milieu aqueux et au fait que les systèmes cellulaires que nous avons utilisés, à savoir les lignées cellulaires, ne sont peut être pas suffisamment efficaces. Nous avons par exemple montré que les résultats obtenus pour le BDE-47 sur les hépatocytes humains en culture primaire ne sont pas transposables à la lignée cellulaire hépatique HepG2. Il serait donc pertinent, afin de compléter nos résultats, d'étudier le métabolisme du BDE-209 sur des systèmes *in vitro* tels que des tranches d'organes en survie.

Chapitre 3 : Caractérisation de l'imprégnation de l'Homme aux RFB et à leurs métabolites

1 - INTRODUCTION

Le premier volet de cette étude, dont les résultats ont été présentés dans le chapitre précédent, nous a apporté des indications précieuses et nouvelles concernant le métabolisme des RFB chez l'Homme. Ces travaux ont d'une part confirmé que des cellules d'origine humaine peuvent métaboliser ces composés, et d'autre part mis en évidence que les métabolites observés chez l'homme concordent avec ceux observés par ailleurs pour d'autres espèces animales. En particulier, nous avons identifié des formes conjuguées pour le TBBPA et des dérivés hydroxylés pour les PBDE. Nous avons également identifié des métabolites précédemment inconnus, à savoir les dérivés dihydrodiol et des conjugués du BDE-47. Ces différents métabolites observés *in vitro* à partir d'hépatocytes humains en culture primaire sont susceptibles d'être produits *in vivo*, et donc d'être observables dans les fluides biologiques. L'étape suivante de ce projet a consistée à rechercher ces métabolites ainsi que certains RFB natifs dans des échantillons biologiques d'origine humaine. Ceci a été réalisé au Laboratoire d'étude des résidus et des contaminants dans les aliments (LABERCA) à Nantes.

Les échantillons analysés dans le cadre de ce projet ont été prélevés selon un protocole respectant les règles éthiques et porté par le CHU de Toulouse. Le travail de développement a consisté dans un premier temps à déterminer les principaux analytes à rechercher, au regard des résultats obtenus lors de nos études de métabolisme et des informations disponibles dans la littérature. Ensuite, une méthode pour l'identification et la quantification de ces analytes par spectrométrie de masse, et un protocole de préparation des échantillons, ont été développés. Initialement élaborée pour le lait maternel, la méthode a par la suite été adaptée aux autres matrices. La dernière étape a consisté à appliquer cette méthode aux échantillons à notre disposition, afin de générer les premières données françaises indicatives des niveaux d'imprégnation de l'Homme aux substances visées, en ce qui concerne les métabolites de RFB.

Dans cette phase de notre travail, plusieurs caractéristiques pouvant *a priori* être à l'origine d'un niveau élevé de difficulté, doivent ici être soulignées. Le premier élément est le niveau de concentration extrêmement faible attendu pour la plupart de ces métabolites dans les fluides biologiques humains. Des calculs préliminaires, basés sur des données bibliographiques et une première approximation des performances analytiques envisageables tenant compte des prises d'essai réduites disponibles, nous ont en effet indiqué que les niveaux attendus seraient probablement très proches des seuils de détection. Le second élément est l'absence de substances de référence marquées aux isotopes stables pouvant garantir une bonne procédure d'étalonnage interne pour les métabolites visés, ce qui a imposé d'aborder l'aspect quantitatif de cette étude avec réserve, et donc dans une optique semi-quantitative. Sur le plan qualitatif, qui était le principal objectif de notre étude, à savoir la mise en évidence de certains métabolites chez l'Homme, le challenge était

donc conséquent et imposait *de facto* une parfaite maîtrise d'un protocole analytique s'annonçant complexe.

1.1 - PRELEVEMENTS BIOLOGIQUES

Les échantillons ont été prélevés au CHU Paule de Viguier de Toulouse, dans le service de gynécologie-obstétrique dirigé par le D^r Alain Berrebi. Ce projet, dont le CHU est le promoteur légal, a fait l'objet d'une présentation devant le comité d'éthique régional (CCPPRB) en février 2010, et l'autorisation de prélèvement a été obtenue le 15 mars. Les prélèvements ont ainsi commencé au printemps 2010.

Ceux-ci ont été réalisés après consentement éclairé de la patiente, chez des femmes majeures devant accoucher par césarienne, prévoyant d'allaiter leur enfant et ne présentant pas de pathologie connue. Les patientes dont la grossesse était pathologique, de niveau de compréhension insuffisant ou encore présentant une maladie virale ou bactérienne contagieuse n'ont pas été incluses dans l'étude. Les participantes avaient la possibilité de se rétracter à tout moment et sans justification.

Les échantillons prélevés lors de l'intervention sont le sang maternel, le sang du cordon ombilical et la graisse sous-cutanée, et, après l'intervention, les urines du nouveau-né et le lait maternel. Les échantillons de sang ont été centrifugés après prélèvement pour récupérer le sérum. Ces échantillons ont été stockés à -20°C dans des tubes silanisés afin de limiter une éventuelle perte en RFB par adsorption sur le verre. Les échantillons ont ensuite été envoyés au LABERCA dans de la carboglace par un transporteur spécialisé. Lors de leur inclusion dans la base de données du laboratoire immédiatement à réception, tous les échantillons ont été anonymisés.

Un questionnaire succinct a été rempli par les patientes participant à l'étude, afin de collecter quelques informations d'ordre général, médical, et concernant leur alimentation. Ce questionnaire de 4 pages, accompagné de la fiche d'inclusion validant la participation de la patiente à l'étude, est présenté en annexe. Ce questionnaire comprend des données socio-économiques telles que l'âge ou la profession de la patiente. Quelques données concernant l'alimentation et le contact avec les matières plastiques sont également demandées, puis des données gynécologiques concernant l'enfant né lors de l'étude et concernant la parité ou la durée d'allaitement par exemple. Des données médicales sont ensuite demandées. Le pourcentage de femmes qui peuvent être incluses dans l'étude est de l'ordre de 10 % de la totalité des femmes accouchant par césarienne puisqu'environ 50 % n'allaitent pas leur enfant, que 30% présentent une pathologie à l'accouchement, et que 10 % n'entrent pas dans les autres critères d'inclusion.

1.2 - PRESENTATION DES ANALYTES

1.2.1 - Sélection des RFB natifs et des métabolites d'intérêt

L'étude bibliographique a donné des indications pour l'établissement d'une liste des métabolites à rechercher (voir Chapitre 1). Elle nous a tout d'abord incités à rechercher les PBDE hydroxylés, que nous avons par ailleurs identifiés comme métabolites dans nos études *in vitro*. Les polybromophénols ont été écartés à cause des sources multiples quant à leur origine, et donc de leur manque de pertinence en tant que biomarqueur de l'exposition aux PBDE. Le cas des PBDE méthoxylés, qui ont eux aussi plusieurs origines potentielles était resté en suspend car ils sont plus rarement identifiés comme métabolites (en comparaison avec les PBDE hydroxylés). Nos résultats sur le métabolisme du BDE-47 n'ayant pas montré la présence de PBDE méthoxylés, ceux-ci n'ont pas été inclus dans la liste des métabolites à rechercher. Par contre, les métabolites conjugués et dihydrodiols que nous avons identifiés lors de nos études *in vitro* devraient être recherchés dans les prélèvements humains, parallèlement aux OH-PBDE.

Pour ce qui est du TBBPA, les données relatives à l'impregnation humaine à ce composé étant peu nombreuses, nous avons recherché ce composé sous sa forme native afin d'enrichir les connaissances à son sujet. Nos résultats relatifs au métabolisme du TBBPA ayant montré que les hépatocytes humains sont capables de conjuguer ce composé, les métabolites de phase II (conjugués glucuronide et/ou sulfate) ont donc été ajoutés à la liste des analytes cibles.

Nous avons également recherché l'HBCD car les données à son sujet sont encore très limitées, surtout en ce qui concerne le sérum de cordons ombilicaux. Cependant, les éventuels métabolites de ce dernier n'ont pas été recherchés, faute d'avoir été clairement identifiés.

Après avoir établi la liste des composés que nous souhaitons rechercher, nous avons tenté de nous procurer les standards, parmi ceux commercialement disponibles, à la fois sous forme native et sous forme marquée aux isotopes stables. En effet, l'identification non ambiguë des analytes cibles se fait, tout comme dans le cas des études de métabolisme, par comparaison à des standards de référence. Ensuite, la manière la plus juste de mesurer la quantité d'un composé en spectrométrie de masse est la dilution isotopique, utilisant donc des standards natifs (^{12}C) et marqués (^{13}C). Or, s'il existe des standards natifs et marqués pour le TBBPA et l'HBCD (diastéréoisomères α , β , γ), ce n'est pas le cas de la plupart des métabolites. Toutefois, il existe depuis peu des standards natifs d'OH-PBDE, mais seulement deux ou trois standards marqués. Le choix des standards natifs d'OH-PBDE s'est finalement porté sur les trois tétra-BDE hydroxylés les plus souvent observés dans la bibliographie, un tri-BDE hydroxylé qui a été identifié trois fois dans des échantillons biologiques humains, un penta- et un hexa-BDE hydroxylés potentiels métabolites de PBDE indicateurs, ainsi

qu'un octa-BDE hydroxylé. Il n'existe en revanche aucun standard de PBDE dihydroxylé ou dihydrodiol, ni de formes conjuguées du TBBPA ou des PBDE. Afin de contourner ce problème, les formes conjuguées peuvent être identifiées et quantifiées, à partir des standards disponibles, après déconjugaison, en tant que composés parents (TBBPA ou OH-PBDE).

1.2.2 - Etude des propriétés physico-chimiques des analytes cibles

Avant d'initier un développement analytique quel qu'il soit, il est toujours préférable de prendre connaissance des principales caractéristiques physico-chimiques des analytes cibles. Quelques données concernant les composés parents étudiés, le TBBPA et l'HBCD, ayant été présentées dans le premier chapitre, nous avons cherché des informations sur les métabolites cibles, à savoir les OH-PBDE et les conjugués des OH-PBDE et du TBBPA, dont certaines formules brutes sont présentées sur la figure III-1.

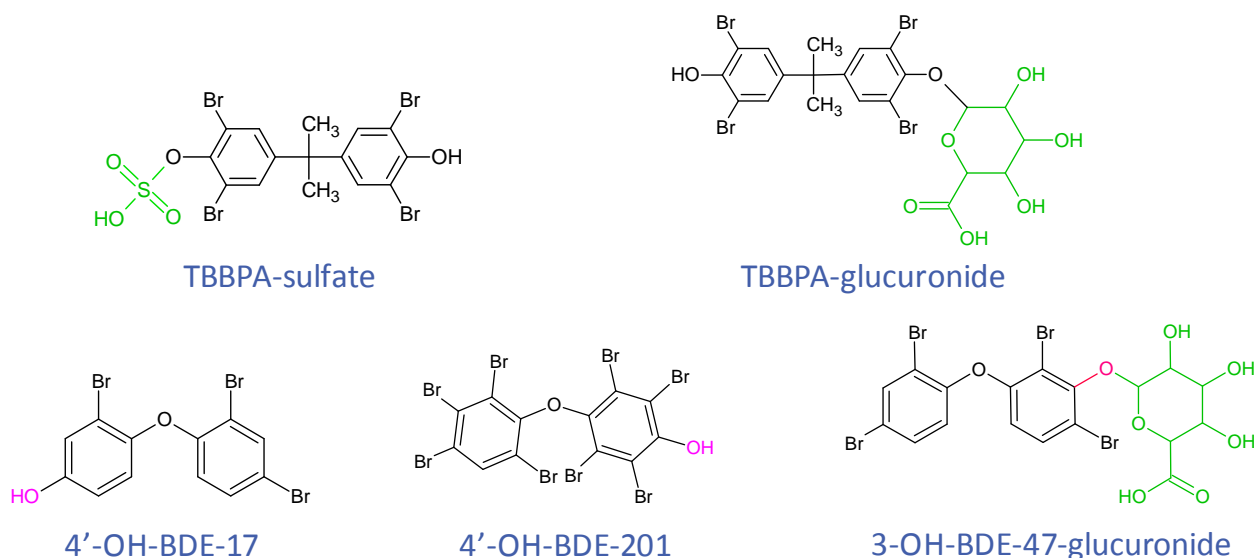


Figure III-1 : Structures chimiques semi-développées des métabolites conjugués du TBBPA et des métabolites hydroxylés des PBDE plus particulièrement étudiés

Les données physico-chimiques disponibles concernant ces métabolites sont très limitées, mais il est possible d'en calculer certaines de manière théorique, grâce à des logiciels de prédiction et de modélisation. Des valeurs de pKa (Grossman and Finkel, 2006) et de logP (VCCLAB, 2005) ainsi calculées sont présentées dans le tableau III-1.

Tableau III-1 : Valeurs de pKa et de logP estimées pour certains métabolites de RFB.

	pKa		logP	
	Selon source (1)	Selon source (2)	Selon source (2)	PBDE parent source (2)
α -HBCD			6,74 \pm 0,75	
β -HBCD				
γ -HBCD				
TBBPA	6,8 – 6,8	8,1	6,7 \pm 0,65	
Glucuronide	3 – 6,8 – \approx 13		4,79 \pm 1,08	
Double glucuronide	3 – 3 – \approx 13		2,67 \pm 1,40	
Sulfate	-2,6 – 6,8		5,16 \pm 1,11	
Double sulfate	-2,6 – -2,6		3,69 \pm 1,87	
Glucu-sulfate	3 – -2,6 – \approx 13		3,34 \pm 1,22	
4'-OH-BDE-17	9,3	9	5,23 \pm 0,41	5,68 \pm 0,28
3-OH-BDE-47	6,3	8	5,99 \pm 0,57	6,40 \pm 0,43
6-OH-BDE-47	7,7	8	5,98 \pm 0,56	
4'-OH-BDE-49	7,9	6,2	5,86 \pm 0,56	6,38 \pm 0,41
5'-OH-BDE-99	7,5	8	6,68 \pm 0,71	7,05 \pm 0,57
6'-OH-BDE-100	7,7	8	6,66 \pm 0,70	7,07 \pm 0,59
3'-OH-BDE-154	6,2	8	7,34 \pm 0,89	7,71 \pm 0,76
4'-OH-BDE-201	6,2	5	8,51 \pm 1,21	8,87 \pm 1,12
BDE-47 dihydroxylé	6 à 8		5,62 \pm 0,81	
BDE-47 dihydrodiol	12,8		3,89 \pm 0,46	
BDE-47-6-hydroxy-sulfate	-2,6		4,21 \pm 0,87	
BDE-47-6-hydroxy-glucuronide	2,9 - \approx 13		3,85 \pm 0,93	

(1) aceorganic.pearsoncmg.com/epoch-plugin/public/pKa.jsp (Grossman and Finkel, 2006)(2) <http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html> (VCCLAB, 2005)

Ces valeurs de pKa estimées suggèrent que les fonctions hydroxyles des OH-PBDE seraient majoritairement sous forme non dissociée dans le lait maternel et le sérum, qui ont un pH généralement compris entre 7 et 7,5. Les groupements glucuronides ou sulfate des conjugués sont quant à eux sous forme dissociée.

Les valeurs de logP estimées confirment que la réaction de conjugaison a pour conséquence d'abaisser fortement cette valeur, et que les métabolites de phase II sont hydrosolubles. Les OH-PBDE présentent eux des valeurs de logP relativement élevées, très proches de celle du PBDE parent, et ils semblent donc modérément polaires. Les valeurs de logP et de pKa montrent au final que ces PBDE hydroxylés ont des caractéristiques assez proches du TBBPA, et qu'ils devraient par conséquent se comporter de manière similaire.

Pour cette phase de développement analytique, nous nous sommes par ailleurs appuyés sur les travaux antérieurs de l'équipe, une méthode ayant déjà été développée pour la mesure du TBBPA et de l'HBCD. Cette méthode est encore en application pour l'HBCD, avec détection par LC-ESI-MS/MS (Cariou, 2006b).

2 - MATERIEL ET METHODES

2.1 - METHODE DE DETECTION ET DE MESURE PAR LC-HRMS

2.1.1 - Présentation de la méthode

La recherche et la mesure de polluants chimiques, ou de leurs métabolites, à l'état de traces dans des échantillons biologiques est un exercice très exigeant car il s'agit d'allier une identification non ambiguë à une détection à de très faibles niveaux de concentration. La méthode utilisée doit donc être à la fois très spécifique et très sensible.

S'agissant de la technique de détection, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ou haute résolution (HRMS) peuvent répondre à ces attentes. L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem et à basse résolution a été rapidement écartée en raison d'un manque de spécificité, puisque les signaux diagnostiques exploitables pour l'identification de l'HBCD et du TBBPA sont dans ce cas du type $[M-H]^- \rightarrow [Br]^-$ (Cariou, 2006b). Nous avons donc choisi de baser nos développements sur la spectrométrie de masse haute résolution en exploitant un instrument de type trappe ionique orbitale (Thermo LTQ-Orbitrap et/ou Exactive) pour satisfaire aux exigences de spécificité. En outre, un autre avantage du couplage LC-HRMS sur ce type d'instrument est la possibilité d'acquisition des données en mode de balayage complet (full scan) sans perte notable de sensibilité. Ceci permet d'élargir notablement le champ d'investigation par rapport à la MS/MS et au mode d'acquisition MRM très ciblé, particulièrement utile pour rechercher et identifier des composés dont les standards ne sont pas disponibles. Tout comme c'était le cas de la méthode LC-APPI-HRMS décrite précédemment, nous prévoyions que le gain de spécificité offert par la haute résolution ne se fasse pas au détriment de la sensibilité. La résolution choisie pour l'application de cette méthode est de 25 000.

S'agissant de la technique d'ionisation, le mode électrospray négatif (ESI⁻) est globalement adapté à l'analyse du TBBPA et des OH-PBDE en raison de leur fonction hydroxyle facilement ionisable, et de l'HBCD en raison du caractère électronégatif des composés halogénés. L'ionisation par ESI⁻ du TBBPA et des OH-PBDE conduit ainsi à la formation quasi-exclusive de l'ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$, comme ceci est visible sur la figure III-2 présentant les spectres de masse de quatre composés parmi nos analytes. Sur ces spectres de masse, les massifs des ions quasi-moléculaires des standards marqués sont également visibles et signalés en rose. Pour le γ -HBCD, dont le spectre de masse est également présenté sur la figure III-2 l'ion quasi-moléculaire est majoritaire, mais des adduits chlore et acétate sont aussi observés. Il en est de même pour les deux autres HBCD, mais les proportions d'adduits varient légèrement.

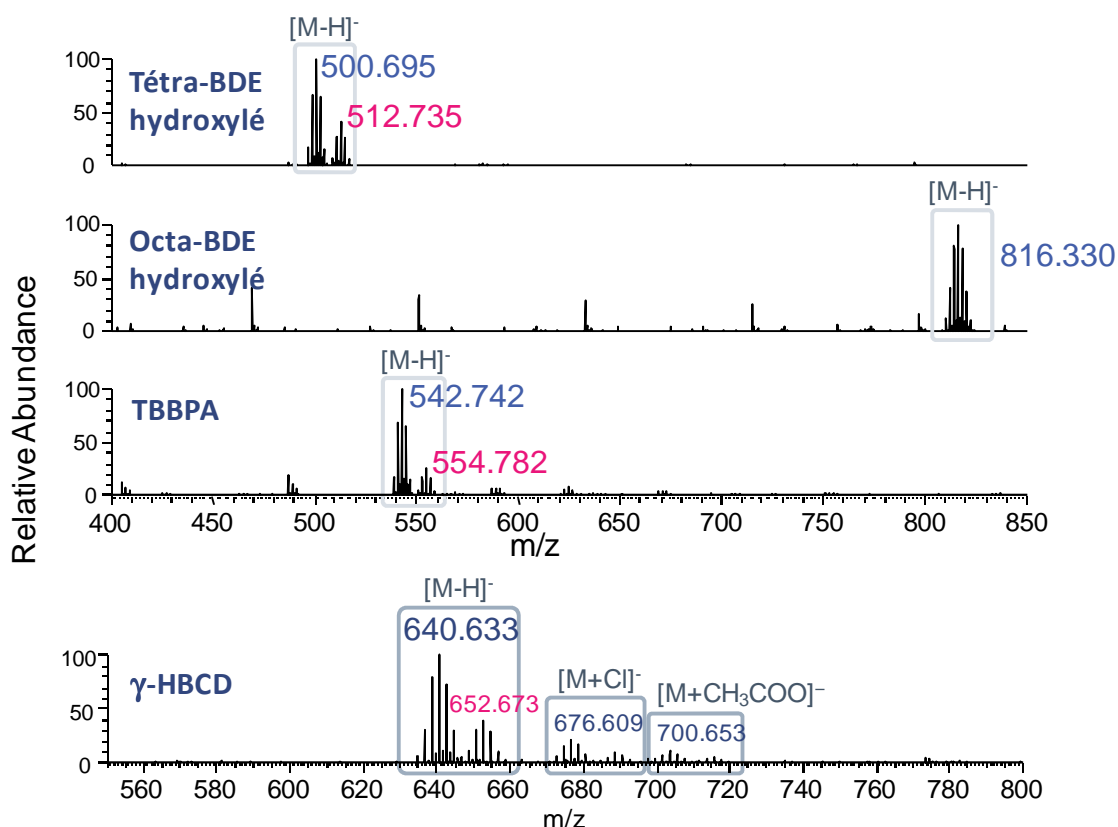


Figure III-2 : Spectres de masses LC-ESI-HRMS de deux PBDE hydroxylés (500 pg), du TBBPA (2 ng) et du γ -HBCD (6 ng) obtenus pour l'injection de solutions de calibration sur l'Exactive

Les ions diagnostiques finalement utilisés pour le suivi et la quantification des analytes sont listés dans le tableau III-2, pour chacun des standards à notre disposition. Il s'agit des deux ions majoritaires du massif isotopique de l'ion $[M-H]^-$ de ces composés. Notre travail de développement a ici consisté à optimiser manuellement les principaux paramètres de source (température, flux de gaz de désolvatation, etc.) et d'ionisation (potentiel de capillaire, tension de cône, systèmes optiques de transmission des ions, etc.) afin de maximiser la sensibilité de détection de ces composés.

Tableau III-2 : Temps de rétention et valeurs de m/z des ions diagnostiques suivis pour la détection des analytes cibles.

	m/z analyte (natif, ^{12}C)	m/z étalon interne (marqué, ^{13}C)
TBBPA	542,743 ; 540,745	554,783 ; 552,785
α -HBCD	640,635 ; 638,637	652,675 ; 650,677
β -HBCD		
γ -HBCD		
4'-OH-BDE-17	420,788 ; 422,786	-
3-OH-BDE-47	500,698 ; 498,700	-
4'-OH-BDE-49		-
6-OH-BDE-47		512,738 ; 510,740
5'-OH-BDE-99	578,609 ; 580,607	-
3'-OH-BDE-154	658,517 ; 656,519	-
4'-OH-BDE-201	816,337 ; 814,339	-

S'agissant de la séparation chromatographique, la colonne utilisée est de type C₁₈ Hypersil Gold de dimensions 100 mm x 2,1 mm x 1,9 µm (Thermo Fisher Scientific), et les phases mobiles sont de l'ACN avec 0,1% d'acide acétique et de l'eau avec 0,1% d'acide acétique. Le gradient d'élution utilisé, initialement d'une durée totale de 25 minutes, a été retravaillé pour devenir le gradient présenté sur la figure III-3, d'une durée totale de 16 minutes.

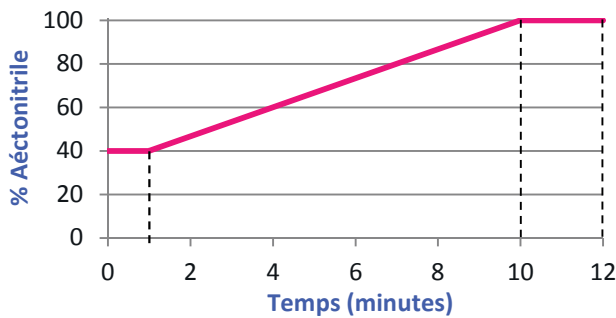


Figure III-3 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation par chromatographie liquide du TBBPA, des PBDE hydroxylés et de l'HBCD

Avec le gradient développé, tous les analytes sont séparés de façon satisfaisante, notamment les trois OH-tétra-BDE et les trois HBCD, comme ceci est visible sur la figure III-4, représentant les chromatogrammes d'ions extraits observés pour une solution de standards.

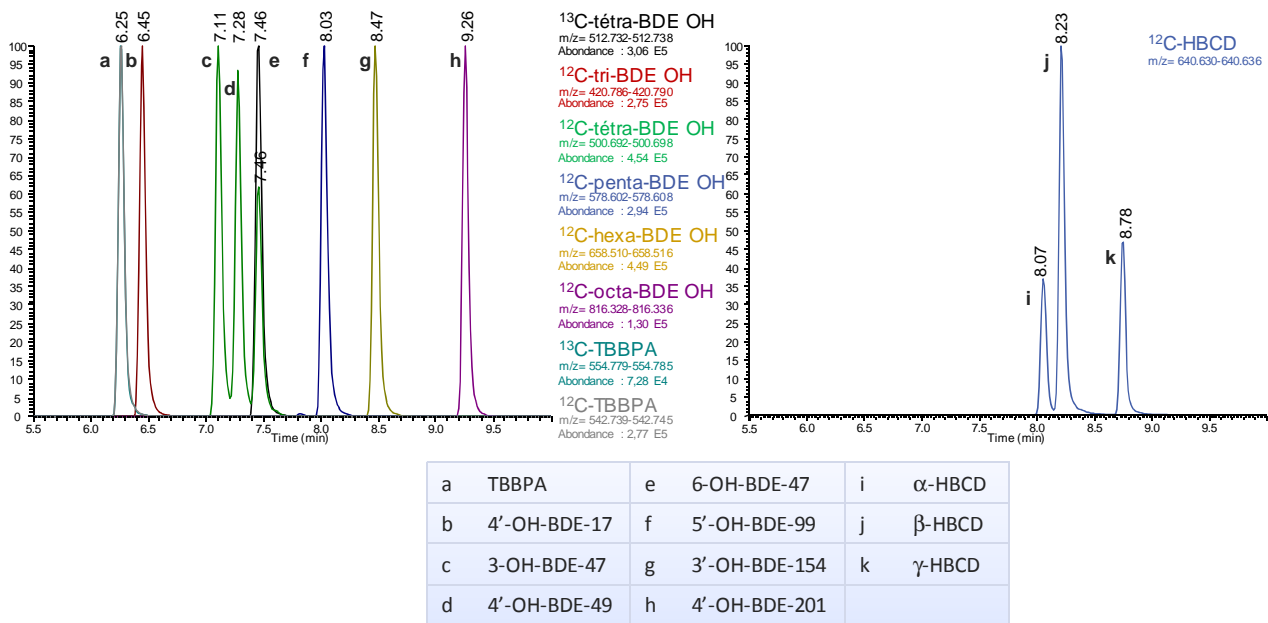


Figure III-4: Chromatogrammes d'ions extraits obtenus pour l'injection de deux solutions standards (phénols à gauche et HBCD à droite) avec le gradient sélectionné sur Hypersil Gold C₁₈

2.1.2 - Critères d'identification non ambiguë des analytes

L'identification des analytes a été basée sur les mêmes critères que ceux utilisés au sein de l'Unité Contaminant de façon réglementaire dans le cadre du contrôle de résidus et contaminants chimiques dans les denrées d'origine animale (directive 2002/657/CE). Pour que la présence d'un composé soit confirmée, plusieurs critères doivent être validés. Le premier est que le temps de rétention relatif du composé natif par rapport au composé marqué doit varier de moins de 2,5% (pour une séparation chromatographique en phase liquide) par rapport à une valeur de référence, qui dans notre cas a été obtenue pour une solution standard. Le second critère est qu'au moins deux ions diagnostiques (pour une mesure en haute résolution) sur quatre recherchés doivent être détectés, avec un rapport signal sur bruit supérieur à 3. Le troisième critère est que le rapport d'intensité mesuré entre deux de ces ions doit correspondre à celui observé pour l'échantillon de référence. La tolérance autorisée pour ce dernier critère dépend de la valeur de ce rapport d'intensité, le principe général consistant à être d'autant plus tolérant que l'abondance du second signal par rapport au premier est faible. La tolérance est ainsi de 20, 25, 30 et 50% pour un rapport $> 0,5$; $]0,2-0,5]$; $]0,1-0,2]$ et $\leq 0,1$ respectivement. Afin de faciliter et d'uniformiser le travail d'identification, un fichier Excel mis en place au sein de l'Unité a été utilisé, dont un exemple sera présenté dans la partie « résultats », à la figure III-13. Les ions utilisés pour l'identification sont les quatre isotopomères majoritaires du massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire, présentés sur les spectres de la figure III-5.

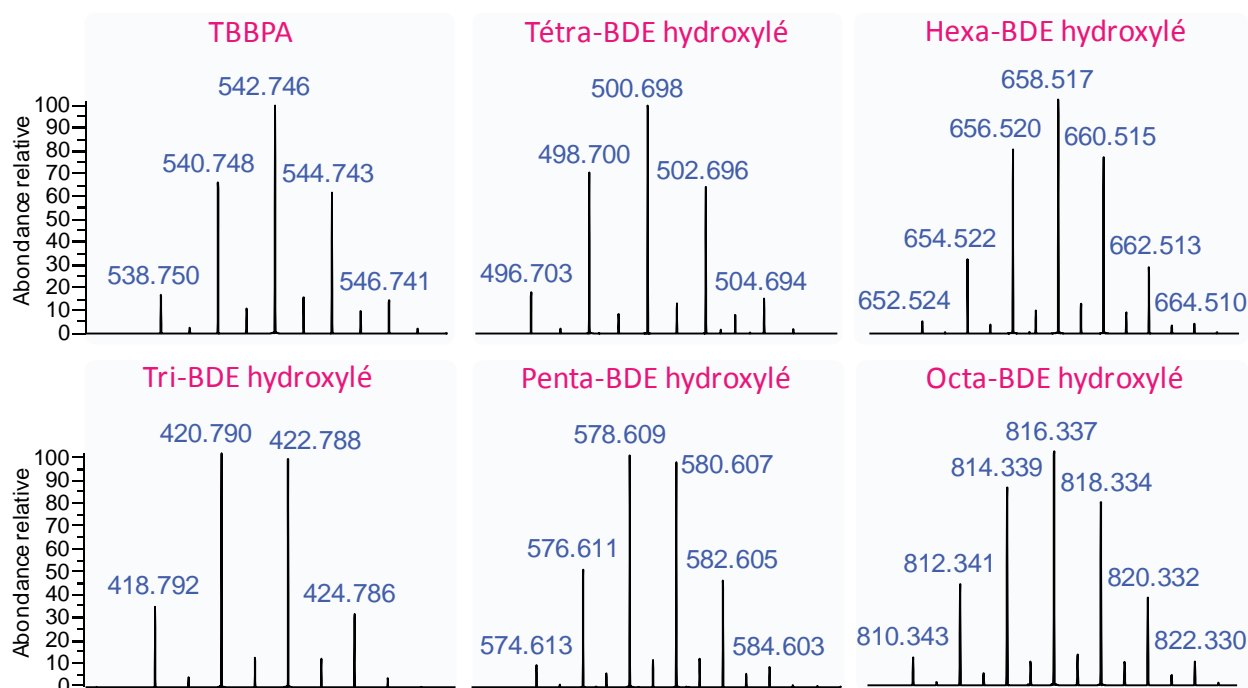


Figure III-5 : Massifs isotopiques des ions quasi-moléculaires du TBBPA et des OH-PBDE

2.1.3 - Procédure de quantification des analytes

La détermination des niveaux de concentration des composés cibles dans les échantillons a été réalisée par la méthode de dilution isotopique. Pour cela, des étalons internes marqués au ^{13}C sont ajoutés aux échantillons en début de préparation ainsi que dans les solutions de calibration, dont la composition est présentée dans le tableau III-3. Dans les solutions contenant les composés phénoliques (TBBPA et OH-PBDE) préparées dans le méthanol, les standards internes sont le ^{13}C -TBBPA et le ^{13}C -6-OH-BDE-47. Les solutions standards utilisées pour la mesure de l'HBCD sont celles utilisées quotidiennement par l'unité contaminant du LABERCA. Elles sont préparées dans le toluène, et doivent être évaporées à sec sous azote et reprises dans l'acétonitrile avant injection.

Tableau III-3 : Concentrations des analytes (pg/ μL) dans les différentes solutions de calibration utilisées.

