

N° d'ordre :.....

THESE

présentée

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Spécialité : Qualité et sécurité des aliments

Par Anne RIU

DEVENIR DES RETARDATEURS DE FLAMMES BROMÉS CHEZ LE RAT ET L'HOMME: CARACTÉRISATION DES MÉTABOLITES ET ÉVALUATION DE L'EXPOSITION FŒTALE

Soutenue le 22 décembre 2006 devant le jury composé de :

M.	TABET J. C. <i>Professeur Université P. et M. Curie, Paris</i>	Président
M.	CRAVEDI J. P. <i>Directeur de recherche INRA, Toulouse</i>	Directeur de thèse
Mme	GOMEZ E. <i>Maître de conférences, Université de Montpellier 2</i>	Rapporteur
M	OLEA N. <i>Professeur Université de Grenade, Espagne</i>	Rapporteur
M.	ZALKO D. <i>Chargé de recherche INRA, Toulouse</i>	Co-directeur

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Jacques Tulliez et Monsieur Jean-Pierre Cravedi qui a dirigé ce travail de thèse, pour m'avoir accueillie au laboratoire des xénobiotiques, mais également pour leur soutien, leurs encouragements et leur encadrement scientifique de qualité et la valeur de leurs conseils tout au long de ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur Daniel Zalko qui a codirigé cette étude, pour sa constante disponibilité et son soutien quotidien, qui m'a fait profiter de ses connaissances scientifiques tout en me laissant la liberté d'action nécessaire pour mener à bien le travail entrepris.

L'appui de Monsieur Laurent Debrauwer pour l'interprétation et la compréhension des analyses en spectrométrie de masse, a largement contribué au développement de ce travail, de même que celui de Madame Elisabeth Perdu-Durand, dont l'aide précieuse a permis de mener à bien les études de métabolisme *in vitro*. Je remercie également Madame Cécile Canlet pour sa précieuse aide concernant la réalisation et l'interprétation des analyses en RMN, ainsi que Madame Isabelle Jouanin pour ses conseils et son aide lors de la réalisation des synthèses chimiques des molécules radiomarquées.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Laurence Dolo dont la sympathie et l'efficacité ne m'ont jamais fait défaut, ainsi qu'à Monsieur Raymond Gazel et Madame Florence Blas-y-Estrada, qui ont pris soin des animaux et que j'ai beaucoup sollicité au cours des expérimentations *in vivo*. Je tiens aussi à remercier Melle Aurélie Garcia pour sa bonne humeur quotidienne et qui m'a été d'une aide précieuse au cours de son stage de DEA, pour l'obtention des derniers résultats importants en fin de thèse. Je remercie très sincèrement mes voisins de bureau, Madame Anne Hillenweck et Monsieur Jean-Philippe Jaeg, pour leur soutien amical, leurs conseils et leur sympathie, malgré les propos « pseudo machistes » de Jean-Philippe. Plus généralement, mes remerciements vont à l'ensemble de l'équipe du laboratoire des Xénobiotiques, pour leur accueil, leur soutien amical et leur disponibilité.

Je tiens à exprimer des remerciements particuliers aux membres de l'équipe du LABERCA de Nantes, Messieurs Bruno Le Bizec, Jean-Philippe Antignac et Ronan Cariou, pour leur accueil et m'avoir fait partager leurs compétences dans l'étude de traces de contaminants dans des matrices biologiques. Je voudrais exprimer également ma gratitude à Messieurs Patrick Balaguer et Alain Berrebi pour leurs conseils scientifiques et leur disponibilité.

Je souhaite également remercier les membres du Jury de thèse, Madame Elena Gomez, Monsieur Nicolas Olea, Monsieur Jean-Claude Tabet, qui m'ont fait l'honneur de lire et de juger ce travail et pour le temps qu'ils y ont consacré.

Je voudrais enfin remercier mes parents, beaux-parents, mes frères et sœurs Camille, Julie, Emilie, Louise et Olivier, mais aussi Sonia et tous mes amis pour leur présence et leur soutien quotidien tout au long de ces trois années de thèse et qui ont largement contribué à ma réussite.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABS	Acrylonitrile butadiène styrène
ACN	Acétonitrile
AhR	Récepteur aux hydrocarbures aromatiques
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
APPI	Photo-ionisation à pression atmosphérique
AR	Récepteur aux androgènes
AS	Activité spécifique
BDE	Bromodiphényle éther
BPA	Bisphénol A
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CMC	Concentration micellaire critique
CYP	Cytochrome
DBDE	Décabromodiphényle éther
DE	Diphényle éther
DL₅₀	Dose létale pour 50 % des individus
DMEM	Dubelco's modified eagle's medium
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
DPI	Diphénylène iodonium
dpm	Désintégration par minute
ER	Récepteur aux œstrogènes
ESI	Ionisation electrospray
GC	Chromatographie en phase gazeuse
HBCD	Hexabromocyclododécane
i.p.	Intra péritonéale
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry <i>Union internationale de la chimie pure et appliquée</i>
K_{ow}	Coefficient de partition octanol/eau
LC	Chromatographie liquide
m/z	Rapport masse/charge
MG	sur la base de la teneur en matière grasse
MPO	Myéloperoxydase
MS	Spectrométrie de masse

p.c.	sur la base du poids corporel
PBB	Polybromobiphényle
PBDD	Polybromo-dibenzo-dioxine
PBDE	Polybromodiphényle éther
PBDF	Polybromo-dibenzo-furane
PCB	Polychlorobiphényle
POP	Polluant organique persistant
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
ppb	partie par milliard
ppm	partie par million
PR	Récepteur à la progestérone
PVC	Chlorure de polyvinyle
PXR	Pregnane X receptor
RFB	Retardateur de flamme bromé
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
T3	Triiodo-thyronine
T4	Tétraïodo-thyronine
TBBPA	Tétrabromobisphénol A
T_R	Temps de rétention
TSH	Thyrotropine
TTR	Transthyrétine
u	Unité de masse atomique
UPLC	Chromatographie Liquide Ultra Performance
UV	Ultraviolets

AVANT PROPOS	1
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	5
I. CONTEXTE.....	7
1. Les retardateurs de flammes	7
2. Les Retardateurs de Flammes Bromés (RFB).....	8
2.1. Production et utilisation du brome	8
2.2. Marché des retardateurs de flammes bromés	9
2.3. Production et utilisation des principaux RFB.....	10
2.3.1. Le tétrabromobisphénol A (TBBPA)	10
2.3.2. Les polybromodiphényles éthers (PBDE)	11
3. Structure et propriétés des principaux retardateurs de flammes bromés.....	11
3.1. Le tétrabromobisphénol A (TBBPA ; n° CAS : 79-94-7)	11
3.1.1. Structure du TBBPA.....	11
3.1.2. Propriétés physico-chimiques du TBBPA.....	12
3.2. Les polybromodiphényles éthers (PBDE).....	12
3.2.1. Structure des PBDE.....	12
3.2.2. Propriétés physico-chimiques des PBDE	14
4. Enjeux sociétaux et aspects réglementaires	15
4.1. Risques d'incendie	15
4.2. Contamination de l'environnement.....	15
4.3. Réglementation et restrictions	16
5. Conclusion.....	17
II. PRESENCE ET DEVENIR DES RFB DANS L'ENVIRONNEMENT	18
1. Niveaux résiduels de RFB détectés dans les différents compartiments environnementaux.....	18
1.1. Le milieu aérien.....	18
1.2. Le milieu aquatique.....	19
1.2.1. Contamination de l'hydrosphère	19
1.2.2. Contamination des sédiments	20
1.2.3. Contamination des espèces aquatiques.....	21
1.2.3.1. Niveaux de contamination.....	21
1.2.3.2. Biotransformation.....	22
1.2.4. Cas particulier des mammifères marins.....	22
1.3. Le milieu terrestre	23
1.3.1. Contamination des oiseaux.....	23
1.3.2. Contamination des mammifères	24
1.4. Le cas des stations d'épuration.....	24
2. Spécificités analytiques.....	25
3. Dégradations biotiques et abiotiques des RFB dans l'environnement	26
3.1. Biodégradation	26
3.2. Photo-dégradation.....	26
3.3. Thermolyse.....	27
4. Conclusions	28
III. NIVEAUX DE CONTAMINATION HUMAINE	29
1. Données disponibles	29
2. Voies d'expositions	31
2.1. Exposition par voie alimentaire.....	31
2.2. Inhalation/ingestion de poussières ménagères.....	32
2.3. Exposition professionnelle	33
3. Conclusions	33
IV. DONNEES METABOLIQUES.....	34

1.	Le TBBPA	34
1.2.	Distribution	34
1.3.	Biotransformations	34
2.	DBDE et autres PBDE.....	35
2.1.	Absorption/élimination.....	35
2.2.	Distribution	36
2.3.	Biotransformations	36
3.	Conclusions	37
V.	DONNEES TOXICOLOGIQUES.....	38
1.	Toxicité aigüe, subchronique et chronique	38
2.	Toxicité sur la reproduction et le développement	39
3.	Etudes des fonctions endocrines	40
4.	Immunotoxicité.....	41
5.	Conclusions	42
VI.	OBJECTIFS DE LA THESE ET STRATEGIE ADOPTEE	42
CHAPITRE 2 : METHODOLOGIES MISES EN ŒUVRE		45
I.	SYNTHESE DES MOLECULES RADIO-MARQUEES	47
1.	[¹⁴ C]-TBBPA	47
2.	[¹⁴ C]-DBDE	48
II.	CHOIX ET MISE AU POINT DES OUTILS ANALYTIQUES	48
1.	Instrumentation	48
2.	Développement des méthodes analytiques concernant le TBBPA	49
2.1.	Développement et optimisation des conditions chromatographiques.....	49
2.2.	Purification des produits formés.....	51
2.3.	Mise au point des méthodes de solubilisation du TBBPA	53
2.3.1.	Pour les études <i>in vitro</i>	53
2.3.2.	Pour les études <i>in vivo</i>	53
2.4.	Techniques d'extraction à partir de différentes matrices biologiques	53
2.4.1.	Extraits des fèces et des contenus digestifs	53
2.4.2.	Extraction du plasma	54
3.	Développement des méthodes analytiques concernant le DBDE	54
3.1.	Développement et optimisation des conditions chromatographiques.....	54
3.2.	Purification du DBDE sur cartouche.....	57
3.3.	Mise au point de méthodes de solubilisation du DBDE	57
3.3.1.	Pour les incubations <i>in vitro</i>	57
3.3.2.	Pour les études <i>in vivo</i>	58
3.4.	Techniques d'extraction à partir de différentes matrices biologiques	59
III.	ETUDES IN VITRO.....	59
1.	Incubations avec des microsomes et des fractions S9 de foie.....	59
2.	Incubations avec des tranches de foie de rat.....	60
3.	Incubations avec des contenus intestinaux de rat en conditions anaérobies	60
4.	Incubations avec des granulocytes humains (neutrophiles)	61
IV.	TESTS D'ACTIVITE BIOLOGIQUE SUR LIGNEES CELLULAIRES BIOLUMINESCENTES	61
V.	CARACTERISATION STRUCTURALE DES PRODUITS DE BIOTRANSFORMATION DU TBBPA ET DU DBDE	63
1.	Méthodes biochimiques	63
1.1.	Suc d' <i>Helix pomatia</i> (activité sulfatase et glucuronidase)	63
1.2.	β glucuronidase de foie de bovin.....	63
1.3.	Aryl sulfatase d' <i>Aerobacter aerogenes</i>	63
2.	Identification et caractérisation en spectrométrie de masse	64
2.1.	Etude des PBDE par APPI-MS et APPI-MS/MS (article 1)	65

2.1.1.	Introduction	65
2.1.2.	Résultats	66
2.1.3.	Résultats complémentaires	66
2.1.4.	Discussion	67
Article 1	69
2.2.	Etude des RFB et de leurs produits de dégradation par LC-APPI-MS (article 2)	71
2.2.1.	Introduction	71
2.2.2.	Résultats	71
2.2.3.	Résultats complémentaires	72
2.2.4.	Discussion	73
Article 2	75
V.	Conclusions	77
CHAPITRE 3 : ETUDE DU METABOLISME DES RFB	79
A/ ETUDE DU METABOLISME DU TBBPA	81
I.	METABOLISME DU TBBPA <i>IN VITRO</i>	81
1.	Introduction	81
2.	Résultats.....	82
3.	Résultats complémentaires	83
3.1.	Effet de la photo-dégradation	83
3.2.	Incubations du TBBPA avec des tranches de foie de rat.....	84
3.3.	Production de certains métabolites du TBBPA pour des identifications structurales complémentaires en RMN	84
3.3.1.	Oxydation du TBBPA par voie chimique.....	84
3.3.2.	Photo-dégradation du TBBPA.....	85
3.4.	Tests d'activité biologique du TBBPA, de ses dérivés moins bromés (dont le BPA) et de certains de ses métabolites	86
4.	Discussion.....	88
Article 3	89
II.	DEVENIR du [¹⁴ C]-TBBPA chez la RATE GESTANTE.....	91
1.	Introduction	91
2.	Matériels et méthodes	91
2.1.	Synthèse	91
2.2.	Animaux	92
2.3.	Instrumentation	92
2.4.	Méthodes d'extraction des matrices biologiques.....	92
2.5.	Hydrolyses enzymatiques.....	93
3.	Résultats et discussion	93
3.1.	Distribution de la radioactivité et profils métaboliques chez la rate gestante gavée quatre jours consécutifs avec du [¹⁴ C]-TBBPA.....	93
3.2.	Profils plasmatiques obtenus à des temps courts après administration (i.p.) d'une dose unique de [¹⁴ C]-TBBPA chez le rat.....	96
4.	Conclusion	97
III.	BIOACTIVATION DU TBBPA <i>IN VITRO</i> PAR DES CELLULES SANGUINES HUMAINES.....	98
1.	Introduction	98
2.	Résultats.....	99
3.	Discussion.....	101
Article 4	103

IV.	Conclusions	105
B/ ETUDE DU METABOLISME DU DBDE		107
I.	BIOTRANSFORMATIONS DU DBDE <i>IN VITRO</i>	107
1.	Introduction	107
2.	Matériels et méthodes	107
3.	Résultats.....	107
4.	Discussion.....	108
II.	DEVENIR DU DBDE CHEZ LA RATE GESTANTE (ARTICLE 5)	109
1.	Introduction	109
2.	Résultats.....	110
3.	Résultats complémentaires	112
3.1.	Implication de la microflore intestinale dans le métabolisme du DBDE	112
3.2.	Essais préliminaires d'identification structurale de l'octaBDE hydroxylé par APPI-MS	112
4.	Discussion.....	114
Article 5.....		117
III.	Conclusions	119
DISCUSSION GENERALE		121
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		137
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		143
ANNEXES.....		159

AVANT PROPOS

Depuis longtemps, la lutte contre les incendies représente un enjeu majeur du point de vue de la santé humaine, mais aussi du point de vue économique. Au cours des dernières décennies, l'utilisation croissante de matériaux inflammables dans la production de nombreux biens de consommation a impliqué la mise en place de normes de sécurité strictes en matière de gestion des risques d'incendies. C'est pour cela que les industries ont recours à des substances chimiques dites « retardateurs de flammes », dont une grande partie est aujourd'hui représentée par les retardateurs de flammes bromés (RFB). Parmi ces RFB, les plus utilisés sont le tétrabromobisphénol A (TBBPA) et le décabromodiphényle éther (DBDE). Le DBDE est le congénère le plus bromé (10 atomes de brome) d'une famille qui compte 209 congénères (les polybromodiphényles éthers, PBDE). Ces produits sont incorporés dans différents matériaux, dans lesquels ils sont soit chimiquement liés, soit simplement ajoutés, afin de leur conférer des propriétés ignifuges. Ces matériaux rentrent dans la composition de nombreux équipements domestiques et industriels soumis à de fortes températures, mais aussi dans certains textiles de revêtement et mousses de capitonnage.

Le bénéfice premier qu'apportent les RFB en réduisant les risques d'incendies, et ainsi en permettant de sauver un grand nombre de vies et de biens, génère en contre partie des craintes, notamment du point de vue environnemental et de la santé humaine. En effet, des niveaux de TBBPA et de DBDE sont retrouvés dans la plupart des compartiments environnementaux, chez l'animal et chez l'Homme. La voie d'exposition aux RFB et à leurs résidus serait, selon toute vraisemblance, principalement due à l'ingestion de denrées alimentaires et de poussières préalablement contaminées. Non seulement les adultes sont exposés mais les nourrissons le sont également *via* l'allaitement par la mère. De récentes études supposent aussi une exposition des fœtus *in utero*. L'analogie structurale de certains RFB avec des contaminants de l'environnement et de la chaîne alimentaire, tels que le bisphénol A pour le TBBPA ou les polychlorobiphényles (PCB) pour les PBDE (lesquels sont à l'origine de dysfonctionnements des régulations endocrines chez l'Homme) soulève des inquiétudes supplémentaires quant à la toxicité potentielle de ces produits.

L'Union Européenne a récemment pris des mesures concernant certains de ces RFB. Depuis 2004, l'utilisation des formulations commerciales (penta- et octa-mix) contenant des PBDE de

faible poids moléculaire est interdite, impliquant que seul le DBDE reste utilisé. Cependant, sous l'effet de rayonnements UV, le TBBPA et le DBDE peuvent perdre des atomes de brome dans l'environnement pour donner respectivement du BPA et des PBDE moins bromés. Les données concernant l'activité biologique de ces deux RFB et de leurs résidus (métabolites, produits de dégradation) sont limitées. La connaissance de leurs voies de biotransformation est très incomplète et ne fournit pas à l'heure actuelle les informations suffisantes, permettant d'évaluer les risques associés à ces xénobiotiques en termes de santé publique. Il apparaît primordial de parvenir à identifier de manière précise la nature des résidus des RFB effectivement présents dans les matrices biologiques chez l'Homme en se basant dans un premier temps sur les résultats établis sur modèles animaux. Cette approche est la seule permettant de quantifier l'exposition à ces xénobiotiques, en analysant des échantillons humains pour y rechercher à la fois des composés parentaux et les principaux produits de biotransformation. Cette approche conduit également à évaluer l'activité biologique des métabolites formés. Enfin, les études de métabolisme permettent de rechercher l'existence de voies métaboliques spécifiques contribuant à comprendre et à expliquer la cytotoxicité de certains RFB.

Afin de répondre à ces questions, un programme regroupant 4 équipes, coordonné par l'UMR 1089 INRA, a été financé en 2004 par l'AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail) pour une durée de 3 ans, avec comme intitulé « l'évaluation du risque associé aux retardateurs de flammes bromés : approche expérimentale de l'exposition chez le nouveau-né et caractérisation des effets biologiques ». L'équipe du Pr A. Berrebi (CHU de Toulouse), se charge pour ce programme de la collecte des échantillons humains, soit 600 échantillons provenant de 100 couples mère/enfant (tissu adipeux de la mère, lait maternel, placenta, sang maternel et fœtal, et méconium). La seconde équipe, du Professeur B. Le Bizec du Laberca à Nantes, se charge de l'analyse et de la quantification du TBBPA et des PBDE dans les matrices humaines. La troisième équipe du Dr D. Zalko (INRA de Toulouse) est chargée de l'étude du métabolisme du TBBPA et du DBDE. La dernière équipe concernée qui est celle du Dr P. Ballaguer (INSERM à Montpellier) se charge d'étudier les activités biologiques associées à ces composés et à leur produits de biotransformation. Ce travail de thèse est partie intégrante de ce projet, pour lequel l'étude du métabolisme du TBBPA et du DBDE a été réalisée, *in vitro* chez le rat et l'Homme, ainsi qu'*in vivo* chez la rate gestante. Nos objectifs principaux étaient d'étudier le devenir du TBBPA et du DBDE, d'évaluer l'exposition fœtale aux RFB chez un modèle animal murin, et

d'identifier les produits de biotransformation formés *in vivo* et *in vitro*. Pour ce dernier volet, une collaboration avec le NILU (Norwegian Institute for air research) a également été initiée. Le programme AFSSET (RD-2004-011) sera terminé en 2007. Certains résultats, notamment concernant l'activité biologique des RFB étudiés, ne sont pas encore disponibles. Les analyses réalisées chez l'Homme sont sur le point de se terminer. Elles démontrent clairement, et pour la première fois, l'exposition de la population française aux RFB.

Chapitre 1 : INTRODUCTION

I. CONTEXTE

L'avènement des polymères synthétiques (plastiques, mousses de capitonnage) a entraîné une impulsion nouvelle dans le domaine de la lutte contre les incendies. En effet, l'inflammabilité élevée de ces matériaux malléables, peu onéreux et hautement hydrophobes, ainsi que le besoin grandissant de sécurité et de réduction du risque, ont ouvert la voie à une production scientifique intense. Afin de diminuer les risques de propagation des flammes dans ces matériaux synthétiques, les industriels ajoutent des composés retardateurs de flammes. Ces produits chimiques sont incorporés dans divers matériaux à usages domestiques et industriels afin de leur conférer des propriétés ignifuges. En général entre 5 et 30 % de ce qui entre dans la fabrication de ces matériaux peut être constitué de composés retardateurs de flammes. Dans nos intérieurs domestiques aussi bien que sur les lieux de travail, la proportion des appareils constitués de polymères synthétiques est en constante augmentation. Il est important de noter que l'utilisation des retardateurs de flammes n'est pas limitée uniquement à l'ignifugation des matériaux synthétiques, puisqu'ils permettent également de lutter contre les incendies, et notamment les feux de forêt. Ces derniers sont combattus grâce au déversement d'organophosphorés. En revanche, ce sont principalement les retardateurs de flammes bromés qui sont incorporés aux polymères synthétiques afin de retarder la prise de feu des biens domestiques et professionnels. Le caractère persistant de ces substances halogénées a suscité de nombreuses inquiétudes depuis plusieurs années, tant au plan environnemental qu'en matière de santé publique. En effet, leur concentration dans l'environnement semble être en augmentation tandis que celle de la plupart des autres polluants organiques persistants (POP), majoritairement chlorés, diminue régulièrement en raison de leur interdiction dans un grand nombre de pays.

1. Les retardateurs de flammes

Les retardateurs de flammes vont inhiber ou supprimer le processus de combustion par une action chimique et/ou physique. Ils interfèrent avec la combustion, à l'une des quatre étapes de ce processus, c'est-à-dire durant l'échauffement, la décomposition, l'inflammation ou la propagation des flammes. C'est pour cela qu'il existe plusieurs familles de retardateurs de flammes. Les 4 groupes majoritaires sont les retardateurs de flammes inorganiques, les organiques halogénés, les organophosphorés et ceux à base d'azote, représentant respectivement 50 %, 25 %, 20 % et 5 % de la production mondiale annuelle (WHO, 1997).

En 2001, la consommation mondiale de retardateurs de flammes a atteint un total de 1,2 millions de tonnes, dont 0,43 millions de tonnes en Europe (EFRA, 2004).

Les retardateurs de flammes agissent donc sur deux fronts : en limitant le départ de feu (empêcher son démarrage) et en retardant la propagation de l'incendie. Ils protègent ainsi les vies et les biens. Du point de vue industriel, les retardateurs de flammes bromés présentent l'avantage d'être efficaces (quantités exigées relativement faibles) et peu onéreux, c'est pour cela qu'ils sont utilisés de façon massive.

2. Les Retardateurs de Flammes Bromés (RFB)

2.1. Production et utilisation du brome

Les halogènes sont très efficaces dans le piégeage des espèces radicalaires formées lors du processus de combustion et présentes au sein des flammes, permettant ainsi le ralentissement ou l'arrêt de la prise de feu. Les 4 halogènes sont efficaces dans la capture des radicaux libres, et cette efficacité de piégeage augmente avec la taille de l'halogène (I>Br>Cl>F). Cependant, tous les halogènes ne peuvent pas être utilisés comme retardateurs de flammes. En effet, les composés fluorés sont très stables et ne se décomposent qu'à de très hautes températures (supérieures à la température de combustion de la plupart des matériaux), délivrant les halogènes trop tard pour être efficaces en tant que retardateurs de flammes. Inversement, les composés iodés sont peu stables et se décomposent à des températures peu élevées. Par conséquent, seuls les composés organochlorés et organobromés sont utilisés comme retardateurs de flammes. Mais avec un piégeage plus efficace et une température de décomposition plus basse, les composés organobromés sont beaucoup plus utilisés que leurs homologues chlorés (Alaee *et al.*, 2003).

Le brome est utilisé dans un grand nombre de produits autres que les retardateurs de flammes: des pesticides, des additifs présents dans l'essence, des huiles de forage et des biocides. Dans les années 1960, 5 % de la production de brome étaient destinés à la fabrication des retardateurs de flammes, alors qu'actuellement 38 % de la production mondiale de brome sont destinés à ces composés ignifugeants (Fig. 1). La production mondiale annuelle de brome a augmenté d'année en année, s'élevant à plus de 540 000 tonnes en 2000. Les premiers pays producteurs de brome sont les Etats-Unis d'Amérique, suivis de très près par Israël. L'Union Européenne arrive en troisième position avec 6 % de la production mondiale de brome en 2000 (Alaee *et al.* 2003).

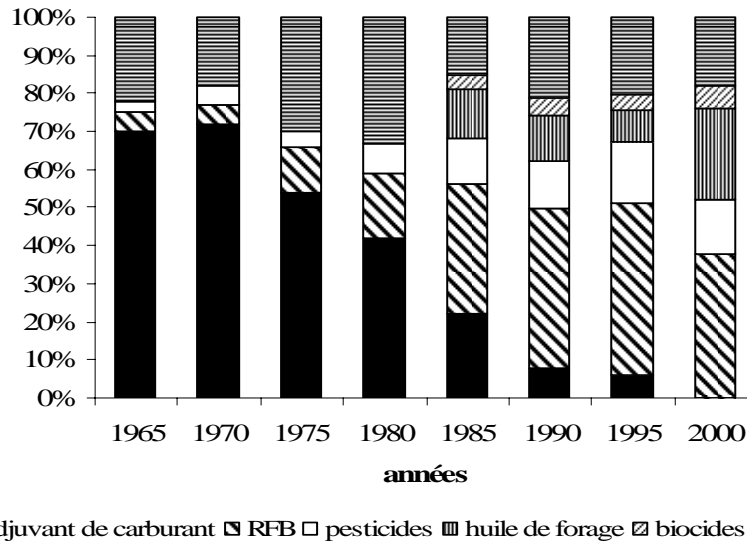


Fig. 1 : Distribution de la présence de brome dans les produits finis (Alaee et al., 2003).

2.2. Marché des retardateurs de flammes bromés

Il existe 75 composés aliphatiques, aromatiques et cyclo-aliphatiques différents utilisés comme retardateurs de flammes bromés, répartis en 6 familles. Leur seul point commun est la présence de brome et leur action en phase gazeuse, permettant le ralentissement ou l'arrêt de la prise de feu par piégeage des espèces radicalaires présentes au sein des flammes.

Les 6 familles de retardateurs de flammes bromés sont : le tétrabromobisphénol A (TBBPA), les polybromodiphényles éthers (PBDE), l'hexabromocyclododécane (HBCD), le polystyrène bromé, les bromophénols et l'anhydride tétrabromophthalique. Une septième famille faisait partie des retardateurs de flammes bromés: les polybromobiphényles (PBB). Ces derniers produits massivement dans les années 70, ont été retirés du marché mondial en 2000, suite à de nombreuses études démontrant leur toxicité.

En 2000, la production mondiale en retardateurs de flammes bromés se situait autour de 310000 tonnes (BSEF, 2001), dont plus de 50 % sous la forme de TBBPA, 30 % représentés par la famille des PBDE, 5 à 10 % par l'HBCD, et les 10 à 15 % restant se répartissant parmi les 3 autres familles de RFB. L'Asie est le plus gros consommateur de RFB (56 % de la demande mondiale) suivie par l'Amérique du nord et l'Europe, qui en consomme respectivement 29 % et 15 % (tableau 1).

RFB	Amériques	Europe	Asie	Reste du monde
TBBPA	18 000	11 600	89 400	600
HBCD	2 800	9 500	3 900	500
PBDE	33 100	8 360	24 650	1 330
Total RFB/région	53 900	29 460	117 950	2 430

*Tableau 1. Estimation de la consommation des RFB majoritaires par région (en tonnes)
(Birnbaum et Staskal, 2004)*

Les 6 familles de RFB sont réparties en 2 sous-groupes. Les retardateurs de flammes dits « réactifs » tel que le TBBPA, sont insérés dans le polymère de manière covalente. Ils ont été mis sur le marché à partir des années 50. En raison de contraintes de procédé ou d'altération des propriétés finales du produit par le retardateur de flammes dans les polymères tels que le polyéthylène, le polypropylène ou le nylon, un second type d'additifs dits « inertes » a été introduit en 1965. Les additifs, tels que les PBDE et l'HBCD sont ainsi simplement mélangés au polymère. Ces derniers sont ainsi plus facilement relargués des matériaux. En effet, la proportion de RFB libérée dans l'environnement est dépendante de la manière dont ces produits chimiques sont ajoutés aux polymères, *i.e.* « réactifs » ou « additifs » (Birnbaum et Staskal, 2004).

2.3. Production et utilisation des principaux RFB

2.3.1. Le tétrabromobisphénol A (TBBPA)

Le TBBPA est majoritairement utilisé comme un retardateur de flammes bromé réactif (>95%), mais il est aussi utilisé comme additif dans certains matériaux. Sa consommation annuelle totale s'élève à plus de 200 000 tonnes /an (BSEF, 2003). Le TBBPA est donc le retardateur de flammes bromé le plus utilisé dans le monde. Il est produit majoritairement en Israël. La production, la commercialisation et l'utilisation du TBBPA, contrairement à d'autres RFB, sont autorisées dans le monde entier. Il est principalement utilisé comme un intermédiaire réactif dans la fabrication de résines époxy ou de polycarbonates. Ces polymères sont utilisés dans la fabrication des cartes de circuits imprimés retrouvées dans la plupart des appareils électroniques. Dans près de 5 % des cas, le TBBPA est utilisé comme additif dans les résines d'acrylonitrile-butadiène-styrène (ABS) constitutives des boîtiers plastifiés de certains appareils électriques ou électroniques. Le TBBPA contribue donc à la

protection incendie des équipements et installations électriques et électroniques aussi bien domestiques qu'industriels (téléviseurs, téléphones portables, ordinateurs, etc...).

2.3.2. Les polybromodiphényles éthers (PBDE)

Cette famille de retardateurs de flammes bromés représente près d'un tiers de la production mondiale de RFB. Ils sont utilisés depuis les années 60. La demande mondiale annuelle en PBDE est estimée à environ 65 000 tonnes/an, dont 85 % sous la forme de deca-mix (cf. composition tableau 2), 10 % sous la forme de penta-mix (cf. composition tableau 2) et 5 % sous la forme d'octa-mix (cf. composition tableau 2) (BSEF, 2001). Les polybromodiphényles éthers sont des retardateurs de flammes bromés utilisés comme additifs, mélangés avec différents polymères, résines ou autres substrats. La concentration en PBDE dans les différents matériaux peut atteindre 5 à 30 %.

Le pentaBDE commercial est utilisé dans les résines époxy des cartes de circuits imprimés, dans les plastiques des ordinateurs et dans certains textiles tels que les tapis et les moquettes.

L'octa-mix est utilisé comme retardateur de flammes dans l'acrylonitrile-butadiène-styrène (ABS). Ces résines sont utilisées dans la production des ordinateurs, téléviseurs, appareils audio et vidéo, etc...

Le deca-mix, second retardateur de flammes bromé le plus utilisé après le TBBPA, a une plus vaste gamme d'applications que ce dernier. Il est utilisé dans les boîtiers en polymères de nombreux appareils électriques ou électroniques, mélangé au HIPS (high impact polystyrene). Il sert de retardateur de flammes dans les textiles de rembourrage des canapés ou des chaises de bureau. Mélangé à du polypropylène, il est également utilisé dans la fabrication des sièges plastifiés installés dans les stades, des câbles de construction ou encore des couvercles de boîtes en plastique pour le stockage et le chauffage des aliments. Il est également retrouvé dans des plastiques renforcés à base de polyesters insaturés dans les voitures ou d'autres véhicules de transport.

3. Structure et propriétés des principaux retardateurs de flammes bromés

3.1. Le tétrabromobisphénol A (TBBPA ; n° CAS : 79-94-7)

3.1.1. Structure du TBBPA

Le TBBPA est l'analogue bromé du bisphénol A (BPA). Le BPA est un composé oestrogéno-mimétique, utilisé dans la production de résines époxy, de polycarbonates et

comme antioxydant dans les plastiques (PVC). Ces polymères de BPA sont entre autres, utilisés dans l'industrie alimentaire, où ils sont présents dans le revêtement des boîtes de conserve et dans les plastiques (polycarbonate) constitutifs de certaines bouteilles d'eau ou de sodas, ce qui constitue une source de contamination de l'alimentation humaine. Le TBBPA est constitué de 2 cycles phénols, reliés entre eux par un groupement isopropyle, substitués chacun de 2 atomes de brome situés en ortho de la fonction alcool (Fig. 2). Il est synthétisé par bromation du bisphénol A dans des solvants organiques.

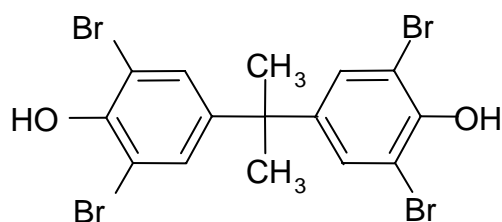


Fig 2. Structure du TBBPA

3.1.2. Propriétés physico-chimiques du TBBPA

Le TBBPA est commercialisé sous forme de poudre blanche, contenant 59 % de brome, son poids moléculaire est de 543,8 g/mol. Son point de fusion est à 180 °C et son point d'ébullition est à 316 °C. Contrairement à son homologue non bromé, le bisphénol A, le TBBPA est très peu soluble dans l'eau en raison de la présence d'atomes de brome sur le squelette carboné (4 mg/L, à 25°C). Son coefficient de partage octanol/eau est relativement élevé ($\log K_{ow} = 4,5$). Il est en revanche plus soluble dans des solvants organiques tels que le méthanol et l'acétonitrile (920 g/L) (WHO, 1995).

3.2. Les polybromodiphényles éthers (PBDE)

3.2.1. Structure des PBDE.

Les PBDE sont synthétisés par bromation d'une molécule de diphényle éther dans des solvants organiques. Les conditions de cette synthèse déterminent le degré d'halogénéation des molécules obtenues. La formule chimique générale d'un PBDE est $C_{12}O_1H_{(n)}Br_{(10-n)}$ avec la somme des atomes d'hydrogène et de brome toujours égale à 10 (Fig. 3). Comme les polychlorobiphényles (PCB), leurs analogues chlorés dépourvus de pont éther reliant les 2 cycles aromatiques, il existe théoriquement 209 congénères, répartis en 10 groupes (du mono- au decabromodiphényle éther, DBDE). La nomenclature des PCB proposée en 1980 par

Ballschmitter et Zell, est aussi utilisée pour les PBDE (nomenclature IUPAC, annexe 1). Cependant, seules 3 formulations comprenant des mélanges de PBDE sont produites et commercialisées : le penta-mix, l'octa-mix et le deca-mix. Ces trois produits commerciaux ne sont pas uniquement constitués de molécules comprenant respectivement 5, 8 et 10 atomes de brome, mais par des mélanges, dont le nom correspond à la moyenne des atomes de brome présents sur les congénères constitutifs du mélange. Les proportions en congénères de ces mélanges commerciaux ont été répertoriées dans le tableau 2, lorsque celles-ci étaient disponibles dans la littérature.

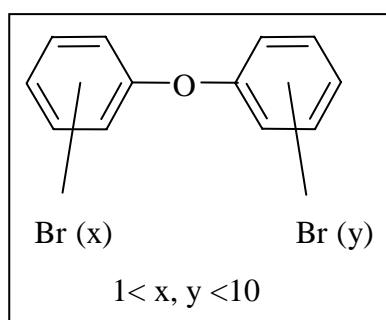


Fig. 3. Structure des PBDE

Le penta-mix commercial est constitué de triBDE, de tétraBDE, de pentaBDE et d'hexaBDE. Deux congénères sont majoritairement retrouvés dans ce mélange commercial, le 2,2',4,4'-tétraBDE (BDE-47) et le 2,2',4,4',5-pentaBDE dont les proportions respectives sont de 37 % et 35 % (Sjodin *et al.*, 1998).

congénères	Penta-mix (%)	Octa-mix (%)	Deca-mix (%)
triBDE	0-1 [BDE-17 ; 28]		
tétraBDE	24-38 [BDE-47 (37); 66 (0,3)]		
pentaBDE	50-62 [BDE-99 (35); 100 (7) ; 85]		
hexaBDE	4-8 [BDE-153 (4); 154 (2.5); 138]	10-12 [BDE-153 (10); 154 (2)]	
heptaBDE		43-44 [BDE-183 (40)]	
octaBDE		31-35 [BDE-197 (10); 203; 196]	
nonaBDE		9-11 [BDE-207 > 208 > 206]	0,3-3
decaBDE		0-1	97-99

Tableau 2. Composition des PBDE commerciaux exprimée en % [congénère (%)]

L'octa-mix est constitué de congénères ayant de 6 à 10 atomes de brome, dont 40% du mélange correspond au seul congénère 2,2',3,4,4',5',6-heptaBDE (BDE-183), les autres

composés majoritaires de ce mélange étant le 2,2',4,4',5,5'-hexaBDE (BDE-153), le 2,2',3,3',4,4',6,6'-octaBDE (BDE-197), et le 2,2',3,3',4,4',5,6,6'-nonaBDE (BDE-207) (Gaul *et al.*, 2005; Korytar *et al.*, 2005).

Dans le deca-mix, le decaBDE (DBDE, n° CAS : 1163-19-5) est le constituant majoritaire du mélange avec la présence d'une faible proportion des 3 nonaBDEs.

3.2.2. Propriétés physico-chimiques des PBDE

	Penta-mix	Octa-mix	Deca-mix
Point de fusion (°C)	92-98	200	290-306
Solubilité dans l'eau à T° ambiante (µg/L)	0,9	0,5	<1
Solubilité dans les solvants (g/L) :			
Méthanol (à 25°C)	10	2-7	0,5
Toluène (à 25°C)	soluble	200	3,8
Log K _{ow}	6,64-6,97	8,35-8,90	9,97

Tableau 3. Propriétés physiques et chimiques des PBDE techniques (WHO, 1994)

L'octa-mix et le deca-mix sont commercialisés sous la forme d'une poudre blanche, alors que le penta-mix l'est sous la forme d'un liquide visqueux. Les PBDE sont des composés relativement résistants aux dégradations physiques, chimiques ou biologiques, et relativement stables thermiquement avec un point d'ébullition situé entre 310 et 425°C, selon le degré de bromation. Les PBDE commerciaux sont composés de congénères ayant un poids moléculaire élevé, ils sont également très peu volatiles, et sont des substances lipophiles avec des coefficients de partition octanol/eau (log K_{ow}) élevés compris entre 6,6 et 9,9 (Tableau 3). Ces produits sont très peu hydrosolubles, en particulier pour ce qui est des congénères les plus bromés : la solubilité dans l'eau de ces composés est inférieure à 1 µg/L à température ambiante. Plus le nombre d'atomes de brome augmente, plus la solubilité du composé dans des solvants organiques est faible. Le congénère substitué avec 10 atomes de brome (DBDE) est particulièrement peu soluble dans des solvants organiques (méthanol et acétonitrile : 0,5

g/L). Par contre, sa solubilité est de l'ordre de quelques g/L dans le toluène ou le diméthyle sulfoxyde (DMSO). La faible solubilité de ces produits rend leur étude difficile, en ce qui concerne leur analyse, mais aussi pour la mise en œuvre d'études *in vitro* et *in vivo* (concernant l'administration et l'extraction des matrices biologiques).

4. Enjeux sociétaux et aspects réglementaires

4.1. Risques d'incendie

Les dégâts liés aux incendies ont toujours été fortement préjudiciables, en terme de destruction de biens et de dommages corporels, mais aussi psychologiques. Pour cette raison depuis des siècles, les sociétés tentent de lutter contre ces ravages. Les normes de sécurité se sont intensifiées avec l'urbanisation de notre environnement, induite par la croissance mondiale amorcée au lendemain de la seconde guerre mondiale. Plus les sociétés sont industrialisées, plus les risques liés aux incendies sont importants et d'origines variées. Les retardateurs de flammes, fabriqués dans un objectif de lutte préventive contre les incendies, ont alors connu un essor important. Aujourd'hui ces composés sont omniprésents dans notre environnement quotidien domestique et industriel, dans les textiles, dans les polymères utilisés dans de nombreux secteurs, tels que l'électronique et l'électrique, dans les transports et dans tous les bâtiments publics.

En 2004, le nombre d'incendies domestiques déclarés s'élevait à 600 000 par an en Europe, provoquant 45 000 blessés et 3250 décès, pour un coût total estimé de 17 milliards €/an*. Aux Etats-Unis près de 3 millions d'incendies sont répertoriés par an, provoquant 4500 décès pour un coût total estimé à 100 milliards de dollars U.S. Le nombre de décès annuels liés aux incendies semble diminuer depuis les années 70. Cette diminution peut être en partie attribuée à l'utilisation des retardateurs de flammes dans les nouveaux matériaux.

4.2. Contamination de l'environnement

Les retardateurs de flammes bromés, en raison de leur efficacité et de leur faible coût, ont donc de nombreuses applications et ils permettent ainsi de sauver un nombre non négligeable de vies et de biens. Cependant, d'autres composés de structures très proches, le bisphénol A (BPA) pour le TBBPA et les polychlorobiphényles (PCB) et les polybromobiphényles (PPB) pour les PBDE, sont reconnus comme étant des contaminants organiques de l'environnement. Le BPA est un perturbateur endocrinien, doté d'une activité oestrogéno-mimétique. Les PCB

*Données obtenues de la campagne nationale de prévention des incendies 2004/
www.cfes.sante.fr/70000/dp/04/dp041019.pdf

et les PBB, sont persistants dans l'environnement, ont un potentiel de bioaccumulation élevé et présentent un risque toxique. Il est donc légitime de penser que leur analogues organobromés que sont les RFB, puissent posséder des caractéristiques voisines.

La première étude rapportant la présence de TBBPA et de PBDE dans l'environnement date de 1979 (DeCarlo, 1979). Depuis, de nombreuses études ont fait état de leur présence dans l'air, les sols, l'eau. Ils ont été détectés dans des échantillons biologiques dont des tissus humains. Ces données ont accentué l'attention de la communauté scientifique pour ces composés, et l'inquiétude des pouvoirs publics à leur égard. Les niveaux actuels de résidus de RFB dans les matrices biologiques humaines, restent globalement inférieurs à ceux des PCB, et sont beaucoup plus élevés chez les habitants d'Amérique du Nord que chez les Européens. De façon générale et contrairement aux PCB, ces niveaux tendent à augmenter régulièrement pour la plupart des pays (Meironyte *et al.*, 1999; Sjodin *et al.*, 2003). Peu de données sont actuellement disponibles quant à leurs effets nocifs sur la santé humaine. Des effets toxiques peuvent néanmoins leur être attribués, tels que le rôle de perturbateurs endocriniens par rapport aux hormones thyroïdiennes ou au niveau des hormones de la reproduction. Mais les données restent encore très fragmentaires concernant le transfert de ces substances dans l'environnement, l'exposition de l'Homme, et en particulier celle du fœtus ou du nouveau-né, ou encore leur toxicité et leur métabolisme.

4.3. Réglementation et restrictions

Dans de nombreux champs d'application, les plastiques doivent remplir des spécifications concernant leur inflammabilité, décrites dans les normes internationales (EFRA, 2004).

L'Union européenne a publié au Journal Officiel de février 2003 trois directives concernant la restriction d'utilisation de certaines substances dangereuses dans les équipements électroniques et électriques (2002/95/EC), les déchets d'équipements électroniques et électriques (2002/96/EC), limitant ainsi la mise sur le marché et l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses (penta-mix et octa-mix) (2003/11/EC). La première prohibe à dater du 1^{er} Juillet 2006 la mise sur le marché d'équipements électroniques et électriques contenant du plomb, du mercure, du cadmium, du chrome hexavalent (chrome VI), des polybromobiphényles (PBB) ou des polybromodiphényles éthers (PBDE). Notons que le TBBPA et le DBDE faisaient partie de la liste dans les versions préliminaires de cette directive. La seconde prévoit le transfert des responsabilités de la collecte, du recyclage et de la revalorisation de ces déchets aux producteurs eux-mêmes (individuels ou collectifs) avant la date d'échéance du 13 août 2005, et le traitement sélectif de nombreux composés dont les

RFB avec obligation de résultats au 31 décembre 2006. La troisième directive généralise la première en prohibant la commercialisation de tout produit contenant du penta-mix ou de l'octa-mix. En effet, depuis le 15 août 2004, la mise sur le marché de produits ou d'articles contenant des concentrations supérieures à 0,1 % en masse d'octa-BDE ou de penta-BDE est interdite au sein de l'Union européenne.

5. Conclusion

Réduire les risques liés aux incendies sans porter préjudice à l'environnement et à la santé humaine est un objectif difficile à mettre en œuvre. En effet, l'industrie défend les bénéfices des retardateurs de flammes, qui sont à la fois sociétaux (baisse de la mortalité, des blessures et des dégâts matériels) et environnementaux (diminution de la pollution liées aux incendies) (Hardy *et al.*, 2003; Hardy, 2004), alors que d'autres s'opposent à l'utilisation des substances actuellement sur le marché comme les « environnementalistes » (*e.g.* Greenpeace) mettant en avant les effets néfastes de ces composés (WWF, 2004). Face à ces enjeux, les scientifiques travaillent pour apporter des données concernant les niveaux et l'origine des contaminations, ou encore le devenir et la toxicité de ces substances, tant au plan environnemental que pour ce qui concerne le consommateur.

Dans un contexte d'économie mondiale, ces produits peu onéreux dont le marché représente un chiffre d'affaires important, permettent de sauver des vies. Cependant, les risques pour l'environnement et la santé humaine ne sont encore que partiellement évalués. Une prise de conscience, par les pouvoirs publics et les instances réglementaires, du problème des retardateurs de flammes bromés a émergé, même si la pression de certains industriels reste forte. L'Europe, comme récemment l'état de Californie, a ainsi interdit l'utilisation des mélanges penta-mix et octa-mix, et renforcé la réglementation concernant le recyclage afin de réduire les contaminations de l'environnement. Seule l'utilisation du deca-mix reste encore autorisée. Ces restrictions ont été prises en raison des risques possibles encourus par l'Homme et sa descendance (enfants nourris au lait maternel, risque possible d'altération de la fertilité), mais aussi parce que ces substances sont très toxiques pour certaines espèces aquatiques. Cependant, des quantités importantes de ces mélanges demeurent encore utilisées dans le reste du monde. De plus, il est démontré que sous l'effet du rayonnement UV, le DBDE perd rapidement un ou plusieurs atomes de brome et qu'il peut par conséquent, se dégrader pour produire l'ensemble de la série des polybromodiphényles éthers ainsi que les furanes correspondants (Watanabe et Tatsukawa, 1987; Soderstrom *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2006). La communauté scientifique doit donc encore répondre à de nombreuses questions, concernant

les niveaux d'exposition des populations et en particulier du fœtus et des nouveau-nés, la toxicité pour l'environnement et l'Homme, ou encore le devenir de ces composés dans l'environnement et dans des organismes vivants.

II. PRESENCE ET DEVENIR DES RFB DANS L'ENVIRONNEMENT

Les données disponibles concernant les niveaux résiduels des RFB dans l'environnement sont beaucoup moins nombreuses que celles concernant les organochlorés. Cependant, depuis quelques années des études démontrent que les RFB additifs ou réactifs peuvent être libérés et venir contaminer l'environnement où les niveaux mesurés sont en constante augmentation. Leur faible solubilité dans l'eau, et par conséquent leur forte lipophilie, en particulier pour les PBDE, implique que ces composés ont tendance à s'accumuler dans les sédiments et les sols, mais également dans divers tissus animaux et chez l'Homme. Dans cette partie, un état des lieux sur les niveaux résiduels de RFB retrouvés dans les différents compartiments environnementaux sera dressé. Les problèmes analytiques liés à l'analyse des RFB seront détaillés car ils expliquent pourquoi les niveaux déterminés ne concernent trop souvent qu'un nombre restreint de composés. Il s'agit principalement des PBDE moyennement bromés (tétra à hexaBDE), les congénères les plus recherchés étant les BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153 et BDE-154. Enfin, il sera question du devenir des RFB dans l'environnement, où leur structure peut être modifiée par des facteurs physico-chimiques ou biotiques.

1. Niveaux résiduels de RFB détectés dans les différents compartiments environnementaux

1.1. Le milieu aérien

Des niveaux significatifs de RFB ont été retrouvés dans l'air malgré leur faible volatilité. Une importante contamination de l'air par les PBDE a été observée en Grande Bretagne, principalement dans les zones urbaines et dans l'air ambiant des intérieurs de bureaux, de voitures ou de domiciles (respectivement, 0,2, 0,1 et 0,7 ng/m³) (Hazrati et Harrad, 2006). Les auteurs attribuent cette contamination à l'utilisation croissante de matériaux contenant des RFB dans ces lieux. A l'extérieur, en milieu ouvert, des concentrations en RFB de l'ordre du pg/m³ ont été retrouvées dans la région des Grands lacs, près de sources de pollution (principalement les usines de production et d'utilisation de ces composés) (Strandberg *et al.*,

2001). Les RFB sont dispersés dans l'air à des distances variables, dépendantes des conditions météorologiques, de la taille des particules présentes dans l'air et du degré de bromation du composé. En ce qui concerne les PBDE, les congénères moyennement et fortement bromés (penta- au deca-BDE) ont été détectés relativement près des sources de pollution, alors que les congénères faiblement bromés, plus volatiles, ont souvent été retrouvés à des distances éloignées des mêmes sources, impliquant des transports à grande échelle de ces composés par la voie aérienne (Dodder *et al.*, 2000). En effet, seuls les PBDE faiblement bromés (mono- au tétra-BDE) ont été retrouvés dans la phase vaporisée de l'air, alors que les congénères plus lourds étaient associés aux particules de l'air (Hale *et al.*, 2006). Une étude a récemment montré que dans un lieu éloigné de toutes sources de contaminations en pleine mer baltique, 10 PBDE pouvaient être identifiés dans l'air. La concentration moyenne de la somme de ces 10 congénères a été estimée à 8,6 pg/m³, avec une large proportion de DBDE (ter Schure *et al.*, 2004), confirmant également la possibilité du déplacement à de longues distances des congénères fortement bromés associés aux particules (de Wit *et al.*, 2006). Actuellement, en Europe, les niveaux de PBDE dans l'atmosphère, en particulier le DBDE, sont en constante augmentation. Ils dépasseraient même de 40 fois les niveaux actuels en PCB (Law *et al.*, 2006). Cette augmentation, et particulièrement celle du DBDE, serait due à la seule utilisation du deca-mix comme formule commerciale en Europe depuis 2004.

Les niveaux résiduels de RFB les plus importants ont été détectés dans l'air ambiant des usines de démantèlement de produits ignifugés. En moyenne, les niveaux mesurés en PBDE représentent dans ce cas plus de 40 ng/m³, le DBDE étant le congénère majoritaire (90 %); ceux du TBBPA s'élèvent à 29,9 ng/m³ dans la même étude, ce résultat étant le seul publié à ce jour concernant ce RFB pour les niveaux de contamination aérienne (Sjodin *et al.*, 2001).

1.2. Le milieu aquatique

1.2.1. Contamination de l'hydrosphère

Très peu de données existent concernant les niveaux des RFB dans l'eau. La présence de PBDE a été détectée dans l'eau de rivières (Pays Bas) et dans les effluents des stations d'épuration (de Wit, 2002; de Boer *et al.*, 2003; Watanabe et Sakai, 2003). Les concentrations étaient très faibles (< 1 µg/L), mais elles semblent augmenter ces dernières années (Hale *et al.*, 2003). Le DBDE et le TBBPA ont été retrouvés associés aux particules en suspension dans les eaux de déchets industrielles, et dans les effluents de stations d'épuration. Les concentrations maximales du DBDE s'élevaient respectivement à 45 et 920 ng/g, et celles du

TBBPA à 320 et 63 ng/g de matière sèche (de Boer *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2004). En raison de leur caractère très hydrophobe, ces composés sont préférentiellement retrouvés dans les sédiments aquatiques.

1.2.2. Contamination des sédiments

Comme pour les autres compartiments environnementaux, la contamination des sédiments par les retardateurs de flammes bromés est fonction de la distance par rapport à la source de contamination. Dans le cas des sédiments, elle est également dépendante de la teneur en matière organique (Allchin *et al.*, 1999; Hale *et al.*, 2003). Près des sources de pollution et des zones urbaines, on observe généralement une contamination majoritaire par les congénères les plus bromés (octa- à nonaBDE). Au contraire, l'analyse des sédiments distants de ces sources confirme le déplacement des congénères de faible poids moléculaire (Hale *et al.*, 2006). Le DBDE, plus hydrophobe que ses congénères moins bromés, est fortement lié aux particules présentes dans les sédiments et sa mobilité s'en trouverait réduite (Watanabe *et al.*, 1986). Généralement, la nature des PBDE identifiés dans les sédiments indique la présence d'un site de fabrication ou d'utilisation des PBDE commerciaux à proximité des lieux de prélèvements (Covaci *et al.*, 2005). Cependant, en général, quelles que soient les rivières étudiées, le DBDE reste le congénère majoritairement présent dans les sédiments, avec des concentrations détectées en constante augmentation (de Wit *et al.*, 2006). Les autres congénères habituellement détectés sont le BDE-47, 85, 99, 100, 153, 154, 183. Le BDE-183 est le principal PBDE constitutif de l'octa-mix, les autres étant des congénères constitutifs du penta-mix. Malgré l'éloignement des sources de pollution, les sédiments marins sont eux aussi contaminés par les PBDE. Les niveaux mesurés y sont plus élevés (concentrations s'élevant jusqu'à 132 ng/g de poids sec) que ceux relevés dans les sédiments d'eau douce localisés dans les mêmes régions (concentrations maximales: 40 ng/g de poids sec) (Eljarrat et Barcelo, 2002; de Wit *et al.*, 2006). Une équipe espagnole a démontré la présence majoritaire du DBDE dans les sédiments marins. Des nona et octaBDE ont également pu être identifiés, laissant supposer une possible dégradation du DBDE dans ces sédiments (Eljarrat et Barcelo, 2004).

Comme pour les PBDE, des niveaux significatifs de TBBPA ont été détectés dans les sédiments marins et d'eau douce. Ces niveaux sont plus faibles que ceux des PBDE. Les plus fortes concentrations en TBBPA détectées (9800 ng/g de poids sec), se trouvaient dans les sédiments d'une rivière située à proximité d'une usine de production de RFB (Morris *et al.*, 2004). Le TBBPA a été également détecté dans des sédiments provenant des Pays Bas, de

Norvège (Schlabach *et al.*, 2004), et dans des sédiments marins de l'océan Arctique (de Wit *et al.*, 2006). Les concentrations maximales dans ces prélèvements s'élèvent respectivement, à 1,3 ng/g, 0,13 ng/g et 1,4 ng/g de poids sec.

1.2.3. Contamination des espèces aquatiques

Les niveaux de RFB retrouvés chez les organismes aquatiques semblent être en parfaite adéquation avec les concentrations retrouvées dans leur environnement. Ainsi, c'est pour les organismes se trouvant dans les zones les plus urbanisées que les concentrations tissulaires sont les plus élevées. Inversement, plus on s'éloigne des sources de contamination, plus ces niveaux sont bas. Il est toutefois important de noter que des niveaux significatifs de RFB ont été mesurés même chez des poissons vivant dans des endroits éloignés de toute source de contamination (lacs de montagne, etc...), suggérant une possible exposition due au déplacement des résidus de RFB, ou à leur transport par voie aérienne et/ou par les courants marins (Law *et al.*, 2006).

1.2.3.1. Niveaux de contamination

De nombreuses études réalisées en particulier en Europe (principalement en Europe du Nord) et en Amérique du Nord répertorient les niveaux des RFB dans les organismes aquatiques. Elles portent majoritairement sur les PBDE et donnent peu d'information sur les niveaux de contamination de ces organismes par le TBBPA. Pour ce dernier, des teneurs en TBBPA de l'ordre du ng/g de matière grasse (MG) ont été détectées chez des poissons pêchés en mer du Nord et dans les rivières belges. Des niveaux nettement supérieurs (200 ng/g MG) ont été mesurés pour certains échantillons d'étoiles de mer prélevés en Grande Bretagne (Morris *et al.*, 2004; Verslycke *et al.*, 2005).

La mer Baltique et la région des Grands lacs sont les biotopes les plus contaminés par les PBDE. Logiquement, les niveaux résiduels retrouvés chez les poissons y sont donc également importants, en particulier pour ce qui concerne les congénères de faible poids moléculaire. Les niveaux moyens en PBDE sont supérieurs à 100 ng/g MG. Des valeurs allant jusqu'à 45 µg/g MG ont été mesurées chez la truite (*Salmo trutta*) pêchée dans un lac norvégien (Mariussen *et al.*, 2003). Les teneurs en DBDE chez les poissons aussi bien d'eau douce que marins sont de l'ordre du ng/g MG (Law *et al.*, 2006). Les niveaux de DBDE les plus élevés ont été mesurés chez des gardons (*Rutilus rutilus*) pêchés dans la mer Baltique dont les muscles contenaient près de 50 ng/g MG (Burreau *et al.*, 2004).

De la même manière, les mollusques et les crustacés sont principalement contaminés par les congénères de faible poids moléculaire (tri- à heptaBDE). En Europe, la zone la plus étudiée concernant la contamination des moules et des crevettes est l'estuaire de l'Escaut, entre la Belgique et les Pays Bas. Les niveaux rapportés dans ces échantillons s'élèvent jusqu'à 3500 ng/g MG pour les congénères de tri- à heptaBDE, et jusqu'à 600 ng/g MG pour le DBDE (Verslycke *et al.*, 2005).

1.2.3.2. Biotransformation

Des études de métabolisme du DBDE (administré par voie orale, mélangé à l'aliment) ont été réalisées chez le poisson (carpe et truite) *in vivo*, mettant en évidence la formation de métabolites issus de la débromation du DBDE, sous la forme de plusieurs congénères de PBDE (Kierkegaard *et al.*, 1999; Stapleton *et al.*, 2004). Ces résultats ont été récemment confirmés par des études *in vitro* sur microsomes de foie de poisson (carpe et truite), montrant que cette débromation du DBDE pouvait avoir lieu dans le foie (Stapleton *et al.*, 2006a). De plus, il est important de mentionner que plusieurs équipes ont identifié des PBDE méthoxylés et hydroxylés dans les tissus de poissons, ceux-ci pouvant provenir du métabolisme des PBDE dans ces organismes (Haglund *et al.*, 1997; Valters *et al.*, 2005).

1.2.4. Cas particulier des mammifères marins

Les concentrations en PBDE chez les mammifères marins sont en général plus élevées que celles mesurées chez les poissons. La contamination de ces animaux, situés au sommet de la chaîne trophique, peut, comme celle des poissons carnivores, non seulement provenir de l'exposition aux RFB présents dans l'environnement mais également de l'ingestion de proies préalablement contaminées.

Une seule étude a mis en évidence la présence de DBDE chez les mammifères marins, les concentrations mesurées étant inférieures à 10 ng/g et 3 ng/g (de poids frais), respectivement dans la graisse de phoques (*Phoca vitulina*) et le foie de cachalots (*Physeter catodon*) (de Boer *et al.*, 1998). Ce dernier résultat est très intéressant, puisque ce cétacé se nourrit de calamars vivant à une profondeur de plusieurs milliers de mètres. Il suggère donc que les fonds marins sont également contaminés par ce RFB. Les autres études font état de niveaux de PBDE de faible poids moléculaire (du tétra- aux hexaBDE) de l'ordre du µg/g mesurés en particulier dans la graisse de ces mammifères (Lindstrom *et al.*, 1999; Law *et al.*, 2003). Une étude a montré que les taux en PBDE étaient plus élevés chez les baleineaux que chez les adultes, suggérant un éventuel transfert de ces polluants organiques de la mère à la

descendance par la lactation. En effet, la contamination des jeunes femelles est nettement supérieure à celle des femelles adultes alors que ce phénomène n'est pas clairement observé chez le mâle (Lindstrom *et al.*, 1999; Van Bavel *et al.*, 1999).

Comme souvent, peu de recherches ont été effectuées sur le TBBPA. Néanmoins, une étude a fait état de niveaux s'élevant en moyenne à 83 ng/g MG dans la graisse de marsouins (*Phocoena phocoena*) capturés dans la mer du Nord à l'Est de la Grande Bretagne (Morris *et al.*, 2004).

1.3. Le milieu terrestre

1.3.1. Contamination des oiseaux

Alors que les congénères faiblement bromés sont détectés chez tous les oiseaux, certaines espèces terrestres comme le faucon (*Falco peregrinus*) sont contaminées par plusieurs congénères de haut poids moléculaire (heptaBDE à DBDE) (Law *et al.*, 2003). La spécificité des congénères retrouvés dans les tissus des oiseaux est probablement en lien avec leur alimentation. La contamination des oiseaux marins est dominée par un tétraBDE (BDE-47), ces oiseaux se nourrissant de poissons contenant essentiellement ce congénère dans leurs tissus (Elliott *et al.*, 2005), alors que celle des oiseaux terrestres est dominée par les pentaBDE et hexaBDE, avec souvent la détection de niveaux élevés pour les congénères fortement bromés tels que l'heptaBDE (BDE-183) et le DBDE (Herzke *et al.*, 2005). Des profils de congénères identiques ont été détectés dans les œufs de ces oiseaux, les niveaux allant de 53 ng/g MG à 4500 ng/g MG (somme des PBDE recherchés) (Lindberg *et al.*, 2004; Verreault *et al.*, 2004). La présence de DBDE a également été démontrée dans le plasma (202-1055 ng/g MG) et les œufs (23-52 ng/g MG) chez les mouettes (*Larus hyperboreus*) capturées sur l'« île aux ours » (île située entre le Groenland et les îles Féroé), représentant 30 % de la somme des PBDE recherchés (Verreault *et al.*, 2004). Ces niveaux restent inférieurs à ceux mesurés dans les œufs de faucon capturés en Suède (28-430 ng/g MG) (Sellström *et al.*, 2001; Law *et al.*, 2003). Les résultats établis pour les oiseaux terrestres montrent clairement des concentrations en DBDE supérieures à celles trouvées chez les oiseaux marins, justifiant l'hypothèse du rôle de l'eau en tant que barrière dans le transfert du DBDE aux organismes aquatiques (Law *et al.*, 2006).

Une étude est disponible pour le TBBPA, faisant état de 7 ng/g MG détectés dans le foie de cormorans (*Phalacrocorax carbo*) capturés dans l'Est de la Grande Bretagne (Morris *et al.*, 2004).

1.3.2. Contamination des mammifères

Il existe peu de données sur la contamination des mammifères terrestres par les RFB. De récentes études sur le renard (*Vulpes vulpes*) et l'ours (*Ursus arctos horribilis*) ont mis en évidence d'importants niveaux de PBDE dans les tissus de ces animaux. Dans la plupart des échantillons analysés, le DBDE est le congénère majoritairement retrouvé, les taux s'élevant jusqu'à 760 ng/g MG dans le foie des renards (Voorspoels *et al.*, 2006). Dans les tissus analysés chez l'ours, les congénères majoritaires semblent varier en fonction de la localisation et de l'alimentation de ces animaux. Le congénère dominant chez les ours de la côte Ouest Canadienne se nourrissant essentiellement de poissons est un tétraBDE (BDE-47), alors que le DBDE et les congénères de haut poids moléculaire (hepta- et octaBDE), prédominent chez les ours des forêts Canadiennes, qui ont une alimentation essentiellement végétarienne. Dans ce cas, la contamination dépend donc à la fois de l'environnement et de l'alimentation (Christensen *et al.*, 2005).

1.4. Le cas des stations d'épuration

Quelques études sont disponibles quant à la contamination des boues de station d'épuration par les RFB. Comme dans les autres compartiments environnementaux, les niveaux retrouvés dans les boues des stations d'épuration sont dépendants géographiquement des sources de pollution. Plus ces sources sont proches des sites de traitement, plus la contamination est importante. Les concentrations en RFB varient en fonction des pays. En général les niveaux observés aux Etats Unis sont largement supérieurs à ceux observés en Europe. En effet, quantitativement, l'utilisation des RFB est supérieure en Amérique du Nord. Ces pays n'ont toujours pas appliqué de restrictions par rapport à l'utilisation de certains RFB, en particulier le penta-mix et l'octa-mix, contrairement à l'Union Européenne (à l'exception récemment de l'état de Californie).

Les PBDE majoritairement retrouvés dans les boues de station d'épuration sont les principaux congénères constitutifs du penta-mix (BDE-47, 99, 100, 153, 154), ainsi que le DBDE. Ce dernier est le congénère majoritaire dans les boues, représentant dans la plupart des cas plus de 60 % de la totalité des PBDE. Les concentrations moyennes en PBDE mesurées en Europe sont de l'ordre de quelques centaines de ng/g de poids sec (250 à 850 ng/g), avec un maximum de 18 µg/g détectés en Espagne (Fabrellas *et al.*, 2004). En Amérique du Nord, les concentrations sont en moyenne de l'ordre de plusieurs µg/g de poids sec (Hale *et al.*, 2003).

Les boues de station d'épuration constituent également un des principaux réservoirs pour le TBBPA, néanmoins, les concentrations en TBBPA sont plus faibles que celles des PBDE:16 à 200 ng/g de poids sec (Law *et al.*, 2006).

2. Spécificités analytiques

Ces dernières années, plusieurs publications ont été consacrées aux niveaux environnementaux des RFB. Cependant, les travaux incluant le dosage du TBBPA et du DBDE, sont peu nombreux. Pourtant, lorsqu'ils ont été recherchés, ces RFB sont effectivement présents, avec des teneurs en DBDE mesurées dominant le plus souvent celles des congénères moins bromés, et des niveaux de contamination en TBBPA en général moins élevés que ceux constatés pour les autres RFB. Concernant les PBDE, seuls ceux considérés « majeurs » sont généralement recherchés : BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154, 183.

Le DBDE, mais aussi tous les PBDE comportant 8 atomes de brome et plus, ont longtemps été négligés pour des raisons de technique analytique. La faible solubilité du DBDE dans les solvants organiques complique la mise au point des méthodes d'extraction de ce composé à partir de différentes matrices, mais aussi le développement de techniques de spectrométrie de masse permettant de le détecter. Depuis les années 1990, plusieurs méthodes analytiques ont été développées pour analyser les PBDE. En raison de leur similitude avec les POP organochlorés, les PBDE sont couramment analysés en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cependant l'analyse des PBDE de haut poids moléculaire, et en particulier du DBDE, est connue pour être difficile. Des dégradations thermiques induites par cette technique (débromation) conduisent à sous-estimer les niveaux réels en DBDE au profit de ses homologues moins bromés. Petit à petit, l'optimisation de ces techniques et l'obtention d'une sensibilité plus importante, ont amélioré les possibilités de recherche du DBDE, et, dans les études les plus récentes, il est plus souvent recherché. Généralement, il compte alors parmi les congénères majoritaires.

Les concentrations mesurées en TBBPA se trouvent souvent en dessous des limites de détection des techniques analytiques utilisées. Ces faibles teneurs peuvent être dues, d'une part au fait que le TBBPA est un RFB « réactif », donc covalamment lié aux polymères synthétiques, qui est par conséquent moins facilement libéré dans l'environnement que les PBDE. D'autre part, une métabolisation efficace et l'élimination rapide du TBBPA par les organismes vivant pourraient expliquer les faibles concentrations de ce composé retrouvées dans les tissus (Watanabe et Sakai, 2003). Quoi qu'il en soit, le nombre de publications où le

TBBPA compte parmi les RFB mesurés est très réduit, et il est difficile d'en tirer des conclusions définitives.

3. Dégradations biotiques et abiotiques des RFB dans l'environnement

Le TBBPA et le DBDE, sont le plus souvent considérés comme faiblement bioaccumulables et peu toxiques. Cependant, il est décrit que dans l'environnement, sous l'effet de sources énergétiques extérieures (UV, chaleur), ces produits peuvent subir des transformations chimiques en formant de multiples composés (bisphénols, PBDE de poids moléculaire inférieur, furanes et dioxines bromées). La dégradation des RFB est donc un paramètre supplémentaire à prendre en compte pour la quantification de ces composés et pour l'analyse du risque associé à leur présence dans l'environnement et dans la chaîne alimentaire.

3.1. Biodégradation

La biodégradation du TBBPA a été constatée dans des sédiments en conditions anaérobies. Cette dégradation résulte d'une réduction par déhalogénéation du TBBPA par les bactéries, conduisant à la formation de BPA en quelques jours, en passant par les intermédiaires successifs tribromo-, dibromo- et monobromo-BPA, la demi vie du TBBPA dans les sédiments étant évaluée à 5 jours (Ronen et Abeliovich, 2000; Voordeckers *et al.*, 2002; Arbeli et Ronen, 2003). Dans les boues de station d'épuration, cette biodégradation semble être plus rapide (quelques heures) (Gerecke *et al.*, 2006) alors que dans certains prélèvements effectués en Israël, elle apparaît inexistante (Brenner *et al.*, 2006). Compte tenu des données disponibles, la biodégradation du TBBPA est donc dépendante du milieu et des microorganismes présents.

De la même manière, le DBDE peut être réduit par débromation par des microorganismes anaérobies. Il a été montré que la concentration en DBDE diminuait de 30 % en 238 jours dans des boues de station d'épuration prélevées en Suisse. Cette biodégradation est caractérisée par l'augmentation significative de la proportion de congénères nona-bromés, ayant respectivement un proton positionné en méta (BDE-207) ou en para (BDE-208) sur le cycle par rapport à l'oxygène central. Puis ces congénères sont à leur tour dégradés par les microorganismes pour donner des octaBDE (Gerecke *et al.*, 2005).

3.2. Photo-dégradation.

Une étude a été publiée concernant la décomposition du TBBPA en solution dans l'eau lorsqu'il est exposé aux rayons ultraviolets (UV). La photolyse induit principalement des

processus d'oxydation provoquant la cassure de la molécule en son centre conduisant à l'apparition de dibromo-phénol et de dibromo-isopropyle phénol. Un troisième produit a été identifié comme étant le dibromo-isopropyle phénol hydroxylé, l'hydroxylation étant située au niveau du groupement isopropyle. Des produits de décomposition minoritaires, résultant de la débromation du TBBPA, ont été également identifiés : le tribromo- et le dibromoBPA (Eriksson *et al.*, 2004b). Dans cette étude, il a été montré que la vitesse de dégradation diminuait avec l'acidité de l'eau. Par exemple, à pH 10, la demi-vie du TBBPA était de 16 min, alors qu'à pH 7,4 elle était de 24 min et à pH 5,5 de 350 h.

Les premiers travaux relatifs à la photo-dégradation du DBDE datent de 1987 (Watanabe et Tatsukawa). De nombreuses études ont récemment confirmé que tous les PBDE étaient sensibles aux rayons UV, et particulièrement le DBDE. La vitesse de décomposition aux UV des PBDE est proportionnelle au nombre d'atomes de brome présents sur la molécule (Bezares-Cruz *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2004a). Le DBDE étant le congénère le plus bromé, il est donc dégradé rapidement lorsqu'il est exposé à la lumière solaire. La demi-vie du DBDE est dépendante du milieu dans lequel il se trouve (Hua *et al.*, 2003; Soderstrom *et al.*, 2004). Dans les solvants organiques, elle est de quelques minutes (<15 minutes dans le toluène), mais peut atteindre quelques heures lorsque le DBDE est piégé dans des matières solides telles que le sable ou les sédiments (respectivement 15 h et 100 h) (Soderstrom *et al.*, 2004). La décomposition du DBDE aux UV consiste en plusieurs étapes de débromation successives, entraînant la formation de nonaBDE, d'octaBDE, puis d'autres congénères jusqu'aux tétraBDE. Plus le temps d'exposition aux UV est long plus la proportion en congénères faiblement bromés augmente, accompagnée à terme par la formation de polybromo-dibenzo furanes (PBDF) (Watanabe et Tatsukawa, 1987).

3.3. Thermolyse

Il a été montré que du TBBPA (monomère) pouvait être libéré lors du démantèlement et de l'incinération d'appareils électroniques, ce démantèlement étant réalisé par des processus de décomposition thermique. Les résines époxy commencent à se décomposer à 295°C. Lors de ce processus, des produits de décomposition du TBBPA sont formés: le BPA, les analogues moins bromés (monobromo-, dibromo-, et tribromoBPA), le dibromophénol, résultant d'une cassure homolytique du TBBPA, et les polybromodibenzo-*p*-dioxines (PBDD) produites par des processus radicalaires induits à ces températures (Luda *et al.*, 2002; Hornung *et al.*, 2003).

Une des voies de contamination de l'environnement par les PBDE est l'évacuation des déchets domestiques et industriels dans les décharges, suivie de leur incinération (Rahman *et al.*, 2001). A de hautes températures (300°C), les plastiques contenant des retardateurs de flammes et en particulier ceux contenant des PBDE sont dégradés, libérant en grande quantité des polybromo-dibenzo-dioxines (PBDD) et des polybromo-dibenzo-furanes (PBDF) (Fig. 4) (Tohka et Zevenhoven, 2002). Outre la formation de dioxines et furanes, le DBDE peut, sous l'action de la chaleur comme sous celle des UV, être réduit et perdre des atomes de brome pour former des congénères moins bromés (Sakai *et al.*, 2001). Tous ces produits sont donc susceptibles d'être formés lors d'incendies domestiques. Par exemple, Ebert et Bahadir (2003) ont montré que les concentrations moyennes de PBDD et PBDF retrouvées dans les débris d'incendies de résidence privées sont comprises entre 1 et 50 ng/g. Les dioxines sont classées par l'OMS parmi les substances cancérigènes, et il a été observé qu'une exposition prolongée aux dioxines entraînait une atteinte du système immunitaire, une perturbation du développement du système nerveux, des troubles des régulations endocriniennes et en particulier de la fonction de reproduction (Mukerjee, 1998).