	Phénols			HBCD	
	^{12}C -TBBPA	^{12}C -OH-PBDE	^{13}C	^{12}C	^{13}C
Solution de calibration 1	0,5	0,2	50	2	50
Solution de calibration 2	2	0,5		10	
Solution de calibration 3	10	2		50	
Solution de calibration 4	50	10		200	
Solution de calibration 5	200	50		600	
Solution de calibration 6	1 000	200		-	-
Solution de calibration 7	5 000	1000		-	-
Solution de quantification	-	-	50	-	50

Les droites d'étalonnages ont été tracées à partir de ces solutions de calibration, en reportant le rapport des aires (A) $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ en fonction du rapport des quantités injectées (Q) $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$. Une fois la linéarité de cette droite vérifiée, le facteur de réponse relatif (RRF) est calculé pour chaque composé. Il s'agit de la pente de la droite, calculée pour chaque point de la gamme de calibration. La valeur moyenne de ces mesures est le RRF moyen, finalement utilisé pour le calcul de la concentration dans les échantillons, selon la formule écrite sur la figure III-6, où m est la masse de l'échantillon.

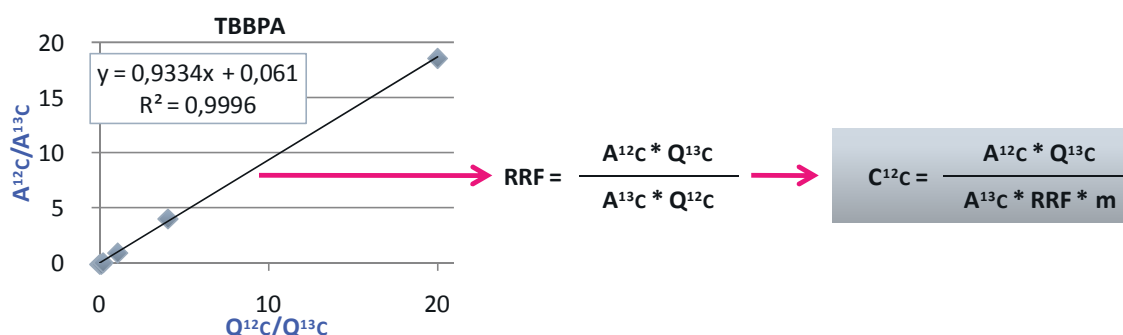


Figure III-6 : Méthode de calcul appliquée pour la quantification des analytes dans les échantillons

2.1.4 - Caractérisation et suivi des performances analytiques

Sur les deux instruments utilisés (LTQ-Orbitrap™ et Exactive, Thermo Fisher Scientific), les limites de détection et de quantification instrumentales se situent aux environs du pg injecté, l'Exactive montrant toutefois des performances légèrement supérieures. Ce dernier, disponible au laboratoire depuis mai 2011, a été utilisé dès que possible pour la plupart de nos analyses particulièrement exigeantes sur le plan de la sensibilité. Au final, les composés pour lesquels la sensibilité est apparue la moins bonne sont l'octa-BDE hydroxylé (identifiable à partir de 2 pg injectés) et les HBCD (de 4 à 10 pg injectés). En comparaison, les limites de détection des HBCD par couplage LC-MS/MS sont environ deux fois supérieures. Ces valeurs sont apparues *a priori* compatibles avec la recherche des composés cibles à des concentrations de l'ordre du pg/g dans les prélèvements biologiques. Ces limites de détection instrumentales seules ne sont toutefois pas suffisantes pour atteindre notre objectif de sensibilité. Afin d'accomplir le challenge fixé, ces conditions de mesure spectrométrique optimales (instrument parfaitement calibré, optimisé, et au meilleur de ses performances), doivent aller de paire avec une grande maîtrise du protocole de préparation des échantillons (afin d'assurer un rendement d'extraction maximal et répétable), et ceci pour chacune des séries d'analyses réalisées. Pour chaque échantillon la limite de détection des analytes a été calculée sur la base de l'intensité des standards internes, avec la formule ci-dessous :

$$\text{LOD} = \frac{A^{12}\text{C} * Q^{13}\text{C}}{A^{13}\text{C} * m}$$

L'aire $A^{12}\text{C}$ a été fixée à 5 000 pour les injections effectuées sur l'Orbitrap et 1 500 pour celles effectuées sur l'Exactive, comme étant une valeur d'aire pour laquelle l'identification du composé est assurée (*i.e.* intensité de signal correspondant à un rapport signal sur bruit supérieur à 3). Cette valeur a été déterminée après que toutes les analyses aient été effectuées. La quantité de standard interne $Q^{13}\text{C}$ est la quantité ajoutée à l'échantillon, multipliée par le volume injecté. L'aire $A^{13}\text{C}$ est celle du standard interne dans l'échantillon, et m est la prise d'essai. Ce calcul donne une indication sur la qualité de la préparation des échantillons pour les composés pour lesquels nous disposons de standards marqués.

Afin de garder sous contrôle les performances du système de mesure, et de maintenir des conditions de travail optimales, la solution de calibration 1, présentée dans le tableau III-3 a été injectée régulièrement au cours des différentes séquences d'injection des échantillons, comme contrôle qualité. Ceci dans le but de confirmer que la limite de détection instrumentale était inférieure, sur l'Exactive, à 2 pg injectés d'OH-PBDE, 5 pg de TBBPA et 20 pg d'HBCD. L'observation de tous

les ions diagnostiques suivis était une condition *sine qua non* pour le lancement des injections sur les échantillons. Dans le cas où cette condition n'était pas remplie, l'instrument était à nouveau nettoyé, si nécessaire recalibré, et le cas échéant les paramètres de fonctionnement réoptimisés. La variabilité de l'abondance de signal brut rapportée à la moyenne (calculée *a posteriori* sur l'ensemble des mesures réalisées) est présentée sur la figure III-7 dans l'ordre chronologique, pour deux étalons internes. La variabilité observée, relativement importante, doit tout d'abord être relativisée par le très faible niveau de concentration en présence, ainsi que par le fait que l'évaluation est faite sur l'abondance du signal brut (et non pas relatif au bruit, comme cela est le cas lors de l'évaluation de la répétabilité des méthodes analytiques). L'amplitude globalement constatée d'environ +/- 40% nous est apparue néanmoins acceptable, notamment car elle ne semble pas pénalisante vis-à-vis de notre objectif premier, qui était le maintien des seuils de sensibilité précédemment mentionnés, même dans le cas des « points bas » du graphique présenté à la figure III-7.

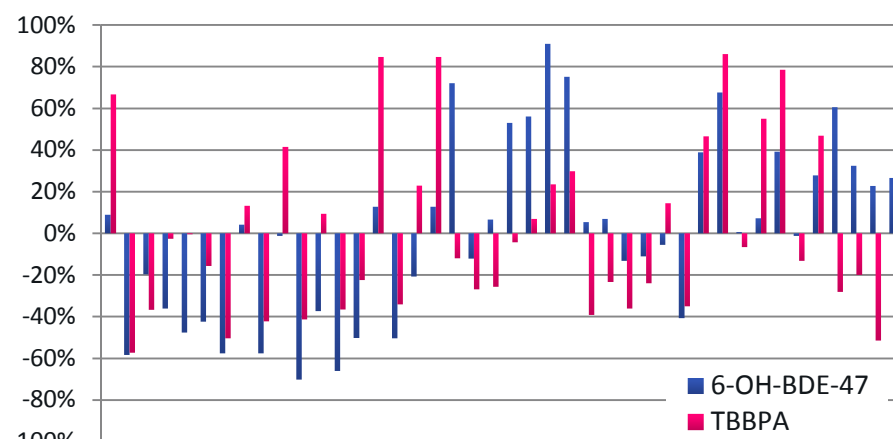


Figure III-7 : Ecart à la moyenne (pourcentage) des contrôles qualité

2.2 - PROTOCOLE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS

2.2.1 - Réflexions préliminaires et présentation de la stratégie globale

Le développement de la méthode de préparation des échantillons en amont de l'analyse par spectrométrie de masse a été initialement basé sur le lait maternel, en supposant que l'étude de cette matrice particulièrement complexe pourrait être ensuite transposée sans difficulté majeure aux autres matrices à notre disposition. Le lait maternel est en effet riche en divers composé pouvant interférer avec l'extraction des composés d'intérêt, puisqu'il s'agit de l'émulsion d'une phase lipidique dans une phase aqueuse concentrée en protéines et glucides, dont l'interface est stabilisée par des protéines amphiphiles. Cette matrice a également été privilégiée pour son caractère central dans notre étude, puisque reflétant d'une part l'imprégnation de la mère et d'autre part l'exposition par voie alimentaire du nouveau-né allaité. La transposition aux autres matrices a bien entendu été

vérifiée par la suite. Nos principaux objectifs étaient de mettre au point une méthode qui soit rapide, peu consommatrice en échantillon compte tenu des faibles volumes disponibles, et qui permette d'identifier les analytes à des niveaux de concentration faibles. Le taux de récupération et la justesse du calcul de la concentration dans les échantillons ont été les principaux paramètres utilisés comme critères de performance de la méthode.

L'objectif de limite de détection, que nous nous sommes fixé en cohérence avec la bibliographie, est 10 pg/g d'échantillon, particulièrement difficile à atteindre compte tenu des faibles volumes d'échantillon disponibles, en particulier pour le sérum pour lequel nous disposions souvent de moins de 5 mL. Pour ces composés lipophiles fortement associés à la matière grasse présente dans les échantillons, le faible taux de lipides présent dans le sérum (inférieur à 1% contre quelques % dans le lait maternel) est un autre facteur aboutissant à une quantité finalement extrêmement faible de composés cibles à détecter dans cette matrice. Notre première intention a donc été de développer une méthode exploitant les propriétés très différentes des analytes afin de rechercher tous les composés à partir d'une seule prise d'essai qui soit cohérente avec les volumes disponibles et avec nos objectifs. Notre stratégie a donc consisté dans un premier temps à séparer les formes conjuguées (glucuronides et/ou sulfates de TBBPA et d'hydroxy-PBDE) des formes libres (TBBPA, OH-PBDE et HBCD), et dans un second temps à purifier séparément ces deux fractions afin d'éliminer un maximum de composés interférents pouvant perturber la mesure par spectrométrie de masse. Pour cela, un partage liquide-liquide entre une phase organique polaire et une phase apolaire a été envisagé, en considérant que les formes conjuguées passeraient préférentiellement dans la première et les formes libres dans la seconde. Ensuite, la fraction conjuguée a été soumise à une hydrolyse enzymatique afin de retrouver les formes libres pouvant alors être identifiées et quantifiées avec les standards sélectionnés et présentés dans la partie 1.1.1. Le traitement de la fraction libre s'est avéré plus complexe, et après plusieurs essais nous avons décidé de séparer les composés phénoliques (TBBPA et OH-PBDE) de l'HBCD via un passage en milieu alcalin sous forme phénolate. Trois fractions sont donc finalement obtenues (formes conjuguées, composés phénoliques et HBCD), qui subissent une étape de purification par SPE avant reprise pour injection en LC-HRMS. Une représentation schématique détaillée de ce protocole est donné plus bas sur la figure III-10.

2.2.2 - Prise d'essai et prétraitement des échantillons

Le volume d'échantillon disponible pour les différents prélèvements réalisés s'est avéré assez variable, mais généralement aux alentours de 10 mL pour le lait et de 4 à 5 mL pour le sérum. Lorsque ceci était possible, la prise d'essai a donc été fixée à 5 mL, et dans le cas des prélèvements pour lesquels la quantité disponible était inférieure, la totalité de l'échantillon a été utilisée pour

analyse. Préalablement à l'extraction, le pH des échantillons a été ajusté en dessous du pKa des OH-PBDE et du TBBPA par ajout d'acide acétique, pour atteindre une valeur de 4 ou 5 environ. Nous avons en effet remarqué que la récupération des composés est meilleure dans ces conditions, surtout pour les composés les plus bromés. Une autre étape cruciale est l'ajout des standards marqués (étalons internes) pour la quantification.

2.2.3 - Extraction des composés d'intérêts

Nous avons choisi de travailler sur des échantillons bruts, sans avoir recours à la lyophilisation, et d'appliquer comme nous l'avons mentionné précédemment une extraction liquide/liquide (LLE) pour séparer les conjugués et les composés apolaires (TBBPA, OH-PBDE, HBCD). Pour des matrices riches en protéines tel que le lait ou le sérum, il est nécessaire de dénaturer les protéines préalablement à l'extraction, sans quoi celle-ci ne pourrait avoir lieu correctement. Nous avons opté pour une précipitation de ces protéines par un solvant organique. L'acétone a été choisi car il est très efficace et moins nocif que le méthanol ou l'acétonitrile. L'hexane a quant à lui été choisi comme solvant apolaire pour l'extraction de la fraction lipidique.

L'extraction a été effectuée dans des proportions en échantillon/acétone/*n*-hexane de 5/5/5 (v/v/v) respectivement. L'extraction des analytes apolaires est en effet apparue satisfaisante dans ces conditions. Une centrifugation, dont le résultat est montré sur la figure III-8, est ensuite réalisée pour parfaire à la fois la précipitation des protéines dans le culot et la séparation des deux phases liquides.

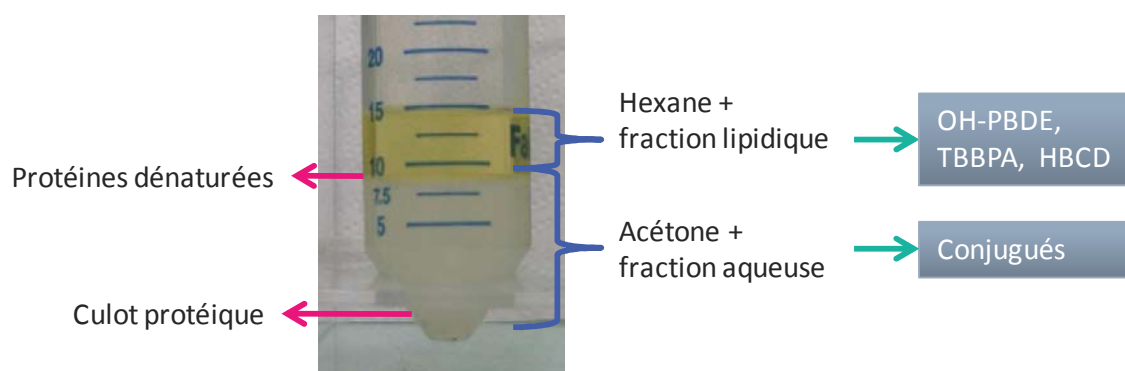


Figure III-8 : Résultat visuel d'une extraction par un mélange acétone/*n*-hexane appliquée au lait maternel (5/5/5, v/v/v)

2.2.4 - Purification des extraits

2.2.4.1 - Fraction lipidique

Une des principales difficultés de l'analyse de contaminants chimiques lipophiles est de les isoler des autres composants de la matière grasse. Une étape de dégradation et d'élimination de celle-ci est par conséquent nécessaire. Différentes techniques et approches existent pour cela, les possibilités suivantes ayant été testées :

- La dénaturation préalable à l'extraction par l'acide chlorhydrique et le propan-2-ol suivie d'une extraction par un mélange DCM/*n*-hexane
- La dénaturation par l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique dilué
- La dénaturation par l'acide sulfurique concentré
- La purification sur cartouche de silice
- La dénaturation par purification sur colonne de silice activée à l'acide sulfurique

Les deux premières options n'ont pas été retenues car la délipidation résultante n'est pas complète. La troisième option n'a également pas été sélectionnée car elle a abouti à une récupération quasi nulle du TBBPA. La quatrième solution n'est pas non plus envisageable car la plupart des lipides sont élués en même temps que la plupart des analytes. La cinquième solution est apparue la plus satisfaisante, mais la colonne de silice nécessite un temps de préparation long, et la récupération du TBBPA n'est pas satisfaisante car trop variable.

Ces différentes approches ne s'étant pas avérées satisfaisantes, une autre solution a dû être envisagée. Parmi les techniques testées, la plus efficace pour la délipidation était le traitement à l'acide sulfurique concentré, mais cela empêche la récupération du TBBPA. Afin de séparer les lipides du TBBPA, nous avons donc utilisé une propriété particulière du TBBPA qui est sa solubilité en milieu alcalin. Comme ceci est mentionné dans le tableau I-7, la solubilité du TBBPA dans l'eau est en effet de 0,1 mg/L à pH=5, de 1,26 mg/L à pH=7 et de 2,34 mg/L à pH=9. Aucune donnée de ce genre n'existe pour les OH-PBDE, mais l'étude de leurs propriétés physico-chimiques et nos essais sur standards ont confirmé qu'ils sont eux aussi solubles en milieu alcalin.

En effectuant une extraction liquide/liquide à la soude 1N, sur la fraction lipidique issue de l'étape d'extraction initiale, il est ainsi possible de récupérer deux phases, visibles sur la figure III-9. La phase inférieure est la phase aqueuse alcaline (soude) contenant les OH-PBDE et le TBBPA et la phase supérieure est la phase organique (hexane) contenant les lipides et l'HBCD.

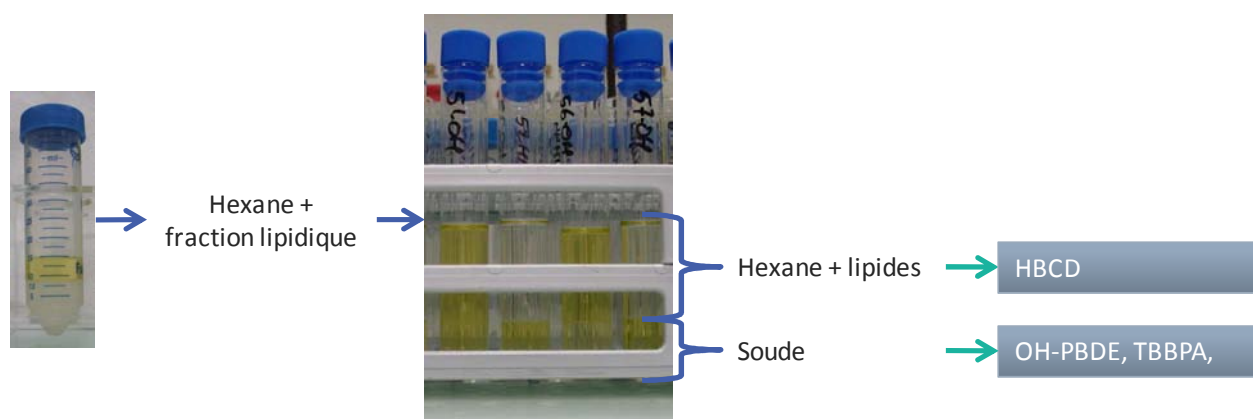


Figure III-9 : Résultat visuel d'une extraction liquide-liquide par un mélange de soude 1N et d'hexane appliquée au sérum

La fraction hexane contenant les lipides et l'HBCD est ensuite délipidée par ajout d'acide sulfurique. Deux traitements par 500 μ L d'acide sulfurique 96% sont nécessaires et suffisants pour délipider totalement la plupart des échantillons, et notamment ceux de lait maternel. La fraction basique a quant à elle été acidifiée par ajout d'acide chlorhydrique 1N en excès, afin de resolubiliser les composés hydroxylés dans un solvant apolaire (hexane).

Afin de parfaire la purification, chacune des deux fractions a subi une étape de purification sur cartouche SPE. Plusieurs types de phase stationnaire étaient envisageables, mais c'est une colonne de type silice (SiOH) qui a été choisie. Celle-ci semblait en effet adaptée à notre application compte tenu de sa capacité connue à retenir des composés de nature plutôt apolaire tout en permettant, selon des conditions utilisées, une purification concomitante de la matière grasse. Ce type de support est d'ailleurs couramment employé au sein de l'unité contaminant pour le traitement de différents types d'échantillons biologiques en vue de l'analyse de diverses classes de POP. Basé sur des travaux antérieurs de purification du TBBPA et de l'HBCD sur ce type de cartouche, les solvants utilisés étaient l'hexane et le dichlorométhane (DCM), le premier n'entraînant pas les analytes qui sont retenus sur la silice. Le conditionnement des cartouches est effectué par du DCM puis du cyclohexane. Le dépôt des extraits a été effectué dans l'hexane. Ensuite, une étape de lavage appliquée par 4 mL de DCM/*n*-hexane 10/90 (v/v) pour l'HBCD ou 20/80 (v/v) pour le TBBPA et les OH-PBDE. Cette différence de protocole est due au fait que l'HBCD est légèrement moins retenu que les autres analytes cibles sur cette phase stationnaire. L'élution se fait ensuite par 10 mL de dichlorométhane/*n*-hexane 80/20 (v/v). Ce mélange a été choisi car le composé parmi nos standards présentant la plus forte rétention, le 4'-OH-BDE-17, nécessite au moins 60% de DCM pour être élué. Considérant une marge de confiance permettant l'élution d'autres substances du même type potentiellement encore plus retenues, une proportion de 80% de DCM a donc été fixée.

2.2.4.2 - Fraction aqueuse

La fraction aqueuse, récupérée après la première LLE et contenant les formes conjuguées a été soumise à une hydrolyse enzymatique. Pour cela, il faut tout d'abord éliminer l'acétone qui dénaturerait les enzymes, par évaporation lente sous flux d'azote à 35°C durant quelques heures. Une partie de l'eau de l'échantillon est également évaporée et le volume final est de 1 à 2 mL. Du suc d'*helix pomatia* purifié, ayant une activité glucuronidase et sulfatase, et du tampon acétate 0,2M pH 5,2, le pH d'activité optimal de la glucuronidase, ont ensuite été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été mis à l'étuve à 50°C durant une nuit.

Après l'hydrolyse enzymatique, une purification sur colonne SPE Oasis HLB, particulièrement bien adaptée à l'élimination de composants hydrophiles, a été envisagée. Celle-ci est effectivement apparue efficace pour la purification, tout en permettant une récupération satisfaisante du TBBPA et de l'HBCD, mais les OH-PBDE ne sont pas récupérables dans les mêmes conditions. Cette solution a par conséquent été exclue, et c'est une extraction liquide/liquide identique à celle appliquée en début de ce protocole qui a été retenue. En effet, les composés déconjugués sont le TBBPA et les OH-PBDE, et sont donc récupérés dans l'hexane. Une purification sur SPE SiOH a donc ensuite été appliquée sur cet extrait, de la même manière que pour les deux fractions obtenues à partir de la fraction apolaire (composés phénoliques et HBCD).

2.2.5 - Reconstitution avant injection

La dernière étape du protocole consiste en l'évaporation de la fraction d'élution issue de chacune des trois purifications sur cartouche. Celle-ci se fait sous flux d'azote à 40°C. Conventionnellement, l'injection se fait dans le mélange de solvant d'équilibre de la méthode LC, dans le cas présent un mélange eau+0,1% d'acide acétique/acétonitrile+0,1% d'acide acétique 60/40 (v/v). Cependant, la récupération des analytes est apparue partielle dans ce mélange, et nous avons opté pour une reprise des extraits secs par de l'acétonitrile pur afin de maximiser la redissolution des analytes cibles, après vérification que cela n'affectait pas la séparation chromatographique par HPLC.

2.3 - PRESENTATION DE LA METHODE FINALISEE

Un schéma de la méthode finalisée est présenté sur la figure III-10, et le détail de la méthode est présenté en annexe.

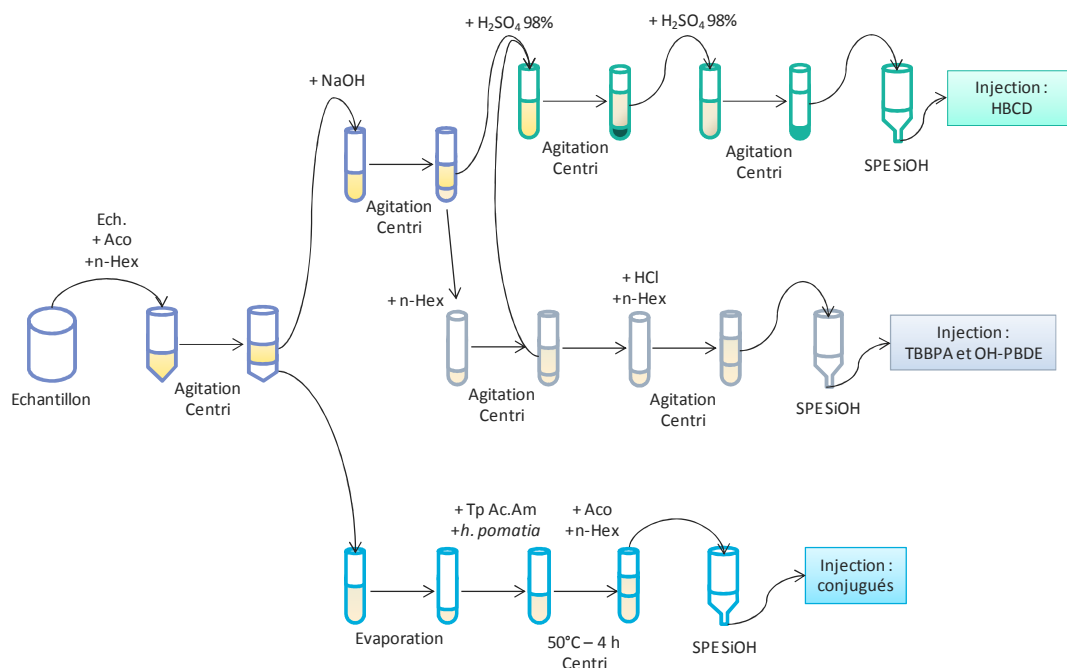


Figure III-10 : Schéma du protocole finalisé développé pour le traitement des échantillons biologiques en vue de l'isolement des différentes classes de composés ciblés.

2.3.1 - Adaptation du protocole aux autres matrices

La méthode ayant été développée pour le lait maternel, des essais ont été effectués afin d'adapter la méthode aux autres matrices à notre disposition. Pour le sérum, le protocole appliqué est le même que celui développé pour le lait maternel, mais les volumes appliqués pour la première LLE ont dû être adaptés au volume d'échantillon disponible. Ainsi, lorsque la prise d'essai est comprise entre 3 et 5 mL les volumes de solvants ajoutés étaient identiques à celle-ci, et lorsque la prise d'essai est inférieure à 3 mL, les volumes de solvants ont été fixés à 3 mL chacun.

Pour l'urine, la phase hexane récupérée après la première extraction fait directement l'objet d'une SPE SiOH puisque cette matrice ne contient pas de lipides.

2.3.2 - Evaluation de l'efficacité de la méthode

L'efficacité de la méthode pour récupérer et quantifier les analytes a été évaluée par l'analyse d'échantillons de lait et de sérum supplémentés. Des échantillons ont ainsi été supplémentés à 500 pg/g avant d'être analysés selon la méthode développée. Les procédures utilisées pour la quantification diffèrent ensuite selon le composé considéré. Ainsi, les courbes d'étalonnage utilisées pour la quantification ont été réalisées sur standard extraits, qui subissent le protocole de préparation des échantillons, pour le TBBPA et les tri- à penta-BDE hydroxylés. Pour l'HBCD, l'hexa- et l'octa-BDE hydroxylé ainsi que les conjugués, la quantification a été faite à partir d'une gamme non extraite.

C'est en utilisant l'une de ces deux méthodes de quantification qu'on a été calculées les valeurs présentées dans le tableau III-4, reportant quelques paramètres permettant d'évaluer les performances de la stratégie analytique développée pour plusieurs séries d'analyse de trois échantillons de lait supplémentés, et deux séries d'analyse de échantillons de trois sérums supplémentés. La valeur de supplémentation des échantillons est de 0,5 ng/g à l'exception des échantillons de sérum du 17/08 qui ont été supplémentés à 2 ng/g en TBBPA (mais 0,5 ng/g pour les autres substances). Les limites de détection calculées pour ces essais sont inférieures à 1 pg/g pour tous les standards marqués.

La justesse pour le TBBPA et l'HBCD est apparue satisfaisante sur les deux types de matrices, mais moins satisfaisante pour les OH-PBDE, l'écart à la valeur réelle pouvant atteindre 70% pour ces derniers. Ce constat s'explique par le fait que ces composés, à la fois apolaires et réactifs (du fait du groupement hydroxyle), ont des propriétés très différentes notamment selon le degré de bromation (voir tableau III-1). Ils peuvent se lier à divers composés, de manière différente selon leur nature et selon la nature de la matrice où ils sont présents. Il en résulte un comportement différent, même entre les différents isomères. Ceci explique la mauvaise récupération du 3'-OH-BDE-154 et du 4'-OH-BDE-201, surtout observée pour les échantillons de sérum. Ceci explique également que le seul OH-PBDE quantifié de manière satisfaisante est le seul pour lequel nous possédons le standard interne marqué, à savoir le 6-OH-BDE-47. Le manque d'étalons internes marqués adaptés est donc au final la raison à ces résultats perfectibles en ce qui concerne la justesse de quantification pour les OH-PBDE. L'objectif avant tout qualitatif de cette phase de notre étude, et le caractère semi-quantitatif de ces mesures que nous avons introduit plus haut, doit donc ici être rappelé. A l'exception des hexa- et octa-BDE hydroxylés dans le sérum, la récupération des analytes apparaît globalement satisfaisante, et les limites de détection estimées sur la base de ces essais permettent d'envisager l'identification de la plupart des analytes au seuil de 10 pg/g que nous nous étions initialement fixé.

Tableau III-4 : Résultats obtenus lors de l'évaluation des performances de la stratégie analytique développée : concentrations (pg/g) calculées après application du protocole et sur la base du système d'étalonnage retenu, pour différents échantillons supplémentés.

		4'-OH-BDE-17	3-OH-BDE-47	4'-OH-BDE-49	6-OH-BDE-47	5'-OH-BDE-99	3'-OH-BDE-154	4'-OH-BDE-201	TBBPA	α -HCB	β -HCB	γ -HCB
Lait maternel	26/07 - éch. 1	299	210	370	538	347	587	641	466			
	26/07 - éch. 2	293	233	409	586	419	550	596	491			
	26/07 - éch. 3	304	228	423	538	417	435	549	455			
	03/08 - éch. 1	212	195	203	602	258	205	754	549			
	03/08 - éch. 2	223	108	233	603	271	146	723	466			
	03/08 - éch. 3	207	198	212	605	262	217	784	556			
	12/08 - éch. 1	229	108	129	650	425	505	381		515	503	489
	12/08 - éch. 2	220	108	124	676	489	457	369		525	506	492
	12/08 - éch. 3	216	109	122	662	428	395	354		526	518	504
	Moyenne	245	166	247	607	368	389	572	497	522	509	496
	Ecart-type	41	56	123	9	86	161	170	45	6	8	8
	Ecart	-51%	-67%	-51%	21%	-26%	-22%	14%	-1%	4%	2%	-1%
Sérum bovin	12/08 - éch. 1	923	234	745	663	407						
	12/08 - éch. 2	343	72	199	635	463						
	12/08 - éch. 3	820	237	742	646	444						
	17/08 - éch. 1	559	272	515	413	209			3 085	499	509	496
	17/08 - éch. 2	698	355	729	410	213			1 466	513	507	494
	17/08 - éch. 3	1 773	863	2 020	449	215			1 292	485	516	502
	Moyenne	852	339	825	536	325	Non récupérés		1 948	499	510	497
	Ecart-type	494	273	623	124	125			989	14	5	4
	Ecart	70%	-32%	65%	7%	-35%			-3%	0%	2%	-1%

2.4 - CONCLUSION

Ces travaux de développement ont abouti à une méthode d'identification et de quantification du TBBPA, de l'HBCD, des OH-PBDE et des conjugués du TBBPA et des OH-PBDE. Cette méthode est applicable aux trois types de matrices prélevées dans le cadre de ce projet, à savoir le lait maternel, le sérum et l'urine, et répond globalement aux attentes de départ en termes de prise d'essai et de performances. En effet, la méthode de détection a été choisie et mise au point pour être la plus spécifique possible. La sensibilité de la méthode instrumentale et le protocole de préparation des échantillons assurent des limites de détection plutôt satisfaisantes, de l'ordre du pg/g d'échantillon. La justesse est également très satisfaisante pour les composés parents, mais l'est moins pour les OH-PBDE en raison du manque de composés marqués adaptés pour un étalonnage interne efficace, et d'un effet de matrice significatif pour certains composés. Pour cette famille de métabolites, les résultats générés associés, doivent par conséquent être considérés comme semi-quantitatifs. Ceci n'est que partiellement problématique car leur mise en évidence qualitative dans les fluides biologiques humains, ou non, représente en soi le premier objectif de notre projet. Une étude qualitative de l'imprégnation de l'homme aux métabolites des PBDE représente en effet à l'heure actuelle des informations très utiles du point de vue toxicologique et du point de vue plus large de l'évaluation du risque associé à ces substances, compte tenu du nombre très limité d'études à ce sujet, et de l'activité biologique de certains de ces métabolites, évoquée dans le chapitre 1..

3 - RECHERCHE DES RFB ET DE LEURS METABOLITES CHEZ L'HOMME

La méthode développée pour l'identification et la quantification du TBBPA, de l'HBCD, des OH-PBDE et des métabolites conjugués a été appliquée à un ensemble d'échantillons de sérum maternel et de cordon, de lait maternel, ainsi qu'à quelques prélèvements d'urines.

La plupart des échantillons analysés dans le cadre de notre étude ont été prélevés en 2010 et 2011. Certains prélèvements ont toutefois été collectés en 2005-2006, lors du précédent projet d'étude de l'imprégnation de l'homme aux RFB (Cariou et al., 2008; Antignac et al., 2009). Les conditions de prélèvement de ces derniers échantillons étaient identiques à celles présentées plus haut dans ce chapitre. Au total, 53 jeux d'échantillons ont été analysés, dont 38 prélevés en 2010 et 15 prélevés en 2006. La quasi-totalité (sauf deux) de ces échantillons contenait le jeu complet de prélèvements (sérum maternel, sérum de sang de cordon et tissu adipeux). En revanche (mais logiquement compte tenu des contraintes habituelles dans ce type d'étude) seuls 39 échantillons de lait maternel et 30 échantillons d'urine ont été obtenus. A noter également que parmi les 38 jeux d'échantillons prélevés en 2010, trois correspondaient à une mère ayant donné naissance à des jumeaux. L'âge moyen des participantes a été de 32,5 ans et le nombre moyen d'enfant par femme de 2,3. Ces deux données sont présentées sur les figure III-11 et III-12.

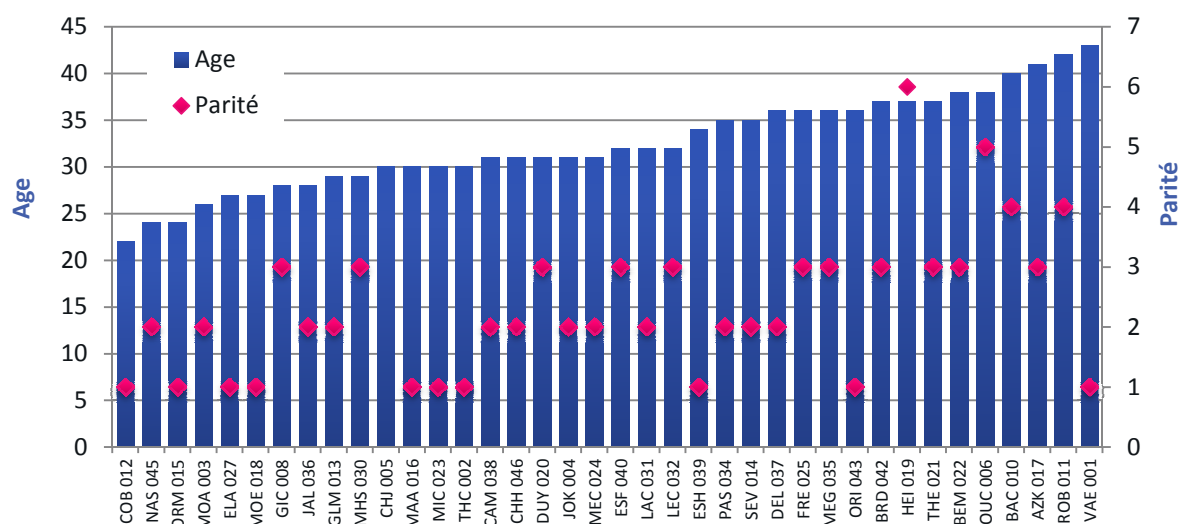


Figure III-11 : Age et parité des mères participant à l'étude.

Ces valeurs sont légèrement supérieures à la moyenne nationale, puisque l'âge moyen d'accouchement est de 30 ans, et le nombre moyen d'enfant par femme de 2,0 (INSEE, 2011). Le poids moyen des nouveau-nés était de 3,20 kg, avec des valeurs comprises entre 1,81 et 4,05 kg. La répartition détaillée en est présenté sur la figure III-12.

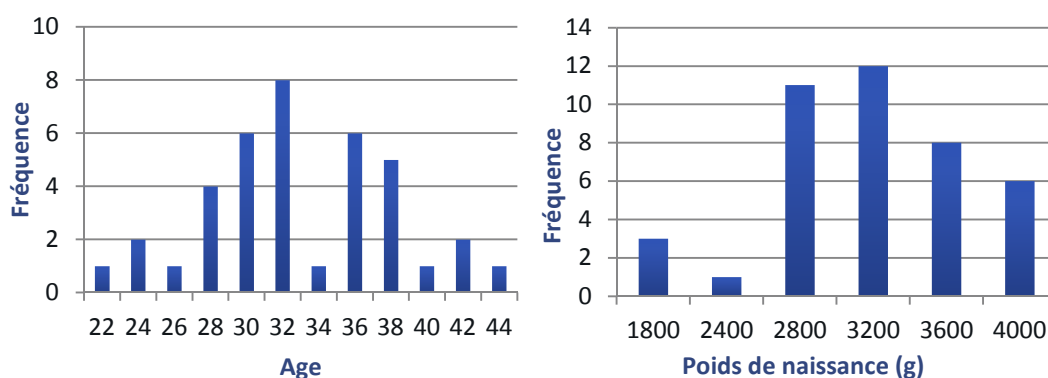


Figure III-12 : Distributions de fréquence de l'âge des mères participant à l'étude (à gauche) et du poids de naissance des nouveau-nés (à droite).

3.1 - IDENTIFICATION DES ANALYTES DANS LES ECHANTILLONS

3.1.1 - Identification ciblée des analytes

Les analytes ont été identifiés en comparaison aux standards à notre disposition, comme ceci a été décrit dans la partie 2.1.2. La figure III-13 présente deux exemples dans lesquels du TBBPA a été détecté. Pour ces deux échantillons, sur la gauche sont présentés les chromatogrammes d'ions extraits utilisés pour la détection du TBBPA natif et marqués, et sur la droite sont présentés les chromatogrammes d'ions extraits de chacun des ions du massif isotopique de l'ion $[M-H]^-$ et le spectre de masse associé. Les temps de rétention observés pour le composé natif et le composé marqué, ainsi que les aires de chacun des ions du massif isotopique ont ensuite été renseignés dans le tableau en bas à droite afin de confirmer ou non la présence du TBBPA, en prenant les valeurs observées dans un standard pour comparaison.

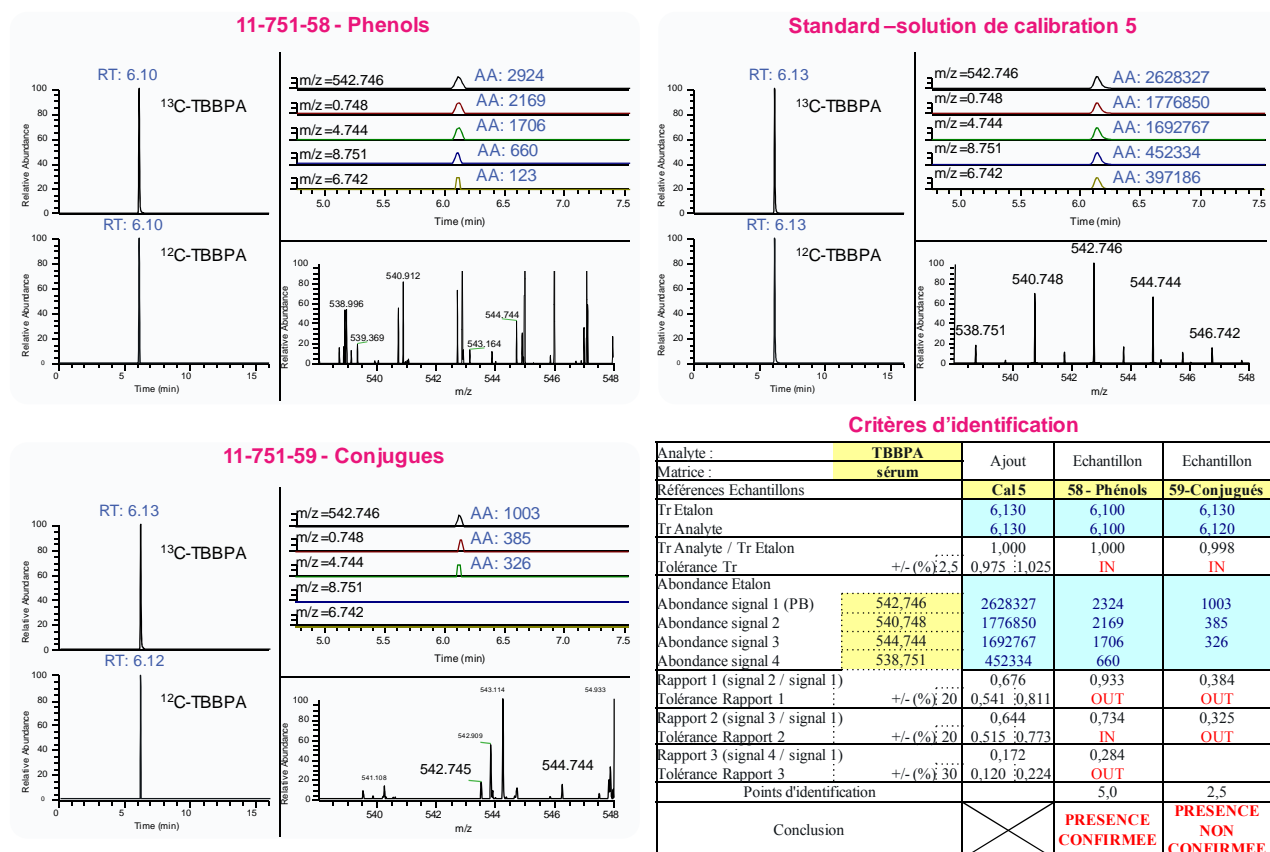


Figure III-13 : Critères utilisés pour la confirmation de la présence du TBBPA dans deux échantillons de sérum

Selon les critères énoncés dans la partie 2.1.2, le temps de rétention relatif de l'analyte par rapport à l'étalon interne doit correspondre à celui observé dans un échantillon de référence (ici la solution de calibration "cal 5"). C'est le cas des deux échantillons pour lesquels ce temps de rétention relatif est de 1,000 pour le premier échantillon ("11-751-58-Phénols") et 0,998 pour le second ("11-751-59-conjugués"). Le second critère est qu'au moins 2 des 4 ions diagnostiques doivent être détectés avec un rapport isotopique correspondant à celui observé pour l'échantillon de référence. C'est le cas du premier échantillon via un le rapport entre le troisième ion diagnostique de $m/z=544,744$ par rapport au premier ion diagnostique de $m/z=542,746$, la présence du TBBPA est donc validée. Par contre dans le cas du second échantillon les trois ions diagnostiques détectés montrent des rapports d'ions différents de celui du standard, et la présence du TBBPA dans cet échantillon n'est pas confirmée.

Les échantillons « non confirmés » n'ont toutefois pas été systématiquement rejetés et un regard critique a alors été porté sur les raisons de ce non respect des critères d'identification non ambiguë. En effet, il faut noter ici que ces critères, utilisés pour le contrôle réglementaire de résidus chimiques dans les denrées (dérivés de la décision 2002/657/CE), sont globalement très exigeants sur le plan analytique, et peuvent s'avérer partiellement adaptés dans le cadre de ce projet de recherche. En particulier en raison de la présence de signaux à de très faibles amplitudes (*i.e.* très proches du bruit

de fond), l'absence d'étalon interne marqué adapté, et/ou encore la nature de l'échantillon considéré comme référence (standard ou matrice supplémentée, niveau de supplémentation). Ces trois exemples de facteurs peuvent parfois contribuer à ne pas remplir les critères d'identification en dépit de la présence réelle de l'analyte cible. Compte tenu du fait que ces trois facteurs ont été rencontrés, il a été décidé d'assouplir les critères énoncés au paragraphe 2.1.2, qui plus est au regard de la spécificité de la méthode de mesure employée, la spectrométrie de masse haute résolution. Après application de notre méthode à la totalité de nos échantillons, il apparaît en effet que le pic détecté dans le cas du second échantillon ne correspondrait pas à un interférent mais bien à une quantité de TBBPA trop faible pour que les quantités d'ions détectées soient suffisamment précises pour valider l'identification. On remarque d'ailleurs sur les chromatogrammes d'ions de la figure III-13 la présence d'un seul pic chromatographique. Dans le cas des OH-PBDE, il apparaît important d'avoir également un regard critique sur le premier critère d'identification, car une variation de temps de rétention peut être observée en fonction de la matrice, car nous possédons un seul standard interne auquel nous référer, mais aussi en raison du grand nombre d'isomères.

Les critères d'identification tels qu'ils ont été présentés dans la partie 2.1.2 ont donc été appliqués pour tous les analytes à tous les échantillons. Ceci assure un haut niveau de confiance dans le cas où la présence de l'analyte a été confirmée. Les échantillons ne remplissant pas ces critères de façon rigoureuse, mais pour lesquels au moins un ion spécifique a été détecté avec une précision en masse d'au moins 5 ppm ($\pm 0,003$ unité à $m/z = 500$) et un temps de rétention variant de moins de 2,5% par rapport à la référence, ont donc également été considérés et ont parfois été inclus dans l'analyse des résultats, lorsque ceci en est fait mention.

En plus des analytes pour lesquels nous possédions les standards, d'autres composés ont été détectés, notamment un tétra- et un octa-BDE hydroxylé. La figure III-14 présente un chromatogramme d'ions extraits et les massifs isotopiques des ions $[M-H]^-$ de ces composés. Sur les chromatogrammes d'ions extraits, on remarque que les temps de rétention observés pour ces deux composés dans les échantillons (en rose) sont légèrement différents de ceux des standards à notre disposition (en bleu), à savoir l'octa-BDE 4'-OH-BDE-201 et les tétra-BDE 3-OH-BDE-47, 4'-OH-BDE-49 et 6-OH-BDE-47 (dans l'ordre d'élution). Cependant, les spectres de masse sont identiques, et notamment le massif isotopique des composés détectés dans les échantillons (en noir) correspond parfaitement à celui des standards (en bleu). Les deux spectres de masse ont été légèrement décalés sur la figure afin de faciliter la comparaison.

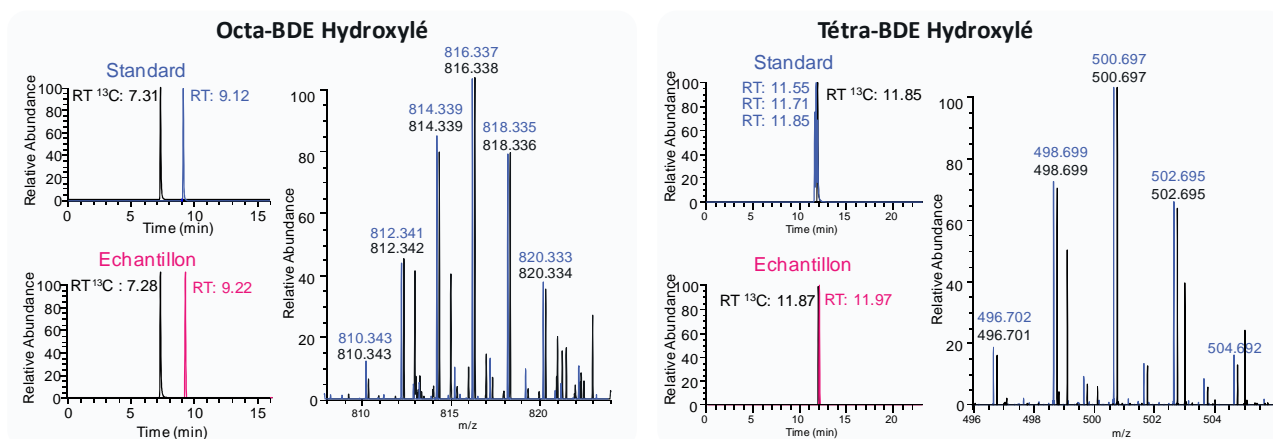


Figure III-14 : Chromatogrammes d'ions extraits et spectre de masse correspondant (massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$) de composés octa-OH-BDE (à gauche) et tétra-OH-BDE (à droite), observés pour un standard et un échantillon de sérum.

Cette figure montre que ces composés sont effectivement des OH-PBDE, aux vues de leur temps de rétention très proches des standards et de leur spectre de masse qui ne laisse apparaître que le massif $[M-H]^-$ spécifique des OH-PBDE. Pour la quantification de ces composés, c'est le 6-OH-BDE-47 qui a été utilisé pour quantifier le tétra-BDE hydroxylé et le 4'-OH-BDE-201 qui a été utilisé pour quantifier l'octa-BDE hydroxylé.

3.1.2 - Identification non ciblée

Nous avons également tenté de tirer partie de l'acquisition en mode de balayage complet (full scan) afin de vérifier la présence d'autres métabolites pour lesquels nous ne possédions pas de standards. La présence de signaux pouvant correspondre à des bromophénols a ainsi été occasionnellement observée dans des échantillons de sérum. Nous avons également recherché les PBDE dihydroxylés et dihydrodiol en supposant que ces composés sont principalement ionisés par déshydrogénation, mais aucune identification formelle n'a été possible. Par contre, du nona-BDE hydroxylé a été observé dans quelques échantillons de sérum. La figure III-15 illustre ceci, en montrant un massif isotopique de nona-BDE hydroxylé tel qu'il a été observé dans un échantillon (11-751-146 – fraction phénols) et le spectre de masse théorique de cet ion. Les deux spectres de masse ont été légèrement décalés afin de faciliter la comparaison. La superposition quasiment parfaite de 4 ions du massif, que ce soit en ce qui concerne la masse (Δ ppm < 1) ou l'abondance relative des ions nous autorise à penser qu'il s'agit bien de nona-BDE hydroxylé.

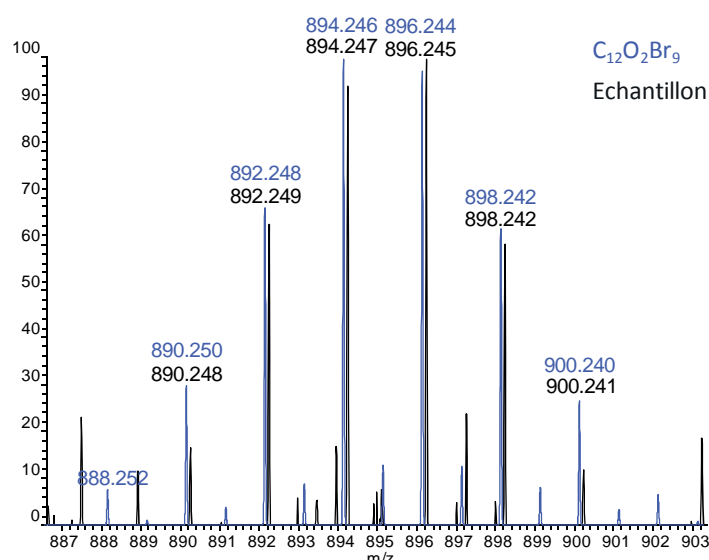


Figure III-15 : Comparaison du spectre de masse (massif isotopique de l'ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$) théorique du nona-BDE hydroxylé et d'un composé identifié dans un échantillon de sérum

En conclusion, plusieurs métabolites ont été identifiés, que ce soit de manière ciblée pour les composés dont nous possédions les standards, ou de manière non ciblée notamment pour le nona-BDE hydroxylé. Ces composés, ainsi que les deux RFB recherchés ont été retrouvés dans les échantillons de lait et de sérum, avec une distribution entre ces deux matrices spécifique à chaque composé, comme ceci est illustré succinctement sur la figure III-16 représentant les analytes identifiés formellement en fonction de la matrice. Sur cette figure, une croix exprime une fréquence de détection inférieure à 20%, deux croix une fréquence comprise entre 20 et 50% et trois croix une fréquence supérieure à 50%.

		Lait maternel	Sérum maternel	Sérum foetal
Métabolites des PBDE tri- à hexa- bromés	OH-PBDE		+	+
	Conjugués		++	++
Métabolites des PBDE hautement bromés	Octa-BDE hydroxylé		+++	+++
	Nona-BDE hydroxylé		+	+
	Conjugués			
	Conjugués du TBBPA		+	+
Composés parents	TBBPA	++	++	+
	HBCD	+++	+	

Figure III-16 : Fréquence de détection des analytes dans les échantillons de lait maternel et de sérum maternel et de cordon analysés

3.2 - CONCENTRATIONS DETERMINEES DANS LES ECHANTILLONS

Selon la figure III-16, le TBBPA et de l'HBCD sont essentiellement retrouvés dans le lait maternel, alors que toutes les familles de composés recherchés ont été retrouvées dans les échantillons de sérum, y compris des conjugués. Le tableau III-5 présente une synthèse des concentrations calculées dans les échantillons. Pour chaque composé cible, les statistiques descriptives de position (moyenne, médiane) et de dispersion (écart-type, valeurs minimales et maximales), ainsi que la fréquence d'observation ont été calculées. Seules les valeurs correspondant à une identification non ambiguë de l'analyte ont été utilisées pour construire ce tableau. La description des résultats obtenus pour chaque analyte ou famille d'analyte sont présentés ci-dessous.

Peu d'analytes ont été retrouvés dans les échantillons d'urine, alors que nous pensions y trouver des conjugués. Du TBBPA-conjugué a toutefois été identifié dans un échantillon et pourrait être présent dans 6 autres échantillons. Ceci indiquerait que, contrairement à ce qui a été observé *in vivo* chez le rat, le TBBPA est éliminé chez l'homme, au moins pour partie, sous forme de conjugués par voie urinaire.

Tableau III-5: Concentrations en analytes (pg/g) calculées dans les échantillons de lait maternel, de sérum de sang de cordon et de sérum maternel

			4'-OH- BDE-17	3-OH- BDE-47	4'-OH- BDE-49	6-OH- BDE-47	Tétra- BDE OH	5'-OH- BDE-99	3'-OH- BDE-154	4'-OH- BDE-201	TBBPA	α- HBCD	β- HBCD	γ- HBCD
Sérum de sang de cordon ombilical	Parents	Moyenne					15,3			202	0,3			
		Médiane								77,7				
		Ecart-Type					105			339	2			
		Valeur min.					1,2			8,3				
		Valeur max.					772			1771	14,4			
		Ech. Quantifiées					4			40	1			
		Fréquence de détection					7%			74%	2%			
	Conjugués	Moyenne			215	0,2		0,02			1			
		Médiane												
		Ecart-Type			1513	0,9		0, 2			6,5			
		Valeur min.			0,3	2					0,4			
		Valeur max.			11022	6		1,3			46			
		Ech. quantifiés			12	2		1			4			
		Fréquence de détection			22%	4%		2%			7%			
Sérum maternel	Parents	Moyenne					5,4	1,2		86	1,7	3,3		
		Médiane								32,7				
		Ecart-Type					38,3	8,4		167	5,5	10,5		
		Valeur min.					1,3	3,8		3,9	0,3	6,5		
		Valeur max.					274	59,6		993	30	57,2		
		Ech. quantifiés					2	2		36	11	6		
		Fréquence de détection					4%	4%		71%	22%	12%		
	Conjugués	Moyenne	0,3	0,02	0,8	0,2	0,3				0,1			
		Médiane												
		Ecart-Type	2,1	0,2	5,3	1,4	1,4				0,7			
		Valeur min.					0,7				1			
		Valeur max.	13,7	1,1	0,2	37,2	9,6				4,3			
		Ech. quantifiés	1	1	4	2	3				3			
		Fréquence de détection	2%	2%	8%	4%	6%				6%			
Lait maternel	Parents	Moyenne									43,6	40,2		
		Médiane										13,4		
		Ecart-Type									231	90,7		
		Valeur min.									0,7	3,3		
		Valeur max.									1442	550		
		Ech. quantifiés									11	25		
		Fréquence de détection									28%	65%		

3.2.1 - Le TBBPA

Les concentrations en TBBPA calculées dans les échantillons de sérum maternel, de sérum du sang du cordon et de lait maternel sont présentées sur l'histogramme de la figure III-17. Il semble ne pas y avoir de lien entre les concentrations dans le sérum et le lait maternel, mais les échantillons de lait maternel correspondant aux 4 échantillons de sérum maternel les plus concentrés n'étaient pas été disponibles, et il est donc difficile de conclure de manière définitive quant à cette relation entre les deux matrices.

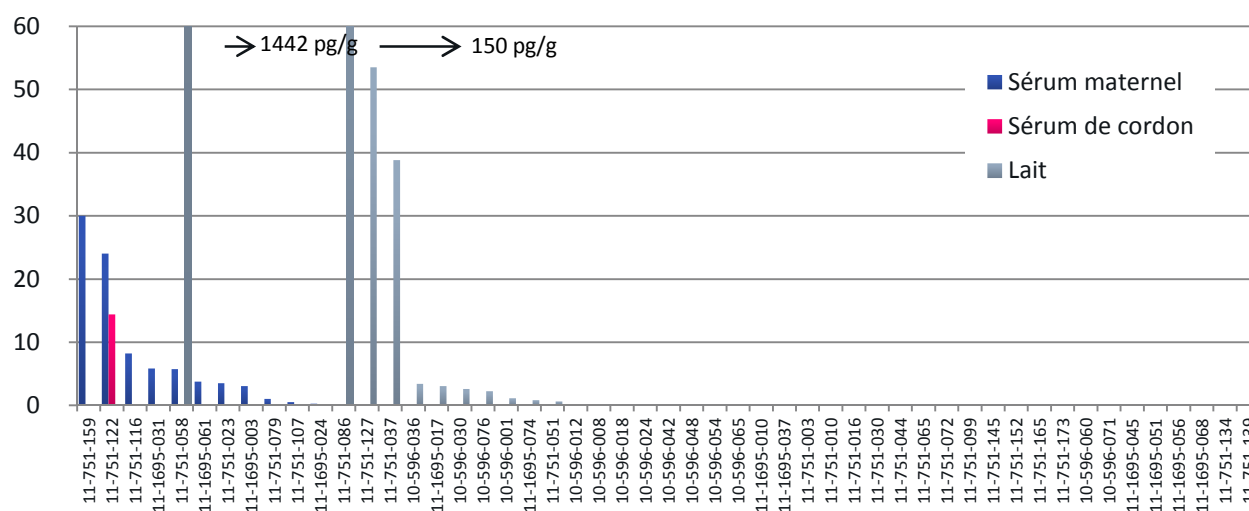


Figure III-17 : Concentrations (pg/g) en TBBPA observées dans les échantillons de sérum et de lait de chaque couple mère-enfant

Les concentrations en TBBPA dans le sérum maternel sont du même ordre de grandeur que celles rapportées par d'autres études, à savoir de l'ordre du ng/g de lipides ou du pg/g de poids frais, comme ceci est montré sur la figure III-18. Nos valeurs sont néanmoins inférieures à la plupart des valeurs observées. La fréquence de détection du TBBPA est cohérente avec celle observée lors de l'étude antérieure à la notre, qui était de 32 % (Cariou et al., 2008) contre 34 % dans notre étude. Les concentrations reportées par les différentes études sont assez variables, notamment entre notre étude et la précédente (Cariou et al., 2008), mais c'est aussi le cas entre les deux études japonaises (Hayama et al., 2004; Kawashiro et al., 2008). De plus, nos valeurs sont très proches de celles de l'étude norvégienne (Thomsen et al., 2002).

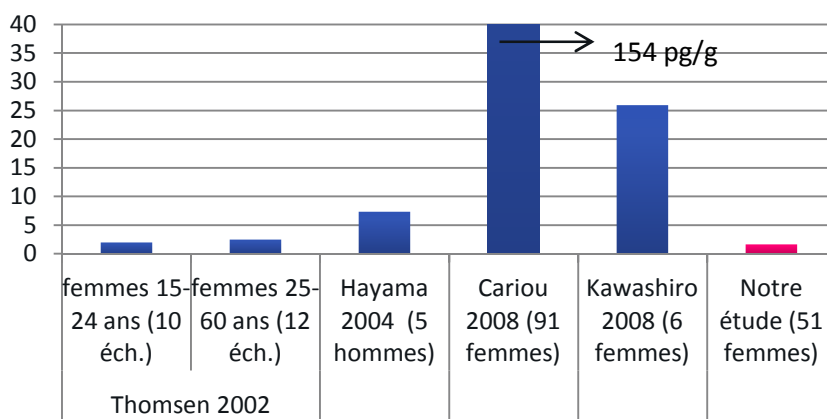


Figure III-18 : Concentrations moyennes (pg/g) en TBBPA observées dans le sérum maternel ou le sérum d'adultes

Seules deux études ont mesuré le TBBPA dans le sérum du sang du cordon ombilical. L'une est celle précédant la notre (Cariou et al., 2008), et la seconde a été réalisée au Japon (Kawashiro et al., 2008), à la même époque. Un résumé de ces deux études est présenté dans le tableau I-2 de la synthèse bibliographique. Les résultats de notre étude sont cohérents avec ceux de l'étude japonaise, qui n'avait pas détecté de TBBPA dans 6 échantillons de sérum de cordon, avec une méthode ayant une limite de détection de 2 pg/g. Lors de l'étude antérieure à la notre, le TBBPA avait été détecté dans 29 % des échantillons de sérum de cordon, contre 24 % dans notre étude. La valeur moyenne retrouvée dans ces échantillons est nettement supérieure à la valeur observée dans notre étude, puisque la valeur moyenne était de 199 pg/g (103,5 ng/g de lipides) et la médiane de 105 pg/g (54,76 ng/g de lipides).

Le TBBPA est finalement surtout retrouvé dans le lait maternel, puisque sa présence a été confirmée dans 28% des échantillons, et suspectée dans 13 %. Cette fréquence de détection est au final similaire à celles habituellement reportées de 40 % environ, d'après les données compilées dans le tableau I-2, et présentées sur la figure III-19 (Cariou et al., 2008; Shi et al., 2009b; Abdallah and Harrad, 2011). La valeur moyenne que nous avons calculée est cohérente avec ces données.

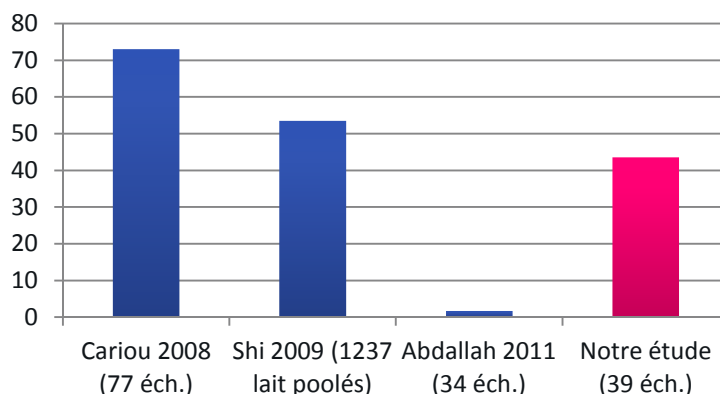


Figure III-19 : Concentrations moyennes (pg/g) en TBBPA observées dans le lait maternel

3.2.2 - L'HBCD

Parmi les trois isomères de l'HBCD, seule la forme α a été observée, et ce uniquement dans les échantillons de lait et de sérum maternel. Les concentrations observées dans les différents prélèvements analysés sont présentées sur l'histogramme de la figure III-20.

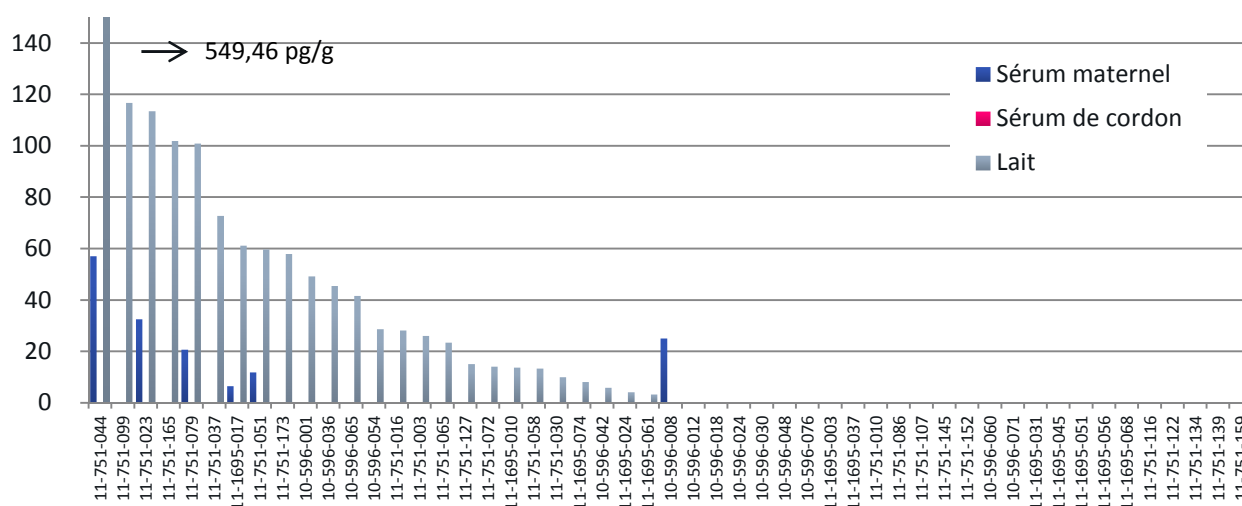


Figure III-20 : Concentrations (pg/g) en α -HBCD observées dans les échantillons de sérum et de lait maternel de chaque couple mère-enfant.