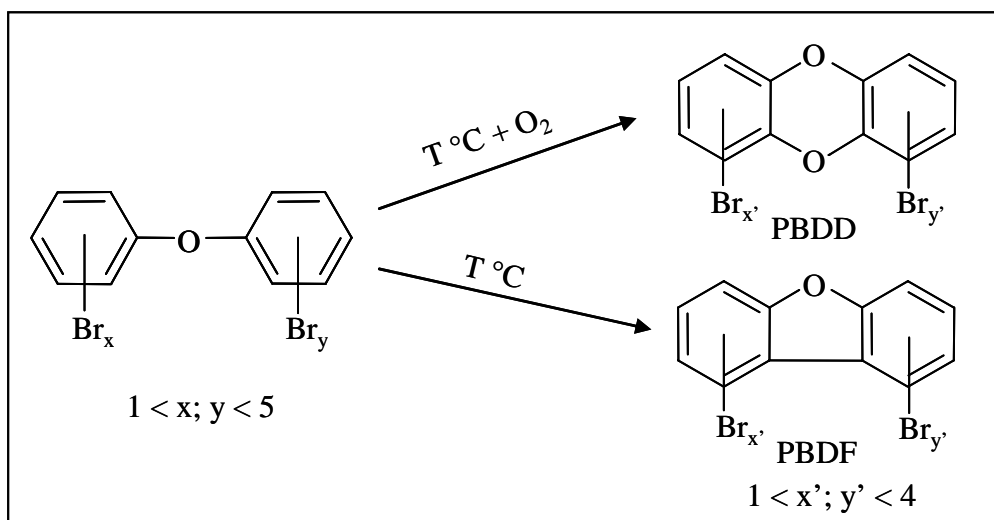


Fig. 4. Formation des PBDD et PPDF à partir des PBDE (Tohka et Zevenhoven, 2002)

4. Conclusions

Des niveaux de contamination en RFB ont été mesurés dans tous les compartiments environnementaux, leur valeur étant dépendante de la proximité avec les sources de pollution (zones urbanisées ou industries produisant et utilisant ces composés). Cependant la présence de RFB y compris dans des endroits éloignés de toute source de pollution (lacs de montagne, Arctique), suggère un transport sur de longues distances de tous ces composés, par les voies

aériennes et les courants marins. Compte tenu de leurs propriétés physico-chimiques (hydrophobicité et poids moléculaire élevé) les niveaux de RFB sont limités dans l'eau et l'air, mais sont plus élevés dans les sédiments et les boues de stations d'épuration, notamment pour ce qui est du DBDE et du TBBPA.

Dans les organismes vivants, les concentrations les plus importantes ont été mesurées chez les animaux se situant au sommet de la chaîne trophique, l'exposition des animaux aux RFB étant largement dominée par la voie alimentaire. En ce qui concerne les PBDE, le profil des congénères détectés est différent entre espèces aquatiques et espèces terrestres. Le BDE-47 (tétraBDE) est le congénère majoritairement détecté chez les espèces aquatiques, alors que chez les animaux terrestres, les BDE-153 et -154 (hexa-BDE) dominent, avec des proportions de DBDE en constante augmentation ces dernières années.

Les propriétés physico-chimiques du DBDE ont longtemps compliqué l'analyse et l'étude de ce composé. Mais quand il est recherché, ce qui est de plus en plus fréquent, il est souvent détecté comme étant le contaminant majoritaire. Les concentrations en TBBPA sont en général plus faibles que celles des PBDE. Selon toute probabilité, son incorporation par liaisons covalentes dans les matériaux ignifugés réduit considérablement sa libération dans l'environnement, contrairement aux PBDE. Néanmoins son dosage n'est pas systématique, et comme pour le DBDE, il pourrait avoir été sous-estimé. Ces deux RFB ne sont pas toujours recherchés et ont également tendance à se dégrader facilement lorsqu'ils sont exposés à la lumière du soleil, ou à de fortes températures. Ils peuvent être également biodégradés par des microorganismes présents dans les sédiments. Ces phénomènes de dégradation des RFB, ayant lieu dans l'environnement, diminuent d'autant l'estimation des niveaux réellement présents dans les différents compartiments analysés.

III. NIVEAUX DE CONTAMINATION HUMAINE

1. Données disponibles

Les matrices humaines les plus couramment analysées sont le tissu adipeux, le sang et le lait maternel. La recherche d'une possible exposition aux RFB *in utero*, a également motivé l'étude de matrices telles que le sang du cordon ombilical, le placenta et très récemment le foie de fœtus humain. Comme pour les études réalisées chez l'animal, les niveaux résiduels en TBBPA mesurés dans les tissus humains sont plus faibles que ceux des PBDE. Pour les

PBDE, les niveaux observés chez les personnes vivant en Amérique du Nord sont largement supérieurs à ceux détectés chez les Européens (Inoue *et al.*, 2006), avec également des profils de congénères différents. En effet, les principaux congénères détectés chez les Nord Américains sont les PBDE faiblement bromés, BDE-47 et BDE-99, alors que le DBDE est le congénère dominant chez les Européens (Covaci et Voorspoels, 2005; Schechter *et al.*, 2005). Il est couramment considéré que la contamination des tissus humains par les RFB est dominée par la présence d'un tétraBDE, le BDE-47, et dans une moindre mesure de deux pentaBDE (BDE-99 et BDE-100) et de deux hexaBDE (BDE-153 et BDE-154). Ces cinq PBDE sont effectivement des contaminants majeurs. Cependant, les difficultés liées à l'analyse des congénères les plus lourds (octaBDE au DBDE) font que très peu d'anciennes études ont pris en compte ces congénères dans les matrices biologiques humaines. Il s'avère aujourd'hui que les niveaux de ces composés de haut poids moléculaire sont loin d'être négligeables et qu'en particulier le DBDE est bien souvent le PBDE dominant dans ces matrices. Il est difficile, pour des raisons développées ci-dessus, d'estimer si les niveaux de DBDE sont en augmentation chez l'Homme. Cela pourrait être le cas, puisque depuis quelques années plus de 80 % des PBDE sont utilisés sous forme de deca-mix au détriment des autres formulations commerciales.

Les concentrations moyennes en PBDE totaux mesurées chez les Européens sont de 20 ng/g MG et 5 ng/g MG respectivement dans le plasma et le tissu adipeux (Covaci *et al.*, 2002). Les congénères majoritaires respectifs sont le DBDE (représentant près de la moitié de la concentration totale de PBDE) et le BDE-47 (Covaci et Voorspoels, 2005; Thomsen *et al.*, 2005). En Amérique du Nord les concentrations respectives sont en moyenne de 60 ng/g et de 25 ng/g MG, le BDE-47 étant le congénère dominant (Schechter *et al.*, 2005). De la même manière, les niveaux dans le lait maternel sont largement plus importants chez les femmes Nord Américaines (75 ng/g MG) que chez les Européennes (2 ng/g MG) (Schechter *et al.*, 2003). Une étude a rapporté que les niveaux de PBDE mesurés dans le sang maternel et dans le sang du cordon ombilical étaient du même ordre (Mazdai *et al.*, 2003). De plus, des concentrations comprises entre 1 et 4.4 ng/g MG ont été détectées dans les placentas humains (Strandman *et al.*, 2000), suggérant le passage de la barrière placentaire par ces polluants organiques. Ces résultats ont été récemment confirmés par la mise en évidence de PBDE (tétraBDE au DBDE) dans les foies de fœtus humains, avec des niveaux voisins de 15 ng/g MG et allant jusqu'à 100 ng/g MG dans un échantillon (Schechter *et al.*, 2006). Il faut noter que non seulement les PBDE sont retrouvés dans les matrices biologiques humaines mais que

la présence de métabolites hydroxylés a également récemment été mise en évidence par une équipe suédoise, dans le sang d'adolescents (Bergman *et al.*, 2006).

Les niveaux de TBBPA dans les matrices biologiques humaines sont beaucoup plus faibles que ceux observés pour les PBDE. Les niveaux de contamination en TBBPA du sérum humain sont de l'ordre de 100 pg/g MG pour les Norvégiens (Thomsen *et al.*, 2001a; Thomsen *et al.*, 2005). L'étude française en cours à ce sujet (Cariou *et al.*, 2005) a montré qu'en plus d'être présent dans le plasma sanguin, le TBBPA est aussi détecté à environ 180 pg/g MG dans le lait maternel (Antignac *et al.*, 2006). Il n'a, en revanche, jamais été mis en évidence dans le tissu adipeux chez l'Homme.

La variation des niveaux résiduels de RFB chez l'Homme en fonction de l'âge a été constatée. Une étude Norvégienne a montré que la contamination du sérum humain était dépendante de l'âge de la personne, ainsi les enfants de 0 à 4 ans présentent les concentrations en PBDE les plus élevées, et celles-ci diminuent avec l'âge de l'individu, à l'exception des niveaux en DBDE qui restent équivalents tout au long de la vie. Au contraire, les concentrations tissulaires en TBBPA sont apparues plus élevées chez les personnes de plus de 60 ans (Thomsen *et al.*, 2005). Le sexe ne paraît pas être un facteur de variation, mais généralement les femmes présentent des taux inférieurs à ceux des hommes (Thomsen *et al.*, 2002). Ce phénomène est attribué à la grossesse et surtout à l'allaitement. En effet, la mobilisation importante des lipides au cours de l'allaitement conduit à une diminution sensible des teneurs observées chez la mère.

2. Voies d'expositions

2.1. Exposition par voie alimentaire

De manière générale, la présence de RFB dans les tissus humains est principalement attribuée à une exposition par voie alimentaire. Ainsi, dans les pays Scandinaves, les niveaux des PBDE mesurés dans le sang humain ont pu être corrélés à la fréquence des repas incluant du poisson gras provenant de la mer Baltique (Sjodin *et al.*, 2000). Le poisson est le principal réservoir alimentaire de PBDE suivi par la viande et les produits laitiers, les congénères principalement détectés étant les BDE-47, 99 et 100. Toutefois, concernant la contamination des denrées alimentaires comme celle de l'environnement, il faut signaler que peu de travaux ont inclus le dosage de composés tels que le DBDE. Les publications les plus récentes, comme celle de Schecter *et al.* (2004), montrent que le DBDE est le PBDE majoritaire

retrouvé dans certains poissons et fromages, ainsi que dans certaines viandes et abats (foie de veau). Les niveaux de contamination des aliments en PBDE pourraient diminuer au cours de la cuisson (Schechter *et al.*, 2006). De nombreuses études ont essayé de définir quelle était l'exposition journalière aux PBDE par l'alimentation. Chez l'adulte (hommes et femmes confondus), cette exposition quotidienne serait de l'ordre de 1ng/kg/jour, correspondant approximativement à 70 ng de PBDE ingérés par jour (Domingo, 2004). L'exposition journalière chez les nourrissons allaités par la mère est bien plus élevée (300 ng/kg/jour) et celle des enfants a été évaluée à 2,5 ng/kg/jour (Schechter *et al.*, 2006).

2.2. Inhalation/ingestion de poussières ménagères

Selon de récentes études, l'inhalation et l'ingestion de poussières ménagères, jusque là négligées, semblent de plus en plus être considérées comme des voies majeures d'exposition aux RFB, ces derniers étant adsorbés sur les particules de poussières. La présence de PBDE dans les poussières peut être due aussi bien à une contamination aérienne qu'à leur utilisation dans les textiles d'habillement ou d'ameublement (rideaux, coussins, moquettes). Les concentrations en PBDE dans les intérieurs de maison peuvent s'élever à plus de 10 ng/g (4 ng/g de poids sec en moyenne), ces concentrations étant largement dominées par le DBDE (Stapleton *et al.*, 2006b), qui peut représenter jusqu'à 95 % de la totalité des PBDE présents (Pless-Mulloli *et al.*, 2006). L'inhalation de ces composés représenterait moins de 4 % de l'exposition quotidienne, compte tenu de la faible volatilité de ces composés (Wilford *et al.*, 2005). En revanche, selon une étude américaine, l'exposition quotidienne au seul DBDE par ingestion de poussière chez l'adulte aux Etats Unis, a été évaluée comme étant comprise entre 180 et 1750 ng/jour (Stapleton *et al.*, 2005).

Une étude a intégré les données disponibles pour différentes source d'exposition (alimentaire, par ingestion et par inhalation de poussières) des tétraBDE aux hexaBDE (le DBDE étant donc exclu) par tranche d'âge. Les expositions moyennes quotidiennes ont été évaluées entre 155 ng/jour pour les adultes et environ 2 µg/jour pour les nourrissons allaités. Pour ces derniers, 90 % de la contamination proviennent de l'alimentation, alors que pour les adultes la principale contamination proviendrait de l'ingestion de poussières. Comme pour la voie alimentaire, les jeunes enfants (de 6 mois à 4 ans) ingèreraient plus de PBDE par les poussières que les adultes, la contamination pouvant atteindre dans les cas extrêmes 20 µg/jour (Jones-Otazo *et al.*, 2005).

2.3. Exposition professionnelle

L'exposition sur le lieu de travail influe aussi sur les niveaux de PBDE retrouvés chez l'Homme, en raison principalement des concentrations importantes en RFB se trouvant dans l'air. Les taux de contamination mesurés dans le sang du personnel d'une usine de démantèlement d'appareils ignifugés, sont apparus être 10 fois supérieurs à ceux détectés dans le sang de personnels hospitaliers (Sjodin *et al.*, 1999). Le profil de congénères observé chez ces personnes fortement contaminées était majoritairement dominé par les PBDE de haut poids moléculaire, notamment le DBDE, alors que le BDE-47 prédominait chez les autres personnes. Les concentrations moyennes mesurées dans le sang de ces personnes, s'élevant respectivement, à plus de 30 ng/g et 3 ng/g MG (Thuresson *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été également constatés pour le TBBPA, pour lequel des concentrations maximales de 200 pg/g MG ont été mesurées dans le sang de personnes soumises à une exposition professionnelle importante (Thomsen *et al.*, 2001b).

3. Conclusions

Comme les autres organismes vivants, l'Homme est quotidiennement exposé aux RFB et les niveaux mesurés dans différentes matrices sont relativement élevés. Les concentrations mesurées pour le TBBPA sont généralement plus faibles que celles des PBDE chez l'Homme. Cependant le nombre d'études concernant la présence en TBBPA chez l'Homme est faible, et chaque fois qu'il est recherché, ce RFB est détecté. Pour l'Homme, l'alimentation serait la principale voie d'exposition aux PBDE, mais au regard de récentes publications, l'ingestion/inhalation de poussières est aussi à prendre en considération. Il est actuellement très difficile d'estimer la portée des quelques résultats qui ont été publiés à ce sujet, et donc d'évaluer l'importance relative de cette source de contamination par rapport aux apports alimentaires, d'autant que les niveaux résiduels de PBDE sont beaucoup plus élevés en Amérique du nord qu'en Europe, et seules des données américaines sont actuellement disponibles.

IV. DONNEES METABOLIQUES

1. Le TBBPA

1.1. Absorption/élimination

Les premières données pour le TBBPA ont été établies chez le rat. Après administration, par voie orale dans de l'huile d'arachide, d'une dose unique (6,5-7,5 mg/kg) de TBBPA marqué au ^{14}C , il a été fait état d'une très faible absorption de cette molécule au niveau du tractus gastro-intestinal, avec une élimination majoritairement fécale, (95 %, contre 1,1 % de la radioactivité retrouvée dans les urines 72 h après exposition, WHO 1995). Des données plus récentes démontrent que la biodisponibilité du TBBPA par voie orale est bien supérieure. Plus de 70 % de la dose administrée par voie orale sont excrétés par la bile 72 h après administration de [^{14}C]-TBBPA chez des rats dont le canal cholédoque a été canulé (Hakk *et al.*, 2000). Dans la même étude, chez des rats non canulés, il a été montré que l'excrétion du TBBPA est majoritairement fécale, (92 % de la dose administrée en 72 h), alors que l'excrétion urinaire est mineure (0,5 % de cette dose). Le TBBPA est rapidement éliminé chez le rat, sa demi-vie plasmatique étant estimée à 13 h (Schauer *et al.*, 2006).

1.2. Distribution

Chez le rat, les quelques données disponibles concernant le TBBPA indiquent que les niveaux résiduels détectés dans les tissus sont très faibles. D'après Hakk *et al.* (2000), suite à l'administration d'une dose unique (2 mg/kg) de TBBPA *per os*, 0,06 % de la dose sont retrouvés dans le foie trois jours après l'administration, les niveaux dans le tissu adipeux étant très faibles voire indétectables.

1.3. Biotransformations

La majorité des métabolites qui ont été mis en évidence chez le rat correspondent à des conjugués glucuronides et sulfates du TBBPA (Hakk *et al.*, 2000; Szymanska *et al.*, 2001). Chez les rats canulés, toute la radioactivité mesurée dans la bile (*ca.* 72 %) est présente sous la forme de conjugués, 3 jours après l'administration d'une dose unique de [^{14}C]-TBBPA. Cependant dans les fèces, la radioactivité détectée est attribuable à du TBBPA inchangé, en relation probable avec une déconjugaison des métabolites par la flore intestinale. Ces résultats ont permis de démontrer que le TBBPA est facilement absorbé chez le rat, métabolisé dans le

foie, et excrété par la bile dans l'intestin où aura lieu la déconjugaison des métabolites (Hakk *et al.*, 2000).

Suite à l'administration de TBBPA à forte dose (250 et 300 mg/kg p.c.) chez le rat, deux études ont récemment fait état de la présence d'un métabolite minoritaire issu de la débromation du TBBPA, le tribromobisphénol A, dans le plasma, et de celle du conjugué glucuronide correspondant (Szymanska *et al.*, 2001; Schauer *et al.*, 2006). Dans les deux cas, les auteurs ont suggéré que cette réduction du TBBPA était une biotransformation due à la microflore intestinale.

Récemment une équipe a mis en évidence la présence de conjugué glucuronide dans le plasma humain, les niveaux s'élevant à 16 nmol/L (*ca.* 11 ng/g) entre 2 h et 6 h après exposition des sujets à 0,1 mg/kg p.c. de TBBPA par voie orale (Schauer *et al.*, 2006). Ce même métabolite a été détecté dans les urines 63 h après l'exposition, le TBBPA inchangé n'étant retrouvé dans aucun des échantillons analysés. Ces résultats démontrent que le TBBPA peut être métabolisé chez l'Homme.

2. DBDE et autres PBDE

2.1. Absorption/élimination

Les premières études délivrant des informations sur l'absorption du DBDE ont été réalisées chez le rat après administration par voie orale (1 à 5000 mg/kg) d'une molécule marquée au ¹⁴C. Elles ont conclu à une absorption mineure du DBDE (Norris *et al.*, 1975; El Dareer *et al.*, 1987), insistant sur la faible biodisponibilité de ce composé. La majorité de la radioactivité (99 %) était retrouvée dans les fèces, 72 h après l'administration. Les autres données disponibles dans ce domaine sont beaucoup plus récentes, et démontrent clairement que la biodisponibilité du DBDE, administré par voie orale (1,9 ou 2,8 mg/kg) à des rats, avait été sous-estimée. Ces deux études permettent de conclure respectivement à une absorption minimale de 26 et 10 % (Mörck *et al.*, 2003; Sandholm *et al.*, 2003). L'élimination du DBDE est relativement rapide chez le rat. Sa demi-vie, après administration par voie intra-veineuse, a été évaluée à 58 h (Sandholm *et al.*, 2003). Chez l'Homme, elle serait de l'ordre de 15 jours (Thuresson *et al.*, 2006).

Concernant les autres PBDE, les données disponibles permettent de conclure à une absorption supérieure à celle du DBDE suite à une administration *per os*. L'absorption des PBDE semble être en relation inverse avec le nombre d'atomes de brome présents sur la molécule. L'élimination de ces composés est, comme pour le DBDE, majoritairement fécale chez le rat.

Cependant chez la souris, l'excrétion n'est pas limitée à la voie fécale, puisqu'un tiers de la dose est retrouvé dans l'urine 5 jours après exposition, contre moins de 1 % chez le rat (Orn et Klasson-Wehler, 1998; Staskal *et al.*, 2006). Les PBDE peuvent également être excrétés dans le lait maternel chez l'animal lors de l'allaitement. En effet, chez la souris allaitante, l'injection d'un mélange de pentaBDE (BDE-99 et -100) est suivie d'un passage élevé de la radioactivité administrée dans le lait, et du transfert de 20 % de la dose à l'ensemble de la portée (Darnerud et Risberg, 2006). Chez le rat, l'induction d'enzymes hépatiques et la diminution du taux de T4 chez le fœtus suggèrent indirectement un passage transplacentaire lors de l'exposition des mères à un mélange commercial, le penta-mix (Zhou *et al.*, 2002).

2.2. Distribution

Soixante douze heures après l'administration d'une dose unique de DBDE *per os* chez le rat, les niveaux résiduels les plus élevés sont mesurés dans le foie (0,5 ppm), mais aussi dans les glandes surrénales (1,2 ppm) (Mörck *et al.*, 2003). Contrairement à ce qui est constaté pour le DBDE, le tissu adipeux apparaît être un site de stockage important pour les congénères moins bromés, tels que le BDE-99 et le BDE-47 (Hakk *et al.*, 2002; Staskal *et al.*, 2006). Toutefois ces études ne permettent pas de savoir sous quelle forme sont retenus les résidus de ces PBDE. Chez le rat, après une administration unique de tétraBDE (BDE-47) et de pentaBDE (BDE-100) par voie orale, les résidus tissulaires représentaient respectivement 80 % (3 jours après administration), 70 % (5 jours après administration) de la dose totale administrée (Hakk *et al.*, 2006; Huwe *et al.*, 2002; Orn et Klasson-Wehler, 1998), suggérant une bioaccumulation plus importante pour les PBDE comportant le moins d'atomes de brome sur les cycles.

Chez des souriceaux de 3 et 10 jours ayant reçu une dose unique de [¹⁴C]-DBDE par voie orale (respectivement 2,2 ou 20,1 mg/kg et 1,3; 13,4 ou 20,1 mg/kg), Viberg *et al.* (2003) ont suggéré qu'une partie de la radioactivité (0,5 %) était localisée dans le cerveau, avec une augmentation de la radioactivité détectée 7 jours après exposition (1 %).

2.3. Biotransformations

Chez le rat (Sprague Dawley), suite à l'administration d'une dose unique de [¹⁴C]-DBDE *per os*, les métabolites ayant été mis en évidence dans les fèces, le plasma et le foie, sont des métabolites hydroxylés et/ou méthoxylés issus de processus d'oxydation du DBDE, ainsi que des métabolites issus de la débromation du DBDE (nonaBDE jusqu'aux hexaBDE). Les structures et la quantification des métabolites n'ont pu être formellement établies. Pour Mörck

et al. (2003), parmi les résidus excrétés dans les fèces 3 jours après exposition, 65 % de la dose unique administrée *per os* étaient retrouvés sous forme de métabolites. L'étude d'El Dareer *et al.* (1987), avait déjà suggéré que la proportion de métabolites du DBDE était comprise entre 1 et 28 % dans les fèces. Ces auteurs supposaient une implication possible de biotransformations d'origine bactérienne, notamment pour ce qui est du processus de débromation. Cependant la mise en évidence de voies de métabolisation oxydatives irait davantage dans le sens d'une métabolisation par les enzymes hépatiques. La présence plasmatique de métabolites hydroxylés a également été démontrée chez le rat après administration intra-péritonéale d'un mélange de PBDE (Malmberg *et al.*, 2005). De la même manière, des métabolites hydroxylés ont été détectés après administration de PBDE isolés (BDE-47, DBDE-99) chez le rat (Hakk *et al.*, 2002; Marsh *et al.*, 2006)

Il est important de noter qu'il a été récemment suggéré que la débromation du DBDE pouvait également avoir lieu chez l'Homme, suite à l'identification d'une forte proportion de nona- et octaBDE dans le plasma sanguin (Thuresson *et al.*, 2006). D'après les données publiées, le DBDE pourrait donc être métabolisé chez l'animal suivant des voies d'oxydation et/ou de réduction, pour donner des métabolites correspondant à des PBDE moins bromés, éventuellement sous la forme d'hydroxy-PBDE.

3. Conclusions

Les études traitant de la toxicocinétique des RFB sont encore trop peu nombreuses. Les résultats connus montrent que le TBBPA est biodisponible, mais que sa biodistribution et sa bioaccumulation sont très limitées. Ses biotransformations chez le rat et l'Homme résulteraient essentiellement de voies de conjugaison. Concernant les PBDE, les études réalisées concernent un nombre limité de congénères, souvent étudiés en mélange. Elles mettent en évidence une biodisponibilité variable selon le degré de bromation, une tendance à la rétention dans le tissu adipeux pour les composés les moins bromés, et des niveaux résiduels non négligeables pour le DBDE dans le foie et les surrénales chez le rat. Ces études font également état de la présence de métabolites hydroxylés et méthoxylés, dont la structure exacte et la présence dans les différents tissus n'a pas pu être déterminée avec précision. La réduction du DBDE en PBDE de poids moléculaire moins élevé, par perte d'un ou plusieurs atomes de brome, pourrait également être à l'origine de plusieurs métabolites. Compte tenu des difficultés techniques liées à l'étude de cette molécule (débromation par des voies physico-chimiques; administration de mélanges), il est impossible de conclure à ce sujet. Il est

habituellement considéré que les bactéries du tube digestif pourraient être responsables de la formation de ce type de métabolites.

V. DONNEES TOXICOLOGIQUES

1. Toxicité aigüe, subchronique et chronique

La DL₅₀ du TBBPA par voie orale est relativement élevée chez le rat comme chez la souris: 4,5-5 g/kg. Le TBBPA n'est pas un irritant cutané (WHO, 1995). Seules des études sur des expositions à court terme ont été réalisées. Chez le rat, le TBBPA n'aurait pas d'effet observé à la dose de 100 mg/kg après une exposition de 3 mois. La dose minimale sans effet nocif observé a été évaluée à 700 µg/g de poids corporel (p.c.)/jour. Au-delà, les effets observés sont une perte de poids, une baisse de l'hématocrite et une augmentation du poids de la rate.

Une exposition chronique au TBBPA par inhalation (>18 mg/L/jour pendant 2 semaines) produit chez le rat un excès de salivation, des larmoiements, et des écoulements nasaux. Une augmentation du poids de la thyroïde et des glandes surrénales a été observée chez les femelles à une concentration de 8 mg/L (WHO, 1995). Les nouveau-nés semblent être plus sensibles à l'exposition au TBBPA que les adultes. Une néphrotoxicité irréversible (lésions poly-cystiques) a été observée chez des nouveau-nés exposés par voie orale à 200 et 600 µg/g p.c. de TBBPA de 4 à 21 jours, alors que les adultes traités n'étaient pas affectés (Fukuda *et al.*, 2004).

Pour le DBDE, la DL₅₀ par voie orale chez le rat est supérieure à 5 g/kg. Celle de l'octaBDE est de 10 g/kg et celle du pentaBDE est comprise entre 0,5 et 5 g/kg (Norris *et al.*, 1975; WHO, 1994). Diverses études de 14 à 103 semaines ont été réalisées par voie orale chez les rongeurs (rats ou souris) avec le déca-mix, l'octa-mix et le penta-mix. Des effets toxiques sont observés principalement sur le foie, le rein et la thyroïde. Globalement, la toxicité de ces PBDE tendrait à décroître avec l'augmentation du nombre d'atomes de brome.

Une sensibilité plus élevée des fœtus et des nouveau-nés a été notée dans de nombreuses études réalisées chez le rongeur, avec des effets neurologiques détectés à l'âge adulte (hyperactivité, altération du comportement spontané) (Kuriyama *et al.*, 2005; Staskal *et al.*, 2006).

Il est important de noter que ces effets ont été obtenus avec des doses très élevées, sans commune mesure avec les doses auxquelles l'Homme pourrait être exposé.

2. Toxicité sur la reproduction et le développement

Les études portant sur l'évaluation des fonctions de reproduction sont très incomplètes, aucune étude spécifique n'étant disponible concernant l'embryotoxicité, la toxicité péri et post natale, ou l'impact sur les descendants (étude multi-génération). En outre, la plupart des études ont été réalisées avec des mélanges commerciaux sans aucune précision concernant la composition des mélanges de PBDE utilisés. Pour le TBBPA aucune étude n'a été rendue publique.

Une étude de fertilité chez le rat exposé pendant 60 jours avant l'accouplement, durant la gestation et pendant la lactation à 100 µg/g p.c./j de déca-mix ne montre pas d'effet sur les principaux paramètres de la reproduction, ni d'effet toxique sur la mère ou les petits (Norris *et al.*, 1975). Cependant, des travaux plus récents montrent des effets sur le développement sexuel de rats dont les mères ont été traitées avec du pentaBDE (BDE-99) par injection sous cutanée (1 ou 10 µg/g p.c./jour) au cours de la gestation (G10 à G18) (Lilienthal *et al.*, 2006). Une altération des tissus ovariens dans la génération F1 dès 60 ng/g p.c. a été observée. Des anomalies osseuses chez la génération F2 ont également été répertoriées après une administration unique de ce PBDE au 6^{ème} jour de gestation (Talsness *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont montré que les PBDE pouvaient avoir des effets sur le développement neurologique chez la souris, à la fois après administration des composés à la mère pendant la gestation ou après administration directement aux nouveau-nés. L'exposition au penta-mix par voie orale chez la souris gravide (6 µg/g p.c./ jour à partir du 6^{ème} jour de gestation) a induit une réduction du nombre de nouveau-nés (Branchi *et al.*, 2003). L'exposition aux PBDE de souriceaux (mélange ou molécule isolée, BDE-99, -153, -183, -203, -206, et DBDE) causerait chez l'adulte une altération irréversible du comportement spontané se traduisant par une hyperactivité et une altération des fonctions d'apprentissage et de la mémoire (Viberg *et al.*, 2004; Viberg *et al.*, 2006). De plus, une étude récente a également montré que le penta-mix avait un potentiel neurotoxique sur les cellules du cerebellum chez le rat *in vitro* (Reistad *et al.*, 2006). Ces résultats sont encore l'objet de controverses, les études ayant été menées uniquement chez la souris, et les résultats étant difficilement transposables à l'Homme.

3. Etudes des fonctions endocrines

De nombreuses perturbations des fonctions endocrines pourraient être attribuées aux RFB, en particulier pour ce qui est de l'axe thyroïdien et des hormones stéroïdiennes.

Il a été montré que le TBBPA, en raison de sa ressemblance structurale avec les hormones thyroïdiennes (notamment la tétraïodothyronine, T4), était un puissant compétiteur de la T4 par rapport à la liaison à une protéine de transport des hormones thyroïdiennes : la transthyrétine humaine, TTR, *in vitro* (la liaison à cette protéine étant 10 fois plus forte que pour le ligand naturel) (Meerts *et al.*, 2000). Ces auteurs ont montré que cette compétition est dépendante non seulement de l'halogène présent sur la molécule, les composés bromés ayant plus d'effet que leurs analogues chlorés, mais aussi du nombre d'atomes de brome présents (plus il y a de brome plus la compétition pour la T4 est importante). Le TBBPA peut également se lier aussi au récepteur aux hormones thyroïdiennes et ainsi empêcher la liaison de la triodothyronine T3 (Kitamura *et al.*, 2005), les mêmes auteurs ont aussi démontré que le TBBPA avait un effet antagoniste *in vivo* vis-à-vis des hormones thyroïdiennes (chez les amphibiens). Une étude a démontré que le TBBPA avait un faible pouvoir œstrogénique *in vitro* contrairement à son analogue non bromé, le BPA. Cet effet tend à augmenter lorsque le nombre d'atomes de brome présents sur les bisphénols diminuent (Meerts *et al.*, 2001).

Aucune donnée n'est disponible concernant le DBDE pour les perturbations des fonctions endocrines. En revanche, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées pour les PBDE de poids moléculaire plus faible.

Très récemment, des travaux ont mis en évidence des effets du pentaBDE (BDE-99) sur les fonctions endocrines, chez des rats adultes qui avaient été exposés *in utero*, les mères ayant été traitées par injection sous cutanée avec du pentaBDE (1 ou 10 µg/g p.c./j) au cours de la gestation (G10 à G18). Les effets observés étaient une diminution de la distance ano-génitale, une baisse de la concentration d'hormones sexuelles stéroïdiennes circulantes, du poids de la thyroïde, du nombre de follicules ovariens (femelles) et une augmentation de la préférence sucrée qui est un indice de féminisation (mâle). Les auteurs notent que ces effets ont été détectés à l'âge adulte, soit bien après l'arrêt de l'exposition au pentaBDE, démontrant la persistance des effets (Lilienthal *et al.*, 2006). Stoker *et al.* avaient déjà mis en évidence en 2004 un retard dans la maturation sexuelle chez les rats mâles et femelles, après exposition dès le sevrage et durant 20 à 31 jours à 60 µg/g p.c./j d'un mélange commercial (penta-mix), qui pourrait être la conséquence d'effets sur la thyroïde. Ainsi, après exposition à ce même mélange commercial ou à du tétraBDE (BDE-47), une diminution du taux de T4 est souvent

rapportée chez le rat et la souris, sans effet sur les taux de T3 et de TSH, ou bien uniquement chez le mâle. Une modification histo-pathologique de la thyroïde est observée à partir de 60 µg/g p.c./j après 20 à 31 jours d'exposition au penta-mix (Fowles *et al.*, 1994; Hallgren *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Stoker *et al.*, 2004). Le taux de T4 est également diminué chez les fœtus dont les mères sont exposées à ce mélange, avec un retour à des valeurs normales 15 jours après le sevrage, correspondant à l'arrêt de l'exposition par l'allaitement (Zhou *et al.*, 2002).

L'étude de l'activité biologique des PBDE n'en est qu'à son début, les premiers résultats montrent que certains congénères sont actifs *in vitro*. Par exemple, les BDE-19, 100, 155 et 49 sont des antagonistes ayant une bonne affinité pour les récepteurs AR (récepteur aux androgènes) et PR (récepteur à la progestérone) et des agonistes ayant une affinité pour le récepteur ER α (récepteur des œstrogènes). Ils inhibent l'activité de l'estradiol sulfotransférase et ont des effets potentialisateurs sur la prolifération induite par T3 des cellules GH3 (Hamers *et al.*, 2006). Certains métabolites hydroxylés des PBDE comportant 3 à 5 atomes de bromes (en fonction de leur stéréochimie) pourraient être des perturbateurs endocriniens (Meerts *et al.*, 2000 et 2001). Compte tenu de leur importante analogie structurale avec les hormones thyroïdiennes (les atomes de brome remplaçant ceux d'iode présents sur les hormones), l'un des mécanismes proposés est une compétition des PBDE avec la T4 pour les récepteurs de la transthyrétine (TTR), la principale protéine de transport des hormones thyroïdiennes chez le rat, toutefois sa signification pour l'Homme reste à déterminer. Enfin, le penta-mix a montré un potentiel anti-androgène dans le test de Hershberger chez le rat immature (Stoker *et al.*, 2005).

4. Immunotoxicité

Le potentiel immunotoxique des RFB est inconnu. Pourtant, une publication, concernant le TBBPA (Pullen *et al.*, 2003) mentionne que ce composé pourrait être immunotoxique, compte tenu des effets observés *in vitro* avec des splénocytes de souris (inhibition de l'expression de la chaîne α du récepteur à l'interleukine 2). Récemment une équipe Norvégienne a mis en évidence que les bisphénols bromés pouvaient induire un stress oxydant par la formation de radicaux libres dans des cellules sanguines humaines (granulocytes neutrophiles), cette induction étant dépendante du nombre d'atomes de brome présents sur la molécule, et étant maximale pour le TBBPA (Reistad *et al.*, 2005). Un tel processus (stress oxydant) avait été préalablement suggéré suite à l'observation de

l'augmentation de l'activité de la glutathion réductase chez le poisson par le TBBPA (Ronisz *et al.*, 2004).

5. Conclusions

La toxicité aigüe des RFB, compte tenu des données disponibles, est assez faible. Aucun de ces composés ne serait génotoxique. Cependant, de nombreuses altérations hormonales ont été rapportées concernant le TBBPA et certains PBDE, et particulièrement les métabolites hydroxylés des PBDE. Concernant la thyroïde, si les effets directs observés chez les rongeurs ne sont pas directement extrapolables à l'Homme, les effets indirects résultant de modifications hormonales thyroïdiennes pourraient avoir un impact certain sur les fonctions de reproduction, et plus particulièrement sur le déroulement de la maturation sexuelle, sur le développement de l'embryon et sur l'activité neurocomportementale des nouveau-nés. Les données disponibles restent cependant trop superficielles pour une analyse satisfaisante de ces aspects. De plus, aucune expérimentation n'a été à ce jour réalisée chez le non-rongeur.

VI. OBJECTIFS DE LA THESE ET STRATEGIE ADOPTEE

Bien que les RFB permettent de sauver un grand nombre de vies et de biens grâce à leurs propriétés ignifuges. Il n'est pas exclu que ces molécules puissent poser un problème de santé publique, compte tenu de leur présence dans tous les compartiments environnementaux et chez l'Homme, ainsi que de leur proximité structurale avec des xénobiotiques connus (bisphénols; PCB et dioxines chlorées). Des effets toxiques sont déjà fortement soupçonnés pour les PBDE tels que certains tétra-, penta- et hexaBDE. Concernant le TBBPA et le DBDE, c'est-à-dire les deux RFB les plus utilisés à l'échelle mondiale et représentant la quasi-totalité des RFB utilisés dans l'Union Européenne, les données concernant les niveaux d'exposition, les effets toxiques et le métabolisme, sont encore en grande partie inexistantes. Les niveaux résiduels de DBDE chez l'Homme semblent être en constante augmentation. Bien que sa détection soit difficile, le DBDE apparaît être le PBDE majoritaire dans les tissus humains. L'Homme est quotidiennement exposé aux RFB par son alimentation et comme cela a été montré récemment, par l'ingestion de poussières domestiques et industrielles. Les nouveau-nés sont aussi directement exposés par le biais de la contamination du lait maternel.

Au vu des données bibliographiques parcellaires existantes, il apparaît nécessaire d'étudier le devenir du TBBPA et du DBDE chez l'Homme et chez l'animal pour:

- Comprendre les voies de biotransformation de ces composés
- Quantifier et identifier les produits de biotransformation par l'obtention de profils métaboliques, requérant le développement de nouvelles techniques analytiques
- Etablir si certains métabolites possèdent une activité biologique et s'ils sont plus rémanents que le composé parental
- Déterminer et évaluer l'exposition fœtale à ces composés.

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons choisi d'étudier le métabolisme du TBBPA et du DBDE chez le rat et chez l'Homme *in vitro*, ainsi qu'*in vivo* chez la rate gestante. Pour cela, l'obtention par synthèse chimique des molécules radio-marquées était nécessaire, celles-ci n'existant pas dans le commerce. Les méthodes analytiques (solubilisation, purification, extraction et chromatographies des RFB) n'étant pas disponibles dans la littérature, elles ont été spécifiquement développées pour cette étude. Les méthodes d'identification par spectrométrie de masse ont également été développées au cours de ce travail. Les méthodologies employées, les résultats obtenus et les conclusions que nous en avons tirées sont détaillés dans ce mémoire. Ce travail a conduit à l'écriture de cinq publications, dont une en cours de soumission. Elles sont incorporées dans les résultats développés dans le manuscrit.

Article 1 : A. Riu, D. Zalko, L. Debrauwer. Study of polybrominated diphenyl ethers using both positive and negative atmospheric pressure photoionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*; 20: 2133-2142 (2006).

Article 2: L. Debrauwer, A. Riu, M. Jouahri, E. Rathahao, I. Jouanin, JP. Antignac, R. Cariou, B. Le Bizec, D. Zalko. 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 (2005).

Article 3: D. Zalko, C. Prouillac, A. Riu, E. Perdu, L. Dolo, I. Jouanin, C. Canlet, L. Debrauwer, JP. Cravedi. Biotransformation of the flame retardant tetrabromo-bisphenol A by human and rat sub-cellular liver fractions. *Chemosphere*; 64: 318-327 (2006).

Article 4: D. Zalko, E. Perdu, T. Reistad, A. Riu, A. Garcia, E. Mariussen. Biotransformation of the flame retardant tetrabromobisphenol-A by human neutrophil granulocytes. *Organohalogen Compounds* (2006). En cours de numérotation

Article 5: A. Riu, JP. Cravedi, L. Debrauwer, A. Garcia, C. Canlet, I. Jouanin, D. Zalko. Disposition and metabolic profiling of [¹⁴C]-Decabromodiphenyl ether in pregnant Wistar rats. *Environment International*. (2006). (soumise)

Chapitre 2 : METHODOLOGIES MISES EN ŒUVRE

Ce chapitre récapitule les méthodes analytiques mises en œuvre au cours de ce travail de thèse, pour réaliser les études de métabolisme du TBBPA et du DBDE. Dans un premier temps, les méthodes de synthèse des molécules radio-marquées au [^{14}C] ont été développées en recherchant une activité spécifique maximale pour chaque composé. Dans un deuxième temps sont décrites les méthodes mises en place pour solubiliser et purifier le TBBPA et le DBDE, puis le développement des systèmes de chromatographie liquide haute performance (CLHP) concernant ces RFB. Dans la troisième partie sont développés les protocoles d'incubations *in vitro* et les protocoles d'extraction. Enfin, la dernière partie de ce chapitre détaille les méthodes d'identification par spectrométrie de masse. Ces dernières ont donné lieu à deux publications dans des revues internationales.

I. SYNTHÈSE DES MOLECULES RADIO-MARQUEES

Les synthèses du [^{14}C]-TBBPA et du [^{14}C]-DBDE ont été réalisées par bromation, respectivement à partir de [^{14}C]-BPA (Bisphénol A) et [^{14}C]-DE (Diphényle éther). L'ajout d'atomes de brome sur les substrats de départ augmente considérablement leur poids moléculaire. Par conséquent, l'activité spécifique des RFB synthétisés est bien moindre que celles des précurseurs utilisés. Or, plus l'activité spécifique est élevée, meilleure est la sensibilité en radio-CLHP, et plus les doses administrées aux animaux peuvent être faibles, permettant de ne pas trop s'éloigner des doses auxquelles l'Homme est exposé.

Toutes les expériences ont été effectuées avec du matériel exclusivement en verre et dans le cas du TBBPA le verre avait été préalablement silanisé, avec du dichlorométhyle silane dans du toluène (5:95, v/v), puis rincé avec de l'acétonitrile (ACN). Lorsque le pipetage avec des embouts plastiques a été nécessaire, c'est du matériel à usage unique « low binding » qui a été utilisé.

1. [^{14}C]-TBBPA

Le TBBPA [2,2-bis(3,5-dibromo-4-hydroxy-phenyl)propane] radio-marqué a été synthétisé à partir du BPA marqué au ^{14}C de manière homogène sur les cycles aromatiques (Moravek Biochemicals, CA, USA; radio-pureté: >99 %, activité spécifique (AS): 7,4 GBq/mmol) selon la méthode décrite par Susan *et al.* (1978): 4,4 équivalents de brome et du BPA ont été solubilisés dans un mélange méthanol:eau (1:1, v/v) (Fig. 5). Après 1 h à température ambiante, la réaction a été stoppée par ajout de bisulfite de sodium, puis le TBBPA a été extrait avec du dichlorométhane. Afin de pouvoir réaliser cette synthèse, il est

impératif d'utiliser du BPA non radio-marqué ajouté au [^{14}C]-BPA pour pouvoir travailler avec une quantité suffisante de produit. Les premières synthèses ont été réalisées avec 2 mg de BPA ajoutés à 6,29 MBq (249 μg) de [^{14}C]-BPA, conduisant au [^{14}C]-TBBPA avec une AS de 757 Bq/ μg . Par la suite, nous avons développé des synthèses en utilisant 400 μg et 600 μg de BPA non radioactif auquel ont été ajoutés respectivement 6,29 MBq et 12,17 MBq de [^{14}C]-BPA, conduisant à une AS du [^{14}C]-TBBPA de 5012 Bq/ μg puis de 6626 Bq/ μg , cette dernière étant l'activité maximale atteinte pour le TBBPA à ce jour. Les rendements de synthèse du [^{14}C]-TBBPA étaient compris entre 50 et 75 %.

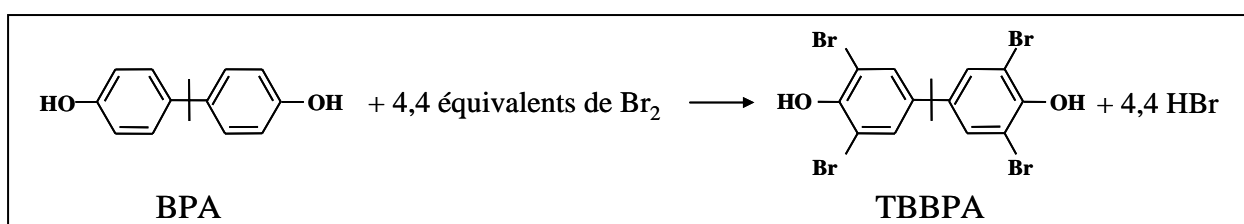


Fig. 5. Synthèse du TBBPA selon la méthode de Susan et al. (1978)

2. [^{14}C]-DBDE

Le DBDE [bis(pentabromophenyl)ether] radio-marqué au [^{14}C] a été synthétisé à partir du DE marqué au ^{14}C de manière homogène sur les cycles aromatiques (Izotop, Institute of Isotopes co. Budapest, Hungary; AS: 862 MBq/mmol) auquel ont été ajoutés du brome en excès et de l'aluminium (catalyseur) sous agitation. Le brome en excès a été ajouté à 9 reprises toutes les 10 min à 50°C. Au 10^{ème} ajout de Br_2 le flacon a été fermé hermétiquement et maintenu 2 h à 70°C. La réaction a été stoppée par ajout d'eau et le [^{14}C]-DBDE a été extrait avec du toluène. Contrairement au TBBPA, la synthèse du [^{14}C]-DBDE ne nécessitait pas d'ajout de DE non radio-marqué. La synthèse a donc été réalisée avec 1,45 mg de DE radioactif conduisant à 8,2 mg de [^{14}C]-DBDE avec une AS de 0,91 MBq/mg (AS maximale qu'il était possible d'obtenir avec le [^{14}C]-DE utilisé), et un rendement de synthèse compris entre 70 et 100 %.

II. CHOIX ET MISE AU POINT DES OUTILS ANALYTIQUES

1. Instrumentation

Les mesures de la radioactivité contenue dans les échantillons liquides ont été réalisées, après mélange avec du liquide scintillant (Ultima Gold, Packard), par comptage direct dans un

compteur à scintillation liquide (Tricarb 2200 CA, Meriden, Connecticut). Les corrections de quenching ont été effectuées automatiquement par l'appareil au moyen d'un standard interne. Les niveaux de radioactivité dans les échantillons solides (tissus et culots d'extraction) ainsi que dans le sang ont également été déterminés au compteur à scintillation liquide, après combustion à l'aide d'un Oxidizer modèle 307 (Packard) et récupération des gaz dans un mélange scintillant approprié (Packard Permafluor E+/ Packard Carbosorb, 2:1, v/v).

La séparation des métabolites présents dans les urines et les extraits d'échantillons biologiques, a été obtenue par CLHP en phase inverse, en utilisant un Spectra system P1000 (Thermo Electron, les Ulis, France) équipé d'un injecteur Rhéodyne. Leur quantification a été effectuée au moyen du couplage de la CLHP à un détecteur de radioactivité en ligne (Flo-one/ β A500, Radiomatic™ 610TR, Perkin Elmer; Villebon-sur-Yvette, France), l'absorption UV étant suivie au moyen d'un détecteur Spectra system UV6000LP (Thermo Electron) réglé à la longueur d'onde $\lambda = 254$ nm. Leur isolement a été obtenu à l'aide d'un collecteur automatique de fractions Gilson modèle 202 (Gilson France, Villiers-le-Bel, France).

Les identifications structurales ont été réalisées en spectrométrie de masse (MS) en utilisant un spectromètre de masse quadripolaire de type piège ionique LCQ DecaXP Finnigan (Thermo Electron, Les Ulis, France), équipé d'une source d'électro-nébulisation (ESI) ou de photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI). Cet appareil a également servi à réaliser les analyses de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) et le couplage chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (LC-MS). La structure de certains métabolites produits en assez grande quantité a été précisée par des études en résonance magnétique nucléaire du proton (^1H -RMN) en utilisant un spectromètre Bruker Avance DRX-600 (Bruker, Wissembourg, France), à 600,13 MHz équipé d'une sonde cryogénique TXI (5 mm H, C, N inverse triple résonance) (articles 3 et 4).

2. Développement des méthodes analytiques concernant le TBBPA

Le développement des méthodes de purification et des systèmes CLHP a été réalisé en prenant en compte la nécessité d'obtenir un système permettant de séparer les différents composés obtenus lors de la synthèse du [^{14}C]-TBBPA, en plus des métabolites formés *in vitro* et *in vivo*. La bromation du TBBPA n'étant pas totale lors de la synthèse, des analogues moins bromés ont également été formés (monobromo-, dibromo- et tribromoBPA).

2.1. Développement et optimisation des conditions chromatographiques

Deux systèmes CLHP ont été développés et optimisés pour l'étude du TBBPA.

Le Système TBBPA I

Colonne : Fluofix (250 x 4,6 mm, 5 μ m; Interchim, Montluçon, France)

Pré-colonne : Kromasil C18 (18 x 4,6 mm, 5 μ m; ColoChrom, Gagny France).

Débit : 1 mL/min, température du four : 35°C, gradient: Fig. 6.

Phases mobiles : A : eau-acide acétique 0,1 %, pH 3,2:ACN (95:5, v/v).

B : ACN 100%

Injection des échantillons dans: 50 % de B + 50 % de A. (utilisation de A/B 20/80 % quand la concentration de TBBPA est importante) (boucle d'injection = 500 μ L)

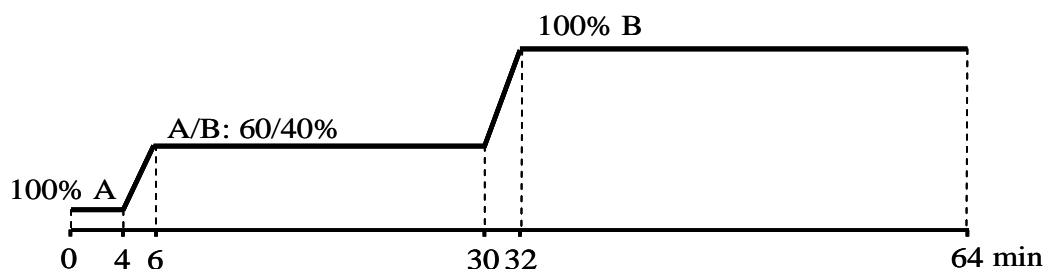


Fig. 6. Gradient CLHP système TBBPA I

Le système TBBPA I permet une excellente séparation du BPA, du monobromo-, du dibromo, du tribromoBPA et du TBBPA issus de la synthèse (Fig 7).

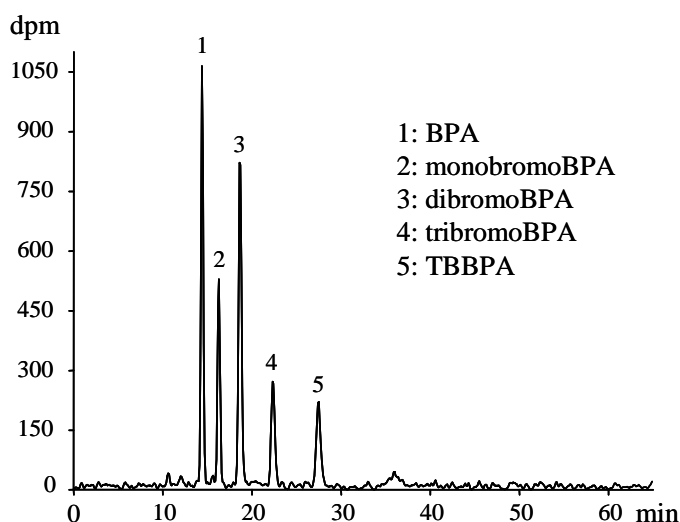


Fig. 7. Radio-chromatogramme de la synthèse de $[^{14}\text{C}]$ -TBBPA avec le système TBBPA I

Ce système a été utilisé pour purifier le TBBPA synthétisé par bromation du BPA. Par ailleurs, si lors de cette synthèse on utilise 2,2 équivalents de brome (au lieu de 4,4; cf. **I.1**),

on favorise la production de monobromo-, dibromo- et tribromoBPA au détriment du TBBPA. Cette procédure, et une séparation par collecte à l'aide du système TBBPA I, ont été utilisées pour purifier ces intermédiaires.

En revanche, il est apparu dès les étapes préliminaires de l'étude du métabolisme du TBBPA, que le système TBBPA I, s'il permettait de s'assurer de l'absence de débromation du composé parent, ne permettait pas de séparer de façon optimale tous les métabolites produits et en particulier les composés apolaires élués à un T_R de 36 min (article 3). Le pic radioactif correspondait en effet à plusieurs métabolites coéluants à ce temps de rétention.

Le Système TBBPA II

Ce système a été développé pour résoudre ce problème.

Colonne : Nucleodur C8 (250 x 4 mm, 5 μ m; Macherey Nagel, Hoerd, France)

Pré-colonne : Kromasil C18 (18 x 4.6 mm, 5 μ m; ColoChrom, Gagny France).

Débit : 1 mL/min, température du four : 35°C, gradient : Fig. 8.

Phases mobiles et conditions d'injection: identiques au système I.

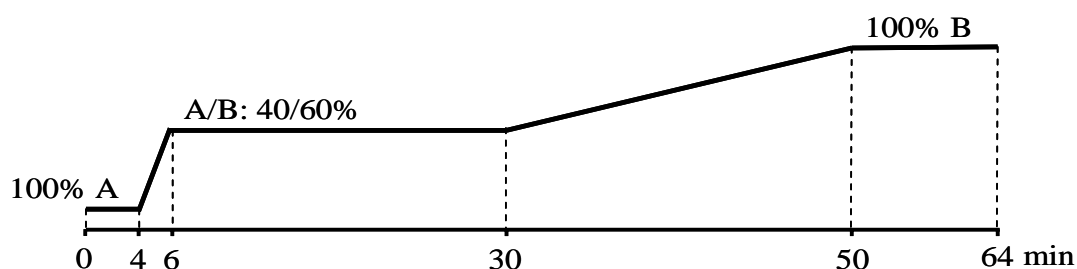


Fig. 8. Gradient CLHP système TBBPA II

Ce système CLHP a été mis en place afin de séparer les composés apolaires obtenus lors des incubations *in vitro* du TBBPA sur microsomes et fractions S9. Dans ce nouveau système le TBBPA est détecté à 18 min et 2 produits moins hydrosolubles (M7a et M7b) éluent respectivement à 36 min, 40 min. Leur identification a été réalisée par spectrométrie de masse avec une source de photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI).

2.2. Purification des produits formés

La purification de chaque composé formé a été réalisée par CLHP couplée à un collecteur de fractions (à raison de 4 tubes/min avec un débit de 1 mL/min). La quantité de produit injecté, étant limitée par la capacité de la colonne (colonne analytique), une optimisation par une étape préalable de purification sur cartouche (2 systèmes) a été développée. Le premier

(système cartouche I) a été mis au point pour séparer le TBBPA des composés polaires. Le second (système cartouche II) l'a été pour séparer le TBBPA des composés moins polaires. Dans les 2 cas, les cartouches utilisées étaient en verre et contenaient 1 g de phase stationnaire (seul le greffage de la phase était différent). La quantité de produit maximale déposée était de 1 mg (équivalent TBBPA) par cartouche.

Les systèmes de purification sont détaillés dans les tableaux 4 et 5.

Système cartouche I : cartouche C18 (Macherey Nagel, Hoerd, France)

	Solvants	Proportion (v/v %)	Volume mL	Produits récupérés
Equilibrage	Méthanol	100 %	4	∅
Equilibrage	Phase A/ACN	60:40	4	∅
Dépôt	Phase A/ACN	60:40	5	∅
Lavage	Phase A/ACN	50:50	4	∅
Elution 1	Phase A/ACN	50:50	4	monoBBPA
Elution 2	Phase A/ACN	50:50	4	Mono- + diBBPA
Elution 3	Phase A/ACN	50:50	4	diBBPA
Elution 4	Phase A/ACN	45:55	4	triBBPA
Elution 5	ACN	100 %	4	TBBPA
Elution 6	ACN	100 %	4	TBBPA + apolaires
Elution 7	ACN	100 %	4	∅
Elution 8	ACN	100 %	4	∅

Tableau 4. Système cartouche I

Système cartouche II : C8 (Macherey Nagel, Hoerd, France)

	Solvants	Proportion (v/v)	Volume mL	Produits récupérés
Equilibrage	Méthanol	100 %	4	∅
Equilibrage	Phase A/ACN	60:40	4	∅
Dépôt	Phase A/ACN	60:40	5	∅
Lavage	Phase A/ACN	60:40	4	∅
Elution 1	Phase A/ACN	40:60	4	∅
Elution 2	Phase A/ACN	40:60	4	TBBPA
Elution 3	Phase A/ACN	40:60	4	TBBPA
Elution 4	Phase A/ACN	30:70	4	Apolaires
Elution 5	ACN	100 %	4	Apolaires
Elution 6	ACN	100 %	4	∅

Tableau 5. Système cartouche II

2.3. Mise au point des méthodes de solubilisation du TBBPA

Bien que le TBBPA soit relativement plus soluble que le DBDE, un certain nombre de précautions méthodologiques ont été prises, notamment l'utilisation d'un matériel exclusivement en verre (lorsque c'était possible) et préalablement silanisé.

2.3.1. Pour les études *in vitro*

La quantité de TBBPA nécessaire pour les incubations *in vitro*, préalablement stockée dans de l'ACN, a été placée dans un tube en verre silanisé puis le solvant a été évaporé avant d'être re-solubilisé dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO, représentant au final 0,5 % du volume d'incubation total).

2.3.2. Pour les études *in vivo*

Les administrations de TBBPA *in vivo* chez le rat (Wistar) ont été réalisées par voie orale ou par injection intra-péritonéale, le composé étant respectivement solubilisé dans 500 µL et 1000 µL d'huile d'arachide. Le TBBPA, stocké dans l'ACN, a été directement déposé sur l'huile, puis le solvant organique a été évaporé sous flux d'azote, avant d'être homogénéisé. Au cours des administrations *per os*, quelle que soit la quantité de TBBPA (dose maximale = 900 µg), la totalité de la dose a été solubilisée dans le volume d'huile, mais la viscosité de ce véhicule entraînait une rétention du produit au niveau de l'aiguille et de la seringue, c'est pourquoi 25 à 30 % de pertes ont été mesurées après administration. En injection intra-péritonéale, les pertes après administration étaient moins importantes (environ 20 %).

2.4. Techniques d'extraction à partir de différentes matrices biologiques

Des techniques analytiques ont été développées pour l'étude des profils métaboliques à partir d'extrait de fèces, de contenus digestifs et de plasma. Ces échantillons ont été prélevés après administration quotidienne de [¹⁴C]-TBBPA à des rates gestantes pendant 4 jours consécutifs, à l'exception des fèces ayant été prélevées quotidiennement pendant l'étude.

2.4.1. Extraits des fèces et des contenus digestifs

L'extraction suivait un protocole à 5 étapes par extraction avec un solvant organique (ACN) des fèces préalablement homogénéisées, permettant d'évaluer la quantité de radioactivité maximale extractible. Les fèces collectées quotidiennement sont homogénéisées individuellement dans 10 mL de NaCl 9 % à l'aide d'un homogénéiseur (Polytron). Après

centrifugation, le surnageant est prélevé et 1 g de fèces homogénéisées est extrait selon le protocole décrit Fig. 9.

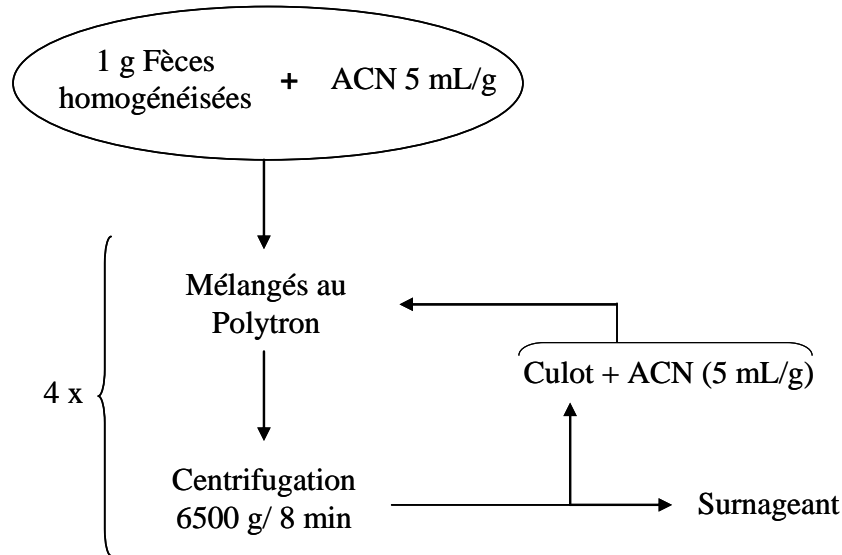


Fig. 9. Protocole d'extraction de la radioactivité des fèces et des différentes matrices biologiques.

Les contenus de l'intestin étant préalablement stockés dans 20 mL de NaCl 9 ‰, ont directement été centrifugés 8 min à 6500 g. Le culot restant, libéré du surnageant aqueux, a été entièrement extrait suivant le même protocole Fig. 9.

2.4.2. Extraction du plasma

Le plasma a été extrait avec du méthanol (1:3, v/v), puis centrifugé 8 min à 6500 g. La quantité de radioactivité contenue dans le surnageant a été déterminée par comptage, le culot de protéines plasmatiques a été extrait à 3 reprises de la même manière avec 1 mL de méthanol.

3. Développement des méthodes analytiques concernant le DBDE

3.1. Développement et optimisation des conditions chromatographiques

Concernant le DBDE, le système CLHP devait permettre, malgré les difficultés d'analyse attendues, de solubiliser une quantité de DBDE (ou de ses produits de biotransformations) suffisante, de récupérer la totalité de l'échantillon injecté, et de séparer les différentes familles

de congénères du DBDE, puis les métabolites formés. Le développement du système a été réalisé avec du [^{14}C]-DBDE (CLHP + détection de la radioactivité), et à partir d'un mélange de congénères incluant des penta-, hexa- et heptaBDE (CLHP + détection UV à $\lambda = 254 \text{ nm}$).

Après plusieurs essais (différentes colonnes, différents mélanges d'injection), le système retenu a été le suivant (**Système DBDE I**):

Colonne : Nucléodur C18 (250 x 4 mm, 5 μm ; Macherey Nagel, Hoerdt, France)

Pré-colonne : Kromasil C18 (18 x 4,6 mm, 5 μm ; ColoChrom, Gagny France).

Débit : 1 mL/min, température du four : 35°C, gradient : Fig. 10.

Phases mobiles : A : eau 100 %

B : méthanol 100%

Injection : 75-100 % d'ACN + 0-25 % d'eau. (Boucle d'injection = 500 μL)

Il est indispensable pour une bonne séparation des congénères faiblement bromés, de rajouter de l'eau dans le mélange d'injection. Du toluène (1-5 %) peut être également ajouté pour une meilleure solubilisation du DBDE, en particulier lorsque la quantité de produit à injecter est importante (au-delà de 4 μg d'équivalents DBDE).

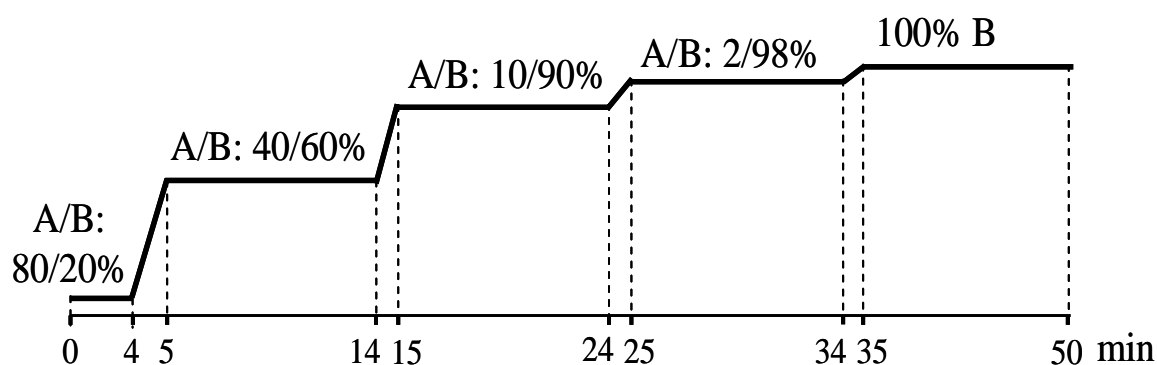


Fig. 10. Gradient CLHP système DBDE I

Dans ce système CLHP le DBDE élué à 40 min (Fig. 11).

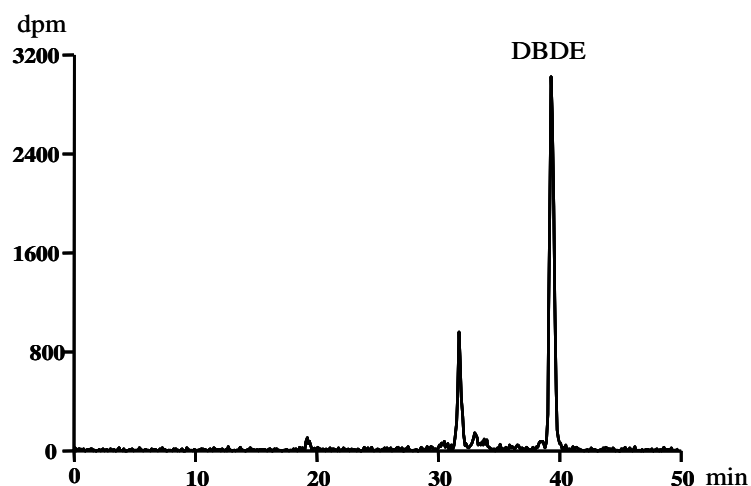


Fig. 11. Radio-chromatogramme du produit de synthèse de [^{14}C]-DBDE, avant l'étape de purification.

Un deuxième Système CLHP a été mis au point pour la LC-MS (**système DBDE II**) dans des conditions de débit moindre et avec une colonne de plus faible capacité.

Système colonne/pré-colonne: Polaris 3 C18 (150 x 2 mm; Varian, Middleburg, Pays Bas)

Débit : 0,15 mL/min, température du four : 35°C, gradient: Fig. 12.

Phases mobiles : A : eau 100 %.

B : méthanol 100%

Injection : 75-100 % d'ACN + 0-25 % d'eau.

Ajout post-colonne de toluène utilisé comme dopant pour favoriser l'ionisation (10 $\mu\text{L}/\text{min}$, i.e. 5 %)

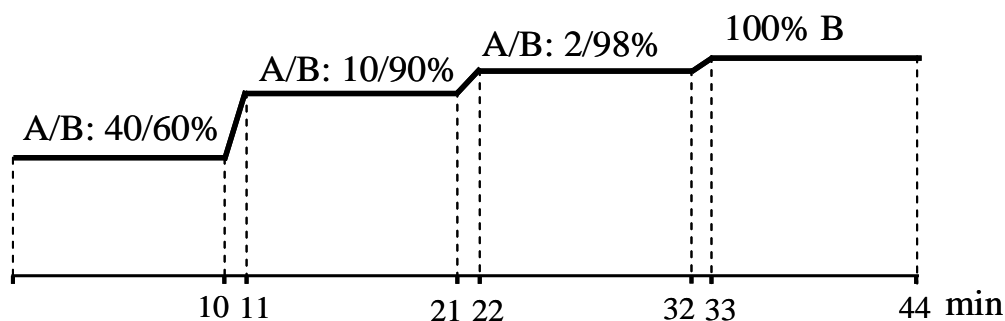


Fig. 12. Gradient LC-MS système DBDE II

3.2. Purification du DBDE sur cartouche

Le système mis au point pour la purification du DBDE sur cartouche est détaillé dans le tableau 6. Les cartouches utilisées étaient des cartouches C18 verre, avec 1 g de phase stationnaire (Macherey Nagel), la quantité maximale déposée s'élevant à 550 µg/cartouche.

	Solvants	Proportion (v/v %)	Volume mL	Produits récupérés
Equilibrage	Méthanol	100 %	4	∅
Equilibrage	Eau/ACN	20:80	4	∅
Dépôt	Eau/ACN	20:80	4	∅
Lavage	Eau/ACN	20:80	4	∅
Elution 1	Eau/ACN	10:90	4	∅
Elution 2	Eau/ACN	10:90	4	Produits $T_R < 30$ min
Elution 3	Eau/ACN	10:90	2	Produits $T_R < 30$ min
Elution 4	ACN	100 %	1	∅
Elution 5	ACN	100 %	1	Produits $T_R < 38$ min
Elution 6	ACN	100 %	1	$T_R < 38$ min + DBDE
Elution 7	ACN	100 %	1	DBDE
Elution 8	Toluène	100 %	4	DBDE
Elution 9	Toluène	100 %	4	DBDE
Elution 10	Toluène	100 %	4	∅

Tableau 6. Système cartouche DBDE

3.3. Mise au point de méthodes de solubilisation du DBDE

3.3.1. Pour les incubations *in vitro*

Compte tenu de ses propriétés physico-chimiques, le DBDE est un composé très peu soluble dans l'eau, ainsi que dans la plupart des solvants organiques. Cependant toutes les incubations *in vitro*, nécessitent d'être réalisées dans un tampon aqueux, la quantité de solvant acceptable étant de 0,5 % de DMSO (ou d'éthanol). La solubilité du DBDE dans les tampons d'incubation classiques a été évaluée et est inférieure à 1 %. Il a donc fallu trouver un moyen de solubiliser suffisamment ce composé pour pouvoir étudier son métabolisme *in vitro*. Nous avons opté pour l'utilisation de poloxamères. Ces poloxamères sont des polymères constitués

d'une partie hydrophobe et d'une partie hydrophile (Fig. 13), ayant la particularité de former des micelles en solution aqueuse, ce qui permet de solubiliser des composés très hydrophobes. Nous disposons de deux sortes de poloxamères (P188 et P407) ayant la même structure mais avec des longueurs de chaînes différentes, et donc une concentration micellaire critique (CMC) différente (tableau 7).

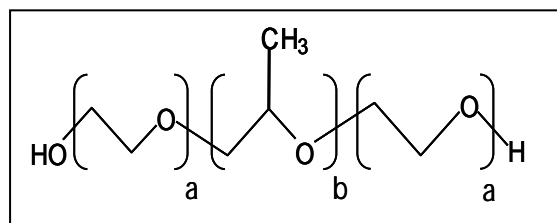


Fig. 13. Structure des poloxamères

	P188	P407
a	80	101
b	27	56
CMC (25°C)	$1,3 \cdot 10^{-2}$ M	$1,2 \cdot 10^{-4}$ M

Tableau 7. Propriétés des poloxamères utilisés.

Pour des concentrations équivalentes de DBDE, il a été déterminé que le poloxamère permettant la meilleure solubilité du $[^{14}\text{C}]$ -DBDE à 37 °C, était le P407. Cette solubilité pour des concentrations de DBDE de 5 à 50 μM , préalablement repris avec 10 μL de DMSO après évaporation du toluène, a été mesurée. Elle est égale à 95 % dans 1 mL de solution de P407 ($1,66 \cdot 10^{-5}$ mol/L dans du tampon phosphate). Des incubations avec des fractions microsomales et subcellulaires (S9) hépatiques de rat ont été réalisées avec une concentration en DBDE de 5 μM solubilisés soit dans 5 μL de DMSO soit dans 5 μL de DMSO auxquels avaient été ajoutés 100 μL de poloxamères P407 (correspondant à une concentration finale en poloxamère dans le milieu d'incubation de $1,66 \times 10^{-5}$ mol/L). A cette concentration la solubilité du DBDE dans le milieu d'incubation est équivalente quel que soit le mélange.

3.3.2. Pour les études *in vivo*

Plusieurs véhicules ont été testés pour atteindre une solubilité maximale du DBDE : le poloxamère P407 (1,3 mg/mL d'eau), la L- α -phosphatidylcholine de soja (75 mg/mL d'eau) et l'huile d'arachide. Il a été ainsi déterminé que l'huile d'arachide était le meilleur véhicule pour l'administration du DBDE. 500 μL et 1000 μL ont été utilisés pour solubiliser environ 740 μg de $[^{14}\text{C}]$ -DBDE avant administration aux rats (Wistar), respectivement par voie orale ou par injection intra-péritonéale (i.p.). Le $[^{14}\text{C}]$ -DBDE (0,67 MBq, 740 μg) stocké dans le toluène a été transféré dans un tube en verre silanisé, puis évaporé à sec sous flux d'azote, et

ensuite repris avec le volume d'huile correspondant. Le mélange DBDE/huile a été soniqué pendant 15 min. Les vérifications CLHP montrent que le DBDE ne se dégrade pas au cours de ce processus. A ce stade, la solubilité du DBDE dans l'huile est supérieure à 95 %. Le mélange est ensuite prélevé avec une aiguille en inox montée sur une seringue en plastique, l'aiguille étant ensuite remplacée soit par une sonde en inox (en vue du gavage), soit par une aiguille d'injection (i.p.). Comme pour le TBBPA, la viscosité de l'huile a pour conséquence une rétention du produit sur tout le matériel utilisé, les pertes de DBDE s'élevant à 25 % par voie orale, et à 30 % par injection.