L' α -HBCD a été identifié dans 12 % des échantillons de sérum maternel, pour une valeur moyenne de 3,3 pg/g. En comparaison aux autres études qui ont recherché l'HBCD dans le sérum humain, ces valeurs apparaissent globalement du même ordre de grandeur mais inférieures (Weiss et al., 2006; Meijer et al., 2008; Thomsen et al., 2008; Roosens et al., 2009). La figure III-21 présente des concentrations en HBCD total, sur laquelle la concentration en ng/g de lipides issue de notre étude a été estimée sur la base d'un taux de matière grasse moyen de 7,5 g de matière grasse/kg de poids frais (Cariou, 2006a). Dans l'étude du même type conduite au sein de l'unité antérieurement à la notre, l' α -HBCD n'avait été détecté dans aucun des 26 échantillons analysés. Ces différences observées sur les sérums maternels entre notre étude et la précédente peuvent être dues à une limite de détection plus basse suite à des améliorations méthodologiques apportées, mais doivent être pondérées compte tenu de la faible fréquence de détection de l' α -HBCD.

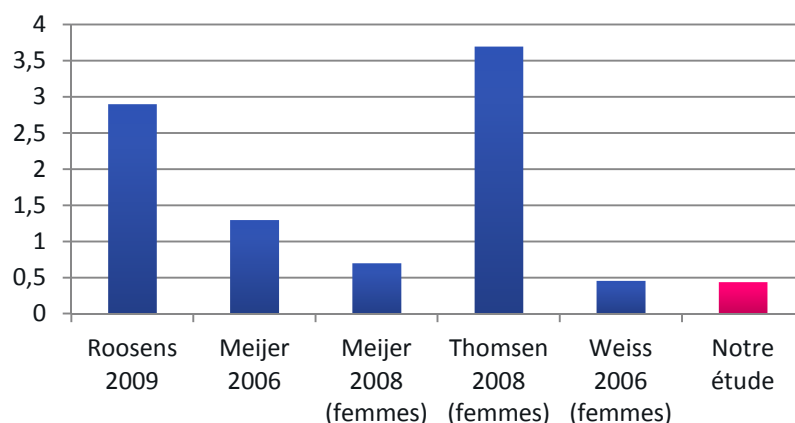
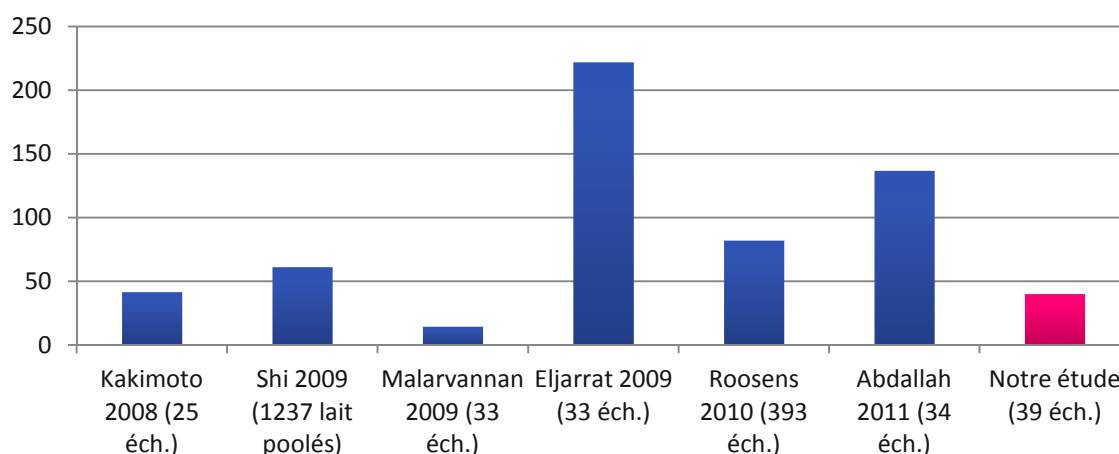


Figure III-21: Concentrations (ng/g de matière grasse) en HBCD observées dans le sérum Humain pour des sujets adultes.

En ce qui concerne le sérum de cordon, aucun des trois diastéréoisomères d'HBCD n'avait été retrouvé dans les 26 échantillons analysés dans le cadre de l'étude précédente à la notre, ce qui est cohérent avec l'absence d'HBCD que nous reportons ici aussi. Une autre étude a également recherché l'HBCD dans des échantillons de sérum maternel et de cordon, mais n'aurait pas retrouvé d'HBCD dans ces échantillons (Roosens et al., 2010b). Une quatrième étude reporte une concentration médiane en HBCD de 0,2 ng/g de lipides dans 4 échantillons de sérum de sang de cordons sur 12 analysés (Meijer et al., 2008). Il semblerait donc que le sérum de sang de cordon ne soit effectivement pas, ou très peu, contaminé par l'HBCD.

L' α -HBCD a été identifié dans 65% des échantillons de lait maternel, et sa présence a également été suspectée dans 13% (supplémentaires) des échantillons (pour rappel, avec un bon niveau de confiance mais sans remplir strictement les critères d'identification non ambiguë utilisés dans un cadre réglementaire). Seul l'isomère alpha a été identifié dans ces prélèvements, comme cela été le cas pour les échantillons de sérum, ce qui est cohérent avec le fait que cet isomère est majoritairement retrouvé dans les échantillons biologiques. Les concentrations mesurées sont similaires à celles déjà observées dans le lait maternel (Kakimoto et al., 2008; Eljarrat et al., 2009; Malarvannan et al., 2009; Shi et al., 2009b; Roosens et al., 2010b; Abdallah and Harrad, 2011), comme le montre la comparaison à d'autres études, présenté sur la figure III-22.

Figure III-22 : Concentrations moyennes (pg/g) en α -HBCD observées dans le lait maternel

3.2.3 - Métabolites hydroxylés des PBDE

Dans les échantillons de sérum maternel, trois PBDE hydroxylés ont été identifiés et quantifiés, à savoir le 5'-OH-BDE-99, un composé tétra-bromé et un octa-bromé. Les autres dérivés de type tétra- et penta-BDE hydroxylés habituellement recherchés dans des études comparables ont quant à eux été identifiés avec une fréquence relativement faible dans nos prélèvements en comparaison à ces quelques études. En effet, d'après les données compilées dans le tableau I-5, le 6-OH-BDE-47 est retrouvé avec une fréquence allant jusqu'à 67% dans les sérums européens ou nord américains. Les concentrations rapportées pour ces composés sont toutefois variables, comprises entre quelques dizaines et plusieurs milliers de pg/g de lipides. Les deux études effectuées sur le continent américain sont celles rapportant les concentrations les plus élevées (supérieures à 100 pg/g), notamment parce que plusieurs congénères sont détectés. Or, il faut noter que ces deux études ont utilisé une méthode de détection relativement peu spécifique, à savoir le couplage GC-ECNI-MS, qui repose sur la détection des signaux spectrométriques correspondant aux atomes de brome (Athanasiadou et al., 2008; Qiu et al., 2009). Les deux autres études disponibles concernant la mesure des OH-PBDE dans le sérum (Kawashiro et al., 2008; Wan et al., 2010a) sont plus spécifiques (GC-EI-HRMS et LC-MS/MS) ont identifié le 6-OH-BDE-47, ainsi que deux autres tétra-BDE hydroxylés dans l'étude japonaise+.

Les valeurs que nous avons retrouvées sont, comme le montre la figure III-23, du même ordre de grandeur, mais inférieures à celles retrouvées par Kawashiro *et al.* (2008) au Japon et par Wan *et al.* (2010) en Corée dans des échantillons de sérum maternel et de cordons ombilicaux. Toutefois, il faut noter que les valeurs présentées pour nos échantillons sur la figure III-23 excluent le couple d'échantillons présentant des valeurs très élevées influençant grandement les moyennes présentées dans le tableau III-5. Les valeurs retrouvées par Qiu *et al.* (2009) aux Etats-Unis dans la population générale sont quant à elles supérieures, de 100 à 28 000 pg/g de lipides pour plusieurs tétra-BDE hydroxylés. Une des raisons pouvant expliquer ces différences

observées peut être le fait que le penta-mix et l'octa-mix ne sont plus utilisés depuis plusieurs années en Europe, alors qu'ils n'ont été interdits par l'UNEP qu'en 2008. Cette occurrence supérieure des OH-PBDE aux Etats-Unis est également cohérente avec l'imprégnation aux PBDE qui a été montrée supérieure chez cette population par rapport aux populations européennes et asiatiques (Frederiksen et al., 2009b).

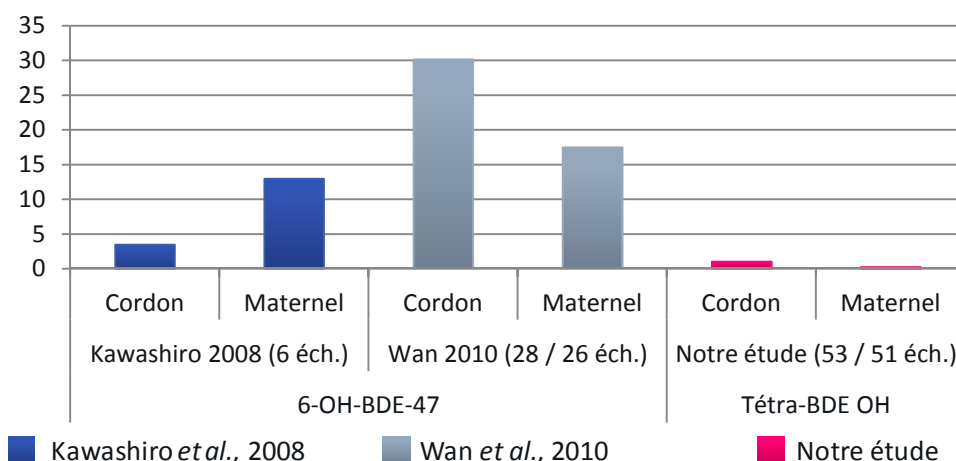


Figure III-23 : Concentrations moyennes (pg/g) de tétra-BDE hydroxylés observées dans le sérum maternel (M) et de sang de cordon ombilical (F)

En ce qui concerne le 5'-OH-BDE-99, ce congénère a été identifié dans des échantillons de sérum de sang de cordon et maternel prélevés aux Etats-Unis, et quantifié à des valeurs de 22 000 et 2 000 pg/g de lipides respectivement, par GC-ECNI-MS (Qiu et al., 2009). Dans les études coréennes et japonaises, les auteurs n'ont en revanche pas identifié de penta-BDE hydroxylé.

Seule une étude a recherché des PBDE hydroxylés comportant plus de 6 atomes de bromes. Il s'agit d'une étude qui a identifié par GC-ECNI-MS deux octa-BDE hydroxylés et un nona-BDE hydroxylé dans le sérum d'ouvriers d'une usine de démantèlement de matériel électronique. La quantification de ces métabolites n'a en revanche pas été effectuée (Yu et al., 2010). Dans nos échantillons, l'octa-BDE hydroxylé apparaît comme un analyte majeur car il a été retrouvé dans 71 % des échantillons de sérum maternel et 74 % des échantillons de sérum de sang de cordon (84 % et 85 % respectivement en prenant en compte les échantillons suspects), selon des concentrations présentées sur la figure III-24. Les concentrations moyennes mesurées pour cet octa-BDE hydroxylé sont de 86 pg/g dans les échantillons de sérum maternel et de 202 pg/g dans les échantillons de sang du cordon ombilical.

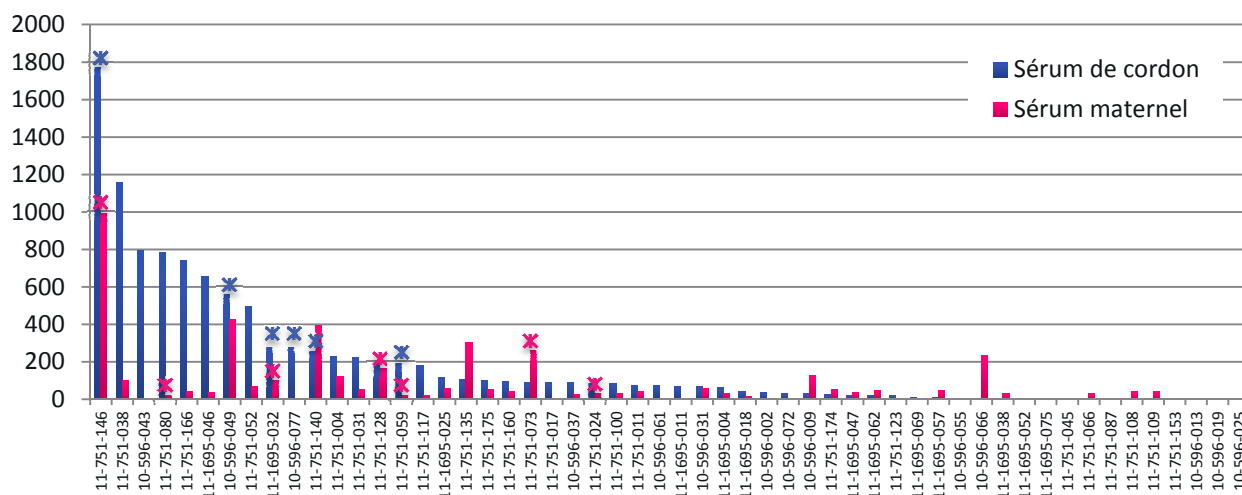


Figure III-24 : Concentrations (pg/g) en octa-BDE hydroxylé observées dans les échantillons de sérum de chaque couple mère-enfant

Comme ceci a été mentionné précédemment, nous avons également détecté du nona-BDE hydroxylé dans certains prélèvements. En appliquant les mêmes règles d'identification que pour les autres analytes, la présence de nona-BDE hydroxylé a ainsi été confirmée dans 7 échantillons de sérum de sang de cordon et 7 échantillons de sérum maternel, dont 4 issus de couples d'échantillons appariés. En considérant des critères d'identification légèrement moins stricts, la présence de ce même composé a également été suspectée dans 7 autres échantillons de sérum de cordon. Il apparaît de plus que le nona-BDE a surtout été retrouvé dans des échantillons présentant des concentrations élevées en octa-BDE hydroxylé. Il s'agit des échantillons marqués d'une croix sur la figure III-24.

Lors de l'étude conduite précédemment, les concentrations en PBDE avaient été étudiées en détail, dans le lait maternel, le sérum (maternel et cordon) et le tissu adipeux. Les conclusions montraient une concentration plus importante de BDE-209 dans les échantillons de sérum de sang de cordon par rapport au sérum maternel ou au lait. Dans les échantillons de sérum de cordon, la concentration en BDE-209 moyenne reportée était de 85 et 128 pg/g dans le sérum maternel et de sang de cordon respectivement, et les concentrations individuelles en nona-BDE (-206, -207, -208) de 6, 31, et 10 dans le sérum maternel, et de 4, 14, et 12 pg/g dans le sérum de cordon, respectivement. Les concentrations en octa-BDE calculées étaient elles inférieures à 10 pg/g, et celles en tri- à hepta-BDE encore inférieures (Antignac et al., 2009). Les valeurs que nous avons calculées pour l'octa-BDE hydroxylé sont donc très proches des concentrations en composé parent.

Dans le lait maternel, aucun PBDE hydroxylé n'a été identifié, contrairement à ce qui a été reporté par une autre étude menée sur le lait maternel, lors de laquelle quatre tétra-BDE

hydroxylés dont le 6-OH-BDE-47 et du 4'-OH-BDE-17 avaient été identifiés dans 3 et 27% des échantillons, à des concentrations de 6,7 et 29,9 pg/g de lipides respectivement (Lacorte and Ikononou, 2009).

3.2.4 - Métabolites conjugués des PBDE

La présence de métabolites conjugués des tétra-BDE hydroxylés a également été confirmée dans les échantillons de sérum de sang de cordon et maternel, principalement des conjugués du 4'-OH-BDE-49. Un conjugué de penta-OH-BDE et de tri-OH-BDE a également été observé dans deux échantillons. Ces composés sont à notre connaissance identifiés pour la première fois dans des échantillons biologiques humains.

Le profil est assez différent entre les échantillons de sérum de sang de cordon où les conjugués du 4'-OH-BDE-49 sont majoritaires, alors que dans les échantillons de sérum maternel, aucun type de métabolite ne semble prédominer, comme le montre les deux histogrammes de la figure III-25 représentant les concentrations en conjugués de tétra-BDE hydroxylé retrouvé dans les échantillons de sérum. Sur ce graphique, les valeurs retrouvées dans les échantillons maternels sont placées côte à côte.

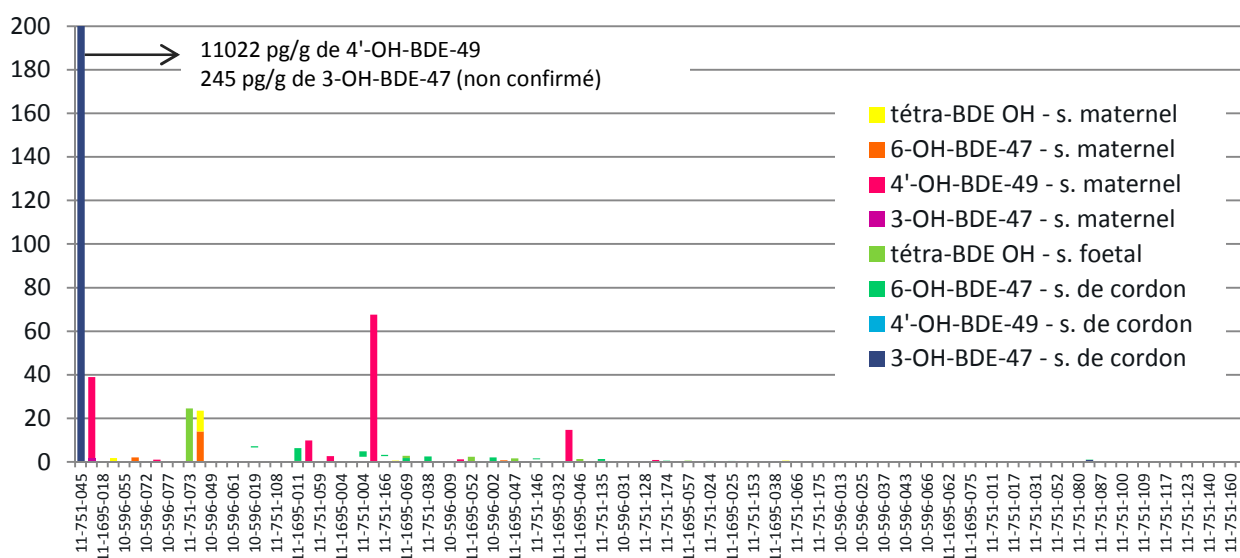


Figure III-25 : Concentrations (pg/g) de tétra-BDE hydroxylé après déconjugaison observées dans les échantillons de sérum de chaque couple mère-enfant

Les données obtenues n'indiquent pas de correspondance claire entre la prévalence de formes hydroxylées et de leurs formes conjuguées correspondantes. Par exemple, l'octa-BDE hydroxylé observé sous sa forme libre dans la majorité des échantillons de sérum a été identifié en tant que conjugué dans seulement trois échantillons présentant des concentrations en octa-BDE hydroxylé supérieures à 100 pg/g.

3.2.5 - Métabolites conjugués du TBBPA

Des métabolites conjugués du TBBPA ont également été observés mais de façon très minoritaire. La concentration moyenne de 1 pg/g de TBBPA-conjugué observée dans le sérum de sang de cordon doit en effet être pondérée de par la forte influence d'une valeur particulièrement élevée de 46 pg/g, sans laquelle la concentration moyenne est de 0,1 pg/g de conjugué. Ces concentrations et fréquences d'observation faibles sont cohérentes avec les concentrations en composé parent. Les concentrations en TBBPA conjugué calculées dans les échantillons de sérum sont présentées sur l'histogramme de la figure III-26, pour chaque couple de valeur mère-enfant.

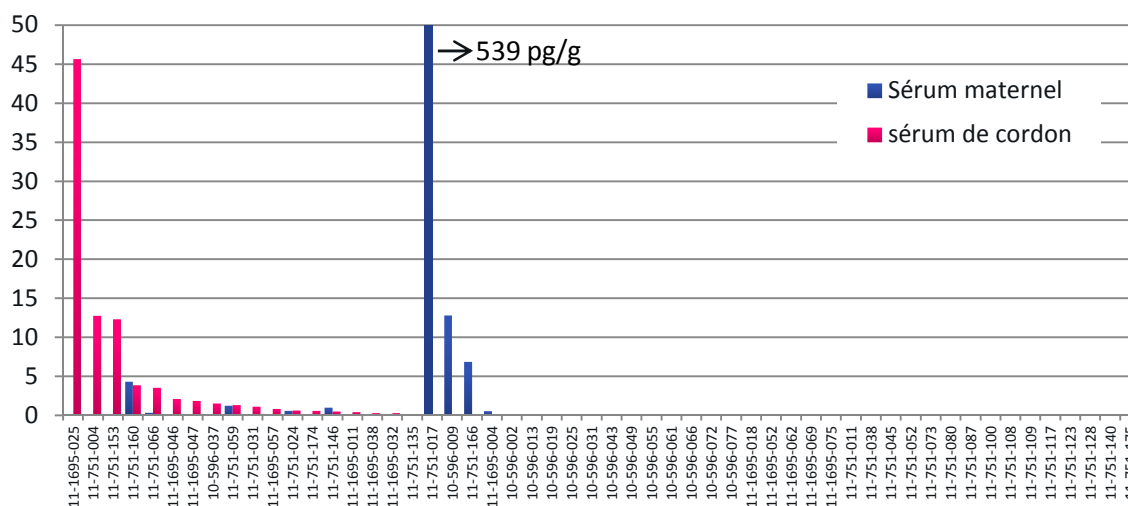


Figure III-26 : Concentrations (pg/g) en tétra-BDE hydroxylé observées dans les échantillons de sérum de chaque couple mère-enfant

La corrélation entre la concentration en TBBPA et celle en TBBPA-conjugué a été étudiée mais elle est difficile à évaluer à cause des très faibles quantités détectées en TBBPA-conjugués, trop proches de la limite de détection. Par ailleurs, aucun métabolite conjugué des OH-PBDE ou du TBBPA n'a été détecté dans les échantillons de lait maternel.

3.3 - ETUDE DU PASSAGE TRANSPLACENTAIRE

Afin d'étudier les corrélations possibles sur un nombre suffisant de valeurs, nous avons utilisés les couples de valeurs pour lesquels le composé étudié a été détecté dans au moins l'un des échantillons du couple. Nous avons toutefois écarté les prélèvements pour lesquels la limite de détection était trop élevée par rapport à nos exigences, ce qui pouvait dès lors induire un biais significatif dans ces analyses statistiques. Pour le TBBPA, nous avons par exemple gardé les

valeurs pour lesquelles la LOD était inférieure à 5 pg/g, et pour l'octa-BDE hydroxylé inférieure à 10 pg/g, compte tenu que la LOD est estimée sur le ¹³C-6-OH-BDE-47.

3.3.1 - Le TBBPA

D'après la comparaison des concentrations retrouvées dans le sérum de sang de cordon et dans le sérum maternel, il semble que le TBBPA puisse passer la barrière placentaire, mais que celle-ci joue un rôle protecteur assez efficace vis-à-vis du fœtus, dans le cas de ce RFB. En effet, le TBBPA n'a été formellement identifié que dans un seul échantillon de sérum de cordon, et celui-ci correspondait au second échantillon maternel le plus concentré. La présence de TBBPA a toutefois été suspectée dans une quinzaine d'échantillons de sérum de sang de cordon supplémentaires, à une concentration moyenne estimée inférieure à 2 pg/g, et nous avons donc pu étudier la corrélation entre ces deux valeurs. Si l'on oppose les valeurs retrouvées dans les échantillons maternels à celles retrouvées dans les échantillons de sérum de cordon, il semblerait qu'il y ait une corrélation entre ces valeurs, comme le montre la figure III-27.

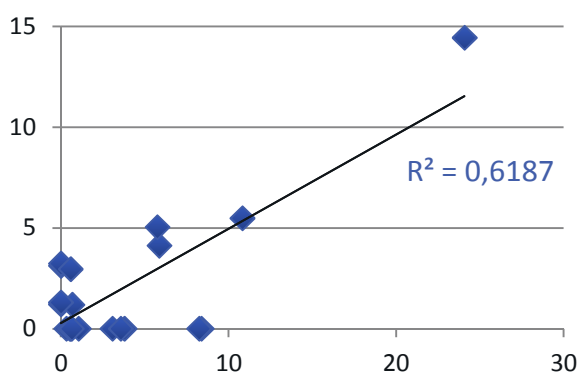


Figure III-27 : Concentrations (pg/g) en TBBPA mesurées dans le sérum de sang de cordon (en ordonnée) en fonction des concentrations (pg/g) dans le sérum maternel (en abscisse)

Le coefficient de détermination de la droite de régression linéaire R^2 est de 0,62, ce qui laisse supposer que le TBBPA puisse passer dans une certaine mesure la barrière placentaire, toutefois de manière modérée, l'équation de la droite de régression ($y = 0,4676x + 0,2803$) laissant supposer qu'il y a dilution entre le sérum maternel et de cordon.

Lors du projet similaire précédent, il n'avait pas été trouvé de lien entre les concentrations dans le sérum maternel et le sérum de cordon, et les concentrations, calculées en pg/g étaient apparues similaires dans les deux types d'échantillons (Cariou et al., 2008). Une autre étude japonaise à ce sujet n'avait pas détecté de TBBPA dans les échantillons sériques, probablement dû au trop faible nombre d'échantillon de cette étude (six de chaque matrice) (Kawashiro et al., 2008).

3.3.2 - L'HBCD

L' α -HBCD semble lui ne pas passer la barrière placentaire, car s'il est présent dans 12 % des échantillons de sérum maternel, il n'a été identifié dans aucun échantillon de sérum de cordon, même si sa présence a été suspectée dans deux échantillons de sérum de cordon. Nos résultats semblent donc indiquer que l' α -HBCD ne passe pas la barrière placentaire.

3.3.3 - L'octa-BDE hydroxylé

Le passage trans-placentaire de l'octa-BDE hydroxylé est clairement démontré, puisque la concentration médiane est de 33 pg/g et 78 pg/g dans le sérum maternel et de sang de cordon respectivement. La figure III-28 a été construite comme dans le cas du TBBPA afin d'évaluer la possibilité d'un lien entre concentration sérique maternelle et de cordons. Elle représente la valeur observée dans le sérum de sang de cordon en fonction de la valeur observée dans le sérum maternel. Il semble y avoir un lien ténu entre les valeurs, mais la valeur du coefficient R^2 est trop faible pour que l'on puisse affirmer franchement le lien entre ces deux concentrations.

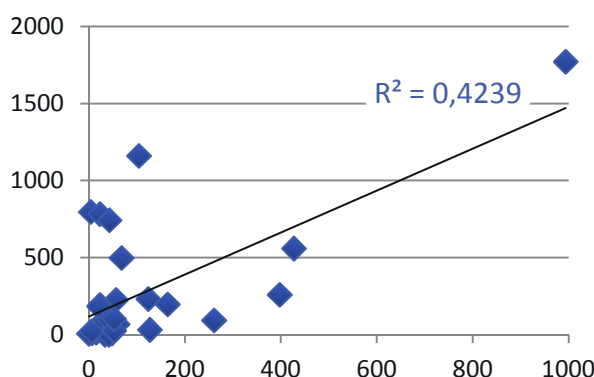


Figure III-28 : Concentrations (pg/g) en octa-BDE hydroxylé mesurées dans le sérum de sang de cordon (en ordonnée) en fonction des concentrations (pg/g) mesurées dans le sérum maternel (en abscisse)

3.3.4 - Les conjugués des tétra-BDE hydroxylés

Des conjugués de tétra-BDE hydroxylés ont été identifiés dans les échantillons de sérum maternel et de sérum de cordon, à des concentrations de l'ordre du pg/g. La moyenne dans le 4'-OH-BDE-49-conjugué dans le sérum de sang de cordon est élevée, à cause d'une valeur de 11 022 pg/g dans un échantillon. Sans celui-ci, la moyenne est de 7 pg/g et l'écart-type de 26 pg/g. Il n'y a pas de relation entre ces valeurs, mais les tétra-BDE-hydroxylés-conjugués sont plus souvent identifiés dans les échantillons de sérum de cordon, avec 26% échantillons positifs contre 14 % pour le sérum maternel, et ces valeurs montent à 65% et 41 % en prenant en compte les échantillons où la présence du composé est suspecté.

3.4 - CORRELATIONS ENTRE LES VALEURS D'IMPREGNATION ET LES DONNEES CLINIQUES

Cette partie de notre étude a uniquement concerné les échantillons prélevés en 2010-2011, ce qui représente donc 37 couples d'échantillons de sérum, et 27 échantillons de lait maternel. Les prélèvements pour lesquels les analytes cibles n'ont pas été détectés (valeurs nulles) ont été écartés pour ces analyses statistiques, afin de ne pas fausser certaines corrélations. La corrélation des concentrations en RFB et en métabolites avec différentes données cliniques ou coutumières a de cette manière été étudiée, pour les variables pour lesquelles nous disposons de suffisamment de valeurs. En effet, ce type d'étude épidémiologique se fait en général sur un très grand nombre d'individu, afin d'avoir une représentativité satisfaisante de la population. Les résultats suivant sont donc à considérer de façon indicative, et ont été réalisés dans le but de mettre en évidence des tendances potentielles.

3.4.1 - TBBPA

S'il est difficile d'observer des relations claires, certaines variables semblent avoir une légère influence sur les niveaux d'imprégnation mesurés en TBBPA. C'est le cas entre l'âge et la concentration sérique en TBBPA, cette dernière semblant diminuer avec l'âge, comme ceci est montré sur la figure III-29. La valeur du coefficient R^2 serait d'ailleurs de 0,28 sans les deux valeurs de concentration les plus élevées, signifiées en gris ci-dessous.

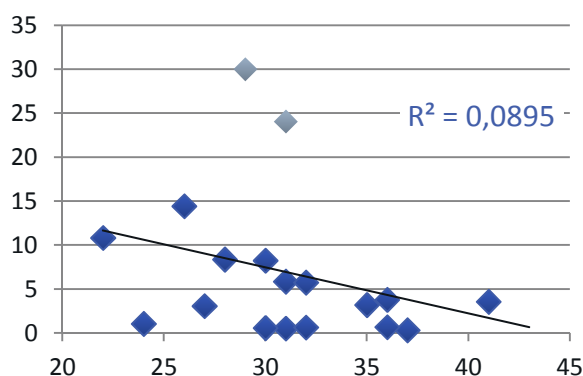


Figure III-29 : Concentrations (pg/g) en TBBPA mesurées dans le sérum maternel (en ordonnée) en fonction de l'âge (années) des sujets (en abscisse)

Une relation du même type avait déjà été observée par Thomsen *et al.* en 2002, qui avaient mesuré le TBBPA dans des pools de sérum prélevés chez des hommes, des femmes et des enfants de différentes classes d'âge. Leurs résultats montraient que les femmes de 25-59 ans et de plus de 60 ans montraient des taux sériques en TBBPA inférieurs aux hommes, aux enfants, et

surtout aux femmes de 15-24 ans (Frederiksen et al., 2009b). Ceci laisse supposer que cette diminution puisse avoir un lien avec la maternité. Nous avons donc pensé que la parité puisse elle aussi avoir un impact sur cette valeur, mais cette relation n'est pas établie, comme le montre la figure III-30. A noter que le TBBPA n'a pas été détecté dans le sérum des quatre femmes présentant une parité supérieure à trois enfants, ce qui semble indiquer la possibilité d'un lien entre ces deux variables. Ces valeurs sont indiquées en rose sur la figure ci-dessous à titre indicatif mais n'ont pas été incluses dans la régression linéaire.

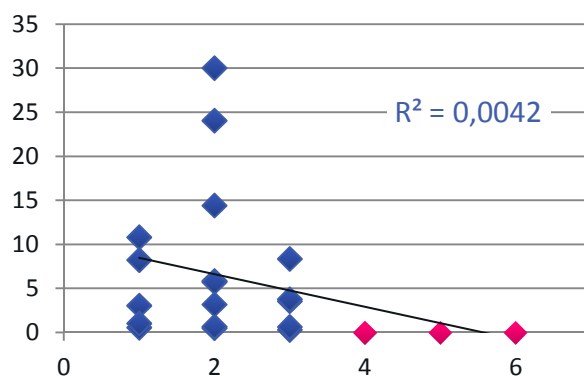


Figure III-30 : Concentrations (pg/g) en TBBPA mesurées dans le sérum maternel (en ordonnée) en fonction de la parité des sujets (en abscisse)

Une autre variable qui pourrait avoir un impact sur le taux sérique en TBBPA, et en RFB en général, est la consommation de poisson, connu pour être un vecteur majeur d'exposition alimentaire pour différentes classes de polluants organiques persistants. Dans le cas du TBBPA, cette tendance n'est toutefois pas évidente, comme le montre la figure III-31. En effet, la grande majorité des femmes qui ont répondu à la question concernant le nombre de repas à base de poisson par semaine ont répondu une à deux fois, une seule personne a répondu 3 fois, deux personnes 4 fois et deux personnes 5 fois. Les données concernant les fortes consommatrices de poisson sont donc insuffisantes pour juger l'impact réel de cette variable.

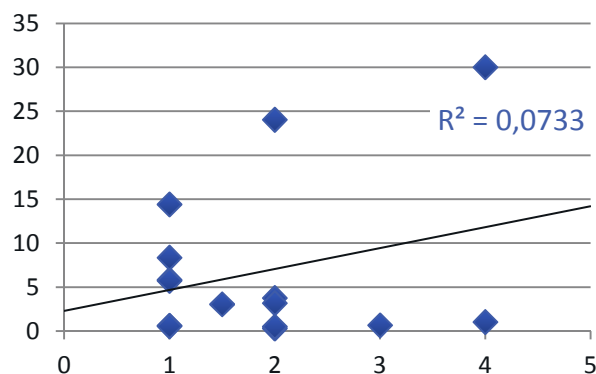


Figure III-31 : Concentrations (pg/g) en TBBPA mesurées dans le sérum maternel (en ordonnée) en fonction de la fréquence de consommation de poissons (repas par semaine) en abscisse

Les corrélations entre les données cliniques et les concentrations sériques dans le sang de cordon n'ont pas été étudiées, à cause du trop faible nombre de valeurs positives, au nombre de 10 dont 9 correspondant à une présence seulement suspectée du TBBPA.

De même, les corrélations observées avec le lait maternel ne sont pas détaillées ici car aucun lien entre les concentrations en TBBPA dans cette matrice et les données cliniques n'a pu être établi. Ceci probablement dû au nombre trop faible de données permettant d'établir une corrélation.

3.4.2 - α -HBCD

En ce qui concerne les facteurs influençant le taux sérique en α -HBCD, la parité à semble t'il un effet négatif sur le taux sérique en α -HBCD, comme le montre le graphique de gauche de la figure III-32. Le coefficient R^2 de la corrélation linéaire est de 0,1396, et l'HBCD n'a pas été détecté dans le sérum de trois des quatre femmes ayant plus de trois enfants, ces valeurs étant signifiées à titre indicatif en rose. En ce qui concerne le lait maternel, le graphique de droite de la figure III-32 montre que cette relation ne semble pas exister pour cette matrice, la droite de régression étant fortement influencée par la valeur maximale en gris.

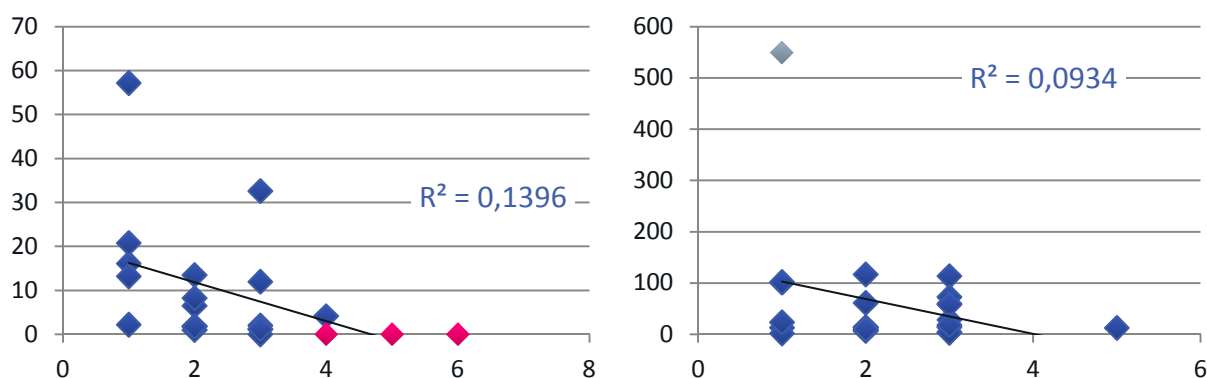


Figure III-32 : Concentrations (pg/g) mesurées en α -HBCD dans le sérum maternel (à gauche) et dans le lait maternel (à droite) en ordonnée en fonction de la parité en abscisse

A l'inverse de ce qui a pu être observé pour le TBBPA, aucune corrélation n'a été constatée entre l'âge et les concentrations en HBCD. La consommation de poisson pourrait quant à elle avoir un effet sur la concentration sérique en α -HBCD, comme le suggère la figure III-33. En effet la régression linéaire est fragilisée par la valeur maximale en gris, sans laquelle le coefficient R^2 est de 0,3895. Ceci est cohérent avec la bibliographie, puisqu'une étude norvégienne a par exemple été montrée chez les adultes que la concentration sérique en HBCD est liée à la consommation de poissons d'un lac contaminé (Thomsen et al., 2008). D'autres travaux menés au laboratoire ont mené à des conclusions similaires. Ces travaux ont montré une

évolution du taux sériques selon que la personne est non consommateur, consommateur moyen ou fort consommateur de poisson. Cette relation n'est pas observée pour le lait maternel.

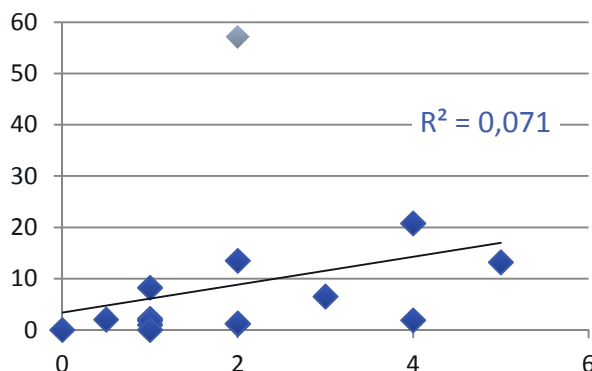


Figure III-33 : Concentrations (pg/g) en α -HBCD mesurées dans le sérum maternel en ordonnée en fonction de la fréquence de consommation de poissons (repas par semaine) en abscisse

Un autre facteur qui semble avoir un effet sur les concentrations circulantes en HBCD est l'allaitement, comme le montre la figure III-34. Cette figure illustre la relation entre le nombre de semaine d'allaitements et les concentrations en α -HBCD dans le sérum à gauche et dans le lait maternel à droite. La relation semble plus forte dans le sérum maternel, et il est intéressant de noter que les valeurs maximales dans le sérum ou le lait ne déséquilibrent pas la corrélation.

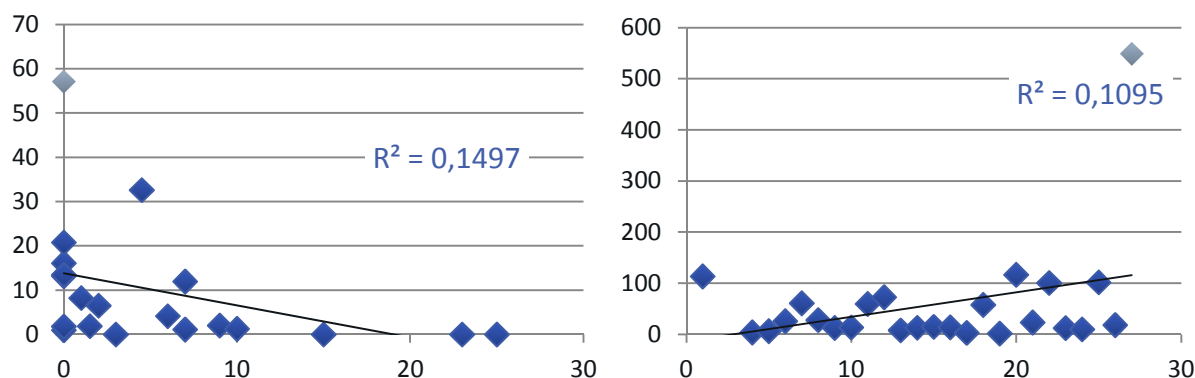


Figure III-34 : Concentrations (pg/g) en α -HBCD mesurées dans le sérum maternel en ordonnée (à gauche) et dans le lait maternel (à droite) en fonction du nombre de semaines d'allaitement en abscisse

Ces deux valeurs maximales ont d'ailleurs été observées chez le même individu. Nous avons donc étudié la corrélation des concentrations en α -HBCD entre le sérum et le lait maternel. Ces valeurs s'avèrent assez bien corrélées, comme le montre la figure III-35. Sans le couple de valeurs maximales qui influent fortement la régression linéaire, le coefficient R^2 demeure assez élevé avec une valeur de 0,4465.

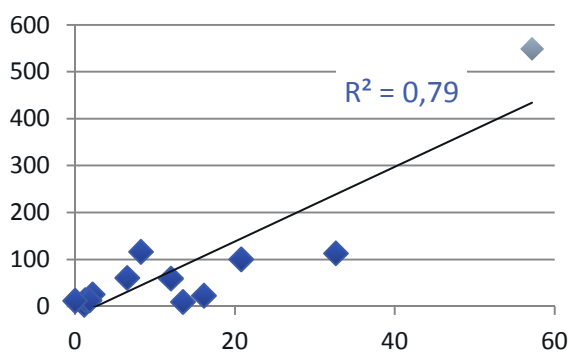


Figure III-35 : Concentrations (pg/g) en α -HBCD observées dans le sérum maternel en ordonnée en fonction de celles observées dans le lait maternel en abscisse

Ces corrélations ne sont pas surprenantes, car l'HBCD est un composé bioaccumulé dans le tissu adipeux. L'allaitement est une voie d'élimination de ce genre de composé qui peut être remobilisé à partir de la matière grasse vers le lait maternel lors de la production de celui-ci. L'HBCD passe ensuite en faible proportion dans le sérum. L'analyse des tissus adipeux serait déterminante afin de valider ou d'infirmer cette hypothèse, ce que nous n'avons pas pu réaliser dans le cadre de cette thèse.

3.4.3 - PBDE hydroxylés et métabolites conjugués

Seule la corrélation des taux sériques en octa-BDE hydroxylé en fonction des données cliniques et environnementales a été étudiée, et il semblerait y avoir une relation entre la consommation de poisson et le taux sérique maternel, comme le montre la figure III-36. Il semblerait donc que la consommation de poisson, potentiel vecteur de plusieurs classes de POPs dont les PBDE, ait un impact sur l'occurrence de ce composé dans le sérum. Ce lien n'a toutefois pas été observé pour les concentrations sériques dans les cordons ombilicaux.

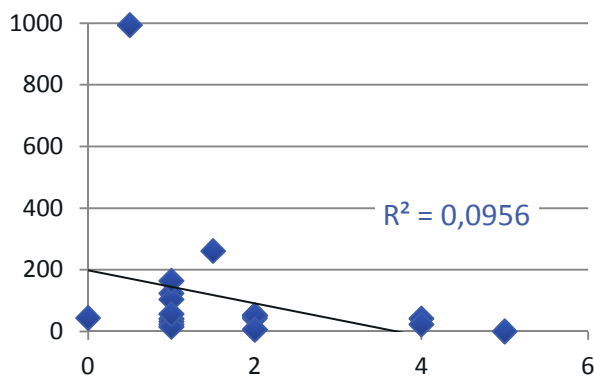


Figure III-36 : Concentrations (pg/g) en octa-BDE hydroxylé mesurées dans le sérum maternel en ordonnée en fonction de la fréquence de consommation de poissons (repas par semaine) en abscisse

Les autres facteurs considérés ne semblent pas avoir d'effet sur la concentration sérique maternelle ou de sang du cordon en octa-BDE hydroxylé. L'impact des facteurs cliniques sur les concentrations sériques en tétra-BDE conjugués a été étudié, mais il est difficile de déterminer s'il existe des relations, en raison du faible nombre de données disponibles et de leur disparité.

Il n'existe pas d'études qui auraient comparé les concentrations circulantes en OH-PBDE et les données telles que l'âge ou la consommation de poisson, mais ce type de données existe pour les composés parents. ainsi, les femmes de plus de 25 ans semblent présenter des taux sériques inférieurs au reste de la population (Thomsen et al., 2002), et la consommation de poissons aurait un effet important selon une étude qui a montré que les personnes ne consommant pas de poissons de la mer particulièrement polluée Baltique présentent des taux sériques 5 fois inférieurs aux personnes en consommant 12 à 20 fois par mois (Sjodin et al., 2003). Ceci pourrait expliquer la légère tendance observée sur la figure III-32, en supposant que l'octa-BDE hydroxylé soit un métabolite des PBDE.

3.5 - CONCLUSION

Cette deuxième partie du projet, dédiée à la recherche et à la mesure du TBBPA, de l'HBCD, des PBDE hydroxylés et des métabolites conjugués du TBBPA et des PBDE chez l'Homme, a donc été composée d'une première étape de développement analytique et d'une seconde partie de mesure de ces composés dans des matrices biologiques humaines prélevées chez des couples mère-enfant. La méthode développée, basée sur le couplage chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse haute résolution, est apparue performante pour la mesure des composés parents. Cependant, elle est apparue perfectible pour les PBDE hydroxylés, à cause du manque de standards marqués et de la variabilité des caractéristiques physico-chimique de cette famille de composés. Il s'agit d'une méthode hautement spécifique et sensible grâce à laquelle l'identification des composés a été rendue possible à des concentrations de l'ordre du pg/g pour les trois matrices étudiées.

L'application de cette méthode à des échantillons de lait maternel, de sérum maternel, de sérum de sang du cordon ombilical, et d'urines du nouveau-né a mis en évidence le fait que le nouveau-né est exposé via le lait maternel aux composés parents étudiés, à savoir le TBBPA et l'HBCD. Le fœtus est quant à lui exposé au TBBPA, avec une relation établie entre les concentrations sériques maternelles et du cordon. Le fœtus est également exposé aux métabolites hydroxylés et conjugués des PBDE. Pour ces derniers, les concentrations sériques dans les cordons ombilicaux sont similaires, voire plus importantes que les concentrations sériques maternelles, ce qui indique que ces composés passent la barrière placentaire et/ou que le fœtus est capable de métaboliser les PBDE dont nous savons qu'ils peuvent passer la barrière placentaire (Antignac et al., 2009). Une

corrélation entre concentrations sériques maternelles et de sang du cordon semble d'ailleurs exister pour l'octa-BDE hydroxylé.

L'identification d'octa-BDE hydroxylé dans la plupart des échantillons de sérum maternel et de cordon constitue la seconde observation de ce genre de composés dans les échantillons sériques, la première observation ayant été faite chez des ouvriers particulièrement exposés aux PBDE. Notre étude est par ailleurs la première à mettre en évidence la présence de composés conjugués des PBDE et du TBBPA chez l'Homme. Ces résultats montrent donc la présence de métabolites des RFB chez l'Homme, même si les métabolites attendus, à savoir les PBDE hydroxylés, semblent minoritaires en comparaison des métabolites conjugués nouvellement identifiés lors des études *in vitro*.

Conclusion générale

Les RFB sont des composés qui représentent un marché important pour l'industrie chimique, et qui ont un rôle prépondérant dans la lutte contre les incendies. Les bénéfices liés à leur utilisation sont économiques, sociaux, et même environnementaux si on prend en compte la protection du milieu naturel vis-à-vis des incendies. D'un autre côté, ce sont des composés qui possèdent des caractéristiques proches des polluants organiques persistants (POPs), à savoir le transport sur de longues distances, la persistance dans l'environnement, la bioaccumulation et la toxicité. Du point de vue de leurs propriétés toxiques, ils pourraient influencer sur les fonctions de reproduction et de développement chez les mammifères, et modifier l'homéostasie des hormones thyroïdiennes et/ou stéroïdiennes. Par conséquent, la question de leur innocuité est posée et une démarche d'appréciation du risque les concernant a été amorcée. Dans le cas de deux formulations commerciales de PBDE, à savoir le penta-mix et l'octa-mix, la balance bénéfice contre risque a incité les autorités de l'ONU à les classer comme polluants organiques persistants, et ainsi d'en interdire la production et l'utilisation à travers le monde. Dans le cas des autres RFB et en particulier du TBBPA, du déca-BDE et de l'HBCD, les données scientifiques disponibles sont encore trop lacunaires pour mener à bien une telle analyse bénéfice-risque. Le déca-BDE a toutefois été interdit dans l'Union Européenne dans certains produits.

Ce travail de thèse s'est inscrit dans la continuité d'un premier projet relatif à l'exposition de l'Homme aux RFB également conduit avec le soutien financier de l'AFSSET entre 2003 et 2006. Ce dernier avait généré de nouvelles connaissances concernant le métabolisme des RFB qui était alors particulièrement méconnu. Notamment, les résultats avaient montré le passage transplacentaire du BDE-209 *in vivo* chez le rat, et précisé les connaissances sur le métabolisme du TBBPA. Ces travaux avaient également contribué à la caractérisation de l'exposition fœtale et du nouveau-né aux RFB, via la mesure de ces composés (PBDE, TBBPA et HBCD) dans un ensemble de prélèvements biologiques. Aujourd'hui, ces résultats font référence au niveau international, du fait du nombre limité d'études relatives au métabolisme des RFB et à l'exposition de ces deux populations particulièrement critiques.

Notre étude a été engagée sur ces bases afin d'approfondir les connaissances relatives aux métabolites des RFB chez l'Homme. En effet, alors que l'imprégnation de l'Homme aux composés natifs a été démontrée, d'autres études ont suggéré que certains métabolites des PBDE peuvent être biologiquement actifs, et dans certain cas responsables d'effets toxiques. Dans ce contexte, ce projet avait deux objectifs, et une finalité. Le premier objectif était d'étudier la capacité des cellules humaines à métaboliser *in vitro* les RFB, et le second objectif était d'étudier l'imprégnation de l'Homme à ces métabolites, en considérant plus particulièrement les deux sous-populations déjà visées dans le cadre du projet précédent. La finalité était d'évaluer dans

quelle mesure les RFB sont effectivement métabolisés par l'Homme, et le cas échéant de savoir si les métabolites en question peuvent être utilisés comme biomarqueurs d'exposition de l'Homme à ces composés.

Pour répondre à ces deux objectifs, nos travaux de thèse ont été articulés suivant deux parties. La première a été développée afin de préciser le métabolisme des PBDE et du TBBPA pour différents types de systèmes cellulaires humains. Le métabolisme des BDE-47 et -209 a ainsi été étudié sur des lignées cellulaires hépatiques, surrénales, ovariennes et intestinales, ainsi que sur des hépatocytes en culture primaire. Ces derniers essais ont été réalisés à la fois sur des cellules humaines et de rat, afin de savoir dans quelle mesure les données existantes sur le métabolisme, et générées *in vivo* chez le rat sont transposables à l'Homme. Le métabolisme du TBBPA a quant à lui été seulement étudié sur hépatocytes humains et hépatocytes de rat en culture primaire. La seconde partie de ce projet a été consacrée à la recherche et à la mesure, dans un ensemble de prélèvements humains collectés chez des couples mères-enfant, de deux composés parents (TBBPA et HBCD), ainsi que certains métabolites (du TBBPA et des PBDE). Seuls les métabolites jugés pertinents d'après l'analyse des résultats obtenus lors des études *in vitro* ainsi que d'après les éléments disponibles à ce sujet dans la littérature ont été recherchés.

Préalablement à la réalisation des études de métabolisme, des méthodes analytiques ont été spécialement développées, tandis que les méthodes biologiques et biochimiques habituellement utilisées pour les études de métabolisme ont été adaptées en tenant compte des difficultés de solubilisation des RFB. Notamment, une méthode d'identification des PBDE et des OH-PBDE par couplage LC-APPI-HRMS a fait l'objet d'une attention particulière car elle fait appel à une technologie récente. Une partie de ce travail a été consacrée à l'étude du comportement des analytes cibles sous différentes conditions d'analyse, avant de développer une première méthode pour l'analyse simultanée des PBDE et de leurs métabolites, notamment de type hydroxylés. Cette méthode, dont la spécificité et la sensibilité sont toutes deux apparues satisfaisantes a été appliquée avec succès aux échantillons résultants des analyses de métabolisme. Dans la seconde partie de ce projet, une stratégie analytique pour la mesure des RFB et de leurs métabolites dans le lait, le sérum, l'urine et le tissu adipeux a été développée. Le couplage LC-ESI-HRMS a été retenu ici car il s'est avéré le plus adapté aux exigences de spécificité et de sensibilité requises pour l'identification et la mesure de contaminants et de leurs métabolites présents à l'état d'ultra-traces au sein de matrices complexes. Le protocole de préparation des échantillons pour l'analyse du TBBPA, de l'HBCD, des PBDE hydroxylés et des métabolites conjugués a été développé à partir d'une seule prise d'échantillon qui soit maximale afin de favoriser la sensibilité. Les performances de cette méthode ont été vérifiées, et se sont avérées satisfaisantes pour les

composés parents, mais manquant de justesse pour l'analyse des PBDE hydroxylés notamment en raison de l'absence de certains standards internes adaptés.

Les résultats de nos études de métabolisme concernant le TBBPA ont confirmé ceux des études conduites *in vivo* pour ce composé : ce produit est essentiellement transformé par glucuronidation et/ou sulfatation par les hépatocytes de rats. Il est également totalement biotransformé par les hépatocytes humains, comme le montrent nos études sur 24 heures. Le métabolisme des hépatocytes de rat est assez similaire, mais dans ce cas la quasi-totalité des métabolites observés sont des doubles conjugués. Ces résultats sont pleinement cohérents avec les études *in vivo* précédemment publiées par Hakk *et al.* pour le rat. Cette première étude sur le métabolisme comparé du TBBPA par les hépatocytes humains et de rat nous permet de faire l'hypothèse que, comme observé chez le rat, le TBBPA pourrait être métabolisé et éliminé par l'Homme assez rapidement, sans bioaccumulation notable.

Ceci expliquerait que les taux circulants observés dans le sérum et le lait maternel soient relativement constants à travers les années, et environ 10 fois inférieurs à ceux observés pour les PBDE, alors que les quantités utilisées dans l'industrie sont similaires. Dans les échantillons à notre disposition, le TBBPA a été retrouvé dans le sérum et le lait maternel à des concentrations globalement similaires à celles observées dans d'autres études, et suggérant que l'exposition de l'homme au TBBPA serait sensiblement constante, à l'inverse d'une décroissance séculaire observée pour les POPs dont l'usage a été interdit ou restreint.

En plus du composé parent, des métabolites conjugués du TBBPA ont été détectés, toutefois en très faibles quantités (de l'ordre du pg/g) et seulement dans une fraction des prélèvements analysés (environ 19 %). Nos résultats concernant l'occurrence du TBBPA et de ses conjugués indiquent donc que celui-ci est conjugué *in vivo* par l'Homme. Ces résultats tendent à montrer que le TBBPA est, au moins pour partie, absorbé, métabolisé et excrété par diverses voies.

Si la métabolisation et l'élimination du TBBPA et de ses métabolites semblent efficaces, la seconde partie de notre étude confirme et renforce les connaissances quant au devenir de ce composé, avec de nouvelles précisions quant aux modalités de l'exposition humaine et au transfert mère/enfant. En particulier, la présente étude confirme que le TBBPA passe dans le lait maternel pour y être retrouvé en quantités supérieures à celles observées dans le sérum. S'ensuit donc une exposition du nouveau-né allaité à ce composé. Nous avons également montré que le TBBPA passe la barrière placentaire, avec un facteur de division estimé à 2 environ entre le compartiment maternel et le compartiment fœtal, montrant que le fœtus est lui aussi exposé au TBBPA et à ses conjugués. Or, en plus des effets délétères du TBBPA sur l'homéostasie des hormones thyroïdiennes, des études récentes de l'équipe de l'INRA de Toulouse ont montré que

les conjugués sulfates ont eux aussi la capacité d'agir en tant que perturbateurs endocriniens, puisqu'ils peuvent se fixer sur le récepteur PPRA- γ , qui joue un rôle important dans la régulation du métabolisme des lipides. L'implication d'une exposition prénatale au bisphénol A dans la mise en place ultérieure de désordres métaboliques (diabète, syndrome métabolique) est actuellement débattue. Le fait que des analogues halogénés tels que le TBBPA, puisse eux aussi induire des effets toxiques et produire une exposition périnatale, comme le montre notre étude, est donc à prendre en considération. En dépit des résultats récents sur l'activité des conjugués du TBBPA, l'étude présentée dans ce mémoire indique que ces composés sont difficilement utilisables comme biomarqueurs à cause de leurs faibles taux circulants. Il n'en reste pas moins que le composé parent, bien qu'il soit éliminé rapidement de l'organisme maternel, produit une exposition fœtale aussi bien que néonatale. Les résultats concernant la proportion de TBBPA sous forme conjuguée mériteraient toutefois d'être confirmés en augmentant la prise d'essai ou en regroupant plusieurs prélèvements et si possible en utilisant une méthode plus sensible. Il n'est pas impossible que l'exposition périnatale au TBBPA soit le résultat de l'exposition au composé parent, et dans une moindre mesure à ses conjugués, eux aussi activateurs du récepteur nucléaire clef PPRA- γ . Il serait donc intéressant d'identifier les métabolites de manière directe, sous leur forme non conjuguée, afin de déterminer la nature exacte des conjugués présents *in vivo* chez l'homme.

En ce qui concerne l'HBCD, nous n'avons pas pu étudier le métabolisme de ce composé, en raison de l'absence de produit radio-marqué. Le ^{14}C -HBCD a été synthétisé au moins par une entreprise, mais il nous a été impossible d'en obtenir, pour des raisons contractuelles (d'exclusivité) liant l'entreprise productrice à ses clients industriels (D. Zalko, communication personnelle). Nos travaux ont cependant apporté des informations sur le comportement de ce composé connu comme persistant et bioaccumulatif. Parmi les trois isomères recherchés, seul l' α -HBCD a été identifié. L'observation de ce seul isomère dans les prélèvements à notre disposition est cohérent avec la bibliographie qui indique que cet isomère est le principal retrouvé chez l'animal en général et chez l'Homme en particulier, alors que dans les formulations commerciales et les échantillons abiotiques, l'isomère γ -HBCD est prédominant. L' α -HBCD a ainsi été retrouvé dans certains échantillons de sérum maternel (environ 39 %), et dans la quasi-totalité des échantillons de lait maternel (environ 87 %). Nous avons en outre mis en évidence le fait que la plupart des échantillons de lait maternel analysés présentent un niveau de concentration en HBCD relativement uniforme d'un individu à l'autre. A noter que contrairement au TBBPA, le passage transplacentaire n'a pas été mis en évidence pour ce produit.

La présence de ce composé dans la quasi-totalité des échantillons de lait, ainsi que l'enrichissement en α -HBCD indiquent que suite à une exposition à l'HBCD celui-ci est absorbé et métabolisé chez l'être humain. Les premières études *in vivo* chez le rat au sujet du métabolisme de l'HBCD reportaient une excrétion rapide et totale, qui a été démentie par des études plus récentes. Ces dernières études, qui indiquent un temps de demi-vie de plusieurs jours pour l'HBCD, sont plus cohérentes avec la structure et les propriétés physico-chimiques de ce composé, mais aussi avec les niveaux résiduels que nous avons observés dans les fluides biologiques. Afin de compléter les données existantes concernant l'imprégnation de l'Homme à l'HBCD, il apparaît important de caractériser le métabolisme de ce composé par des cellules humaines, par exemple comme nous l'avons fait lors de ce projet pour le TBBPA et les PBDE. Par ailleurs, bien que les données toxicologiques concernant l'HBCD soient relativement limitées, il a d'ores et déjà été montré qu'il peut agir comme perturbateur endocrinien au niveau de l'axe thyroïdien. Afin de compléter la démarche d'appréciation du risque au sujet de ce produit il serait donc important d'étudier les effets d'une exposition chronique, en se focalisant sur des doses cohérentes avec les niveaux d'exposition humaine que nous avons mise en évidence dans la présente étude.

En ce qui concerne les PBDE, nos résultats, en accord avec ceux d'autres équipes, ont montré que le comportement des différents congénères est déterminé par le degré de bromation du composé parent. Les résultats de nos études *in vitro* sur le BDE-47, en complément des données publiées par Stapleton *et al.* en 2009, ont mis en évidence la capacité des hépatocytes humains à transformer les PBDE faiblement à moyennement bromés (tri- à hepta-BDE). En effet, la formation de métabolites hydroxylés a été observée dans notre étude pour le BDE 47, alors que Stapleton *et al.* ont observé la formation de penta-BDE hydroxylés, d'un composé tétrabromé non identifié et de bromophénols à partir du BDE-99. Nos résultats démontrent donc l'existence d'un métabolisme hépatique humain pour ce congénère, passant par une hydroxylation simple ou double avec possible saturation d'une double liaison du cycle aromatique dans le cas où les hydroxylations sont adjacentes. Les hépatocytes humains ont également la capacité de conjuguer ces métabolites de phase I par glucuronidation ou sulfatation. Cependant, cette deuxième phase n'est que partielle, des métabolites hydroxylés libres étant également présents.

Dans les prélèvements biologiques analysés, des métabolites hydroxylés et conjugués des PBDE moyennement bromés ont été identifiés, et ceci uniquement dans le sérum de sang maternel et de cordon ombilical. En concordance avec nos résultats obtenus sur hépatocytes, la plupart des métabolites retrouvés dans les échantillons de sérum sont des formes conjuguées. Les concentrations sériques de ces métabolites, de l'ordre du pg/g, sont toutefois particulièrement

variables. Cette observation rejoint là encore les résultats de nos essais *in vitro*, qui avaient montré une variabilité interindividuelle importante concernant la métabolisation du BDE-47.

La présence de métabolites dans les échantillons (sérum) de sang du cordon ombilical montre que, tout comme les composés parents, les métabolites des PBDE peuvent passer la barrière placentaire. Alternativement, il est également possible que les PBDE soient métabolisés par le fœtus, puisque les quantités de métabolites conjugués sont parfois supérieures dans les échantillons fœtaux par rapport à l'échantillon maternel correspondant. La mise en place des capacités métaboliques de phase II est progressive au cours de la gestation, et est assez tardive. Cette hypothèse est donc plausible, en particulier à terme.

Comme dans le cas des métabolites conjugués du TBBPA, les métabolites des PBDE hydroxylés moyennement bromés sont présents dans les fluides biologiques à des concentrations trop faibles pour qu'ils puissent être utilisés comme biomarqueurs. Cependant, si ceci est vrai pour la population française en particulier, ce n'est peut être pas le cas pour d'autres populations plus exposées aux PBDE, comme les populations américaines ou asiatiques.

Le cas du BDE-209 est différent, car les premières études de métabolisme au sujet de ce composé indiquaient que celui-ci n'est ni absorbé ni métabolisé. Depuis, plusieurs études *in vivo* chez le rat ont démenti ces résultats et ont au contraire montré qu'une partie assez importante est en fait absorbée, et que ce composé est métabolisé, par débromation et par oxydation. Au moment où ce projet débutait, aucune donnée n'existait sur le métabolisme du BDE-209 par des cellules d'origine humaine, et nous avons donc décidé d'étudier la capacité de plusieurs types de cellules à transformer ce composé. Les premiers essais ont été réalisés sur hépatocytes humains et de rat en culture primaire, et nos résultats sont venus conforter ceux de Stapleton *et al* de 2009. Le BDE-209 n'est pas métabolisé par les hépatocytes humains, malgré une activation de cytochromes, notée par ces auteurs. Nous avons ensuite étudié le métabolisme de ce RFB avec différentes lignées cellulaires humaines, mais aucun métabolite n'a été détecté. Il était important de réaliser cette étude, car le DBDE a pour tissus cibles non seulement le foie, mais aussi deux glandes endocrines : les ovaires et les surrénales, comme ce ceci a été montré *in vivo* chez le rat. Or, ces tissus extra-hépatiques sont impliqués dans la production d'hormones, par exemple le cortisol et l'aldostérone qui sont produits dans les surrénales. L'hypothèse que les enzymes impliquées dans ces voies métaboliques soient partiellement responsables de la biotransformation du BDE-209 devait donc être explorée. Plusieurs éléments laissent supposer que ces résultats ne permettent pas de conclure à une absence totale de métabolisation du BDE-209 par l'Homme. En effet, en premier lieu, la présence d'un composé, en quantité toutefois trop faible pour être identifié, a été détectée dans les incubations de cellules surrénaliennes et

ovariennes incubées avec un promoteur de la production des cytochromes impliqués dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes. En outre, il faut également tenir compte du fait que si les lignées cellulaires utilisées dans ce travail constituent des modèles relativement faciles à obtenir, ils restent assujettis à certaines limites sur le plan du métabolisme, car il s'agit de lignées de cellules cancéreuses dont l'activité enzymatique est altérée par rapport à des cellules saines.