3.4. Techniques d'extraction à partir de différentes matrices biologiques

Des techniques analytiques ont été développées pour l'étude des profils métaboliques à partir d'extraits d'urine, de fèces, de contenus digestifs et de plasma ainsi qu'à partir de divers tissus. Ces échantillons ont été prélevés après administration quotidienne de [¹⁴C]-DBDE à des rates gestantes pendant 4 jours, à l'exception des urines et des fèces ayant été prélevées quotidiennement pendant l'étude. Pour les fèces préalablement homogénéisées, les contenus et les divers tissus, la procédure d'extraction suivait un protocole en 6 étapes faisant appel à des solvants organiques et permettant d'évaluer précisément la quantité de radioactivité extraite. Les urines et le plasma suivaient un protocole d'extraction en 3 étapes avec des solvants organiques (article 5).

III. ETUDES IN VITRO

Des études de métabolisme *in vitro* du TBBPA et du DBDE ont été menées au moyen d'incubations réalisées avec différents systèmes d'essai (fractions subcellulaires hépatiques et tranches de foie, contenus intestinaux de rat, granulocytes humains) pour essayer de préciser les voies de biotransformations suivies par ces composés, au niveau hépatique et extra-hépatique.

1. Incubations avec des microsomes et des fractions S9 de foie

Les incubations ont été réalisées avec des fractions microsomales et des fractions S9 de foie (respectivement 2 mg et 7 mg de protéines; 37 °C; 2 h) de rat (Wistar) et d'Homme. Les microsomes et les fractions S9 ont été préparés par centrifugation différentielle, comme décrit

dans la section « matériels et méthodes » de l'article 3, concernant le TBBPA, pour lequel les concentrations utilisées ont été de 20, 50, 100 et 200 μM .

Des études de métabolisme *in vitro* similaires ont été réalisées avec des microsomes et fractions S9 de foie de rat pour le DBDE à la concentration de 5 μM . Une seule concentration pour le DBDE a été utilisée en raison des complications rencontrées lors de la solubilisation de ce composé dans les milieux d'incubations.

2. Incubations avec des tranches de foie de rat

Des incubations du TBBPA avec des tranches de foie de rat (Wistar) ont été réalisées, en complément des expérimentations sur fractions subcellulaire hépatiques, pour disposer de données sur un système cellulaire complet permettant d'être plus proche du métabolisme *in vivo*. De plus, concernant le DBDE, nous avons voulu savoir quel était le comportement de ce composé lors d'incubations réalisées avec ce système.

Préparation des tranches: un foie de rat a été prélevé et perfusé avec un tampon Krebs-Henseleit oxygéné. Les tranches de 8 mm de diamètre et 0,2 mm d'épaisseur ont été obtenues à l'aide d'un trancheur de tissu Krumdieck (Alabama recherche et développement Corp., Munford), le poids moyen des tranches étant de 20 mg, contenant près de 2 mg de protéines.

Incubation: les tranches ont été incubées avec du TBBPA (5 μM) ou du DBDE (5 μM) dans des piluliers en verre préalablement silanisés, avec 1 mL de milieu DMEM (Dubelco's Modified Eagle's Medium), à 37 °C pendant 4 h sous O_2/CO_2 (95/5) et sous agitation.

3. Incubations avec des contenus intestinaux de rat en conditions anaérobies

Afin de rechercher si le métabolisme du DBDE était en partie pris en charge par la microflore bactérienne de l'intestin, des incubations avec du contenu digestif provenant du duodénum, du jéjunum et du caecum de rat (Wistar), ont été réalisées en anaérobiose.

Nous avons utilisé 4 rates Wistar nourries pendant 4 jours avec le même aliment que celui utilisé pour l'étude de métabolisme du DBDE *in vivo*, pour ne pas avoir à prendre en compte ce paramètre de variation. De plus, deux véhicules ont été utilisés pour solubiliser le DBDE: le DMSO et de l'huile d'arachide, ce dernier étant le véhicule utilisé pour les administrations *per os* lors des études *in vivo*. Les rates ont été abattues par dislocation des cervicales puis exsanguination, le tube digestif étant prélevé et rapidement déposé dans une enceinte maintenue sous argon afin de maintenir l'anaérobiose. Une partie aliquote (500 μg) de contenu duodénal, jéjunal ou caecal a été prélevée et placée dans un tube eppendorf vide ou contenant préalablement 5 μM de DBDE solubilisé dans 50 μL d'huile. Pour les incubations

avec le DMSO (5 μ M de DBDE), 5 μ l de solvant ont été déposés directement sur le contenu, puis mélangés avec une aiguille. Les tubes eppendorfs ont été placés à 37°C pendant 30 min et 2 h pour le duodénum et le jéjunum, et 2 h et 24 h pour le contenu caecal. Les incubations ont été stoppées par ajout de 1 mL d'ACN, et la radioactivité a été extraite selon la procédure d'extraction des tissus décrite dans l'article 4 (le volume de solvant étant dans ce cas de 1 mL).

4. Incubations avec des granulocytes humains (neutrophiles)

Compte tenu des résultats préliminaires du programme AFSSET RD 2004-011 confirmant la présence de TBBPA dans le sang humain, nous avons décidé de collaborer avec une équipe Norvégienne travaillant sur des cellules sanguines humaines (granulocytes neutrophiles). Cette équipe avait récemment démontré que le TBBPA déclenchait un stress oxydant sur ces cellules, contrairement au BPA (analogue non bromé) qui ne provoquait aucun effet. De plus, les résultats obtenus au cours de l'étude du métabolisme *in vitro* du TBBPA (article 3) suggéraient la formation d'espèces réactives pour ce RFB. L'objectif était de déterminer quelles étaient les voies de biotransformations du TBBPA dans ces cellules, et si celles-ci pouvaient jouer un rôle dans la genèse de ces effets.

Des granulocytes humains provenant de trois individus ont été isolés des autres cellules sanguines puis ont été incubés (2×10^6 cellules/mL) avec différentes concentrations de TBBPA (1, 5, 10, 20 et 50 μ M), la procédure est détaillée dans la section « matériels et méthodes » de l'article 4.

IV. TESTS D'ACTIVITE BIOLOGIQUE SUR LIGNEES CELLULAIRES BIOLUMINESCENTES

Compte tenu de la littérature démontrant que le TBBPA pouvait perdre des atomes de brome *in vivo* chez le rat, nous avons purifié les mono-, di- et tribromoBPA obtenus lors des synthèses du TBBPA. Lorsque cela a été possible, certains métabolites ont été également produits en quantité suffisante, pour tester leur activité biologique. Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet AFSSET par l'équipe INSERM de Montpellier (U540), après l'envoi des différents produits purifiés. L'activité biologique du TBBPA, des bisphénols plus faiblement bromés et de certains métabolites, a été recherchée à partir de lignées cellulaires

bioluminescentes exprimant différents récepteurs et un gène rapporteur (la luciférase) correspondant.

Les lignées utilisées ont été des cellules:

- HeLa, avec le récepteur des œstrogènes humains ER α et ER β et le gène rapporteur ERE- β globine-luciférase
- HeLa, avec le récepteur humain de la dioxine AhR et le gène rapporteur XRE-TK-luciférase
- HeLa, avec un récepteur chimérique contenant le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4 de levure fusionné au domaine de liaison à l'hormone de différents récepteurs nucléaires: récepteur humain des inducteurs de la prolifération des peroxyosomes, Gal4-PPAR α , δ ou γ ; récepteur des xénobiotiques, Gal4-PXR) et le gène rapporteur (GAL4RE)₅- β globine-luciférase

Le protocole utilisé par l'U540 INSERM consiste à mesurer par bioluminescence et sur cellules entières, la production de luciférase, dont l'expression est régulée par le récepteur exprimé dans la lignée utilisée:

La détection est effectuée dans des plaques blanches de culture format 96 puits (Greiner cellstar). Les cellules sontensemencées à une densité de 40000 cellules par puits dans 150 μ l de milieu de culture DMEM sans rouge de phénol supplémenté avec 6 % de sérum de veau foetal déstéroïdé. Le jour suivant, le milieu des puits est remplacé par le même milieu contenant le produit à tester (le solvant ne dépassant pas 0,4% du volume). Les tests ont été réalisés en utilisant une gamme de concentration. Après 16 heures d'incubation, le milieu contenant les ligands est remplacé par du milieu contenant de la luciférine (0,3 mM). La luciférine diffuse dans les cellules et produit un signal stable 10 minutes plus tard. La plaque de culture est ensuite placée dans un luminomètre lecteur de plaque (Microbeta EG&G Wallac) et la luminescence est mesurée durant deux secondes pour chaque puits. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire de luminescence (RLU) et en pourcentage d'activité luciférase, la valeur 100% étant donnée par l'activité induite par le ligand de référence à la concentration de 1 μ M. Les agonistes de référence sont l'œstradiol pour ER α et ER β , la dioxine pour AhR, la rifampicine pour PXR et GW9578, L-16041 et BRL49653 pour PPAR α , PPAR δ et PPAR γ , respectivement.

V. CARACTERISATION STRUCTURALE DES PRODUITS DE BIOTRANSFORMATION DU TBBPA ET DU DBDE

1. Méthodes biochimiques

Des déconjugaisons enzymatiques ont été réalisées sur des métabolites du TBBPA détectés dans les extraits de contenu digestif prélevé obtenus à partir des études *in vivo*, avec un mélange d'enzymes (suc d'*Helix pomatia*), ou de manière plus spécifiques (β glucuronidase et sulfatase). Compte tenu des temps de rétention respectifs observés pour les métabolites majoritaires dans les contenus du tube digestif, et des données de la littérature, nous pouvions en effet supposer la présence de conjugués du TBBPA dans ces extraits. Pour chaque hydrolyse un témoin a été réalisé, ce dernier suivant exactement le même protocole mais sans l'ajout d'enzymes.

1.1. Suc d'*Helix pomatia* (activité sulfatase et glucuronidase)

Une partie aliquote de l'extrait (1680 Bq) a été placée dans un tube eppendorf puis a été évaporée à sec sous flux d'azote avant d'être reprise dans 480 μ L de tampon acétate de sodium 0,2 M ajusté à pH 5 avec de l'acide acétique, où 20 μ L de suc d'*Helix pomatia* avaient été ajoutés. Le mélange a été incubé à 42°C pendant 16 h. La réaction a été stoppée par l'ajout de 1 mL de méthanol. Puis le mélange a été centrifugé pendant 10 min à 8000 g. Le surnageant a été évaporé à sec et repris dans le mélange d'injection avant l'analyse en radio-CLHP.

1.2. β glucuronidase de foie de bovin

Une partie aliquote de l'extrait (1680 Bq) a été placée dans un tube eppendorf puis a été évaporée à sec sous flux d'azote avant d'être reprise dans 500 μ L de tampon acétate de sodium 0,2 M ajusté à pH 5, où ont été ajoutés 500 UI de β glucuronidase de foie de bovin (Sigma). Le mélange a été incubé pendant 6 h à 37°C sous agitation. La réaction a été stoppée avec 1,5 mL de méthanol, la suite du protocole est identique à la description donnée au paragraphe IV. 1.1.

1.3. Aryl sulfatase d'*Aerobacter aerogenes*

Une partie aliquote de l'extrait (1680 Bq) a été placée dans un tube eppendorf puis a été évaporée à sec sous flux d'azote avant d'être reprise dans 500 μ L de tampon Tris 0,01 M ajusté à pH 7,4, où ont été ajoutés 0,01 UI d'Aryl sulfatase d'*Aerobacter aerogenes* (Type VI,

Sigma). Le mélange a été incubé pendant 6 h à 37°C sous agitation. La réaction a été stoppée avec 1,5 mL de méthanol, la suite du protocole est identique à la description donnée au paragraphe IV. 1.1.

2. Identification et caractérisation en spectrométrie de masse

Une partie de ma thèse a été consacrée, avec l'aide de L. Debrauwer, au développement et à la mise au point de méthodes d'analyses et d'identification des RFB par spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse (MS) est une méthode d'analyse de choix pour les RFB, la présence d'atomes de brome sur ces composés facilitant considérablement l'analyse, de par l'existence d'un massif isotopique caractéristique. En effet, les abondances naturelles des deux isotopes stables du brome (^{79}Br et ^{81}Br) étant pratiquement égales, la distribution statistique de ces isotopes selon le nombre d'atomes de brome présents sur la molécule aboutit à la formation d'un massif constitué de plusieurs pics clairement identifiables sur les spectres de masse. La présence de n atomes de brome génère ainsi un massif comportant $n+1$ pics, espacés de 2 unités de masse nominale, dont les abondances relatives sont illustrées dans la Figure 14.

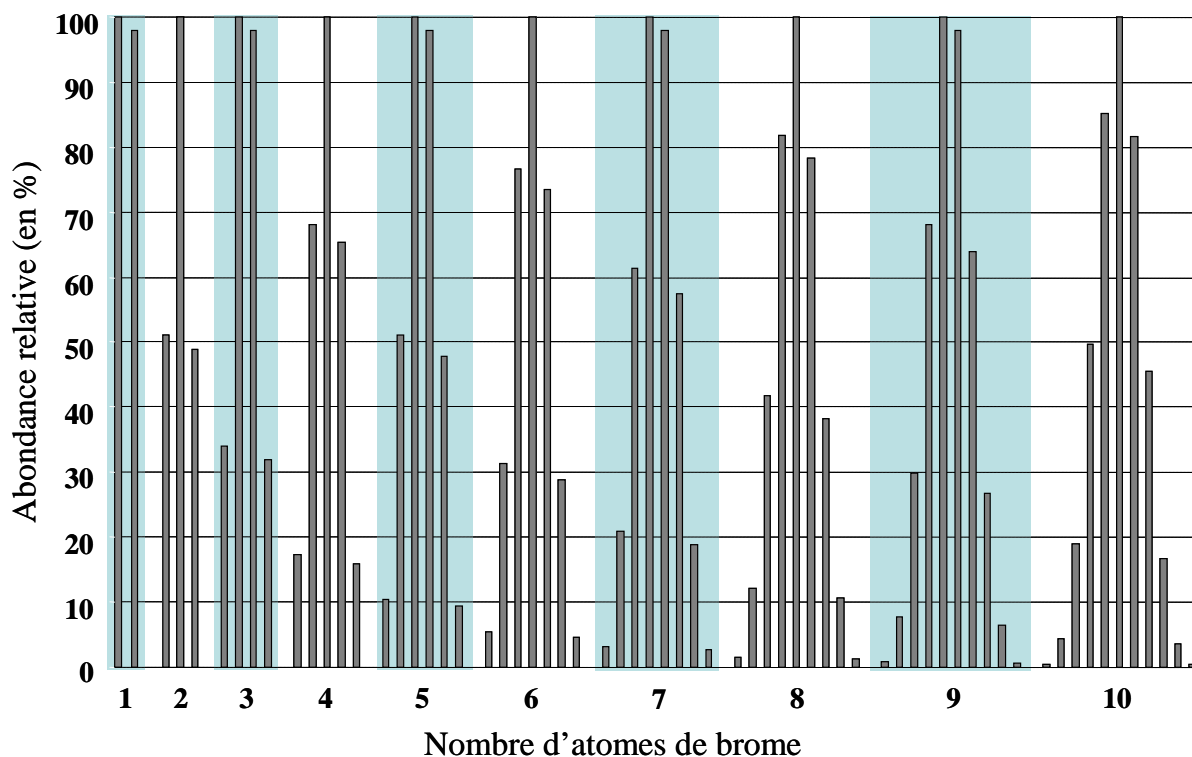


Fig. 14. Massifs isotopiques théoriques caractéristiques de composés comportant de 1 à 10 atomes de brome.

Notre objectif principal était de développer une méthode de couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse, afin de faciliter l'identification de ces composés et notamment l'identification des produits de biotransformations issus du métabolisme du TBBPA et du DBDE.

Ce travail a conduit à deux publications: la première consistant en la mise au point d'une méthode d'identification de quelques congénères des PBDE par spectrométrie de masse grâce à la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI), la seconde résultant de la mise au point des méthodes d'identification des RFB et de leurs produits de dégradation par couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (LC-APPI-MS).

Cependant, il est important de noter que préalablement au développement de l'ionisation par APPI pour l'identification du TBBPA et ses produits de dégradation et de biotransformation, les identifications étaient réalisées en ionisation par électro-nébulisation (ESI-MS). Cette technique a donc été utilisée, notamment pour la caractérisation des métabolites formés au cours des études *in vitro* du TBBPA.

2.1. Etude des PBDE par APPI-MS et APPI-MS/MS (**article 1**)

2.1.1. Introduction

L'analyse des PBDE, comme celle de leurs analogues chlorés, est couramment réalisée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Hyotylainen et Hartonen, 2002). Cependant, l'analyse des PBDE de haut poids moléculaire (et particulièrement celle du DBDE) est difficile, compte tenu des problèmes de dégradation thermique rencontrés avec cette technique (Covaci *et al.*, 2003). De plus, les sources utilisées en spectrométrie de masse pour ces analyses entraînent une importante fragmentation des PBDE, compliquant l'interprétation des spectres obtenus. Par conséquent, l'identification et la quantification de ces composés par GC-MS est difficile et conduit souvent à une sous-estimation de la quantité de PBDE de poids moléculaire élevé. Le DBDE étant la molécule privilégiée pour notre étude, il était donc indispensable de mettre au point des méthodes impliquant une température d'analyse modérée et l'utilisation d'une technique d'ionisation plus douce. Récemment, la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI) est apparue comme une technique d'ionisation complémentaire permettant l'analyse de composés hydrophobes (Kauppila *et al.*, 2004). L'objectif de notre travail était d'étudier le comportement des PBDE avec cette technique d'ionisation ainsi que celui des ions produits lors de collisions en spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

2.1.2. Résultats

Le détail des réglages des paramètres du spectromètre de masse sont récapitulés dans la partie « matériels et méthodes » de l'article 1. Les résultats obtenus concernent 17 congénères standards: 2 diBDE, 1 triBDE, 3 tétraBDE, 4 pentaBDE, 2 hexaBDE et 4 heptaBDE et le DBDE.

Afin de mener à bien des analyses en APPI-MS, il a été indispensable d'ajouter au mélange à analyser 1 % de toluène (dopant couramment utilisé en APPI), pour favoriser l'ionisation et obtenir ainsi un signal convenable pour les produits à identifier.

L'ionisation positive, ou négative, a été utilisée en fonction du degré de bromation du PBDE. Les congénères faiblement bromés (mono- à tétraBDE) sont plus facilement ionisés en mode positif, formant un ion M^+ . Les autres congénères (pentaBDE à DBDE) sont préférentiellement ionisés en mode négatif, formant ainsi un ion $[M-Br+O]^-$ probablement issu de la substitution d'un atome de brome par un atome d'oxygène présent dans la source. Cependant, cette substitution n'a lieu que lorsque les congénères ont au moins un atome de brome situé en position para sur le cycle par rapport à l'oxygène central. Si le mode d'ionisation le plus efficace dépend du nombre d'atomes de brome présents sur la molécule, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permet de différencier les isomères entre eux. Ainsi, nous avons déterminé que les ions fragments obtenus par collision de l'ion parent majoritaire ainsi que l'abondance relative de ces ions varient en fonction de l'isomère analysé. La perte de $COBr$ observée lors des analyses en mode positif, est détectée uniquement pour les congénères n'ayant pas d'atome de brome en position ortho (figure 1 et 2, article 1). Les ions fragments obtenus lors de la MS/MS en mode négatif résultent majoritairement de la perte de Br_2 , mais également de la cassure de la molécule en 2 parties (schéma 4, article 1), l'abondance relative de ces ions variant avec l'isomère analysé (figure 3 et 4, article 1).

2.1.3. Résultats complémentaires

Après la publication de cet article, nous avons poursuivi notre travail en précisant le comportement d'autres congénères ainsi que celui de quelques produits dérivés des PBDE disponibles dans le commerce: les 3 nonaBDE, un pentaBDE hydroxylé et un pentaBDE méthoxylé ont été analysés en APPI-MS en mode d'ionisation négatif.

et leur abondance relative varient en fonction de l'isomère analysé. Cette technique semble très prometteuse pour l'analyse des PBDE. C'est une méthode d'ionisation douce induisant très peu de fragmentation en source, et pouvant permettre de différencier facilement les congénères. Cette technique, couplée à la chromatographie liquide, apparaît adaptée pour l'identification structurale des différents congénères, dans le cadre d'études de métabolisme. Au-delà de ces études, l'APPI-MS semble également être une technique de choix pour la quantification des PBDE. Les défauts de détection, notamment concernant le DBDE et les congénères de haut poids moléculaire, entraînés par la débromation de ces composés due à l'utilisation de températures élevées lors de l'analyse en GC-MS, sont écartés avec l'APPI-MS. Cette technique est donc un atout pour l'analyse et pour l'exactitude de la quantification des PBDE et principalement pour les congénères de haut poids moléculaire, sachant que ces composés fortement bromés (octa-, nonaBDE et DBDE) sont couramment détectés dans les études récentes concernant la quantification des PBDE dans les différentes matrices environnementales ou biologiques. L'APPI-MS pourrait permettre la quantification et le dosage de ces composés présents dans les matrices à l'état de traces. En effet, des tests préliminaires ont été effectués en LC-APPI-MS à partir d'extraits de matrices biologiques humaines (préparées par le Laberca à Nantes, dans le cadre du programme AFSSET RD 2004-011), cette technique s'est avérée prometteuse pour l'identification des PBDE, notamment pour les congénères de haut poids moléculaire (nonaBDE, DBDE) présents dans ces matrices. Pour le programme AFSSET, l'analyse des échantillons biologiques a été effectuée au Laberca, par GC-MS (haute résolution). Compte tenu de la dégradation du DBDE par la perte d'un atome de brome provoquée par cette technique, un doute persistait quant à la réelle présence de nonaBDE dans les matrices biologiques humaines. La mise en évidence de nonaBDE par LC-APPI-MS confirme sans équivoque leur présence dans les matrices analysées.

Article 1

A. Riu, D. Zalko, L. Debrauwer. Study of polybrominated diphenyl ethers using both positive and negative atmospheric pressure photoionization and tandem mass spectrometry. Rapid Communication in Mass Spectrometry; 20: 2133-2142 (2006).

Study of polybrominated diphenyl ethers using both positive and negative atmospheric pressure photoionization and tandem mass spectrometry

Anne Riu, Daniel Zalko and Laurent Debrauwer*

Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1089 Xénobiotiques INRA-ENVT, 180 chemin de Tournefeuille, BP3, 31931 Toulouse Cedex 9, France

Received 22 March 2006; Revised 28 April 2006; Accepted 2 May 2006

Atmospheric pressure photoionization (APPI) was assessed for the mass spectrometric analysis of polybromodiphenyl ethers (PBDEs) on the basis of a set of 17 standard compounds. Positive and negative ionization modes were both investigated. M^+ ions were formed under positive ion conditions whereas the negative ion mode yielded $[M-Br+O]^-$ ions. The behavior of these APPI-produced ions towards collisional activation was studied using an ion trap mass spectrometer. In positive ion mode, the loss of Br_2 was one of the major fragmentation pathways, and was favored for ortho-substituted PBDEs. Conversely, the loss of $COBr$ occurred only for non-ortho-substituted congeners. The collisional excitation of $[M-Br+O]^-$ ions in the ion trap also led to the loss of Br_2 , to the elimination of HBr , and to the formation of product ions by cleavage of the ether bond. The formation of para-quinone radical anions was observed for PBDEs ranging from penta- to hepta-congeners, whereas brominated aromatic carbanions were formed preferentially for the most brominated PBDEs studied in this work (hepta- or deca-BDEs). M^+ ions did not undergo this fragmentation process. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Brominated flame retardants (BFRs) are added to polymers, in plastics, textiles, electronics circuitry and other materials, to prevent or minimize fire damage.¹ Thus, BFRs are present in industrial equipment and in many consumer goods such as televisions, computers and furniture. Many of these substances are persistent and lipophilic and have been shown to bioaccumulate in the environment,^{2,3} animals^{4–6} and humans,^{7–11} similarly to other persistent organic pollutants (POPs).¹² BFR production is dominated by two main compound classes: tetrabromo-bisphenol A (TBBPA) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) estimated at over 120 000 and 65 000 tons/years, respectively.¹²

In contrast to TBBPA, which forms part of the chemical structure of polymers, PBDEs are only additive compounds dissolved in polymeric materials.^{1,12} The penta-, octa- and decabromodiphenyl ethers are the compounds mainly used in such applications, but there are actually 209 possible congeners of PBDEs.¹³ These various congeners possess specific chemical and physical properties which lead to a range of biological and toxicological effects. Recently, some PBDEs have been shown to be neurotoxic,¹⁴ and to act as

endocrine disruptors.^{15–17} Although their impact on the environment and their potential risk for animals are of concern to the scientific community, little is known about the fate of these compounds in the environment or in living organisms.

Increasing PBDE levels have been found in biota¹⁸ and humans¹⁹ in the past 20 years and due to this trend, several analytical methods have been developed since the late 1990s for the determination of PBDEs.^{20,21} Owing to their similarity to chlorinated POPs, the analysis of PBDEs is usually achieved by gas chromatography (GC) coupled to electron capture or mass spectrometric (MS) detection. However, the analysis of highly brominated congeners (particularly DBDE) is known to be difficult due to thermal degradation problems.²⁰ Moreover, a relative lack of sensitivity is observed with electron ionization (EI) for highly brominated PBDEs. Electron capture negative ionization (ECNI), based on the monitoring of the m/z 79 and 81 bromide ions, is the most widely used method for the analysis of PBDEs.²² Liquid chromatography/mass spectrometric (LC/MS) techniques using electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) have also been developed for the analysis of BFRs such as TBBPA or hexabromocyclododecane (HBCD).^{23–25} Recently, atmospheric pressure photoionization (APPI) has appeared as a complementary ionization technique, allowing the analysis of hydrophobic compounds.²⁶

*Correspondence to: L. Debrauwer, Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1089 Xénobiotiques INRA-ENVT, 180 chemin de Tournefeuille, BP3, 31931 Toulouse Cedex 9, France.

E-mail: Laurent.Debrauwer@toulouse.inra.fr

Contract/grant sponsor: Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET); contract/grant number: RD-2004-011.

Contract/grant sponsor: Conseil Régional Midi-Pyrénées; contract/grant number: 03011987.

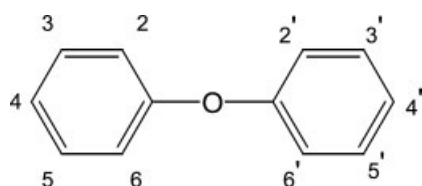
A recent study in our laboratory has shown APPI to be a promising technique for the LC/MS analysis of 'heavy' BFRs or related degradation compounds in general, and PBDEs in particular.^{27,28} The main objective of this study was to investigate the behavior of PBDEs towards the APPI process as well as the behavior of the APPI-produced ions towards low-energy collisions in tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments, with the further goal of developing LC/APPI-MS methods for the analysis of the highly brominated PBDEs, which are difficult to analyze by GC/MS. In this context, this paper presents the investigation of APPI as a ionization technique which may render PBDEs amenable to LC/MS analysis. The various ions formed by 17 different standard compounds under both positive and negative APPI conditions were investigated as well as the main product ions observed in MS/MS experiments in an ion trap mass spectrometer.

EXPERIMENTAL

Chemicals

The PBDE standards used, BDE-7, 15, 17, 47, 54, 77, 85, 100, 119, 126, 138, 155, 182, 183, 184 and 190 (Table 1), were purchased from Wellington Laboratories (Guelph, ON, Canada). BDE-209 (dipentabromophenyl ether, DBDE; purity: >98%) was purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). DBDE was a mixture of octa-BDEs, nona-BDEs and DBDE ($\geq 97\%$ DBDE). Starting solutions (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in nonane) were diluted in MeOH/H₂O (50:50, v/v) to a final concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Due to its very low solubility in polar solvents, deca-BDE was first prepared as hexane/toluene solutions and thus a higher proportion of toluene (used as the doping agent) was used

Table 1. Standard PBDE congeners used in the study



Congener	Bromine	Substitution pattern
BDE-7	2	2,4-
BDE-15	2	4,4'-
BDE-17	3	2,2',4-
BDE-47	4	2,2',4,4'-
BDE-54	4	2,2',6,6'-
BDE-77	4	3,3',4,4'-
BDE-85	5	2,2',3,4,4'-
BDE-100	5	2,2',4,4',5-
BDE-119	5	2,3',4,4',6-
BDE-126	5	3,3',4,4',5-
BDE-138	6	2,2',3,4,4',5'-
BDE-155	6	2,2',4,4',6,6'-
BDE-182	7	2,2',3,4,4',5,6'-
BDE-183	7	2,2',3,4,4',5',6-
BDE-184	7	2,2',3,4,4',6,6'-
BDE-190	7	2,3,3',4,4',5,6-
BDE-209	10	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-

for the analysis of this compound. All solvents (analytical grade) used in this study were purchased from Scharlau Chemie SA (Barcelona, Spain).

Mass spectrometry

The mass spectra were acquired on a quadrupole ion trap mass spectrometer (Finnigan LCQ DecaXP; Thermo Electron, Les Ulis, France) fitted with the Finnigan APCI/APPI dual ionization source. This source generates 10 eV photons by means of a VUV krypton discharge lamp. Except for the assessment of various solvent systems and doping agents, sample solutions (typically 1 ng/ μL in MeOH/H₂O (50:50), 1% toluene) were introduced into the ionization source at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Typical ionization source operating conditions were as follows: heated nebulizer temperature, 300°C; heated transfer capillary temperature, 250°C; sheath gas flow rate, 25 (arb. units); auxiliary gas flow rate, 5 (arb. units). MS/MS experiments were carried out in the resonant excitation mode using a 1.5 Th isolation window. All other parameters for MS and MS/MS experiments were adjusted for each compound in order to obtain maximum sensitivity and structural information for the compound of interest. All analyses were achieved under automatic gain control conditions using helium as the damping as well as the collision gas for MS/MS experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimal conditions for the analysis of PBDEs in APPI-MS

A set of model PBDEs with various degrees of bromination was used for the assessment of APPI solvent systems. Five different solvent systems were tested, two reversed-phase and three normal-phase solvent mixtures. Mixtures (50:50, v/v) of acetonitrile (ACN)/H₂O and MeOH/H₂O for reversed-phase systems, and heptane/methylene chloride, hexane/methylene chloride and heptane/isopropanol for normal-phase systems, were assessed. For all these solvent systems, toluene and acetone, the two most frequently used doping agents for APPI,²⁹ were tested. Use of a doping agent is known to enhance the APPI process.^{29–31} Efficient doping agents have ionization energies lower than 10 eV so that they are ionized by the photons emitted by the VUV krypton lamp. The dopant photoions produced have relatively high recombination energies or low proton affinities, so that they may react by charge exchange or proton transfer with neutral species present in the atmospheric pressure ion source. Ion signals were obtained for the solvent systems under both positive and negative ion modes in the case of reversed-phase systems. Under positive ionization conditions, M⁺ ions were formed whereas [M–Br+O]⁺ ions were observed in the negative ion mode. Based on these ions, sensitivity was better with MeOH/H₂O mixtures than with ACN/H₂O mixtures, as indicated in Table 2. The normal-phase systems gave weak M⁺ ions in positive ion APPI (PI-APPI) whereas no signal was obtained by negative ion APPI (NI-APPI), suggesting that normal-phase systems were inappropriate for the analysis of PBDEs by NI-APPI. It should be noted that virtually no signal could be obtained without the use of a doping agent whatever the solvent system used. Of the

Table 2. Observed signal-to-noise ratios for the APPI analysis of PBDEs using different solvent systems (values reported are mean values calculated from triplicate analyses of 500 pg of various penta- and hexa-PBDEs by FIA)

Solvent system	PI-APPI (M^+ ions)			NI-APPI ($[M-Br+O]^-$ ions)		
	0% Toluene	1% Toluene	5% Toluene	0% Toluene	1% Toluene	5% Toluene
MeOH/H ₂ O (50:50)	2	15	6	3	25	8
ACN/H ₂ O (50:50)	—	7	3	—	16	4
CH ₂ Cl ₂ /hexane	—	4	—	—	—	—

doping agents tested, toluene was found to give better results than acetone (data not shown). The photoions of toluene gave better ionization of PBDEs, when added at 1% in the solvent system. When the dopant was added at 5%, the signal intensity was increased by about 5 to 10 times depending on the degree of bromination of the PBDE being studied. However, the chemical noise was also greatly increased, yielding lower signal-to-noise (S/N) ratios than those obtained with 1% toluene (see Table 2). Moreover, the use of high toluene content may cause miscibility problems in the case of reversed-phase solvent systems containing water. Therefore, 1% of toluene in the solvent system was preferred for the continuation of our study. Thus, optimal conditions to analyze PBDEs in APPI-MS were: solvent system, MeOH/H₂O (1:1, v/v) with 1% toluene as dopant.

Study of PBDE congeners using positive APPI

Positive APPI of PBDEs

The molecular ions of standard isomeric PBDEs were compared in order to highlight general behavior trends in low-energy collisional activation according to the level of bromine substitution. The standard PBDEs studied in this work ranged from the dibrominated to decabrominated congeners and they are listed in Table 1.

As previously mentioned,²⁸ detection of positive ions gave more sensitive results for the weakly brominated congeners. Intense signals were produced for the PBDE congeners ranging from di- to penta-BDEs whereas hexa- and hepta-BDEs were less sensitive and almost no signal could be obtained for PBDEs bearing more than seven bromine (Br) atoms. Therefore, the behavior of molecular ions of PBDEs towards low-energy collisional excitation was studied for congeners ranging from di- to hepta-BDEs, although some results could also be obtained on deca-BDE. As a general rule, collision-induced dissociation (CID) experiments were carried out on the most abundant isotopic ion of the brominated molecular isotopic cluster for each compound.

For all PBDEs considered in this work, positive ionization yielded M^+ ions and the signal observed at $M+1$ did not exceed the natural ¹³C isotopic contribution. PI-APPI is considered to preferentially yield M^+ ions for low proton affinity compounds whereas MH^+ ions may be formed by proton transfer for higher proton affinity compounds. In a study on the metastable atom bombardment (MAB) ionization of PBDEs using N₂ as the metastable bombardment gas, Ikononou and Rayne³² reported that the number of ortho-Br atoms was an important factor in the stability of gaseous phase M^+ ions produced from such molecules. The

electron population at the highest occupied molecular orbital (HOMO) was reported to be higher for ortho-Br atoms than for meta- and para-Br atoms. The presence of ortho-Br atoms may also lead to a higher electron population of the oxygen atom due to an 'ortho-effect'. Thus, the electron ejection process involved in the formation of the M^+ ions is more favored for ortho-Br atoms than for Br atoms in other positions. Based on these considerations, it seems reasonable to assume (although the related data are not available in the literature) that the ortho-brominated PBDEs have lower ionization energies than other congeners. The energies transferred to samples in the MAB N₂ mode and during the APPI process are in the same range (8.5–11.9 eV for the metastable states of the nitrogen molecules and 10 eV and 10.6 eV for the Kr discharge VUV lamp). These energies are close to the ionization energies of many organic compounds and the residual energy remaining on the molecular ions produced is relatively small, compared with the residual energy under EI conditions. This results in the formation of M^+ ions carrying only weak internal energies and, thus, no significant fragmentation occurs. Under EI conditions, the situation differs since the dissociation of the highly ortho-brominated congeners has higher rate constants than those characterizing the other congeners, as reported by several authors.^{33–35} On the basis of molecular modeling calculations, ortho-(C-Br) bond lengths were reported to be longer than those of both the meta- and the para-(C-Br) bonds.³² This means that the bond length is inversely correlated to the bond strength. This property may explain why the M^+ ions, which were not observed under EI (i.e. for degrees of bromination higher than four to five Br atoms), may also fragment more readily in CID experiments carried out from APPI-produced M^+ ions of ortho-substituted PBDEs than from non-ortho analogues.

CID experiments on the PI-APPI-produced M^+ molecular ions from PBDEs

di-BDEs: Under positive APPI conditions, dibromodiphenyl ethers (BDE-7 and BDE-15) yielded M^+ ions for which the isotopic pattern was centered on m/z 328 (see Fig. 1(a)). When selected as the precursor ion in the ion trap, the m/z 328 ions (⁷⁹Br⁸¹Br isotopomer) gave a major product ion at m/z 168 for a resonant excitation voltage of 1.25 V_{p-p} (Table 3). This corresponded to the elimination of Br₂. This elimination was a major process for BDE-7 (Fig. 1(b)), whereas it was only weakly observed for BDE-15 (Fig. 1(c)), suggesting that the BDE-15 m/z 328 precursor ion was more stable than the BDE-7 one. BDE-15 has two Br atoms in para positions of the diphenyl ether function, whereas BDE-7 bears two Br atoms

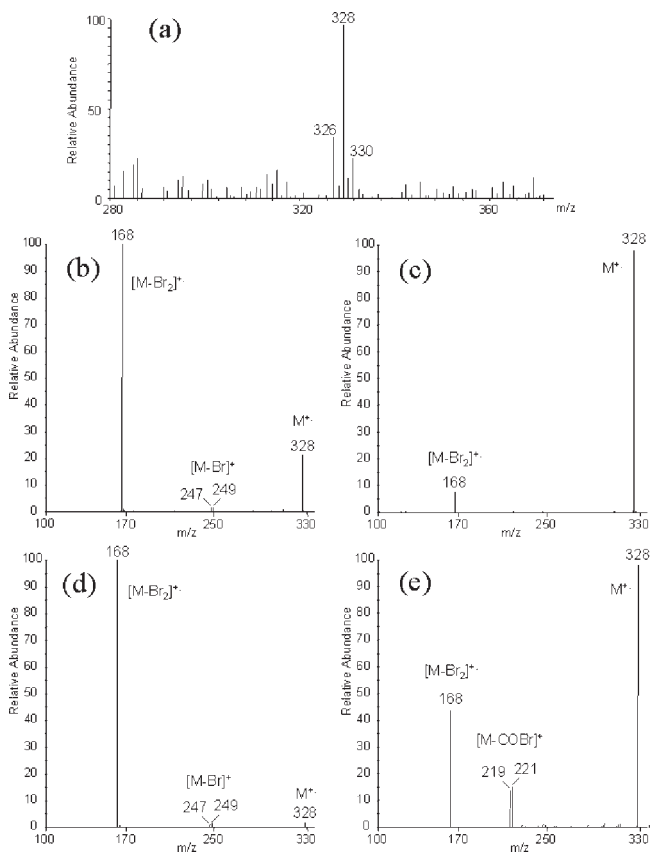


Figure 1. PI-APPI mass spectrum of (a) the dibromodiphenyl ether BDE-15; MS/MS spectra of the m/z 328 precursor ion obtained at 1.25 V_{p-p} excitation voltage for (b) BDE-7 and (c) BDE-15, and MS/MS spectra of the m/z 328 precursor ion obtained at 1.85 V_{p-p} excitation voltage for (d) BDE-7 and (e) BDE-15.

on the same aromatic ring, in ortho and para positions relative to the diphenyl ether function. This gives BDE-15 a greater stability since C–Br bond lengths have been reported to be shorter for para positions than for ortho positions.³² The loss of Br was also observed as a minor fragmentation pathway for BDE-7 whereas it did not occur for BDE-15. Conversely, the MS/MS spectrum of BDE-15 displayed a product ion at m/z 219 (Fig. 1(e)), which was not observed for BDE-7. The signal intensity of this ion was enhanced by increasing the excitation voltage from 1.25 to 1.85 V_{p-p} (Figs. 1(d) and 1(e)). Although not confirmed by high-resolution MS measurements, this ion can reasonably be attributed to $[M-COBr]^+$.

tri-BDEs: As expected, the PI-APPI mass spectrum of BDE-17 (see Table 1) displayed M^+ ions with an isotopic pattern distributed between m/z 404 (34% relative abundance), m/z

406 (100%), m/z 408 (97%) and m/z 410 (33%), characteristic of a tribrominated species. From this isotopic cluster, the m/z 406 ion ($^{79}Br_2^{81}Br$ isotopomer) was selected and collisionally activated (1.25 V_{p-p} excitation voltage). The resulting product ions are reported in Table 3. As observed for BDE-7, the elimination of Br_2 was the major decomposition process of BDE-17, and only weak $[M-Br]^+$ ions were detected. This behavior followed the same trend as observed for di-BDEs, confirming that the elimination of two Br atoms is favored when at least one ortho position is brominated. No $[M-COBr]^+$ product ion was observed for this compound whatever the excitation voltage applied.

tetra-BDEs: As observed for di- and tri-BDEs, tetra-BDEs (BDE-47, BDE-54, BDE-77) also displayed M^+ ions. The isotopic cluster was centered on m/z 486, as indicated in Fig. 2(a) for BDE-77. The CID mass spectra generated from the m/z 486 ion ($^{79}Br_2^{81}Br_2$ isotopomer) for the three tetrabrominated isomers (excitation voltage, 1.25 V_{p-p}) are shown in Figs. 2(b), 2(c) and 2(d), respectively. As expected from the previous results, the congener bearing all its Br atoms in the ortho positions (BDE-54) was the least stable molecular ion. This confirmed that the stability of M^+ ions decreased with an increasing number of ortho-Br atoms. The CID spectra of the m/z 486 ion from BDE-47 and BDE-54 displayed abundant $[M-Br_2]^+$ product ions at m/z 324/326/328 (in 0.167/0.666/0.167 respective proportions) and, to a lesser extent, a $[M-Br]^+$ ion at m/z 405/407 (Figs. 2(b) and 2(c)), whereas the M^+ ion from BDE-77 proved to be more stable (Fig. 2(d) and Table 3). On increasing the tickle voltage to 2.00 V_{p-p} , BDE-77 underwent specific decomposition processes leading to $[M-COBr]^+$ and $[M-Br_2-Br]^+$ ions at m/z 377/379 and 245/247, respectively (Fig. 2(e)), which were not observed for BDE-47 and BDE-54 (data not shown). Thus, BDE-77 behaved similarly to BDE-15, indicating that the elimination of COBr required the absence of any Br atom in the ortho position. A mechanism is proposed in Scheme 1 for the elimination of COBr in the case of BDE-77 taken as an example. This involves the loss of $\cdot Br$ followed by rearrangements leading to the subsequent elimination of CO. Although this mechanism could rationalize the decomposition process, it could not explain the requirement for there to be no Br atom at the ortho position for the fragmentation to proceed.

penta-BDEs: These compounds were characterized by M^+ ions displaying an isotopic cluster centered on m/z 564. The MS/MS spectra of the selected m/z 564 ($^{79}Br_3^{81}Br_2$ isotopomer) precursor ions (resonant excitation voltage of 1.25 V_{p-p}) displayed abundant product ions at m/z 402/404/406, corresponding to the loss of Br_2 for BDE-85 and BDE-100 (Table 3). When excited at this voltage, the m/z 564 ions of

Table 3. Selected precursor ions and observed product ions (and their relative abundances) for different PBDEs analyzed by PI-APPI-MS/MS

BDE	7	15	17	47	54	77	85	100	119	126
M^+ Selected m/z	328(20)	328 (100)	406 (32)	486 (100)	486 (10)	486 (100)	564 (60)	564 (100)	564 (100)	564 (100)
$[M-^{79}Br]^+$	249 (2)	—	—	407 (1)	407 (3)	—	—	—	—	—
$[M-^{81}Br]^+$	247 (2)	—	—	405 (1)	405 (4)	—	—	—	—	—
$[M-(^{79}Br)_2]^+$	—	—	248 (50)	328 (18)	328 (22)	328 (1)	406 (45)	406 (31)	—	—
$[M-^{79}Br^{81}Br]^+$	168 (100)	168 (20)	246 (100)	326 (75)	326 (100)	326 (5)	404 (100)	404 (63)	—	—
$[M-(^{81}Br)_2]^+$	—	—	—	324 (23)	324 (24)	324 (1)	402 (15)	402 (12)	—	—

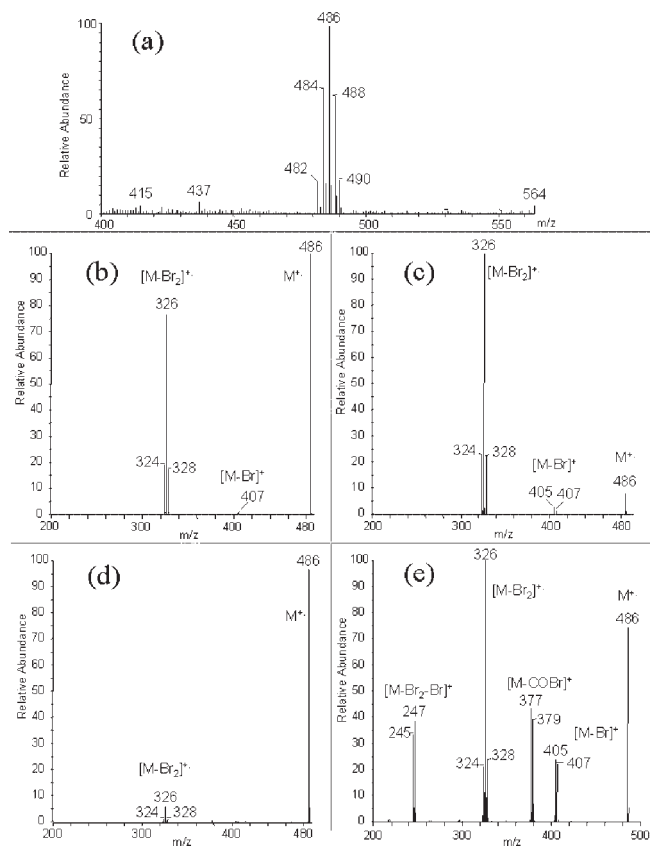
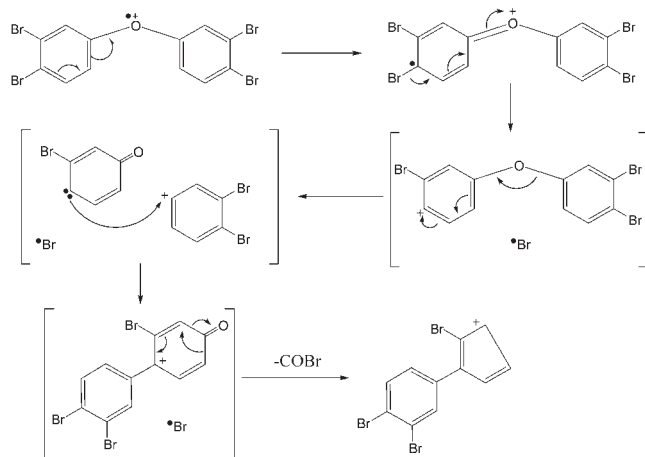


Figure 2. (a) PI-APPI mass spectrum of BDE-77; MS/MS spectra of the m/z 486 ion for three isomeric tetra-BDEs (excitation voltage, $1.25 V_{p-p}$): (b) BDE-47, (c) BDE-54, and (d) BDE-77, and (e) MS/MS spectrum of BDE-77 (excitation voltage, $2.00 V_{p-p}$).

BDE-119 and BDE-126 did not fragment (see Table 3), indicating that the $M^{+\cdot}$ ions of these latter penta-BDEs were more stable than the two others (BDE-85 and BDE-100). This confirmed that the loss of Br_2 is favored when two ortho-Br substituents are present on positions 2 and 2' of the aromatic rings. In the case of BDE-119, two Br atoms are present in the ortho position but on the same aromatic ring. This configuration gave no fragmentation of the m/z 564 precursor ion for an excitation voltage of $1.25 V_{p-p}$. On increasing the



Scheme 1. Proposed mechanism for the loss of COBr from APPI-produced $M^{+\cdot}$ ions of BDE-77.

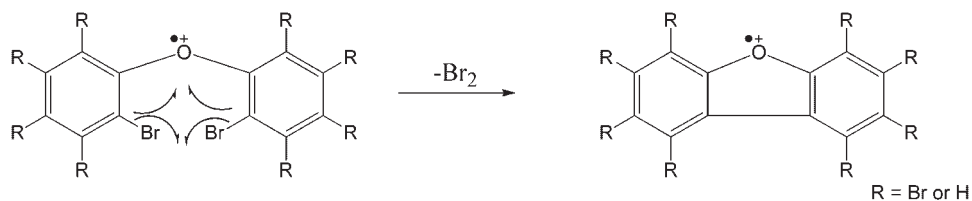
excitation voltage to $2.0 V_{p-p}$, the loss of 107 Da to yield the $[M-COBr]^+$ product ion (m/z 455/457) took place only for BDE-126, also confirming that this decomposition pathway is observed only for congeners with no bromine-substituted ortho position. This $[M-COBr]^+$ product ion can be considered as diagnostic of PBDEs bearing no ortho-Br atom, since they were observed only from APPI-produced $M^{+\cdot}$ ions of PBDEs with no substituted ortho position (i.e. BDE-15, BDE-77 and BDE-126 in this work). This trend was different from that observed for PBDEs in EI, where the loss of COBr has been reported as reflecting the presence of one Br atom at an ortho position (except for the monobrominated BDE-3 congener).³⁵ Similarly, the loss of COCl was monitored for the low-resolution EI-MS determinations of dioxins.^{36,37}

hexa- and hepta-BDEs: The $M^{+\cdot}$ isotopic cluster of BDE-138 and BDE-155 (hexa-BDEs) was observed between m/z 638 and 650, and BDE-182, BDE-183, BDE-184 and BDE-190 (hepta-BDEs) gave $M^{+\cdot}$ ions distributed from m/z 716 to 730. By isolation and subsequent excitation ($1.25 V_{p-p}$) of the most abundant ion of their molecular ion cluster (i.e. m/z 644 ($^{79}Br_3^{81}Br_3$ isotopomer) and m/z 722 ($^{79}Br_4^{81}Br_3$ isotopomer) for hexa- and hepta-BDEs, respectively), all these compounds gave $[M-Br_2]^+$ (relative abundance 100%) and $[M-Br]^+$ (relative abundance ca. 1%, data not shown) as the only product ions. Here again, no $[M-COBr]^+$ product ion was formed for these congeners which all displayed at least two Br atoms at the ortho positions. As a general trend, our results indicated that for PBDEs bearing more than two Br atoms, the loss of two Br atoms was observed as a major process relative to the loss of one bromine radical. We also observed that the loss of two Br atoms was more likely for congeners displaying at least one Br atom in the ortho position. In the absence of any ortho-Br atoms (e.g. BDE-15, BDE-77, BDE-126), the decomposition of $M^{+\cdot}$ ions was more difficult and led to $[M-Br_2]^+$ product ions of lower relative abundances (Table 3). These results are in agreement with previously published work using EI,^{33–35} where it was reported that $[M-Br_2]^+$ ions are the major product ions formed (especially for PBDEs bearing six Br atoms or more) and that their formation was even more favored in the presence of ortho-Br atoms. For PBDE congeners bearing two ortho-Br atoms in the 2, 2' positions, a decomposition pathway involving the simultaneous homolytic cleavage of the two ortho C–Br bonds, leading to Br_2 and a polybrominated dibenzofuran, can be considered (Scheme 2). On the other hand, in the case of congeners with only one ortho-Br atom, the elimination of Br_2 probably takes place sequentially with the initial loss of the ortho-Br substituent to form a Br^\cdot radical, which subsequently abstracts a second Br atom from elsewhere on one of the aromatic rings as proposed in Scheme 3. This sequential elimination has also been previously related by Ikonomou and Rayne for MAB-generated ions.³²

Study of PBDE congeners using negative APPI

Negative APPI of PBDEs

The analysis of the same PBDE congeners was carried out by negative ion APPI. No significant signal could be obtained



Scheme 2. Proposed mechanism for the loss of Br₂ from APPI-produced M⁺ ions of 2,2'-brominated PBDEs.

for PBDE congeners up to tribrominated compounds. The ionization yield was very weak for tetra-BDEs and increased with the number of Br atoms of the considered PBDE. Thus, for PBDEs ranging from tetra- to decabrominated analogues, the negative APPI process led to the formation of [M-Br+O]⁻ ions. The formation of such ions from BFRs has already been reported by Traldi and coworkers.³⁸ These authors reported that these ions could reasonably originate from an initial dissociative resonance capture leading to [M-Br]⁻ ions, which could immediately react with oxygen molecules present in the atmospheric pressure source. The important role of oxygen in the negative APPI process has also been underlined in other investigations on the APPI mechanism.^{26,29} Kauppila *et al.* described the formation of [M-X+O]⁻ ions from polychlorinated, nitro- or other aromatic compounds by means of negative ion APPI-MS.^{26,29} They considered that these ions were formed by substitution reactions involving O₂⁻ ions generated from O₂ present in the ambient air of the APPI source, as follows:



(with e.g. X = Cl or NO₂ in the case of hexachlorobenzene or 1,4-dinitrobenzene, respectively²⁹).

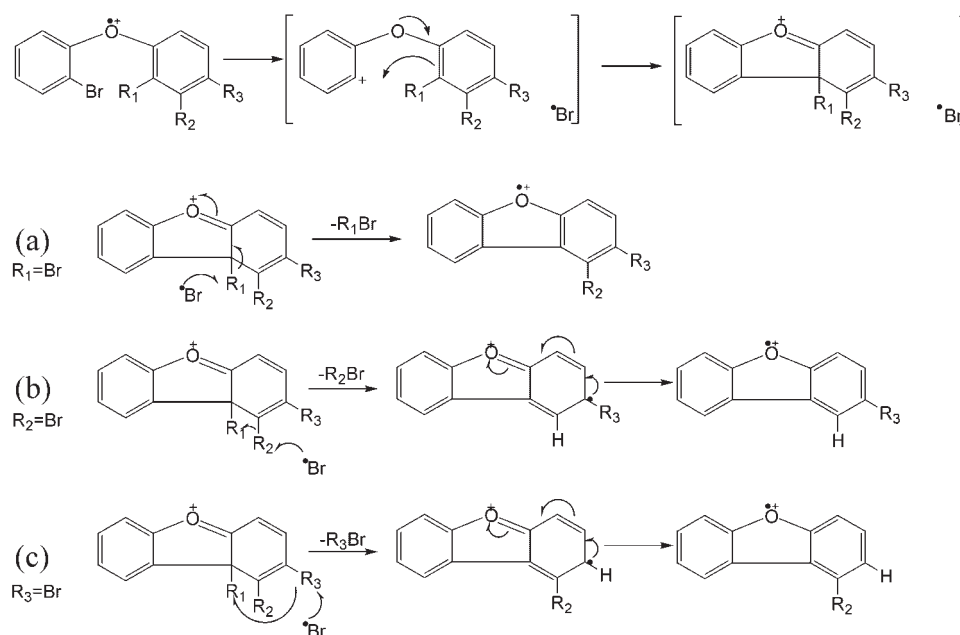
Whatever the process involved in the formation of the [M-Br+O]⁻ ion, it seemed to take place only for highly

brominated compounds since negative ions could not be observed for di- or tri-BDEs, probably because these latter compounds are not sufficiently chemically activated.

Until now, the production of negative ions from PBDEs has exclusively been achieved by means of electron capture negative ionization (ECNI). This soft ionization technique has been described as producing Br⁻ ions as the most abundant ions, except for BDE-209 (deca-BDE), for which the ion of *m/z* 487 formed by cleavage of the ether bond has been reported as the predominant ion.^{11,20,33,39} The formation of [M-Br+O]⁻ ions has never been mentioned under ECNI conditions, showing that the presence of reactive oxygen species in the ambient air present in the APPI source is probably needed.

CID experiments on NI-APPI-produced [M-Br+O]⁻ ions from PBDEs

tetra-BDEs: Under NI-APPI, tetra-BDE congeners BDE-47 and BDE-77 were characterized by a tribrominated phenoxide [M-Br+O]⁻ ion centered at *m/z* 421. Under the experimental conditions used in this work, the third tetra-BDE herein studied (BDE-54: 2,2',6,6'-tetraBDE) could not be ionized in negative ion mode. This suggests that the above discussed processes did not take place for BDE-54 as it may not be sufficiently activated to react with O₂⁻ in the



Scheme 3. Proposed mechanisms for the loss of Br₂ from APPI-produced M⁺ ions of (a) 2,2'- (b) 2,3'- and (c) 2,4'-brominated PBDEs.

atmospheric pressure source. Thus, the position of the Br atoms seemed to play an important role in the negative APPI process of PBDEs. The presence of a Br atom at the para position of the aromatic rings of PBDEs may be required for the aromatic substitution reaction with the O_2^- nucleophilic species present in the atmospheric pressure source to occur. However, this observation could not be confirmed due to the lack of other available commercial PBDEs with no bromine atoms at the para position.

The CID spectra of m/z 421 precursor ions ($^{79}Br_2^{81}Br$ isotopomer) showed differences between the BDE-47 and BDE-77 isomers (Table 4). As observed under positive ion conditions, BDE-47 decomposed with a higher rate constant than BDE-77 for the same collision conditions, meaning that the $[M-Br+O]^-$ ions of BDE-77 were more stable than those of BDE-47. Here again, this could reasonably be attributed to the presence of two ortho-Br atoms on BDE-47, inducing enhanced intramolecular attack by ortho effects and then a greater degree of fragmentation. This indicated that the ortho-Br atoms must be retained and were still present in the selected $[M-Br+O]^-$ ions, supporting the hypothesis of the involvement of the para position in the negative ion process. The elimination of HBr constituted the major decomposition process of tetra-BDE $[M-Br+O]^-$ ions. As observed under positive ion conditions, the presence of Br atoms in the ortho positions also favored the elimination of Br_2 , which occurred only for BDE-47.

penta-BDEs: pentabrominated BDE isomers BDE-85, BDE-100, BDE-119 and BDE-126 were characterized by a $[M-Br+O]^-$ ion distributed from m/z 497 to 505. The fragmentations observed from the various penta-BDEs (m/z 501 precursor ion, i.e. $^{79}Br_2^{81}Br_2$ isotopomer) studied are summarized in Table 4. As an example, the NI-APPI mass spectrum of BDE-100 is reported in Fig. 3(a), together with the CID (excitation voltage 1.75 V_{p-p}) spectra of BDE-85 and BDE-100 (Figs. 3(b) and 3(c), respectively). As observed for tetra-BDEs, these CID spectra allowed us to differentiate the positional isomers studied. The stability of the $[M-Br+O]^-$ ions was in the following order: BDE-119 > BDE-126 > BDE-100 > BDE-85 (see Table 4). The decompositions of these compounds mainly involved the elimination of HBr and Br_2 (Table 4). Although of minor abundance, other important product ions were formed by cleavage of the ether bond with charge retention on the phenoxide ion. This led to the formation of the $[C_6H_2O_2^{79}Br_2]^-$, $[C_6H_2O_2^{79}Br^{81}Br]^-$, and $[C_6H_2O_2^{81}Br_2]^-$ product ions at m/z 264, 266 and 268, respectively (Fig. 3 and Table 4). The formation of these ions was favored for BDE-100 (Fig. 3(c)) relative to the other penta-BDEs, and did not take place from BDE-126. Thus, the occurrence of such a product ion may be indicative of the presence of at least one Br atom at the ortho position. It is important to note that product ions corresponding to cleavage of the other C–O bond of the PBDEs (i.e. m/z 249/251/253 corresponding to $[C_6H_3OBr_2]^-$) were not observed. Moreover, no signal was observed at m/z 186–188 (corresponding to a $[C_6H_3O_2Br]^-$ product ion). This suggested that: (i) the ionization process involving the replacement of a Br atom by an O atom preferentially occurred on the tribrominated aromatic ring of the penta-BDEs (unless a Br atom migration could take place) and (ii) the presence of

Table 4. Selected precursor ions and observed product ions (and their relative abundances) for different PBDEs analyzed by NI-APPI-MS/MS

BDE	47	77	85	100	119	126	138	155	182	183	184	190
$[M-Br+O]^-$ selected m/z	421	421	501	501	501	501	579	579	659	659	659	659
$[M-Br+O]^- = [M]^-$	421 (100)	421 (100)	501 (64)	501 (100)	501 (100)	501 (100)	579 (60)	579 (100)	659 (21)	659 (100)	659 (15)	659 (74)
$[M-H^{79}Br]^-$	341 (10)	341 (5)	421 (97)	421 (29)	421 (2)	421 (5)	499 (100)	499 (58)	579 (100)	579 (43)	579 (28)	579 (35)
$[M-H^{81}Br]^-$	339 (5)	339 (2)	419 (100)	419 (32)	419 (2)	419 (6)	497 (64)	497 (43)	577 (98)	577 (35)	577 (32)	577 (33)
$[M-^{79}Br_2]^-$	263 (3)	—	343 (1)	343 (1)	—	343 (1)	421 (10)	421 (6)	501 (4)	501 (39)	501 (22)	501 (23)
$[M-^{79}Br^{81}Br]^-$	261 (5)	—	341 (4)	341 (5)	—	341 (4)	419 (15)	419 (10)	499 (12)	499 (86)	499 (100)	499 (100)
$[M-^{81}Br_2]^-$	259 (2)	—	339 (2)	339 (2)	—	339 (2)	417 (4)	417 (4)	497 (3)	497 (35)	497 (36)	497 (32)
$[C_6H_xBr_yO_2]^-$	—	—	268 (1)*	268 (9)*	268 (1)*	—	268 (—)*	268 (7)*	—	348 (—)**	—	348 (—)**
	—	—	266 (3)*	266 (39)*	266 (3)*	—	266 (1)*	266 (11)*	—	346 (7)**	346 (7)**	346 (6)**
	—	—	264 (3)*	264 (12)*	264 (1)*	—	264 (—)*	264 (4)*	—	344 (5)**	344 (2)**	344 (5)**
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	342 (—)**	—	342 (—)**
$[C_6H_xBr_y]^-$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	317 (8)†	397 (—)‡	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	315 (33)‡	395 (2)‡	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	313 (72)‡	393 (3)‡	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	311 (14)†	391 (2)‡	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	389 (—)‡	—	—	—

* $x = 2, y = 2$.

** $x = 1, y = 3$.

† $x = 2, y = 3$.

‡ $x = 1, y = 4$.

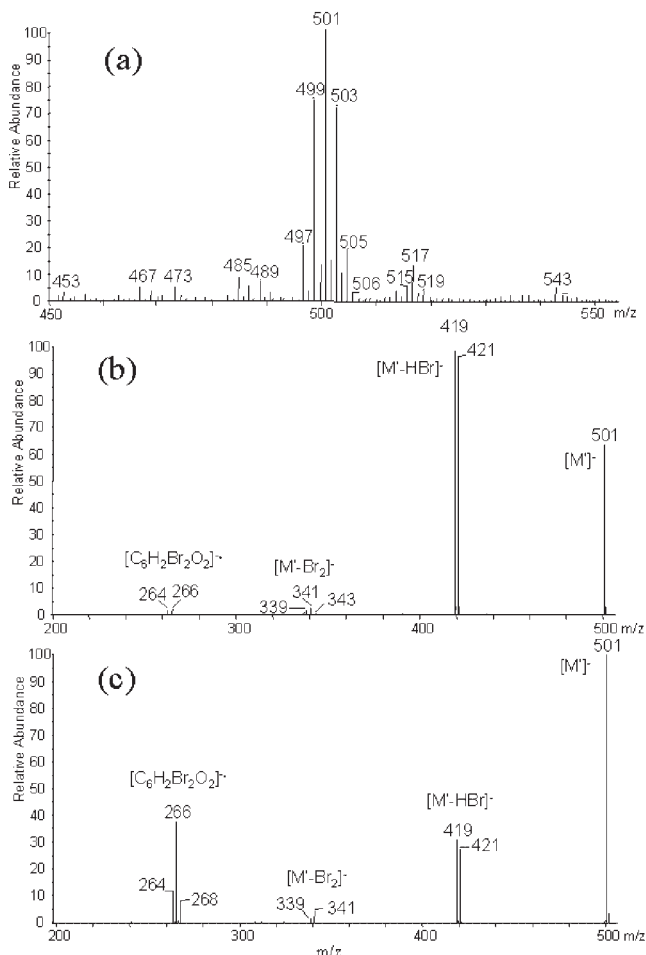


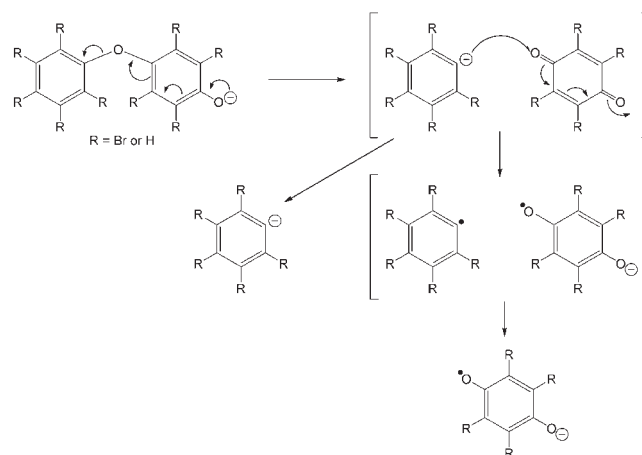
Figure 3. (a) NI-APPI mass spectrum of BDE-100; MS/MS spectra of the m/z 501 precursor ion for (b) BDE-85 and (c) BDE-100 (excitation voltage: 1.75 V_{p-p}).

the para-O atom induced a preferential cleavage of the phenyl ether bond to form a para-dioxygenated species. Indeed, the ortho-Br substituent may induce a steric constraint in the proximity of the ether bond, which could favor its cleavage. This could explain why BDE-126 underwent almost no cleavage of its phenyl ether bond. However, other factors than steric constraints may be considered to explain why the formation of a $[C_6H_2O_2Br_2]^-$ product ion was favored for BDE-100 compared with a structurally close compound such as BDE-85.

hexa-BDEs: The $[M-Br+O]^-$ ions of hexa-BDEs were characterized by an isotopic pattern distributed from m/z 575 to 585. As previously observed, the $[M-Br+O]^-$ ions were found to be more stable for BDE-155 than for BDE-138, confirming that the environment of the ether bond of PBDE is the major factor governing the stability of the $[M-Br+O]^-$ ions towards collisional excitation. The same decomposition processes were observed for hexa-BDEs as for penta-BDEs, i.e. elimination of HBr and Br_2 . Cleavage of the ether bond was also observed but, unlike for penta-BDEs, this process led to different product ions according to the isomer considered (Table 4). For BDE-138, the phenyl ether bond cleavage represented a very minor process (less than 1%

relative abundance, see Table 4) yielding on the one hand $[C_6H_2O_2Br_2]^-$ ions (cluster centered on m/z 266), and on the other $[C_6HO_2Br_3]^-$ ions (cluster centered on m/z 344). The formation of these latter ions must involve the migration of a Br atom from one aromatic ring of BDE-138 to the other. Thus, this possibility has also to be considered in the formation of the m/z 266 ions for penta-BDEs (i.e. migration of a Br atom from the tribrominated aromatic ring since the phenoxy group is at position 4'). In the case of BDE-155, the cleavage of the phenyl ether bond was as favored as the elimination of HBr or Br_2 (see Table 4), but the product ions formed in this case were of a different kind. Indeed, the m/z 311/313/315/317 product ions were observed as the most abundant ions yielded by this decomposition process. These m/z ratios were consistent with the formation of $[C_6H_2Br_3]^-$ ions. This means that, for BDE-155, cleavage of the phenyl ether bond could yield a non-oxygenated product ion. The complementary $[C_6H_2O_2Br_2]^-$ ions were also observed, although in lower abundance. The occurrence of both the $[C_6H_2O_2Br_2]^-$ and $[C_6H_2Br_3]^-$ ions can be explained by considering a decomposition mechanism involving an ion-dipole complex intermediate, as proposed in Scheme 4. The first step of such a mechanism is a charge-induced cleavage of the ether bond of the PBDE leading to an aromatic carbanion and a neutral quinonic species. The dissociation of the ion-dipole complex at this stage leads to the $[C_6H_2Br_3]^-$ ions in the case of BDE-155 taken as an example. On the other hand, the quinone could also undergo a reduction process by attack of the carbanion before the ion-dipole complex dissociates. This leads to the formation of the $[C_6H_2O_2Br_2]^-$ ions observed at m/z 264/266/268 for BDE-155. Factors influencing the orientation of the negative charge before the dissociation of the ion-dipole complex probably include the steric and electronic configuration of the initial PBDE, which govern the relative acidity of the two partners in the ion-dipole complex, as well as the stability of the negatively charged aromatic species which can be formed.

hepta-BDEs: Four isomeric hepta-BDEs, i.e. BDE-182, BDE-183, BDE-184 and BDE-190, were studied in the negative ion mode and yielded abundant hexabrominated $[M-Br+O]^-$



Scheme 4. Proposed mechanism for the formation of $[C_6H_xBr_xO_2]^-$ and $[C_6H_wBr_2]^-$ product ions from APPI-produced $[M-Br+O]^-$ ions of PBDEs.

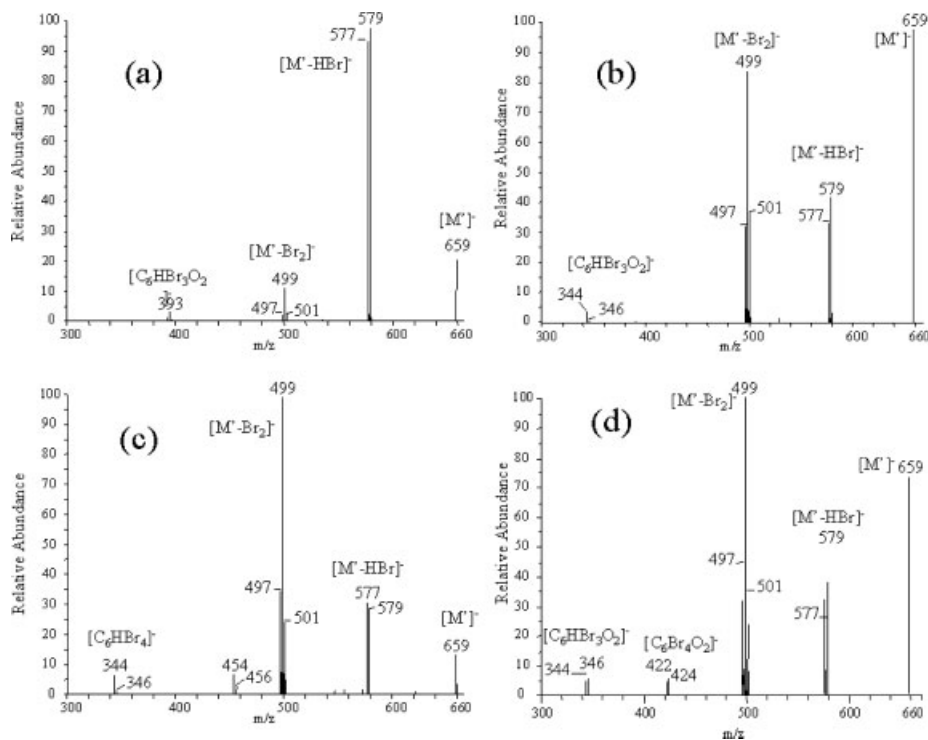


Figure 4. MS/MS spectra of the NI-APPI produced m/z 659 precursor ion for (a) BDE-182, (b) BDE-183, (c) BDE-184, and (d) BDE-190 (excitation voltage: 1.75 V_{p-p}).

ions centered on m/z 659 (data not shown). The CID spectra acquired from the m/z 659 ($^{79}Br_3^{81}Br_3$ isotopomer) ion of BDE-182, BDE-183, BDE-184 and BDE-190 (collision excitation, 1.75 V_{p-p}) are shown in Figs. 4(a), 4(b), 4(c), and 4(d), respectively. Here again, the stability of the $[M^- - Br + O]^-$ ions varied according to the relative positions of the Br atoms on the molecule, with stabilities in the following order: BDE-183 > BDE-190 > BDE-182 > BDE-184. Contrary to what was found for the penta- and hexa-BDEs, the loss of Br_2 was more important than the elimination of HBr for hepta-BDEs (except for BDE-182). Loss of Br_2 may be favored over the elimination of HBr when the number of Br atoms increases, probably as a result of steric decompression. In addition, there are fewer hydrogen atoms in the vicinity of Br atoms in the case of highly brominated PBDEs. Thus, statistically the loss of Br_2 may also be favored over that of HBr in these competitive elimination processes. The MS/MS spectra of the m/z 659 ions of the hepta-BDEs (Fig. 4), also displayed product ions arising from the cleavage of the ether bond, with charge retention on both the oxygenated and the non-oxygenated part of the molecule, depending on the isomer considered. Thus, BDE-182 underwent a cleavage leading to the formation of a $[C_6HBr_4]^-$ product ion centered on m/z 393. On the other hand, collisional excitation of BDE-183 led to a $[C_6H_2O_2Br_2]^-$ radical anion at m/z 344/346. Here again, a decomposition mechanism involving an ion-dipole complex intermediate (Scheme 4) may explain this observation. In such a complex and before its dissociation, the charge location is governed by the relative acidity of each partner of the complex, depending on the structure of the PBDE

congener, i.e. the number and the location of the Br atoms on the diphenyl ether skeleton.

The structure of BDE-190 was different because it had five Br atoms on one aromatic ring and only two on the second aromatic ring. In this case, the cleavage of the ether C–O bond yielded a $[C_6O_2Br_4]^-$ product ion (m/z 424). No $[C_6H_3O_2Br]^-$ ion at m/z 186/188 was formed, indicating that the ionization process occurred on the pentabrominated ring of BDE-190. However, ions were detected at m/z 344/346, indicating that a $[C_6HO_2Br_3]^-$ product ion was also formed. The origin of this ion could not be explained without considering the migration of more than one Br atom from the pentabrominated moiety of BDE-190 or a consecutive fragmentation occurring from the m/z 579 ion.

deca-BDE: The mass spectrum of deca-BDE displayed a $[M^- - Br + O]^-$ ion cluster between m/z 886 and 904. Contrary to what was observed for the less brominated analogues, a major product ion was present in the mass spectrum (isotopic cluster between m/z 483 and 493). This ion resulted from the cleavage of the ether bond of deca-BDE, leading to a $[C_6Br_5O]^-$ product ion. The CID spectrum of deca-BDE (m/z 896 precursor ion, i.e. $^{79}Br_4^{81}Br_5$ isotopomer) displayed, in addition to the $[(M^- - Br + O) - Br_2]^-$ ion present as the base peak, other product ions (3% rel. abundance, data not shown) isotopically distributed from m/z 469 to 477, which could be attributed to a $[C_6Br_5]^-$ species.²⁸ In this case again, the cleavage of the C–O bond occurred with the negative charge located on the non-oxygenated moiety of the precursor ion, probably due to the efficient stabilization of the negative charge by the five Br atoms.

CONCLUSIONS

The initial aim of this work was to investigate the potential of atmospheric pressure photoionization (APPI) for the LC/MS analysis of PBDEs. These compounds are normally analyzed by GC/MS using electron ionization or electron capture negative ionization, and the analysis of the highly brominated PBDE congeners is known to be difficult. This work provides new data on the APPI of PBDEs and shows that APPI can be used for PBDE analyses including quantitative determinations as well as structural investigations, e.g. in the course of metabolism studies. The positive and negative ion modes were complementary depending on the degree of bromination of the PBDE. The behavior of the APPI-produced M^+ and $[M-Br+O]^-$ ions has been studied in ion trap MS/MS experiments. APPI-produced M^+ ions fragmented in a similar way to that observed under EI conditions, i.e. by elimination of $\cdot Br$, Br_2 and $\cdot COBr$. However, unlike previous observations from EI-generated M^+ ions, the loss of $\cdot COBr$ occurred only for PBDE congeners displaying no substituted ortho position. In the negative ion mode, specific transitions involving cleavage of the PBDE ether bond were highlighted. The observed product ions may be the result of the formation of an ion-dipole complex which dissociates with charge retention on both parts of the complex depending on the bromine substitution pattern of the starting PBDE congener. Finally, the loss of Br_2 was the most widespread decomposition process observed from the M^+ and the $[M-Br+O]^-$ ions and this transition could be used in the future development of sensitive LC/MS/MS determinations of PBDEs using APPI.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge support from the 'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail' (AFSSET grant RD-2004-011) and from the 'Conseil Régional Midi-Pyrénées' (grant 03011987). We wish to thank Muriel Boutes for efficient technical assistance in the generation of experimental data, and Prof. Jean-Claude Tabet for fruitful discussions on this work.

REFERENCES

- World Health Organization, Environmental Health Criteria 192, Flame retardants—a general introduction, World Health Organization: Geneva, 1997.
- Watanabe I, Kashimoto T, Tatsukawa R. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1986; **36**: 839.
- Yamamoto H, Okumura T, Nishikawa Y, Konishi H. *J. AOAC Int.* 1997; **80**: 102.
- Lindstrom G, Wingfors H, Dam M, van Bavel B. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1999; **36**: 355.
- Huwe JK, Lorentzen M, Thuresson K, Bergman A. *Chemosphere* 2002; **46**: 635.
- Easton MD, Luszniak D, Von der Geest E. *Chemosphere* 2002; **46**: 1053.
- Hardell L, Lindstrom G, Van Bavel B, Wingfors H, Sundelin E, Liljegren G. *Oncol. Res.* 1998; **10**: 429.
- Meneses M, Wingfors H, Schuhmacher M, Domingo JL, Lindstrom G, Van Bavel B. *Chemosphere* 1999; **39**: 2271.
- Noren K, Meironyte D. *Chemosphere* 2000; **40**: 1111.
- Ohta S, Ishizuka D, Nishimura H, Nakao T, Aozasa O, Shimidzu Y, Ochiai F, Kida T, Nishi M, Miyata H. *Chemosphere* 2002; **46**: 689.
- Kazda R, Hajslova J, Poustka J, Cajka T. *Anal. Chim. Acta* 2004; **520**: 237.
- de Wit CA. *Chemosphere* 2002; **46**: 583.
- de Boer J, de Boer K, Boon JP. Polybrominated biphenyls and diphenyl ethers. In *The Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 3. Springer: Heidelberg, 2000; 61.
- Viberg H, Fredriksson A, Eriksson P. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; **192**: 95.
- Zhou T, Taylor MM, DeVito MJ, Crofton KM. *Toxicol. Sci.* 2001; **66**: 105.
- Meerts IATM, van Zanden JJ, Luijckx EAC, van Leeuwen-Bol I, Marsh G, Jakobsson E, Bergman A, Brouwer A. *Toxicol. Sci.* 2000; **56**: 95.
- Meerts IATM, Letcher RJ, Hoving S, Marsh G, Bergman A, Lemmen JG, van der Burg B, Brouwer A. *Environ. Health Perspect.* 2001; **109**: 399.
- Sellström U, Söderström G, de Wit C, Tysklind M. *Organohalogen Compd.* 1998; **35**: 447.
- Meironyte D, Noren K, Bergman A. *J. Toxicol. Environ. Health A* 1999; **58**: 329.
- Covaci A, Voorspoels S, de Boer J. *Environ. Int.* 2003; **29**: 735.
- Hyötyläinen T, Kallio M, Hartonen K, Jussila M, Palonen S, Riekkola ML. *TrAC Trend. Anal. Chem.* 2002; **74**: 4441.
- Björklund J, Tollback P, Östman C. *J. Mass Spectrom.* 2003; **38**: 394.
- Cariou R, Antignac JP, Marchand P, Berrebi A, Zalko D, Andre F, Le Bizec B. *J. Chromatogr. A* 2005; **1100**: 144.
- Morris S, Allchin CR, Bersuder P, Zegers BN, Haftka JJ, Boon JP, Brandsma SH, Kruijt AW, van der Veen I, van Hesseltingen J, de Boer J. *Organohalogen Compd.* 2003; **60**: 436.
- Morris S, Bersuder P, Allchin CR, Zegers BN, Boon JP, Leonard PEG, de Boer J. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2006; **25**: 343.
- Kaupilla TJ, Kotiaho T, Bruins AP, Kostiaainen R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004; **15**: 203.
- Debrauwer L, Riu A, Jouanin I, Zalko D. *Proc. 53rd ASMS Conference*, San Antonio, TX, June 5–9, 2005.
- Debrauwer L, Riu A, Jouahri M, Rathahao E, Jouanin I, Antignac JP, Cariou R, Le Bizec B, Zalko D. *J. Chromatogr. A* 2005; **1082**: 98.
- Kaupilla TJ, Kuuranne T, Meurer EC, Eberlin MN, Kotiaho T, Kostiaainen R. *Anal. Chem.* 2002; **74**: 5470.
- Robb DB, Covey TR, Bruins AP. *Anal. Chem.* 2000; **72**: 3653.
- Raffaelli A, Saba A. *Mass Spectrom. Rev.* 2003; **22**: 318.
- Ikonomou MG, Rayne S. *Anal. Chem.* 2002; **74**: 5263.
- Alaee M, Sergeant DB, Ikonomou MG, Luross JM. *Chemosphere* 2001; **44**: 1489.
- Marsh G, Bergman A, Bladh LD, Gillner M, Jakobsson E. *Organohalogen Compd.* 1998; **37**: 305.
- Wang D, Cai Z, Jiang G, Wong MH, Wong WK. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; **19**: 83.
- March RE, Spendore M, Reiner EJ, Mercer RS, Plomley JB, Waddell DS, MacPherson KA. *Int. J. Mass Spectrom.* 2000; **194**: 235.
- Plomley JB, Lausevic M, March RE. *Mass Spectrom. Rev.* 2000; **19**: 305.
- Basso E, Marotta E, Seraglia R, Tubaro M, Traldi P. *J. Mass Spectrom.* 2003; **38**: 1113.
- Thomsen C, Haug LS, Leknes H, Lundanes E, Becher G, Lindstrom G. *Chemosphere* 2002; **46**: 641.

2.2. Etude des RFB et de leurs produits de dégradation par LC-APPI-MS (**article 2**).

2.2.1. Introduction

Comme les PBDE, le TBBPA est le plus souvent analysé par GC-MS après une étape de dérivatisation. La première analyse du TBBPA réalisée avec succès par LC-MS est récente (Hayama *et al.*, 2004). Pour les PBDE, aucune étude en LC-MS n'avait été publiée avant nos travaux. Notre objectif était de développer une méthode d'analyse appropriée pour tous les RFB par LC-MS. Les techniques à pression atmosphérique: ionisation par électro-nébulisation (ESI) et ionisation chimique (APCI) couramment utilisées, ne permettent pas d'ioniser les PBDE. C'est pourquoi les méthodes de LC-MS ont été développées avec l'APPI. Cette ionisation s'est par ailleurs montrée plus efficace que les ionisations courantes, pour l'identification de produits de photo-dégradation du TBBPA.

2.2.2. Résultats

Tous les résultats sont détaillés dans l'article 2. La structure des différents produits de dégradation (composés moins polaires que le TBBPA) identifiés lors de la photolyse du TBBPA est récapitulée dans le tableau 8, et mise en correspondance avec les codes qui leurs ont été attribués dans la publication. La photo-dégradation du TBBPA a été réalisée après 5 jours d'exposition du RFB solubilisé dans de l'ACN et placé dans une cuve en quartz, à la lumière du soleil. Les produits de photo-dégradation du TBBPA ont pu être facilement identifiés en LC-APPI-MS, particulièrement ceux ayant une masse moléculaire supérieure à 1000 u et certains avoisinant 1500 u, qui n'étaient clairement pas analysables en GC-MS, et pour lesquels l'utilisation de l'ionisation par électro-nébulisation (ESI) était difficile et peu sensible compte tenu de leur faible polarité.

Comme dans l'article précédent, les PBDE (pentaBDE au DBDE) ont été analysés en ionisation négative en APPI-MS. Les résultats concernent l'identification préliminaire d'un mélange de standards constitué de pentaBDE, d'hexaBDE et d'heptaBDE réalisée en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-APPI-MS). De la même manière le DBDE a été identifié éluant à 36,7 min. Cette technique semble être une méthode alternative à la GC-MS, permettant de s'affranchir des artéfacts analytiques induisant la débromation des PBDE et notamment du DBDE.

	T_R (min)	m/z	Atomes de Br	Structure
Pic 1 (6)	35,4	926,6	6	
Pic 2 (6)	35,8	792,7	6	
Pic 3 (7)	39,4	1028,6	7	
Pic 4 (8)	48,8	1468,2	10	

Tableau 8. Identification par LC-MS des produits issus de la photo-dégradation du TBBPA. Le chiffre entre parenthèses correspond aux pics identifiés en radio-CLHP (cf. Fig. 5 de l'article 2).

2.2.3. Résultats complémentaires

Pour les PBDE, la poursuite des travaux après publication de l'article 2 a permis d'obtenir des résultats supplémentaires décrits dans le tableau 9. Dans ce tableau sont répertoriés les temps de rétention en LC-MS (Système CLHP DBDE II) de quelques congénères.

Congénère	BDE-100	BDE-206	BDE-207	BDE-208	DBDE
Nb de brome	5	9	9	9	10
T_R (min)	26,9	37,6	34,7	34,7	38,7

Tableau 9. Temps de rétention obtenus en LC-MS pour certains congénères des PBDE avec le système DBDE II

2.2.4. Discussion

Comme pour les PBDE, la technique d'ionisation choisie (APPI), semble être une méthode de choix pour l'analyse du TBBPA, et plus particulièrement pour ses produits de dégradation. La photolyse de ce RFB entraîne entre autres des dimérisation et trimérisation du TBBPA, résultant ainsi en la formation de composés de haut poids moléculaire et d'une polarité plus faible. Nos résultats confirment ceux publiés récemment par Eriksson et al. (2004); l'exposition aux UV entraîne la cassure de la molécule en 2 parties: le dibromo-isopropyle phénol et le dibromo-phénol. Par contre, ces mêmes auteurs n'avaient pas mis en évidence la présence de composés moins hydrosolubles que le TBBPA. Notre étude montre que le dibromo-phénol réagit avec une molécule de TBBPA pour donner un composé à 3 cycles aromatiques avec 6 atomes de brome (pic 2). En ce qui concerne les PBDE, et notamment le DBDE, la LC-MS permet d'injecter des quantités réduites de produit (de l'ordre de 20-100 pg pour certains, dont le DBDE, et jusqu'à 5 pg pour d'autres), ce qui est indispensable pour les études de métabolisme. De plus, contrairement à la GC-MS, la pureté des échantillons analysés ne nécessite pas d'être aussi poussée, car à quantité injectée équivalente l'utilisation de la LC-MS/MS permet de travailler avec des solutions plus diluées (volumes injectés beaucoup plus importants), et d'effectuer un dessalage et une « prépurification » en ligne des échantillons. Ceci représente un atout pour l'analyse d'extraits purifiés provenant de matrices complexes telles que les tissus d'animaux. Cette étude a permis de démontrer que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse utilisant l'APPI comme technique d'ionisation était un outil efficace pour l'analyse des RFB et de leurs produits de dégradation. L'utilisation de la LC-APPI-MS semble être une méthode alternative à la GC-MS prometteuse pour l'analyse des RFB, en ouvrant la voie à la LC-MS/MS et en permettant de s'affranchir de la débromation des PBDE et notamment de celle du DBDE.

Article 2

L. Debrauwer, A. Riu, M. Jouahri, E. Rathahao, I. Jouanin, JP. Antignac, R. Cariou, B. Le Bizec, D. Zalko. 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. J. Chromatogr. A; 1082: 98-109 (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

Laurent Debrauwer^{a,*}, Anne Riu^a, Majdouline Jouahri^a, Estelle Rathahao^a, Isabelle Jouanin^a, Jean-Philippe Antignac^b, Ronan Cariou^b, Bruno Le Bizec^b, Daniel Zalko^a

^a UMR 1089 Xénobiotiques, 180 Chemin de Tournefeuille, BP 3, 31931 Toulouse Cedex 9, France

^b LABERCA, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, route de Gachet, BP 50707, 44307 Nantes Cedex 3, France

Available online 17 May 2005

Abstract

Atmospheric pressure photo ionisation has been evaluated for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by LC–MS. Degradation mixtures obtained from the photochemical degradation of tetrabromobisphenol A and decabromodiphenylether were used as model systems for the assessment of the developed methodology. Negative ion mode gave best results for TBBPA and its degradation compounds. $[M - H]^-$ ions were formed without the need of using a doping agent. MS and MS/MS experiments allowed the structural identification of new TBBPA “polymeric” degradation compounds formed by attachment of TBBPA moieties and/or their respective cleavage products. In the case of polybromodiphenylethers, the positive mode provided M^{*+} ions and gave better results for congeners ranging from mono- to pentabromodiphenylethers whereas for higher bromination degrees, the negative ion mode (providing $[M - Br + O]^-$ ions) was best suited. Under both positive and negative ionisation modes, the use of toluene as doping agent gave better results. Liquid chromatography–mass spectrometry by means of atmospheric pressure photo-ionisation was applied to the analysis of aromatic brominated flame retardants and their degradation products. This methodology proved to be particularly useful, for the characterisation and structural identification of some compounds which are not amenable to GC–MS, especially in the case of apolar “polymeric” degradation products of tetrabromobisphenol A investigated in this work.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Brominated flame retardants; Tetrabromobisphenol A; Polybromodiphenylethers; LC–MS; APPI

1. Introduction

Brominated flame retardants (BFRs) are widely used as additives in the production of polymers and plastics in order to slow down or inhibit the early steps of catching fire. Thus, this group of chemicals is present in many consumer goods such as televisions, computers and other products containing printed circuit boards, and they are also found in plastics and foams used in the car industry [1]. These chemicals are widely released into the environment and are considered as “new” environmental contaminants. Due to their physico-chemical properties, many of them are

described as persistent organic pollutants (POPs). BFRs are mainly represented by tetrabromobisphenol A (TBBPA, Fig. 1), polybrominated diphenylethers (PBDEs, Fig. 1), which are aromatic compounds, and the cycloaliphatic compound hexabromocyclododecane (HBCD). The worldwide production of BFRs is greater than 200 ktonnes/year [2], among which the above mentioned compounds account for ca. 70%. Since the beginning of their use 25 years ago, their occurrence has been reported in almost all environmental compartments (sediments, air, water) as well as in animals and humans [3]. Some BFRs are suspected to be carcinogenic and recently, some polybrominated diphenyl ether (PBDEs) congeners as well as tetrabromobisphenol A (TBBPA) have been shown to act as endocrine disruptors [4,5]. Although their impact on the environment and their potential risk for

* Corresponding author.

E-mail address: Laurent.Debrauwer@toulouse.inra.fr (L. Debrauwer).

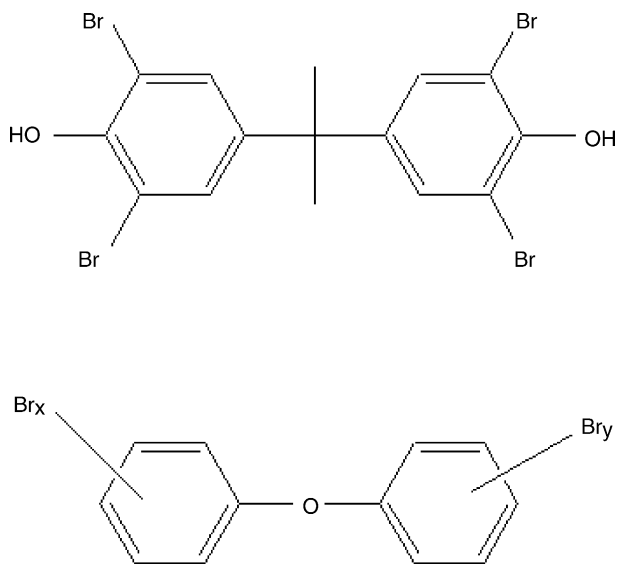


Fig. 1. Chemical structures of TBBPA and PBDEs.

animals is a present time concern for the scientific community, little is known about the fate of these compounds in the environment as well as in living organisms.

Since the end of the 1990s, several methods have been developed for the analysis of BFRs. As mentioned by Covaci et al. in a recent review article [6], the analysis of BFRs is usually achieved using gas chromatography coupled to electron capture or mass spectrometric detection [7–11], on the basis of analytical methodologies previously developed for chlorinated POPs, such as polychlorinated biphenyls (PCBs). Similarly to those compounds, PBDEs present 209 possible congeners with different degree of bromination. Although the composition of technical mixtures used in the industry is less complex than for PCBs, highly brominated PBDEs (i.e. octa-, nona- and deca-BDEs) have been shown to undergo degradation into analogues with a lower degree of bromination [12,13]. For this reason, many different congeners may be released into the environment, even from simple technical mixtures such as DeBDE (97–98% decabromodiphenylether [14]). Powerful analytical methods have been proposed for the analysis of PBDEs by GC–MS [6,11,15]. However, the analysis of highly brominated congeners (particularly DeBDE) is known to be difficult due to thermal degradation problems [6]. For this compound short columns are generally used, which is detrimental for the separation of the other congeners. Another problem concerns the relative lack of sensitivity observed for highly brominated PBDEs when analysed using electron ionisation mass spectrometry. Therefore, electron capture negative ionisation (ECNI) based on the monitoring of the m/z 79 and 81 ions for the bromine trace is now the most widely used method for the analysis of PBDEs [6]. Concerning the gas chromatographic analysis of other BFRs, HBCD is also known to be affected by thermal degradation, and in the case of TBBPA, a derivatisation step is needed. For this reason, electrospray

ionisation mass spectrometry coupled to liquid chromatography has been successfully used in recent works conducted on TBBPA [16] and HBCD [17,18]. However, as far as we know, LC–MS based methodologies have not been investigated for the analysis of PBDEs yet.

Atmospheric pressure ionisation techniques were one of the main causes of the tremendous development of LC–MS techniques over the last 20 years. Nowadays, electrospray [19,20] (ESI) and atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) [21,22] are the most used ionisation techniques for LC–MS. However, there are still some compounds for which neither ESI nor APCI produce any ion current. Recently, atmospheric pressure photo ionisation (APPI) [23] appeared as a complementary ionisation technique for LC–MS, allowing the ionisation of a wide range of compounds, and broadening the applicability of LC–MS. The present paper reports a new original approach for the analysis of aromatic BFRs by LC–MS, using APPI as the ionisation technique, with the main objective to provide a powerful methodology for the study of some of BFRs metabolites and degradation products which are not easily amenable to GC–MS analysis. Indeed, gas chromatography may be less suited in the context of degradation or metabolism studies, due to its limitations for the analysis of compounds such as some hydroxylated derivatives, and even more inappropriate for glucuronic acid or glutathione conjugates, all of which are encountered as usual xenobiotic metabolites. In this work, efforts were focused on aromatic BFRs (i.e. TBBPA and PBDEs), which represent more than 95% of the estimated world market BFR demand [24]. Thus, this work excluded HBCD for which a powerful LC–MS methodology using electrospray ionisation has been recently reported [17].

First, various atmospheric pressure ionisation techniques such as ESI, APCI and APPI have been assessed under both positive and negative ionisation conditions, for TBBPA and different PBDE congeners. Although good results could be obtained with negative ESI for TBBPA, ESI and APCI were found to be not well suited for the analysis of some of its degradation products. For these compounds as well as for PBDEs, APPI gave interesting results. The various ionic species formed under both positive and negative APPI conditions were investigated as well as the main fragment ions obtained in MS/MS experiments achieved into an ion trap device. The application of LC–APPI–MS to the analysis of TBBPA degradation compounds and its potential for the analysis of PBDE mixtures are presented.

2. Experimental

2.1. Reagents and chemicals

Analytical grade acetic acid, HPLC grade acetonitrile and toluene were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Reference PBDEs were purchased from Wellington Laboratories (Guelph, Canada). Tetrabromobisphenol A

was from Fluka (St. Quentin Fallavier, France) and octabromodiphenylether from Promochem (Molsheim, France). Monobromodiphenylethers and decabromodiphenylether were from Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). For LC–MS experiments, a home synthesised mixture of PBDEs ranging from penta- to hepta-congeners was prepared by partial bromination of diphenylether according to previously published procedures [25]. The photo degradation mixture of TBBPA was obtained by exposure of a 0.5 mg/ml solution of TBBPA in acetonitrile to solar light during five days. After that period, the solution was kept at -20°C in the dark until analysis.

2.2. LC–MS

LC–MS analyses were carried out on a quadrupole ion trap mass spectrometer (Finnigan LCQ DecaXP, Thermo Electron, Les Ulis, France) fitted with the Finnigan APCI/APPI dual ionisation source. This source generates 10 eV photons by means of a Krypton discharge lamp. For infusion preliminary studies, samples (typically 1 ng/ μl in MeOH–H₂O (50–50, v/v)) were introduced into the ionisation source at a flow rate of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Typical ionisation source operating conditions were as follows: heated nebulizer temperature, 450°C ; heated transfer capillary temperature, 250°C ; heated transfer capillary voltage, -20 V , tube lens offset,

-35 V . All other parameters for MS and MS/MS experiments were adjusted for each compound in order to get maximum sensitivity and structural information for the compound of interest. All analyses were achieved under automatic gain control conditions using helium as damping as well as collision gas for MS/MS experiments.

For LC–MS, a TSP 4000 (Thermo Electron, Les Ulis, France) pump fitted with a Rheodyne injector was used. UV detection was achieved with a UV 1000 detector from Thermo Separation Products (Les Ulis, France). Reversed phase columns consisted in a Nucleodur (Interchim, Montluçon, France) 100-C8 column (250 mm \times 4 mm, 5 μm) for TBBPA and its related degradation compounds; or an Ultrabase (SFCC, Eragny, France) RP18 column (250 mm \times 2 mm, 5 μm) for PBDEs. The following gradient elution was used for TBBPA: 100% A from 0 to 4 min, 100–40% A from 4 to 6 min, 60% B from 6 to 30 min, then 60–100% B from 30 to 50 min, and finally 100% B from 50 to 64 min; with A: H₂O/ACN/CH₃COOH (95:5:0.1) and B: ACN. The flow rate was 1 ml/min and a post column splitting was made in order to let 0.1 ml/min entering the ionisation source. For the LC–MS analysis of PBDEs, an isocratic elution system consisting in a H₂O/MeOH (1:99) mixture was used at a flow rate of 0.2 ml/min. A post column addition of toluene (5 $\mu\text{l}/\text{min}$, i.e. 2.5%) as the doping agent was made.

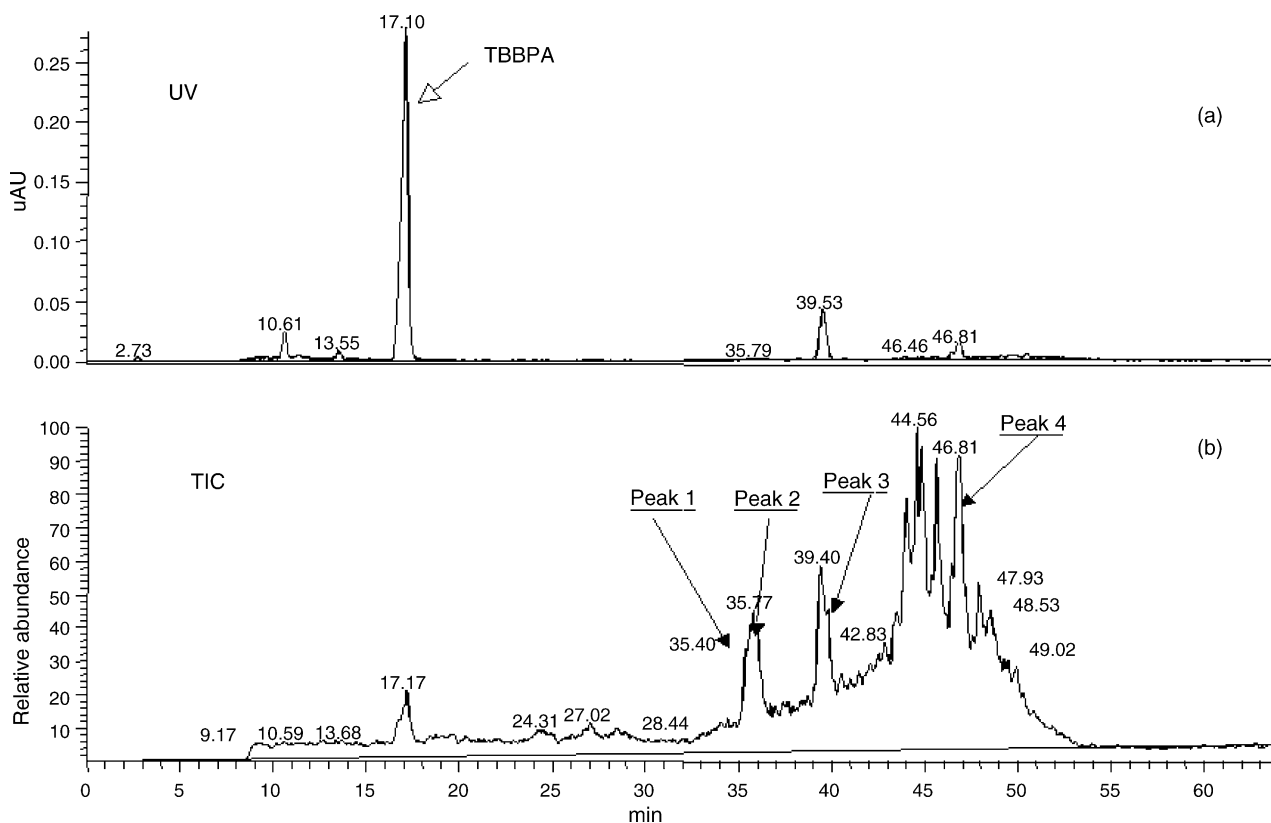


Fig. 2. Chromatogram of a TBBPA photodegradation mixture analysed by LC with (a) UV and (b) NI-APPI-MS detection.

3. Results and discussion

3.1. Tetrabromobisphenol A

3.1.1. LC–APPI-MS analysis of a model TBBPA degradation mixture

TBBPA can be considered as the most polar molecule among major BFRs. The use of electrospray ionisation for the analysis of this compound has already been mentioned as an interesting alternative to GC–MS/MS mainly by providing simpler determination procedures due to the absence of derivatisation. In terms of sensitivity, LC–ESI-MS/MS can be competitive with published GC–EI-MS/MS techniques with limits of detection in the ppt range [16]. Electrospray ionisation has also been successfully used for the structural identification of metabolites produced *in vitro* from incubations of TBBPA and its non brominated analogue bisphenol A (BPA) with rat and human subcellular liver fractions [26,27]. This ionisation technique proved to be well suited for the analysis of polar metabolites resulting from the cleavage of the C–C bond between the central carbon atom and the aromatic rings of the molecules, as well as for sulfate or glucuronide conjugates produced by phase II metabolism enzymes. In this work, we have submitted a solution of TPPBA to solar radiation in order to induce its photolytic degradation. Fig. 2 shows the separation of a crude degradation mixture of TBBPA after five days, by liquid chromatography coupled to UV (254 nm, Fig. 2a) and to mass spectrometric detection after APPI ionisation (Fig. 2b). The UV trace shows the occurrence of several polar degradation compounds eluted between 3 and 15 min. Some of the main polar decomposition products were, respectively, identified as 2,6-dibromophenol; 3-hydroxy-4-isopropylene-2,6-dibromophenol and tribromophenol. Traces of debrominated TBBPA (i.e. tribromo-, dibromo- and monobromobisphenol A) were also detected. This shows that the decomposition of TBBPA involved processes leading to the breakage of the central carbon bonds as well as possible subsequent bromine migrations. On the other hand, additional degradation compounds were detected after the elution time of unchanged TBBPA. For the mass spectrometric analysis of these apolar compounds, electrospray ionisation was almost inefficient. The use of APPI proved to constitute an interesting alternative. First, the influence of the flow rate on the overall detection sensitivity of TBBPA photo-degradation compounds by APPI was investigated (data not shown). A flow rate of 0.1 ml/min gave the best results in terms of sensitivity using post-column infusion experiments with TBBPA. This result was consistent with previously published works in which APPI optimal flow rates were in the 0.1–0.2 ml/min range, depending on the configuration of the ionisation source that was used [28–31]. As indicated in Fig. 2b, the ionisation of TBBPA degradation compounds by means of APPI was very efficient, especially for apolar compounds eluted at retention times greater than 30 min. According to the gradient elution used in this work, this corresponded to acetonitrile contents

greater than 65%. The susceptibility of APPI towards the mobile phase solvent composition has already been mentioned as a potential drawback of this technique [30,31], and is clearly illustrated in Fig. 2b. Relatively weak signals are observed for early eluting peaks (i.e. for water rich mobile phases). On the other hand, at the end of the gradient elution (i.e. close to 100% acetonitrile in the mobile phase) small peaks observed on the UV trace (Fig. 2a) gave very intense signals with APPI-MS (Fig. 2b). This particular feature could constitute a limitation for the quantitative analysis of mixtures of BFR degradation compounds or metabolites.

3.1.2. Molecular mass determination of new TBBPA apolar degradation compounds

The structure of these unusual TBBPA apolar degradation compounds has been further investigated by means of MS/MS experiments conducted on the molecular species produced by APPI. Under the negative ionisation conditions used in this work, $[M - H]^-$ ions were observed as the molecular species. Selected MS and MS/MS spectra of apolar TBBPA degradation compounds chosen as representative examples are presented in Fig. 3. The MS spectra displayed very characteristic isotopic patterns allowing for the attribution of the number of bromine atoms contained in the analysed structure, as shown in Fig. 3 (a–d), respectively, for peaks 1 (35.4 min), 2 (35.8 min), 3 (39.4 min), and 4 (46.8 min). According to their isotopic clusters and molecular ion mass, peaks 1 and 2 could be identified as hexabrominated molecules, peak 3 as an heptabrominated species whereas peak 4 appeared to bear 10 bromine atoms. The first two compounds were detected as their $[M - H]^-$ ions. Surprisingly, peak 3 appeared as a $[M - 2H + Na]^-$ adduct ion. In the case of peak 4, the two pseudo-molecular ionic species coexisted (see Fig. 3d). The mechanism of formation of negative ions in atmospheric pressure photo ionisation has already been discussed by Traldi and coworkers [32] who concluded that negative ions were likely produced via slow electrons emitted not only by the positive APPI ionisation process but also by the metallic surfaces of the ionisation source. Considering the ionisation energy of Fe (7.7 eV) and the energy of the photons from the Kr lamp (ca. 10 eV), these electrons are emitted in the range of ca. 2 eV, which is suitable for both associative and dissociative resonance capture processes. According to these authors, the molecular ionic species formed from TBBPA was produced through a H^\bullet loss resulting from a dissociative electron capture process. These authors also observed the formation of a $[M - Br + O]^-$ anion from TBBPA, which was not the case in our work. This may be due to different geometries of the ionisation sources used in our respective studies (i.e. the source used by Traldi and coworkers [32] displayed a Kr lamp located in front of the stainless steel surfaces of the ion entrance device whereas our source presents a lamp orthogonal to both the nebulizer and the ion entrance device). This difference may minimise the electron stripping from stainless steel surfaces in our configuration, and induce the emission of photo electrons ranging

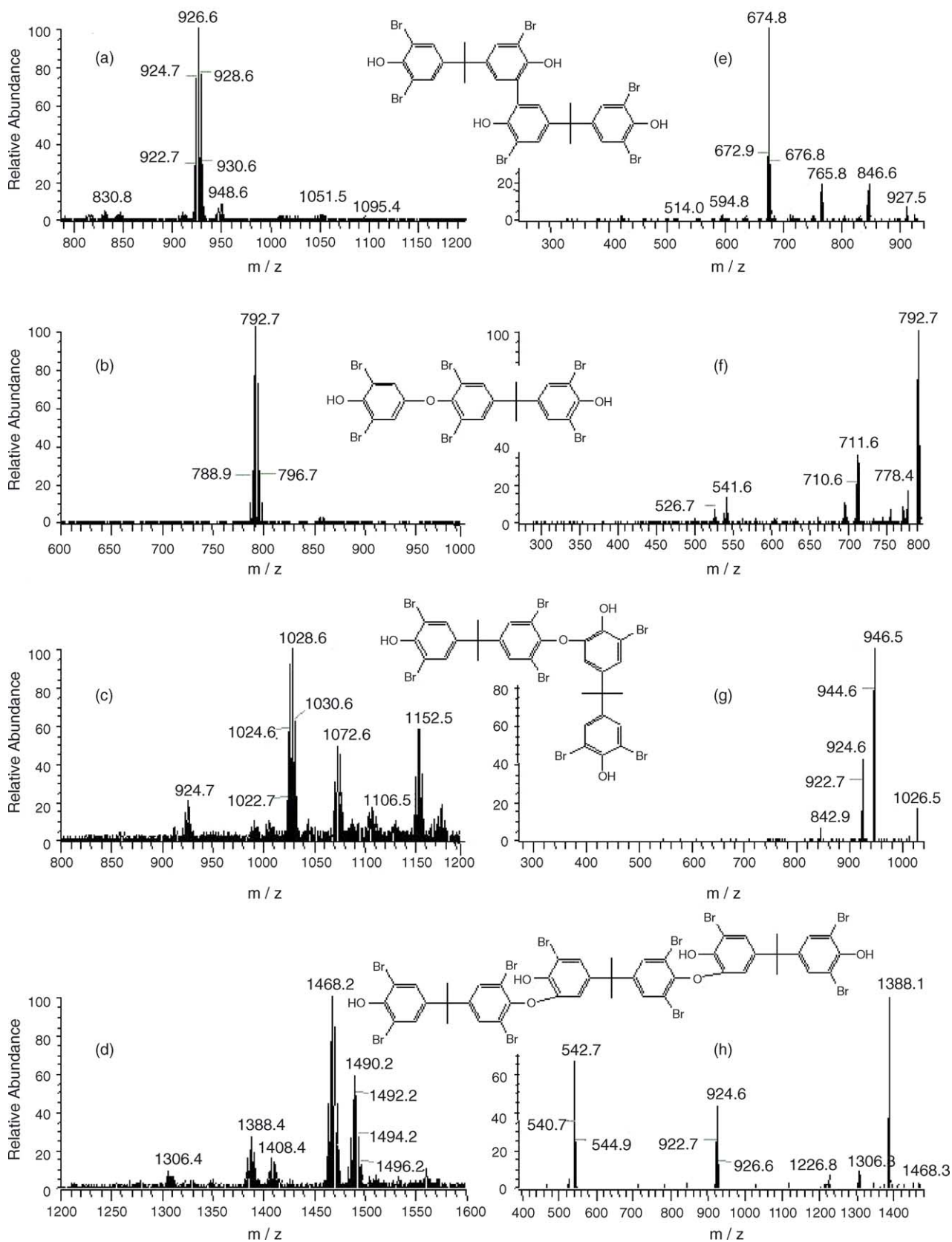


Fig. 3. Mass spectra obtained from the LC-MS analysis of peaks 1–4 using NI-APPI ionisation. Photoionisation mass spectra of (a) peak 1, (b) peak 2, (c) peak 3, (d) peak 4, and MS/MS spectra of (e) m/z 927, (f) m/z 793, (g) m/z 1027 and (h) m/z 1468 selected ions from peaks 1 to 4, respectively. Insets represent the proposed structure for each compound.

in different energy levels. Therefore, depending on the source configuration, certain resonance capture processes may have been favoured or hindered with respect to the others.

3.1.3. MS/MS structural investigation of the TBBPA apolar degradation compounds

Fig. 3e–h show the MS/MS spectra generated from the most abundant ion of the molecular ion cluster for each of the above mentioned compounds. The MS/MS spectrum presented in Fig. 3e, is the result of the collisional excitation of the m/z 927 parent ion from peak 1 (Figs. 2 and 3a) in an ion trap device. This spectrum displayed diagnostic fragment ions at m/z 846/848, 765/767, and 675. Another fragment ion of weaker intensity was observed at m/z 912, corresponding to the elimination of a methyl radical from the selected parent ion. The first cluster of fragment ions present from m/z 845 to m/z 848, arised from the loss of either a bromine atom ($^{79}\text{Br}^{\bullet}$ or $^{81}\text{Br}^{\bullet}$) or a neutral bromhydric acid (H^{79}Br or H^{81}Br) moiety. A second cluster was observed from m/z 763 to m/z 769, corresponding to the consecutive elimination of either Br^{\bullet} or HBr from the previous ions. The formation of the m/z 675 fragment ion was consistent with the breakage of the C–C bond between the central carbon and the aromatic ring on one of the tetrabromobisphenol A moieties. Based on these data, 2,2'-dihydroxy-3,3'-dibromo-5,5'-di(3,5-dibromo-4-hydroxycumyl)-biphenyl could be proposed as a structure for peak 1 (see inset in Fig. 3e) although isomeric structures (TBBPA units linkage positions) were also possible. Fig. 3f represents the MS/MS spectrum of the m/z 793 parent ion from peak 2 (Figs. 2 and 3b). The main fragment ions were observed at m/z 778, 711–714 and 543. The latter one corresponded to the deprotonated form of TBBPA as shown by characteristic fragment ions generated in a subsequent MS^3 experiment carried out from the m/z 543 fragment ion (data not shown). The other characteristic fragment ions arose from the elimination of radical species such as CH_3^{\bullet} (m/z 778), $^{79}\text{Br}^{\bullet}$ or $^{81}\text{Br}^{\bullet}$ (m/z 712/714), as well as neutral H^{79}Br and H^{81}Br (m/z 711/713) from the molecular ion. From these data and other complementary data generated by NMR [27], peak 2 could be identified as 2,6-dibromo-4-(3',5'-dibromo-4'-hydroxycumyl)-1-(3'',5''-dibromo-4''-hydroxy-phenoxy)-benzene. Fig. 3g displays the MS/MS spectrum of the main apolar compound according to the UV trace, i.e. peak 3 (Figs. 2 and 3c). The decomposition of the m/z 1027 $[\text{M} - 2\text{H} + \text{Na}]^-$ parent ion did not give useful structural information. The only observed fragmentation pathways involved the elimination of either HBr (m/z 947/945) or NaBr (m/z 925/923) from the selected parent species. The observed elimination of NaBr confirmed the nature of the molecular species as a sodium adduct. The reason why this particular compound appeared exclusively in the form of a sodium adduct could not be explained. Nevertheless, these data allowed us to propose a reasonable structure for peak 3 (see inset in Fig. 3g). The last selected MS/MS spectrum is presented in Fig. 3h for peak 4 (Figs. 2 and 3d). The decomposition of the m/z 1468 parent ion led to the

formation of main fragment ions at m/z 1386/1388, 925 and 543. As observed for the products discussed above, the elimination of Br and HBr was the first decomposition process occurring from the selected molecular species. Consecutive eliminations led to the fragment ion clusters centred on the m/z 1388, 1306 and 1207 ratios. This compound also underwent a specific cleavage of the ether bond which led to the complementary daughter ions at m/z 925 and 543, representing one and two TBBPA moieties, respectively. This kind of compound constituted by three TBBPA units may be formed considering a double nucleophilic substitution of a bromine atom of TBBPA by another TBBPA molecule. This process could generate several positional isomeric structures among which one is proposed in Fig. 3h.

As indicated in Fig. 2, the LC–APPI–MS analysis of TBBPA submitted to photochemical degradation in acetonitrile allowed to evidence the formation of numerous degradation products. These compounds could be splitted into two main groups. The first one is constituted by compounds that are more water soluble than TBBPA, which are eluted before TBBPA in our reversed phase chromatographic run. The dehalogenation of TBBPA into BPA was very weakly observed in the present study, whereas it has been described as the main anaerobic biodegradation process of TBBPA [33,34]. However, this degradation process was reported to occur under reductive conditions, which is not the case in our study.

The second group of TBBPA degradation products concerned compounds which were less water soluble than TBBPA itself. Their occurrence could be clearly evidenced by LC–APPI–MS. These compounds resulted from the combination of several TBBPA and/or 2,6-dibromophenol units, and were eluted as a group of poorly resolved peaks between 35 and 55 min. This shows that a great number of apolar degradation compounds are formed after five days of irradiation of a solution of TBBPA in acetonitrile by solar UV light. APPI was the only LC–MS technique allowing the efficient ionisation and detection of these apolar degradation compounds of TBBPA. This paper is the first report on the occurrence of such compounds in the photochemical degradation of TBBPA. In 2003, Eriksson et al. [35] studied the photochemical degradation of TBBPA in water. The degradation of TBBPA under aerobic and anaerobic conditions has also been studied [33,34]. 2,6-Dibromophenol was shown to be one of the polar photo-degradation products of TBBPA but none of the apolar compounds we identified was reported in these studies. Although the possible role of acetonitrile in the formation of these apolar compounds has to be considered, structurally related compounds were recently identified by our group during the investigation of the in vitro metabolism of TBBPA [27].

Besides, the formation of apolar metabolites eluted after the parent compounds has also been reported in previous studies conducted with BPA, the non brominated analogue of TBBPA [26]. In this case, polymeric structures such as BPA dimers were characterised [26]. These compounds accounted for 1–2% of the total amount of BPA put in incubation. In

similar incubations carried out with TBBPA, amounts close to 20% were found to be associated with apolar metabolites [27]. The presence of bromine atoms clearly influences the ability of bisphenols to undergo oxidation, either by chemical or biochemical pathways.

3.2. Preliminary data on the LC–APPI–MS analysis of PBDEs

3.2.1. Ion species produced by APPI from various PBDE congeners

In the course of metabolism studies undertaken on BFRs, our aim was to probe an LC–MS methodology which could be applied to the identification of PBDEs as well as their metabolites which were expected to be hardly amenable to GC–MS analysis. However, neither ESI nor APCI could give any ion current whatever the ion mode that was used (positive or negative). On the other hand, APPI gave interesting results, as shown in Fig. 4, representing the MS spectra obtained from BDE85 and BDE100, two isomeric penta-BDEs, under positive and negative ionisation conditions, respectively. $M^{\bullet+}$ radical cations were produced under PI-APPI conditions (see Fig. 4a and b), according to the positive APPI ionisation mechanism of such compounds having ionisation energies lower than 10 eV. On the other hand, $[M - Br + O]^-$ ions were formed under NI-APPI (Fig. 4c and d), meaning that a dissociative resonance capture occurred, leading to $[M - Br]^-$ ions, which immediately reacted with oxygen molecules present in the atmospheric pressure ionisation source, as previously reported [32].

Different PBDE congeners ranging from di- to deca-BDE were analysed (direct injection) under both positive and negative APPI conditions using methanol–water–toluene (98:2:1, v/v/v) as the solvent system. Signal-to-noise ratios obtained from these experiments are reported in Table 1. From these results, positive ion mode appeared to be well suited for

PBDE congeners ranging from di- to penta-BDEs, whereas lower S/N ratios were observed for hexa- and hepta-BDEs and no signal was obtained for octa- and deca-BDE. On the other hand, the negative ion mode gave no signal for di- and tri-BDEs, low S/N ratios for tetra-BDEs, and worked better for congeners ranging from penta- to deca-BDE. Indeed, for penta-BDEs, similar performances were obtained with both positive and negative ionisation modes. On the other hand, in the case of octa- and deca-BDE, the negative APPI ionisation mode was the only way to get signal under the conditions we used. In general, these results are in good agreement with the high electron affinity of bromine, i.e. the more brominated the molecule, the easier the electron capture process.

3.2.2. MS/MS analysis of APPI produced ions from various PBDE congeners

The MS/MS spectra obtained by resonant excitation of APPI produced $M^{\bullet+}$ ions from BDE85 and BDE100 are presented in Fig. 5a and b. The loss of Br^{\bullet} and Br_2 represented the only decomposition processes observed for BDE85 as well as BDE100. The $M^{\bullet+}$ ions of other congeners ranging from di- to hepta-BDEs (i.e. BDE7, BDE15, BDE17, BDE47, BDE54, BDE77, BDE138, BDE183 and BDE190) behaved similarly towards collisional excitation into the ion trap, although some slight differences could be observed in the relative fragmentation yields (data not shown). The PI-APPI ionisation process appeared to be much softer than EI and the $M^{\bullet+}$ ions are always by far the most intense ions produced by interaction of PBDEs with photons in the gas phase (see Fig. 4), whereas $[M - Br_2]^{\bullet+}$ fragments are formed using EI, especially in the case of *ortho*-substituted bromines [11,36,38]. However, the decomposition of the APPI produced $M^{\bullet+}$ ions using MS/MS also led to $[M - Br_2]^{\bullet+}$ as the most intense and almost unique fragment ions, and the presence of *ortho*-bromines also favoured their formation [37]. Until now, the production of negative ions from PBDEs has exclusively been achieved by means of electron capture negative ionisation (ECNI), i.e. via the capture of a thermal electron by electrophilic molecules such as PBDEs in a high pressure chemical ionisation source. This soft ionisation technique was described to produce Br^- ions as the most intense signals to monitor, except for BDE209 (deca-BDE) for which the m/z 487 formed by cleavage of the ethereal bond has been mentioned as the most predominant ion [6,15,38,39]. The formation of $[M - Br + O]^-$ ions has never been mentioned under ECNI conditions, showing that thermal electrons used in ECNI are not in the same range of energy as those produced by the negative APPI process.

The MS/MS spectra generated from the NI-APPI produced $[M - Br + O]^-$ ions suffered from the absence of one of the bromine atoms in the parent ion selected for MS/MS. This feature hindered part of the initially available structural information. This is illustrated by the MS/MS spectra of BDE85 and BDE100 given in Fig. 5c and d. The decomposition of these compounds mainly involved the elimination of HBr and Br_2 . The same trend was observed

Table 1

Signal-to-noise ratios obtained from different PBDE congeners analysed under PI and NI-APPI conditions (calculated from the $M^{\bullet+}$ or $[M - Br + O]^-$ isotopic clusters from 2 ng injections)

Number of Br atoms	BDE#	S/N PI-APPI	S/N NI-APPI
2	7	9	–
	15	9	–
3	17	22	–
	47	18	4
	54	8	6
4	77	25	6
	85	20	14
	100	26	20
6	138	7	34
	183	6	16
7	190	6	8
	201	–	4
10	209	–	4

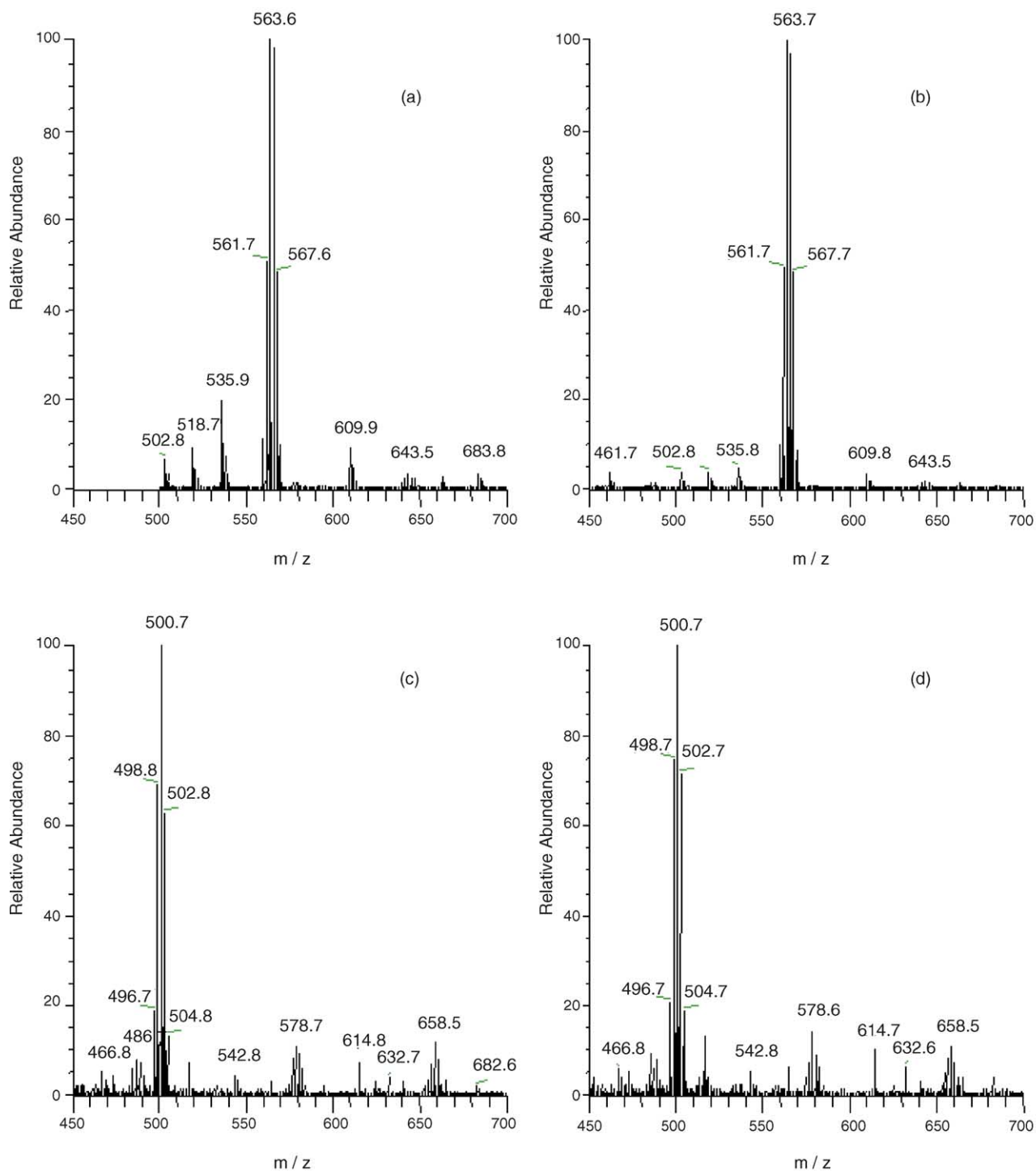


Fig. 4. Photoionisation mass spectra of the two isomeric penta-BDEs BDE85 and BDE100 obtained in (a and b) the positive and (c and d) the negative ion mode, respectively. Spectra were obtained from 5 ng PBDEs.

for the other analogues studied from penta- to hepta-BDEs (data not shown). The cleavage of the ethereal bond with charge retention on the oxygenated part of the molecule was also observed, leading to the formation of a $C_6H_2O_2Br_2$ radical anion species at m/z 266. This process is favoured for

BDE100 compared to BDE85, although the $[M - Br + O]^-$ ion was found to be more stable in the case of BDE100. The position of the missing bromine atom in the $[M - Br + O]^-$ ions studied in MS/MS as well as their decomposition mechanisms are now under investigation [37].

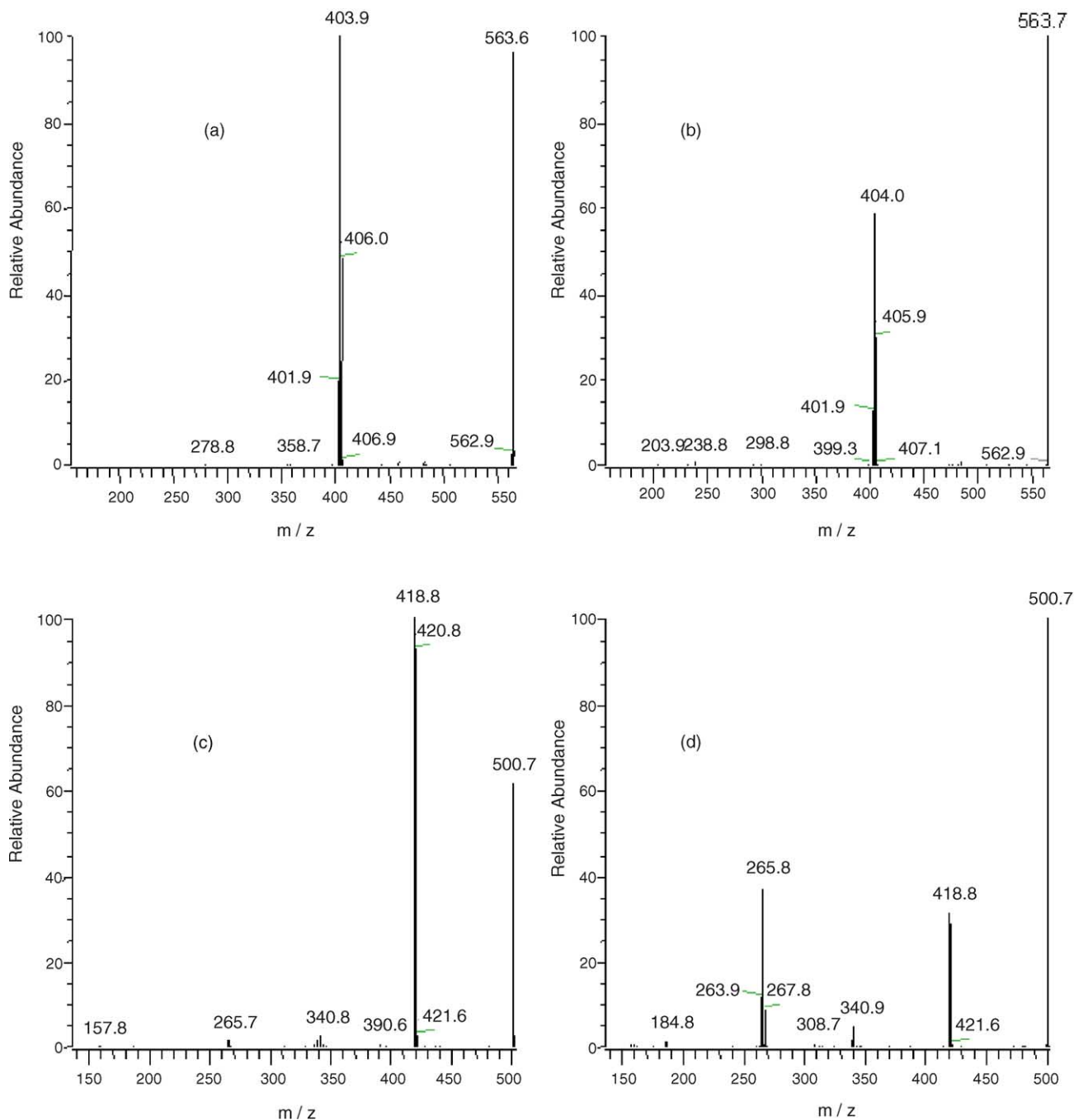


Fig. 5. MS/MS spectra generated from (a and b) the PI-ApPI produced m/z 564 ion and (c and d) the NI-ApPI produced m/z 501 parent ions selected as the most intense ions of the molecular isotopic clusters from BDE85 and BDE100, respectively. Spectra were obtained from 5 ng PBDEs.

3.2.3. LC-ApPI-MS analysis of a model PBDE synthetic mixture

Our first concern was the development of a methodology for the analysis of degradation compounds and/or metabolites of deca-BDE, which have been reported to be mainly tetra- to nona-BDE congeners [11,15,38–41]. Therefore, the negative ion mode was chosen for the continuation of our work since it gave a better sensitivity for the detection of congeners bearing more than five bromine atoms. An ap-

plication of the developed methodology for the analysis of PBDEs using NI-ApPI-MS is presented in Fig. 6, displaying the reconstructed ion chromatograms obtained from the injection of a home-made synthetic mixture of PBDEs ranging from penta- to hepta-congeners. Selecting the most abundant ion of their isotopic clusters, penta-, hexa- and hepta-BDEs can be best detected at m/z 501, 581 and 659, respectively. Although it does not appear on the spectra presented in Fig. 4, the elimination of HBr was observed as a weak process (ca.

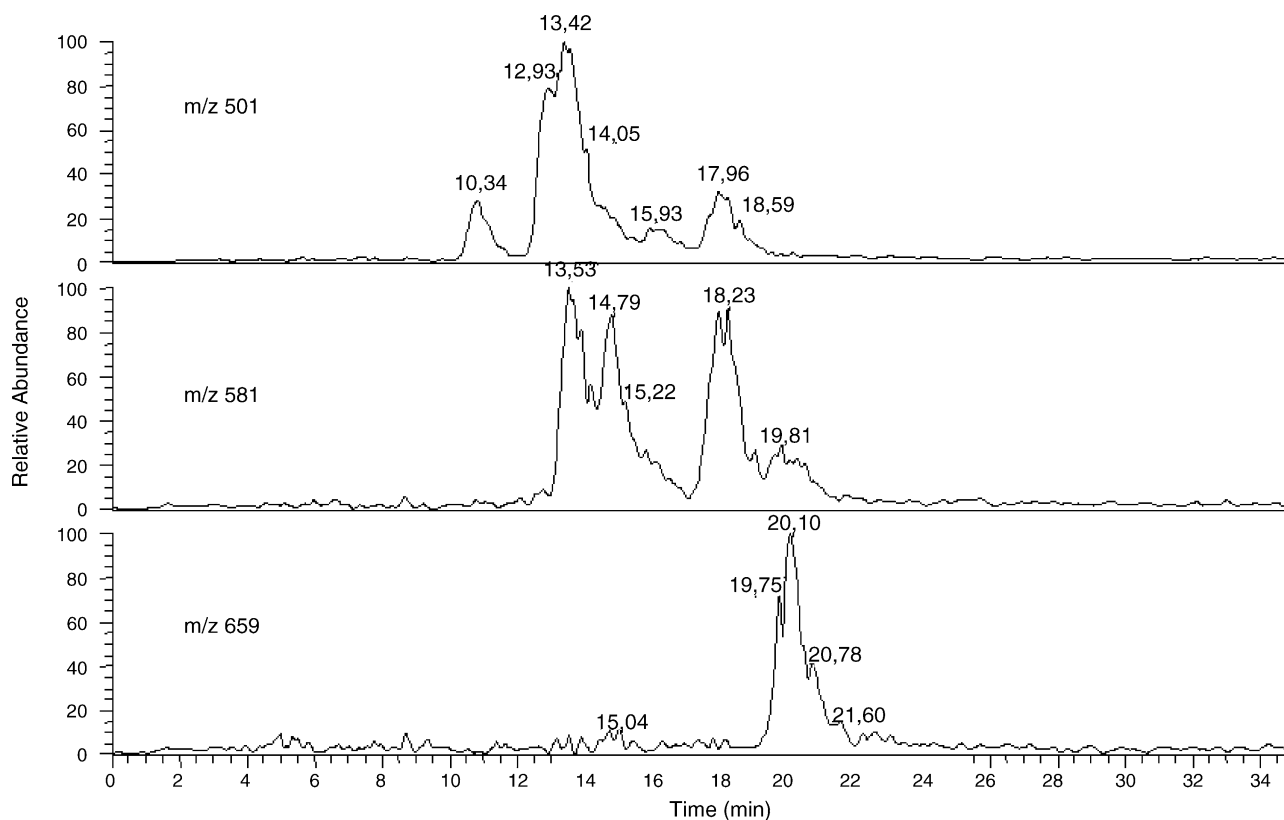


Fig. 6. Extracted ion chromatograms of penta- to hepta-BDEs obtained from the LC–APPI-MS analysis of a PBDE mixture (50 ng mixture injected): (a) penta-BDEs at m/z 501, (b) hexa-BDEs at m/z 581 and (c) hepta-BDEs at m/z 659.

10% relative abundance) on the MS spectra of PBDEs. This implied that m/z 581 and m/z 501 ions were present on the MS spectra of the hepta- and hexa-BDEs, respectively. Consequently, since several peaks appeared at the same retention time on Fig. 6, minor interfering signal may be present from hepta-BDEs on the hexa-BDEs trace, or from hexa-BDEs on the penta-BDEs trace.

However, although the resolving power of liquid chromatography is much lower than that of gas chromatography, these preliminary data indicated that LC–APPI-MS could provide an interesting alternative for the separation and characterisation of isomeric PBDE congeners (Fig. 6) as well as for their differentiation (Fig. 5). As far as we know, this work represents the first report on the analysis of PBDEs using an LC–MS methodology. Since hydroxylated derivatives have already been described as metabolites of PBDEs [5,42], this methodology may be useful for the identification of phase II PBDE metabolites such as glucuronic acid or glutathione conjugates for which the use of LC–MS may be necessary.

The same methodology has also been assessed for the analysis of deca-BDE (BDE209). Fig. 7 represents the mass fragmentogram obtained from the injection of 50 ng of commercial deca-BDE, together with the corresponding MS and MS/MS spectra presented as inserts. Deca-BDE was eluted as a quite large peak at 36.6 min. As observed for the other PBDE congeners using negative APPI, deca-BDE was

characterised by a $[M - Br + O]^-$ ion cluster (m/z 886–904). Contrary to less brominated analogues, fragment ions were present on the MS spectrum of deca-BDE, resulting from the elimination of Br_2 ($[M - Br + O - Br_2]^-$, m/z 729–743 cluster) and from the cleavage of the ether bond of deca-BDE ($[C_6Br_5O]^-$, m/z 483–493 isotopic cluster). The MS/MS spectrum of the selected m/z 896 parent ion exhibited two main diagnostic ion clusters at m/z 734/736/738 (elimination of Br_2) and m/z 469–475. This latter was consistent with a molecular formula of $[C_6Br_5]^-$, meaning that the cleavage of the ether bond occurred with charge retention on the non oxygenated part of the molecule. This orientation was different from that observed on the MS spectrum, suggesting that different fragmentation processes are involved depending on the energy deposition mode (i.e. in-source photon induced process or collisional excitation into the ion trap). This preliminary result showed that liquid chromatography coupled to negative atmospheric pressure photo ionisation could be used as a potential alternative for the analysis of deca-BDE, which is known to be present in the environment at high levels, and is difficult to analyse using GC–MS.

In this preliminary study, elevated amounts were injected in order to get high signal levels and to assess separation as well as ionisation capabilities of our methodology. In terms of sensitivity, although no systematic optimisation study has been undertaken, the limits of detection were estimated in the

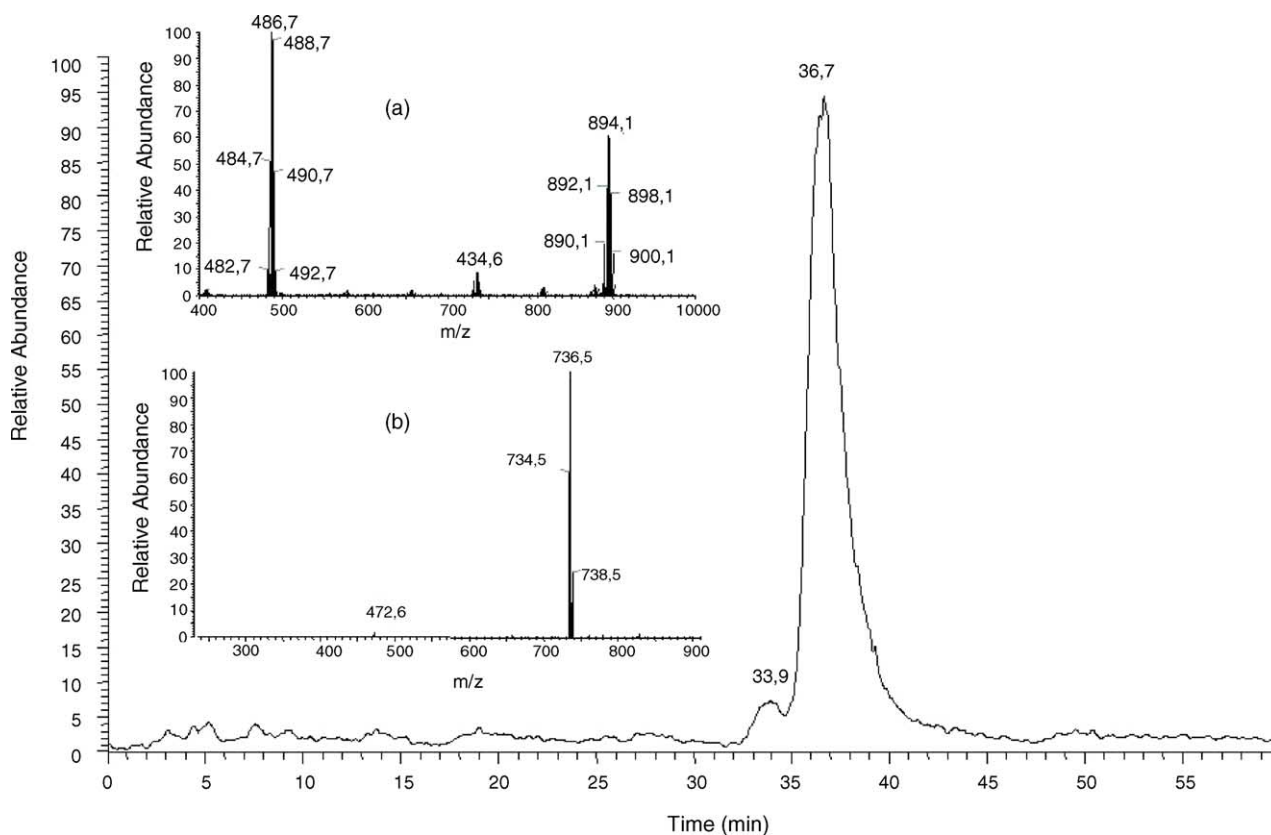


Fig. 7. Extracted ion chromatogram obtained from the LC–APPI–MS (MS/MS) analysis of deca-BDE (50 ng injected). Insets represent the NI-APPI (a) MS and (b) MS/MS spectra of deca-BDE.

range of 200–1500 pg of PBDEs injected onto the LC column, depending on the nature and the bromination degree of the congener. This preliminary estimation needs to be improved for the detection of PBDEs in *in vivo* samples, and work is now in progress in order to reach better sensitivity levels. Nevertheless, taking into account the higher volumes which can be injected in LC in comparison to GC, the performance of our method is not so far from those reached with GC in terms of concentration of the injected solution.

4. Conclusion

APPI proved to constitute an efficient tool for the mass spectrometric analysis of aromatic BFRs using atmospheric pressure ionisation coupled to liquid chromatography. As stated in the text, this recent ionisation technique involves complex ionisation chemistry which is not fully understood yet. Indeed, different molecular species are observed depending upon the ionisation mode used (positive versus negative) and the nature of the compound to be analysed. Although the developed methodology was primarily intended to be used for the qualitative analysis of BFR degradation compounds and/or their metabolites, a potential drawback was found for quantitative analyses, related to the APPI susceptibility with regard to the solvent composition during

a gradient elution. This feature may render difficult the simultaneous determination of several compounds without the use of several internal standards. Nevertheless, the proposed methodology is applicable for the LC–MS analysis of BFR degradation compounds and/or metabolites which are not amenable to GC–MS and for which ESI and APCI are inefficient. This methodology opens a way to the use of LC–MS/MS based methods for the identification of apolar BFR biotransformation compounds which can be formed *in vitro* [27] and may be used for checking the occurrence of such metabolites *in vivo*. Work is now in progress to improve both the MS detection sensitivity and the chromatographic separation selectivity (isomers) via the use of (i) normal phase HPLC systems for which APPI was reported to be applicable [43] and (ii) more selective stationary phases.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support from the “Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale” (AFSEE grant RD-2004-011) and from the “Conseil Régional Midi-Pyrénées” (grant 03011987). We are thankful to Thermo Electron France for complimentary providing the Finnigan APPI source fitted on the LCQ instrument. Nathalie Martins, Julien Bourdron and Muriel Boutes are

also acknowledged for their kind assistance in preliminary experiments on this topic.

References

- [1] WHO Environmental Health Criteria 192, Flame Retardants, General Introduction, World Health Organization, Geneva, 1997.
- [2] L. Birnbaum, D. Staskal, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 9.
- [3] M. Alae, R. Wenning, *Chemosphere* 46 (2002) 579.
- [4] I. Meerts, R. Letcher, S. Hoving, G. Marsh, A. Bergman, G. Lemmen, B. Van Der Burg, A. Brouwer, *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 399.
- [5] I. Meerts, J. Van Zanden, E. Luijckx, I. Van Leeuwen-Bol, G. Marsh, E. Jakobsson, A. Bergman, A. Brouwer, *Toxicol. Sci.* 56 (2000) 95.
- [6] A. Covaci, S. Voorspoels, J. De Boer, *Environ. Int.* 29 (2003) 735.
- [7] C. Thomsen, E. Lundanes, G. Becher, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 282.
- [8] U. Sellström, A. Kierkegaard, T. Alsberg, P. Jonsson, C. Wahlberg, C. DeWit, *Organohalogen Compd.* 37 (1998) 147.
- [9] C. Thomsen, L. Haug, E. Lundanes, G. Becher, G. Lindström, *Organohalogen Compd.* 47 (2000) 194.
- [10] A. Covaci, J. De Boer, J. Ryan, S. Voorspoel, P. Schepens, *Anal. Chem.* 74 (2002) 790.
- [11] D. Wang, Z. Cai, G. Jiang, M. Wong, W. Wong, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 83.
- [12] I. Watanabe, R. Tatsukawa, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39 (1987) 953.
- [13] J. Eriksson, E. Jakobson, G. Marsh, A. Bergman, *Proceedings of the 2nd International Workshop on Brominated Flame Retardants*, Stockholm, 2001.
- [14] M. Ikonou, S. Rayne, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5263.
- [15] R. Kazda, J. Hajslová, J. Poustka, T. Cajka, *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 237.
- [16] T. Hayama, H. Yoshida, S. Onimaru, S. Yonakura, H. Kuroki, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 131.
- [17] W. Budakowski, G. Tomy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1399.
- [18] G. Tomy, W. Budakowski, T. Halldorson, D. Whittle, M. Keir, C. Marvin, G. McInnis, M. Alae, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 2298.
- [19] M. Yamashita, J. Fenn, *J. Phys. Chem.* 92 (1984) 4451.
- [20] J. Fenn, M. Mann, C. Meng, S. Wong, C. Whitehouse, *Science* 246 (1989) 64.
- [21] J. Henion, B. Thomson, P. Dawson, *Anal. Chem.* 54 (1982) 451.
- [22] A. Bruins, T. Covey, J. Henion, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2642.
- [23] D. Robb, T. Covey, A. Bruins, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3653.
- [24] C. De Wit, *Chemosphere* 46 (2002) 583.
- [25] U. Orn, L. Eriksson, E. Jakobsson, A. Bergman, *Acta Chem. Scand.* 50 (1996) 802.
- [26] J.P. Jaeg, E. Perdu, L. Dolo, L. Debrauwer, J.P. Cravedi, D. Zalko, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4935.
- [27] D. Zalko, C. Prouillac, A. Riu, E. Perdu, L. Dolo, I. Jouanin, C. Canlet, L. Debrauwer, J.P. Cravedi, *Chemosphere*, 2005, in press.
- [28] A. Leinonen, T. Kuuranne, R. Kostianen, *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 693.
- [29] H. Keski-Hyyniä, M. Kurkela, E. Elovaara, L. Antonio, J. Magdalou, L. Luukkanen, J. Taskinen, R. Kostianen, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3449.
- [30] C. Yang, J. Henion, *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 155.
- [31] J.P. Rauha, H. Vuorela, R. Kostianen, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 1269.
- [32] E. Basso, E. Marotta, R. Seraglia, M. Tubaro, P. Traldi, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 1113.
- [33] J. Voordeckers, D. Fennell, K. Jones, M. Hagglom, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 696.
- [34] Z. Ronen, A. Abeliovich, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 2372.
- [35] J. Eriksson, S. Rahm, N. Green, A. Bergman, E. Jakobsson, *Chemosphere* 54 (2004) 117.
- [36] G. March, A. Bergman, L. Bladh, M. Gillner, E. Jakobsson, *Organohalogen Compd.* 37 (1998) 305.
- [37] A. Riu, M. Boutes, D. Zalko, L. Debrauwer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, in preparation.
- [38] M. Alae, D. Sergeant, M. Ikonou, J. Luross, *Chemosphere* 44 (2001) 1489.
- [39] C. Thomsen, L. Haug, H. Leknes, E. Lundanes, G. Becher, G. Lindström, *Chemosphere* 46 (2002) 641.
- [40] A. Kierkegaard, L. Balk, U. Tjärnlund, C. DeWit, B. Jansson, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 1612.
- [41] H. Stapleton, M. Alae, R. Lechter, J. Baker, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 112.
- [42] P. Haglund, D. Zook, H. Buser, J. Hu, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 3281.
- [43] A. Delobel, F. Halgand, B. Laffranchisse-Gosse, H. Snijders, O. Laprêvote, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5961.