La recherche de métabolites du BDE-209 a donc été réalisée sur la base des observations faites *in vivo* chez le rat, et en faisant l'hypothèse que si le métabolisme de ce composé existe chez l'Homme, il pourrait être similaire à celui observé pour les PBDE moins bromés (débromation, oxydation). Dans les échantillons biologiques à notre disposition, nous avons donc recherché des métabolites de type octa- et nona-BDE hydroxylés. Nos hypothèses se sont avérées justes, puisqu'un octa-BDE hydroxylé a été retrouvé dans une grande majorité des échantillons de sérum maternel et fœtal, à des concentrations de l'ordre de quelques dizaines de pg/g. Un nona-BDE hydroxylé a également été identifié dans quelques échantillons de sérum, parmi les plus concentrés en octa-BDE hydroxylé. Des octa-BDE hydroxylés ont déjà été identifiés dans des échantillons de sérum humain (Yu et al., 2010) et dans des études de métabolisme réalisées *in vivo* chez le rat (Morck et al., 2003), et il apparaît donc justifié de penser qu'il s'agit bien de métabolites du BDE-209, et que ce composé est donc effectivement métabolisé *in vivo* par l'homme.

Cependant, quelques caractéristiques de l'imprégnation de la mère et de son nouveau-né à l'octa-BDE hydroxylé nous interpellent. La première spécificité est que l'octa-BDE hydroxylé a été identifié dans le sérum maternel et fœtal, mais pas dans le lait maternel, alors que ces observations ne semblent pas pouvoir être clairement attribuables à un phénomène biologique ou à une question de seuil de détection analytique. La seconde spécificité est qu'aucun hepta- ou hexa-BDE hydroxylé, ni aucun métabolite conjugué hexa- à nona-bromé n'a été détecté, ce qui suggère que la métabolisation du BDE-209 pourrait être limitée à une double débromation et à une hydroxylation pour conduire à un octa-BDE hydroxylé. Il est également possible qu'à partir de ce point le processus de débromation soit inefficace et soit relayé par des processus oxydatifs différents menant, par exemple, à la production de bromophénols. Cette interprétation est plausible puisque les bromophénols ont été identifiés comme métabolites des PBDE à plusieurs reprises. Par ailleurs, les données déjà obtenues chez le rat sont en adéquation, puisque la biotransformation du BDE-209 chez le rat (après une exposition quotidienne courte de 4 jours) était largement limitée à l'apparition de PBDE portant au minimum 8 atomes de brome (Riu et al., 2008). Les auteurs avaient fait l'hypothèse que l'octa-BDE hydroxylé était l'un des métabolites principaux formés et qu'une durée d'exposition plus longue aurait peut-être conduit à l'apparition de PBDE de poids moléculaire moins important (tetra et penta-BDE notamment).

Les résultats de la présente étude suggèrent que l'explication pourrait être différente, et que les voies métaboliques suivies sont chez le rat également, une débromation limitée au stade hepta- ou octa-BDE, comme l'hypothèse en a été formulée plus haut. Cependant, il n'est à ce jour pas possible d'exclure l'une ou l'autre hypothèse, mais il est évident que l'octa-BDE hydroxylé est un métabolite majeur. Une troisième spécificité est que les concentrations en octa-BDE hydroxylé par rapport au composé parent semblent élevées en comparaison des PBDE moyennement bromés. Ceci indiquerait alors une accumulation de l'octa-BDE hydroxylé lui-même peu métabolisé ou faiblement excrété. Or, aucune donnée n'existe sur le potentiel toxique de ce composé qui pourrait, tout comme les congénères tétra- et penta-bromés être un perturbateur endocrinien.

L'ensemble de ces considérations nous amène à penser que l'octa-BDE hydroxylé, et possiblement le nona-BDE hydroxylé, pourraient être utilisés comme biomarqueurs de l'exposition au BDE-209, en raison de leur fréquence de détection élevée et des concentrations observées, souvent bien supérieures à la limite de détection de notre méthode.

Ces résultats suggèrent aussi que le BDE-209 n'est pas aussi inerte que ne le laissent penser de précédentes études à son sujet. Il apparaît désormais déterminant de caractériser précisément le métabolisme humain de ce composé, en utilisant comme nous l'avons déjà suggéré divers types de cellules d'origine humaine en culture primaire ou sous forme de tranches d'organe en survie. D'autre part, l'acquisition de connaissances supplémentaires au sujet de l'octa-BDE hydroxylé s'avère dorénavant nécessaire, tant au niveau de l'évaluation de l'exposition que de la caractérisation du danger.

En conclusion, ces travaux ont montré que les PBDE et le TBBPA sont effectivement métabolisés par l'Homme. L'activité biologique des métabolites est maintenant établie pour les conjugués sulfate du TBBPA et les tétra- et penta-BDE hydroxylés. La présence des premiers dans les fluides biologiques n'a pas été directement prouvée, mais est supposée sur la base des résultats obtenus *in vitro* sur hépatocytes en culture primaire. La présence des seconds semble quant à elle minoritaire, tout comme l'ont montré d'autres études. Ces composés, incluant les conjugués du TBBPA, les tétra- et les penta-BDE hydroxylés (et leurs conjugués) ne semblent donc au final pas pouvoir être utilisés comme biomarqueurs de l'exposition de l'homme aux PBDE, au vu de leurs concentrations plus faibles que celles des composés parents. En revanche, l'octa-BDE hydroxylé, que nous supposons être le métabolite principal du BDE-209, est présent en quantité relativement importante comparé au composé parent dans la plupart des échantillons, et pourrait donc être utilisé comme biomarqueur de l'exposition au BDE-209. Ceci apparaît être

d'autant plus pertinent que la seule autre source possible, pour ce métabolite, est une exposition à des octa-BDE (octa-mix), composés qui ne sont aujourd'hui plus utilisés.

Références bibliographiques

Abdallah, M.A., Harrad, S., 2011. Tetrabromobisphenol-A, hexabromocyclododecane and its degradation products in UK human milk: Relationship to external exposure. *Environment International* 37, 443-448.

Abdallah, M.A.-E., Ibarra, C., Neels, H., Harrad, S., Covaci, A., 2008. Comparative evaluation of liquid chromatography-mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry for the determination of hexabromocyclododecanes and their degradation products in indoor dust. *Journal of Chromatography A* 1190, 333-341.

Antignac, J.P., Cariou, R., Maume, D., Marchand, P., Monteau, F., Zalko, D., Berrebi, A., Cravedi, J.P., Andre, F., Le Bizec, B., 2008. Exposure assessment of fetus and newborn to brominated flame retardants in France: preliminary data. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 258-265.

Antignac, J.P., Cariou, R., Zalko, D., Berrebi, A., Cravedi, J.P., Maume, D., Marchand, P., Monteau, F., Riu, A., Andre, F., Le Bizec, B., 2009. Exposure assessment of French women and their newborn to brominated flame retardants: Determination of tri- to deca-polybromodiphenylethers (PBDE) in maternal adipose tissue, serum, breast milk and cord serum. *Environmental Pollution* 157, 164-173.

Athanasiadou, M., Cuadra, S.N., Marsh, G., Bergman, A., Jakobsson, K., 2008. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and bioaccumulative hydroxylated PBDE metabolites in young humans from Managua, Nicaragua. *Environmental Health Perspectives* 116, 400-408.

Athanasiadou, M., Marsh, G., Athanassiadis, I., Asplund, L., Bergman, Å., 2006. Gas chromatography and mass spectrometry of methoxylated polybrominated diphenyl ethers (MeO-PBDEs). *Journal of Mass Spectrometry* 41, 790-801.

Bagag, A., 2008. Photoionisation et spectrométrie de masse : un nouvel outil pour l'identification de biomolécules. Université d'Evry Val d'Essone, p. 371.

Bergman, A., Klasson-Wehler, E., Kuroki, H., 1994. Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ Health Perspect* 102.

Branchi, I., Capone, F., Alleva, E., Costa, L.G., 2003. Polybrominated Diphenyl Ethers: Neurobehavioral Effects Following Developmental Exposure. *NeuroToxicology* 24, 449-462.

Brandsma, S.H., Ven, L.T.M.v.d., Boer, J.d., Leonards, P.E.G., 2009. Identification of hydroxylated metabolites of hexabromocyclododecane in wildlife and 28-days exposed Wistar rats. *Environmental Science & Technology* 43, 6058-6063.

BSEF, 2003. Major Brominated Flame Retardants Volume Estimates Total Market Demand By Region in 2001, 21 January 2003.

BSEF, 2009. HBCD fact sheet.

BSEF, 2010a. Deca-BDE fact sheet.

BSEF, 2010b. TBBPA fact sheet.

Cai, Y.M., Zhang, W.B., Hu, J.J., Sheng, G.Y., Chen, D.J., Fu, J.M., 2011. Characterization of maternal transfer of decabromodiphenyl ether (BDE-209) administered to pregnant Sprague-Dawley rats. *Reproductive Toxicology* 31, 106-110.

- Canton, R.F., Sanderson, J.T., Letcher, R.J., Bergman, A., van den Berg, M., 2005. Inhibition and induction of aromatase (CYP19) activity by brominated flame retardants in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicological Sciences* 88, 447-455.
- Canton, R.F., Sanderson, J.T., Nijmeijer, S., Bergman, A., Letcher, R.J., van den Berg, M., 2006. In vitro effects of brominated flame retardants and metabolites on CYP17 catalytic activity: A novel mechanism of action? *Toxicology and Applied Pharmacology* 216, 274-281.
- Canton, R.F., Scholten, D.E.A., Marsh, G., De Jong, P.C., Van den Berg, M., 2008. Inhibition of human placental aromatase activity by hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs). *Toxicology and Applied Pharmacology* 227, 68-75.
- Cariou, R., 2006a. Évaluation de l'exposition du fœtus et du nouveau-né aux perturbateurs endocriniens de type retardateurs de flamme bromés. Université de Nantes - Chimie Biologie, p. 306.
- Cariou, R., 2006b. Évaluation de l'exposition du fœtus et du nouveau-né aux perturbateurs endocriniens de type retardateurs de flamme bromés. Chimie Biologie. Université de Nantes, p. 306.
- Cariou, R., Antignac, J.-P., Zalko, D., Berrebi, A., Cravedi, J.-P., Maume, D., Marchand, P., Monteau, F., Riu, A., Andre, F., bizec, B.L., 2008. Exposure assessment of French women and their newborns to tetrabromobisphenol-A: Occurrence measurements in maternal adipose tissue, serum, breast milk and cord serum. *Chemosphere* 73, 1036-1041.
- CE, 2001. EUR 19730 European Union Risk Assessment Report – Diphenyl ether, pentabromo derivative. p. 282.
- CE, 2002. EUR 20402 EN European Union Risk Assessment Report – Bis(pentabromophenyl) ether. p. 282.
- CE, 2003. EUR 20403 EN European Union Risk Assessment Report – Diphenyl ether, octabromo derivative. p. 262.
- CE, 2006. EUR 22161 EN European Union Risk Assessment Report – 2,2',6,6'-tetrabromo-4,4'-isopropylidenediphenol (tetrabromobisphenol-A or TBBP-A), Part II – Human Health. p. 158.
- CE, 2008. R044-0805-env-hh-final-ECB Risk Assessment:Hexabromocyclododecane. p. 507.
- Chang, H., Wan, Y., Naile, J., Zhang, X.W., Wiseman, S., Hecker, M., Lam, M.H.W., Giesy, J.P., Jones, P.D., 2010. Simultaneous quantification of multiple classes of phenolic compounds in blood plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 506-513.
- Chen, L.J., Lebetkin, E.H., Sanders, J.M., Burka, L.T., 2006. Metabolism and disposition of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE99) following a single or repeated administration to rats or mice. *Xenobiotica* 36, 515-534.
- Cheng, S.W., Randall, K., Kotchevar, A.T., 2008. In Vitro Metabolism Studies of Polybrominated Diphenyl Ethers Using Rat and Human Liver Microsomes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. Science Publications, pp. 295-303.
- Covaci, A., Gerecke, A.C., Law, R.J., Voorspoels, S., Kohler, M., Heeb, N.V., Leslie, H., Allchin, C.R., de Boer, J., 2006. Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans: A review. *Environmental Science & Technology* 40, 3679-3688.

- Covaci, A., Voorspoels, S., Abdallah, M.A.-E., Geens, T., Harrad, S., Law, R.J., 2009. Analytical and environmental aspects of the flame retardant tetrabromobisphenol-A and its derivatives. *Journal of Chromatography A* 1216, 346-363.
- Darnerud, P.O., 2003. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environment International* 29, 841-853.
- de la Torre, A., Pacepavicius, G., Martínez, M., Darling, C., Muir, D., Alae, M., 2009. Methoxylated and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in brown bullhead (*ameiurus nebulosus*) plasma from lake ontario. *Organohalogen Compounds* 71, 2105-2110.
- de Wit, C.A., Herzke, D., Vorkamp, K., 2010. Brominated flame retardants in the Arctic environment - trends and new candidates. *Science of the Total Environment* 408, 2885-2918.
- Debrauwer, L., Riu, A., Jouahri, M., Rathahao, E., Jouanin, I., Antignac, J.P., Cariou, R., Le Bizec, B., Zalko, D., 2005. Probing new approaches using atmospheric pressure photo ionization for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1082, 98-109.
- DePierre, J.W., Ernster, L., 1978. The metabolism of polycyclic hydrocarbons and its relationship to cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 473, 149-186.
- Dingemans, M.M.L., Heusinkveld, H.J., Bergman, A., van den Berg, M., Westerink, R.H.S., 2010. Bromination Pattern of Hydroxylated Metabolites of BDE-47 Affects Their Potency to Release Calcium from Intracellular Stores in PC12 Cells. *Environmental Health Perspectives* 118, 519-525.
- Domingo, J.L., Marti-Cid, R., Castell, V., Llobet, J.M., 2008. Human exposure to PBDEs through the diet in Catalonia, Spain: Temporal trend - A review of recent literature on dietary PBDE intake. *Toxicology* 248, 25-32.
- Dumont, C., Perdu, E., de Sousa, G., Debrauwer, L., Rahmani, R., Cravedi, J.-P., Chagnon, M.-C., 2011. Bis(hydroxyphenyl)methane—bisphenol F—metabolism by the HepG2 human hepatoma cell line and cryopreserved human hepatocytes. *Drug and Chemical Toxicology* 34, 445-453.
- EFRA, 2004a. Retardateurs de flammes, les questions les plus courantes. p. <http://www.flameretardants.eu/content/Default.asp?PageID=116>.
- EFRA, 2004b. Retardateurs de flammes, les questions les plus courantes.
- EFRA, 2006. Flame retardant market statistics.
- EFRA, 2011a. Flame retardants - How do they work ?
- EFRA, 2011b. VECAP Annual Progress Report 2010.
- Eljarrat, E., Guerra, P., Martinez, E., Farre, M., Alvarez, J.G., Lopez-Teijon, M., Barcelo, D., 2009. Hexabromocyclododecane in Human Breast Milk: Levels and Enantiomeric Patterns. *Environmental Science & Technology* 43, 1940-1946.
- Ema, M., Fujii, S., Hirata-Koizumi, M., Matsumoto, M., 2008. Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats. *Reproductive Toxicology* 25, 335-351.

- Emsley, A., Lim, L., Stevens, G., Williams, P., 2005. International Fire Statistics and the Potential Benefits of Fire Counter-Measures For European Flame Retardants Association.
- Eriksson, P., Fischer, C., Wallin, M., Jakobsson, E., Fredriksson, A., 2006. Impaired behaviour, learning and memory, in adult mice neonatally exposed to hexabromocyclododecane (HBCDD). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21, 317-322.
- Eriksson, P., Jakobsson, E., Fredriksson, A., 2001. Brominated flame retardants: A novel class of developmental neurotoxicants in our environment? *Environmental Health Perspectives* 109, 903-908.
- Erratico, C.A., Szeitz, A., Bandiera, S.M., 2010. Validation of a novel in vitro assay using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC/MS) to detect and quantify hydroxylated metabolites of BDE-99 in rat liver microsomes. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878, 1562-1568.
- Evenset, A., Christensen, G.N., Carroll, J., Zaborska, A., Berger, U., Herzke, D., Gregor, D., 2007. Historical trends in persistent organic pollutants and metals recorded in sediment from Lake Ellasjoen, Bjornoya, Norwegian Arctic. *Environmental Pollution* 146, 196-205.
- Feng, C.L., Xu, Y.P., He, Y., Luo, Q.A., Zha, J.M., Wang, Z.J., 2010. Debrominated and methoxylated polybrominated diphenyl ether metabolites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to decabromodiphenyl ether. *Journal of Environmental Sciences-China* 22, 1425-1434.
- Fery, Y., Buschauer, I., Salzig, C., Lang, P., Schrenk, D., 2009. Technical pentabromodiphenyl ether and hexabromocyclododecane as activators of the pregnane-X-receptor (PXR). *Toxicology* 264, 45-51.
- Frederiksen, M., Thomsen, C., Froshaug, M., Vorkamp, K., Thomsen, M., Becher, G., Knudsen, L.E., 2010. Polybrominated diphenyl ethers in paired samples of maternal and umbilical cord blood plasma and associations with house dust in a Danish cohort. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213, 233-242.
- Frederiksen, M., Thomsen, M., Vorkamp, K., Knudsen, L.E., 2009a. Patterns and concentration levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in placental tissue of women in Denmark. *Chemosphere* 76, 1464-1469.
- Frederiksen, M., Vorkamp, K., Thomsen, M., Knudsen, L.E., 2009b. Human internal and external exposure to PBDEs - A review of levels and sources. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212, 109-134.
- Galindo-Iranzo, P., Quintanilla-López, J.E., Lebrón-Aguilar, R., Gómara, B., 2009. Improving the sensitivity of liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of hexabromocyclododecanes by chlorine adduct generation. *Journal of Chromatography A* 1216, 3919-3926.
- Gebbink, W.A., Sonne, C., Dietz, R., Kirkegaard, M., Riget, F.F., Born, E.W., Muir, D.C.G., Letcher, R.J., 2008. Tissue-specific congener composition of organohalogen and metabolite contaminants in East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*). *Environmental Pollution* 152, 621-629.
- Geneva-Association, 2010. World Fire Statistics 26.
- Germer, S., Piersma, A.H., van der Ven, L., Kamyschnikow, A., Fery, Y., Schmitz, H.J., Schrenk, D., 2006. Subacute effects of the brominated flame retardants

- hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A on hepatic cytochrome P450 levels in rats. *Toxicology* 218, 229-236.
- Grossman, R., Finkel, R., 2006. ACE Organic pKa calculator.
- Guerra, P., Eljarrat, E., Barceló, D., 2011. Determination of halogenated flame retardants by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30, 842-855.
- Guitart, C., Slattery, M., Ankisetty, S., Radwan, M., Ross, S.J., Letcher, R.J., Reddy, C.M., 2011. Contemporary ¹⁴C radiocarbon levels of oxygenated polybrominated diphenyl ethers (O-PBDEs) isolated in sponge–cyanobacteria associations. *Marine Pollution Bulletin* 62, 631-636.
- Hakk, H., Huwe, J.K., Murphy, K., Rutherford, D., 2010. Metabolism of 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl Ether (BDE-47) in Chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 8757-8762.
- Hakk, H., Larsen, G., Bergman, Å., Örn, U., 2000. Metabolism, excretion and distribution of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in conventional and bile-duct cannulated rats. *Xenobiotica* 30, 881-890.
- Hakk, H., Letcher, R.J., 2003. Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants--a review. *Environment International* 29, 801-828.
- Hale, R.C., La Guardia, M.J., Harvey, E., Gaylor, M.O., Mainor, T.M., 2006. Brominated flame retardant concentrations and trends in abiotic media. *Chemosphere* 64, 181-186.
- Handayani, D., Edrada, R.A., Proksch, P., Wray, V., Witte, L., Van Soest, R.W.M., Kunzmann, A., Soedarsono, 1997. Four New Bioactive Polybrominated Diphenyl Ethers of the Sponge *Dysidea herbacea* from West Sumatra, Indonesia. *Journal of Natural Products* 60, 1313-1316.
- Harrad, S., Abdallah, M.A.E., Rose, N.L., Turner, S.D., Davidson, T.A., 2009. Current-Use Brominated Flame Retardants in Water, Sediment, and Fish from English Lakes. *Environmental Science & Technology* 43, 9077-9083.
- Harrad, S., Ibarra, C., Abdallah, M.A.E., Boon, R., Neels, H., Covaci, A., 2008a. Concentrations of brominated flame retardants in dust from United Kingdom cars, homes, and offices: Causes of variability and implications for human exposure. *Environment International* 34, 1170-1175.
- Harrad, S., Ibarra, C., Diamond, M., Melymuk, L., Robson, M., Douwes, J., Roosens, L., Dirtu, A.C., Covaci, A., 2008b. Polybrominated diphenyl ethers in domestic indoor dust from Canada, New Zealand, United Kingdom and United States. *Environment International* 34, 232-238.
- Hassanin, A., Johnston, A.E., Thomas, G.O., Jones, K.C., 2005. Time trends of atmospheric PBDEs inferred from archived UK herbage. *Environmental Science & Technology* 39, 2436-2441.
- Haukås, M., Mariussen, E., Ruus, A., Tollefsen, K.E., 2009. Accumulation and disposition of hexabromocyclododecane (HBCD) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 95, 144-151.
- Hayama, T., Yoshida, H., Onimaru, S., Yonekura, S., Kuroki, H., Todoroki, K., Nohta, H., Yamaguchi, M., 2004. Determination of tetrabromobisphenol A in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 809, 131-136.

- Helleday, T., Tuominen, K.-L., Bergman, Å., Jenssen, D., 1999. Brominated flame retardants induce intragenic recombination in mammalian cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 439, 137-147.
- Hermanson, M.H., Isaksson, E., Forsstrom, S., Texeira, C., Muir, D.C.G., Pohjola, V.A., van de Wal, R.S.V., 2010. Deposition History of Brominated Flame Retardant Compounds in an Ice Core from Høltedahlfonna, Svalbard, Norway. *Environmental Science & Technology* 44, 7405-7410.
- Hovander, L., Malmberg, T., Athanasiadou, M., Athanassiadis, L., Rahm, S., Bergman, A., Wehler, E.K., 2002. Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 105-117.
- Howe, P.D., Dobson, S., Malcolm, H.M., 2005. 2,4,6-Tribromophenol and other simple brominated phenols. WHO, IPCS Concise International Chemical Assessment Documents.
- Huang, H.L., Zhang, S.Z., Christie, P., 2011. Plant uptake and dissipation of PBDEs in the soils of electronic waste recycling sites. *Environmental Pollution* 159, 238-243.
- Hutzinger, O., Thoma, H., 1987. Polybrominated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: the flame retardant issue. *Chemosphere* 16, 1877-1880.
- Huwe, J.K., Hakk, H., Smith, D.J., Diliberto, J.J., Richardson, V., Stapleton, H.M., Birnbaum, L.S., 2008. Comparative absorption and bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers following ingestion via dust and oil in male rats. *Environmental Science & Technology* 42, 2694-2700.
- INSEE, 2011. Bilan démographique 2010.
- Isobe, T., Oda, H., Takayanagi, N., Kunisue, T., Komori, H., Arita, N., Ueda, N., Nose, M., Yamada, T., Takahashi, S., Tanabe, S., 2009. Hexabromocyclododecanes in human adipose tissue from Japan. *Environmental Chemistry* 6, 328-333.
- Janak, K., Sellstrom, U., Johansson, A.K., Becher, G., de Wit, C.A., Lindberg, P., Helander, B., 2008. Enantiomer-specific accumulation of hexabromocyclododecanes in eggs of predatory birds. *Chemosphere* 73, S193-S200.
- Johnson-Restrepo, B., Adams, D.H., Kannan, K., 2008. Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecanes (HBCDs) in tissues of humans, dolphins, and sharks from the United States. *Chemosphere* 70, 1935-1944.
- Kakimoto, K., Akutsu, K., Konishi, Y., Tanaka, Y., 2008. Time trend of hexabromocyclododecane in the breast milk of Japanese women. *Chemosphere* 71, 1110-1114.
- Kato, Y., Okada, S., Atobe, K., Endo, T., Matsubara, F., Oguma, T., Haraguchi, K., 2009. Simultaneous Determination by APCI-LC/MS/MS of Hydroxylated and Methoxylated Polybrominated Diphenyl Ethers Found in Marine Biota. *Analytical Chemistry* 81, 5942-5948.
- Kawashiro, Y., Fukata, H., Inoue, M.O., Kubonoya, K., Jotaki, T., Takigami, H., Sakai, S.I., Mori, C., 2008. Perinatal Exposure to Brominated Flame Retardants and Polychlorinated Biphenyls in Japan. *Endocrine Journal* 55, 1071-1084.
- Kelly, B.C., Ikonomou, M.G., Blair, J.D., Gobas, F., 2008. Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in a Canadian Arctic marine food web. *Environmental Science & Technology* 42, 7069-7077.

- Kitamura, S., Shinohara, S., Iwase, E., Sugihara, K., Uramaru, N., Shigematsu, H., Fujimoto, N., Ohta, S., 2008. Affinity for thyroid hormone and estrogen receptors of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers. *Journal of Health Science* 54, 607-614.
- Kohler, M., Zennegg, M., Bogdal, C., Gerecke, A.C., Schmid, P., Heeb, N.V., Sturm, M., Vonmont, H., Kohler, H.P.E., Giger, W., 2008. Temporal trends, congener patterns, and sources of Octa-, Nona-, and decabromodiphenyl ethers (PBDE) and hexabromocyclododecanes (HBCD) in Swiss lake sediments. *Environmental Science & Technology* 42, 6378-6384.
- Kuiper, R.V., Cantón, R.F., Leonards, P.E.G., Jenssen, B.M., Dubbeldam, M., Wester, P.W., van den Berg, M., Vos, J.G., Vethaak, A.D., 2007. Long-term exposure of European flounder (*Platichthys flesus*) to the flame-retardants tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecane (HBCD). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 349-360.
- Kuiper, R.V., Vethaak, A.D., Cantón, R.o.F., Anselmo, H., Dubbeldam, M., van den Brandhof, E.-J., Leonards, P.E.G., Wester, P.W., den Berg, M.v., 2008. Toxicity of analytically cleaned pentabromodiphenylether after prolonged exposure in estuarine European flounder (*Platichthys flesus*), and partial life-cycle exposure in fresh water zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 73, 195-202.
- Lacorte, S., Ikononou, M.G., 2009. Occurrence and congener specific profiles of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated derivatives in breast milk from Catalonia. *Chemosphere* 74, 412-420.
- Law, R.J., Bersuder, P., Barry, J., Wilford, B.H., Allchin, C.R., Jepson, P.D., 2008a. A Significant Downturn in Levels of Hexabromocyclododecane in the Blubber of Harbor Porpoises (*Phocoena phocoena*) Stranded or Bycaught in the UK: An Update to 2006. *Environmental Science & Technology* 42, 9104-9109.
- Law, R.J., Herzke, D., Harrad, S., Morris, S., Bersuder, P., Allchin, C.R., 2008b. Levels and trends of HBCD and BDEs in the European and Asian environments, with some information for other BFRs. *Chemosphere* 73, 223-241.
- Lee, E., Kim, T.H., Choi, J.S., Nabanata, P., Kim, N.Y., Ahn, M.Y., Jung, K.K., Kang, I.H., Kim, T.S., Kwack, S.J., Park, K.L., Kim, S.H., Kang, T.S., Lee, J., Lee, B.M., Kim, H.S., 2010. Evaluation of liver and thyroid toxicity in Sprague-Dawley rats after exposure to polybrominated diphenyl ether BDE-209. *Journal of Toxicological Sciences* 35, 535-545.
- Legler, J., Brouwer, A., 2003. Are brominated flame retardants endocrine disruptors? *Environment International* 29, 879-885.
- Letcher, R.J., Gebbink, W.A., Sonne, C., Born, E.W., McKinney, M.A., Dietz, R., 2009. Bioaccumulation and biotransformation of brominated and chlorinated contaminants and their metabolites in ringed seals (*Pusa hispida*) and polar bears (*Ursus maritimus*) from East Greenland. *Environment International* 35, 1118-1124.
- Li, Y.N., Zhou, Q.X., Wang, Y.Y., Xie, X.J., 2011. Fate of tetrabromobisphenol A and hexabromocyclododecane brominated flame retardants in soil and uptake by plants. *Chemosphere* 82, 204-209.
- Lignell, S., Aune, M., Darnerud, P.O., Cnattingius, S., Glynn, A., 2009. Persistent organochlorine and organobromine compounds in mother's milk from Sweden 1996-2006: Compound-specific temporal trends. *Environmental Research* 109, 760-767.
- Lilienthal, H., van der Ven, L.T.M., Piersma, A.H., Vos, J.G., 2009. Effects of the brominated flame retardant hexabromocyclododecane (HBCD) on dopamine-dependent behavior and

- brainstem auditory evoked potentials in a one-generation reproduction study in Wistar rats. *Toxicology Letters* 185, 63-72.
- Linderholm, L., Biague, A., Mansson, F., Norrgren, H., Bergman, A., Jakobsson, K., 2010. Human exposure to persistent organic pollutants in West Africa - A temporal trend study from Guinea-Bissau. *Environment International* 36, 675-682.
- Lupton, S.J., McGarrigle, B.P., Olson, J.R., Wood, T.D., Aga, D.S., 2009. Human Liver Microsome-Mediated Metabolism of Brominated Diphenyl Ethers 47, 99, and 153 and Identification of Their Major Metabolites. *Chemical Research in Toxicology* 22, 1802-1809.
- Lupton, S.J., McGarrigle, B.P., Olson, J.R., Wood, T.D., Aga, D.S., 2010. Analysis of hydroxylated polybrominated diphenyl ether metabolites by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 2227-2235.
- Malarvannan, G., Kunisue, T., Isobe, T., Sudaryanto, A., Takahashi, S., Prudente, M., Subramanian, A., Tanabe, S., 2009. Organohalogen compounds in human breast milk from mothers living in Payatas and Malate, the Philippines: levels, accumulation kinetics and infant health risk. *Environmental Pollution* 157, 157 (156) 1924-1932.
- Malmberg, T., Athanasiadou, M., Marsh, G., Brandt, I., Bergman, A., 2005. Identification of hydroxylated polybrominated diphenyl ether metabolites in blood plasma from polybrominated diphenyl ether exposed rats. *Environmental Science & Technology* 39, 5342-5348.
- Malmvarn, A., Zebuhr, Y., Kautsky, L., Bergman, A., Asplund, L., 2008. Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers and polybrominated dibenzo-p-dioxins in red alga and cyanobacteria living in the Baltic Sea. *Chemosphere* 72, 910-916.
- Marchesini, G.R., Meimaridou, A., Haasnoot, W., Meulenberg, E., Albertus, F., Mizuguchi, M., Takeuchi, M., Irth, H., Murk, A.J., 2008. Biosensor discovery of thyroxine transport disrupting chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 232, 150-160.
- Marchi, I., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., 2009. Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: A review. *Talanta* 78, 1-18.
- Mariussen, E., Fonnum, F., 2003. The effect of brominated flame retardants on neurotransmitter uptake into rat brain synaptosomes and vesicles. *Neurochemistry International* 43, 533-542.
- Mariussen, E., Haukas, M., Arp, H.P.H., Goss, K.U., Borgen, A., Sandanger, T.M., 2010. Relevance of 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane diastereomer structure on partitioning properties, column-retention and clean-up procedures. *Journal of Chromatography A* 1217, 1441-1446.
- Mariussen, E., Steinnes, E., Breivik, K., Nygard, T., Schlabach, M., Kalas, J.A., 2008. Spatial patterns of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in mosses, herbivores and a carnivore from the Norwegian terrestrial biota. *Science of the Total Environment* 404, 162-170.
- Marsh, G., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Sandholm, A., 2006. Identification of hydroxylated metabolites in 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether exposed rats. *Chemosphere* 63, 690-697.
- Marsh, G., Athanasiadou, M., Bergman, A., Asplund, L., 2004. Identification of hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in Baltic Sea salmon (*Salmo salar*) blood. *Environmental Science & Technology* 38, 10-18.