V. Conclusions

Les outils analytiques développés et la méthodologie mise en place, avaient pour principal objectif de permettre la réalisation des études de métabolisme *in vitro* et *in vivo*, pour le TBBPA et le DBDE. L'activité spécifique des molécules radioactives obtenues s'est avérée satisfaisante dans le cas du TBBPA (6283 Bq/ μ g), et maximale dans celui du DBDE (908 Bq/ μ g), avec des rendements de synthèse acceptables dans les 2 cas. De plus, des molécules d'intérêt d'un haut degré de pureté (> 99.8 %) ont été obtenues grâce au développement des méthodes de purification adaptées (cartouches, CLHP). La mise au point des systèmes chromatographiques nous a également permis d'optimiser les conditions d'injection et de parvenir à une récupération de 100 % du produit injecté, tout en séparant efficacement les composés étudiés. Finalement, bien que l'APPI soit une technique d'ionisation complexe et pas encore totalement comprise du point de vue des mécanismes mis en jeu, elle nous a permis d'analyser efficacement par spectrométrie de masse ces RFB, mais également leurs produits de dégradation. Le développement de ces outils a été déterminant pour la suite de ce travail, puisqu'il a permis pour la première fois d'établir des profils métaboliques détaillés pour le TBBPA (*in vitro*) et pour le DBDE (*in vivo*).

Chapitre 3 : ETUDE DU METABOLISME DES RFB

A/ ETUDE DU METABOLISME DU TBBPA

Les études de métabolisme du TBBPA ont été réalisées à la fois *in vivo* et *in vitro*, pour étudier son devenir chez l'animal et préciser les voies de biotransformation. Dans une première partie sont développées les études *in vitro* réalisées avec des fractions microsomales et subcellulaires de foie de rat et d'Homme, étude ayant été concrétisée par une publication au cours de ma thèse (article 3). Dans une deuxième partie, le devenir du TBBPA *in vivo* chez la rate gestante ainsi que l'exposition fœtale à ce composé sont détaillés, et dans une troisième partie est décrite une étude effectuée en collaboration avec une équipe norvégienne du Norwegian Institute for air research (NILU) sur les biotransformations du TBBPA *in vitro* en présence de cellules sanguines humaines (granulocytes). Cette étude a fait l'objet d'une communication orale lors du congrès international Dioxin 2006 à Oslo, dont le texte a été accepté et sera publié dans *Organohalogen Compounds* (article 4).

I. METABOLISME DU TBBPA IN VITRO

1. Introduction

Aucune publication n'était disponible, au début de mon travail, concernant le métabolisme *in vitro* du TBBPA chez l'animal ou chez l'Homme. Cependant, une étude avait fait état de la dé-halogénéation de ce RFB par des microorganismes, conduisant à la formation des congénères tribromo-, dibromo-, monobromoBPA ainsi que de BPA (Ronen et Arbeli, 2003). Le TBBPA est l'analogue bromé du BPA, xéno-œstrogène pour lequel plusieurs études menées au sein de l'UMR 1089 ont montré que les voies métaboliques comprenaient des étapes d'oxydation et de conjugaison (Zalko *et al.*, 2003; Jaeg *et al.*, 2004). Concernant le TBBPA, l'existence de voies de conjugaison avaient été démontrées *in vivo* (Hakk *et al.* 2000) mais pas celle des voies oxydatives. Par ailleurs, aucune donnée n'était disponible chez l'Homme pour les biotransformations de ce RFB. Pour répondre à ces questions, des études de métabolisme *in vitro* ont été menées au moyen d'incubations réalisées avec des fractions microsomales et des fractions S9 de foie de rats (mâle/femelle) et d'humains.

2. Résultats

Tous les résultats sont détaillés dans l'article 3. Toutefois, un récapitulatif des principaux métabolites est présenté dans le tableau 10 et mis en correspondance avec les codes attribués dans la publication.

	T_R (min) Système I/ Système II	Atomes de Br	Structure
M1	11,9	2	
M2	12,5	4	
M3	12,9	2	
M4	13	2	
M5	17	2	
M6	17,3	4	
M7a	36	6	
M7b	40	7	

Tableau 10. Structure des métabolites détectés après incubation du TBBPA avec des microsomes et fractions S9 de foie de rat et d'Homme.

Des métabolites résultant du clivage oxydatif de la molécule (M1, M3, M4, M5) et de la formation de produits moins polaires que le TBBPA (M7a, M7b), ont été obtenus au cours d'incubations réalisées avec des microsomes et des fractions S9 hépatique de rat et d'humain. Des métabolites conjugués ont également été détectés lors des incubations réalisées avec des fractions S9, le conjugué glucuronide étant le métabolite majoritaire. La vitesse de formation des métabolites, M2 en particulier, était plus élevée chez le rat que chez l'humain, sans différence observée en fonction du sexe, alors que la vitesse de formation des métabolites apolaires (M7a et M7b) était plus élevée chez le mâle que chez la femelle.

Des blancs d'incubation réalisés avec les microsomes et les fractions subcellulaires sans système générateur de NADPH, sur lesquels aucune métabolisation du TBBPA n'a été observée, indiquent que les biotransformations du TBBPA *in vitro* sont probablement des voies dépendantes des cytochromes P450.

3. Résultats complémentaires

Plusieurs expériences complémentaires ont été réalisées pour:

- S'assurer que les métabolites observés ne résultaient pas de la dégradation du TBBPA à la lumière au cours des incubations
- Compléter les résultats obtenus *in vitro* sur des fractions subcellulaires à l'aide de tranches de foie de rat
- Produire des métabolites en quantité suffisante pour une identification structurale en RMN (analyse détaillée dans l'article 3)

3.1. Effet de la photo-dégradation

Afin de lever tout soupçon sur la photo-dégradation du TBBPA à la lumière pendant les incubations, (processus démontré par Eriksson *et al.* (2004) lors de l'exposition aux UV du TBBPA dans l'eau), des incubations supplémentaires avec des microsomes de foie de rat ont été réalisées parallèlement à l'obscurité et à la lumière (dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'article 3). La métabolisation du TBBPA est identique dans les deux cas, confirmant l'action des voies enzymatiques et non celle de la photo-dégradation.

3.2. Incubations du TBBPA avec des tranches de foie de rat

Des études *in vitro* ont été menées au moyen d'incubation de TBBPA (5 μ M) avec des tranches de foie de rat (Chapitre 2, III. 2.). Les résultats préliminaires obtenus, ont montré que la métabolisation du TBBPA résultait exclusivement de la conjugaison du TBBPA (45 %), conduisant majoritairement au conjugué glucuronide du TBBPA (M2).

3.3. Production de certains métabolites du TBBPA pour des identifications structurales complémentaires en RMN

Nous avons tenté de produire les métabolites apolaires au moyen de trois approches différentes: biochimique, chimique, et photochimique. Ces métabolites étant produits par oxydation du TBBPA *in vitro*, nous avons réalisé un grand nombre d'incubations avec des microsomes de foie de rat et à une concentration élevée de TBBPA (100 μ M, le protocole suivi étant identique à celui détaillé dans l'article 3). Nous avons également essayé de réaliser cette oxydation par voie chimique, ainsi que par photo-dégradation du TBBPA aux UV. En effet, des processus d'oxydation quasi-identiques à ceux observés *in vitro*, induits par la photolyse du TBBPA, conduisant à la formation de produits de dégradation résultant de la cassure du TBBPA ont été récemment démontrés dans la littérature (Eriksson *et al.* 2004).

3.3.1. Oxydation du TBBPA par voie chimique

Le réactif utilisé a été l'hypochlorite de calcium [Ca(ClO)₂]: 1,3 équivalents d'hypochlorite ont été ajoutés à du TBBPA (10 mg). La réaction a été réalisée dans 1,5 mL de méthanol, pendant 1 h sous agitation et à température ambiante. Elle a été stoppée par l'ajout de 2 mL d'acide chlorhydrique 0,1N, le méthanol a ensuite été évaporé, et le TBBPA oxydé a été extrait de la phase aqueuse avec 15 mL d'acétate d'éthyle, la phase organique étant finalement séchée sur du sulfate de magnésium. Les résultats préliminaires étaient satisfaisants, cette synthèse permettant d'obtenir une oxydation du TBBPA. Les deux « moitiés » issues de la cassure du TBBPA au niveau du carbone central de la molécule ont été observées (Fig. 15): le dibromo-phénol (1) et le dibromo-isopropyle phénol (2), ainsi qu'un produit moins hydrosoluble que le TBBPA (3) éluant au même temps de rétention que le métabolite (M7a). Ce composé apolaire (3) résulterait de l'association chimique d'une molécule de TBBPA inchangée avec le dibromo-phénol (Fig. 16). Ces produits d'oxydation n'ayant pas été directement analysés en spectrométrie de masse et en RMN, leur identification structurale a été déduite sur la base de leur temps de rétention, comparé à celui de standards préalablement identifiés.

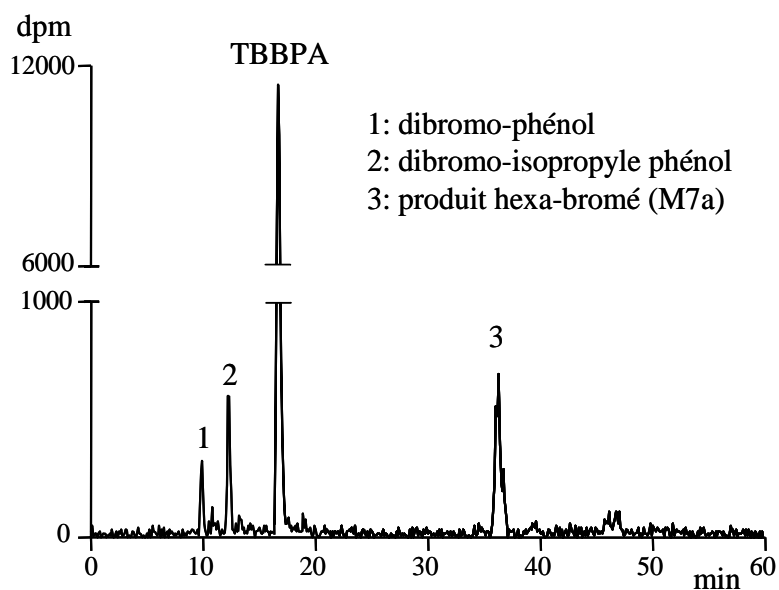


Fig. 15. Radio-chromatogramme de l'oxydation du TBBPA par voie chimique

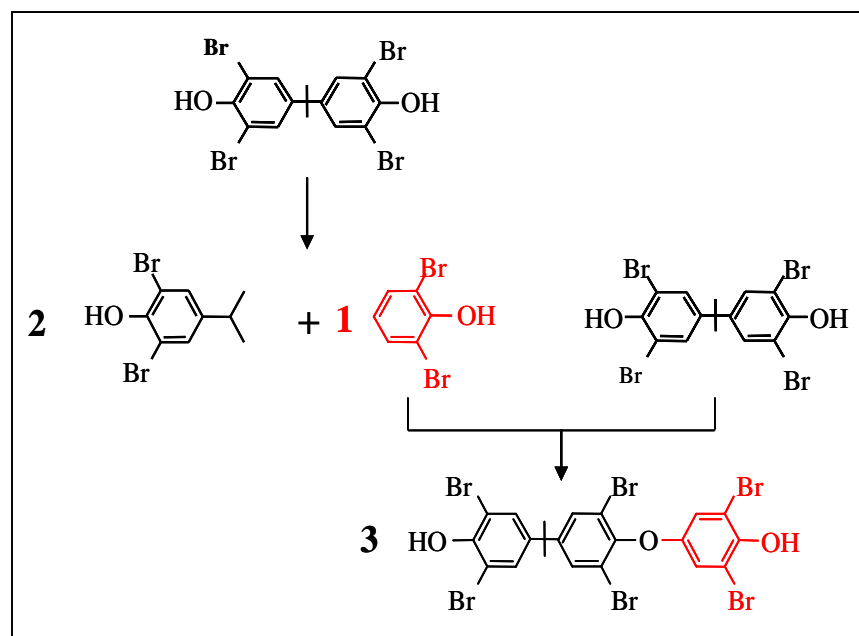


Fig. 16. Processus d'oxydation du TBBPA par voie chimique

3.3.2. Photo-dégradation du TBBPA

La photolyse, préalablement décrite dans l'article 2, a permis de montrer qu'après 5 jours d'exposition du TBBPA à la lumière du soleil, 23 % de composés apolaires étaient formés (Fig. 17A). Le composé majoritaire [(4), Fig. 17B], formé par la voie photochimique est le dimère du TBBPA substitué avec 7 atomes de brome (M7b), représentant 70 % du total des produits apolaires. Le composé hexabromé (3) correspondant au métabolite M7a est

également détecté mais en faible quantité (6 % des produits apolaires). Le troisième produit formé (5) correspond à un trimère de TBBPA substitué de 10 atomes de brome (article 2, Fig. 3), éluant à 48 min avec le système CLHP TBBPA II.

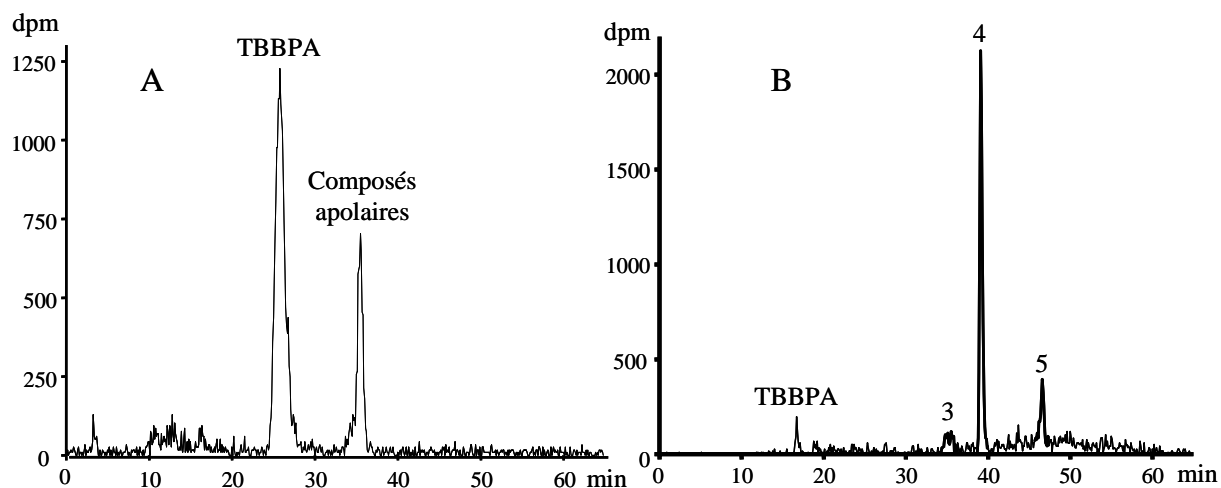


Fig. 17. Radio-chromatogrammes de la photolyse du TBBPA obtenus avec: (A) le système TBBPA I (analyse de la totalité de l'échantillon) et (B) le système TBBPA II (analyse des pics apolaires uniquement).

Finalement, la méthode par la voie biochimique a été retenue car elle s'est avérée la plus rapide et la plus simple à mettre en œuvre dans le cadre des objectifs poursuivis. En effet, les deux autres méthodes d'oxydation testées demandaient un développement plus poussé: (i), les conditions d'oxydation par voie chimique n'ayant pas été optimisées, la proportion de produits d'oxydation formés était trop faible; (ii), la voie photochimique conduisait à une perte non expliquée de 60 % de la radioactivité, et donc de produits formés. De plus, l'optimisation des deux méthodes aurait été indispensable pour la production de M7a et M7b, ces méthodes permettant uniquement l'obtention d'un des deux métabolites d'intérêt.

3.4. Tests d'activité biologique du TBBPA, de ses dérivés moins bromés (dont le BPA) et de certains de ses métabolites

Les résultats ont été obtenus à partir de lignées cellulaires bioluminescentes exprimant différents récepteurs (chapitre 2, IV.) par l'équipe U540 INSERM de Montpellier. Ils montrent que le TBBPA n'active pas les récepteurs ER, au contraire de ses analogues moins bromés et du BPA. Une diminution de l'activation est observée lorsque le nombre d'atomes de brome augmente (les métabolites n'ayant pas été testés). Ni le TBBPA, ni ses dérivés de synthèse ne provoquent une activation des récepteurs PXR et AhR. Les effets du TBBPA, des analogues moins bromés et des métabolites apolaires du TBBPA formés *in vitro*, M7a et M7b

(mélange), ont été testés sur des lignées exprimant les différents récepteurs PPAR (α , δ , et γ). Aucun des composés testés ne s'est avéré actif sur les récepteurs PPAR α et PPAR δ . Par contre, ces produits se sont comportés comme des ligands agonistes sur PPAR γ . Sur ces lignées, le TBBPA et le tribromoBPA sont plus actifs que le dibromoBPA et le monobromoBPA. Le premier test du mélanges des métabolites apolaires ($T_R = 35$ min dans le système CLHP TBBPA I) montre que ces composés sont également actifs sur PPAR γ . La figure 18 illustre les effets de ces composés sur les lignées exprimant les différents récepteurs PPAR.

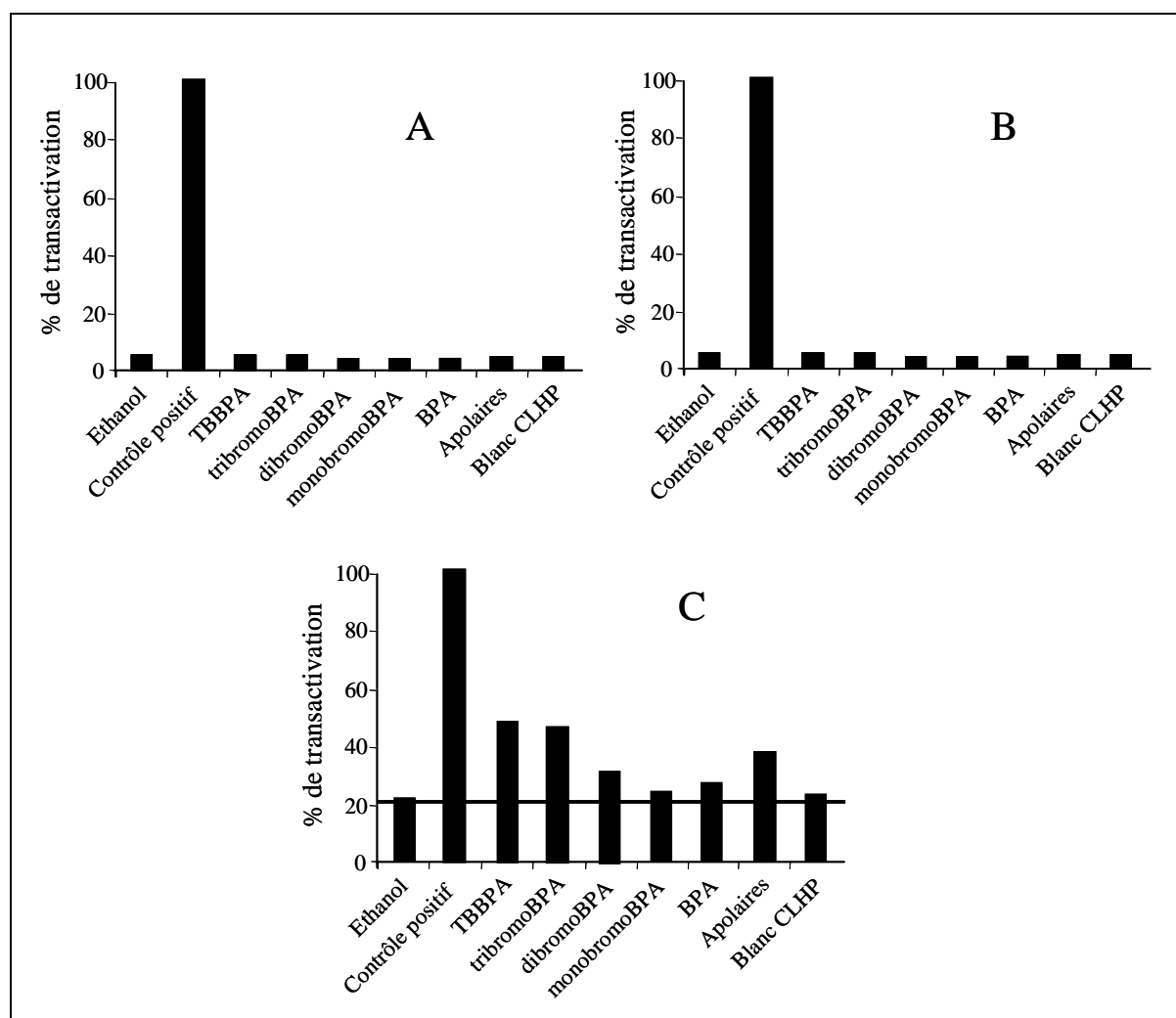


Fig 18. Effets du TBBPA, de ses dérivés moins bromés, du BPA et des métabolites apolaires du TBBPA formés lors des incubations réalisées avec des fractions subcellulaires hépatiques, sur les lignées exprimant les récepteurs PPAR : (A) PPAR α , (B) PPAR δ et (C) PPAR γ . [Concentration en ligand = 10^{-5} M, n = 3; contrôles positifs: GW9578 (PPAR α), L-16041 (δ), BRL4953 (γ) et contrôles négatifs : éthanol et blanc CLHP]

4. Discussion

Cette étude comparative de la biotransformation du TBBPA *in vitro* chez le rat et l'humain, a permis de démontrer que ce RFB était bien métabolisé par des enzymes d'oxydation et de conjugaison. Cependant, les fractions subcellulaires hépatiques murines ou humaines, n'ont pas été capables de réduire le TBBPA par débromation, contrairement à ce qui a été montré dans l'environnement (Arbeli et Ronen, 2003). L'observation d'un conjugué glucuronide formé au cours des incubations sur fractions S9 hépatiques va dans le sens de précédents résultats *in vivo* publiés précédemment (Hakk *et al.* 2000), selon lesquels une large proportion de métabolites conjugués est excrétée par la bile. Cependant, les voies métaboliques prédominantes du TBBPA sont, d'après nos résultats, dépendantes des cytochromes P450, conduisant à l'oxydation de ce RFB. La cassure de la molécule par des processus d'oxydation entraîne la formation de métabolites polaires et, par recombinaison, celle de métabolites moins hydrosolubles que le TBBPA (M7a et b). Le mécanisme de formation de ces métabolites reste encore inconnu. Des étapes d'oxydation semblables sont également observées lors de l'oxydation chimique et de la dégradation photochimique du TBBPA. Ces deux méthodes entraînent la formation par oxydation de composés quasi-identiques à ceux obtenus biochimiquement mais en proportions différentes. L'oxydation chimique à l'hypochlorite du TBBPA produit majoritairement, après cassure de la molécule, le composé issu de la recombinaison d'une molécule de TBBPA avec le dibromo-phénol (M7a), alors que la photo-dégradation du TBBPA dans de l'ACN entraîne la formation majoritaire du composé issu de la dimérisation de composé parent substitué de 7 atomes de brome (M7b).

Article 3

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



Biotransformation of the flame retardant tetrabromo-bisphenol A by human and rat sub-cellular liver fractions

Daniel Zalko *, Caroline Prouillac, Anne Riu, Elisabeth Perdu, Laurence Dolo, Isabelle Jouanin, Cécile Canlet, Laurent Debrauwer, Jean-Pierre Cravedi

Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1089 Xénobiotiques, 180 chemin de Tournefeuille, BP3, 31931 Toulouse Cédex 9, France

Abstract

The comparative in vitro metabolism of the flame retardant tetrabromo-bisphenol A was studied in rat and human using a [¹⁴C]-radio-labelled molecule. Tetrabromo-bisphenol A is metabolised into the corresponding glucuronide (liver S9 fractions) and several other metabolites produced by cytochrome P450 dependent pathways (liver microsomes and liver S9 fractions). No major qualitative differences were observed between rat and human, regardless of the selected concentration, within the 20–200 μM range. Tetrabromo-bisphenol A undergoes an oxidative cleavage near the central carbon of the molecule, that leads to the production of hydroxylated dibromo-phenol, hydroxylated dibromo-isopropyl-phenol and glutathione conjugated dibromo-isopropyl-phenol. The main metabolites of tetrabromo-bisphenol A are two molecules of lower polarity than the parent compound, characterised as a hexa-brominated compound with three aromatic rings and a hepta-brominated dimer-like compound, respectively. Both structures, as well as the lower molecular weight metabolites resulting from the breakdown of the molecule, suggest the occurrence of chemically reactive intermediates formed following a first step oxidation of tetrabromo-bisphenol A.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Metabolism; Biotransformation; In vitro; Endocrine disrupter

1. Introduction

Brominated flame retardants (BFR) are widely used in the manufacture of industrial equipment and consumer goods in order to prevent or minimise fire damage. Tetrabromo-bisphenol A (TBBPA) is the largest selling BFR (WHO, 1997) with a world-wide demand currently estimated over 120000 tons/year (Arias, 2001; BSEF, 2004). TBBPA can be used either as an additive (physically mixed with polymers) or a reactive (polymerized) BFR to produce resins, high impact polystyrene and adhesives (WHO, 1995). It is primarily used as a reactive flame retardant in

the manufacture of epoxy resins (Hyötyläinen and Hartonen, 2002). The presence of TBBPA in environmental samples was first reported in Japan, in river sediments (Watanabe et al., 1983). It was later found in sediments in Sweden (Sellström and Jansson, 1995) and in municipal sewage sludge in Canada, Sweden and the USA (Lee and Peart, 2002; Oberg et al., 2002; Quade et al., 2003). Human exposure to TBBPA was demonstrated by analyses carried out on plasma samples from electronics dismantling plant workers in Sweden and Norway (Hagmar et al., 2000; Thomsen et al., 2002). Significant amounts of this BFR have also been found in human plasma with no direct relation to occupational exposure (Thomsen et al., 2001, 2002; Hayama et al., 2004), as well as tribromo-BPA (Thomsen et al., 2001, 2002). The latter could be a metabolite produced by the enzymatic de-halogenation of TBBPA, or may be the result of a direct exposure. Indeed, tribromo-BPA, bisphenol A (BPA), monobromo-BPA and

Abbreviations: BFR(s), brominated flame retardant(s); TBBPA, tetrabromo-bisphenol A; HSQC, heteronuclear single quantum correlation; HMBC, heteronuclear multiple bond connectivity.

* Corresponding author. Tel.: +33 561 285 004; fax: +33 561 285 244.

E-mail address: dzalko@toulouse.inra.fr (D. Zalko).

dibromo-BPA are all potential biodegradation products of TBBPA in the environment (Arbeli and Ronen, 2003).

Current data about the metabolic fate of TBBPA in animal models is limited, and though its half-life in human has been examined (Hagmar et al., 2000), no studies directly dealing with the metabolism of TBBPA in humans have been published so far. The formation of 3 different biliary conjugates was demonstrated *in vitro* in rats dosed TBBPA by an oral route (Hakk et al., 2000; Hakk and Letcher, 2003). In another study, it was stated that tribromo-BPA was a major metabolite of TBBPA in rat (Szymanska et al., 2001). TBBPA is the brominated analogue of the xeno-estrogen BPA, which undergoes *in vivo* and *in vitro* oxidative metabolism in addition to conjugation reactions (Zalko et al., 2003; Jaeg et al., 2004). For TBBPA, the balance between these different pathways is unknown and so is the relevance of rat as a model animal for the understanding of the fate of TBBPA in humans. On this basis, we started the present work to study the *in vitro* comparative biotransformation of TBBPA, using rat and human liver sub-cellular fractions. Both microsomes and S9 fractions were selected. Radio-labelled TBBPA was synthesised and analytical systems enabling the separation of TBBPA and its main metabolites were developed in order to achieve the separation of putative debrominated analogues of TBBPA and characterise the structure of TBBPA metabolites produced by the oxidative or conjugative biotransformation of this BFR.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Radio-labelled TBBPA [2,2-bis(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)propane] was synthesised from ring- ^{14}C -BPA (Moravek Biochemicals, CA, USA; radio-purity: >99%, specific activity: 7.4 GBq mmol $^{-1}$) according to Susán et al. (1978): 4.4 equivalents of bromine were added to 6.29 MBq ^{14}C -BPA and 600 μg unlabelled BPA (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France; purity: >99%) in 200 μl ethanol/water (1:1 v/v); after 1 h at room temperature, the reaction was quenched with sodium bisulfite, extracted with dichloromethane and the organic layer was dried with magnesium sulfate. TBBPA was purified by TLC (20 \times 20 cm \times 0.25 mm plates, silica 60 F 254) with acetone/petroleum ether (1:4 v/v Rf = 0.30). Its structure was confirmed by MS and NMR. Its radio-purity was checked by HPLC coupled to on-line radioactivity detection. Radio-labelled ^{14}C -TBBPA was obtained with a specific radioactivity of 1263.6 Bq μg^{-1} and was purified by HPLC (system I) to reach a radio-purity of 99.8%. Mono-, di- and tri-bromobisphenol A were synthesised by a similar method, but using 2.2 equivalents of bromine. They were purified by HPLC (system I) and their structure was confirmed by ESI-MS.

All solvents (analytical grade) were purchased from Scharlau Chemie SA (Barcelona, Spain). Dimethylsulfox-

ide (DMSO) and dimethylchlorosilane, unlabelled TBBPA, NADP, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, UDP glucuronic acid and β -glucuronidase from bovine liver were obtained from Sigma Aldrich. Acetic acid and toluene were purchased from Merck Eurolab (VWR International, France).

2.2. Sub-cellular fractions and *in vitro* incubations

Human liver sub-cellular fractions: S9 and microsomes from male and female were purchased from TEBU (Le-Perray-en-Yvelines, France) and obtained from pools of 10 donors. Three female and three male Wistar rats were killed by cervical dislocation followed by exsanguination and livers were perfused immediately using 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). Livers were weighed and homogenised using a Potter-Elvehjem Teflon glass homogeniser in 4 volumes g^{-1} of ice-cold phosphate buffer. S9 fractions were obtained by centrifugation at 10000g for 20 min at 5 $^{\circ}\text{C}$. Microsomal pellets were obtained by centrifugation of S9 fractions at 105000g for 60 min. Microsomes were resuspended with gentle homogenisation in 1 volume g^{-1} of 0.1 M phosphate buffer containing 20% glycerol. S9 fractions and microsomes were stored at -80°C until use. The protein contents of sub-cellular fractions were determined by the method of Lowry et al. (1951).

Metabolism of ^{14}C -TBBPA by rat and human liver S9 fractions and microsomes: *in vitro* biotransformations of TBBPA were studied by incubating 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ under shaking, radio-labelled ^{14}C -TBBPA (5000 Bq) fortified with unlabelled TBBPA at different concentrations (20, 50, 100 and 200 μM), with 2 mg microsomal protein or 7 mg S9 protein (100 mg liver equivalent) in a final volume of 1 ml 0.1 M sodium/potassium buffer, 5 mM MgCl_2 (pH 7.4) containing a NADPH generating system (1.3 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, 2 IU glucose-6-phosphate dehydrogenase). Measurement of radioactivity was carried out for every concentration prior to the beginning of incubations, to ensure that TBBPA was correctly dissolved in the medium. Whatever the *in vitro* system, more than 92% of the radioactivity put in incubations was recovered in supernatants, with no significant difference between rat and human, nor between females and males.

Blank samples without NADPH generating system were used as controls for non-NADPH-mediated TBBPA transformation. Reactions were stopped by adding three volumes of methanol, and samples were centrifuged for 10 min at 6000g. Supernatant samples (500 μl) were concentrated under a nitrogen stream and analysed by HPLC coupled to on-line radioactivity detection.

Confirmation of TBBPA-glucuronide structure: S9 incubation media extracts were incubated in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5) for 4 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, with 500 IU of bovine liver β -glucuronidase (without sulfatase activity, determined using 4-nitrophenyl sulfate as substrate) prior to analysis by HPLC coupled to on-line radioactivity detection.

In vitro synthesis of [^{14}C]-TBBPA-glucuronide: [^{14}C]-TBBPA glucuronidation was performed by incubating 2 mg microsomal protein with labelled TBBPA (100 μM ; 5000 Bq) and UDP-glucuronic acid (1 mM) in 1 ml 0.5 M Tris buffer pH 7.4 containing 10 mM MgCl_2 for 2 h at 37 $^\circ\text{C}$.

2.3. Analytical procedure

All experiments were carried out using low binding cones (VWR International) and glass material silanised with dimethylchlorosilane:toluene (5:95 v/v) and washed with acetonitrile. Radioactivity in liquid samples was determined by direct counting on a Packard liquid scintillation counter (Model Tricarb 2200CA; Packard Instruments, Meriden, CT, USA) using Packard Ultima Gold as the scintillation cocktail.

Supernatant extracts were analysed by HPLC on a HP1100 series apparatus (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) equipped with a Rheodyne Model 7125 injector (Rheodyne, Cotati, CT, USA) connected for radioactivity detection to a Radiomatic Flo-One/ β A500 instrument (Radiomatic, La-Queue-Lez-Yvelines, France) using Packard Flo-Scint II as the scintillation cocktail to establish metabolic profiles, or to an HP1100 series UV detector set at 254 nm and a Gilson Model 201/202 fraction collector (Gilson, Roissy, France) for metabolite purification.

Metabolic profiling was carried out using HPLC system I, which consisted of a Fluofix column (250 \times 4.6 mm, 5 μm) (Interchim, Montluçon, France) coupled to a Kromasil C18 guard precolumn (18 \times 4.6 mm, 5 μm) (Interchim). Mobile phases: A: acetic acid solution at pH 3.2:acetonitrile (95:5 v/v); B: 100% acetonitrile; 0–4 min, A: 100% isocratic; 4–6 min, linear gradient from A: 100% to A:B 60:40; 6–30 min, A:B 60:40 isocratic; 30–32 min, linear gradient from A:B 60:40 to B: 100%; 32–64 min, B: 100% isocratic; Flow rate: 1 ml min^{-1} ; 35 $^\circ\text{C}$. Additional separation of TBBPA metabolites (M7) was obtained with HPLC system II using a Nucleodur C8 column (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) with the following gradient: 0–4 min, A: 100% isocratic; 4–6 min, linear gradient from A: 100% to A:B 40:60; 6–30 min, A:B 40:60 isocratic; 30–50 min, linear gradient from A:B 40:60 to B: 100%; 50–64 min, B: 100% isocratic.

2.4. Metabolites isolation and structural characterisation

Metabolite isolation was carried out using the 100 μM TBBPA incubation supernatants, separately for male and females, for the two experimental systems (liver microsomes/liver S9 fractions) and for both species. Supernatants extracts were concentrated under a nitrogen stream, re-diluted in 8 ml acetic acid (pH 3.2):acetonitrile (80:20, v/v), and fractionated on 1 g Chromabond C18ec glass cartridges (Macherey Nagel) previously washed with 4 ml acetonitrile and equilibrated with 8 ml acetic acid (pH 3.2):acetonitrile (80:20, v/v). Elution was performed succes-

sively with 4 ml acetic acid (pH 3.2):acetonitrile (80:20, v/v), 8 ml acetic acid (pH 3.2):acetonitrile (60:40, v/v) and 8 ml acetonitrile. The last two fractions were concentrated and partitioned using HPLC systems I and II. Metabolite structural characterisations were carried out on a quadrupole ion trap mass spectrometer (Finnigan LCQ, Thermo Finnigan, Les Ullis, France) fitted with an electrospray ionisation source operated in the negative ionisation mode. Samples (typically 1 ng μl^{-1} in MeOH: H_2O 50:50, v/v) were introduced into the ionisation source by direct infusion at a flow rate of 3 $\mu\text{l min}^{-1}$. Typical ionisation source operating conditions were as follows: electrospray needle, 5 kV; heated transfer capillary, -20 V; tube lens offset, -35 V. The heated capillary was maintained at 200 $^\circ\text{C}$. Other parameters for MS experiments were adjusted for each compound in order to obtain maximum sensitivity (i.e. octapoles and inter-octapoles lens voltages tuned for maximum ion beam transmission). MS/MS experiments were carried out using typical parent ion isolation width of 1.5 a.m.u. and collision energies of 17–30% arbitrary units (corresponding to an excitation voltage of 0.85–1.5 $V_{\text{p-p}}$). All analyses were achieved under automatic gain control conditions using helium as damping as well as collision gas for MS/MS experiments.

NMR spectra were obtained at 300 K on a Bruker Avance DRX-600 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 600.13 MHz and equipped with a 5 mm H, C, N inverse triple resonance TXI cryoprobe attached to a Cryoplatfom (the preamplifier cooling unit). Samples were dissolved in 600 μl CD_3CN . One-dimensional spectra were acquired using a standard pulse sequence for ^1H NMR. 1024 free induction decays (FIDs) were collected with a spectral width of 12 ppm into 64 K data points. An exponential function equivalent to a line-broadening of 0.3 Hz was applied prior to Fourier transformation. ^1H - ^{13}C heteronuclear single quantum correlation (HSQC) spectra were acquired using a standard echo/antiecho-TPPI gradient selection pulse sequence with the following parameters: 6 and 30 kHz spectral widths in the proton and carbon dimensions, respectively, 1 K data points in f_2 and 512 increments in f_1 . The ^1H - ^{13}C heteronuclear multiple bonding connectivity (HMBC) spectra optimised for long-range couplings were obtained with a 2.5 s relaxation delay, 6 and 36 kHz spectral widths in the proton and carbon dimensions, respectively, 1 K data points in f_2 and 512 increments in f_1 .

3. Results

3.1. Radio-HPLC profiling of TBBPA incubations

Incubation of TBBPA with liver microsomes. Radio-HPLC profiles corresponding to the analyses of 20 μM TBBPA incubations are shown in Fig. 1, for female rat (A) and human (B). Using HPLC system I, the retention time (R_t) of TBBPA was 29.2 min. Two major metabolite peaks were observed. The more hydrophilic peak (M3)

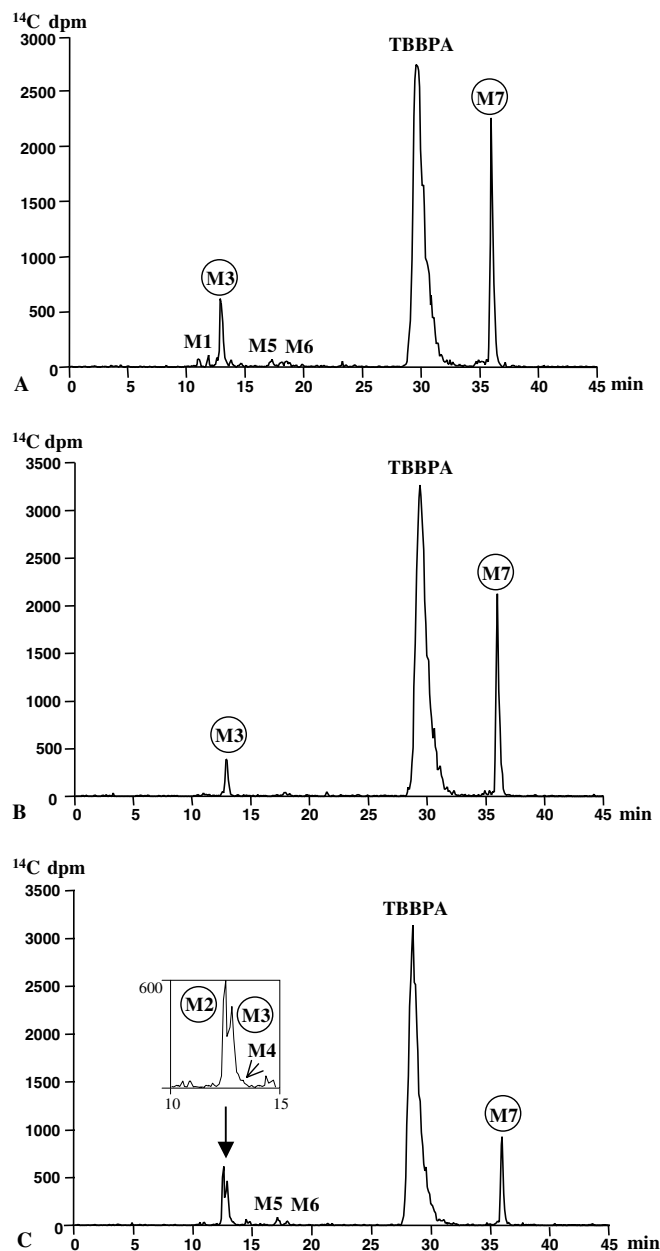


Fig. 1. Radio-chromatographic profiles obtained from the incubation of radio-labelled TBBPA (20 μ M, 2 h) with liver microsomes from female rat (A) and female human (B), and S9 liver fractions from woman (C), respectively. M1 to M7 are TBBPA metabolites.

had a R_t of 12.9, while M7 (R_t : 36 min) was less hydrophilic than TBBPA. Additional peaks eluting before TBBPA were observed (M1, M5, M6) but none of them accounted for more than 1% of the detected radioactivity. Qualitatively, no difference was observed between the radio-chromatograms obtained at 20 μ M and those obtained for higher concentrations of TBBPA, nor between male and female rats, or male or female human microsomes, respectively. In control incubations carried out without a NADPH generating system, only parent TBBPA was observed on the radio-chromatograms. The HPLC gradient was developed with the aim to detect the formation

of putative debromination products, namely BPA, mono-, di- and tri-bromo BPA. These compounds would elute at 14.5, 16.5, 18.9, and 22.8 min, respectively. Whatever the TBBPA concentration or the sub-cellular fraction used, none of these compounds was formed at a level of more than 0.5% of the chromatogram radioactivity.

Incubation of TBBPA with liver S9 fractions. Radio-chromatograms were qualitatively identical to those obtained with liver microsomes except that a third major metabolite, with a R_t of 12.5 min (M2) was detected in all incubation supernatants (Fig. 1C), as well as a very small radioactive peak with a R_t of 13 min (M4). No qualitative difference was observed between the different profiles, whatever the species, gender or TBBPA concentration, and no debromination of TBBPA could be detected. M2 was found to co-elute with authentic TBBPA-glucuronide previously synthesised at the laboratory. S9 supernatant incubation with bovine liver β -glucuronidase confirmed this structural hypothesis since M2 was deconjugated to TBBPA. In control S9 incubations carried out without a NADPH generating system (data not shown) only TBBPA and TBBPA-glucuronide were detected.

3.2. Quantitative analysis

The formation rates of M3 and M7 were calculated for all incubations carried out with liver microsomes, and expressed in nmoles of metabolised TBBPA mg of microsomal protein⁻¹ h⁻¹ (Fig. 2). The formation of both peaks was cytochrome P-450 dependent because neither of them was observed when no NADPH generating system was added to the incubations. Both curves appeared to be enzymatic saturation curves. For M3, saturation occurred around 50 μ M TBBPA, with a significant difference between male and female rats at 20 μ M and 50 μ M TBBPA ($p < 0.05$). Similar gender-related differences were observed in human, though no statistical analyses were carried out since unique incubations of pooled human sub-cellular fractions were used for the study. At 50 μ M TBBPA, M7 accounted for 21.4 \pm 3.3% and 17.6 \pm 5.3% of the detected radioactivity in male and female rats incubation supernatants, respectively. Its formation rates showed gender-related differences in rat, which were statistically significant for the two highest concentrations. Peak 7 formation rate did not appear to reach a complete saturation at 200 μ M, at the highest TBBPA concentration used (Fig. 2B). TBBPA-glucuronide was formed at a much higher rate using rat S9 fraction than human S9 fractions (Fig. 3).

3.3. Metabolite isolation

The first elution of C18 cartridges (pH 3.2, 20% acetonitrile) was discarded because it contained no radioactivity. The second fraction, eluted with 40% acetonitrile, contained all polar TBBPA metabolites (M1 to M6), while the remainder of the radioactivity (TBBPA and M7) was recovered with the last elution fraction at 100% acetonitrile.

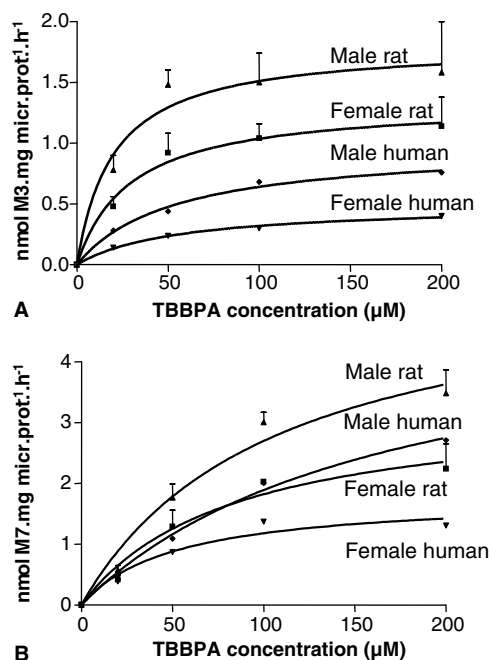


Fig. 2. Effect of TBBPA concentration on metabolites M3 (A) and M7 (B) production by rat and human liver microsomes. Values are the mean \pm SD of data derived from samples from 3 rats (male and female). In human, results were obtained using liver microsomes from a pool of 10 donors.

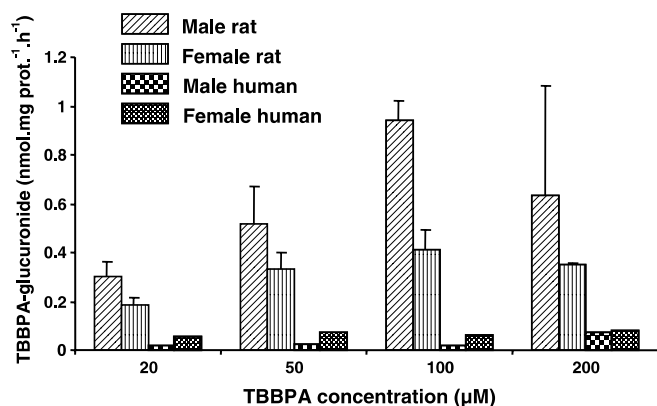


Fig. 3. TBBPA-glucuronide production at varying concentrations of TBBPA, in rat and human liver S9 incubations. Mean \pm SD from 3 rats (male and female), or from a single determination for human (pool of 10 donors).

trile. the first MS analyses of radioactive M7 indicated that this peak contained multiple metabolites which could not be resolved with the Fluofix HPLC column. M7 was efficiently separated on a C8 column (HPLC system II). Nearly 90% of the radioactivity within this peak was eluted with HPLC system II at 37.4 min (M7a) or 40.6 min (M7b) (Fig. 4). Additional incubations at 100 μ M TBBPA were carried out with liver microsomes in male rats and humans in order to produce enough material for the NMR analyses of these two compounds. M7a and M7b, respectively, accounted for ca. 35% and 50% of the radioactivity. The remainder of the radioactivity was associated with at least

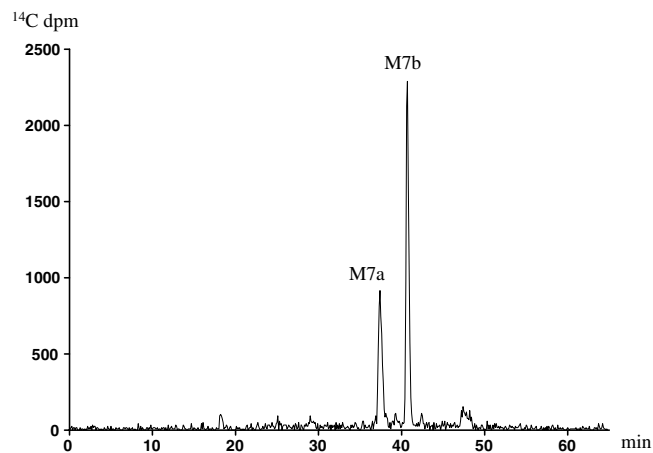


Fig. 4. Radio-HPLC analysis of radioactive peak 7 using a C8 column (HPLC system II), showing the separation of TBBPA metabolites M7a and M7b.

5 minor compounds which could not be isolated in sufficient amounts to achieve structural characterisation.

3.4. TBBPA metabolites structural characterisation

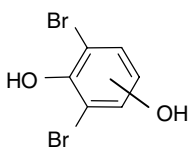
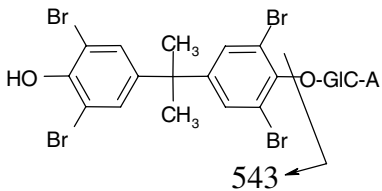
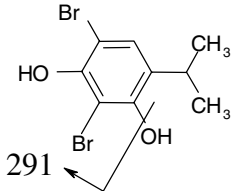
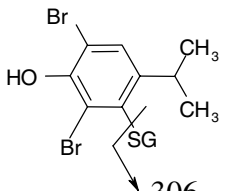
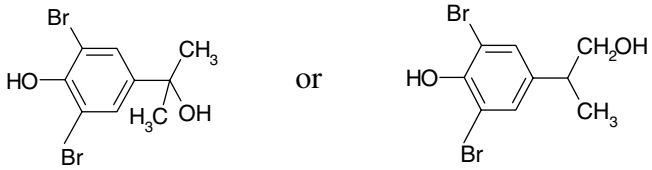
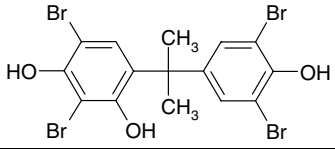
Polar TBBPA metabolites (M1 to M6). Metabolites were concentrated and analysed by ESI-MS in the negative mode. Results are summarised in Table 1. Except otherwise indicated, MS analyses always produced similar results for peaks with a similar R_t , regardless the type of incubation they were isolated from.

M3 $[M-H]^-$ quasi-molecular ion was detected at m/z 309. The isotopic pattern observed was consistent with that of a molecule bearing 2 bromine atoms. MS/MS analysis demonstrated the loss of water. A similar result was obtained for M5. On these bases, M3 and M5 were characterised as two isomers of hydroxylated 2,6-dibromo-4-isopropyl-phenol. For the latter, the loss of water in MS/MS was obtained with a lower collision energy, meaning that the hydroxyl group was more labile for M5 than for M3. Therefore it is hypothesised that for M5, hydroxylation occurred on the isopropyl moiety, while for M3 (the major polar metabolite when TBBPA was incubated with liver microsomes) hydroxylation occurred on the aromatic ring.

The minor metabolite M1 was identified from the supernatants of TBBPA incubations with male or female rat microsomes. Based on R_t it was present in the supernatants of all the incubations we carried out. The $[M-H]^-$ quasi-molecular ion was detected at m/z 267, corresponding to hydroxylated 2,6-dibromo-phenol. For M6, a $[M-H]^-$ quasi-molecular ion was detected at m/z 559, suggesting a hydroxylated TBBPA. Given the limited amounts of M1 and M6 formed in the incubations, it was impossible for stereochemical assignments to be made.

M2, present only in S9 fraction supernatants, was confirmed to be TBBPA mono-glucuronide, with a $[M-H]^-$ quasi-molecular ion detected at m/z 719 and a loss of 176

Table 1
Structure, HPLC data and mass spectral data for TBBPA metabolites M1 to M6

Metabolite R_t (min)	Structure	Quasi-molecular ion $[M-H]^-$ (m/z) (most abundant ion)
M1 (11.9)		267
M2 (12.5)		719
M3 (12.9)		309
M4 (13)		598
M5 (17)		309
M6 (17,3)		559

mass units in MS/MS, corresponding to glucuronic acid. Based on its R_t , M4 was only present in S9 supernatants. However, sufficient amounts of this minor metabolite could only be isolated from rat. The $[M-H]^-$ quasi-molecular ion was detected at m/z 598, corresponding to an odd molecular weight of 599, thus indicating the presence of an odd number of nitrogen atoms in the molecule. Its fragmentation in MS/MS led to the formation of a m/z 306 fragment ion which can be considered as diagnostic for a glutathione moiety. Thus, this metabolite was characterised as the glutathione conjugate of 2,6-dibromo-4-isopropyl phenol.

M7 structural characterisation. ESI-MS analyses of M7a and M7b produced similar results regardless of the type of

incubation these metabolites were isolated from: male or female rat, or male or female human. The isotopic distribution of the $[M-H]^-$ quasi-molecular ion of M7a was centred on m/z 793. The observed isotopic pattern was consistent with that of a hexabrominated molecule (Fig. 5A). Additional support was provided by H/D exchange experiments using CH_3OD/D_2O as the solvent. Under these conditions, the quasi-molecular ion of M7a was shifted from a $[M-H]^-$ species at m/z 793 to a $[M_{d2}-D]^-$ species at m/z 794, consistent with the presence of two exchangeable hydrogen atoms. On this basis it was concluded that M7a was a hexabrominated metabolite formed by TBBPA and 2,6-dibromo-4-hydroxy-phenol. Two isomers could correspond to this formula.

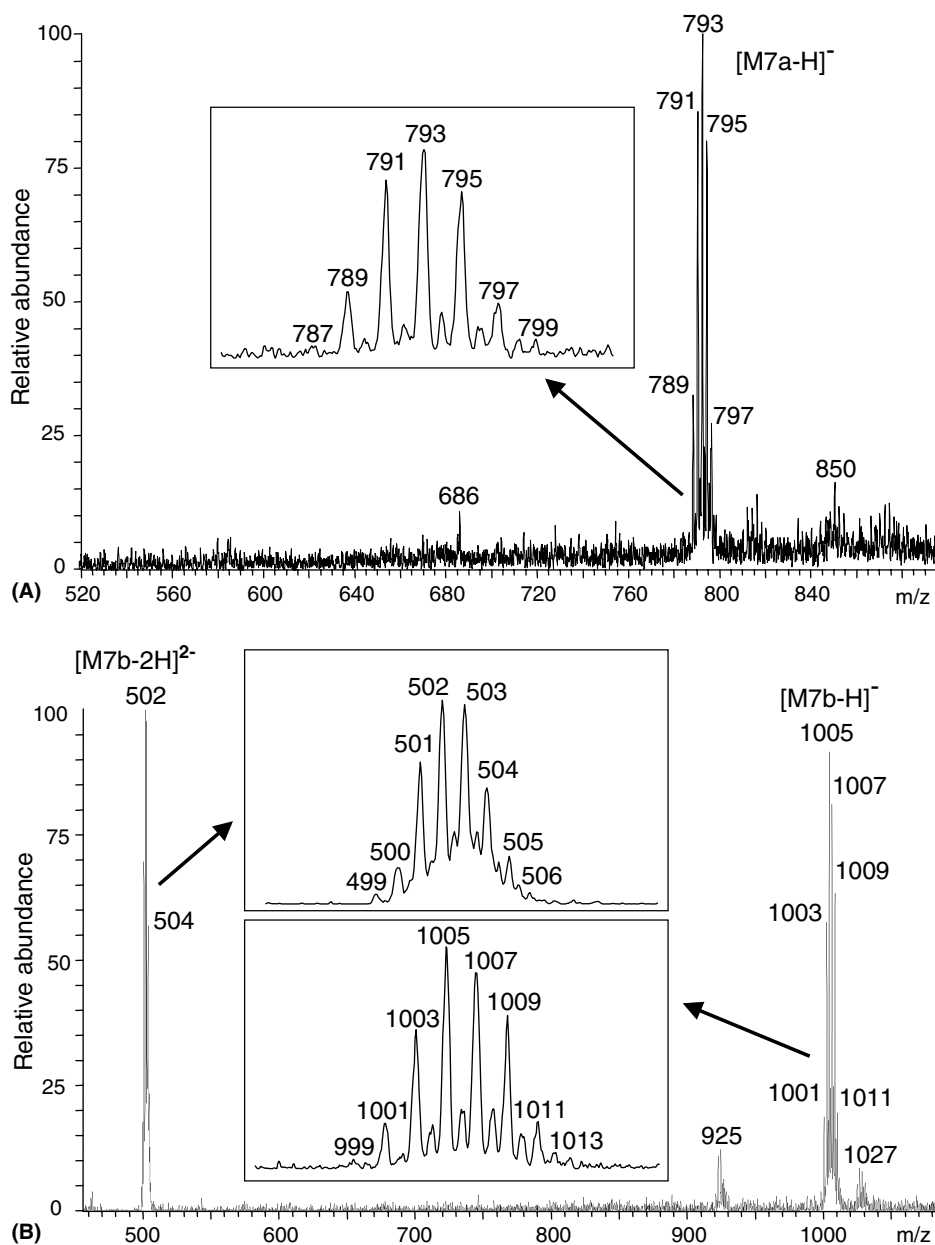


Fig. 5. Negative ESI-MS spectra of metabolites M7a (A) and M7b (B) isolated from the supernatants of 100 μ M TBBPA incubations with human liver microsomes.

The NI-ESI Mass Spectrum of M7b displayed a $[M-H]^-$ quasi-molecular ion isotopic cluster centred at m/z 1005 together with the doubly-charged $[M-2H]^{2-}$ species at m/z 502. In this case, the isotopic pattern observed was consistent with that of a molecule bearing 7 bromine atoms (Fig. 5B). H/D exchange experiments were also carried out on this metabolite. The quasi-molecular ion of M7b was shifted from a $[M-H]^-$ species at m/z 1005 to a $[M_{d3}-D]^-$ species at m/z 1007. This confirmed that only 3 hydroxy groups had exchangeable hydrogen atoms. Thus, M7b was tentatively identified as a “TBBPA dimer” with an ether bond and 7 bromine atoms. Again, two isomeric structures could correspond to this formula.

Additional amounts of M7a and M7b were isolated from TBBPA incubations carried out with male rat and human liver microsomes, respectively, and were analysed by 1H NMR, gradient selection gs-HSQC and gs-HMBC. The 1H and ^{13}C chemical shifts are summarised in Table 2. According to MS analyses, the elemental formula of M7a was $C_{21}H_{14}Br_6O_3$, implying 12 degrees of unsaturation assigned to three aromatic rings. The 1H NMR spectrum of M7a showed three singlets at 7.02, 7.41 and 7.51 ppm in the aromatic region, each singlet integrating to two equivalent protons, because of the symmetry of each ring. HMBC experiment performed on M7a showed correlations between H-3 (δ 7.41) and C-4 (δ 150.5), C-2

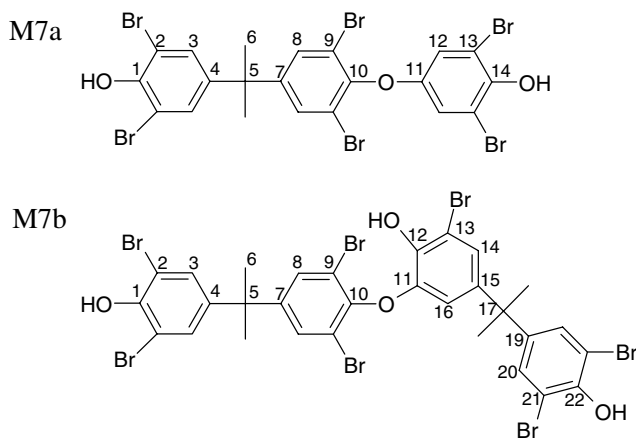
Table 2
¹³C and ¹H NMR chemical shifts in CD₃CN for metabolites M7a and M7b

Atom	M7a		M7b	
	$\delta^{13}\text{C}^a$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}^a$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
1	NO ^b	–	NO ^b	–
2	111.8	–	111.7	–
3	132.3	7.41 (s)	132.5	7.35 (s)
4	150.5	–	150.3	–
5	44.2	–	43.6	–
6	30.5	1.63 (s)	30.8	1.62(s)
7	148.4	–	148.2	–
8	133.4	7.51 (s)	133.6	7.46 (s)
9	119.4	–	119.2	–
10	NO ^b	–	NO ^b	–
11	151.6	–	145.9	–
12	147.9	7.02 (s)	NO ^b	–
13	112.4	–	114.5	–
14	NO ^b	–	125.7	7.18 (d) $J = 2$ Hz
15	–	–	143.2	–
16	–	–	113.6	5.95 (d) $J = 2$ Hz
17	–	–	43.2	–
18	–	–	31.0	1.45 (s)
19	–	–	150.3	–
20	–	–	132.7	7.19 (s)
21	–	–	111.7	–
22	–	–	NO ^b	–

Atom numbering: see M7a and M7b formulas.

^a Determined from the cross sections of HSQC and HMBC NMR spectra.

^b Signal not observed.



(δ 111.8) and C-5 (δ 44.2) and between H-8 (δ 7.51) and C-7 (δ 148.4), C-9 (δ 119.4) and C-5 (δ 44.2), indicating the presence of a TBBPA moiety. The HMBC spectrum of M7a also exhibited correlations between H-12 (δ 7.02) and C-11 (δ 151.6) and C-13 (δ 112.4). The chemical shift of C-12 (δ 147.9) indicated the presence of a dibromophenol moiety, the linkage between the two moieties being an ether bond, not a C–C bond. Moreover, the ¹³C chemical shifts obtained by 2D-NMR techniques led to the unequivocal characterisation of M7a as 2,6-dibromo-4-(2',6'-dibromo-1'-hydroxycumyl)-phenoxy-3'',5''-dibromo-4''-hydroxybenzene.

For M7b, MS analyses were consistent with a C₃₀H₂₃Br₇O₄ elemental formula implying 16 degrees of

unsaturation assigned to four aromatic rings. The ¹H NMR spectrum of M7b showed two doublets at 5.95 and 7.18 ppm with a coupling constant of 2 Hz corresponding to meta coupling, and three singlets at 7.19, 7.35 and 7.46 ppm in the aromatic region, each singlet integrating to two equivalent protons, because of the symmetry of these rings. Since the C-11/C-17 aromatic ring bears four different substituents, there was no symmetry, the two protons were not equivalent and a meta coupling was observed. In the aliphatic region, two singlets at 1.45 and 1.62 ppm corresponding to two non-equivalents methyl groups were observed. The correlations observed in the HMBC spectrum indicated the presence of a TBBPA moiety. Correlations between H-20 (δ 7.19) and C-19 (δ 150.3), C-20 (δ 132.7), C-21 (δ 111.7) and C-17 (δ 43.2) confirmed the structure of the terminal ring of the molecule. Due to the structure of the C-11/C-17 aromatic ring, two possible isomers could correspond to M7b. However, the correlations obtained in HMBC experiment between $\delta = 5.95$ and $\delta = 145.9$ ppm, and between $\delta = 7.18$ and $\delta = 114.5$ ppm, respectively, indicated that the ¹³C chemical shifts of C-11 and C-13 were 145.9 and 114.5 ppm, respectively, and ¹H chemical shifts of H-16 and H-14 were 5.95 and 7.18 ppm, respectively. Therefore, carbon-11 was necessarily linked to a substituent O-aryl and carbon-12 beared a hydroxy group. On this basis, M7b was characterised as 2,6-dibromo-4-(2',6'-dibromo-1'-hydroxycumyl)-phenoxy-2''-hydroxy-3''-bromo-5''-(2',6'-dibromo-1'-hydroxycumyl)benzene.

4. Discussion

The comparative in vitro study of TBBPA biotransformation in rat and human demonstrates that this BFR is extensively metabolised by oxidative as well as conjugative enzyme-dependent pathways. High-grade purity [¹⁴C]-TBBPA enabled us to identify several metabolites present in small amounts in incubation supernatants. Neither rat nor human liver sub-cellular fractions were able to debrominate TBBPA, unless these compounds were produced in very small amounts and could not be detected.

In vivo studies of the metabolic fate of TBBPA in rat have demonstrated the formation of sulfate and glucuronide conjugates excreted in bile (Hakk et al., 2000). Incubations carried out with liver S9 fractions confirm that TBBPA mono-glucuronide (M2) is a major metabolite of TBBPA. However, the predominant metabolic pathways of TBBPA in vitro are cytochrome P450 dependent. As previously observed with BPA, the non-brominated analogue of TBBPA (Jaeg et al., 2004), a cleavage of the molecule adjacent to the central carbon atom occurs, leading to the production of two different types of metabolites. On one hand, we identified three compounds sharing a dibromo-isopropyl-phenol structure, namely two hydroxylated isomers of 2,6-dibromo-4-isopropyl-phenol (M3 and M5), and the glutathione conjugate of 2,6-dibromo-4-isopropyl-phenol (M4). The latter metabolite was produced

only in incubations of TBBPA with S9 fractions, as expected. On the other hand, only one metabolite (M1) was based on a dibromo-phenol structure. It was characterised as hydroxylated 2,6-dibromo-4-phenol. All these metabolites, as well as TBBPA glucuronide, were found to be more polar than TBBPA in our reversed-phase HPLC system. Among these, M3 was the major metabolite of TBBPA. It was produced by cytochrome P-450 oxidative reactions, as evidenced by its formation in both species and by control incubations carried out without a NADPH generating system. Since we used TBBPA labelled on both aromatic rings, it would be expected that a metabolite would have formed from the other half of the molecule, e.g. dibromo-phenol, which was not observed.

The detailed structural study of the major *in vitro* metabolites of TBBPA (M7), which eluted later than TBBPA, provided additional information. To achieve the structural characterisation of this peak, it was necessary to develop a second HPLC system, able to separate the co-eluting components, identified as 2,6-dibromo-4-(2',6'-dibromo-1'-hydroxycumyl)-phenoxy-3'',5''-dibromo-4''-hydroxybenzene (M7a) and 2,6-dibromo-4-(2',6'-dibromo-1'-hydroxycumyl)-phenoxy-2''-hydroxy-3''-bromo-5''-(2',6'-dibromo-1'-hydroxycumyl)benzene (M7b), respectively. M7a and M7b were not formed unless a NADPH generating system was added to the incubations, suggesting that the first step of the formation of both compounds was necessarily the P450-dependent oxidation of TBBPA. The hydroxylation of BPA on one of the methyl groups linked to the central carbon was previously demonstrated, as well as the ring hydroxylation of this molecule (Zalko et al., 2003; Jaeg et al., 2004). Small amounts of hydroxylated-TBBPA (M6) were detected in incubation supernatants. The understanding of the mechanism of formation of M7a and M7b deserves additional investigations. The structure of metabolite M7b suggests a nucleophilic substitution of a bromine of one molecule of TBBPA by a second molecule of TBBPA. Based on our results, a possible explanation for the formation of M7a would be that TBBPA undergoes a first-step P450-dependent hydroxylation, resulting in a chemically reactive radical intermediate. Two molecules of this hydroxylated intermediate could then disproportionate with concomitant cleavage and dehydration, giving rise on one hand to TBBPA and hydroxy-dibromo-phenol (M1), which in incubation media would combine to produce M7a by dehydration, and on the other hand to an intermediate radical of dibromo-isopropyl-phenol, recovered in incubation supernatants as a glutathione conjugate (M4) or as hydroxylated metabolites (M3, M5).

The possible occurrence of oxidative metabolic pathways of TBBPA *in vivo* remains unknown. We carried out preliminary studies *in vitro* in rat (D. Zalko, unpublished data) which are in very good agreement with Hakk et al. results (2000), showing no debromination of TBBPA and predominantly conjugative metabolism. Tough the formation of very limited amounts of mono-, di- or tri-bro-

mobisphenol A *in vitro* cannot be totally ruled out, the current *in vitro* study suggests that the significant amounts of tribromobisphenol A found in rat feces (Szymanska et al., 2001) very likely result from the biodegradation of TBBPA by rat gut micro-flora rather than from the hepatic biotransformation of TBBPA. Qualitatively, the biotransformation of TBBPA by rat and human liver sub-cellular fractions was similar, with very few differences observed between males and females. Thus, rat appears to be a good model for the understanding of the fate of this high volume BFR. The structure of several metabolites indicated that reactive intermediates could be formed following the P450-oxidation of the molecule. These structures may be able to bind to endogenous macro-molecules, triggering adverse toxicological effects. Very few studies have been made available concerning TBBPA toxicity. In rat, TBBPA may disrupt heme metabolism (Szymanska et al., 2000). It was also shown to be immunotoxic *in vitro*, in murine splenocytes (Pullen et al., 2003). The underlying mechanisms have not been elucidated, but might be linked with the oxidative metabolism of TBBPA. Furthermore, metabolites which are less polar than TBBPA (M7a, M7b) have been shown to form *in vitro*. Their possible accumulation in tissues is unknown, nor are their biological effects. TBBPA inhibits triiodothyronine fixation on the thyroid hormone receptor (Kitamura et al., 2002) and is a competitor of thyroxine fixation on transthyretin (Meerts et al., 2000). Information about the biological activity of TBBPA metabolites will have to be generated in order to better understand their potential endocrine disrupter properties.

Acknowledgements

We wish to thank F. Blas-y-Estrada and R. Gazel for excellent technical support and express our appreciation for the financial support provided by the “Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale” (AFSSE grant RD-2004-011).

References

- Arbeli, Z., Ronen, Z., 2003. Enrichment of a microbial culture capable of reductive debromination of the flame retardant tetrabromobisphenol-A, and identification of the intermediate metabolites produced in the process. *Biodegradation* 14, 385–395.
- Arias, P.A., 2001. Brominated flame retardants—an overview. In: *Proceedings of the Second International Workshop on Brominated Flame Retardants: BFR 2001, 14–16 May 2001, Stockholm, Sweden*, pp. 17–19.
- BSEF (Bromine Science and Environmental Forum), 2004. Tetrabromobisphenol A fact sheet edition 2004. http://www.bsef-site.com/env_health/tbbpa/BSEF%20TBBPA%20Final.pdf.
- Hakk, H., Letcher, R.J., 2003. Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants—a review. *Environ Int.* 29, 801–828.
- Hakk, H., Larsen, G., Bergman, A., Orn, U., 2000. Metabolism, excretion and distribution of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in conventional and bile-duct cannulated rats. *Xenobiotica* 30, 881–890.
- Hagmar, L., Sjödin, A., Höglund, P., Thuresson, K., Rylander, L., Bergman, A., 2000. Biological half-lives of polybrominated diphenyl

- ethers and tetrabromobisphenol A in exposed workers. *Organohalogen Compd.* 47, 198–201.
- 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. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 809, 131–136.
- Hyytiäinen, T., Hartonen, K., 2002. Determination of brominated flame retardants in environmental samples. *Trends Analyt. Chem.* 21, 13–29.
- Jaeg, J.P., Perdu, E., Dolo, L., Debrauwer, L., Cravedi, J.P., Zalko, D., 2004. Characterization of new bisphenol A metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4935–4942.
- Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H., Fujimoto, N., 2002. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 554–559.
- Lee, H.B., Peart, T.E., 2002. Organic contaminants in Canadian municipal sewage sludge. Part I. Toxic or endocrine disrupting phenolic compounds. *Water Qual. Res.* 37, 681–696.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, R.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Meerts, I.A., van Zanden, J.J., Luijckx, E.A., 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. *Toxicol. Sci.* 56, 95–104.
- Oberg, K., Warman, K., Oberg, T., 2002. Distribution and levels of brominated flame retardants in sewage sludge. *Chemosphere* 48, 805–809.
- Pullen, S., Boecker, R., Tiegs, G., 2003. The flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrabromobisphenol A-bisallylether suppress the induction of interleukin-2 receptor alpha chain (CD25) in murine splenocytes. *Toxicology* 184, 11–22.
- Quade, S.C., Alaei, M., Marvin, C., Hale, R., Solomon, K.R., Bunce, N.J., Fisk, A.T., 2003. Determination of tetrabromobisphenol A in Detroit river sediment and sewage sludge. In: *Proceedings of Dioxin 2003 (23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs)*, 24–29 August 2003, Boston MA, USA, 99. pp. 327–330.
- Sellström, U., Jansson, B., 1995. Analysis of tetrabromobisphenol A in a product and environmental samples. *Chemosphere* 31, 3085–3092.
- Susán, A.B., Ebert, D.A., Duncan, W.P., 1978. Synthesis of ¹⁴C-labelled flame retardants. ¹⁴C-labelled tetrabromophthalic anhydride and tetrabromobisphenol-A. *J. Label. Compd. Radioph.* 16, 579–589.
- Szymanska, J.A., Piotrowski, J.K., Frydrych, B., 2000. Hepatotoxicity of tetrabromobisphenol-A: effects of repeated dosage in rats. *Toxicology* 142, 87–95.
- 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.
- Thomsen, C., Lundanes, E., Becher, G., 2001. Brominated flame retardants in plasma samples from three different occupational groups in Norway. *J. Environ. Monit.* 3, 366–370.
- 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. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1414–1418.
- Watanabe, I., Kashimoto, T., Tatsukawa, R., 1983. Identification of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in the river sediment and the mussel collected in Osaka. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 48–52.
- WHO, 1995. *Environmental Health Criteria 172, Tetrabromobisphenol A and derivatives*. World Health organization, Geneva.
- WHO, 1997. *Environmental Health Criteria 192, Flame retardants: a general introduction*. World Health organization, Geneva.
- Zalko, D., Soto, A.M., Dolo, L., Dorio, C., Rathahao, E., Debrauwer, L., Faure, R., Cravedi, J.P., 2003. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ. Health Perspect.* 111, 309–319.

II. DEVENIR du [¹⁴C]-TBBPA chez la RATE GESTANTE

Il nous est apparu important de savoir quel était le devenir du TBBPA et de ses résidus chez l'animal, et de préciser quels étaient les niveaux d'exposition à cette molécule pour les fœtus, chez un modèle mammalien. Dans la mesure du possible, nous souhaitons également quantifier la proportion de métabolites présents dans les tissus de la mère et chez les fœtus, et déterminer si les résultats obtenus *in vitro*, précédemment décrits, étaient transposables *in vivo*.

1. Introduction

Les études peu nombreuses actuellement disponibles quant au devenir du TBBPA *in vivo*, font état chez le rat d'une faible bioaccumulation tissulaire avec une élimination rapide des résidus par voie fécale. Une large proportion de métabolites a été retrouvée dans la bile, démontrant une absorption gastro-intestinale de ce composé (Hakk *et al.* 2000). Les métabolites majoritairement observés sont des conjugués, cependant il a été mentionné la présence de tribromoBPA dans les fèces de rats traités par voie orale avec du TBBPA (Szymanska *et al.* 2001). La présence de tribromoBPA dans le plasma de rats traités, a été récemment confirmée (Schauer *et al.* 2006). Les profils métaboliques correspondants n'ont jamais été décrits. Les risques d'exposition fœtale au TBBPA sont également inconnus. C'est pour compléter ces données que nous avons entrepris l'étude du devenir du TBBPA radio-marqué au carbone 14 chez la rate gravide à un stade de gestation avancé (J16 à J19). L'administration d'une dose relativement faible (< 200 µg/kg) de TBBPA a été effectuée par voie orale pendant 4 jours consécutifs.