- Marsh, G., Stenutz, R., Bergman, A., 2003. Synthesis of hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers - Natural products and potential polybrominated diphenyl ether metabolites. *European Journal of Organic Chemistry*, 2566-2576.
- Mas, S., Jauregui, O., Rubio, F., de Juan, A., Tauler, R., Lacorte, S., 2007. Comprehensive liquid chromatography-ion-spray tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of eight hydroxylated brominated diphenyl ethers in environmental matrices. *Journal of Mass Spectrometry* 42, 890-899.
- Mascolo, G., Locaputo, V., Mininni, G., 2010. New perspective on the determination of flame retardants in sewage sludge by using ultrahigh pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry with different ion sources. *Journal of Chromatography A* 1217, 4601-4611.
- McCormick, J.M., Paiva, M.S., Haggblom, M.M., Cooper, K.R., White, L.A., 2010. Embryonic exposure to tetrabromobisphenol A and its metabolites, bisphenol A and tetrabromobisphenol A dimethyl ether disrupts normal zebrafish (*Danio rerio*) development and matrix metalloproteinase expression. *Aquatic Toxicology* 100, 255-262.
- McKinney, M.A., De Guise, S., Martineau, D., Béland, P., Arukwe, A., Letcher, R.J., 2006. Biotransformation of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and rat mammalian model using an in vitro hepatic microsomal assay. *Aquatic Toxicology* 77, 87-97.
- McKinney, M.A., Dietz, R., Sonne, C., De Guise, S., Skirnisson, K., Karlsson, K., Steingrímsson, E., Letcher, R.J., 2011. Comparative hepatic microsomal biotransformation of selected PBDEs, including decabromodiphenyl ether, and decabromodiphenyl ethane flame retardants in Arctic marine-feeding mammals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 1506-1514.
- Meerts, I., Letcher, R.J., Hoving, S., Marsh, G., Bergman, A., Lemmen, J.G., van der Burg, B., Brouwer, A., 2001. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PBDEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental Health Perspectives* 109, 399-407.
- Meerts, I., van Zanden, J.J., Luijckx, E.A.C., van Leeuwen-Bol, I., Marsh, G., Jakobsson, E., Bergman, A., Brouwer, A., 2000. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicological Sciences* 56, 95-104.
- Meijer, L., Weiss, J., Van Velzen, M., Brouwer, A., Bergman, A., Sauerf, P.J.J., 2008. Serum concentrations of neutral and phenolic organohalogenes in pregnant women and some of their infants in the Netherlands. *Environmental Science & Technology* 42, 3428-3433.
- Mercado-Feliciano, M., Bigsby, R.M., 2008. Hydroxylated metabolites of the polybrominated diphenyl ether mixture DE-71 are weak estrogen receptor- α ligands. *Environmental Health Perspectives* 116, 1315-1321.
- Morck, A., Hakk, H., Orn, U., Wehler, E.K., 2003. Decabromodiphenyl ether in the rat: Absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Drug Metabolism and Disposition* 31, 900-907.
- Munsch, C., Heas-Moisán, K., Tixier, C., Olivier, N., Gastineau, O., Le Bayon, N., Buchet, V., 2011. Dietary exposure of juvenile common sole (*Solea solea* L.) to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Part 1. Bioaccumulation and elimination kinetics of individual congeners and their debrominated metabolites. *Environmental Pollution* 159, 229-237.

- Munschy, C., Heas-Moisan, K., Tixier, C., Pacepavicius, G., Alae, M., 2010. Dietary exposure of juvenile common sole (*Solea solea* L.) to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Part 2. Formation, bioaccumulation and elimination of hydroxylated metabolites. *Environmental Pollution* 158, 3527-3533.
- Nakagawa, Y., Suzuki, T., Ishii, H., Ogata, A., 2007. Biotransformation and cytotoxicity of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol A, and its analogues in rat hepatocytes. *Xenobiotica* 37, 693-708.
- Nyholm, J.R., Norman, A., Norrgren, L., Haglund, P., Andersson, P.L., 2008. Maternal transfer of brominated flame retardants in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 73, 203-208.
- OSPAR, 1998. Oslo-Paris web site.
- Pena-Abaurrea, M., Weijs, L., Ramos, L., Borghesi, N., Corsolini, S., Neels, H., Blust, R., Covaci, A., 2009. Anthropogenic and naturally-produced organobrominated compounds in bluefin tuna from the Mediterranean Sea. *Chemosphere* 76, 1477-1482.
- Pettersson, A., Bavel, B.v., Engwall, M., Jimenez, B., 2004. Polybrominated Diphenylethers and Methoxylated Tetrabromodiphenylethers in Cetaceans from the Mediterranean Sea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47, 542-550.
- Polder, A., Gabrielsen, G.W., Odland, J.O., Savinova, T.N., Tkachev, A., Loken, K.B., Skaare, J.U., 2008a. Spatial and temporal changes of chlorinated pesticides, PCBs, dioxins (PCDDs/PCDFs) and brominated flame retardants in human breast milk from Northern Russia. *Science of the Total Environment* 391, 41-54.
- Polder, A., Thomsen, C., Lindstrom, G., Loken, K.B., Skaare, J.U., 2008b. Levels and temporal trends of chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants in individual human breast milk samples from Northern and Southern Norway. *Chemosphere* 73, 14-23.
- Qiu, X.H., Bigsby, R.M., Hites, R.A., 2009. Hydroxylated Metabolites of Polybrominated Diphenyl Ethers in Human Blood Samples from the United States. *Environmental Health Perspectives* 117, 93-98.
- Reistad, T., Fonnum, F., Mariussen, E., 2006. Neurotoxicity of the pentabrominated diphenyl ether mixture, DE-71, and hexabromocyclododecane (HBCD) in rat cerebellar granule cells in vitro. *Archives of Toxicology* 80, 785-796.
- Rice, D.C., Reeve, E.A., Herlihy, A., Thomas Zoeller, R., Douglas Thompson, W., Markowski, V.P., 2007. Developmental delays and locomotor activity in the C57BL6/J mouse following neonatal exposure to the fully-brominated PBDE, decabromodiphenyl ether. *Neurotoxicology and Teratology* 29, 511-520.
- Riu, 2006. Devenir des retardateurs de flammes bromés chez le rat et l'homme: caractérisation des métabolites et évaluation de l'exposition fœtale. Université de Toulouse - SEVAB.
- Riu, A., Cravedi, J.P., Debrauwer, L., Garcia, A., Canlet, C., Jouanin, I., Zalko, D., 2008. Disposition and metabolic profiling of [C-14]-decabromodiphenyl ether in pregnant Wistar rats. *Environment International* 34, 318-329.
- Riu, A., le Maire, A., Grimaldi, M., Audebert, M., Hillenweck, A., Bourguet, W., Balaguer, P., Zalko, D., 2011. Characterization of novel ligands of ER α , ER β and PPAR γ : the case of halogenated bisphenol A and their conjugated metabolites. *Toxicological Sciences*.

- Riu, A., Zalko, D., Debrauwer, L., 2006. Study of polybrominated diphenyl ethers using both positive and negative atmospheric pressure photoionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 2133-2142.
- Robb, D.B., Covey, T.R., Bruins, A.P., 2000. Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 72, 3653-3659.
- Roosens, L., Abdallah, M.A.E., Harrad, S., Neels, H., Covaci, A., 2009. Exposure to Hexabromocyclododecanes (HBCDs) via Dust Ingestion, but Not Diet, Correlates with Concentrations in Human Serum: Preliminary Results. *Environmental Health Perspectives* 117, 1707-1712.
- Roosens, L., Cornelis, C., D'Hollander, W., Bervoets, L., Reynders, H., Van Campenhout, K., Van Den Heuvel, R., Neels, H., Covaci, A., 2010a. Exposure of the Flemish population to brominated flame retardants: Model and risk assessment. *Environment International* 36, 368-376.
- Roosens, L., D'Hollander, W., Bervoets, L., Reynders, H., Van Campenhout, K., Cornelis, C., Van Den Heuvel, R., Koppen, G., Covaci, A., 2010b. Brominated flame retardants and perfluorinated chemicals, two groups of persistent contaminants in Belgian human blood and milk. *Environmental Pollution* 158, 2546-2552.
- Ross, M.S., Wong, C.S., 2010. Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure photoionization, and anion attachment atmospheric pressure photoionization for the analysis of hexabromocyclododecane enantiomers in environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1217, 7855-7863.
- Routti, H., Letcher, R.J., Chu, S.G., Van Bavel, B., Gabrielsen, G.W., 2009. Polybrominated Diphenyl Ethers and Their Hydroxylated Analogues in Ringed Seals (*Phoca hispida*) from Svalbard and the Baltic Sea. *Environmental Science & Technology* 43, 3494-3499.
- Saegusa, Y., Fujimoto, H., Woo, G.-H., Inoue, K., Takahashi, M., Mitsumori, K., Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M., 2009. Developmental toxicity of brominated flame retardants, tetrabromobisphenol A and 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane, in rat offspring after maternal exposure from mid-gestation through lactation. *Reproductive Toxicology* 28, 456-467.
- Samuelsen, M., Olsen, C., Holme, J.A., Meussen-Elholm, E., Bergmann, A., Hongslo, J.K., 2001. Estrogen-like properties of brominated analogs of bisphenol A in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cell Biology and Toxicology* 17, 139-151.
- Sanders, J.M., Chen, L.J., Lebetkin, E.H., Burka, L.T., 2006. Metabolism and disposition of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether following administration of single or multiple doses to rats and mice. *Xenobiotica* 36, 103-117.
- Schechter, A., Haffner, D., Colacino, J., Patel, K., Papke, O., Opel, M., Birnbaum, L., 2010. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Hexabromocyclododecane (HBCD) in Composite US Food Samples. *Environmental Health Perspectives* 118, 357-362.
- Seyer, A., Riu, A., Debrauwer, L., Bourges-Abella, N., Brunelle, A., Laprevote, O., Zalko, D., 2010. Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Imaging Demonstrates the Specific Localization of Deca-Bromo-Diphenyl-Ether Residues in the Ovaries and Adrenal Glands of Exposed Rats. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 21, 1836-1845.
- Shi, H.H., Qian, L.J., Guo, S.Z., Zhang, X.L., Liu, J.Q., Cao, Q.Z., 2010. Teratogenic effects of tetrabromobisphenol A on *Xenopus tropicalis* embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 152, 62-68.

- Shi, T., Chen, S.J., Luo, X.J., Zhang, X.L., Tang, C.M., Luo, Y., Ma, Y.J., Wu, J.P., Peng, X.Z., Mai, B.X., 2009a. Occurrence of brominated flame retardants other than polybrominated diphenyl ethers in environmental and biota samples from southern China. *Chemosphere* 74, 910-916.
- Shi, Z., Wu, Y., Li, J., Zhao, Y., Feng, J., 2009b. Dietary exposure assessment of Chinese adults and nursing infants to tetrabromobisphenol-A and hexabromocyclododecanes: occurrence measurements in foods and human milk. *Environmental Science & Technology* 43, 4314-4319.
- Simpson, E.R., Waterman, M.R., 1988. Regulation of the Synthesis of Steroidogenic Enzymes in Adrenal Cortical Cells by ACTH. *Annual Review of Physiology* 50, 427-440.
- Sjodin, A., Patterson, D.G., Bergman, A., 2003. A review on human exposure to brominated flame retardants - particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environment International* 29, 829-839.
- Song, R.F., He, Y.H., Murphy, M.B., Yeung, L.W.Y., Yu, R.M.K., Lam, M.H.W., Lam, P.K.S., Hecker, M., Giesy, J.P., Wu, R.S.S., Zhang, W.B., Sheng, G.Y., Fu, J.M., 2008. Effects of fifteen PBDE metabolites, DE71, DE79 and TBBPA on steroidogenesis in the H295R cell line. *Chemosphere* 71, 1888-1894.
- Sousa, G., Langouët, S., Nicolas, F., Lorenzon, G., Placidi, M., Rahmani, R., Guillouzo, A., 1996. Increase of cytochrome P-450 1A and glutathione transferase transcripts in cultured hepatocytes from dogs, monkeys, and humans after cryopreservation. *Cell Biology and Toxicology* 12, 351-358.
- SRI-consulting, 2007. Global consumption and market of flame retardants (SRI consulting).
- Stapleton, H.M., Alaei, M., Letcher, R.J., Baker, J.E., 2004. Debromination of the flame retardant decabromodiphenyl ether by juvenile carp (*Cyprinus carpio*) following dietary exposure. *Environmental Science & Technology* 38, 112-119.
- Stapleton, H.M., Brazil, B., Holbrook, R.D., Mitchelmore, C.L., Benedict, R., Konstantinov, A., Potter, D., 2006. In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. *Environmental Science & Technology* 40, 4653-4658.
- Stapleton, H.M., Kelly, S.M., Pei, R., Letcher, R.J., Gunsch, C., 2009. Metabolism of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) by Human Hepatocytes in Vitro. *Environmental Health Perspectives* 117, 197-202.
- Staskal, D.F., Hakk, H., Bauer, D., Diliberto, J.J., Birnbaum, L.S., 2006. Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners 47, 99, 100, and 153 in mice. *Toxicological Sciences* 94, 28-37.
- Stoker, T.E., Laws, S.C., Crofton, K.M., Hedge, J.M., Ferrell, J.M., Cooper, R.L., 2004. Assessment of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture, in the EDSP male and female pubertal protocols. *Toxicological Sciences* 78, 144-155.
- Szymanska, J.A., Sapota, A., Frydrych, B., 2001. The disposition and metabolism of tetrabromobisphenol-A after a single i.p. dose in the rat. *Chemosphere* 45, 693-700.
- Tajima, K., Hosokawa, K., Yoshida, Y., Dantes, A., Sasson, R., Kotsuji, F., Amsterdam, A., 2002. Establishment of FSH-responsive cell lines by transfection of pre-ovulatory human granulosa cells with mutated p53 (p53val135) and Ha-ras genes. *Molecular Human Reproduction* 8, 48-57.

- Teuten, E.L., Reddy, C.M., 2007. Halogenated organic compounds in archived whale oil: A pre-industrial record. *Environmental Pollution* 145, 668-671.
- Teuten, E.L., Xu, L., Reddy, C.M., 2005. Two Abundant Bioaccumulated Halogenated Compounds Are Natural Products. *Science* 307, 917-920.
- Thomsen, C., Knutsen, H.K., Liane, V.H., Frøshaug, M., Kvalem, H.E., Haugen, M., Meltzer, H.M., Alexander, J., Becher, G., 2008. Consumption of fish from a contaminated lake strongly affects the concentrations of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in serum. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 228-237.
- Thomsen, C., Lundanes, E., Becher, G., 2002. Brominated flame retardants in archived serum samples from Norway: A study on temporal trends and the role of age. *Environmental Science & Technology* 36, 1414-1418.
- Thomsen, C., Stigum, H., Frøshaug, M., Broadwell, S.L., Becher, G., Eggesbo, M., 2010. Determinants of brominated flame retardants in breast milk from a large scale Norwegian study. *Environment International* 36, 68-74.
- Tseng, L.H., Li, M.H., Tsai, S.S., Lee, C.W., Pan, M.H., Yao, W.J., Hsu, P.C., 2008. Developmental exposure to decabromodiphenyl ether (PBDE 209): Effects on thyroid hormone and hepatic enzyme activity in male mouse offspring. *Chemosphere* 70, 640-647.
- Ueno, D., Darling, C., Alaei, M., Pacepavicius, G., Teixeira, C., Campbell, L., Letcher, R.J., Bergman, Å., Marsh, G., Muir, D., 2008. Hydroxylated Polybrominated Diphenyl Ethers (OH-PBDEs) in the Abiotic Environment: Surface Water and Precipitation from Ontario, Canada. *Environmental Science & Technology* 42, 1657-1664.
- UNEP, 1998. Convention on Long-range Transboundary Air Pollution.
- UNEP, 2001. Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants (POP) telle qu'amendée en 2009.
- Valters, K., Li, H.X., Alaei, M., D'Sa, I., Marsh, G., Bergman, A., Letcher, R.J., 2005. Polybrominated diphenyl ethers and hydroxylated and methoxylated brominated and chlorinated analogues in the plasma of fish from the Detroit River. *Environmental Science & Technology* 39, 5612-5619.
- Van den Steen, E., Eens, M., Covaci, A., Dirtu, A.C., Jaspers, V.L.B., Neels, H., Pinxten, R., 2009a. An exposure study with polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in female European starlings (*Sturnus vulgaris*): Toxicokinetics and reproductive effects. *Environmental Pollution* 157, 430-436.
- Van den Steen, E., Pinxten, R., Jaspers, V.L.B., Covaci, A., Barba, E., Carere, C., Cichon, M., Dubiec, A., Eeva, T., Heeb, P., Kempenaers, B., Lifjeld, J.T., Lubjuhn, T., Mand, R., Massa, B., Nilsson, J.A., Norte, A.C., Orell, M., Podzemny, P., Sanz, J.J., Senar, J.C., Soler, J.J., Sorace, A., Torok, J., Visser, M.E., Winkel, W., Eens, M., 2009b. Brominated flame retardants and organochlorines in the European environment using great tit eggs as a biomonitoring tool. *Environment International* 35, 310-317.
- Van der Ven, L.T.M., de Kuil, T.V., Verhoef, A., Verwer, C.M., Lilienthal, H., Leonards, P.E.G., Schauer, U.M.D., Canton, R.F., Litens, S., De Jong, F.H., Visser, T.J., Dekant, W., Stern, N., Hakansson, H., Slob, W., Van den Berg, M., Vos, J.G., Piersma, A.H., 2008a. Endocrine effects of tetrabromobisphenol-A (TBBPA) in Wistar rats as tested in a one-generation reproduction study and a subacute toxicity study. *Toxicology* 245, 76-89.

- van der Ven, L.T.M., van de Kuil, T., Leonards, P.E.G., Slob, W., Lilienthal, H., Litens, S., Herlin, M., Hakansson, H., Canton, R.F., van den Berg, M., Visser, T.J., van Loveren, H., Vos, J.G., Piersma, A.H., 2009. Endocrine effects of hexabromocyclododecane (HBCD) in a one-generation reproduction study in Wistar rats. *Toxicology Letters* 185, 51-62.
- Van der Ven, L.T.M., van de Kuil, T., Verhoef, A., Leonards, P.E.G., Slob, W., Canton, R.F., Germer, S., Hamers, T., Visser, T.J., Litens, S., Hakansson, H., Fery, Y., Schrenk, D., van den Berg, M., Piersma, A.H., Vos, J.G., 2008b. A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of a purified technical pentabromodiphenyl ether (pentaBDE) mixture in Wistar rats. *Toxicology* 245, 109-122.
- Van der Ven, L.T.M., van de Kuil, T., Leonards, P.E.G., Slob, W., Canton, R.F., Germer, S., Visser, T.J., Litens, S., Hakansson, H., Schrenk, D., van den Berg, M., Piersma, A.H., Vos, J.G., Opperhuizen, A., 2008c. A 28-day oral dose toxicity study in Wistar rats enhanced to detect endocrine effects of decabromodiphenyl ether (decaBDE). *Toxicology Letters* 179, 6-14.
- VCCLAB, V.C.C.L., 2005. ALOGPS 2.1 program : On-line lipophilicity (logP), Water Solubility (logS) & pKa Prediction.
- Verreault, J., Gabrielsen, G.V., Chu, S.G., Muir, D.C.G., Andersen, M., Hamaed, A., Letcher, R.J., 2005. Flame retardants and methoxylated and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in two Norwegian Arctic top predators: Glaucous gulls and polar bears. *Environmental Science & Technology* 39, 6021-6028.
- Von meyerinck, L., Hufnagel, B., Schmoldt, A., Bente, H.F., 1990. Induction of rat liver microsomal cytochrome P-450 by the pentabromo diphenyl ether Bromkal 70 and half-lives of its components in the adipose tissue. *Toxicology* 61, 259-274.
- Vonderheide, A.P., 2009. A review of the challenges in the chemical analysis of the polybrominated diphenyl ethers. *Microchemical Journal* 92, 49-57.
- Wan, Y., Choi, K., Kim, S., Ji, K., Chang, H., Wiseman, S., Jones, P.D., Khim, J.S., Park, S., Park, J., Lam, M.H.W., Giesy, J.P., 2010a. Hydroxylated Polybrominated Diphenyl Ethers and Bisphenol A in Pregnant Women and Their Matching Fetuses: Placental Transfer and Potential Risks. *Environmental Science & Technology* 44, 5233-5239.
- Wan, Y., Liu, F.Y., Wiseman, S., Zhang, X.W., Chang, H., Hecker, M., Jones, P.D., Lam, M.H.W., Giesy, J.P., 2010b. Interconversion of Hydroxylated and Methoxylated Polybrominated Diphenyl Ethers in Japanese Medaka. *Environmental Science & Technology* 44, 8729-8735.
- Wan, Y., Wiseman, S., Chang, H., Zhang, X.W., Jones, P.D., Hecker, M., Kannan, K., Tanabe, S., Hu, J.Y., Lam, M.H.W., Giesy, J.P., 2009. Origin of Hydroxylated Brominated Diphenyl Ethers: Natural Compounds or Man-Made Flame Retardants? *Environmental Science & Technology* 43, 7536-7542.
- Watanabe, M., Nakajin, S., 2004. Forskolin up-regulates aromatase (CYP19) activity and gene transcripts in the human adrenocortical carcinoma cell line H295R. *Journal of Endocrinology* 180, 125-133.
- Weiss, J., Wallin, E., Axmon, A., Jönsson, B.A.G., Åkesson, H., Janák, K., Hagmar, L., Bergman, Å., 2006. Hydroxy-PCBs, PBDEs, and HBCDDs in Serum from an Elderly Population of Swedish Fishermen's Wives and Associations with Bone Density. *Environmental Science & Technology* 40, 6282-6289.
- Whitfield, F.B., Helidoniotis, F., Drew, M., 1996. *Flavour Science*

THE ROLE OF DIET AND ENVIRONMENT IN THE NATURAL FLAVOURS OF SEAFOODS. pp. 3-12.

Wiseman, S.B., Wan, Y., Chang, H., Zhang, X., Hecker, M., Jones, P.D., Giesy, J.P., 2011. Polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated/methoxylated analogs: Environmental sources, metabolic relationships, and relative toxicities. *Marine Pollution Bulletin* 63, 179-188.

Yu, Z.Q., Zheng, K.W., Ren, G.F., Zheng, Y.Y., Ma, S.T., Peng, P.G., Wu, M.H., Sheng, G.Y., Fu, J.M., 2010. Identification of Hydroxylated Octa- and Nona-Bromodiphenyl Ethers in Human Serum from Electronic Waste Dismantling Workers. *Environmental Science & Technology* 44, 3979-3985.

Zalko, D., Prouillac, C., Riu, A., Perdu, E., Dolo, L., Jouanin, I., Canlet, C., Debrauwer, L., Cravedi, J.P., 2006. Biotransformation of the flame retardant tetrabromo-bisphenol A by human and rat sub-cellular liver fractions. *Chemosphere* 64, 318-327.

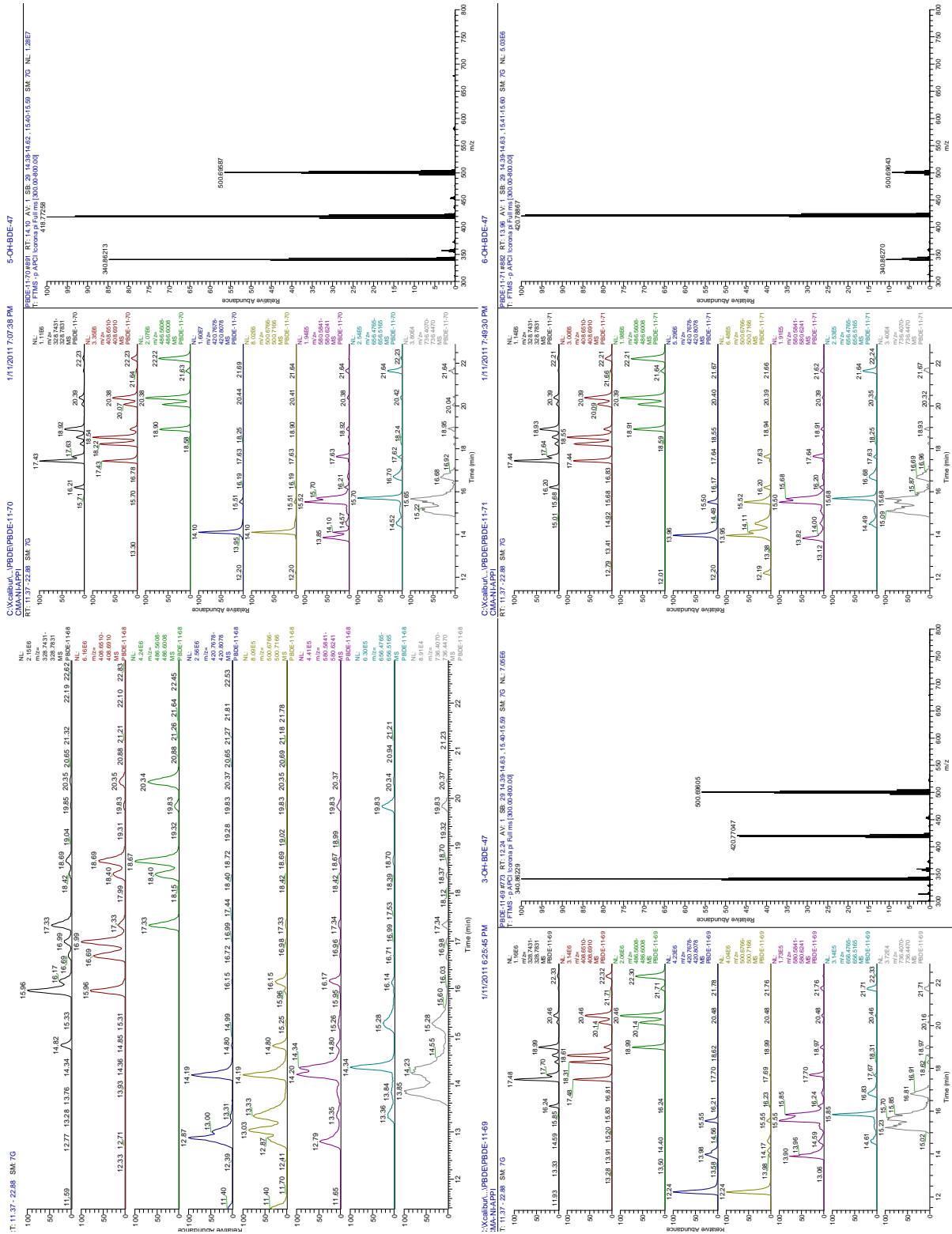
Zegers, B.N., Mets, A., Van Bommel, R., Minkenberg, C., Hamers, T., Kamstra, J.H., Pierce, G.J., Boon, J.P., 2005. Levels of hexabromocyclododecane in harbor porpoises and common dolphins from western European seas, with evidence for stereoisomer-specific biotransformation by cytochrome P450. *Environmental Science & Technology* 39, 2095-2100.