2. Matériels et méthodes

2.1. Synthèse

Les protocoles de synthèse et de purification du [¹⁴C]-TBBPA ont été détaillés dans la 1^{ère} partie du Chapitre 2 (I.1). L'activité spécifique de la molécule correspondait à 6626 Bq/µg et sa pureté testée par radio-CLHP était supérieure à 99,8 %.

2.2. Animaux

Trois rates Wistar gestantes (poids corporel, [p.c.]: 235 ± 11 g) provenant de chez Charles River (l'Arbresle, France), ont été acclimatées et logées individuellement dans des cages à métabolisme en inox. Les animaux, avec un libre accès à l'eau et à un régime standard (SAFE, Augy, France), ont été maintenus dans une pièce avec un cycle d'éclairage de 12 h/jour. A partir du 16^{ème} jour de gestation, chaque animal a été gavé tous les jours pendant 4 jours, avec du [¹⁴C]-TBBPA solubilisé dans 500 µL d'huile d'arachide, les doses étaient ajustées à 285,5 µg/kg p.c./jour (1,8 MBq/kg p.c./jour). Les animaux ont été abattus par dislocation des cervicales et exsanguination 24 h après le dernier gavage, le sang étant collecté dans des tubes héparinés. Les urines et les fèces ont été collectées quotidiennement pendant les 4 jours. Lors de la dissection des animaux, tous les organes ont été prélevés, ainsi que du tissu adipeux abdominal, et du muscle (*semi-tendineux*). L'estomac (ligaturé avec son contenu), les placentas et les fœtus (toute la portée) ont également été prélevés. Le liquide amniotique a été collecté lors du prélèvement des fœtus. Le tube digestif a été divisé en 2 parties : l'intestin grêle et le gros intestin. Pour chaque partie le tissu a été séparé de son contenu par un lavage avec 20 mL de NaCl 9 ‰. Les cages ont été rincées avec 100 mL d'éthanol, dont des parties aliquotes de 1 mL ont été prélevés pour le comptage de la radioactivité.

Parallèlement, 2 rats mâles (220 g) ont été exposés par injection intra-péritonéale, à une dose de [¹⁴C]-TBBPA (1,53 MBq/kg ; 354 µg/kg) solubilisé dans 500 µL d'huile d'arachide. Les rats ont été respectivement abattus par dislocation des cervicales puis exsanguination, 1 h et 4 h après l'administration. Le sang a été récupéré dans des tubes héparinés, puis directement centrifugé pendant 10 min à 700 g. La radioactivité dans le plasma a été évaluée par comptage au compteur à scintillation.

2.3. Instrumentation

Le système CLHP utilisé dans cette étude pour séparer les métabolites, est le système TBBPA II, détaillé dans le Chapitre 2 (II. 2.1.2).

2.4. Méthodes d'extraction des matrices biologiques

Pour cette étude, des extraits des fèces, des contenus digestifs et de plasma ont été réalisés. La procédure d'extraction à partir de solvants organiques a été développée pour évaluer de façon précise la quantité maximale de radioactivité extractible (Chapitre 2, II. 2.4.).

2.5. Hydrolyses enzymatiques

Les hydrolyses enzymatiques des métabolites du TBBPA ont été réalisées dans les conditions décrites dans le Chapitre 2 (IV. 1.), avec le suc d'*Helix pomatia* (0,1 µg/µL), puis avec la β glucuronidase de foie de bovin (4 ng/UI) et avec de l'aryl sulfatase d'*Aerobacter aerogenes* (200 µg/µL).

3. Résultats et discussion

3.1. Distribution de la radioactivité et profils métaboliques chez la rate gestante gavée quatre jours consécutifs avec du [¹⁴C]-TBBPA

La radioactivité restant dans le matériel de gavage a été quantifiée après chaque administration. La dose réelle, ainsi calculée, était de $191,5 \pm 10,9$ µg/kg p.c./jour (dose théorique: $285,5 \pm 13,3$ µg/kg p.c./jour). Quotidiennement, approximativement 30 % de la dose restaient donc sur le matériel servant à l'administration, la majorité de la radioactivité étant localisée dans la sonde et la seringue ayant servi pour le gavage.

Dans cette étude, la radioactivité totale retrouvée a été de $93,1 \pm 0,9$ %. Les niveaux résiduels mesurés dans les tissus et les excréta sont répertoriés dans le tableau 11, avec les concentrations correspondantes exprimées en ng/g (ppb) de poids frais.

Comme décrit précédemment par Hakk *et al.* (2000), le TBBPA est majoritairement éliminé par voie fécale, avec la très grande majorité de la radioactivité administrée retrouvée dans cette étude (9/10 de la dose), alors que l'excrétion urinaire est très faible (*ca.* 0,5 %). Le reste de la radioactivité administrée est retrouvé principalement dans le contenu du tube digestif, intestin grêle et gros intestin correspondant respectivement à $0,5 \pm 0,1$ % et $4,5 \pm 1,4$ % de la dose administrée. La radioactivité mesurée dans les tissus et dans le reste de la carcasse est inférieure à 0,5 % de la dose ($0,30 \pm 0,04$ %). Les niveaux résiduels les plus élevés ont été détectés dans la paroi du tube digestif (intestin grêle et gros intestin) et dans le foie, correspondant respectivement à 0,1; 0,7 et 0,4 ppb. Moins de 0,01 % de la radioactivité ont été retrouvés dans les fœtus, indiquant un passage transplacentaire très limité du TBBPA et de ses résidus chez le rat, et une exposition foetale mineure.

	% de la dose administrée	ng/g (ou ng/mL) d'équivalents [¹⁴ C]-TBBPA
Fèces	87,00 ± 1,44	
Contenu du tube digestif	4,99 ± 1,44	
Estomac (tissu + contenus)	0,30 ± 0,38	
Urine	0,52 ± 0,07	22,53 ± 4,85
Intestin grêle (tissu)	0,103 ± 0,047	29,33 ± 15,0
Gros intestine (tissu)	0,072 ± 0,058	20,37 ± 8,92
Foie	0,038 ± 0,015	5,00 ± 1,93
Plasma	< 0,01	1,27 ± 0,23
Reins	< 0,01	0,93 ± 0,38
Utérus	< 0,01	0,73 ± 0,35
Tissu adipeux		0,53 ± 0,49
Placenta	< 0,01	0,53 ± 0,15
Poumons	< 0,01	0,53 ± 0,06
Ovaires	< 0,01	0,53 ± 0,15
Cœur	< 0,01	0,43 ± 0,32
Muscle		0,37 ± 0,38
Liquide amniotique	< 0,01	0,37 ± 0,06
Surrénales	< 0,01	0,37 ± 0,12
Rate	< 0,01	0,33 ± 0,23
Cerveau	< 0,01	0,33 ± 0,40
Fœtus	< 0,01 ^(a)	0,30 ± 0,00
Carcasse	0,045 ± 0,017	0,40 ± 0,14
Cages	0,063 ± 0,028	
TOTAL	92,13 ± 0,88	

^(a)pour l'ensemble de la portée.

Tableau 11. Bilan métabolique du TBBPA et distribution de ses résidus chez la rate Wistar gestante après 4 jours consécutifs d'administration de 191 µg/kg de [¹⁴C]-TBBPA, de J16 à J19 de la gestation.

Les faibles quantités de radioactivité mesurées dans les tissus ne permettant pas d'obtenir les profils métaboliques du TBBPA, seuls les extraits de fèces et des contenus digestifs ont pu être analysés. Lors de l'extraction, 3 fractions ont été obtenues (Tableau 12).

	Intestin grêle	Gros intestin	Fèces
Phase aqueuse	65,6 ± 0,3 %	5,5 ± 1,4 %	10,4 ± 4,6 %
Phase organique	28,8 ± 4,8 %	89,1 ± 1,8 %	84,9 ± 1,7 %
Résidus « non extractibles »	4,4 ± 3,1 %	5,5 ± 1,4 %	7,7 ± 1,4 %

Tableau 12. Répartition de la radioactivité dans les contenus du tube digestif et les fèces après extraction en phase aqueuse et dans un mélange de solvants organiques.

La proportion de résidus « liés ou non extractibles » mesurée, était faible (< 8 %). Par contre près des 2/3 de la radioactivité extraite du contenu de l'intestin grêle ont été retrouvés dans la phase aqueuse, alors que la majorité de la radioactivité détectée dans les fèces et les contenus du gros intestin était localisée dans la phase organique. Les profils métaboliques obtenus à partir des extraits aqueux du contenu de l'intestin grêle (Fig. 19A) ont démontré que près de la moitié de la radioactivité détectée correspondait à des métabolites plus polaires (temps de rétention, $t_R = 11,3$ et $12,2$ min) que le TBBPA ($t_R = 18$ min). Les profils métaboliques des fèces (Fig. 19B) et des contenus du gros intestin, indiquent que toute la radioactivité extraite correspondait à du TBBPA inchangé. Ces résultats démontrent donc que des composés plus polaires que le TBBPA sont majoritairement présents dans la partie haute du tube digestif.

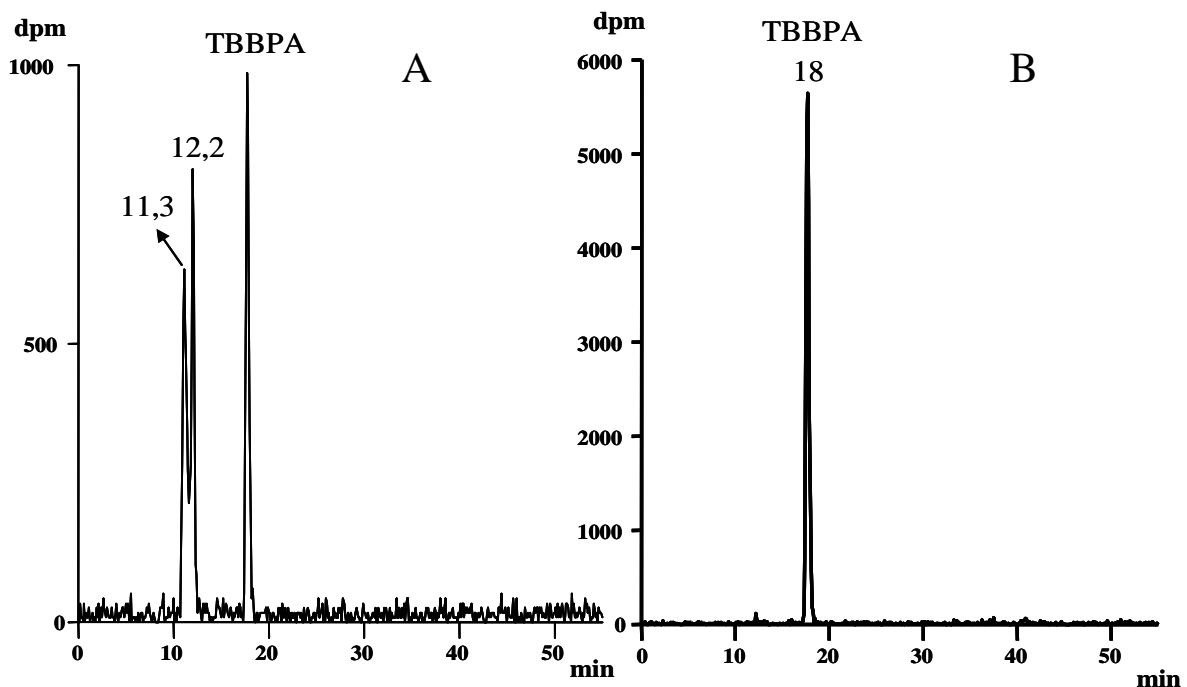


Fig. 19. Radio-chromatogrammes représentatifs des extraits aqueux du contenu de l'intestin grêle (A) et des fèces (B)

Les métabolites observés, correspondant probablement à des conjugués, pourraient avoir été déconjugués par la flore bactérienne pour redonner du TBBPA, expliquant pourquoi dans le contenu du gros intestin et les fèces, la totalité radioactivité extraite correspond à du TBBPA inchangé.

Notons que des niveaux de radioactivité largement supérieurs avaient été observés lors d'une étude préliminaire chez la rate gestante. Dans cette étude, pour laquelle un seul animal a été

utilisé, une dose orale unique de TBBPA (3,2 mg/kg p.c.) avait été administrée à une rate au 19^{ème} jour de gestation, et celle-ci avait été abattue seulement 16 h après le gavage. La quantité de radioactivité détectée dans le foie était supérieure à celle de l'étude sur 4 jours, permettant d'obtenir un profil métabolique hépatique. Les quantités supérieures de radioactivité mesurées dans le foie pour cette étude sont en adéquation avec la dose plus importante de radioactivité administrée. L'abattage de la rate à 16 h au lieu de 24 h a également joué un rôle non négligeable dans le fait qu'une proportion plus importante de la radioactivité administrée a été retrouvée dans le foie (ca. 1,8 %). En effet, il a été montré chez le rat (Schauer *et al.* 2006), que le pic plasmatique de TBBPA était détecté 3 h après son administration par voie orale, le produit étant totalement éliminé 72 h après administration. Des métabolites identiques à ceux détectés à partir d'extrait des contenus de l'intestin grêle, ont été également observés sur le profil métabolique de foie de ce rat, mais en quantité moindre (13 %).

L'hydrolyse enzymatique effectuée avec le suc d'*Helix pomatia* (contenant glucuronidase et sulfatase) sur les métabolites détectés dans les contenus de l'intestin grêle et dans le foie lors de ces études *in vivo*, a confirmé la présence de métabolites conjugués. Des hydrolyses enzymatiques spécifiques avec respectivement la β -glucuronidase de foie de bovin et l'aryl sulfatase d'*Aerobacter aerogenes*, effectuées sur ces métabolites ont permis de démontrer que le métabolite éluant à 11,3 min correspond à un conjugué sulfate et que celui éluant à 12,2 min correspond à un conjugué glucuronide. Ces résultats sont en adéquation avec les données rapportées dans la littérature dans lesquelles il a été démontré que les métabolites majoritaires obtenus *in vivo* chez le rat, après administration *per os* de TBBPA, étaient des conjugués glucuronides et sulfates (Hakk *et al.* 2000).

3.2. Profils plasmatiques obtenus à des temps courts après administration (i.p.) d'une dose unique de [¹⁴C]-TBBPA chez le rat

Après rinçage du matériel d'administration, la dose réelle administrée aux rats était de 285 μ g/kg (dose théorique: 354 μ g/kg). Les niveaux plasmatiques de TBBPA étaient approximativement 30 fois plus importants 1 h après l'administration (119,7 ng/g d'équivalent TBBPA dans le plasma) que 4 h après (4,3 ng/g). Ces résultats, même s'ils ne concernent que deux animaux, tendent à confirmer une élimination rapide du TBBPA chez le rat. Le profil plasmatique obtenu après extraction (Fig. 20), a permis d'évaluer la proportion

de métabolites à *ca.* 10 % dans le plasma, 1 h après exposition. Les 2 métabolites préalablement identifiés dans le foie et le contenu de l'intestin grêle ont été détectés dans le plasma, représentant 6,8 % de la radioactivité plasmatique. Par ailleurs, un métabolite mineur éluant à 16 min a également été détecté. Il représente environ 3 % de la radioactivité plasmatique totale. Sur la base de son temps de rétention, il pourrait s'agir soit du tribromoBPA identifié dans de précédentes études (Szymanska *et al.* 2001; Schauer *et al.* 2006), soit de dibromo-isopropyle phénol hydroxylé, M5 (le groupement hydroxyle se situant sur l'isopropyle) ou de TBBPA hydroxylé (M6), sur la base de nos études *in vitro* (article 3).

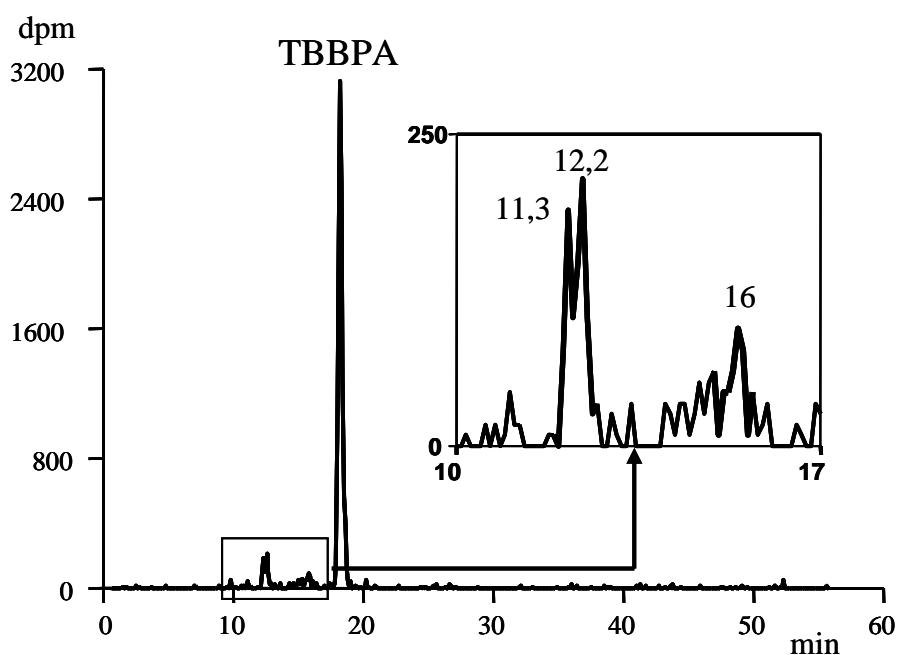


Fig. 20. Profil plasmatique du TBBPA chez le rat Wistar obtenu par radio-CLHP

4. Conclusion

Les résultats obtenus lors de nos travaux sont en accord avec ceux de précédentes études. Ils ont permis de confirmer que le TBBPA est majoritairement éliminé par voie fécale et que la bioaccumulation de ce RFB dans les tissus est faible. Par ailleurs, ils montrent que les niveaux résiduels détectés chez le fœtus sont faibles et que le passage transplacentaire de cette molécule est limité chez le rat. Pour les tissus et extraits où le profilage métabolique a pu être réalisé, une forte proportion de métabolite est détectée et correspond principalement à la conjugaison du TBBPA par les enzymes de phase II. L'oxydation du TBBPA « cytochrome P450 dépendante » observée *in vitro* n'a pu être confirmée *in vivo*. Toutefois, la détection d'un métabolite mineur dans le plasma chez le rat pourrait être liée à ce type de voie

métabolique. Ce qui représente un intérêt majeur puisque, malgré le peu d'études disponibles quant aux niveaux résiduels de TBBPA chez l'Homme, ce RFB a été retrouvé dans le sérum humain à chaque fois qu'il a été recherché.

III. BIOACTIVATION DU TBBPA *IN VITRO* PAR DES CELLULES SANGUINES HUMAINES

Cette étude a été réalisée en collaboration avec une équipe du Norwegian Institute for air research (NILU, Dr Mariussen) et l'Etablissement de Recherche Norvégien de la Défense Nationale (FFI, Dr Reistad). Ces chercheurs ont récemment démontré que le TBBPA activait *in vitro* le stress oxydant dans les granulocytes neutrophiles humains, entraînant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), alors que son analogue non bromé, le BPA, ne produisait pas d'effet sur ces cellules (Reistad *et al.*, 2005). Nous venions de démontrer une importante biotransformation du TBBPA *in vitro* dans le foie. Nous avons souhaité vérifier si le TBBPA était métabolisé par ces cellules sanguines humaines, et si les biotransformations pouvaient être mis en relation avec les effets observés. La première partie de ce travail sera prochainement publié dans *Organohalogen Compounds*.

1. Introduction

Les granulocytes neutrophiles représentent environ 65 % des globules blancs et sont les principaux acteurs de la phagocytose lorsqu'ils rencontrent une cellule étrangère ou infectée. Ils interviennent dans les réactions de défenses immunitaires non spécifiques de l'organisme. Ils dégradent les agents pathogènes par les systèmes « tueurs » dépendants de l'oxygène, aboutissant à la production de substances puissamment bactéricides telles que H₂O₂, HOCl, et radicaux oxydants (OH[•]). Ce processus est appelé « burst oxydatif ». Cependant, ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent être produites en excès sous l'effet de facteurs exogènes, comme par exemple la présence au niveau sanguin de certains xénobiotiques. Dans ce cas, elles peuvent elles-mêmes représenter un danger pour la cellule qui les produit, son environnement proche, et dans l'absolu, pour l'organisme tout entier.

Bien que de faibles niveaux résiduels de TBBPA aient été précédemment déterminés dans le plasma des rats exposés à ce RFB, les niveaux de TBBPA mesurés chez l'Homme dans le sang s'élèvent par exemple à 330 pg/g MG dans l'étude du World Wildlife Foundation (WWF,

2004). L'exposition humaine au TBBPA a été également démontrée dans différents pays (Thomsen *et al.* 2001, Cariou *et al.* 2005) suggérant une exposition continue à de faibles doses de TBBPA. Par ailleurs, une étude récente a montré que le TBBPA pouvait avoir un potentiel immunotoxique chez la souris (Pullen *et al.* 2003). Il était donc important d'élucider les voies métaboliques du TBBPA dans ces cellules, pour accroître nos connaissances sur le potentiel d'induction d'effets toxiques de ce composé, et également de comprendre si ces voies pouvaient, du point de vue théorique, être mises en relation avec une éventuelle immunotoxicité de ce RFB.

2. Résultats

Les granulocytes humains provenant de trois individus ont été incubés pendant 1 h à 37°C avec différentes concentrations de TBBPA radio-marqué. A la fin des incubations, 15 à 30 % de la radioactivité étaient présents dans le milieu d'incubation alors que 70 à 85 % se retrouvaient dans le culot cellulaire. Cette répartition était liée à la présence de métabolites essentiellement polaires dans le milieu d'incubation, alors que dans les extraits du culot cellulaire, les métabolites détectés étaient moins hydrosolubles que le TBBPA (Fig. 2, article 4). La proportion de métabolites retrouvée dans le milieu d'incubation (Fig. 21 A) et dans l'extrait du culot cellulaire (Fig. 21 B) augmentait en fonction de la concentration, à l'exception des incubations réalisées avec 50 µM de TBBPA, pour lesquelles elle diminuait considérablement.

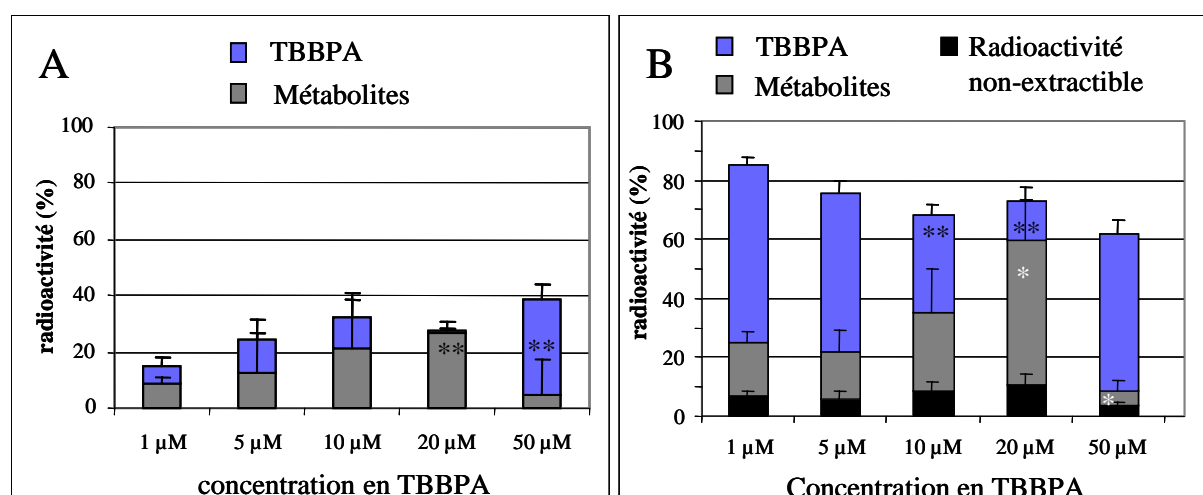


Fig. 21. Pourcentage de métabolites formés dans les milieux d'incubation (A) et dans le culot cellulaire (B), en fonction de la concentration croissante en $[^{14}\text{C}]$ -TBBPA. Moyenne \pm écart type sur des incubations de granulocytes.

(* différence significative $P < 0,01$; ** différence très significative $P < 0,001$)

La biotransformation du TBBPA est réduite lors des incubations réalisées en présence de DPI (diphénylène-iodonium), un inhibiteur de la NADPH oxydase (Fig. 1, article 4).

L'analyse des produits d'incubations (surnageants, extraits de culots) a été réalisée par radio-CLHP, en utilisant le système TBBPA II. Deux métabolites majoritaires ont été détectés dans les milieux d'incubations, éluant respectivement à 11,5 min (A) et 14 min (B), alors que deux pics de polarité voisine ont été détectés dans les extraits de culots cellulaires, éluant à 37 et 38 min (C).

La formation du métabolite majeur dans les milieux d'incubations (A) suit une courbe de cinétique enzymatique avec une saturation à une concentration de TBBPA voisine de 10 μM (Fig. 3, article 4).

Le tableau 13 récapitule les différents métabolites formés lors des incubations du TBBPA avec des granulocytes humains, qui sont mis en correspondance avec les codes attribués dans l'article 4.

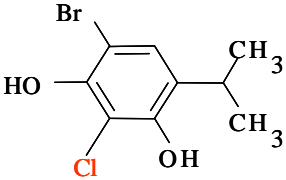
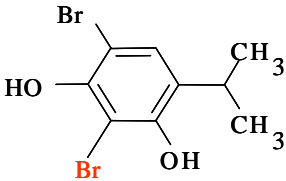
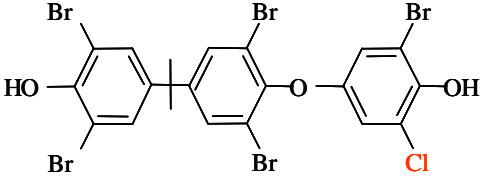
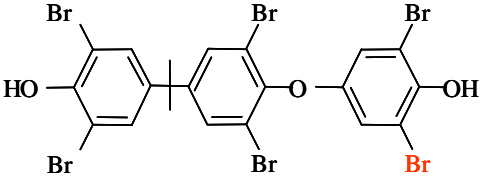
	T_R (min) système II	Atomes de Br	Atomes de Cl	Structure
A	11,5	1	1	
		2	0	
Ca	37	5	1	
Cb	38	6	0	

Tableau 13. Structure des métabolites détectés au cours des incubations du [^{14}C]-TBBPA avec des granulocytes neutrophiles humains.

L'identification structurale des métabolites du TBBPA a été réalisée en ESI-MS. Le métabolite B, élué à 14 min, n'a pu être identifié, en raison de trop d'impureté coéluant avec ce dernier, et entraînant des interférences en spectrométrie de masse. L'analyse en MS a permis de mettre en évidence la présence de deux métabolites de polarité voisine coéluant à 11,5 min (A). Ces métabolites polaires correspondent à l'isopropyle phénol hydroxylé issu du clivage oxydatif enzymatique du TBBPA, respectivement substitué soit de deux atomes de brome, soit d'un atome de brome et d'un atome de chlore. De la même manière, les métabolites apolaires formés dans les granulocytes (C) sont constitués d'une molécule de TBBPA sur laquelle se sont greffés respectivement un chloro-bromo-phénol (Ca) ou un dibromo-phénol (Cb)

3. Discussion

Cette étude montre que le TBBPA est largement métabolisé dans les granulocytes humains, les voies de biotransformations du TBBPA étant dépendantes de l'arsenal enzymatique présent dans ces cellules sanguines. Ces résultats sont confirmés par la réduction considérable du métabolisme du TBBPA dans les granulocytes en présence du DPI, un inhibiteur de la NADPH oxydase. L'utilisation de DPI empêche la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), bloquant l'action de la myéloperoxydase des granulocytes. Le métabolisme du TBBPA par les granulocytes est donc lié au fonctionnement de la myéloperoxydase. A la concentration en TBBPA la plus élevée utilisée, la métabolisation est limitée, suggérant une possible cytotoxicité du composé sur ces cellules. L'identification des métabolites a montré que dans les granulocytes, comme dans le foie, la biotransformation *in vitro* du TBBPA passe par une rupture de la molécule au niveau du carbone central, résultant en la formation de dibromo-isopropyle phénol, qui est retrouvé sous forme hydroxylé. L'autre moitié de la molécule donne apparemment un métabolite hexabromé après addition à une molécule de TBBPA. La libération de l'anion superoxyde, produit par la NADPH oxydase, entrainerait l'oxydation du TBBPA par la myéloperoxydase des granulocytes neutrophiles. L'anion superoxyde formé est converti en peroxyde d'hydrogène, lequel est utilisé par la myéloperoxydase et amène à la formation d'acide hypochloreux. L'implication de ce dernier réactif, pourrait expliquer la formation dans les granulocytes de métabolites dont un atome de brome a été substitué par un atome de chlore, métabolites qui n'avaient jamais été observés lors des incubations réalisées avec des fractions subcellulaires de foie.

En parallèle des travaux concernant le TBBPA, une étude de métabolisme du BPA a été effectuée dans les mêmes conditions. Elle démontre que le BPA n'est pas métabolisé par les

granulocytes humains. La présence d'atomes de brome sur le TBBPA paraît donc être déterminante à la fois pour son effet activateur de la NADPH oxydase (Reistad *et al.*, 2005) et pour sa métabolisation par les granulocytes neutrophiles *in vitro*. L'observation de métabolites oxydés du TBBPA suggère, comme pour les oxydations P450 dépendantes, la formation d'intermédiaires chimiquement réactifs. Dans l'absolu, ceux-ci pourraient modifier l'action des granulocytes neutrophiles et ainsi altérer la réponse immunitaire chez l'Homme. Par ailleurs, le TBBPA étant un excellent activateur de la NADPH oxydase *in vitro*, sa présence dans le sang même en quantité limitée, pourrait favoriser la formation de ROS, et, éventuellement, l'oxydation d'autres xénobiotiques. Il serait intéressant de tester, si le BPA pourrait être oxydé par les granulocytes humains activés par la présence d'une faible quantité de TBBPA.

Article 4

D. Zalko, E. Perdu, T. Reistad, A. Riu, A. Garcia, E. Mariussen. Biotransformation of the flame retardant tetrabromobisphenol-A by human neutrophil granulocytes. Organohalogen Compounds (2006).

**BIOTRANSFORMATION OF THE BROMINATED FLAME RETARDANT
TETRABROMOBISPHENOL-A BY HUMAN NEUTROPHIL GRANULOCYTES**

Daniel Zalko¹, Elisabeth Perdu¹, Trine Reistad², Anne Riu¹, Aurélie Garcia¹, Espen Mariussen³

¹ Institut National de la Recherche Agronomique, P.O. Box 3, 31931 Toulouse Cédex 9, France; ²Norwegian Defence Research Establishment, P. O. Box 25, N-2027 Kjeller, Norway; ³Norwegian Institute for Air Research, P. O. Box 100, N-2027 Kjeller, Norway

Introduction

Tetrabromobisphenol A (TBBPA) is industrially the most important individual brominated flame retardant used with an annual demand of approximately 120 000 metric tons¹. TBBPA is primarily used as a chemically bound flame retardant, which is supposed to limit its spread in the environment. However, several reports have shown that this compound is present in the environment, and that it may leak from treated material². Significant amounts of TBBPA have also been found in human plasma samples, even in non-occupational exposed people³. Concerns have been raised about the possible interference of TBBPA with thyroid hormone function⁴ and about its potential immunotoxic effects⁵.

Little is known about the fate of TBBPA in animal models and in human. TBBPA was shown to have a relatively short elimination half-life⁶. In rodents, this BFR forms several conjugates which are readily excreted in bile⁷. In vitro models (human and rat liver sub-cellular fractions: microsomes, S9 fractions) confirm that conjugation (to glucuronic acid) is a major metabolic pathway for TBBPA. However, in vitro, P-450 dependent oxidations produce the largest part of TBBPA metabolites, leading, among other, to the oxidative cleavage of the molecule. Moreover, the results of these experiments indicate that reactive intermediates may be formed through oxidative metabolic pathways⁸.

Neutrophils, the predominant cell type among phagocytes, are involved in non-specific immune processes. In response to a variety of agents, neutrophils release large quantities of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) in a phenomenon known as respiratory burst. Previously it was reported that TBBPA potently induces respiratory burst in granulocytes⁹. The effect was

attributed to activation of ERK followed by activation of the NADPH oxidase. Inappropriate activation of respiratory burst is associated with tissue injury and impairment of the ability to clear invading microorganisms¹⁰.

The aim of this study was to elucidate the metabolic fate of TBBPA in human neutrophil granulocytes, in order to increase our knowledge about the potential of this BFR to induce adverse effects, and to investigate the possible connection with previous findings^{5,8,9} using a cell model of prime importance in many non-specific immune processes.

Materials and Methods

Chemicals

[¹⁴C]-TBBPA was synthesised from ring-[¹⁴C]-BPA (Moraveck biochemicals, USA) and purified as described elsewhere⁸. Its structure was confirmed by MS and NMR. It was purified by HPLC to reach *ca.* 100% purity. Unlabelled TBBPA was obtained from Merck Eurolab (VWR international, France).

Isolation and exposure of human neutrophil granulocytes

Fresh blood samples were collected each morning from healthy male volunteers (n=3). The granulocytes were separated from EDTA blood by dextran sedimentation followed by a standard density-gradient centrifugation as previously described⁹. [¹⁴C]-TBBPA, fortified when necessary with unlabelled TBBPA (concentrations: 1, 5, 10, 20, 50 µM) was mixed with HEPES buffered HBSS with glucose followed by the addition of granulocytes (final concentration 2x10⁶/ml) and exposed at 37°C for one hour. Additional incubations were carried out at 10 µM in the same conditions in the presence of 4 µM diphenylene-iodonium

(DPI), which is a NADPH oxidase inhibitor. The samples were then centrifuged to separate the incubation media from the cells, and the supernatants were transferred to new vials. Control incubations were carried out in the same conditions, with no cells, and 10 μM [^{14}C]-TBBPA.

Radioactivity repartition and qualitative analysis of TBBPA metabolites.

The radioactivity present in supernatants was determined by direct counting using a Packard liquid scintillation counter. Cells were extracted with acetonitrile/water 50:50 v/v prior to radioactivity determination. Remaining pellets were solubilized with Packard Soluene-350 to determine the amount of non extractable radioactivity. All supernatants and cell extracts were analysed by HPLC using a Nucleodur C8 column (Macherey-Nagel, France) connected for radioactivity detection to a Radiomatic Flo-One/ β A500 instrument (Radiomatic, France). Analytical conditions were adapted from Zalko et al.⁸. Isolation of metabolites was carried out by combining HPLC separation and C18 Chromabond glass cartridge (Macherey Nagel) SPE.

Structural characterisations were carried out on a Finnigan LCQ decaXP quadrupole ion trap mass spectrometer (Thermo Electron, France) fitted with an electrospray ionisation source operated in the negative ionisation mode.

Results and Discussion

Radioactivity repartition in supernatants and in cells

Depending on the TBBPA concentration, the proportion of radioactivity recovered in supernatants varied between 15 and 30% of the radioactivity put in the incubations (Fig 1;

left). Most of the radioactivity remained in the cells and decreased from 85 to 70%, depending on the TBBPA concentration put in incubations (Fig 1; right).

The proportions of metabolites in each compartment appeared to increase with TBBPA concentration, in the incubation media as well as in the cells. In the presence of diphenyleneiodonium (DPI), the metabolites production was inhibited in both compartments (Fig 1).

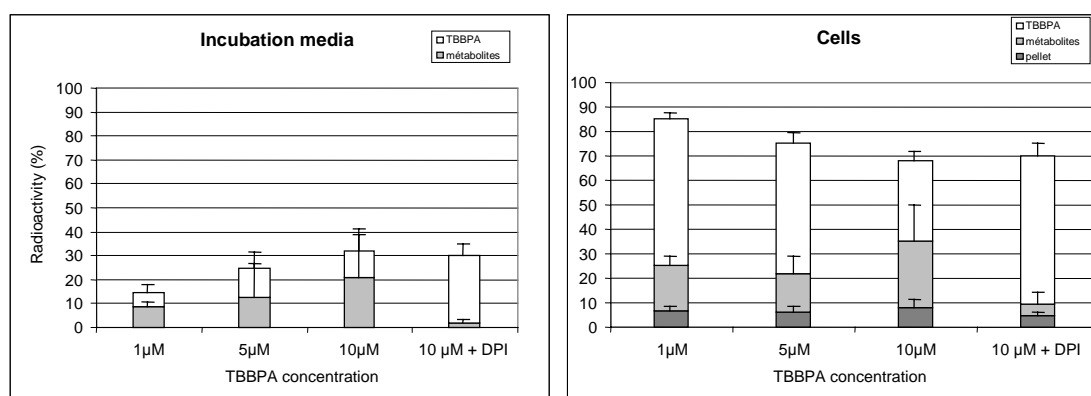


Fig 1. Radioactivity repartition (%) in the incubation media (left) and in the intracellular fraction (right). Mean \pm SD for granulocytes incubations from 3 human male volunteers

Radio-HPLC profiling

The radio-chromatographic profiling of [14 C]-TBBPA incubated with no cells showed that no degradation of TBBPA occurred under our incubation conditions, nor during storage before analysis. A single peak was observed in radio-HPLC, with a retention time of 18,2 min, corresponding to unchanged TBBPA.

At 10 μ M, the radioactivity present in incubation media, *e.g.* in the extra-cellular compartment, accounted for one third of the radioactivity put in incubations. Whatever the TBBPA concentration, one major metabolite was detected. Its retention time was 11,3 min (Fig. 2; metabolite A). Another metabolite was eluted before TBBPA, but was formed in

smaller quantity (Fig. 2; metabolite B). Most of the radioactivity put in incubation remained in the cell pellet, and was extracted with acetonitrile/water. The corresponding analysis (Fig. 2, left) showed the presence of unchanged TBBPA, as well as metabolites exhibiting retention times of 37 and 38 min, respectively (Fig. 2; C).

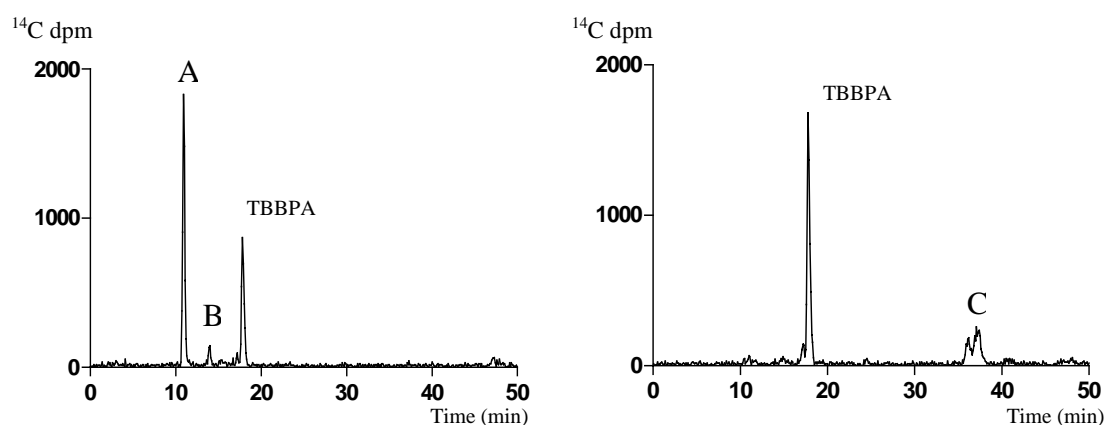


Fig 2. TBBPA biotransformation by human granulocytes [10 μ M ¹⁴C-TBBPA, 1 hr, 37°C] Radio-HPLC analyses of the incubation media (left), and the intra-cellular fraction extract (right)

In incubations of [¹⁴C]-TBBPA carried out with granulocytes in the presence of DPI, the biotransformation of TBBPA was dramatically reduced (Fig. 1). Only low amounts of metabolites A and C could be detected, indicating that DPI, a NADPH oxidase inhibitor, is an efficient inhibitor of TBBPA metabolites formation in this *in vitro* system.

Effect of TBBPA concentration on metabolite A production

The formation rate of metabolite A (retention time 11,3min) was determined for all incubations and expressed in nmoles of metabolised TBBPA per million of cells and per hour (Fig. 3). This metabolite was present in small amount in cells, but was the major metabolite detected in incubation media. In the incubation media, its production curve appeared to be an enzymatic curve with a saturation occurring around 10 μ M TBBPA.

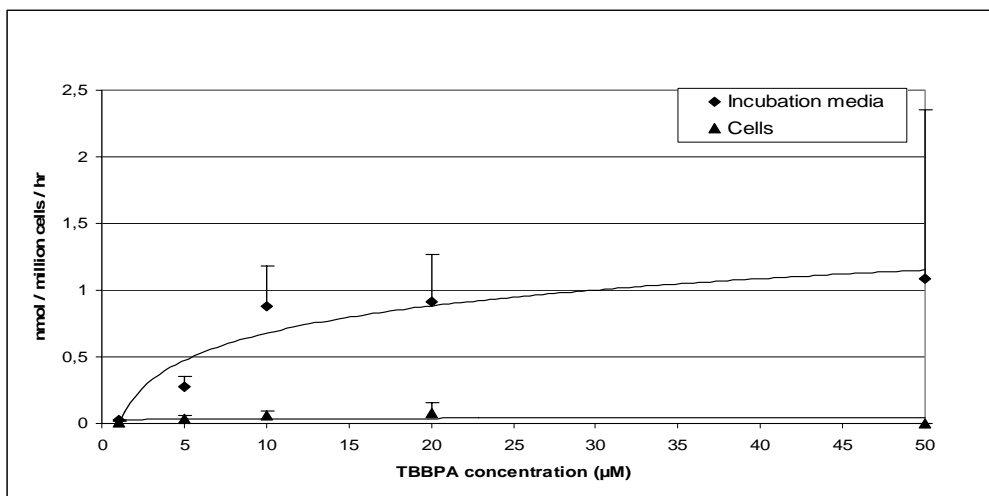


Fig 3. Effect of TBBPA concentration on metabolite A production in the incubation media and in the intracellular fractions, respectively, for incubations carried out with granulocytes from 3 human male volunteers (Mean \pm SD).

Metabolites structure

Metabolite A was purified from supernatants and was analysed by ESI-MS. The $[M-H]^-$ quasi-molecular ion was detected at m/z 309, with an isotopic pattern consistent with that of a molecule bearing 2 bromine atoms. MS^2 analysis demonstrated the loss of a molecule of water. Based on this analysis, we conclude that metabolite A is hydroxylated 2,6-dibromo-4-isopropyl-phenol. The comparison of the results with previously isolated metabolites of TBBPA⁸ strongly suggests that the hydroxylation site is located on the aromatic ring (Fig. 4). Metabolites B and C structures are under investigation. Based on the HPLC retention time, it is postulated that the group of metabolites C may correspond to hexa- and hepta-brominated compounds formed following a first-step oxidation of TBBPA.

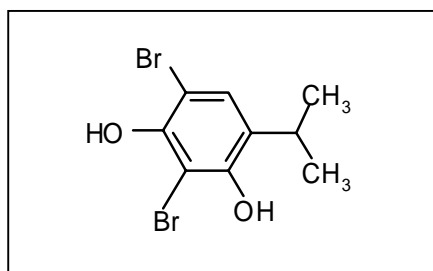


Fig. 4. Metabolite A was identified as hydroxylated 2,6-dibromo-4-isopropyl-phenol by ESI MS. 3 isomers could correspond to this structure. Based on its pattern of fragmentation and on a comparison with TBBPA metabolites standards, metabolite A should correspond to 2,6-dibromo-4-isopropyl-3-hydroxy-phenol

Discussion

Current data indicate that TBBPA bio-accumulation potential is low, compared to other BFR. Though the largest sell BFR currently marketed, and because it is not considered as a POP, TBBPA has raised fewer concerns regarding its possible effects on human health than PBDEs, for instance. However, human exposure to TBBPA has been demonstrated^{3,11} in various countries, suggesting a continuous exposure to low doses of this compound. The immunotoxicity of TBBPA was previously questioned following the results of *in vitro* studies carried out with mice splenocytes⁵. Moreover, it was shown that TBBPA activates NADPH oxidase and enhances the formation of reactive oxygen species in human neutrophil granulocytes⁹. The major metabolite present in incubation supernatants was characterized as hydroxy-dibromo-isopropylphenol, a breakdown molecule also produced by P450 dependent pathways by rat and human sub-cellular fractions⁸. The release of superoxide anion, mediated by NADPH oxidase, appears to trigger TBBPA oxidation by human neutrophil granulocytes. Leukocytes are able to produce oxidised metabolites of several drugs¹², one of the main

pathways being the involvement of the NADPH oxidase, through the production of superoxide anion, later converted to hydrogen peroxide and used by myeloperoxidase. The present study demonstrates that TBBPA is extensively biotransformed by human granulocytes. The oxidative breakdown of TBBPA is inhibited by DPI, a NADPH oxidase inhibitor, suggesting the ultimate involvement of myeloperoxidase in the cleavage of this BFR.

References

1. de Wit CA. *Chemosphere* 2002;46:583.
2. Sellstrom, U, Jansson, B. *Chemosphere* 1995;31:3085.
3. Thomsen C, Lundanes E, Becher G. *J Environ Monit* 2001;3:366.
4. Kitamura S, Jinno N, Ohta S, Kuroki H, Fujimoto N. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:554.
5. Pullen S, Boecker R, Tiegs G. *Toxicology* 2003;184:11.
6. Schauer UM, Volkel W, Dekant W. *Toxicol Sci* 2006;91:49.
7. Hakk H, Letcher RJ. *Environ Int* 2003;29:801.
8. Zalko D, Prouillac C, Riu A, Perdu E, Dolo L, Jouanin I, Canlet C, Debrauwer L, Cravedi JP. *Chemosphere* 2006.
9. Reistad T, Mariussen E, Fonnum F. *Toxicol Sci*. 2005;83:89.
10. Labro MT. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:615.
11. Cariou R, Antignac JP, Maume D, Marchand P, Monteau F, Zalko D, Berrebi A, Cravedi JP, André F, Le Bizec B. *Dioxin* 2006.
12. Uetrecht JP. *Drug Metabolism Reviews* 1992;24:299.

IV. Conclusions

Ce travail nous a permis de montrer que la métabolisation du TBBPA avait lieu à la fois *in vivo* et *in vitro* chez le rat et chez l'Homme. *In vivo* chez la rate gestante, cette métabolisation résulte essentiellement de la conjugaison du TBBPA par les enzymes de phase II, ces conjugués pouvant ensuite être déconjugués par la microflore bactérienne du tube digestif pour être éliminés par voie fécale sous la forme de TBBPA inchangé. En effet cette étude a permis de démontrer des niveaux tissulaires relativement bas ainsi qu'une exposition fœtale limitée, dans ce modèle animal.

In vitro, le TBBPA est largement métabolisé par les fractions subcellulaires de foie de rat et d'Homme ainsi que par des cellules sanguines humaines. Les produits de biotransformations correspondent à des conjugués du TBBPA, et impliquent majoritairement des processus d'oxydation dépendants de l'équipement enzymatique présent dans chaque tissu: cytochrome P450 dans le foie, et myéloperoxydase dans les granulocytes. Non seulement la rupture du composé parent au niveau du carbone central a été observée, mais des produits de biotransformation moins hydrosolubles ont également été identifiés. Tous ces métabolites peuvent être également produits par des processus d'oxydation chimique et photochimique, confirmant une oxydation relativement aisée du TBBPA. Il reste maintenant à déterminer dans quelle mesure la formation de ces métabolites peut avoir des implications toxicologiques. Les premiers résultats ont montré que le TBBPA et qu'un des deux métabolites apolaires (ou les deux) avaient une affinité significative pour le récepteur au PPAR γ , et étaient capables de l'activer.

B/ Etude du métabolisme du DBDE

De la même manière que pour le TBBPA, nous avons réalisé l'étude du métabolisme du DBDE à la fois *in vitro* et *in vivo* pour déterminer les voies de biotransformations de ce RFB ainsi que son devenir dans un organisme vivant. Les résultats sont brièvement développés dans la première partie de ce chapitre (I. 2.). Dans un deuxième temps (II. 2.), sont détaillés les données obtenues pour le DBDE *in vivo* chez la rate gestante, déterminant le devenir de ce composé et l'étendue de l'exposition fœtale chez ce modèle animal. Ce travail a fait l'objet d'une publication au cours de ma thèse (article 5).

I. BIOTRANSFORMATIONS DU DBDE *IN VITRO*

1. Introduction

Les données disponibles, concernant le métabolisme du DBDE *in vitro* sont à ce jour limitées. Une étude récente a mis en évidence la débromation du DBDE *in vitro* lors d'incubations de ce RFB avec des fractions microsomales hépatiques de carpe et de truite (Stapleton *et al.* 2006). Cette débromation du DBDE avait également été observée dans des boues de stations d'épuration (Gerecke *et al.* 2005). Dans notre travail, le métabolisme du DBDE *in vitro* a été étudié au moyen d'incubations avec des fractions microsomales et subcellulaires (S9) hépatiques ainsi qu'avec des tranches de foie de rat, avec une concentration en DBDE de 5 μ M.

2. Matériels et méthodes

Les méthodes de solubilisation du DBDE utilisées pour les incubations *in vitro* sont décrites dans le Chapitre 2 (II. 3.3.1.).

Les procédures des incubations sont détaillées dans le Chapitre 2 (III. 1. et 2.).

Les analyses radio-CLHP ont été réalisées avec le système DBDE I (cf. Chapitre 2, II. 3.1.).

3. Résultats

Les incubations avec les fractions microsomales et subcellulaires ont pu être réalisées en utilisant deux moyens de solubilisation du DBDE : 5 μ L de DMSO seul et 5 μ L DMSO auxquels avaient été ajoutée une solution de poloxamères. L'utilisation d'une molécule radio-marquée a permis de s'assurer que la solubilité du DBDE et la récupération de la radioactivité

après incubations étaient toutes deux proches de 100 %. Le DBDE n'a pas été métabolisé au cours des incubations *in vitro* avec des fractions microsomales ou des fractions S9 de foie: seul le DBDE inchangé était présent sur les radio-chromatogrammes correspondants, éluant avec un T_R de 40 min (Fig. 22) dans ce système CLHP.

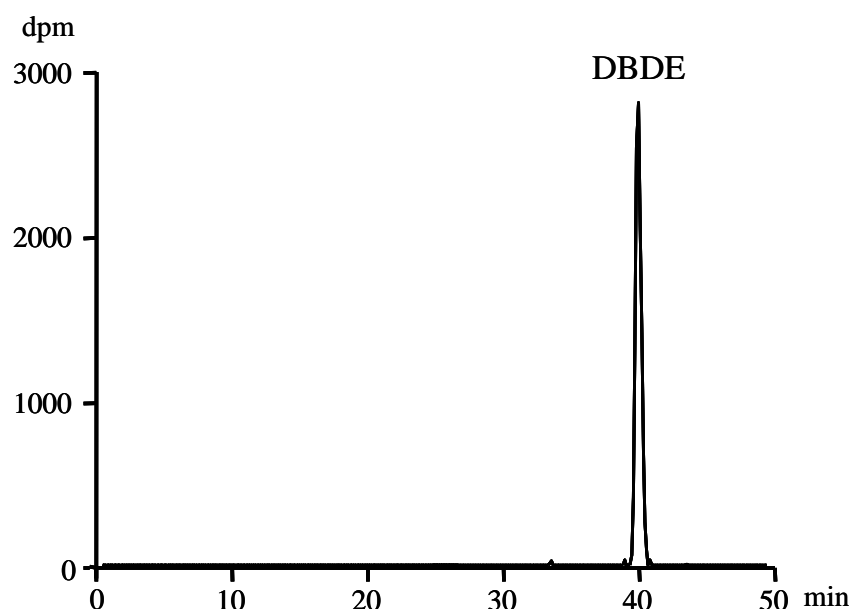


Fig. 22. Radio-chromatogramme obtenu après incubations du [^{14}C]-DBDE avec des fractions microsomales et S9 hépatiques de rat.

De la même façon, aucune métabolisation du DBDE n'a été observée après incubation du DBDE avec des tranches de foie de rat.

4. Discussion

Ces résultats ont permis de montrer que le DBDE n'était pas métabolisé *in vitro* chez le rat Wistar, dans nos conditions expérimentales. La biotransformation du DBDE *in vitro* a été démontré chez le poisson avec des microsomes de foie (Stapleton *et al.* 2006). Toutefois, les concentrations du DBDE utilisées par ces auteurs étaient plus de 30 fois plus faibles que celle que nous avons utilisée, ce qui, en dehors des différences inter-espèces, pourrait expliquer la formation de métabolites. Stapleton *et al.* ont choisi de détecter directement les éventuels métabolites formés par spectrométrie de masse, alors que notre approche, utilisant une molécule marquée, était de parvenir en premier lieu au profilage radio-CLHP des métabolites formés. Les méthodes utilisées par Stapleton *et al.* autorisant une plus grande sensibilité, et donc une utilisation de concentrations faibles, n'ont pas permis de quantifier la proportion de

métabolites du DBDE. A l'inverse, la stratégie que nous avons développée pourrait conduire à cette quantification, mais il faudrait pouvoir utiliser de plus faibles concentrations de DBDE. Au-dessous de 1 μM , la quantité de radioactivité utilisée serait trop faible pour pouvoir procéder à l'analyse en radio-CLHP. Nous pourrions également utiliser l'APPI-MS pour la détection directe des métabolites présents dans les milieux d'incubations, si le DBDE pouvait, à de faibles concentrations, être pris en charge par les enzymes de biotransformations du rat.

II. DEVENIR DU DBDE CHEZ LA RATE GESTANTE (ARTICLE 5)

1. Introduction

Comme pour les études *in vitro*, les données bibliographiques disponibles au sujet du métabolisme du DBDE *in vivo* sont peu nombreuses. Il existe une étude ancienne, datant des années 70 sur le métabolisme du DBDE chez le rat, faisant état d'une faible absorption (< 1 %) et d'une faible métabolisation de ce composé (Norris *et al.* 1975), sur laquelle se sont longtemps appuyés un grand nombre d'industriels pour réfuter le potentiel toxique de ce composé, eu égard à sa faible biodisponibilité et sa bioaccumulation limitée. Cependant, deux études plus récentes émanant d'une même équipe ont fait état d'une absorption plus importante (10 à 26 %) du DBDE chez le rat, et de sa métabolisation *in vivo*. Les métabolites identifiés étaient issus de processus de réduction conduisant à la débromation du DBDE ainsi que de processus d'oxydation conduisant à la formation de métabolites hydroxylés et/ou méthoxylés de PBDE substitués de 5 à 8 atomes de brome (Mörck *et al.* 2003, Sandholm *et al.* 2003). Cependant la proportion de ces métabolites dans les tissus et leur identification structurale formelle demeurent à ce jour inconnues.

De nombreuses études ont démontré que les niveaux résiduels de DBDE retrouvés chez l'Homme, et notamment chez les jeunes enfants de 0 à 4 ans (Thomsen *et al.* 2005), étaient importants. De plus, de récents résultats ont rapporté la présence de ce composé dans le foie de fœtus humain (Schechter *et al.* 2006), démontrant ainsi le passage transplacentaire du DBDE chez l'Homme.

Nous avons réalisé l'étude du métabolisme du DBDE chez la rate gestante pour essayer de répondre à ces différentes questions et évaluer l'exposition des fœtus à ce composé, mais également pour quantifier et identifier le DBDE et ses métabolites dans les tissus maternels et fœtaux.

2. Résultats

La dose nominale de DBDE administrée à trois rates Wistar gestantes par voie orale pendant 4 jours, du jour 16 au jour 19 de gestation, a été évaluée à 2 mg/kg/jour, après correction des doses théoriques par les pertes mesurées sur le matériel servant à gaver les animaux.

La majeure partie de la radioactivité administrée a été retrouvée dans les fèces et le contenu digestif. Cependant 20 % de la dose ont été détectés dans les tissus et dans le reste de la carcasse dont *ca.* 6,5 % dans le foie et *ca.* 0,5 % dans les fœtus (cf tableau 1 de l'article 5). En dehors du foie, les concentrations résiduelles les plus importantes, ont été retrouvées dans les glandes surrénales (33 µg/g de poids frais) et les ovaires (16 µg/g de poids frais).

Les profils métaboliques obtenus à partir de l'extraction de la radioactivité présente dans les différentes matrices biologiques, ont permis de démontrer que le DBDE était métabolisé *in vivo* et que M2, un pic radioactif élué à 37 min, était le composé majoritairement retrouvé dans tous les tissus, à l'exception du tissu adipeux et de la carcasse. Les autres résultats sont détaillés dans l'article 5.

Les métabolites majoritaires ont pu être identifiés par LC-APPI-MS à partir des extraits fécaux et hépatiques (cf. Chapitre 2, IV. 2.1.3 et IV 2.2.3.). Toutefois un doute persistait concernant M2. En effet, sous le pic M2 coéluaient plusieurs composés. Dans les fèces, M2 était constitué de 2 nona-BDE (BDE-207 et 208), alors que dans les extraits de foie, un nona-BDE (BDE-207) et un octa-BDE hydroxylé (HO-octa-BDE) coéluaient sous le pic M2, ces résultats ont été confirmés par RMN. Cependant la proportion de chaque produit identifié reste encore inconnue. Les métabolites détectés et identifiés sont répertoriés dans le tableau 14 ci-dessous et mis en correspondance avec les codes qui leur ont été attribués dans la publication.

De la même manière pour M4 (octaBDE), sous ce pic, il pourrait également être question d'un métabolite hydroxylé substitué de 7 atomes de brome. Si l'on s'affranchit de cette hypothèse, c'est à dire dans le cas où ce pic radioactif ne correspondrait qu'à un octaBDE, seuls quelques congénères octa-bromés, parmi les 12 théoriques existants, peuvent correspondre à ce métabolite. Le spectre MS/MS (Fig. 5B, article 5) de l'ion parent m/z 736, montre deux groupes d'ions fragments majoritaires: m/z 654/656 et m/z 574/576/578, résultant de l'élimination respective d'HBr et de Br₂. il est possible d'identifier également un groupe d'ions fragments minoritaire à m/z 391/393/395 indiquant le clivage de la molécule au niveau de la liaison éther avec rétention de la charge sur la partie non oxygénée du métabolite.

Cet ion fragment correspond à $[C_6H_1Br_4]^-$ supposant, en s'affranchissant de la possible migration d'atome de brome décrite dans l'article 1, que le métabolite est substitué de 4 atomes de brome sur chaque cycle, seuls 6 congénères présentent une telle isomérisation. Le congénère BDE-202 peut être éliminé, n'ayant pas d'atome de brome en position para sur le cycle, il ne peut pas être ionisé en APPI-MS (cf. article 1). Donc M4, peut correspondre aux congénères restants, *i.e.* les BDE-194, 196, 197, 199, et 201. L'identification de l'isomère n'a pu être réalisée car nous n'avions pas tous ces standards à notre disposition.

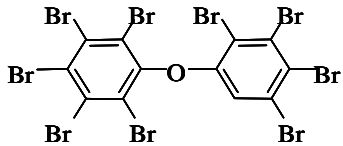
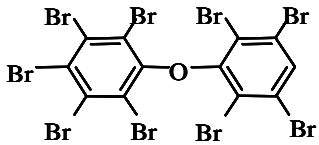
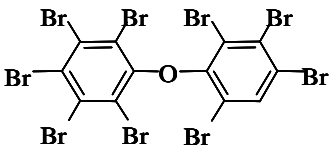
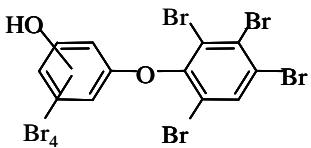
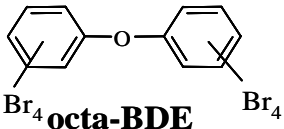
Métabolite	T _R (min)	Structure	Ion quasi-moléculaire [M-Br+O] ⁻ ou [M-H] ⁻ (ion le plus abondant)
M1	39	 <p>BDE-206</p>	<i>m/z</i> 816
M2 (des fèces)	37	 <p>BDE-208</p>	<i>m/z</i> 816 M ⁺ <i>m/z</i> 878 (BDE-208)
		<p>+</p>  <p>BDE-207</p>	<i>m/z</i> 816
M2 (du foie)	37	<p>+</p>  <p>HO-octa-BDE</p>	<i>m/z</i> 816
M4	34,5	 <p>octa-BDE</p>	<i>m/z</i> 736

Tableau 14. Structure des métabolites du DBDE détectés dans les extraits de fèces et de foie de rates gestante (identique au Tableau 3 de la publication)

Il est important de noter que des vérifications par radio-CLHP ont permis de confirmer que le DBDE n'a pas été dégradé au cours de différentes étapes de l'étude, notamment avant administration et pendant la procédure d'extraction.

3. Résultats complémentaires

3.1. Implication de la microflore intestinale dans le métabolisme du DBDE

Des incubations *in vitro* avec du contenu digestif de rat (quatre femelles) ont été réalisés en anaérobiose pour confirmer ou réfuter la prise en charge du métabolisme DBDE par la microflore intestinale. Les contenus utilisés, provenaient de trois parties différentes du tube digestif: le contenu duodéal, jéjunal, et caecal (cf. Chapitre 2, III. 3.). Le choix de travailler sur trois parties différentes de l'intestin a été déterminé par la différence des populations bactériennes présentes dans le contenu digestif en fonction de leur localisation dans l'intestin (Rowland, 1986).

Sur les radio-chromatogrammes enregistrés après extraction de la radioactivité des contenus digestifs, a été détectée la présence d'un seul produit éluant à un temps de rétention de 40 min, T_R correspondant à celui du DBDE inchangé. Ces incubations nous ont permis de montrer qu'aucune métabolisation du DBDE n'était, dans nos conditions expérimentales, prise en charge par la microflore intestinale des rates, confirmant ainsi que la biotransformation du DBDE observée *in vivo* n'était pas due aux microorganismes présents dans le tube digestif.

3.2. Essais préliminaires d'identification structurale de l'octaBDE hydroxylé par APPI-MS

Nous avons cherché à développer une approche complémentaire pour l'identification directe des métabolites en LC-APPI-MS, plus rapide que la procédure utilisée pour la RMN qui requiert une quantité importante de produit purifié, et qui permet également de s'affranchir des problèmes rencontrés avec l'utilisation de cette technique d'ionisation. En effet, la photo-ionisation à pression atmosphérique ne permet pas de différencier un PBDE contenant n atomes de brome d'un PBDE hydroxylé contenant $n-1$ atomes de brome puisque ces deux composés peuvent former des ions de rapport m/z identiques correspondant respectivement aux ions $[M-Br+O]^+$ et $[M-H]^+$. Pour tenter de lever cette ambiguïté, nous avons testé plusieurs techniques de dérivatisation du groupement phénol, décrites dans la littérature.

Méthylation par le méthanol trifluoroborane (BF_3 -méthanol): La réaction a été réalisée avec le métabolite M2 (1 μ g) mélangé à 100 μ L de ce réactif. Au bout d'une heure à 80°C, la réaction a été stoppée par évaporation du BF_3 -méthanol restant. L'analyse en LC-MS n'a pas permis de détecter de produit méthoxylé. La dérivation avec ce réactif n'a pas fonctionné. Ceci peut être dû au manque d'efficacité de ce réactif sur des molécules d'acidité moyenne comme les phénols, et/ou à la position difficilement accessible du groupement hydroxyle présent sur la molécule en raison de l'encombrement stérique dû aux atomes de brome.

Acétylation par l'anhydride acétique: nous nous sommes inspirés de la procédure utilisée dans l'étude de Morck et al. (2003), décrivant l'acétylation des métabolites hydroxylés du DBDE. Après 1 h d'incubation du métabolite M2 (1 μ g) purifié à partir des extraits de foie, avec de l'anhydride acétique et de la triéthylamine, à température ambiante, le profil radio-chromatographique obtenu (Fig. 23) ainsi que l'analyse en LC-MS ont montré que cette réaction avait dégradé le métabolite par débromation.

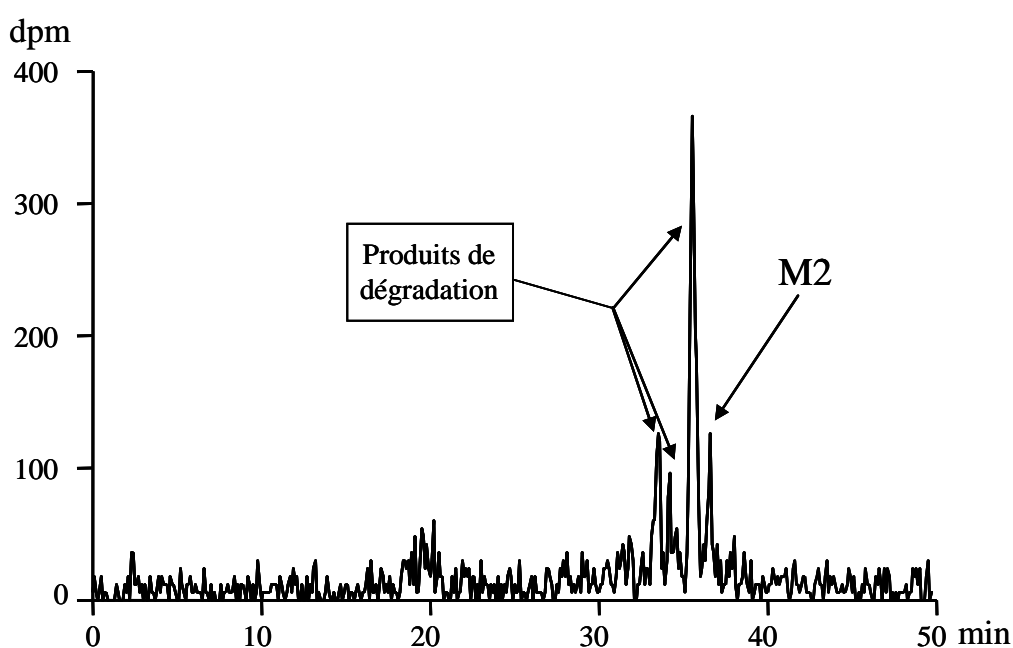


Fig. 23. Radio-chromatogramme du métabolite M2 après acétylation

En effet, des composés plus polaires, éluant avant le T_R de M2 ont été observés, correspondant à des hepta et octaBDE. Par contre, aucun composé acétylé n'a été mis en évidence par LC-MS. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir une erreur dans l'identification structurale des métabolites effectuée par Morck et al. (2003). En effet, ces

auteurs ont utilisé cette méthode pour dériver les métabolites formés *in vivo*, avant d'identifier des métabolites hydroxylés et/ou méthoxylés comportant 5 à 8 atomes de brome. L'importante débromation du DBDE observée par ces auteurs pourrait être due aux artefacts formés lors de la réaction de dérivatisation utilisée, surévaluant ainsi le potentiel de réduction du DBDE par des processus enzymatiques.

Méthylation par le diazométhane: La procédure d'acétylation utilisée ayant abouti à une dégradation du métabolite, nous avons choisi d'utiliser le diazométhane pour méthyler l'octaBDE hydroxylé (méthode souvent décrite dans la littérature). Après 2 h de réaction à température ambiante du métabolite M2 (1 µg) purifié à partir d'extrait de foie, avec 1 mL de solution de diazométhane dans l'éther, la réaction est arrêtée par évaporation du réactif. L'analyse a été réalisée en LC-APPI-MS/MS. L'ion m/z 750,5 recherché, correspondant à un ion $[M-Br+O]^+$ formé à partir d'un méthoxy-octaBDE, a été détecté sur le spectre MS avec une abondance relative très faible, cette dernière étant trop faible pour nous permettre de distinguer un massif isotopique correspondant à un produit contenant du brome. Ce composé méthoxylé coélue encore avec le BDE-207 (m/z 816,2), lequel masque le signal du composé dérivatisé. L'ion fragment correspondant à la perte du groupe méthyle (comme il avait été constaté lors de l'analyse d'un pentaBDE méthoxylé standard, [chapitre 2 V.2.1.3.](#)) n'est pas observé sur le spectre MS/MS de l'ion parent m/z 750,5. Cependant un ion fragment minoritaire $[C_7H_4OBr_3]^+$ issu du clivage de la molécule avec rétention de la charge sur l'oxygène central est détecté, ce qui va dans le sens de la présence du groupe méthoxy sur la molécule. Bien que la formation du dérivé méthylé soit faible, les premières analyses réalisées en LC-MS/MS, renforceraient l'hypothèse de la coexistence, mise en évidence en RMN, du nonaBDE (BDE-207) et de l'octaBDE hydroxylé sous le pic radioactif présent majoritairement dans la plupart des tissus.

4. Discussion

Cette étude a démontré que l'absorption du DBDE était relativement importante, avec la présence d'environ 20 % de la dose administrée dans les tissus et le reste de la carcasse, après 4 jours consécutif d'exposition par voie orale. Environ deux tiers de la dose ont été retrouvés dans les fèces, alors que l'urine est une voie d'excrétion mineure pour ce RFB. Nos résultats sont en accord avec ceux de Morck *et al.* (2003) qui avaient évalué l'absorption du DBDE chez le rat à environ 10 %, 72 h après l'exposition de ces rongeurs à une dose unique de DBDE administrée par voie orale.

La distribution tissulaire du DBDE et de ses résidus est différente de celle des PBDE de faible poids moléculaire chez ce modèle animal, ces derniers ayant tendance à s'accumuler dans le tissu adipeux (Orn et klasson-Wehler, 1998). Dans notre étude, les niveaux résiduels les plus élevés ont été détectés dans des glandes endocrines (surrénales et ovaires), dans le foie et les reins. De plus 0,5 % de la dose ont été retrouvés dans les fœtus, démontrant que le DBDE et ses métabolites pouvaient traverser la barrière placentaire.

Nos résultats ont permis de déterminer que chez le rat, *in vivo*, la biotransformation du DBDE était bien réelle, mais que la proportion de métabolites présents était bien inférieure à celle proposée par Morck et al. (2003). Par exemple, pour les fèces, ces auteurs l'avaient estimée à 65 %. En raison de l'absence de profilage métabolique dans les différents tissus, Morck *et al.* n'ont pas pu quantifier la proportion exacte de métabolites formés. Dans notre étude, les profils métaboliques tissulaires ont été réalisés, à notre connaissance pour la première fois, grâce au développement des méthodes d'extraction des résidus des différents tissus, ainsi que des conditions d'analyses CLHP permettant de séparer le DBDE de ses métabolites. Ainsi la proportion de métabolites a été quantifiée à plus de 7 % de la dose administrée. Dans tous les tissus maternels et chez le fœtus, environ 10 % de la radioactivité extractible étaient associés à des métabolites, cette proportion s'élevant à près de 30 % dans les reins. L'identification de ces métabolites a permis de mettre en évidence que la biotransformation du DBDE résultait de la débromation de la molécule, mais aussi de l'hydroxylation de ses métabolites réduits. En effet, les 3 nonaBDE (BDE-206, 207 et 208) ainsi qu'un ou plusieurs octaBDE ont été identifiés, et la présence d'un octaBDE hydroxylé a également été détectée. La proportion tissulaire du BDE-207 et de l'octa-BDE hydroxylé n'a pu être déterminée compte tenu des difficultés rencontrées lors de l'analyse de ces composés en spectrométrie de masse. Ces métabolites sont toutefois les produits de transformations majoritaires dans la plupart des tissus. La débromation du DBDE *in vivo* avait déjà été observée chez le poisson (Stapleton *et al.* 2004) et chez le rat, la détection de métabolites hydroxylés avait été également démontrée chez le rat mais concernant des congénères comportant 5 à 8 atomes de brome (Morck *et al.* 2003). Cependant il faut rester prudent quant aux résultats de Morck *et al.* car la technique de dérivation utilisée, pourrait entraîner la débromation du composé compte tenu de la dégradation de M2 que nous avons obtenue suite à l'essai de dérivation du métabolite hydroxylé. Ils auraient donc surévalué la métabolisation DBDE issu de la débromation du composé chez le rat. Les données disponibles concernant les niveaux de DBDE chez l'Homme et récemment chez le fœtus, démontrent clairement la présence de ce RFB (Fängstrom *et al.* 2005, Schechter *et al.* 2006). La mise en évidence directe de la présence de

plusieurs métabolites du DBDE chez le rat, à la fois dans les fœtus et tous les tissus maternels, mais aussi dans des glandes endocrines, soulignent l'intérêt et la nécessité de mieux comprendre le devenir du DBDE, mais aussi l'activité biologique de ses métabolites, et les effets à long terme qui pourraient être associés à ces composés.

Article 5

**A. Riu, JP. Cravedi, L. Debrauwer, A. Garcia, C. Canlet, I. Jouanin, D. Zalko.
Disposition and metabolic profiling of [¹⁴C]-Decabromodiphenyl ether in pregnant
Wistar rats. (Soumis à publication) au journal Environment International.**

Disposition and metabolic profiling of [¹⁴C]-Decabromodiphenyl ether in pregnant Wistar rats

Anne Riu, Jean-Pierre Cravedi, Laurent Debrauwer, Aurélie Garcia, Cécile Canlet, Isabelle Jouanin, Daniel Zalko*

Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1089 Xénobiotiques, 180 chemin de Tournefeuille, BP3, 31931 Toulouse cedex 9, France

* Corresponding author. Tel.: +33 561 285 004; fax: +33 561 285 244

E-mail address: dzalko@toulouse.inra.fr (D. Zalko)

Keywords: DBDE; Diphenyl ether; PBDEs; Biotransformation; Metabolism; *In vivo*; Rat; Foetus; Endocrine disrupter

Abstract

Fully brominated diphenyl ether, decabromodiphenyl ether (DBDE), is one of the most widely used brominated flame retardants worldwide. Little data is available about the metabolic fate of DBDE in animal models and nothing at all about the extent of foetal exposure. In this work, pregnant Wistar rats were force-fed with 99.8 % pure [^{14}C]-DBDE over 96 hr at a late stage of gestation (days 16 to 19). More than 19 % of the administered dose was recovered in tissues and carcasses, demonstrating efficient absorption of DBDE despite its high molecular weight and low solubility. The highest concentrations of DBDE residues were found in endocrine glands (adrenals, ovaries) and in the liver, with lower values recorded for fat. In all tissue extracts, most of the radioactivity was associated with unchanged DBDE. The use of high-grade purity [^{14}C]-DBDE allowed quantification of several metabolites present both in maternal tissues and in foetuses. These biotransformation products accounted for 9-27 % of the extractable radioactivity in tissues and 14 % of that in foetuses. Three nona-BDEs and one octa-BDE were identified by LC-APPI/MS. The unequivocal characterisation of a hydroxylated octa-BDE isolated from liver was confirmed by NMR. In rat, the main metabolic pathways of DBDE are debromination and oxidation. DBDE, and very likely most of its metabolites, are able to cross the placental barrier in rat. Metabolic profiles, obtained *in vivo* for the first time, demonstrated the presence of DBDE and major biotransformation products in endocrine glands as well as in foetuses. The biological activity of these metabolites still needs to be assessed in order to better understand the potential toxicity of DBDE.

1. Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are common flame retardants which are widely used in the manufacture of industrial and domestic equipments to prevent fire and minimize fire damage. PBDEs are used in many consumer products, including computers, electronic and electrical equipment, textiles and foam furniture. Their chemical formula is $C_{12}H_{(10-n)}Br_n$ ($n \leq 10$); the theoretical number of possible congeners is 209. PBDEs are manufactured as three different formulations: penta-BDE, octa-BDE and deca-BDE (EHC-162, 1994). Deca-BDE is now the only PBDE commercial mix whose use is still authorised in the European Union. In 2002, the worldwide demand for deca-BDE formulations was estimated at over 50 000 tons (BSEF, 2003). Used as additive BFR, PBDEs are not bound to the matrix of flame retarded products and can therefore leach into the environment (Birnbaum and Staskal, 2004). Like other organic pollutants, they are considered to be persistent and lipophilic compounds and some have been shown to bioaccumulate in the environment (Watanabe et al., 1986; Yamamoto et al., 1997). PBDEs can be found in animal tissues (Lindstrom et al., 1999; Huwe et al., 2002), as well as in humans (Noren and Meironyte, 2000; Sjodin et al., 2004). The most commonly detected congeners are BDE-47, 99, 100, 153, 154 and 183, which are also major congeners present in technical mixes (Darnerud et al., 2001). Less information is available about DBDE (BDE-209). In the environment, DBDE readily debrominates into lower molecular weight PBDEs (Bezares-Cruz et al., 2004; Gerecke et al., 2005). Measuring DBDE in biological matrices is harder than other PBDEs due to its high molecular weight and weak solubility even in organic solvents. However, recent data suggest that levels of DBDE (and of other highly brominated PBDEs congeners) are increasing in the domestic environment (Stapleton et al., 2005), in mammals (Voorspoels et al., 2006) and in human samples (Thomas et al., 2005).

The results of only a limited number of studies of the toxicity of DBDE have been made available. Lower PBDE congeners have been studied more extensively. Some have been shown to cause neurotoxic effects in mice (Eriksson et al., 2002; Viberg et al., 2003a). Others, including hydroxylated PBDEs metabolites, could interact with the thyroid hormone system (Meerts et al., 2000), and display agonistic or antagonistic activity toward the Ah receptor (Chen and Bunce, 2003), or induce the expression of CYP1A1 and CYP1A2 (Von Meyerinck et al., 1990).

In humans, the presence of DBDE has been demonstrated in milk (Schechter et al., 2003), serum (Takasuga et al., 2004; Thomas et al., 2005) and adipose tissue (Stanley et al., 1991; Cariou et al., 2005). The presence of PBDEs in human foetal liver was recently reported (Schechter et al., 2006), DBDE being the prominent congener, demonstrating the transplacental passage of PBDE residues from mother to foetus. These results suggest that not only human adults but also foetuses are exposed to PBDE residues.

Little is known about DBDE's metabolic fate in animal models. A previous study using radiolabelled DBDE showed that approximately 90% of the radioactivity administered to rats was recovered in faeces 72h after a single oral dose. Indirect evidence of DBDE absorption was provided by the identification of several PBDEs, as well as hydroxylated and methoxylated metabolites in the liver, kidney, lung and small intestine wall (Mörck et al., 2003). Mörck et al. demonstrated that at least 10% of a 2.85 mg.kg⁻¹ single oral dose of DBDE was absorbed. This percentage was found to be even greater following an oral dose of 1.9 mg.kg⁻¹ (Sandholm et al., 2003). These results contrast sharply with the very low absorption rate observed in earlier studies (Norris et al., 1975; El Dareer et al., 1987). None of these studies were able to determine the corresponding metabolic profiles of DBDE residues in tissues. The distribution and proportion of DBDE metabolites in tissues remain unknown. We consequently decided to investigate the metabolism of DBDE in pregnant Wistar rats,

focusing on these issues and on foetal exposure. Rats were dosed with [^{14}C]-radiolabelled DBDE of high radiochemical purity by the oral route on 4 consecutive days, from gestational days 16 to 19. Suitable extraction and analytical methods were developed to achieve the radio-chromatographic separation of DBDE metabolites formed *in vivo* and to study their structure.

2. Material and methods

2.1 Chemicals

Radio-labelled DBDE [bis(pentabromophenyl)ether], was synthesised from ring- ^{14}C -diphenyl ether (Izotop, Institute of Isotopes co. Budapest, Hungary; specific activity: 5,28 MBq.mg $^{-1}$). ^{14}C -diphenyl ether (7.4 MBq) in methanol was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream. Aluminium was added as catalyser, and excess Br $_2$ (VWR Prolabo, Pessac, France) was added every 10 min at 50°C. After the ninth addition, the vial was hermetically closed and was kept for 2 hr at 70°C. The reaction was quenched with water and DBDE was extracted with toluene, which was further purified using 1g C18 cartridges from Macherey Nagel (Hoerdt, France) (system I). DBDE (*ca.* 300 μg /cartridge) was retaken in 4 mL acetonitrile: water (80:20, v/v) and fractionated on glass cartridges previously washed with 4 mL acetonitrile and equilibrated with 4 mL acetonitrile:water (80:20, v/v). Elution was performed successively with 4 mL acetonitrile:water (80:20, v/v), 10 mL acetonitrile:water (90:10, v/v), 4 mL acetonitrile, and 8 mL toluene. Purified DBDE was found in the last fraction. DBDE radiochemical purity was checked by radio-HPLC (purity > 99.8%) with specific activity of 0.91 MBq.mg $^{-1}$. The yield of the synthesis was close to 100 %. All solvents (analytical grade) were purchased from Scharlau Chemie SA (Barcelona, Spain).

PBDE standards, *i.e.* BDE-206, 207 and 208, were purchased from Wellington Laboratories (Guelph, Canada).

2.2 Animals

Three conventional pregnant Wistar rats (b.w.: 284 ± 11 g) were purchased from Charles River (l'Arbresle, France). They were acclimatised and individually housed in stainless steel metabolic cages. Animals were allowed free access to water and to a standard diet (SAFE; Augy, France). They were maintained on a 12-hr light/dark cycle. Each animal was force-fed daily with [^{14}C]-DBDE solubilised in peanut oil from gestational days 16 to 19, doses were adjusted to $2.61 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ (b.w.)} \cdot \text{day}^{-1}$ ($2.37 \text{ MBq.kg}^{-1} \text{ (b.w.)} \cdot \text{day}^{-1}$). Urine and faeces were collected daily over a 4-day period. Animals were killed by cervical dislocation followed by exsanguination on day 20 of gestation, 24 h after the last DBDE dosage. Blood was collected in heparinised tubes. The liver, digestive tract, kidneys, adrenals, spleen, lung, heart, brain, abdominal adipose tissue, muscle (*semitendinosus*), ovaries, uterus, placenta, and foetuses of each animal were removed and stored at -20°C until analysis. Amniotic liquid was collected during removal of the foetuses. Digestive tracts were divided into three parts: stomach, small intestine, and large intestine, which were each separately washed of their content with 20 mL NaCl 9‰; the contents were stored separate from the tissues themselves at -20°C until use. Cages were individually washed with 100 mL ethanol, from which 1 mL aliquots were taken for measurement of radioactivity.

2.3 Instrumentation

HPLC analyses were performed on a Spectra system P1000 (Thermo Electron, les Ulis, France) equipped with a Rheodyne injector and a UV detector set at 254 nm (Spectra system UV6000LP, Thermo Electron), connected to a Flo-one/ β A500 radioactivity detector

(Radiomatic™ 610TR, Perkin Elmer; Villebon-sur-Yvette, France). Flow-scint II (Packard Instruments Co, Downers Grove, IL) was used as scintillation cocktail to determine metabolic profiles. The radioactivity detector was replaced by a Gilson model 202 (Gilson, Roissy, France) fraction collector to isolate metabolites prior to identification. The reverse-phase HPLC system consisted of a C18 Nucleodur column (250 x 4 mm, 5 µm; Macherey Nagel, Hoerd, France) with a Kromasil C18 guard pre-column (18 x 4.6 mm, 5 µm; ColoChrom, Gagny France). Conditions were as follow: flow: 1 mL.min⁻¹; temperature: 35°C; mobile phases: A: water, and B: methanol. A four step gradient was used: 0-4 min, A:B 80:20 v/v; 4-6 min, linear gradient from A:B 80:20 v/v to A:B 40:60 v/v; 6-14 min, A:B 40:60 v/v; 14-15 min, linear gradient from A:B 40:60 v/v to A:B 10:90 v/v; 15-24 min, A:B 10:90 v/v; 24-25 min, linear gradient from A:B 10:90 v/v to A:B 2:98 v/v; 25-34 min, A:B 2:98 v/v; 34-35 min, linear gradient from A:B 2:98 v/v to B: 100 %; 35-50 min, B: 100 %.

Radioactivity in urine and all other liquid samples was determined by direct counting using a Packard liquid scintillation counter (Tricarb 2200CA; Packard, Meriden, CT), and Packard Ultima Gold as scintillation cocktail. Radioactivity in rat carcasses, faeces, fresh tissues and extraction pellets was determined by complete combustion of the samples trapped in appropriate scintillation cocktail (Packard Permafluor E+/ Packard Carbosorb, 2:1, v/v) using a Packard 307 Oxidizer, followed by [¹⁴C]O₂ quantification on the Packard liquid scintillation counter. Three replicates were analysed for each sample.

2.4 Sample processing

Faeces and contents of digestive tracts. All faeces samples collected daily throughout the metabolic balance study were individually homogenised in 10 mL NaCl 9 ‰ using a Polytron homogeniser (Kinematica, Lucerne, Switzerland), and were centrifuged for 8 min at 6500 g. Radioactivity was determined by direct counting (supernatants) or by combustion

(pellets). The following procedure was used for extraction of faecal residues: for each sample, 1 g of homogenised material was mixed with acetonitrile (10 mL), extracted using a Polytron homogeniser, and centrifuged for 8 min at 6500 g. The supernatant was separated from the pellet, which was extracted twice more with the same solvent and three times with acetonitrile:toluene (90:10, v/v). Radioactivity in all supernatants and in the remaining pellet was determined by direct counting and combustion, respectively. An aliquot of the first extract of each faeces sample was taken for HPLC analysis. As they were stored in NaCl 9 %, digestive tract contents were first thawed and then centrifuged for 8 min at 6500 g. Radioactivity in supernatants and pellets was determined by direct counting and complete combustion, respectively. Extractions were individually carried out using acetonitrile as the extraction solvent (10 mL.g⁻¹), as detailed above for faeces.

Tissues. Large tissues (liver, intestine) were homogenised and aliquots were taken for extraction. For smaller tissues, all the available material remaining after radioactivity determination was used. Extraction was carried out in six steps, as detailed above for faeces but using 5 mL of solvent per g of fresh tissue (adrenals: *ca.* 17 mL.g⁻¹; ovaries: *ca.* 10 mL.g⁻¹). Radioactivity in all supernatants and in the remaining pellet was determined by direct counting and combustion, respectively. To determine metabolic profiles, an aliquot (*ca.* 500 Bq) of the first extract of each tissue was sampled. Part of the tissues and other solvent extraction fractions were pooled and analysed in the same way for purposes of comparison. For the adipose tissue and carcasses, the two first acetonitrile extracts were delipidated with isooctane (1:2, v/v). Three volumes of acetonitrile were added (4:2, v/v acetonitrile:isooctane) and the resulting acetonitrile extracts were concentrated under N₂ to dryness and retaken in acetonitrile:methanol:water (2:1:1, v/v/v) before radio-HPLC analysis. Similar extraction was carried out with [¹⁴C]-DBDE supplemented samples (liver, digestive tract) from control animals, to ensure no degradation of the DBDE occurred during the procedure.

Plasma. Plasma samples were individually mixed with methanol (1:3, v/v), stirred, and centrifuged for 10 min at 6500 g. The pellet of protein was extracted twice more with acetonitrile. For each animal, all extracts were pooled, evaporated to dryness under a nitrogen stream and retaken in acetonitrile:methanol:water (2:2:1, v/v/v) for radio-HPLC analysis. Radioactivity remaining in the last centrifugation pellet was determined by combustion.

Urine: For each rat, pooled urine samples were mixed with methanol (1:3, v/v) and centrifuged for 8 min at 6500 g. The pellet was extracted twice with 10 mL acetonitrile. Urine extracts were pooled and evaporated to dryness under vacuum and were retaken in 4 mL acetonitrile:methanol:water (2:1:1, v/v/v), then were purified on 1 g C18 glass cartridges (system II). Cartridges were washed with 4 mL acetonitrile and equilibrated with 4 mL acetonitrile:methanol:water (2:1:1, v/v/v). Elution was performed successively with 4 mL acetonitrile:methanol:water (2:1:1, v/v/v), 4 mL acetonitrile:water (90:10, v/v), 6 mL acetonitrile, and 4 mL toluene. The first two fractions were concentrated and analysed by radio-HPLC.

The mean values of statistical analyses were compared using a Student *t*-test.

2.5 Metabolite identification

Metabolites were isolated using the two first extracts from faeces and liver, respectively. For liver, extracts were purified using 1 g C18 cartridges (system I) prior to HPLC fractionation. Extracts were concentrated under a nitrogen stream and partitioned using the same analytical HPLC system as for metabolic profiling. The structure of the metabolites was characterised by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

Mass Spectrometry. Analyses were carried out on a quadrupole ion trap mass spectrometer (Finnigan LCQ DecaXP, Thermo Electron, Les Ulis, France) fitted with a Finnigan APCI /

APPI dual ionisation source. This source generates 10 eV photons by means of a VUV Krypton discharge lamp. For preliminary infusion studies, samples (typically 1 ng.µL⁻¹ in methanol:water (1:1, v/v), 1% toluene) were introduced into the ionisation source at a flow rate of 10 µL.min⁻¹. Typical ionisation source operating conditions were as follows: heated nebuliser temperature, 300°C; heated transfer capillary temperature, 250°C; sheath gas flow rate, 25 (arbitrary units); auxiliary gas flow rate, 5 (arbitrary units). MS/MS experiments were carried out in the resonant excitation mode with an isolation window width of 1.5 u. All other parameters for MS and MS/MS experiments were adjusted for each compound to obtain maximum sensitivity and structural information for the compounds of interest. All analyses were performed under automatic gain control conditions using helium as damping gas and as collision gas for MS/MS experiments (resonant excitation). For LC-MS, a TSP 4000 (Thermo Electron, les Ulis, France) pump fitted with a Rheodyne injector was used. The reversed phase column consisted of a Polaris 3 C18 (150 x 2 mm; Varian, Middleburg, The Netherlands), conditions were the same as described above but with a flow rate of 0.15 µL.min⁻¹. A post-column addition of toluene (5 µL.min⁻¹, *i.e.* 2.5%) as the doping agent was made.

NMR. The ¹H NMR spectrum of metabolite was obtained at 300 K on a Bruker Avance DRX-600 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 600.13 MHz and equipped with a 5 mm H, C, N inverse triple resonance TXI cryoprobe attached to a cryoplatfom (the preamplifier cooling unit). The sample (M2 = 4 µg) was dissolved in 600 µl of deuterated acetonitrile (CD₃CN). The ¹H spectrum was acquired using a standard pulse sequence for ¹H NMR. 2048 free induction decays (FIDs) were collected with a spectral width of 12 ppm in 64 K data points, the experimental time was 2 h. An exponential function equivalent to a line-broadening of 0.3 Hz was applied prior to Fourier transformation.

3. Results

3.1 Metabolic balance in pregnant Wistar rats dosed with DBDE for four consecutive days.

The radioactivity remaining in the material used to dose the animals was quantified, enabling the rats' actual dosage to be calculated; this was $2.00 \pm 0.11 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ (b.w.).day}^{-1}$, corresponding to $1.82 \text{ MBq.kg}^{-1} \text{ .day}^{-1}$ (nominal: $2.61 \pm 0.13 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ (b.w.).day}^{-1}$).

Total radioactivity recovery for the experiment was $91.1 \pm 2.9 \%$. Residual levels measured in tissues and excreta are summarised in Table 1, with the corresponding concentrations (based on fresh weight) expressed in micrograms per gram (ppm) \pm SD of DBDE equivalent. The faecal route was the major elimination route for DBDE and related compounds (2/3 of the administered radioactivity), whereas urinary excretion was very low (*ca.* 0.1 %). By the end of the study, the digestive tract contained an additional 5 % of the administered dose, with 0.4 %, 0.7 % and 4.2 % located in the stomach, small intestine and large intestine, respectively. The concentration of DBDE residues in the large intestine wall (1.6 ppm) was significantly lower than in the stomach (3.1 ppm). Although, it cannot be excluded that part of this radioactivity could be due to DBDE adsorbed to the epithelium mucosa, our results suggest that the major part corresponded to tissue residues. In other tissues, the highest concentrations of residues were found in the adrenals, ovaries, and liver (all above 10 ppm). Residual levels calculated for whole blood were around 1 ppm, 75 % of these residues being associated with the plasma fraction. Residue concentrations in the reproductive tract ranged from 0.11 ppm (amniotic fluid) to 2.5 ppm (placenta), with *ca.* 0.5 ppm calculated for foetuses, corresponding to 0.47 % and 0.43 % of the administered radioactivity for placentas and foetuses (whole litter), respectively. DBDE residual concentrations in adipose tissue and in skeletal muscle were below 0.8 ppm. Small amounts of radioactivity were detected in the brain. About 9 % of the administered radioactivity was still located in carcasses

(corresponding to remaining muscle and fat; bones, skin, eyes) at the end of the study. Most of it was located in the skin and adipose tissue (data not shown).

3.2 Metabolic profiles

Faeces, digestive tract contents, and urine. The results obtained for extractions of faeces and digestive tract contents are summarised in Fig. 1A. They are expressed as a percentage of the radioactivity recovered, which did not significantly differ from 100 %. The aqueous fraction (homogenisation in NaCl) accounted for a small percentage of the radioactivity remaining in the stomach at the end of the study. This fraction was highest in the small intestine (60.5 ± 7.2 %) and dropped to 14.4 ± 5.2 % in the large intestine. In faeces (4-day excretion) it accounted for less than 3 % of total radioactivity. Conversely, the organic fraction (6-step solvent extraction) was highest in the stomach content and in faeces. Large amounts of non-extractable residues were found in the large intestine (42.8 ± 13.0 % of the radioactivity), corresponding to 1.8 % of the radioactivity administered over the 4-day study. In faeces, the proportion of non-extractable residues was around 20 %, with no significant difference observed from day 1 to day 4 of the study.

Radio-HPLC analyses showed that 97 % of the radioactivity recovered in the organic fractions of faecal extracts was associated with unchanged DBDE, which was eluted at 40 min R_T , using the HPLC system specially developed for the study (Fig. 1B). Three metabolites were detected on the radio-chromatogram: M1 ($R_T = 39$ min), M2 ($R_T = 37$ min) and M4 ($R_T = 32$ min). In the contents of the digestive tract (5 % of administered radioactivity), unchanged DBDE in the organic fractions accounted for 96.4 %, 86.4 % and 91.9 % of the radioactivity in the stomach, small intestine and large intestine, respectively. The proportion of metabolite M2 in the organic fraction, particularly in the small and large intestine, was higher than in the faeces. In addition, these fractions contained metabolites

exhibiting a higher polarity (R_T ranging from 24 to 30 min). Polar metabolites were also detected in the aqueous fractions (R_T : 2-30 min), accounting for 34.4 %, 70.5 %, 50.6 % and 17.5 % of the radioactivity in the stomach, small intestine, large intestine and faeces, respectively (data not shown). Despite the low concentration of residues in urine ($0.06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), chromatographic profiles could be obtained from pooled samples (from day 1 to day 4). Only polar compounds were detected (R_T : 2-30 min) and no unchanged DBDE was found in urine.

Plasma and other tissues. Total radioactivity recovery for tissue extractions was close to 100 %. With the exception of the large intestine, relatively low amounts of tissue radioactivity were associated with non-extractable residues (Fig. 2). Radio-HPLC analyses showed that the majority of extractable radioactivity corresponded to unchanged DBDE, while the proportion of metabolites ranged from 9 % (target tissues: adrenals, ovaries, liver) to 30 % (carcass). Metabolic profiles for the main tissues of interest are shown in Fig. 3. The distribution of the main DBDE metabolites is detailed in Table 2. M2 was the major radioactive peak detected and was present in all tissues. M2 accounted for *ca.* 10 % of radioactivity in tissues, with slightly lower values recorded in the adrenals, ovaries and liver; conversely, the proportion measured in the kidney was twice as high. More than 12 % of plasma radioactivity was associated with metabolites. Apart from M2, only one other metabolite (M3, R_T : 34.5 min) was detected in plasma samples. Both compounds were also present in placenta extracts, for which the profiles were very similar to those obtained for plasma. M3 was found in all tissues, but not in fat and carcasses. M1, eluting slightly before unchanged DBDE, was detected in all samples except plasma, placenta and fat. Other minor metabolites were found in the liver and the adrenals (M4, R_T : 32 min) as well as in foetuses (M5, R_T : 31 min). The latter metabolite appeared to be specific to foetal extracts, but due to

the limited amounts detected and the respective R_T of M4 and M5, the possibility that the two compounds actually correspond to the same structure cannot be totally ruled out. Radioactivity in carcasses was mainly associated with M1 and M2. A third metabolite, with a R_T of 27.6 min (M6), was detected in carcasses, but accounted for only 2 % of the total extractable radioactivity. M6 was also present in the uterus and in fat.

3.3 Metabolite isolation and structural identification

Faecal metabolites were isolated from faeces extracts using HPLC coupled to a fraction collector. Liver extracts were purified using C18 glass cartridges prior to HPLC fractionation. Acetonitrile elutions 5 to 7 were found to contain all hepatic metabolites but only a small amount of unchanged DBDE, which was recovered in the last cartridge elutions using 100 % toluene. Each metabolite isolated by HPLC was concentrated before LC-MS analyses for M1, M2 and M3, which were carried out separately for faecal and hepatic metabolites. Additional NMR analysis was possible of the major metabolite M2, which was purified from liver extracts. Other metabolites could not be isolated in sufficient amounts to enable structural identification.

LC-APPI-MS: APPI was recently shown to be a suitable technique for the LC-MS analysis of PBDEs (Basso et al., 2003; Kauppila et al., 2004; Debrauwer et al., 2005a; Riu et al., 2006). In the negative ionisation (NI) mode, $[M-Br+O]^-$ ion species are formed. Using NI-APPI analysis, DBDE was characterised by a $[M-Br+O]^-$ ion cluster distributed from m/z 886 to 904. On the LC-MS system, DBDE was eluted at 38.72 min. As already shown, fragment ions were present on the MS spectrum of DBDE, resulting from the elimination of Br_2 ($[M-Br+O-Br_2]^-$, m/z 729-743 cluster) and from the cleavage of the ether bond of DBDE with charge retention on the oxygenated part of the molecule ($[C_6Br_5O]^-$, m/z 483-493 isotopic cluster)

(Debrauwer et al., 2005a). The limit of detection (LOD) in our LC-MS conditions ranged from 10 to 200 pg, depending on the BDE congener. The LOD for DBDE was 10 pg. (Debrauwer et al., 2005b).

M1. LC-APPI-MS analyses of M1 isolated from faeces and liver produced similar results. M1 was eluted at 37.64 min in our LC-MS system, and the MS spectrum displayed a [M-Br+O]⁻ ion cluster of M1 centered on m/z 816 which was characteristic of standard nona-BDE. In contrast to DBDE, no fragmentation occurred in the source, suggesting that this congener is more stable than DBDE. The MS/MS spectrum of the selected m/z 816 parent ion exhibited two main diagnostic fragment ions at m/z 734/736 and m/z 654/656/658, resulting from the elimination of HBr and Br₂, respectively. Based on the comparison of the R_T, MS and MS/MS spectra of M1 with those of the 3 standard nona-BDEs, this metabolite was identified as BDE-206 (Table 3).

M2. M2 was eluted at 35.5 min, whatever its origin (faecal: M2a, or hepatic: M2b). It was found to coelute with two nona-BDEs, namely BDE-207 and BDE-208. The negative ion cluster centered on m/z 816 can be attributed either to a [M-Br+O]⁻ ion from a nona-BDE, or to a [M-H]⁻ ion from a hydroxylated octa-BDE (Fig. 4). However, MS analysis of M2a isolated from faeces extracts revealed a weak signal centered on m/z 878 with an isotopic pattern consistent with a molecule bearing nine bromine atoms (Fig. 4A). The elimination of HBr from the M[•] molecular ion was also detected ([M-HBr]^{•-}, m/z 792-806 cluster). These two ions were also observed on the MS spectrum of the standard congener BDE-208, demonstrating the presence of this nona-congener in faeces extracts. The presence of BDE-207 cannot be ruled out since, like BDE-208, it is characterised by a [M-Br+O]⁻ ion, and the MS/MS spectrum of BDE-207 and BDE-208 are similar. Thus, both BDE-207 and BDE-208

could be present in faecal extracts. Due to the low quantity of this metabolite present in faeces, NMR analysis could not be performed, and the concomitant presence of hydroxylated octa-BDE can thus not be ruled out. No M^+ quasi-molecular ion was observed on the MS spectrum of M2b purified from liver extracts (Fig. 4B), showing that in contrast to faeces, BDE-208 was not present in liver extracts. It was thus concluded that the nona congener present in liver extracts was BDE-207. Additional ^1H NMR analyses were undertaken to investigate the presence of hydroxylated octa-BDE. Only three peaks were observed on the NMR spectrum: a singlet at 9.61 ppm, and two singlets at 7.39 and 7.38 ppm. The addition of D_2O in the NMR tube resulted in the disappearance of the singlet at 9.61 ppm, indicating the presence of a hydroxy group on the molecule. The two singlets at 7.39 and 7.38 ppm, in different proportions on the NMR spectrum, indicated the presence of two compounds in M2b. These peaks corresponded to an aromatic proton in each compound, and were in meta positions compared with the O-aryl substituent, because of the chemical shift of the proton. The position of the hydroxy group could not be determined. This hydroxy group is not located on the same aromatic ring as the aromatic proton of the molecule. On this basis, M2b was identified as a mixture of BDE-207 and of a hydroxylated octa-BDE (Table 3).

M3. M3 was isolated from liver extracts. Its R_T in LC-APPI-MS was 32.41 min, with an $[\text{M}-\text{Br}+\text{O}]^-$ ion cluster centered on m/z 736 (Fig. 5A). The MS/MS spectrum of the selected m/z 736 parent ion exhibited two main diagnostic fragment ions at m/z 654/656 and m/z 574/576/578, resulting from the elimination of HBr and Br_2 , respectively (Fig. 5B). M3 was thus identified as an octa-BDE. Due to the small quantities of M3 present in tissues, NMR analysis could not be carried out on this metabolite, and the concomitant presence of a hydroxylated hepta-BDE can consequently not be excluded.

4. Discussion

Technical DBDE is the only PBDE formulation whose use is still authorised in the EU. It is also the PBDE formulation which is by far the most commonly used worldwide. Nevertheless, only limited data is available regarding the bioavailability, metabolism and possible toxicity of DBDE *in vivo*. Data based on early studies carried out in rodents, reporting a very low absorption of DBDE (Norris et al., 1975; El Dareer et al., 1987), provided support for the widespread belief that DBDE is poorly bioavailable following oral exposure. Studies demonstrating that the absorption of DBDE in Sprague Dawley rats was in the 10-30 % range (Mörck et al., 2003; Sandholm et al., 2003) were only recently made available. According to Mörck et al. (2003), absorption may even be underestimated, based on the fact that 65 % of the faecal radioactivity was found to be associated with metabolites. Doses in the mg.kg^{-1} range were used in both these works as well as in our own study, while human exposure is expected to occur in the ng.kg^{-1} range (Jones-Otazo et al., 2005), thus probably with a higher absorption rate. Little is known about the biotransformation of DBDE, due to the technical difficulty involved in analysing this molecule and its residues. Recent articles strongly suggest that *in vivo* debromination of DBDE occurs in fish (Kierkegaard et al., 1999; Stapleton et al., 2004; Stapleton et al., 2006), in rat (Mörck et al., 2003; Sandholm et al., 2003), and possibly in humans (Thuresson et al., 2005). This issue is of particular importance since PBDE levels measured in biological samples could be either degradation compounds of DBDE, or the result of a direct exposure to lower brominated PBDE mixtures. The subsequent formation of hydroxylated and methoxylated metabolites has been documented (Mörck et al., 2003), demonstrating that DBDE can be metabolised in rat. However, quantification and distribution of DBDE metabolites in tissues has not yet been undertaken. In the present study, pregnant Wistar rats were dosed with [^{14}C]-DBDE of high

radiochemical purity over a period of 96 hr at a late stage of gestation, and analytical methods were specially developed to allow the unequivocal quantification of DBDE and its metabolites both in maternal tissues and in foetuses.

No DBDE degradation occurred during the preparation and administration of the dosage solution, or during tissue extraction processes, as assessed by radio-HPLC. More than 19% of the administered dose was recovered in the body (tissues + carcass) of Wistar rats force-fed with DBDE over 4 days, demonstrating relatively high absorption of DBDE as well as efficient distribution to tissues. The faecal route was the main excretion pathway (2/3 of the administered dose), whereas urinary excretion was very low. These results are in good accordance with previous studies on Fisher and Sprague Dawley rats (Norris et al., 1975; El Dareer et al., 1987; Mörck et al., 2003; Sandholm et al., 2003). In faeces extracts, only a low proportion of the radioactivity corresponded to metabolites. Characterisation of the metabolites in these samples showed that DBDE was debrominated into the 3 nona-congeners, *i.e.* BDE-206 (M1), 207 and 208 (M2). The presence of these metabolites was probably due to DBDE metabolism by rats. Reductive dehalogenation by gut microflora cannot be ruled out (Rowland, 1986).

DBDE residues were found in all tissues. Our results, in good agreement with previous data, demonstrated that the distribution of DBDE in rat was different from that of lower PBDE congeners. In contrast with tetra-BDE (Orn and Klasson-Wehler, 1998), DBDE was weakly distributed to the adipose tissue. Residue concentrations were high in the adrenals, ovaries, liver, kidney and heart, their calculated values all being significantly higher than levels of plasma radioactivity. The relatively low levels measured in plasma are probably explained by the pharmacokinetics of DBDE. Indeed, circulating DBDE levels have been found to peak at 6 hr in rat following oral administration (Sandholm et al., 2003), while in our study, blood radioactivity levels were measured 24 hr post dose. Liver was found to be the target tissue for

DBDE (11 ppm, corresponding to 6.5 % of the administered dose). However, the highest residual levels were found in endocrine glands, namely the adrenals (33 ppm) and ovaries (16 ppm). This unequivocally confirms a previous result by Mörck et al. (2003) for the selective accumulation of DBDE in the adrenals, and provides the first demonstration of the concentration of DBDE residues in ovaries. Only small amounts of DBDE residues were found to cross the blood-brain barrier, but about 0.5 % of the dose was found in foetuses (whole litter) demonstrating that DBDE residues are able to cross the placental barrier in rats. The direct extrapolation of these results to humans is impossible; however, rat placentation at a late stage of gestation is histologically close to human placentation (chorio-allantoidian type, histiotrophic embryo nutrition). The transplacental passage of DBDE in humans is to be expected, as evidenced by the recent results of Schechter et al., demonstrating the presence of DBDE in human foetal liver.

Unchanged DBDE was the main residue found in faeces, which contained only *ca.* 3 % of metabolites. A higher proportion of residues was associated with metabolites in tissues. The major radioactive peak, M2, accounted for 7 to 11 % of tissue extractable radioactivity, with the exception of the kidney (21 %). LC-MS and NMR analyses showed that M2b purified from the liver consisted of a nona-congener (BDE-207) and of hydroxylated octa-BDE. For other tissues, it was not possible to determine the proportion of M2 associated with either nona-BDEs or hydroxylated octa-BDE. The use of highly pure [¹⁴C]-DBDE enabled identification of minor metabolites. M1 and M3, purified from liver extracts, were identified as BDE-206 and an octa-BDE congener, respectively. Since only limited amounts of M3 were obtained for structural characterisation, NMR analysis could not be performed on this metabolite. Given that APPI was used as the MS ionisation technique, it cannot be ruled out that M3 partly corresponds to hydroxylated hepta-BDE, which would support previous data from Mörck et al. (2003). Additional polar metabolites were detected in urine. Similar

compounds were found in intestine contents but not in faeces, suggesting the presence of conjugates that are later deconjugated by gut microflora. M1, M2 and M3 were detected in endocrine glands and in foetuses. Based on structural characterisation of liver and faeces extracts, nona-BDE, octa-BDE, and hydroxylated octa-BDE could thus be present in these tissues; the structure of the latter metabolites strongly suggests cytochrome-P450 dependant oxidation of DBDE. M1 and M5 were found in foetuses but not in placenta or maternal plasma. Thus the hypothesis that foetal M1 and/or M5 is due to foetal metabolism can not be excluded.

The current 96-hr study evidenced the presence of DBDE as well as several metabolites, all bearing a minimum of seven bromine atoms, in most rat tissues. All together (excreta + tissues + carcass), these metabolites accounted for *ca.* 7 % of the radioactivity administered to rats. The identified metabolites could be biologically active. Little is known about the biological effects of highly brominated PBDEs, and nothing at all about their corresponding hydroxylated metabolites. For several PBDEs of lower molecular weight (tri- to penta-BDEs), it has been shown that biological activity as well as *in vitro* toxicity is enhanced by microsomal oxidation (Meerts et al., 2000; Hamers et al., 2006). Hydroxylated PBDEs were found to induce estrogen receptor signal transduction (Meerts et al., 2001). *In vivo*, an 8 day study in pregnant rats (days 10 to 18 of gestation) showed that penta-BDE (BDE-99) exposure leads, in male offspring, to a reduction in testosterone and estradiol levels, as well as to a reduction in ano-genital distance (Lilienthal et al., 2006). PBDEs of lower molecular weight than DBDE and hydroxy-PBDEs can also alter thyroid homeostasis. Some hydroxylated PBDE bearing four or five bromine atoms display close structural similarity with thyroid hormones and can bind thyroid hormone receptors (Marsh et al., 1998). Some have been shown to be potent competitors of T₄ for binding human thyroid hormone transport protein, transthyretin, *in vitro* (Meerts et al., 2000). In mice and rats, reports mentioned a decrease in

circulating concentrations of thyroid hormones after the administration of a PBDE mixture or of single congeners (Hallgren et al., 2001; Zhou et al., 2002). To our knowledge, no study concerning the *in vivo* effects of DBDE on steroid or thyroid hormone levels or regulation has been published. Given current knowledge about lower brominated analogues, it is of particular interest to note that DBDE and its residues were able to cross the placental barrier in pregnant Wistar rats, and that hydroxylated octa-BDE could be present in all tissues and in foetuses. Viberg et al. (2003b), showed that DBDE can cause permanent neurotoxic effects in mice exposed during critical periods of *in utero* development. The developing central nervous system is highly dependant on thyroid hormones, and is therefore a potential target for endocrine disrupters able to interfere with thyroid homeostasis (Colborn, 2004). This may be the case for DBDE and its metabolites, either through the disruption of maternal thyroid regulation, or through direct exposure of embryos / foetuses.

High concentrations of DBDE residues, including metabolites, were found in endocrine glands. The biological activity of compounds such as hydroxylated octa-BDE, at the level of sex-hormone nuclear receptors, and the possible consequences of their presence in ovaries require further study. Residual levels detected in the adrenals and the corresponding metabolic profiles are of even more interest. Indeed, it has been shown that polychlorinated biphenyls (PCBs), whose chemical structure is closely related to that of PBDEs, have toxic effects in animals and impair corticosteroids regulation. PCBs can induce hyperplasia of the adrenal cortical in harbour seal, leading to immunotoxicity of PCB metabolites in these marine mammals (Ross et al., 1996a; Ross et al., 1996b). The immunotoxicity of these organo-chlorinated compounds was also reported in rats (Ross et al., 1997), which is consistent with the known regulation of the immune system by corticosteroids.

In conclusion, our study showed that DBDE was efficiently absorbed and distributed in pregnant rats. DBDE biotransformation resulted in the production of lower brominated

metabolites, namely octa- and nona-BDEs, as well as hydroxylated octa-BDE. Additional work is now necessary to determine the precise structure of the latter metabolite (debromination and hydroxylation positions). Both DBDE and its metabolites were able to cross the placental barrier in rat following *per os* administration. Some of these compounds could be endocrine disruptors. The major metabolites of DBDE will have to be produced in sufficient amounts in order to better understand their biological activity.

Acknowledgements

We wish to thank F. Blas-y-Estrada and R. Gazel for excellent technical support and express our appreciation for the financial support provided by the “Agence Française de Sécurité Sanitaire de l’Environnement et du Travail” (AFSSET, RD-2004-01), Région Midi-Pyrénées (APRTT, 2004-2005) and the “Ministère de l’Ecologie et du Développement Durable” (MEDD).

References

- Basso, E.; Marotta, E.; Seraglia, R.; Tubaro, M.; Traldi, P. On the formation of negative ions in atmospheric pressure photoionization conditions. *J Mass Spectrom.* 38: 1113-1115; 2003.
- Bezares-Cruz, J.; Jafvert, C. T.; Hua, I. Solar photodecomposition of decabromodiphenyl ether: product and quantum yield. *Environ Sci Technol.* 38: 4149-4156; 2004.
- Birnbaum, L. S.; Staskal, D. F. Brominated flame retardants: cause for concern? *Environ Health Perspect.* 112: 9-17; 2004.
- BSEF. BFR regulatory overview in Europe. Brussels: Bromine Science and Environmental Forum. 2003.
- Cariou, R.; Antignac, J. P.; Marchand, P.; Berrebi, A.; Zalko, D.; Andre, F.; Le Bizec, B. New multiresidue analytical method dedicated to trace level measurement of brominated flame retardants in human biological matrices. *J Chromatogr A.* 1100: 144-152; 2005.
- Chen, G.; Bunce, N. J. Polybrominated diphenyl ethers as Ah receptor agonists and antagonists. *Toxicol Sci.* 76: 310-320; 2003.
- Colborn, T. Neurodevelopment and endocrine disruption. *Environ Health Perspect.* 112: 944-949; 2004.
- Darnerud, P. O.; Eriksen, G. S.; Johannesson, T.; Larsen, P. B.; Viluksela, M. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environ Health Perspect.* 109: 49-68; 2001.
- Debrauwer, L.; Riu, A.; Jouahri, M.; Rathahao, E.; Jouanin, I.; Antignac, J. P.; Cariou, R.; Le Bizec, B.; Zalko, D. Probing new approaches using atmospheric pressure ionization for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1082: 98-109; 2005a.

- Debrauwer, L.; Riu, A.; Jouanin I., Zalko, D. Investigation of atmospheric pressure photoionization for the analysis of polybromodiphenylethers and their related biotic or abiotic degradation products. 53rd ASMS Conference, San Antonio, Texas; 2005b.
- EHC-162. Environment Health Criteria 162. Brominated diphenyl ethers. International program on chemical safety. Geneva, Switzerland: World Health Organisation.; 1994.
- El Dareer, S. M.; Kalin, J. R.; Tillery, K. F.; Hill, D. L. Disposition of decabromodiphenyl ether in rats dosed intravenously or by feeding. *Journal of Toxicol Environ Health*. 22: 405-415; 1987.
- Eriksson, P.; Viberg, H.; Jakobsson, E.; Orn, U.; Fredriksson, A. A brominated flame retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether: uptake, retention, and induction of neurobehavioral alterations in mice during a critical phase of neonatal brain development. *Toxicol Sci*. 67: 98-103; 2002.
- Gerecke, A. C.; Hartmann, P. C.; Heeb, N. V.; Kohler, H. P.; Giger, W.; Schmid, P.; Zennegg, M.; Kohler, M. Anaerobic degradation of decabromodiphenyl ether. *Environ Sci Technol*. 39: 1078-1083; 2005.
- Hallgren, S.; Sinjari, T.; Hakansson, H.; Darnerud, P. O. effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Arch Toxicol*. 75: 200-208; 2001.
- Hamers, T.; Kamstra, J. H.; Sonneveld, E.; Murk, A. J.; Kester, M. H.; Andersson, P. L.; Legler, J.; Brouwer, A. In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicol Sci*. 92: 157-173; 2006.
- Huwe, J. K.; Lorentzen, M.; Thuresson, K.; Bergman, A. Analysis of mono- to decabrominated diphenyl ethers in chickens at the part per billion level. *Chemosphere*. 46: 635-640; 2002.

- Jones-Otazo, H. A.; Clarke, J. P.; Diamond, M. L.; Archbald, J. A.; Ferguson, G.; Harner, T.; Richardson, G. M.; Ryan, J. J.; Wilford, B. Is house dust the missing exposure pathway for PBDEs? An analysis of the urban fate and human exposure. *Environ Sci Technol.* 39: 5121-5130; 2005.
- Kauppila, T. J.; Kotiaho, T.; Kostianen, R. Negative Ion-atmospheric pressure photoionisation-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 15: 203-211; 2004.
- Kierkegaard, A.; Lennart, B.; Tjarlund, U.; De Wit, C.; Jansson, B. Dietary uptake and biological effects of decabromodiphenyl ether in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol.* 33: 1612-1617; 1999.
- Lilienthal, H.; Hack, A.; Roth-Harer, A.; Grande, S. W.; Talsness, C. E. Effects of developmental exposure to 2,2,4,4,5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. *Environ Health Perspect.* 114: 194-201; 2006.
- Lindstrom, G.; Wingfors, H.; Dam, M.; Van Bavel, B. Identification of 19 polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) from the Atlantic. *Arch Environ Contam Toxicol.* 36: 355-363; 1999.
- Marsh, G.; Bergman, A.; Bladh, L. G.; Gillner, M.; Jakobsson, E. Synthesis of p-hydroxybromodiphenyl ethers and binding to the thyroid receptor. *Organohalog Compd.* 37: 305-308; 1998.
- Meerts, I. A. T. M.; Van Zanden, J. J.; Luijckx, E. A. C.; Van Leeuwen-Bol, I.; Marsh, G.; Jakobsson, E.; Bergman, A.; Brouwer, A. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicol Sci.* 56: 95-104; 2000.
- Meerts, I. A. T. M.; Letcher, R. J.; Hoving, S.; Marsh, G.; Bergman, A.; Lemmen, J. G.; Van Der Burg, B.; Brouwer, A. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers,

- hydroxylated PBDEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ Health Perspect.* 109: 399-407; 2001.
- Mörck, A.; Hakk, H.; Örn, U.; Klasson-Wehler, E. Decabromodiphenyl ether in the rat: absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Drug Metab Dispos.* 31: 900-907; 2003.
- Noren, K.; Meironyte, D. Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years. *Chemosphere.* 40: 1111-1123; 2000.
- Norris, J. M.; Kociba, R. J.; Schwetz, B. A.; Rose, J. Q.; Humiston, C. G.; Jewett, G. L.; Gehring, P. J.; Mailhes, J. B. Toxicology of octabromobiphenyl and decabromodiphenyl oxide. *Environ Health Perspect.* 11: 153-161; 1975.
- Örn, U.; Klasson-Wehler, E. Metabolism of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in rat and mouse. *Xenobiotica.* 28: 199-211; 1998.
- Riu, A.; Zalko, D.; Debrauwer, L. Study of polybrominated diphenyl ethers using both positive and negative atmospheric pressure photoionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 20: 2133-2142; 2006.
- Ross, P.; De Swart, R.; Addison, R.; Van Loveren, H.; Vos, J.; Osterhaus, A. Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: wildlife at risk? *Toxicology.* 112: 157-169; 1996a.
- Ross, P.; De Swart, R.; Van Loveren, H.; Osterhaus, A.; Vos, J. The immunotoxicity of environmental contaminants to marine wildlife: a review. *Ann Rev Fish Dis.* 6: 151-165; 1996b.
- Ross, P. S.; De Swart, R. L.; Van Der Vliet, H.; Willemsen, L.; De Klerk, A.; Van Amerongen, G.; Groen, J.; Brouwer, A.; Schipholt, I.; Morse, D. C.; Van Loveren, H.;

- Osterhaus, A. D.; Vos, J. G. Impaired cellular immune response in rats exposed perinatally to Baltic Sea herring oil or 2,3,7,8-TCDD. *Arch Toxicol.* 71: 563-574; 1997.
- Rowland, I. R. Reduction by the gut microflora of animals and man. *Biochem Pharmacol.* 35: 27-32; 1986.
- Sandholm, A.; Emanuelsson, B. M.; Klasson-Wehler, E. Bioavailability and half-life of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in rat. *Xenobiotica.* 33: 1149-1158; 2003.
- Schechter, A.; Pavuk, M.; Papke, O.; Ryan, J. J.; Birnbaum, L.; Rosen, R. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. mothers' milk. *Environ Health Perspect.* 111: 1723-1729; 2003.
- Schechter, A.; Papke, O.; Harris, T. R.; Musumba, A. Polybrominated diphenyl ether in the United States: levels in human blood and milk, food and environmental samples. *Organohalog Compd.* 2006.
- Sjodin, A.; Jones, R. S.; Focant J. F.; Lapeza, C.; Wang, R. Y.; McGahee, E. E.; Zhang, Y.; Turner, W. E.; Slazyk, B.; Needham, L. L.; Patterson, D. G. Retrospective time-trend study of polybrominated diphenyl ether and polybrominated and polychlorinated biphenyl levels in human serum from the United States. *Environ Health Perspect.* 112: 654-658; 2004.
- Stanley, J. S.; Cramer, P. H.; Thornburg, K. R.; Remmers, J. C.; Breen, J. J.; Schwemberger, J. Mass spectral confirmation of chlorinated and brominated diphenylethers in human adipose tissues. *Chemosphere.* 23: 1185-1195; 1991.
- Stapleton, H. M.; Alae, M.; Letcher, R. J.; Baker, J. E. Debromination of the flame retardant decabromodiphenyl ether by juvenile carp (*Cyprinus carpio*) following dietary exposure. *Environ Sci Technol.* 38: 112-119; 2004.

- Stapleton, H. M.; Dodder, N. G.; Offenberg, J. H.; Schantz, M. M.; Wise, S. A. Polybrominated diphenyl ethers in house dust and clothes dryer lint. *Environ Sci Technol.* 39: 925-931; 2005.
- Stapleton, H. M.; Brazil, B.; Holbrook, R. D.; Mitchelmore, C. L.; Benedict, R.; Konstantinov, A.; Potter, D. In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. *Environ Sci Technol.* 40: 4653-4658; 2006.
- Takasuga, T.; Senthilkumar, K.; Takemori, H.; Ohi, E.; Tsuji, H.; Nagayama, J. Impact of fermented brown rice with *Aspergillus oryzae* (FEBRA) intake and concentrations of polybrominated diphenylethers (PBDEs) in blood of humans from Japan. *Chemosphere.* 57: 795-811; 2004.
- Thomas, G. O.; Wilkinson, M.; Hodson, S.; Jones, K. C. Organohalogen chemicals in human blood from the United Kingdom. *Environ Pollut.* 141: 30-41; 2005.
- Thuresson, K.; Bergman, A.; Jakobsson, K. Occupational exposure to commercial decabromodiphenyl ether in workers manufacturing or handling flame-retarded rubber. *Environ Sci Technol.* 39: 1980-1986; 2005.
- Viberg, H.; Fredriksson, A.; Eriksson, P. Neonatal exposure to polybrominated diphenyl ether (PBDE 153) disrupts spontaneous behaviour, impairs learning and memory, and decreases hippocampal cholinergic receptors in adult mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 192: 95-106; 2003a.
- Viberg, H.; Fredriksson, A.; Jakobsson, E.; Orn, U.; Eriksson, P. Neurobehavioral derangements in adult mice receiving decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) during a defined period of neonatal brain development. *Toxicol Sci.* 76: 112-120; 2003b.

- Von Meyerinck, L.; Hufnagel, B.; Schmoldt, A.; Benthe, H. F. 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; 1990.
- Voorspoels, S.; Covaci, A.; Lepom, P.; Escutenaire, S.; Schepens, P. Remarkable findings concerning PBDEs in the terrestrial top-predator red fox (*Vulpes vulpes*). *Environ Sci Technol*. 40: 2937-2943; 2006.
- Watanabe, I.; Kashimoto, T.; Tatsukawa, R. Confirmation of the presence of the flame retardant decabromobiphenyl ether in river sediment from Osaka, Japan. *Bull Environ Contam Toxicol*. 36: 839-842; 1986.
- Yamamoto, H.; Okumura, T.; Nishikawa, Y.; Konishi, H. Determination of decabrodiphenyl ether in water and sediment samples by gas chromatography with electron capture detection. *J AOAC Int*. 80: 102-106; 1997.
- Zhou, T.; Taylor, M. M.; Devito, M. J.; Crofton, K. M. Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption. *Toxicol Sci*. 66: 105-116; 2002.

Figure captions

Fig. 1: Radioactivity distribution in digestive tract contents and in faeces (mean \pm SD, n = 3) (A), and typical radio-chromatogram corresponding to the organic fraction of faecal extracts (B).

Fig. 2: Radioactivity-based distribution of DBDE residues in tissues of pregnant Wistar rats dosed with [^{14}C]-DBDE from gestational days 16 to 19 (mean \pm SD, n = 3).

Fig. 3: Typical radio-chromatographic profiles obtained from tissues and foetuses of pregnant Wistar rats dosed with [^{14}C]-DBDE from gestational days 16 to 19.

Fig. 4: Negative APPI –MS analysis of M2: MS spectra for M2a isolated from faeces (A) and M2b from liver (B) extracts.

Fig. 5: Negative APPI-MS analysis of M3 isolated from liver extracts: MS spectrum (A) and MS/MS spectrum (B).

Table 1: Four-day metabolic balance study in pregnant Wistar rats force-fed with 2 mg.kg⁻¹ [^{14}C]-DBDE each day from gestational days 16 to 19.

Table 2: Distribution of the main metabolites of DBDE in the tissues of pregnant Wistar rats dosed with [^{14}C]- DBDE from gestational days 16 to 19. Results are based on radio-HPLC analysis of extractable residues (mean \pm SD, n = 3).

Table 3. Structure, HPLC data (retention times using the LC-MS system) and mass spectral data for DBDE metabolites M1, M2 (a and b) and M3.

Table 1.

	% of administered radioactivity	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (or $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) [^{14}C]-DBDE equivalents
faeces	66.29 ± 1.35	
digestive tract content	5.33 ± 1.50	
urine	0.11 ± 0.02	0.06 ± 0.01
adrenals	0.16 ± 0.05	33.03 ± 4.07
ovaries	0.13 ± 0.02	16.05 ± 2.91
liver	6.48 ± 1.03	11.16 ± 2.42
kidneys	0.29 ± 0.05	3.90 ± 0.48
stomach	0.20 ± 0.07	3.10 ± 0.46
small intestine	0.64 ± 0.15	2.81 ± 0.79
heart	0.08 ± 0.01	2.47 ± 0.36
lung	0.13 ± 0.02	1.93 ± 0.32
spleen	0.06 ± 0.01	1.82 ± 0.18
large intestine	0.16 ± 0.04	1.61 ± 0.27
plasma		1.53 ± 0.12
uterus	0.24 ± 0.09	1.39 ± 0.28
adipose tissue		0.79 ± 0.10
muscle		0.41 ± 0.05
brain	0.01 ± 0.00	0.11 ± 0.01
placentas	0.47 ± 0.05	2.48 ± 0.16
foetuses	0.43 ± 0.03 ^(a)	0.46 ± 0.05
amniotic fluid	0.02 ± 0.00	0.11 ± 0.01
carcass	9.23 ± 1.21	1.11 ± 0.05
cages	< 0.0002	

^(a)For the whole litter.

% of extractable [¹⁴C]	M1	M2	M3	M4	M5	M6
<i>Rt (min)</i>	<i>39</i>	<i>37</i>	<i>34.5</i>	<i>32</i>	<i>31</i>	<i>27.6</i>
Adrenals	0.7 ± 0.4	6.9 ± 1.3	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.4		
Ovaries	1.1 ± 0.3	8.8 ± 2.5	1.7 ± 0.6			
Liver	1.4 ± 0.2	6.7 ± 1.3	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.1		
Kidney	1.4 ± 0.1	20.9 ± 1.7	4.7 ± 0.1			
Placentas		10.3 ± 2.6	1.4 ± 0.2			
Plasma		11.3 ± 1.7	1.4 ± 0.1			
Uterus	1.4 ± 0.1	10.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1			2.9 ± 1.0
Adipose tissue		9.0 ± 2.5				10.8 ± 0.2
Foetus	1.6 ± 0.7	9.3 ± 1.0	1.6 ± 0.4		1.3 ± 0.2	
Carcass	16.6 ± 7.8	10.3 ± 0.5				2.0 ± 0.6

Table 2

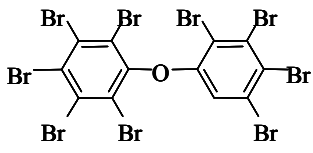
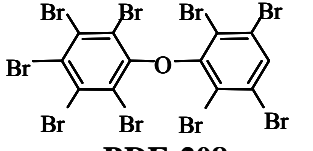
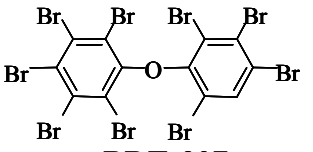
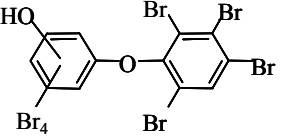
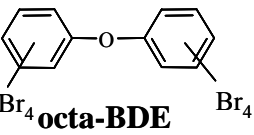
Metabolite	LC-MS R _T (min)	Structure	Quasi-molecular ion [M-Br+O] ⁻ or [M-H] ⁻ (most abundant ion)
M1	37.6	 <p style="text-align: center;">BDE-206</p>	<i>m/z</i> 816
M2a (from faeces)	35.5	<p style="text-align: center;">+</p>  <p style="text-align: center;">BDE-208</p>	<i>m/z</i> 816 M ⁺ <i>m/z</i> 878 (BDE-208)
		 <p style="text-align: center;">BDE-207</p>	<i>m/z</i> 816
M2b (from liver)	35.5	<p style="text-align: center;">+</p>  <p style="text-align: center;">HO-octa-BDE</p>	<i>m/z</i> 816
M3	32.4	 <p style="text-align: center;">Br₄ octa-BDE</p>	<i>m/z</i> 736

Table 3.

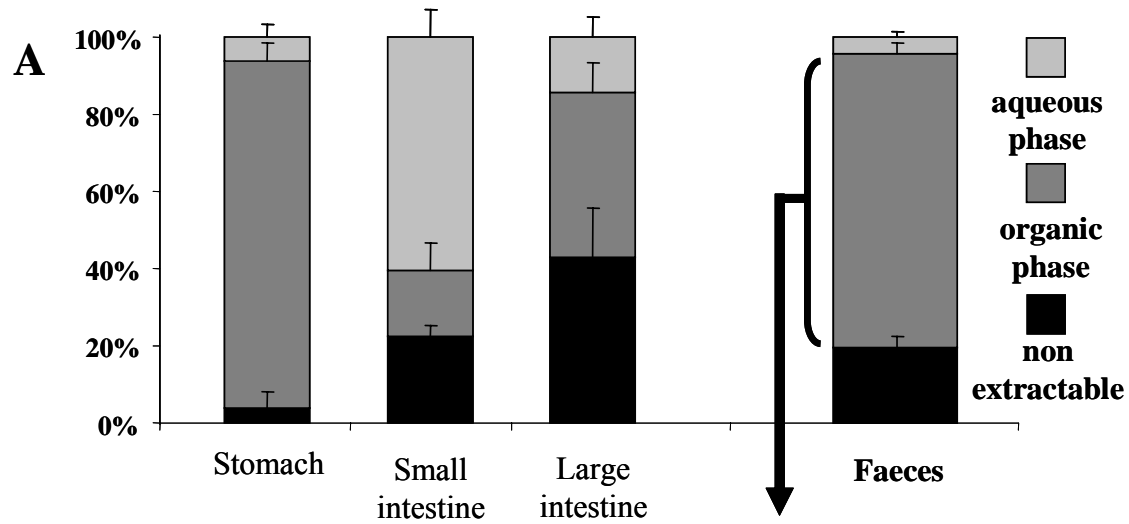
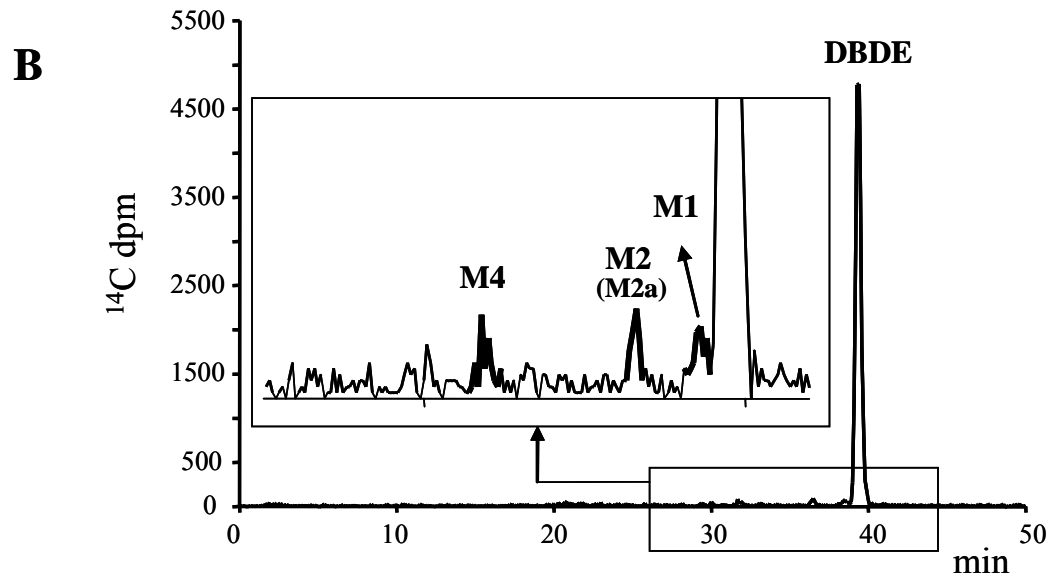


Fig. 1



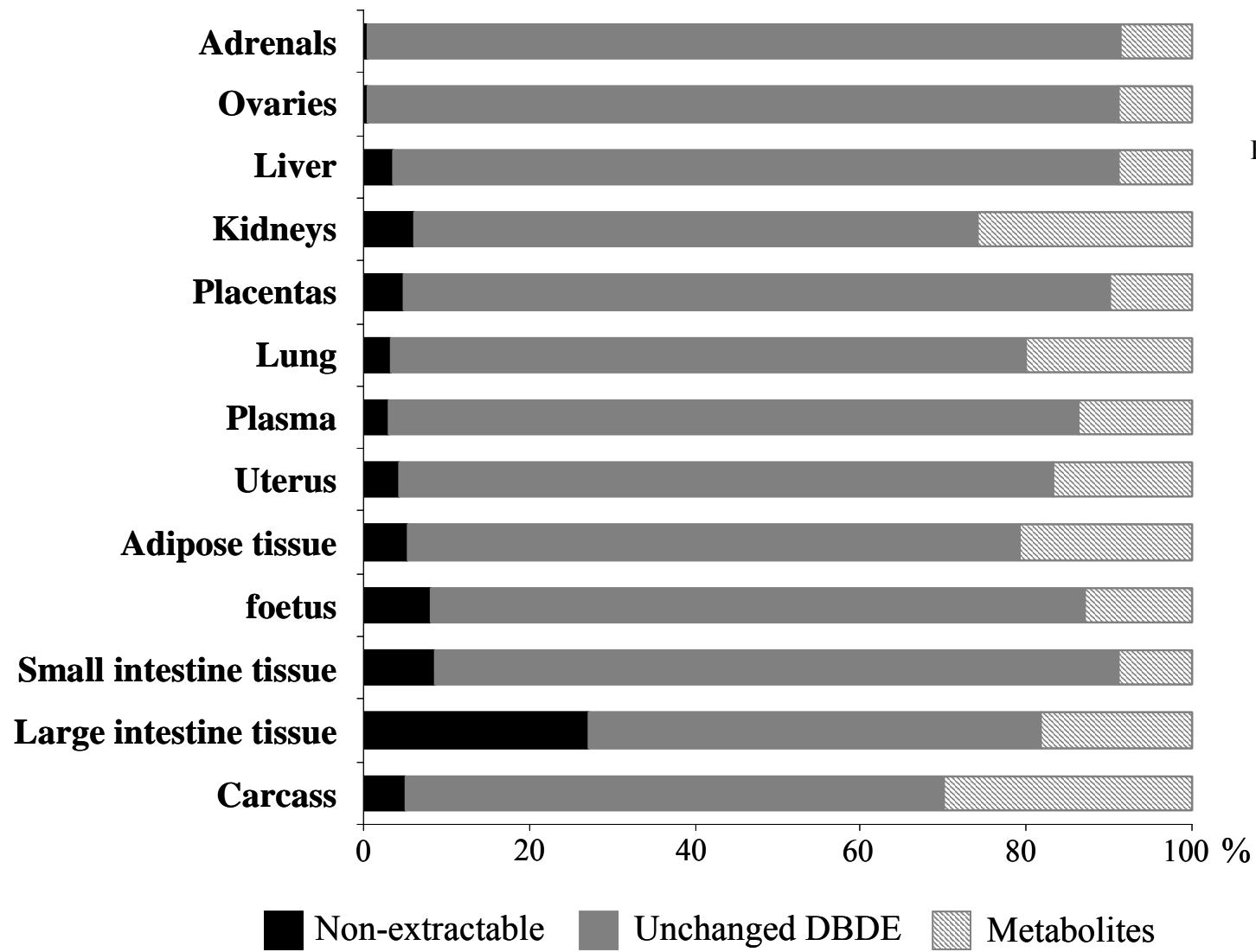


Fig. 2

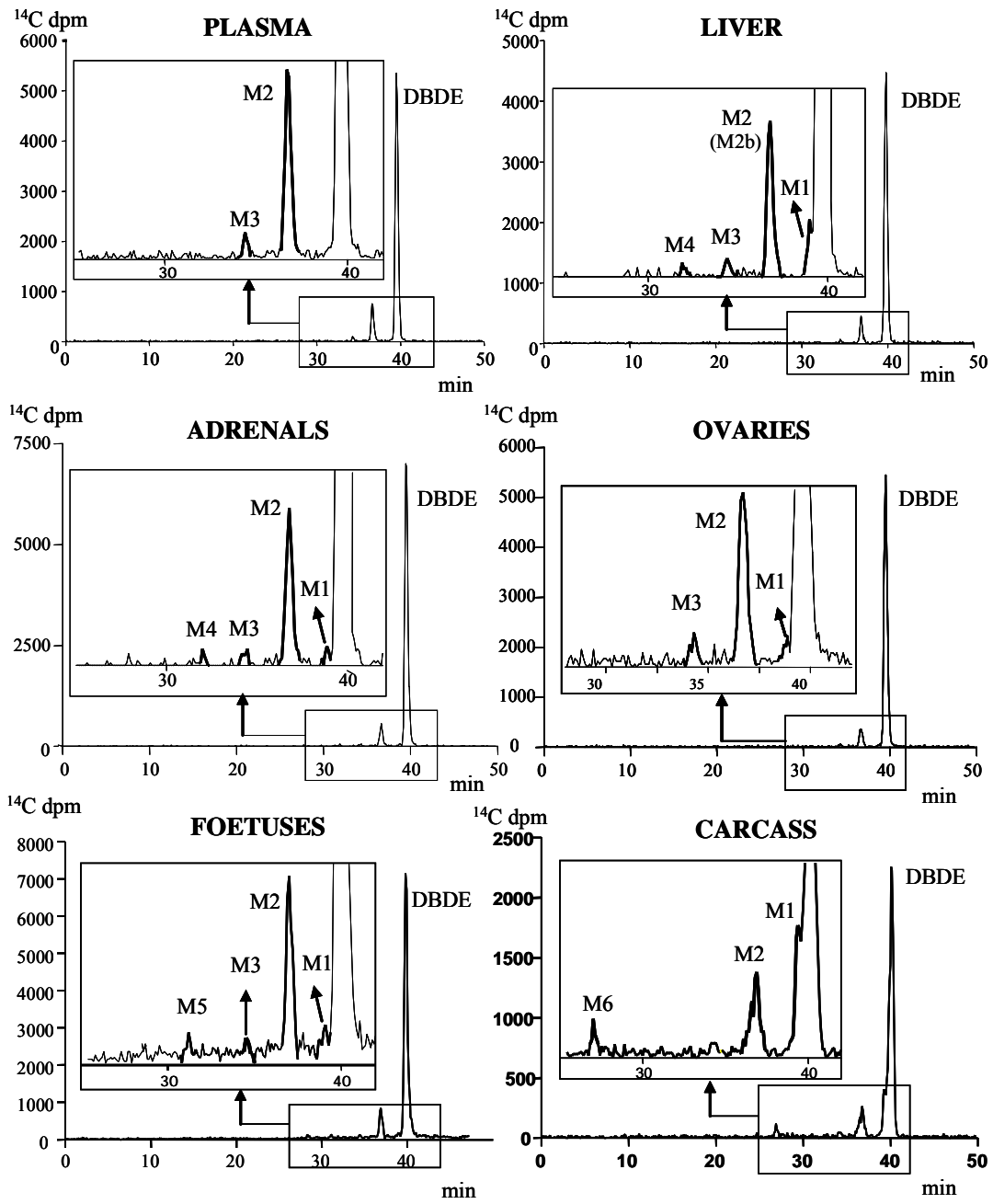


Figure 3

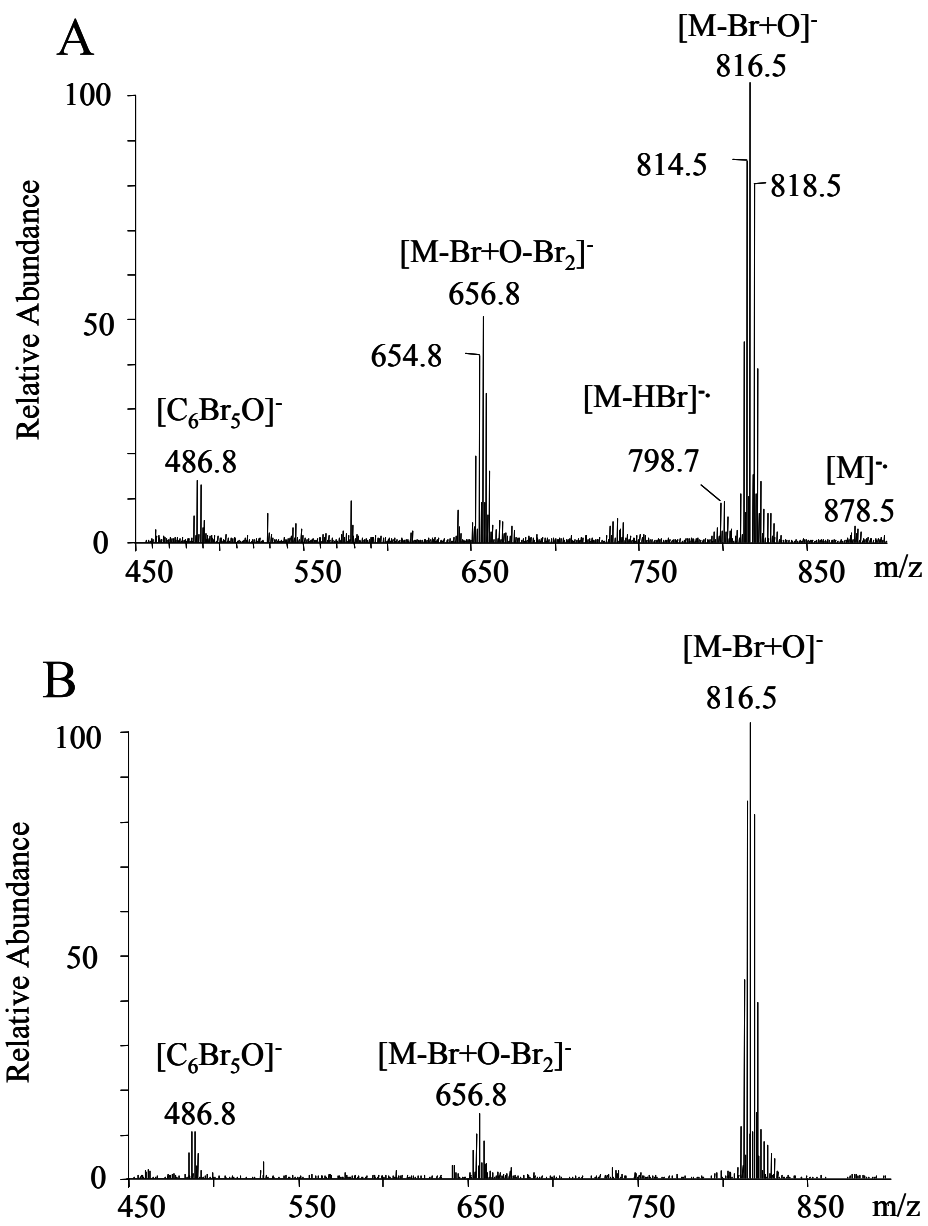


Figure 4

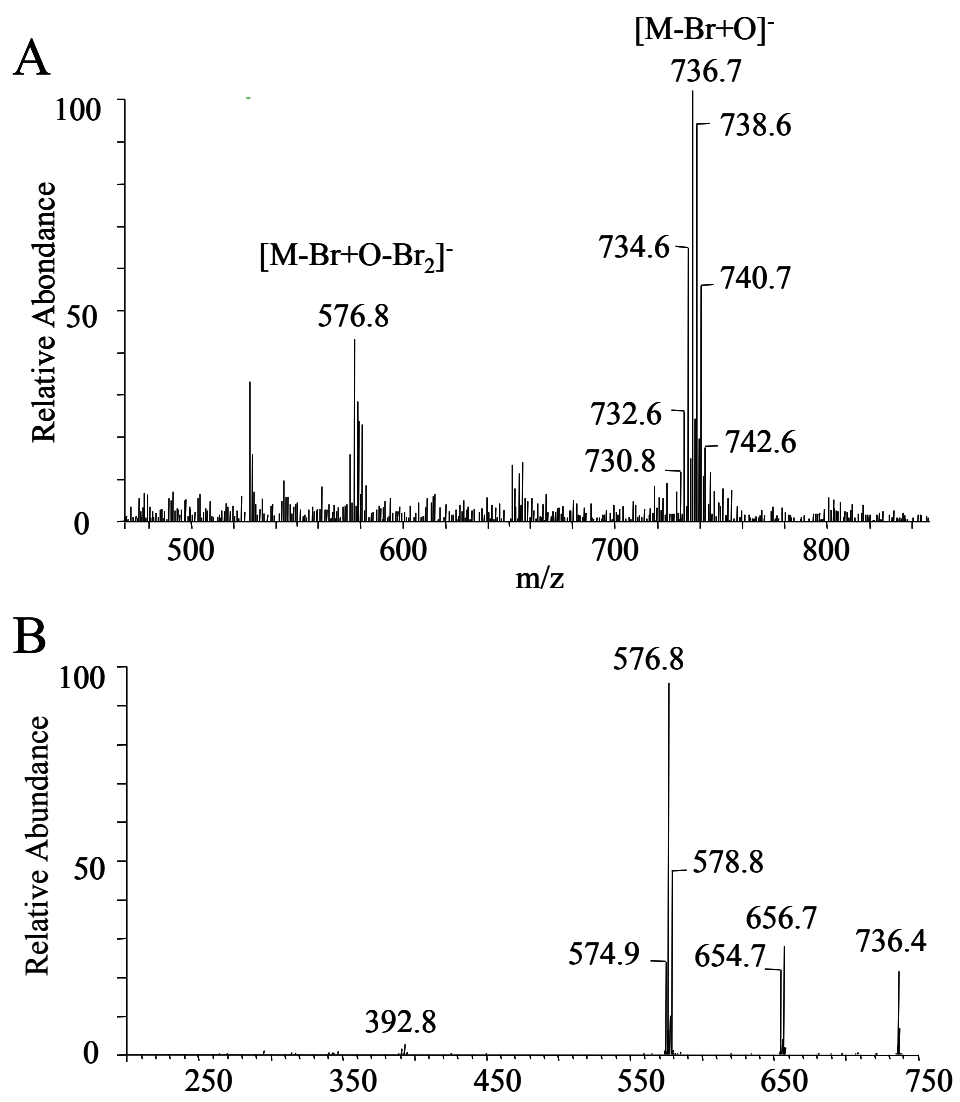


Figure 5

III. Conclusions

Aucune biotransformation du DBDE *in vitro*, n'a été détectée lors des incubations avec des fractions microsomales et subcellulaires hépatiques et avec des tranches de foie de rat Wistar. Cependant, ces résultats obtenus *in vitro* ne nous permettent pas de conclure définitivement en l'absence totale de métabolisme du DBDE, car compte tenu de l'approche adoptée (utilisation de [¹⁴C]-DBDE), nous ne pouvons pas exclure la formation de métabolites en très faible quantité, ni la possibilité que le DBDE puisse être métabolisé à des concentrations bien en dessous de 5 µM.