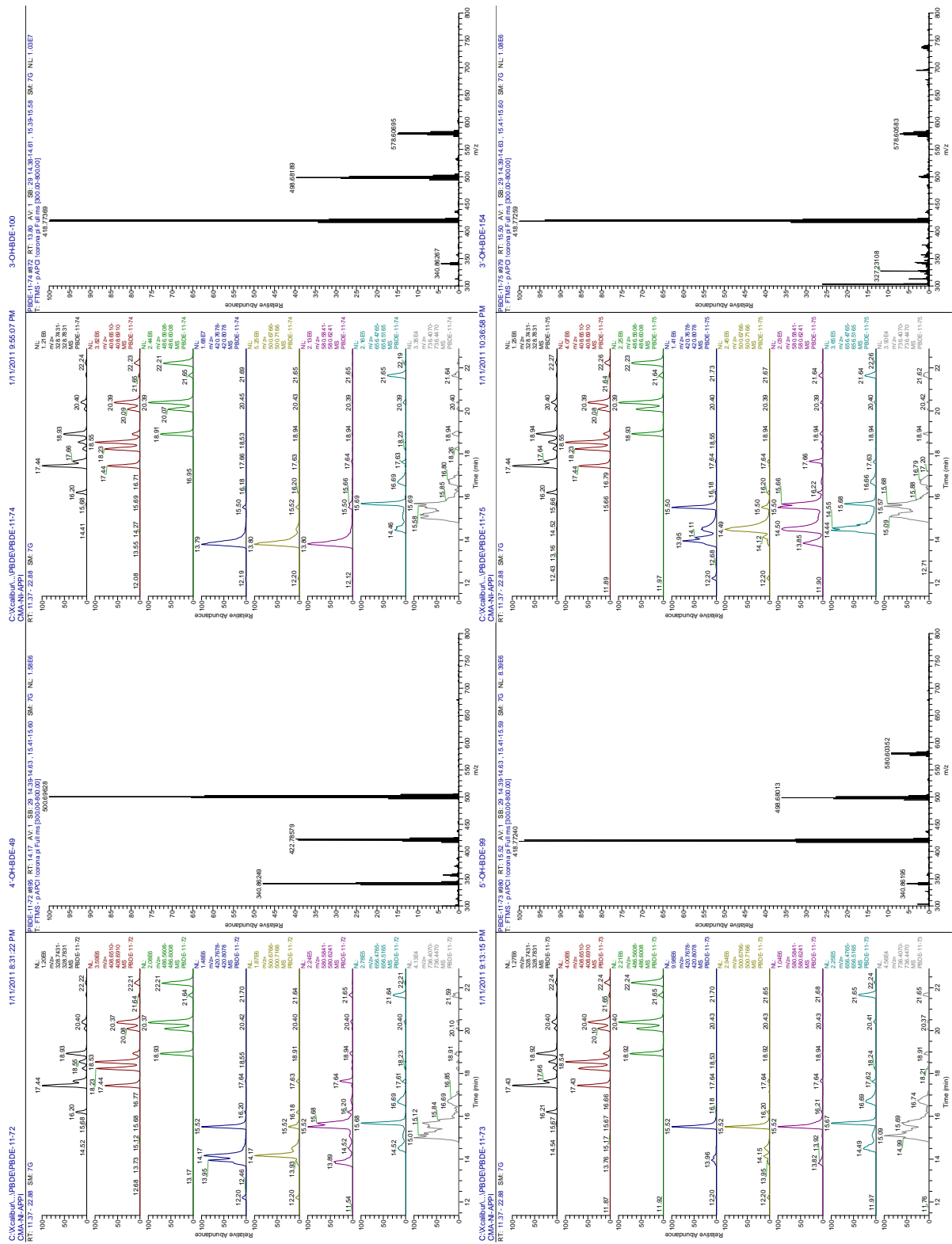
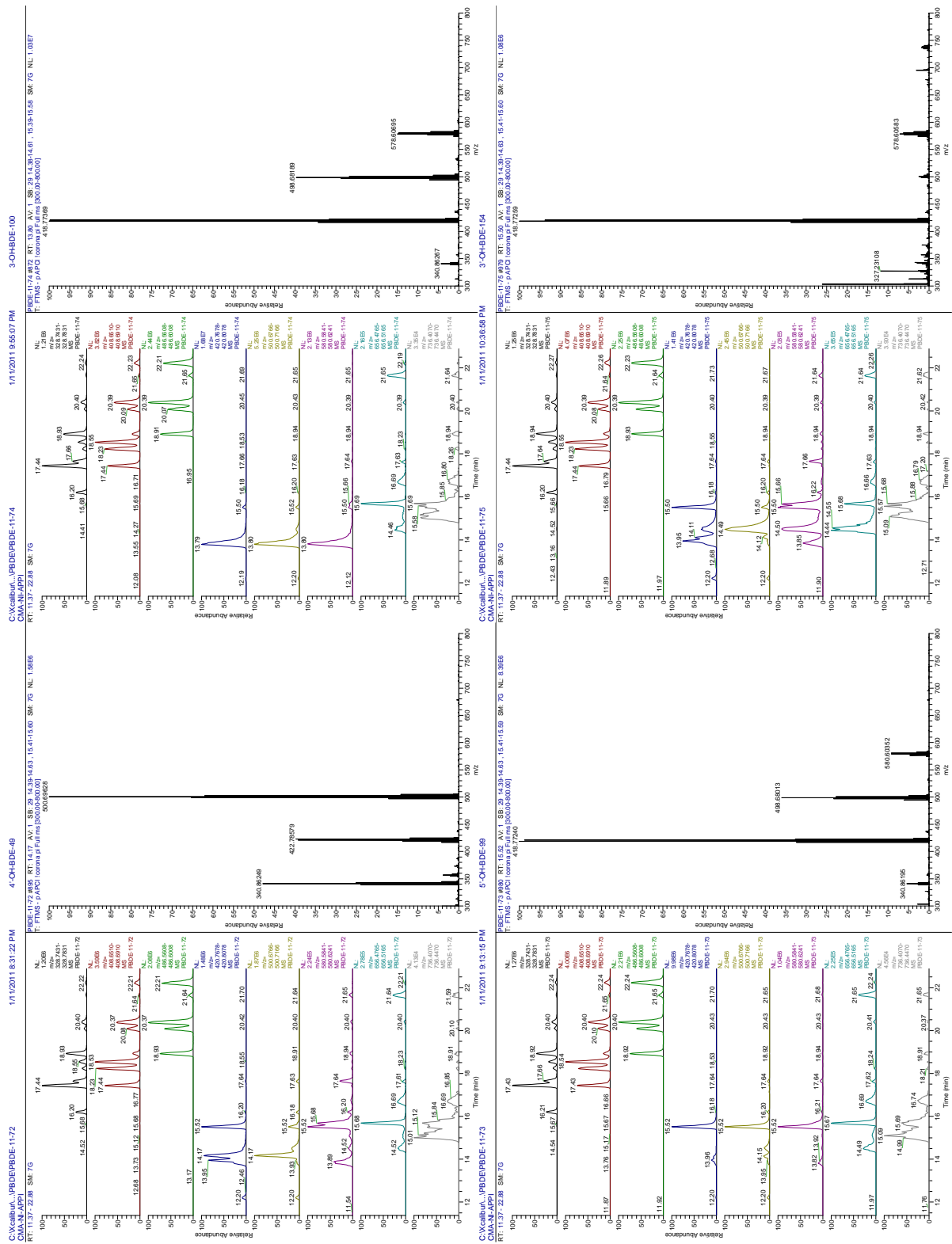
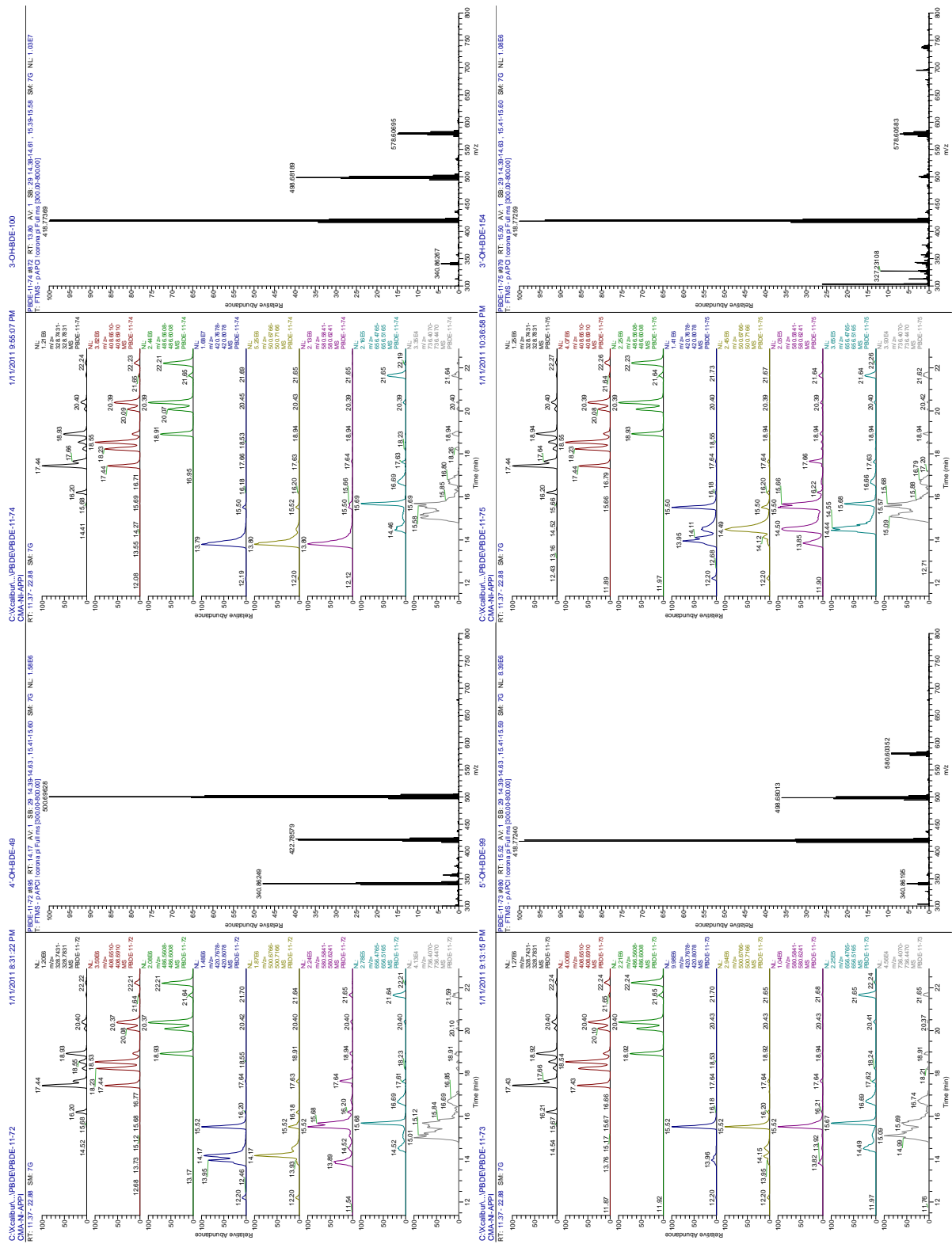
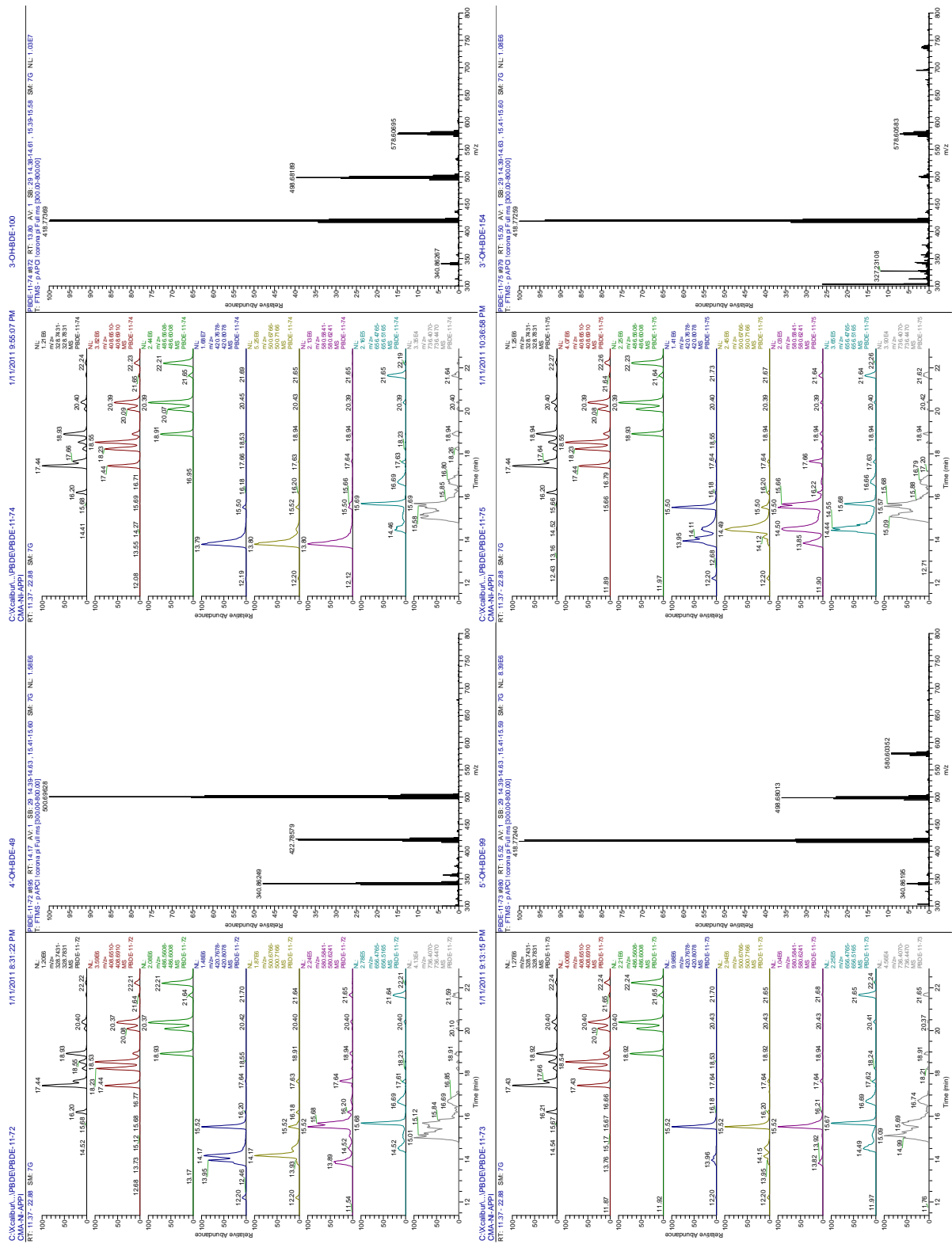
Zhang, H., Skildum, A., Stromquist, E., Rose-Hellekant, T., Chang, L.C., 2008. Bioactive Polybrominated Diphenyl Ethers from the Marine Sponge *Dysidea* sp. *Journal of Natural Products* 71, 262-264.

Zhou, T., Ross, D.G., DeVito, M.J., Crofton, K.M., 2001. Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. *Toxicological Sciences* 61, 76-82.

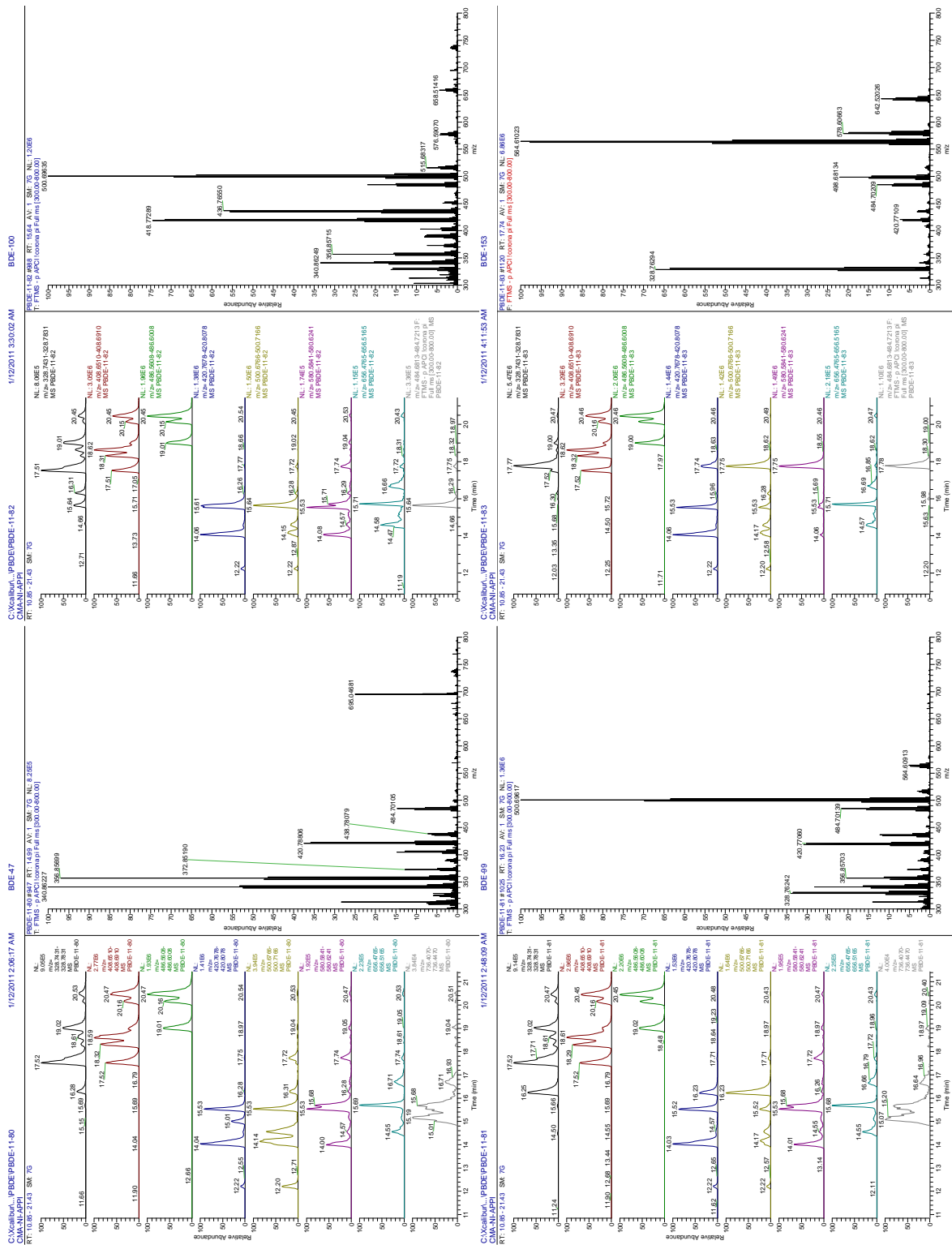
Annexes

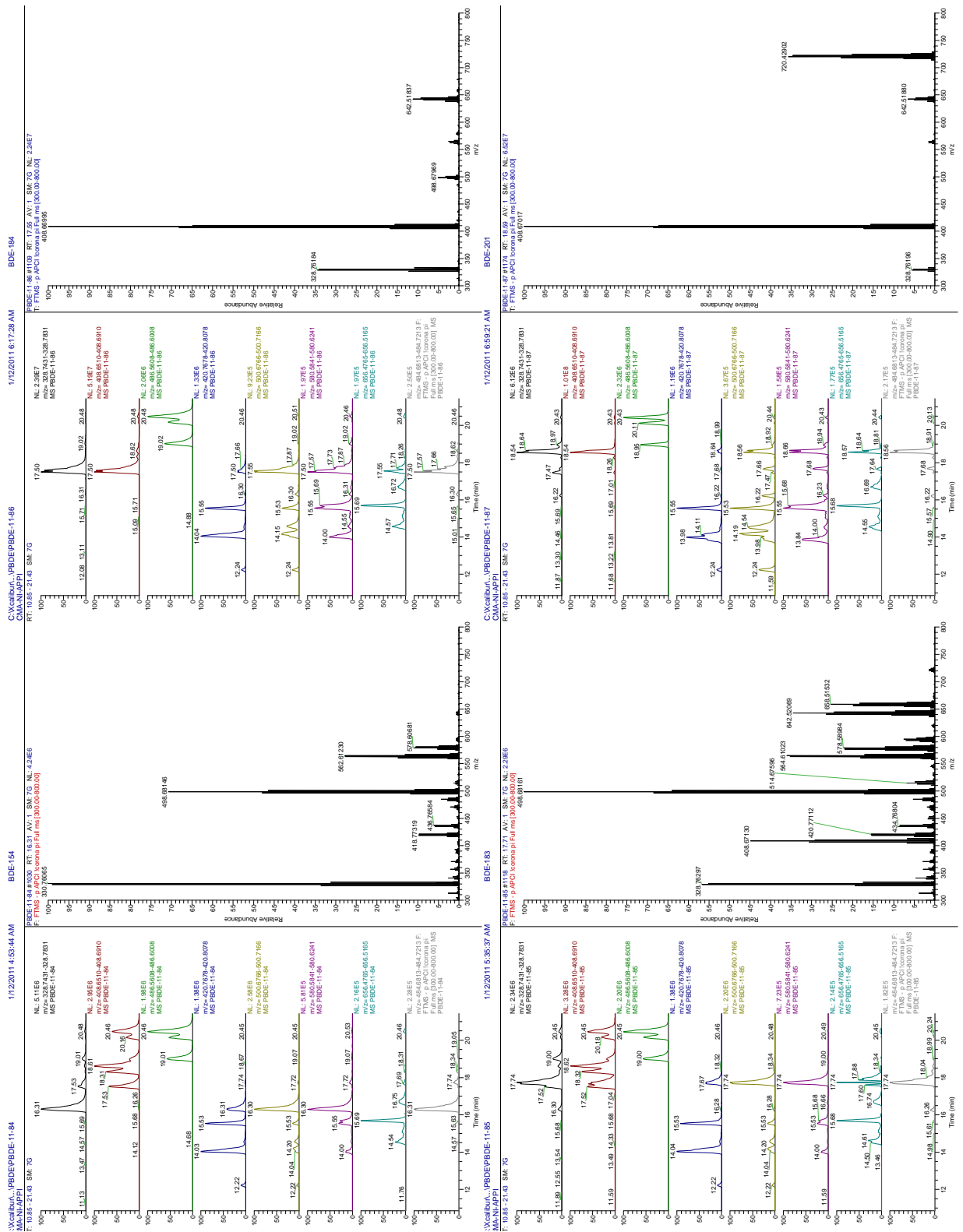
1 - ANNEXE 1 : SPECTRES DE MASSE DES PBDES ET OH-PBDES OBTENUS EN APPI SUR DES SOLUTIONS CONTENANT TOUT LES STANDARDS ET SURCHARGE EN UN DES COMPOSES

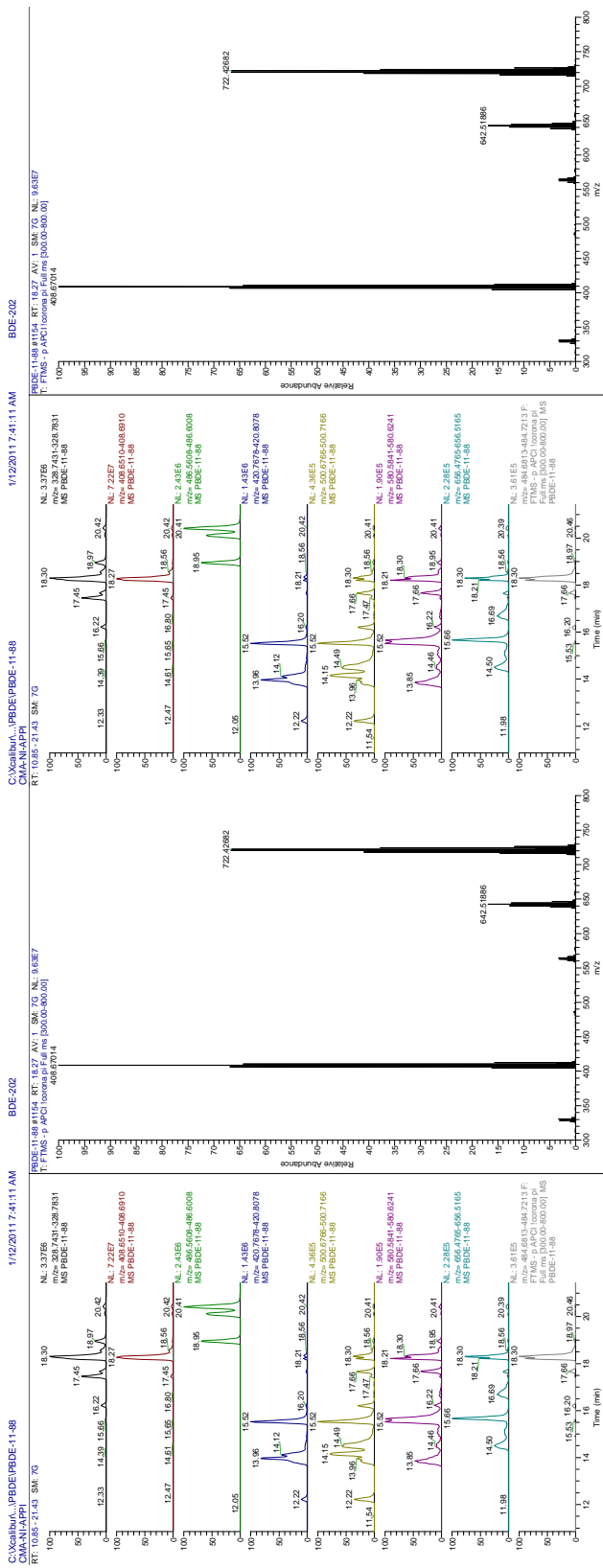












2 - ANNEXE 2 : CAHIER D'OBSERVATIONS « RETARDATEURS DE FLAMME BROMES : METABOLITES ACTIFS ET BIOMARQUEURS D'EXPOSITION CHEZ LA FEMME ENCEINTE ET LE FŒTUS »

CAHIER D'OBSERVATION PROTOCOLE BISPHENOL 2

DONNEES GENERALES

- N° d'inclusion :

--	--	--

- Age :

--	--

-Lieu de naissance :

--	--

•Département:

•ou Pays :

- Ville de résidence actuelle :

- Profession :

- Contacts fréquents Avec des matières plastiques : OUI NON

Avec du matériel électrique : OUI NON

- Profession du partenaire :

MODES D'ALIMENTATION

- Sans restriction : OUI NON

Si OUI : • Nombre de repas viande par semaine :

• Nombre de repas poisson par semaine:

- Végétarien : OUI NON

Si OUI : • Mangez-vous du poisson : OUI NON

• Si OUI combien de fois par semaine :

Consommation de liquides conditionnés en bouteille plastique : OUI NON

Si OUI : • Nombre de bouteilles par semaine :

• Nombre de bouteilles de jus de fruit par semaine :

Consommation d'aliments en conserve : OUI NON

Si OUI : • Nombre de boîtes de conserve par semaine :

• Nombre de pack carton par semaine :

Utilisation de boîtes de conservation type « Tuperware »: OUI NON

Si OUI : • Stockage des aliments : OUI NON

• Cuisson, chauffage : OUI NON

DONNEES GYNECO-OBSTETRIQUES

- Taille :

- Poids : - Prise de poids :

- Durée des cycles : de à jours

- Stérilité : OUI NON

Si OUI origine : • Ovulatoire

• Autre :

en clair :

- Primigeste : **OUI** **NON**

Si NON : • Nombre de grossesses interrompues :

• Nombre d'enfant vivant :

• Nombre total de mois d'allaitement :

- Date césarienne :

- Raison :

- Semaines d'aménorrhée :

- Enfant : • Garçon fille

• Poids :

• En bonne santé : OUI NON

si NON :

DONNEES MEDICO-CHIRURGICALES

- Problèmes hépatiques : OUI NON

Si OUI lesquels :

.....

- Problèmes thyroïdiens : OUI NON

Si OUI lesquels :

.....

- Autres problèmes hormonaux : OUI NON

si OUI lesquels :

.....

- Autres antécédents médicaux : OUI NON

si OUI lesquels :

.....

- Autres antécédents chirurgicaux : OUI NON

si OUI lesquels :

.....

3 - ANNEXE 3: PROTOCOLE DE RECHERCHE DU TBBPA, DE L'HBCD, DES OH-PBDE ET DES CONJUGUES

3.1 - PRISE D'ESSAI

Prélever les quantités d'échantillon suivantes dans un tube à fond conique 15 (sérum) ou 50 mL (lait et tissu adipeux) :

- Lait maternel : 5 mL
- Sérum : 5 mL
- Urines : 5 mL
- Tissu adipeux lacéré : 1 g

3.2 - AJUSTEMENT DU PH

- Vérifier le pH du lait et du sérum avec du papier pH
- Ajuster le pH du lait et du sérum avec de l'acide acétique pour atteindre $\text{pH} \approx 4,2$

3.3 - AJOUT DES STANDARDS DE QUANTIFICATION

Ajouter :

- 50 μL de TBBPA – SQ 2 ($^{13}\text{C} = 50 \text{ pg}/\mu\text{L}$)
- 50 μL d'OH-PBDE – SQ 2 ($^{13}\text{C} = 50 \text{ pg}/\mu\text{L}$)
- 50 μL HBCD – SQ 2 ($^{13}\text{C} = 50 \text{ pg}/\mu\text{L}$)

Agiter

3.4 - REALISATION DE L'EXTRACTION

3.4.1 - Echantillons de sérum

- Ajouter 3 mL d'Acétone / volume de sérum si $> 3 \text{ mL}$
- Agiter doucement
- Ajouter 3 mL de *n*-Hexane/ volume de sérum si $> 3 \text{ mL}$
- Agiter doucement 20 sec
- Centrifugation 15 min, 3500 rpm

3.4.2 - Echantillons de lait maternel

- Ajouter 5 mL d'Acétone
- Agiter doucement
- Ajouter 5 mL de *n*-Hexane
- Agiter 20 sec
- Centrifugation 15 min, 3500 rpm

3.4.3 - Echantillons de tissu adipeux

- Ajouter 5 mL d'Acétone
- Agiter doucement
- Ajouter 5 mL de *n*-Hexane
- Agiter 2 heures
- Centrifugation 15 min, 4000 rpm

3.4.4 - Gamme extraite

- Agiter 20 sec
- Centrifugation 15 min, 3500 rpm

3.5 - PRELEVEMENT APRES EXTRACTION

3.5.1 - Partie supérieure

Dans un tube en verre 14 mL borosilicaté :

- Prélever la phase supérieure contenant l'hexane et le tissu adipeux en totalité
- Rq : séparation des 2 phases par un dépôt dans le cas du lait
- Effectuer la séparation des composés phénoliques des composés neutres : **point 4.6.**

3.5.2 - Partie inférieure

Dans un tube en verre 14 mL borosilicaté :

- Prélever la phase inférieure contenant l'acétone et l'eau (sérum et lait)
- Evaporer l'acétone sous N₂, 45°C (1-2 mL)
- Effectuer l'hydrolyse enzymatique : **point 4.8.**

3.6 - SEPARATION DES COMPOSES PHENOLIQUES (TBBPA ET OH-PBDE) ET DES COMPOSES NEUTRES (HBCD)

Pour les urines, cette étape n'est pas réalisée, l'étape suivante est la cartouche SiOH : **point 5.9.**

3.6.1 - Ionisation des composés phénoliques

- Prélever l'hexane de l'extraction : **point 4.5.1.**
- Ajouter 1,8 mL de soude 1N
- Vortexer 1 à 2 minutes
- Centrifugation 10 min, 4500 rpm

3.6.2 - Récupération de l'HBCD

Dans un tube en verre 14 mL borosilicaté :

- Récupérer l'hexane après réalisation du **point 4.6.1**

3.6.3 - Nettoyage de la soude

- Ajouter 5 mL de *n*-Hexane sur la soude du **point 4.6.1**
- Vortexer 1 minute
- Centrifugation 5 min, 3500 rpm
- Ajouter les 5 mL d'hexane à ceux du **point 4.6.2.**
- Effectuer la dénaturation de la matière grasse : **point 4.7.**

3.6.4 - Protonation des composés phénoliques et resolubilisation dans l'hexane

- Ajouter 2 mL d'HCl 1N à la soude du **point 4.6.3.**
- Ajouter 5 mL de *n*-Hexane
- Vortexer 1 minute
- Centrifugation 5 min, 3500 rpm
- Récupérer l'hexane dans un tube borosilicaté 14 mL
- Effectuer la purification sur cartouche SiOH : **point 4.9.**

3.7 - DENATURATION DE LA MATIERE GRASSE

- Prélever l'hexane du **point 4.6.3.**

3.7.1 - Echantillons de sérum et de lait maternel

- Ajouter 500 µL d'acide sulfurique 98%
- Vortexer 1 à 2 minutes
- Centrifugation 5 min à 3500 rpm
- Eliminer l'acide
- Ajouter 500 µL d'acide sulfurique 98%
- Vortexer 1 à 2 minutes
- Centrifugation 5 min à 3500 rpm
- Récupérer l'hexane dans un tube borosilicaté 14 mL
- Effectuer la purification sur cartouche SiOH : **point 4.9.**

3.7.2 - Echantillons de tissu adipeux

- Ajouter 1 mL d'acide sulfurique 98%
- Vortexer 1 à 2 minutes
- Centrifugation 5 min à 3500 rpm
- Récupérer l'hexane dans un tube borosilicaté 14 mL
- Répéter cette opération 1 ou 2 fois : l'hexane ne doit plus être coloré
- Effectuer la purification sur cartouche SiOH : **point 4.9.**

3.8 - HYDROLYSE ENZYMATIQUE

- Récupérer la phase aqueuse du **point 4.5.2..** après évaporation
- Ajouter 50 µL de TBBPA – SQ 2 (^{13}C = 50 pg/µL)
- Ajouter 2 mL de tampon acétate 0,2 M à pH=5,2
- Ajouter 200 µL de suc d'*helix pomatia* purifié (10 000 UI)
- Mettre à l'étuve à 50°C durant 4 heures
- Centrifugation 15 min, 3500 rpm
- Effectuer la purification sur cartouche SiOH : **point 4.9.**

3.9 - SPE SIOH (1G, 6ML)

- Conditionnement :
 - o 4*5 mL DCM
 - o 5 mL c-Hexane
- Dépôt :
 - o OH-PBDE et TBBPA : hexane du **point 4.6.4.**
 - o HBCD : hexane du **point 4.7.**
 - o Conjugués: la fraction E2 reprise en DCM/n-Hex (20:80, v:v) du **point 4.8.**
- Elutions :
 - o E1 = 4 mL DCM/n-Hexane (20:80) / (10:90) pour HBCD
 - o E2 = 2*5 mL DCM/n-Hexane (80:20)
- Reprise : **point 4.10.**

3.10 - REPRISE

- Evaporer E2 à sec sous N_2
- Reprendre dans 50 µL de la solution EE (fluorométholone 100 pg/µL)
- Vortexer doucement 1 minute
- Transférer dans un vial pour injection
- Injection

Retardateurs de flamme bromés : métabolites actifs et biomarqueurs d'exposition chez l'homme.

Les retardateurs de flamme bromés sont des agents ignifuges utilisés dans de nombreux produits manufacturés. Les plus courants sont les polybromodiphényl éther (PBDE), le tétrabromo-bisphénol A (TBBPA) et l'hexabromocyclododécane (HBCD). Ces composés considérés comme des polluants organiques persistants (POPs) sont désormais retrouvés dans l'environnement et chez l'Homme, et sont suspectés, ainsi que leurs métabolites, d'être des perturbateurs endocriniens. Des développements analytiques basés sur la spectrométrie de masse ont été engagés afin d'étudier le métabolisme *in vitro* du TBBPA et des PBDE et rechercher les composés parents et leurs métabolites dans différents prélèvements d'origine humaine. Les métabolites formés chez l'Homme ont ainsi été identifiés comme étant des conjugués pour le TBBPA, et des dérivés hydroxylés, dihydrodiol et conjugués pour les PBDE. La plupart de ces métabolites ont été identifiés et quantifiés dans les fluides biologiques humains, démontrant ainsi l'exposition du fœtus et du nouveau-né à ces composés, à des niveaux similaires à ceux retrouvés dans d'autres pays. D'un point de vue qualitatif, la présence de métabolites potentiellement actifs sur des cibles cellulaires a été mise en évidence, ainsi que le passage des résidus vers le lait (TBBPA, HBCD) et/ou au travers de la barrière placentaire (TBBPA et PBDE). Un métabolite spécifique, présent en importantes (octa-BDE hydroxylé) pourrait être un bon biomarqueur d'exposition, et son potentiel toxique devrait par ailleurs être étudié.

Brominated flame retardants: bioactive metabolites and biomarker of human exposure

Brominated Flame Retardants are widely used for the manufacture of fire-proofed industrial products and consumer goods. Major BFRs are polybromodiphenyl ether (PBDE), tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecane (HBCD). Considered as persistent organic pollutants (POPs), they are detected in various environmental compartments and human samples. Parent compounds as well as several metabolites could act as endocrine disruptors. Methodological developments based on mass spectrometry, *in vitro* approaches (TBBPA, PBDE) and an extensive review of the available literature have been used to sharpen our current knowledge of the fate of BFR, and to identify both parent compounds and metabolite in human samples. Results obtained *in vitro* using human primary hepatocyte cultures as well as human cell lines show that human cells biotransform TBBPA into conjugated metabolites and PBDE into hydroxylated, dihydrodiol and conjugated metabolites. Those metabolites were detected in human samples, demonstrating foetal and newborn exposition. BFR and some of their metabolites, including bioactive compounds, are transferred through the placental barrier (TBBPA, PBDE) and/or into milk (TBBPA, HBCD). Even though the monitored concentration levels were found to be low, one of these metabolites, namely (OH-octaBDE) was found to be abundant in almost all serum samples, and appears to be a relevant candidate biomarker of exposure.