En revanche, le choix d'une étude basée sur l'utilisation de [¹⁴C]-DBDE d'une radio-pureté proche de 100 % a permis *in vivo* l'obtention de résultats déterminants concernant le devenir de ce RFB. L'étude réalisée chez des rates gestantes a démontré une absorption gastro-intestinale relativement élevée du DBDE avec la présence de concentrations résiduelles (DBDE et ses métabolites) importantes dans les glandes surrénales et les ovaires. Les biotransformations du DBDE chez le rat, résultent à la fois de la réduction du composé par débromation et de l'oxydation de certains des PBDE ainsi formés. De plus le passage transplacentaire de ce RFB et de la plupart de ses métabolites a été mis en évidence, démontrant chez le rat en fin de gestation, une exposition des fœtus *in utero*.

DISCUSSION GENERALE

Le TBBPA et le DBDE sont les deux retardateurs de flammes bromés les plus couramment utilisés dans le monde. Pour l'Union Européenne, le deca-mix reste le seul mélange de PBDE autorisé, l'utilisation des formulations commerciales penta-mix et octa-mix ayant été interdite depuis 2004. Les données bibliographiques concernant la biodisponibilité, le métabolisme et le potentiel toxique du TBBPA et du DBDE sont très limitées. Pourtant, on en retrouve des quantités substantielles dans différentes matrices biologiques humaines, en particulier pour ce qui est du DBDE. Plusieurs études ont montré que l'Homme était exposé quotidiennement à ces RFB par l'alimentation, mais également par l'inhalation et l'ingestion de poussières, pour lesquelles les teneurs en RFB sont importantes et en constante augmentation. On estime que l'exposition quotidienne de l'Homme est de l'ordre du ng/kg de poids corporel. La contamination du lait maternel par les RFB entraîne également une exposition quotidienne des nouveau-nés. Non seulement la contamination humaine est principalement due à l'ingestion de ces composés, mais la mise en évidence de la présence de PBDE dans le foie de fœtus humain, suggère également une exposition fœtale *in utero*.

Quelle que soit la matrice étudiée (environnement, animal, Homme), seuls les composés parents sont actuellement recherchés, conduisant à une sous-estimation des niveaux résiduels réels de RFB. Les produits de biotransformation ou de dégradation environnementale du TBBPA et du DBDE, connus seulement pour partie, ne sont presque jamais pris en compte. Dans l'environnement, des processus de dégradation photochimique et/ou bactérienne entraînent la débromation du TBBPA et du DBDE au profit de leurs congénères moins bromés (Arbeli et Ronen, 2003; Eriksson et al. 2004; Gerecke et al. 2005; Ahn et al. 2006). *In vivo*, ces RFB subissent également des biotransformations enzymatiques. Le TBBPA est considéré comme un polluant faiblement biodisponible compte tenu de son élimination rapide, et de son efficace métabolisation *in vivo*. Ce composé est en effet facilement conjugué puis excrété par voie biliaire chez le rat et chez l'Homme (Hakk *et al.* 2000; Schauer *et al.* 2006). Les produits de biotransformation du DBDE, un polluant organique persistant, sont eux difficilement quantifiables. En conséquence, aucun profilage des résidus tissulaires comprenant les métabolites n'avait pu être réalisé avant notre travail. La formation par débromation de PBDE moins bromés que le composé parental, a été démontrée *in vivo* chez le poisson et chez le rat, mais également suggérée récemment chez l'Homme (Morck *et al.* 2003; Stapleton *et al.* 2004; Thuresson *et al.* 2005). Or, pour les différentes matrices analysées, il est difficile d'évaluer quelle est la proportion de PBDE détectée qui est attribuable à la biotransformation du DBDE *in vivo*, et quelle est celle qui est due à une exposition directe à des mélanges de PBDE moins bromés. Chez le rat, il a été démontré que

le DBDE pouvait également être oxydé et donner des métabolites hydroxylés et/ou méthoxylés. Il semblerait que ces métabolites puissent être également présents chez l'Homme (Bergman *et al.*, 2006) Les études de métabolisme des PBDE décrites dans la littérature concernent parfois des mélanges commerciaux, et, dans le cas de composés isolés, la pureté du produit utilisé n'est pas précisée, ce qui complique considérablement l'interprétation des résultats. La distribution et la quantification des métabolites de ces RFB dans les tissus, tout comme leurs voies de biotransformation et la possibilité d'une exposition fœtale ont été peu ou pas documentées, que ce soit chez l'Homme ou chez l'animal. Dans ce travail de thèse les études de métabolisme de ces RFB, *in vitro* et *in vivo*, ont été réalisées grâce à des molécules radio-marquées ayant une pureté proche de 100 %. Des méthodes analytiques spécifiques ont été développées pour permettre l'élucidation des voies de biotransformation du TBBPA et du DBDE. Ces méthodes ont également permis de quantifier sans équivoque et pour la première fois (obtention de profils métaboliques), les composés parents et leurs métabolites à la fois détectés dans les tissus maternels et dans les fœtus, lors des études *in vivo* réalisées chez des rates gestantes. Les doses utilisées lors de nos travaux correspondaient aux doses minimales que nous pouvions administrer aux animaux pour obtenir des profils métaboliques tissulaires en radio-CLHP, compte tenu des limites imposées par l'activité spécifique des composés radio-marqués utilisés.

Les études de métabolisme *in vivo* du TBBPA et du DBDE réalisées chez le rongeur en fin de gestation ont montré que le devenir de ces deux retardateurs de flammes bromés était différent. Il est important de mentionner que les doses de DBDE et de TBBPA administrées aux animaux par voie orale, étaient relativement élevées comparées aux doses auxquelles l'Homme est exposé quotidiennement. Nos résultats montrent que la biodisponibilité du DBDE est relativement élevée chez le rat avec une absorption du composé proche de 20 %. Celle du TBBPA est difficilement évaluable compte tenu du protocole que nous avons choisi, ainsi que des faibles niveaux tissulaires détectés. Nous avons montré que sur une période de 96 h, plus de 85 % de la dose administrée étaient localisés dans les fèces et que seulement 0,3 % de la radioactivité demeuraient dans les tissus, à la fin de l'étude. Nos résultats confirment donc que ce composé est rapidement éliminé, en accord avec les travaux de Hakk *et al.* (2000). Ces auteurs, en plus des bilans métaboliques réalisés chez des rats conventionnels, ont montré chez des animaux dont le canal cholédoque avait été canulé, que plus de 70 % de la dose de [¹⁴C]-TBBPA administrée par voie orale étaient excrétés dans la bile en 72 h, et que 80 % de la radioactivité étaient présents sous la forme de métabolites, démontrant ainsi une

absorption et une métabolisation considérable de ce RFB *in vivo* chez le rat. La métabolisation du TBBPA résultait exclusivement de la conjugaison du composé parent, puis les conjugués produits étaient très majoritairement hydrolysés dans le tube digestif pour redonner du TBBPA retrouvé dans les fèces. Compte tenu de l'existence de ces travaux avant le début de cette thèse, nous avons pour notre part choisi de privilégier le profilage métabolique des résidus tissulaires du TBBPA, ainsi que la quantification d'un possible passage transplacentaire de ce RFB. Bien que nous n'ayons pas étudié pour cette raison l'excrétion biliaire des résidus du [¹⁴C]-TBBPA, nos résultats, avec notamment la mise en évidence par CLHP de plusieurs métabolites polaires présents dans les extraits du contenu de l'intestin grêle (probablement des conjugués) confortent ceux de Hakk et ses collaborateurs. La conjugaison de l'un ou des deux groupement phénols du TBBPA, qui se produit également chez l'Homme (Schauer *et al.*, 2006) semble donc être la voie majeure de métabolisation du TBBPA *in vivo*.

Les résultats que nous avons obtenus concernant l'absorption du DBDE confortent ceux de deux études précédentes (Morck *et al.*, 2003; Sandholm *et al.*, 2003). Ils confirment pour la troisième fois que la biodisponibilité du DBDE administrée par voie orale est importante chez le rongeur (absorption proche de 20 %), démontrant sans ambiguïté que les études plus anciennes (Norris *et al.*, 1975; El Dareer *et al.*, 1987), faisant état d'une absorption inférieure à 1 %, ne doivent plus être prises en compte pour l'évaluation du risque lié au DBDE. Dans ces études, trop souvent prises comme référence pour justifier d'une hypothétique innocuité du DBDE, soit les résultats ne sont pas détaillés (Norris *et al.*, 1975), soit les auteurs tirent des conclusions hâtives malgré le manque d'analyses effectuées. Morck *et al.* (2003) annonçaient que l'absorption du DBDE chez le rat Sprague Dawley était de l'ordre de 10 %, mais concluaient qu'elle était probablement supérieure, parce qu'une importante proportion (65 %) de la radioactivité présente dans les fèces (voie majeure d'élimination de ce composé) était détectée sous forme de métabolites. Non seulement notre étude et celles de Morck *et al.* et Sandholm *et al.* concluent à une absorption du DBDE chez le rat de l'ordre de 10 à 26 %, mais les doses utilisées pour les trois études étaient voisines de 2 mg/kg. Or, on peut penser qu'à des doses moins importantes, l'absorption du DBDE pourrait être supérieure à celle constatée (Wong *et al.*, 2006). Le rapport entre exposition et concentration dans le sang est nettement plus important chez l'Homme que chez le rat (facteur 20). En effet, la contamination moyenne du sérum humain, mesurée chez l'Homme (Fischer *et al.*, 2006) est d'environ 20 pg/mL, alors que les niveaux d'exposition pour la totalité des PBDE (dont un tiers correspond au DBDE) ont été estimés à quelques ng/kg par la même équipe. Il est donc

vraisemblable que la biodisponibilité du DBDE chez l'Homme, dans les conditions « réelles » d'exposition, soit supérieure à celle observée chez le rat dans nos conditions expérimentales. Notons également que l'exposition au DBDE est plus importante chez le nourrisson élevé au lait maternel (12 ng/kg/jour) que chez l'adulte (Fischer *et al.*, 2006).

Chez le rat, la distribution des résidus du [¹⁴C]-DBDE s'est avérée être large, avec près de 10 % de la radioactivité administrée retrouvés dans les tissus. Environ 9 % de cette radioactivité demeuraient dans la carcasse après 4 jours consécutifs de traitement. Contrairement aux PBDE de faible poids moléculaire (tétraBDE) (Orn et Klasson-Wehler, 1998), ni le DBDE ni ses métabolites n'ont tendance à s'accumuler dans le tissu adipeux, comme le montrent les niveaux résiduels mesurés au cours de notre étude. La majorité de la radioactivité administrée a été retrouvée dans le foie, qui constitue un tissu cible pour ce RFB chez le rat. Cependant, les concentrations résiduelles les plus importantes ont été retrouvées dans des glandes endocrines: les surrénales et les ovaires. L'accumulation sélective du DBDE dans les glandes surrénales avait déjà été constatée par Morck *et al.* (2003). Notre étude, menée chez des rates gestantes, confirme sans équivoque ces résultats, et démontre pour la première fois l'accumulation des résidus de ce RFB dans les ovaires. Cette concentration au niveau des glandes endocrines ne semble pas être exclusive au DBDE. En particulier, pour les glandes surrénales, elle pourrait survenir pour la majorité des PBDE. Elle a notamment été constatée chez la souris concernant les BDE-47, 85 et 99 (Darnerud et Risberg, 2006). Notre étude démontre également pour la première fois le passage du DBDE et de la plupart de ses métabolites au travers de la barrière placentaire chez le rat, avec près de 0,5 % de la radioactivité détectés dans les fœtus, pour l'ensemble de la portée. Il est impossible d'extrapoler directement ces résultats à l'Homme, cependant la placentation chez le rat, en fin de gestation, est histologiquement proche de celle chez l'humain (de type chorio-allantoïdienne, avec une nutrition histiotrophique de l'embryon). Par conséquent, l'hypothèse du passage transplacentaire du DBDE et de ses résidus chez l'Homme paraît vraisemblable. Elle est par ailleurs considérablement renforcée par la démonstration récente de la présence du DBDE dans le foie de fœtus humain (Schechter *et al.*, 2006).

Les méthodes analytiques développées lors de ce travail de thèse ont conduit, pour la première fois, à l'obtention des profils métaboliques tissulaires du DBDE, par CLHP couplée à la détection en ligne de la radioactivité. La séparation du DBDE de ses produits de biotransformation et l'utilisation d'une molécule radio-marquée ayant une pureté proche de 100 % ont permis de quantifier la proportion de métabolites présents dans les différents tissus analysés. La totalité des produits de biotransformation du DBDE chez le rat Wistar a été

évaluée pour notre étude à plus de 7 % de la dose totale reçue par les animaux. L'identification des métabolites en LC-APPI-MS et RMN montre que les biotransformations du DBDE *in vivo* sont issues de processus de réduction et d'oxydation enzymatiques, conduisant à des PBDE substitués au minimum de 7 atomes de brome et dont certains sont présents sous forme hydroxylée. Contrairement aux résultats décrits par Morck *et al.* faisant état de la présence de 65 % de métabolites dans les fèces, nos résultats indiquent que seule une très faible proportion de la radioactivité fécale (3 %) est associée à des métabolites. Les trois congénères de nonaBDE existants, issus de la réduction enzymatique du DBDE ont néanmoins été identifiés à partir des extraits fécaux. Les incubations du DBDE *in vitro* réalisées avec du contenu digestif en conditions d'anaérobiose ont démontré qu'aucune biotransformation du DBDE n'avait lieu dans ces conditions, permettant d'infirmier l'hypothèse de la réduction du DBDE par la microflore intestinale. La différence observée entre nos résultats et ceux de Morck *et al.* pourrait être imputée soit à la souche de rats utilisée, (Wistar dans notre étude et Sprague Dawley pour l'étude précédente), soit à une activité réductrice prononcée de la microflore intestinale des rats utilisés par ces auteurs. On sait par ailleurs que la flore bactérienne peut varier en fonction de l'alimentation des rats (Rowland, 1986) ce qui pourrait être un autre élément d'explication.

Dans les extraits tissulaires, près de 10 % de la radioactivité sont associés à des métabolites. La majeure partie des métabolites tissulaires correspond à un nonaBDE (BDE-207) et à un octaBDE hydroxylé, coéluant au même temps de rétention et dont la proportion exacte sous le pic radioactif détecté est inconnue. Un métabolite minoritaire, dont la structure n'a pu être identifiée, a été uniquement détecté dans les extraits fœtaux, suggérant la prise en charge de résidus ayant traversé la barrière placentaire par les enzymes du métabolisme, qui sont pour partie fonctionnelles chez les fœtus de rat en fin de gestation (Chow et Fischer, 1987; Miller *et al.*, 1982). Ces résultats indiquent donc que le DBDE pourrait être biotransformé à la fois chez la mère et chez le fœtus. Compte tenu de l'absence de métabolisation détectable en radio-CLHP lors des incubations *in vitro* du DBDE réalisées avec différents systèmes d'essais (fractions subcellulaires hépatiques et tranches de foie de rat), à la concentration de 5 μM , il nous a été impossible de préciser le mécanisme et la cinétique de formation des métabolites du DBDE. Une étude récente a démontré que le DBDE pouvait être métabolisé *in vitro* avec des fractions microsomales de foie de poisson, résultant en la formation de PBDE de faible poids moléculaire (Stapleton *et al.*, 2006). Les concentrations utilisées dans cette étude étaient très faibles (15 nM). La stratégie adoptée dans notre étude avec des analyses en radio-CLHP au moyen de molécules radio-marquées, ne permet pas de réaliser de telles incubations.

Malgré l'optimisation de l'activité spécifique maximale du DBDE que nous avons synthétisé, la faible activité spécifique du substrat de départ disponible dans le commerce, le [¹⁴C]-diphényle éther, constitue une limite certaine dans ce domaine. Sur la base des méthodologies développées au cours de la thèse, on pourrait envisager de réaliser des incubations identiques avec des concentrations de DBDE plus faibles (< 1 µM), puis d'identifier les métabolites formés en LC-APPI-MS, en s'appuyant également sur les résultats déjà obtenus *in vivo* (temps de rétention et structure des métabolites connus). Cependant, la quantification des métabolites présents nécessiterait d'optimiser les paramètres d'analyse, et de développer une méthode de dosage par LC-MS.

L'APPI s'est avérée être une méthode de choix pour l'analyse des PBDE, et plus particulièrement pour les congénères fortement bromés, en spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide. Contrairement à la GC-MS (technique d'analyse couramment utilisée pour ces composés), l'ionisation APPI n'entraîne pas de dégradation par débromation du DBDE, permettant de ne pas le confondre avec ses congénères substitués avec 9 atomes de brome. De plus, la méthode de chromatographie liquide couplée à l'APPI-MS que nous avons développée pendant ce travail de thèse, permet d'identifier directement le DBDE et ses métabolites formés *in vivo*, à partir de matrices biologiques complexes. Nous avons cependant rencontré de nombreux problèmes dus au manque de maîtrise de cette nouvelle technique d'ionisation. Les PBDE de haut poids moléculaire s'ionisent en APPI en mode négatif selon un processus de substitution d'un atome de brome par un atome d'oxygène présent dans la source, et les métabolites hydroxylés sont ionisés par la perte d'un proton, comme cela été observé sur des PBDE hydroxylés standards. Ceci conduit, pour des composés de structures différentes, à deux ions chargés négativement, de masse identique. Dans ces conditions, l'APPI ne nous permet pas de faire la différence entre les métabolites du DBDE formés (par exemple, l'octaBDE hydroxylé et le nonaBDE), en l'absence d'une dérivation préalable des métabolites hydroxylés, qui a été développée en fin de thèse.

Contrairement au DBDE, les niveaux résiduels tissulaires de TBBPA mesurés 24 h après la dernière administration du produit sont très faibles, aussi bien chez la mère que chez les fœtus. Le passage transplacentaire du TBBPA apparaît être très limité chez le rat, et 4 jours de traitement à la dose de 190 µg/kg ne se traduisent que par une exposition fœtale mineure. Seule une faible proportion du [¹⁴C]-TBBPA administré est retrouvée dans les excréta ou les tissus sous la forme de métabolites qui sont des produits de conjugaison de la molécule, confirmant les précédents résultats (Hakk *et al.* 2000). Ce type de biotransformation est

généralement impliqué dans les voies de détoxification des xénobiotiques chez les mammifères. Aucune débromation du TBBPA n'a été observée malgré le développement de systèmes CLHP permettant de séparer les mono-, di- et tribromoBPA, et aussi malgré l'utilisation d'une molécule radio-marquée d'une pureté proche de 100 %. Szymanska et al. (2001) avaient précédemment décrit la présence de tribromoBPA (10 %) dans les extraits fécaux chez le rat. Il faut rester prudent à l'égard de ces résultats, car la pureté du TBBPA radio-marqué utilisé lors de cette étude n'a pas été précisée. Le TBBPA peut perdre des atomes de brome lorsqu'il est exposé à la lumière ou être débromé dans l'environnement (Eriksson et al. 2004). Cependant aucun de nos résultats, que ce soit *in vivo* ou *in vitro* ne permet de conclure à une déhalogénéation de ce RFB chez le rat. Le faible potentiel de bioaccumulation du TBBPA avait été montré chez le poisson (WHO, 1995). Nos résultats permettent de supposer qu'il en est de même chez le rat, compte tenu des très faibles niveaux résiduels tissulaires détectés *in vivo*. Ceci conforte le point de vue général quant au TBBPA, qui, n'étant pas considéré comme bioaccumulable ou persistant, est le plus souvent présenté comme un RFB potentiellement peu toxique, en comparaison avec, par exemple, les PBDE (Birnbaum et Staskal, 2004; de Wit, 2002). C'est notamment pour cela que ce composé est rarement recherché lors du dosage de RFB à partir de matrices biologiques humaines. Pourtant, malgré une élimination supposée rapide, quand le TBBPA est dosé chez l'Homme il est systématiquement retrouvé (Thomsen *et al.* 2002; WWF, 2004; Cariou *et al.* 2005). Ces résultats suggèrent donc une exposition régulière au TBBPA. Peut-on, sur les bases de connaissances actuelles, la considérer comme sans conséquence en termes de santé humaine? Les études *in vitro* réalisées durant cette thèse, avec des fractions subcellulaires hépatiques de rat et d'Homme, mais également avec des granulocytes neutrophiles humains, démontrent que ce n'est pas le cas. *In vitro*, le TBBPA est très efficacement métabolisé. Contrairement à ce qui est observé *in vivo*, les voies d'oxydation prédominent. Les voies de biotransformations du TBBPA *in vitro* ont été déterminées comme étant dépendantes des cytochromes P450 présents dans le foie, résultant en la formation de métabolites polaires issus du clivage oxydatif de la molécule, mais également à l'origine de la formation de composés apolaires. Le mécanisme de formation de ces métabolites moins hydrosolubles reste encore mal connu. La formation enzymatique d'un intermédiaire chimiquement instable, n'ayant pu être piégé, pourrait être à l'origine du clivage oxydatif de la molécule. L'absence de métabolites hydroxylés comportant 3 atomes de brome, implique que l'intermédiaire formé, potentiellement réactif, ne proviendrait pas d'une déhalogénéation oxydative, mais d'un mécanisme qui reste encore à déterminer. Les métabolites polaires issus du clivage oxydatif

du TBBPA ont été identifiés sous forme hydroxylés (dibromo-phénol hydroxylé: M1 et dibromo-isopropyle phénol hydroxylé: M3 et M5), suggérant la formation préalable d'espèces chimiques réactives, stabilisées par l'hydroxylation de la molécule. L'identification d'un métabolite minoritaire conjugué au glutathion (M4) renforce l'hypothèse de la présence de métabolites intermédiaires électrophiles potentiellement réactifs. Les métabolites du TBBPA *in vitro* observés lors des incubations réalisées avec des granulocytes humains, sont similaires, mais leur formation est dépendante de la myéloperoxydase (MPO) et non des cytochromes P450. La MPO a besoin de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour fonctionner, ce dernier étant formé à partir de l'anion superoxyde (O₂⁻) transformé à partir de l'oxygène présent dans les cellules, par la NADPH oxydase. Les granulocytes neutrophiles sont des cellules « tueuses » activées à l'occasion d'une réponse immunitaire pour former des espèces réactives de l'oxygène (ROS). En présence de bactéries ou de composés exogènes, la myéloperoxydase granulocytaire utilise le peroxyde d'hydrogène et le chlore présents dans la cellule pour former l'acide hypochloreux (HOCl) qui détruira la cible (Utrecht, 1992). Ce processus peut, dans certains cas, contribuer à l'oxydation de xénobiotiques, comme par exemple pour des médicaments (procainamide), responsables de processus iatrogènes (O'Brien, 2000). Le TBBPA est un puissant inducteur de la formation de ROS dans les granulocytes, par activation de la NADPH oxydase (Reistad *et al.*, 2005). L'activation de cette enzyme par le TBBPA libère la myéloperoxydase encapsulée dans les granulocytes quiescents. Combinée au peroxyde d'hydrogène et en présence de chlore, la MPO est capable d'oxyder le TBBPA. L'utilisation d'inhibiteurs de la NADPH oxydase empêche la biotransformation du TBBPA dans les granulocytes humains. Les produits de biotransformation obtenus par ces voies enzymatiques sont, comme pour les fractions hépatiques, des métabolites polaires (M3) produits par le clivage oxydatif du TBBPA, mais également des métabolites apolaires (M7a). Contrairement aux incubations réalisées avec des fractions subcellulaires de foie, on n'observe pas la formation de conjugués. Par contre, aussi bien pour M3 que pour M7a, des métabolites où un atome de brome avait été substitué par un atome de chlore ont été également identifiés. L'observation de ces métabolites chlorés dans les incubations du TBBPA avec des granulocytes humains est particulièrement intéressant, car ce type d'halogénéation est caractéristique des voies de métabolisation dépendantes de la MPO.

Le TBBPA, RFB présent dans le sang humain chez les Européens, est un activateur très efficace de la NADPH oxydase des granulocytes neutrophiles, et un inducteur puissant, *in vitro*, de la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Nos résultats montrent qu'il provoque la libération de la MPO granulocytaire, conduisant à sa métabolisation par des processus

oxydatifs. Pour les incubations réalisées avec son analogue non bromé, le BPA, un plastifiant qui figure parmi les xéno-œstrogènes majeurs en termes de production, aucune métabolisation n'est observée. Des résultats préliminaires obtenus en fin de thèse ont montré que l'oxydation du BPA pouvait pourtant se produire, lorsque des incubations *in vitro* étaient réalisées sans cellules, en l'unique présence de MPO et de H₂O₂, démontrant que cette enzyme peut prendre en charge le BPA, lorsqu'elle est libérée des granulocytes. Les métabolites du BPA observés étaient identiques à ceux préalablement identifiés après des incubations *in vitro* réalisées avec des fractions subcellulaires de foie (Jaeg *et al.*, 2004). L'oxydation du BPA produit, entre autres, du catéchol BPA, métabolite qui est capable (comme les catéchols d'œstrogènes naturels) de générer des espèces réactives entraînant la formation d'adduits à l'ADN *in vitro* (Atkinson et Roy, 1995a) et *in vivo* chez la souris (Atkinson et Roy, 1995b). Dans le cas particulier du BPA, il serait donc intéressant de réaliser de nouvelles incubations avec des granulocytes humains activés par une faible concentration de TBBPA. On peut formuler l'hypothèse que dans ce cas la MPO serait libérée, et que des biotransformations du BPA seraient observées. D'un point de vue plus général, ces résultats méritent de plus amples investigations, compte tenu de la présence de nombreux xénobiotiques dans le sang chez l'Homme. Ainsi, le TBBPA pourrait en théorie exercer des effets toxiques chez l'Homme, causés directement par ses produits de biotransformation, mais sa toxicité pourrait également être indirecte, *via* la stimulation du stress oxydant dans ces cellules sanguines, et l'induction de la métabolisation d'autres xénobiotiques. Or, pour beaucoup de contaminants majeurs de la chaîne alimentaire régulièrement détectés dans le sang humain (BPA, PCB...), la formation de métabolites oxydés constitue une étape clef pour l'expression du potentiel toxique. Ces mécanismes sont également soupçonnés pour de nombreux médicaments responsables d'incidents iatrogènes. La problématique de l'implication du TBBPA dans la formation d'espèces réactives de l'oxygène apparaît donc importante à considérer, d'autant que ce RFB n'est pas le seul inducteur de ROS dans les granulocytes humains. Il a été montré que les PCB comme les PBB, pouvaient également provoquer un stress oxydant dans ces cellules sanguines et ainsi entraîner la libération de MPO (Brown *et al.*, 1998; Kristoffersen *et al.*, 2002).

Les concentrations de TBBPA que nous avons utilisées dans les incubations *in vitro* réalisées avec des granulocytes sont nettement supérieures à celles que l'on peut détecter dans le sérum sanguin humain. Rapporté au nombre de cellules, la plus faible utilisée (1 µM) était supérieure d'un facteur voisin de un million aux concentrations circulantes détectées chez l'Homme. Il est possible que les biotransformations observées *in vitro*, soient plus

importantes à l'échelle humaine (proportion de métabolites formés) compte tenu des faibles concentrations de TBBPA dans le sang circulant (0,5 pg/mL de sérum). Malgré, la faible biodisponibilité du TBBPA *in vivo*, nos résultats observés *in vitro* indiquent qu'il faut rester prudent avant de conclure définitivement à l'innocuité de ce composé.

Les données relatives aux effets biologiques du TBBPA sont très limitées. Aucune n'est actuellement disponible pour le DBDE, seuls des PBDE de moindre poids moléculaire ayant été étudiés. Nous avons mis en évidence de nombreux métabolites, formés *in vitro* pour le TBBPA, et *in vivo* pour le DBDE. Certains de ces produits de biotransformation pourraient être biologiquement actifs. Les méthodes séparatives développées lors de ce travail ont permis de purifier certains métabolites en quantité suffisante, et de les tester en utilisant des lignées cellulaires bioluminescentes exprimant certains récepteurs (ER, PXR, AhR). Ce travail, effectué en collaboration avec l'unité 540 de l'INSERM à Montpellier, a conduit à de premiers résultats concernant le TBBPA. Pour ce RFB, une réponse négative (absence d'activation) pour les ER a été constatée. De même, le TBBPA et ses métabolites n'ont pas été capables d'activer les récepteurs PXR et AhR sur les lignées cellulaires correspondantes. Concernant les lignées ER, nous avons également testé l'activité biologique du monobromo-, du dibromo- et du tribromoBPA, puisque nous supposons au départ qu'il pourrait s'agir de métabolites formés suite à la débromation du TBBPA *in vivo* et/ou *in vitro*. Il a été observé que plus le nombre d'atomes de brome présents sur la molécule augmente, plus le potentiel oestrogénique de ces composés diminue, en accord avec les travaux de Meerts *et al.* (2001) qui avaient démontré le faible potentiel oestrogénique du TBBPA, en comparaison du BPA.

A l'inverse, lors des tests réalisés sur des cellules exprimant le récepteur PPAR γ , nous avons constaté une activation par le TBBPA, celle-ci diminuant graduellement avec le nombre d'atomes de brome présents (TBBPA > tribromoBPA > dibromoBPA > monobromoBPA > BPA). Les métabolites apolaires (mélange de M7a et M7b) ont également montré une activité PPAR γ . Les récepteurs PPAR γ sont impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique et dans le contrôle de la glycémie. Ligands de ce type de récepteur, le TBBPA et ses métabolites apolaires pourraient donc interférer dans le processus de stockage des graisses et être impliqués dans le développement de différentes pathologies, pouvant être associées au dérèglement de ce type de récepteur (obésité, diabète).

Aucun essai n'a encore pu être effectué concernant les PBDE et les différents métabolites du DBDE formés *in vivo* chez le rat, qui comportent tous au minimum 7 atomes de brome. Les connaissances sur les effets biologiques des PBDE de haut poids moléculaire sont limitées, voire inexistantes pour leurs analogues hydroxylés. Par contre, pour plusieurs PBDE

faiblement bromés (tri- à pentaBDE), il a été montré que l'activité biologique, comme la toxicité observée *in vitro*, étaient augmentées par l'oxydation enzymatique de ces composés (Meerts et al., 2000; Hamers et al., 2006). Comme le TBBPA, les PBDE hydroxylés substitués de 3 à 5 atomes de brome, présentent une importante analogie structurale avec les hormones thyroïdiennes. Compte tenu de cette analogie structurale, le TBBPA et certains PBDE hydroxylés peuvent se lier aux récepteurs aux hormones thyroïdiennes (Kitamura *et al.*, 2002; Marsh *et al.*, 1998), et sont de puissants compétiteurs de la T4 pour la liaison à la transthyréline qui est une des protéines de transport des hormones thyroïdiennes (Meerts et al., 2000). Bien que la transthyréline ne soit pas la protéine de transport principale des hormones thyroïdiennes chez l'Homme, il est envisageable que ces composés puissent perturber l'homéostasie thyroïdienne. La diminution des concentrations d'hormones thyroïdiennes circulantes a été décrite *in vivo* chez des rongeurs exposés à un mélange de PBDE (penta-mix) ou au seul BDE-47, un tétraBDE (Hallgren *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002). Compte tenu de ces données, et des structures des métabolites du DBDE que nous avons identifiés, il apparaît nécessaire de procéder à l'évaluation de l'activité biologique des congénères de plus haut poids moléculaire. En particulier, l'activité biologique potentielle de l'octaBDE hydroxylé, métabolite majeur du DBDE présent dans tous les tissus, y compris les glandes endocrines, devra être évaluée dans le détail, compte tenu des données publiées pour d'autres hydroxy-PBDE. Pour pouvoir tester l'activité biologique de l'octaBDE hydroxylé, il sera d'abord nécessaire de déterminer la structure exacte de ce métabolite (position d'hydroxylation), puis de l'obtenir en quantité suffisante.

Connaissant le potentiel toxique attribué à certains congénères de PBDE et à leurs analogues hydroxylés, il est important de noter que le DBDE et ses résidus sont capables de traverser la barrière placentaire chez la rate gestante, et sont donc présents chez le fœtus. Le développement du système nerveux central (SNC) est dépendant des hormones thyroïdiennes, le SNC est donc une cible potentielle pour les perturbateurs endocriniens capables d'interférer dans la régulation de ces hormones (Colborn, 2004). Cela pourrait donc être le cas pour le DBDE et ses métabolites, mais également pour le TBBPA, soit par le dérèglement de la régulation thyroïdienne de la mère, soit par l'exposition directe du fœtus, particulièrement dans le cas des PBDE. Les niveaux résiduels de DBDE détectés dans le cerveau sont très faibles, cependant une étude a montré que le DBDE pouvait provoquer des effets neurotoxiques permanents chez des souris adultes alors qu'elles avaient été exposées au DBDE pendant la période critique du développement *in utero*, en relation avec le traitement de leur mère par voie orale (Viberg *et al.*, 2003). Les RFB, et en particulier leurs métabolites

hydroxylés, pourraient également interférer avec la régulation des hormones de la reproduction. Les congénères hydroxylés de faible poids moléculaire sont des ligands potentiels mais également des activateurs des récepteurs aux œstrogènes humains (ER α et ER β) *in vitro* (Meerts *et al.*, 2001). Certains, tétraBDE et pentaBDE hydroxylés mais aussi un heptaBDE, le BDE-183, peuvent également inhiber l'activité des cytochromes P450 17 et 19, impliqués dans le métabolisme de hormones sexuelles (Canton *et al.*, 2005; Canton *et al.*, 2006). Lilienthal *et al.* (2006) ont montré que l'administration d'une dose de BDE-99 (pentaBDE) pendant 8 jours à des rates gestantes entraînait une réduction des niveaux de testostérone et d'œstradiol mais également une féminisation chez la descendance mâle, démontrée par la réduction de la distance ano-génitale. Cette étude renforce donc l'hypothèse que les PBDE de faible poids moléculaire, et notamment leurs analogues hydroxylés, sont également des perturbateurs endocriniens *in vivo* chez l'animal, interférant dans la régulation des hormones stéroïdiennes sexuelles et dans le développement sexuel. Le DBDE, et des métabolites tel que l'octaBDE hydroxylé, pourraient eux aussi perturber la régulation des hormones sexuelles, soit directement, s'ils possèdent une activité biologique, soit indirectement, si au cours d'un temps d'exposition allant au-delà de 4 jours, ils produisent des congénères de poids moléculaire plus faible (par débromation). L'importance de ces éléments est d'autant plus grande que dans notre étude des niveaux résiduels importants ont été retrouvés dans les ovaires. Les niveaux résiduels détectés dans les glandes surrénales et le profil métabolique qui leur est associé soulèvent également un intérêt majeur, qui devra donner lieu à des études plus approfondies. Des essais sur les récepteurs aux gluco- et minéralo-corticoïdes apporteront une information supplémentaire sur les activités liées au DBDE et à ses métabolites. Il a été montré que les PCB, dont la structure chimique est proche des PBDE, provoquaient des effets toxiques chez les animaux, et perturbaient la régulation des corticostéroïdes. Certains PCB (ou plus précisément des métabolites formés *in vivo*) peuvent induire une hyperplasie de la zone corticale chez le phoque, entraînant entre autres effets une immunodépression des animaux, dont la sensibilité à des atteintes virales est de ce fait augmentée (Ross *et al.*, 1996a; Ross *et al.*, 1996b). Ce type d'immunotoxicité a également été rapportée chez le rat (Ross *et al.*, 1997). Ces résultats peuvent être mis en étroite relation avec la régulation du système immunitaire par les corticostéroïdes. Comme leurs analogues chlorés, le DBDE et ses métabolites pourraient être également impliqués dans des perturbations hormono-dépendantes du système immunitaire.

Concernant le TBPPA, une étude suggère qu'il pourrait être immunotoxique *in vitro* chez la souris, en inhibant l'expression d'une protéine (CD25) dans les splénocytes, provoquant une

possible réduction des défenses immunitaires contre les infections et les tumeurs (Pullen *et al.*, 2003). Nos résultats indiquent que le TBBPA pourrait être également impliqué dans la perturbation du système immunitaire, en relation avec les résultats *in vitro* obtenus lors d'incubations avec des granulocytes humains. On ne peut exclure qu'il existe une relation entre les biotransformations que nous avons observées pour le TBBPA, et les résultats de Pullen *et al.* (2003). Il a été montré que la présence de ROS dans les cellules était impliquée dans des processus inflammatoires pouvant favoriser à long terme le développement de cancers. Non seulement la production de ROS par les granulocytes humains ayant été activée par le TBBPA est un élément à prendre en considération, mais l'induction du métabolisme oxydatif d'autres xénobiotiques, en relation avec la libération de myéloperoxydase granulocytaire pourrait également influencer le devenir d'autres contaminants ou de médicaments au niveau sanguin. Bien que peu d'études soient disponibles concernant l'activité biologique des RFB, de nombreuses perturbations pourraient leur être attribuées, compte tenu de leur présence avérée chez l'Homme, et de la mise en évidence de métabolites dont la structure suggère une possible activité biologique, ou de l'existence de voies de biotransformations conduisant à la génération d'espèces chimiquement réactives. Ainsi, malgré le bénéfice qu'apportent le TBBPA et le DBDE en tant que retardateurs de flammes, permettant de préserver des vies et des biens, leur présence chez l'Homme soulève un problème de santé publique qu'il est important de mieux évaluer. Ce travail de thèse rajoute donc une « pierre à l'édifice », en ouvrant de nombreuses perspectives quant à l'identification des métabolites formés mais aussi quant à la compréhension des mécanismes biologiques pouvant établir un lien entre les voies de biotransformations de ces deux RFB et certains de leurs effets toxiques documentés au cours des cinq dernières années, qui ont fait l'objet de controverses scientifiques, en grande partie à cause du manque d'éléments concrets permettant de statuer sur la nature exacte des résidus présents dans les organismes exposés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le principal objectif de ce travail de thèse était d'étudier de façon détaillée le devenir des deux retardateurs de flamme bromés les plus couramment utilisés, le TBBPA et le DBDE, afin de mieux appréhender le risque qu'ils constituent pour l'Homme. La stratégie mise en place a consisté (1) à étudier le devenir de ces RFB radio-marqués au ^{14}C chez des rates gestantes conventionnelles, pour obtenir des profils métaboliques tissulaires et évaluer l'exposition fœtale à ces polluants ; (2) à compléter cette approche *in vivo* par des études de métabolisme comparé *in vitro* chez le rat et l'Homme, en utilisant différents systèmes d'essai.

Pour atteindre ces objectifs, il était nécessaire de mettre en œuvre des approches qui relèvent de la chimie analytique, de la biochimie et de la biologie, mais également de développer des méthodes, en particulier dans le domaine de la chimie analytique, sans lesquelles ce travail n'aurait pas été possible. La nécessité de devoir disposer de molécules radio-marquées et le fait que ni le TBBPA ni le DBDE radioactifs n'étaient disponibles dans le commerce, nous a conduit à envisager la réalisation de ce marquage au laboratoire. Sachant que nous souhaitions réaliser les études de métabolisme *in vivo* avec une bonne sensibilité, tout en utilisant des doses faibles, c'est-à-dire aussi proches que possible des niveaux d'exposition, nous avons apporté un soin particulier à cette synthèse afin d'obtenir une activité spécifique la plus élevée possible. Compte tenu des exigences de synthèse (utilisation de bisphénol A et de diphenyle éther marqués au ^{14}C commerciaux ayant une activité spécifique limitée, difficultés pour atteindre des rendements proches de 100% à partir de micro-quantités de produits), nous avons obtenu une activité spécifique maximale pour le DBDE, et celle du TBBPA nous a permis de diviser la dose administrée aux animaux d'un facteur 10 par rapport à celles des études précédemment rapportées dans la littérature. Les RFB sont des composés peu solubles dans l'eau et de nombreux solvants organiques. C'est le cas pour le TBBPA mais tout particulièrement pour le DBDE. Nous sommes parvenus à mettre au point des méthodes analytiques permettant, pour ces deux composés, de mener à bien les différentes études de métabolisme *in vivo* et *in vitro*. L'utilisation des molécules radio-marquées d'une pureté proche de 100 %, obtenues grâce aux méthodes optimisées pendant la thèse et au développement de systèmes CLHP spécifiques, ont permis de détecter et de quantifier sans équivoque les différents métabolites des RFB étudiés. L'utilisation de la LC-APPI-MS semble être une technique de choix, alternative à la GC-MS généralement utilisée pour l'analyse des RFB, permettant à la fois l'analyse structurale du TBBPA et du DBDE, mais également de leurs produits de dégradation et de biotransformation. Ce type d'ionisation ne nécessite pas la dérivation préalable du TBBPA et de ses résidus (cette

technique préliminaire est utilisée pour favoriser leur volatilisation en GC-MS), et n'entraîne pas de dégradation du DBDE et des congénères de haut poids moléculaire. En effet, toutes les études récentes concernant la détection des PBDE dans les différentes matrices environnementales ou biologiques, y compris chez l'Homme, mettent en évidence non seulement le DBDE, mais également des octa- et nonaBDE. Le développement de l'APPI-MS a été très utile pour s'assurer que la présence de ces congénères dans les tissus analysés était réelle et ne provenait pas d'artéfacts d'analyse induits par la GC-MS. Pour les études de métabolisme, la LC-MS est mieux adaptée que la GC-MS pour l'analyse de métabolites conjugués, souvent plus hydrosolubles que le composé de départ et plus difficilement détectables compte tenu des fragmentations induites par les techniques d'ionisation utilisées. La détection de métabolites de haut poids moléculaire est également difficile par GC-MS car la gamme de masse ne permet pas de détecter des composés ayant une masse molaire au-delà de 1000 u. La LC-APPI-MS représente donc un atout pour l'identification de ces RFB extraits des matrices complexes que sont les tissus biologiques. Cependant, la présence de métabolites hydroxylés du DBDE comportant n atomes de brome, complique un peu leur analyse par APPI-MS. Ceux-ci doivent subir une étape de dérivatisation préalable afin de pouvoir les différencier des PBDE comportant $n+1$ atomes de brome (cf. Chapitre 3, B, II. 2.). On pourrait, dans l'avenir, envisager de travailler sous atmosphère de gaz inerte (Argon) dans la source APPI, ce qui pourrait être une solution pour empêcher l'ionisation par la substitution d'un atome de brome par un atome d'oxygène ($[M-Br+O]^+$) et favoriser la formation d'ions radicalaires (M^{\cdot}) pour les PBDE non hydroxylés.

Nos résultats indiquent que le devenir du TBBPA et du DBDE, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, est différent. Ils confirment la faible bioaccumulation du TBBPA *in vivo* chez des rates gestantes, pour lesquelles les niveaux résiduels tissulaires sont très faibles en dépit d'administrations réitérées, et la rapide élimination de ce RFB. Ils confirment également la bonne biodisponibilité du DBDE à faible dose chez le rat et démontrent pour la première fois, une rétention préférentielle du DBDE et de ses métabolites dans des glandes endocrines: les surrénales et les ovaires. Cette étude met aussi en évidence le passage transplacentaire des résidus de DBDE, attestant de l'exposition fœtale à ce RFB chez le rat. Les métabolites du DBDE formés *in vivo* sont issus de processus de réduction, par débromation, et d'oxydation enzymatiques. Ils résultent en la formation, après seulement 4 jours consécutifs de traitement, de métabolites comportant au minimum 7 atomes de brome, dont certains sont hydroxylés. Il serait intéressant de prolonger l'exposition du DBDE au-delà de 4 jours, afin de rechercher si

des PBDE substitués de 3 à 6 atomes de brome sont formés. En effet, la responsabilité de ces composés dans la perturbation de certaines fonctions endocrines est largement documentée et de manière plus générale, ce sont les tétra- et penta-PBDE qui sont les congénères les plus toxiques. Les principaux métabolites du DBDE détectés, et ce dans la plupart des tissus, correspondent à deux composés: un nonaBDE (BDE-207) et un octaBDE hydroxylé, qui coéluent sous le même pic radioactif. On peut envisager qu'avec le développement de conditions CLHP différentes (modification du gradient CLHP, utilisation d'une colonne différente) on puisse séparer ces composés, et donc quantifier la proportion exacte de ces deux métabolites dans les tissus. Nous avons déjà exploré certaines de ces pistes sans succès. Une alternative intéressante pourrait être l'utilisation de la chromatographie liquide ultra performance (UPLC). Cette technique, qui permet d'augmenter la résolution chromatographique (*i.e.* d'affiner les pics chromatographiques) peut être utilisée pour séparer des métabolites de polarités très proches. L'absence de métabolisation du DBDE *in vitro* avec des fractions subcellulaires hépatiques ne nous a pas permis de préciser les mécanismes enzymatiques mis en jeu *in vivo*, compte tenu de la stratégie adoptée (utilisation du radio-marquage). Dans ce cas, le développement d'une technique de dosage en LC-MS pourrait vraisemblablement, en se basant sur les résultats déjà obtenus, conduire à l'identification des métabolites du DBDE formés *in vitro* en réalisant des incubations identiques utilisant de plus faibles concentrations de DBDE, sans produit radio-marqué.

La métabolisation du TBBPA *in vivo* chez le rat résulte essentiellement de la conjugaison de ce RFB sur les groupements phénols. En comparaison, les biotransformations du TBBPA *in vitro* sont plus diversifiées et quantitativement importantes. Elles résultent essentiellement de processus d'oxydation dépendants des cytochromes P450 avec des fractions subcellulaires hépatiques de rat et d'Homme, et dépendants de la myéloperoxydase pour les incubations réalisées avec des granulocytes humains. Des métabolites polaires hydroxylés, issus du clivage du TBBPA, ont été identifiés, mais la formation de métabolites moins hydrosolubles et de poids moléculaire plus élevés que le TBBPA a également été démontrée. Bien que ces voies oxydatives de biotransformation n'aient pas été observées *in vivo* chez le rat, on ne peut pas totalement exclure qu'elles puissent se produire, y compris chez l'Homme. Pour ce RFB, il serait en tout cas intéressant de rechercher chez l'Homme, en plus du TBBPA inchangé, la présence de composés d'oxydation apolaires. Ceux-ci, compte tenu de leur plus faible hydrosolubilité, pourraient avoir une capacité de bioaccumulation supérieure à celle du TBBPA, et pourraient peut être servir de biomarqueurs d'exposition à ce RFB.

En raison de son faible niveau de bioaccumulation, le TBBPA est généralement considéré sans danger. Sa présence chez l'Homme est démontrée dans toutes les études où il est recherché, ce qui, compte tenu de sa métabolisation et de son élimination rapide, semble indiquer une exposition constante non négligeable. Si nos études *in vivo* chez la rate gestante, attestent d'un métabolisme de phase II prépondérant, nos études *in vitro* montrent que le TBBPA pourrait également suivre des voies de biotransformation oxydatives, contribuant à la formation d'espèces chimiquement réactives. Ces voies métaboliques pourraient être impliquées dans la genèse de processus immunotoxiques ou dans la production d'effets sur le long terme, pour lesquels les études toxicologiques font actuellement défaut. Le DBDE est un retardateur de flammes pour lequel des soupçons plus importants existent en matière de santé humaine, compte tenu de sa proximité structurale avec les PCB. Nos résultats démontrent que contrairement aux arguments encore trop souvent avancés, ce RFB, administré par voie orale, est biodisponible. Le développement de méthodes analytiques spécifiques nous a permis de démontrer que ce composé est métabolisé chez le rat. Cette biotransformation conduit à des PBDE moins bromés, dont certains ont été récemment interdits (octaBDE) suite aux directives prises par l'Union Européenne, mais également à des PBDE hydroxylés qui soulèvent des inquiétudes supplémentaires en raison de leur présence dans les glandes endocrines, et dont l'activité biologique devra être précisée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahn, M. Y.; Filley, T. R.; Jafvert, C. T.; Nies, L.; Hua, I.; Bezares-Cruz, J. Photodegradation of decabromodiphenyl ether absorbed onto clay minerals, metal oxides, and sediment. *Environ. Sci. Technol.* 40: 215-220; 2006.
- Alaee, M.; Arias, P.; Sjodin, A.; Bergman, A. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environ Int.* 29: 683-9; 2003.
- Allchin, C. R.; Law, R. J.; Morris, S. polybrominated diphenylethers in sediments and biota downstream of potential sources in the UK. *Environmental Pollution.* 105: 197-207; 1999.
- Antignac, J. P.; Maume, D.; Marchand, P.; Monteau, F.; Zalko, D.; Berrebi, A.; Cravedi, J. P.; Andre, F.; Le Bizec, B.; Cariou, R. Exposure assessment of fetus and newborn to brominated flame retardants in France: Preliminary data. *Organohal. Compds.* 2006.
- Arbeli, Z.; Ronen, Z. Enrichment of a microbial culture capable of reductive debromination of the flame retardant tetrabromobisphenol-A, and identification of the intermediate metabolites produced in the process. *Biodegradation.* 14: 385-395; 2003.
- Atkinson, A.; Roy, D. In vitro conversion of environmental estrogenic chemical bisphenol A to DNA binding metabolite(s). *Biochem Biophys Res Commun.* 210: 424-33; 1995a.
- Atkinson, A.; Roy, D. In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ Mol Mutagen.* 26: 60-6; 1995b.
- Bergman, A.; Athanasiadou, M.; Fäldt, E.; Jakobsson, K. Hydroxylated PBDE metabolites in human blood. *Organohal. Compds.* 2006.
- Bezares-Cruz, J.; Jafvert, C. T.; Hua, I. solar photodecomposition of decabromodiphenyl ether: product and quantum yield. *Environ. Sci. Technol.* 38: 4149-4156; 2004.
- Birnbaum, L. S.; Staskal, D. F. brominated flame retardants: cause for concern? *Environmental Health Perspectives.* 112: 9-17; 2004.
- Branchi, I.; Capone, F.; Alleva, E.; Costa, L. G. Polybrominated diphenyl ethers: neurobehavioral effects following developmental exposure. *NeuroToxicology.* 24: 449-462; 2003.
- Brenner, A.; Mukmenev, I.; Abeliovich, A.; Kushmaro, A. Biodegradability of tetrabromobisphenol A and tribromophenol by activated sludge. *Ecotoxicology.* 15: 399-402; 2006.
- Brown, A. P.; Olivero-Verbel, J.; Holdan, W. L.; Ganey, P. E. Neutrophil activation by polychlorinated biphenyls: structure-activity relationship. *Toxicol Sci.* 46: 308-16; 1998.
- BSEF. Major Brominated flame retardants volume estimates: total market demand by region. Brussels: Bromine Science and Environmental Forum. available: http://bsef-site.com/docs/BFR_vols_2001.doc. 2001.

- BSEF. BFR regulatory overview in Europe. Brussels: Bromine Science and Environmental Forum. Available: <http://www.bsef-site.com/weee/>. 2003.
- Burreau, S.; Zebuhr, Y.; Broman, D.; Ishaq, R. Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) studied in pike (*Esox lucius*), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) from the Baltic Sea. *Chemosphere*. 55: 1043-52; 2004.
- Canton, R. F.; Sanderson, J. T.; Letcher, R. J.; Bergman, A.; Van Den Berg, M. Inhibition and induction of aromatase (CYP19) activity by brominated flame retardants in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Sci*. 88: 447-55; 2005.
- Canton, R. F.; Sanderson, J. T.; Nijmeijer, S.; Bergman, A.; Letcher, R. J.; Van Den Berg, M. In vitro effects of brominated flame retardants and metabolites on CYP17 catalytic activity: A novel mechanism of action? *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006.
- Chow, S. A.; Fischer, L. J. Metabolism and disposition of cyproheptadine and desmethylcyproheptadine in pregnant and fetal rats. *Drug Metab Dispos*. 15: 740-8; 1987.
- Christensen, J. R.; Macduffee, M.; Macdonald, R. W.; Whiticar, M.; Ross, P. S. Persistent organic pollutants in British Columbia grizzly bears: consequence of divergent diets. *Environ Sci Technol*. 39: 6952-60; 2005.
- Colborn, T. Neurodevelopment and endocrine disruption. *Environ Health Perspect*. 112: 944-9; 2004.
- Covaci, A.; De, B. J.; Ryan, J. J.; Voorspoels, S.; Schepens, P. Determination of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue by large-volume injection-narrow-bore capillary gas chromatography/electron impact low-resolution mass spectrometry. *Anal Chem*. 74: 790-8; 2002.
- Covaci, A.; Voorspoels, S.; De Boer, J. Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples. *Environ Int*. 29: 735; 2003.
- Covaci, A.; Gheorghe, A.; Voorspoels, S.; Maervoet, J.; Steen Redeker, E.; Blust, R.; Schepens, P. Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sediment cores from the Western Scheldt river (Belgium): analytical aspects and depth profiles. *Environ Int*. 31: 367-375; 2005.
- Covaci, A.; Voorspoels, S. Optimization of the determination of polybrominated diphenyl ethers in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 827: 216-23; 2005.
- Darnerud, P. O.; Risberg, S. Tissue localisation of tetra- and pentabromodiphenyl ether congeners (BDE-47, -85 and -99) in perinatal and adult C57BL mice. *Chemosphere*. 62: 485-93; 2006.

- De Boer, J.; Wester, P. G.; Klamer, H. J.; Lewis, W. E.; Boon, J. P. Do flame retardants threaten ocean life? *Nature*. 394: 28-9; 1998.
- De Boer, J.; Wester, P. G.; Van Der Horst, A.; Leonards, P. E. Polybrominated diphenyl ethers in influents, suspended particulate matter, sediments, sewage treatment plant and effluents and biota from the Netherlands. *Environ Pollut*. 122: 63-74; 2003.
- De Wit, C.; Alae, M.; Muir, D. C. G. Levels and trends of brominated flame retardants in the arctic. *Chemosphere*. 2006.
- De Wit, C. A. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*. 46: 583-624; 2002.
- Decarlo, V. J. Studies on brominated chemicals in the environment. *Ann N Y Acad Sci*. 320: 678-81; 1979.
- Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the council of 27 January 2003 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment. Official Journal of the European Union.
- Directive 2002/96/EC of the European Parliament and of the council of 27 January 2003 on waste electrical and electronic equipment (WEEE). Official Journal of the European Union.
- Directive 2003/11/EC of the European Parliament and of the council of 6 February 2003 amending for the 24th time council directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether). Official Journal of the European Union.
- Dodder, N. G.; Strandberg, B.; Hites, R. A. Concentrations and spatial variations of polybrominated diphenyl ethers in fish and air from northeastern United States. *Organohalogen Compounds*. 47: 69-72; 2000.
- Domingo, J. L. Human exposure to polybrominated diphenyl ethers through the diet. *J Chromatogr A*. 1054: 321-6; 2004.
- Ebert, J.; Bahadir, M. Formation of PBDD/F from flame-retarded plastic materials under thermal stress. *Environ Int*. 29: 711-716; 2003.
- EFRA. The European Flame Retardants Association. *Retardateurs de flammes, les questions les plus courantes*. 2004.
- El Dareer, S. M.; Kalin, J. R.; Tillery, K. F.; Hill, D. L. Disposition of decabromodiphenyl ether in rats dosed intravenously or by feeding. *Journal of Toxicology and environmental Health*. 22: 405-415; 1987.
- Eljarrat, E.; Barcelo, D. Congener-specific determination of dioxins and related compounds by gas chromatography coupled to LRMS, HRMS, MS/MS and TOFMS. *Journal of Mass Spectrometry*. 37: 1105-1117; 2002.

- Eljarrat, E.; Barcelo, D. Sample handling and analysis of brominated flame retardants in soil and sludge samples. *Trends in analytical chemistry*. 23: 727-736; 2004.
- Elliott, J. E.; Wilson, L. K.; Wakeford, B. Polybrominated diphenyl ether trends in eggs of marine and freshwater birds from British Columbia, Canada, 1979-2002. *Environ Sci Technol*. 39: 5584-91; 2005.
- Eriksson, J.; Green, N.; Marsh, G.; Bergman, A. photochemical decomposition of 15 polybrominated diphenyl ether congeners in methanol/water. *Environ Sci Technol*. 38: 3119-3125; 2004a.
- Eriksson, J.; Rahm, S.; Green, N.; Bergman, A.; Jakobsson, E. Photochemical transformations of tetrabromobisphenol A and related phenols in water. *Chemosphere*. 54: 117-26; 2004b.
- Fabrellas, B.; Larrazabal, D.; Martinez, M. A.; Eljarrat, E.; Barcelo, D. Presence of polybrominated diphenyl ethers in spanish sewage sludge: important contribution of deca-BDE. *Organohal. Compds*. 66: 3755-3760; 2004.
- Fischer, D.; Hooper, K.; Athanasiadou, M.; Athanassiadis, I.; Bergman, A. Children show highest levels of polybrominated diphenyl ethers in a California family of four: a case study. *Environ Health Perspect*. 114: 1581-4; 2006.
- Fowles, J. R.; Fairbrother, A.; Baecher-Steppan, L.; Kerkvliet, N. I. Immunologic and endocrine effects of the flame-retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6J mice. *Toxicology*. 86: 49-61; 1994.
- Fukuda, N.; Ito, Y.; Yamaguchi, M.; Mitumori, K.; Koizumi, M.; Hasegawa, R.; Kamata, E.; Ema, M. Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. *Toxicology Letters*. xxx: xxx-xxx; 2004.
- Gaul, S.; Lehnert, K.; Conrad, J.; Vetter, W. HPLC isolation and NMR structure elucidation of the most prominent octabromo isomer in technical octabromo diphenyl ether. *J Sep Sci*. 28: 2268-74; 2005.
- Gerecke, A. C.; Hartmann, P. C.; Heeb, N. V.; Kohler, H. P.; Giger, W.; Schmid, P.; Zennegg, M.; Kohler, M. Anaerobic degradation of decabromodiphenyl ether. *Environ Sci Technol*. 39: 1078-83; 2005.
- Gerecke, A. C.; Giger, W.; Hartmann, P. C.; Heeb, N. V.; Kohler, H. P.; Schmid, P.; Zennegg, M.; Kohler, M. Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge. *Chemosphere*. 64: 311-7; 2006.
- Haglund, U.; Zook, D. R.; Buser, H. R.; Hu, J. Identification and quantification of polybrominated diphenyl ethers and methoxy-polybrominated diphenyl ethers in Baltic biota. *Environ Sci Technol*. 31: 3281-3287; 1997.
- Hakk, H.; Larsen, G.; Bergman, A.; Orn, U. Metabolism, excretion and distribution of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in conventional and bile-duct cannulated rats. *Xenobiotica*. 30: 881-90; 2000.

- Hakk, H.; Larsen, G.; Klasson-Wehler, E. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male Sprague-Dawley rat. *Xenobiotica*. 32: 369-382; 2002.
- Hakk, H.; Huwe, J.; Low, M.; Rutherford, D.; Larsen, G. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100) in male Sprague-Dawley rats. *Xenobiotica*. 36: 79-94; 2006.
- Hale, R. C.; Alaei, M.; Manchester-Neesvig, J. B.; Stapleton, H. M.; Ikonomou, M. G. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment. *Environ Int*. 29: 771-9; 2003.
- Hale, R. C.; La Guardia, M. J.; Harvey, E.; Gaylor, M. O.; Mainor, T. M. Brominated flame retardant concentrations and trends in abiotic media. *Chemosphere*. 64: 181-6; 2006.
- Hallgren, S.; Sinjari, T.; Hakansson, H.; Darnerud, P. O. effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Arch Toxicol*. 75: 200-208; 2001.
- Hamers, T.; Kamstra, J. H.; Sonneveld, E.; Murk, A. J.; Kester, M. H.; Andersson, P. L.; Legler, J.; Brouwer, A. In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicol Sci*. 92: 157-73; 2006.
- Hardy, M. L.; Biesemeier, J.; Manor, O.; Gentit, W. Industry-sponsored research on the potential health and environmental effects of selected brominated flame retardants. *Environ Int*. 29: 793-9; 2003.
- Hardy, M. L. A comparison of the fish bioconcentration factors for brominated flame retardants with their nonbrominated analogues. *Environ Toxicol Chem*. 23: 656-61; 2004.
- Hayama, T.; Yoshida, H.; Onimaru, S.; Yonekura, S.; Kuroki, H.; Todoroki, K.; Nohta, H.; Yamaguchi, M. Determination of tetrabromobisphenol A in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 809: 131-6; 2004.
- Hazrati, S.; Harrad, S. PBDEs and PCBs in indoor air: levels and factors influencing their concentrations. *Organohal. Compds*. 2006.
- Herzke, D.; Berger, U.; Kallenborn, R.; Nygard, T.; Vetter, W. Brominated flame retardants and other organobromines in Norwegian predatory bird eggs. *Chemosphere*. 61: 441-9; 2005.
- Hornung, A.; Balabanovich, A. I.; Donner, S.; Seifert, H. Detoxification of brominated pyrolysis oils. *J Anal Appl Pyrolysis*. 0: 1-11; 2003.
- Hua, I.; Kang, N.; Jafvert, C. T.; Fabrega-Duque, J. R. Heterogeneous photochemical reactions of decabromodiphenyl ether. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22: 798-804; 2003.

- Huwe, J.; Hakk, H.; Lorentzen, M. A mass balance study of a commercial octabromodiphenyl ether mixture in rats. *Organohal. Compds.* 58: 229-232; 2002.
- Hyotylainen, T.; Hartonen, K. Determination of brominated flame retardant in environmental samples. *Trends in analytical chemistry.* 21: 13-29; 2002.
- Inoue, K.; Harada, K.; Takenaka, K.; Uehara, S.; Kono, M.; Shimizu, T.; Takasuga, T.; Senthilkumar, K.; Yamashita, F.; Koizumi, A. Levels and concentration ratios of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in serum and breast milk in Japanese mothers. *Environ Health Perspect.* 114: 1179-85; 2006.
- Jaeg, J. P.; Perdu, E.; Dolo, L.; Debrauwer, L.; Cravedi, J. P.; Zalko, D. Characterization of new bisphenol a metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions. *J Agric Food Chem.* 52: 4935-42; 2004.
- Jones-Otazo, H. A.; Clarke, J. P.; Diamond, M. L.; Archbold, J. A.; Ferguson, G.; Harner, T.; Richardson, G. M.; Ryan, J. J.; Wilford, B. Is house dust the missing exposure pathway for PBDEs? An analysis of the urban fate and human exposure to PBDEs. *Environ Sci Technol.* 39: 5121-30; 2005.
- Kaupilla, T. J.; Kotiaho, T.; Kostianen, R. Negative Ion-atmospheric pressure photoionisation-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15: 203-211; 2004.
- Kierkegaard, A.; Lennart, B.; Tjarnlund, U.; De Wit, C.; Jansson, B. Dietary uptake and biological effects of decabromodiphenyl ether in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol.* 33: 1612-1617; 1999.
- Kitamura, S.; Jinno, N.; Ohta, S.; Kuroki, H.; Fujimoto, N. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun.* 293: 554-9; 2002.
- Kitamura, S.; Kato, T.; Iida, M.; Jinno, N.; Suzuki, T.; Ohta, S.; Fujimoto, N.; Hanada, H.; Kashiwagi, K.; Kashiwagi, A. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci.* 76: 1589-601; 2005.
- Korytar, P.; Covaci, A.; Leonards, P. E.; De Boer, J.; Brinkman, U. A. Comprehensive two-dimensional gas chromatography of polybrominated diphenyl ethers. *J Chromatogr A.* 1100: 200-7; 2005.
- Kristoffersen, A.; Voie, O. A.; Fonnum, F. Ortho-substituted polybrominated biphenyls activate respiratory burst in granulocytes from humans. *Toxicol Lett.* 129: 161-6; 2002.
- Kuriyama, S. N.; Talsness, C. E.; Grote, K.; Chahoud, I. Developmental Exposure to Low Dose PBDE 99: 1--Effects on Male Fertility and Neurobehavior in Rat Offspring. *Environ Health Perspect.* 113: 149-54; 2005.
- Law, R. J.; Alae, M.; Allchin, C. R.; Boon, J. P.; Lebeuf, M.; Lepom, P.; Stern, G. A. Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife. *Environ Int.* 29: 757-70; 2003.

- Law, R. J.; Allchin, C. R.; De Boer, J.; Covaci, A.; Herzke, D.; Lepom, P.; Morris, S.; Tronczynski, J.; De Wit, C. A. Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. *Chemosphere*. 64: 187-208; 2006.
- Lilienthal, H.; Hack, A.; Roth-Harer, A.; Grande, S. W.; Talsness, C. E. Effects of developmental exposure to 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. *Environ Health Perspect*. 114: 194-201; 2006.
- Lindberg, P.; Sellstrom, U.; Häggberg, L.; De Wit, C. Higher brominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane found in eggs of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) breeding in Sweden. *Environ Sci Technol*. 38: 93-96; 2004.
- Lindstrom, G.; Wingfors, H.; Dam, M.; Van Bavel, B. Identification of 19 polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) from the Atlantic. *Arch Environ Contam Toxicol*. 36: 355-63; 1999.
- Luda, M. P.; Balabanovich, A. I.; Camino, G. Thermal decomposition of fire retardant brominated epoxy resins. *J Anal Appl Pyrolysis*. 65: 25-40; 2002.
- Malmberg, T.; Athanasiadou, M.; Marsh, G.; Brandt, I.; Bergman, A. Identification of hydroxylated polybrominated diphenyl ether metabolites in blood plasma from polybrominated diphenyl ether exposed rats. *Environ Sci Technol*. 39: 5342-8; 2005.
- Mariussen, E.; Fjeld, E.; Strand-Andersen, M.; Hjerpset, M.; Schlabach, M. Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers in trout from Norwegian lakes. *Organohal. Compds*. 61: 69-72; 2003.
- Marsh, G.; Bergman, A.; Bladh, L. G.; Gillner, M.; Jakobsson, E. Synthesis of p-hydroxybromodiphenyl ethers and binding to the thyroid receptor. *Organohalogen Compounds*. 37: 305-308; 1998.
- Marsh, G.; Athanasiadou, M.; Athanassiadis, I.; Sandholm, A. Identification of hydroxylated metabolites in 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether exposed rats. *Chemosphere*. 63: 690-7; 2006.
- Mazdai, A.; Dodder, N. G.; Abernathy, M. P.; Hites, R. A.; Bigsby, R. M. Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples. *Environ Health Perspect*. 111: 1249-52; 2003.
- Meerts, I. A. T. M.; Van Zanden, J. J.; Luijckx, E. A. C.; Van Leeuwen-Bol, I.; Marsh, G.; Jakobsson, E.; Bergman, A.; Brouwer, A. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicological Sciences*. 56: 95-104; 2000.
- Meerts, I. A. T. M.; Letcher, R. J.; Hoving, S.; Marsh, G.; Bergman, A.; Lemmen, J. G.; Van Der Burg, B.; Brouwer, A. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PBDEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ Health Perspect*. 109: 399-407; 2001.

- Meironyte, D.; Noren, K.; Bergman, A. Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Swedish human milk. A time-related trend study, 1972-1997. *Journal of Toxicology and environmental Health, Part A*. 58: 329-341; 1999.
- Miller, R. K.; Heckmann, M. E.; Mckenzie, R. C. Diethylstilbestrol: placental transfer, metabolism, covalent binding and fetal distribution in the Wistar rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 220: 358-65; 1982.
- Mörck, A.; Hakk, H.; Örn, U.; Klasson-Wehler, E. Decabromodiphenyl ether in the rat: absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Drug metabolism and disposition*. 31: 900-907; 2003.
- Morris, S.; Allchin, C. R.; Zegers, B. N.; Haftka, J. J.; Boon, J. P.; Belpaire, C.; Leonards, P. E.; Van Leeuwen, S. P.; De Boer, J. Distribution and fate of HBCD and TBBPA brominated flame retardants in North Sea estuaries and aquatic food webs. *Environ Sci Technol*. 38: 5497-504; 2004.
- Mukerjee, D. Health impact of polychlorinated dibenzo-p-dioxins: a critical review. *J Air Waste Manag Assoc*. 48: 157-165; 1998.
- Norris, J. M.; Kociba, R. J.; Schwetz, B. A.; Rose, J. Q.; Humiston, C. G.; Jewett, G. L.; Gehring, P. J.; Mailhes, J. B. Toxicology of octabromobiphenyl and decabromodiphenyl oxide. *Environ Health Perspect*. 11: 153-61; 1975.
- O'brien, P. J. Peroxidases. *Chemico-Biological Interactions*. 129: 113-139; 2000.
- Orn, U.; Klasson-Wehler, E. Metabolism of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in rat and mouse. *Xenobiotica*. 28: 199-211; 1998.
- Pless-Mulloli, T.; Schechter, A.; Schilling, B.; Pöpke, O. Levels of PBDE in household dust and lint in the UK, Germany and the USA. *Organohal. Compds*. 2006.
- Pullen, S.; Boecker, R.; Tiegs, G. The flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrabromobisphenol A-bisallylether suppress the induction of interleukin-2 receptor alpha chain (CD25) in murine splenocytes. *Toxicology*. 184: 11-22; 2003.
- Rahman, F.; Langford, K. H.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Sci Total Environ*. 275: 1-17; 2001.
- Reistad, T.; Mariussen, E.; Fonnum, F. The effect of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol-A, on free radical formation in human neutrophil granulocytes: the involvement of the MAP kinase pathway and protein kinase C. *Toxicol Sci*. 83: 89-100; 2005.
- Reistad, T.; Fonnum, F.; Mariussen, E. Neurotoxicity of the pentabrominated diphenyl ether mixture, DE-71, and hexabromocyclododecane (HBCD) in rat cerebellar granule cells in vitro. *Arch Toxicol*. 2006.
- Ronen, Z.; Abeliovich, A. Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromobisphenol A. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2372-2377; 2000.

- Ronisz, D.; Farmen Finne, E.; Karlsson, H.; Forlin, L. Effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane (HBCDD), and tetrabromobisphenol A (TBBPA), on hepatic enzymes and other biomarkers in juvenile rainbow trout and feral eelpout. *Aquat Toxicol.* 69: 229-45; 2004.
- Ross, P.; De Swart, R.; Addison, R.; Van Loveren, H.; Vos, J.; Osterhaus, A. Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: wildlife at risk? *Toxicology.* 112: 157-69; 1996a.
- Ross, P.; De Swart, R.; Van Loveren, H.; Osterhaus, A.; Vos, J. The immunotoxicity of environmental contaminants to marine wildlife: a review. *Ann Rev Fish Dis.* 6: 151-165; 1996b.
- Ross, P. S.; De Swart, R. L.; Van Der Vliet, H.; Willemsen, L.; De Klerk, A.; Van Amerongen, G.; Groen, J.; Brouwer, A.; Schipholt, I.; Morse, D. C.; Van Loveren, H.; Osterhaus, A. D.; Vos, J. G. Impaired cellular immune response in rats exposed perinatally to Baltic Sea herring oil or 2,3,7,8-TCDD. *Arch Toxicol.* 71: 563-74; 1997.
- Rowland, I. R. Reduction by the gut microflora of animals and man. *Biochem Pharmacol.* 35: 27-32; 1986.
- Sakai, S.; Watanabe, J.; Honda, Y.; Takatsuki, H.; Aoki, I.; Futamatsu, M.; Shiozaki, K. Combustion of brominated flame retardants and behavior of its by products. *Chemosphere.* 42: 519-531; 2001.
- Sandholm, A.; Emanuelsson, B. M.; Klasson-Wehler, E. Bioavailability and half-life of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in rat. *Xenobiotica.* 33: 1149-1158; 2003.
- Schauer, U. M. D.; Völkel, W.; Dekant, W. Toxicokinetics of tetrabromobisphenol A in humans and rats after oral administration. *Toxicol Sci.* 91: 49-58; 2006.
- Schechter, A.; Pavuk, M.; Papke, O.; Ryan, J. J.; Birnbaum, L.; Rosen, R. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. mothers' milk. *Environ Health Perspect.* 111: 1723-9; 2003.
- Schechter, A.; Papke, O.; Tung, K. C.; Staskal, D.; Birnbaum, L. Polybrominated diphenyl ethers contamination of United States food. *Environ Sci Technol.* 38: 5306-5311, 2004.
- Schechter, A.; Papke, O.; Tung, K. C.; Joseph, J.; Harris, T. R.; Dahlgren, J. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the U.S. population: current levels, temporal trends, and comparison with dioxins, dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls. *J Occup Environ Med.* 47: 199-211; 2005.
- Schechter, A.; Pöpke, O.; Harris, T. R.; Musumba, A. Polybrominated diphenyl ether in the United States: levels in human blood and milk, food and environmental samples. *Organohal. Compds.* 2006.

- Schlabach, M.; Fjeld, E.; Borgen, A. R. Brominated flame retardants in Drammens River and the Drammensfjord, Norway. The Third International Workshop on Brominated Flame Retardants, Toronto 6-9 June. 2004.
- Sellström, U.; Lindberg, P.; Häggberg, L.; De Wit, C. Higher brominated PBDEs found in eggs of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) nbreeding in Sweden. Proceedings of the 2nd international workshop on brominated flame retardants BFR 2001, ay 14-16.: 159-162; 2001.
- Sjodin, A.; Jakobsson, E.; Kierkegaard, A.; Marsh, G.; Sellstrom, U. Gas chromatographic identification and quantification of polybrominated diphenyl ether in a commercial product, Bromkal 70-5DE. J. Chromatogr. A. 822: 83-89; 1998.
- Sjodin, A.; Hagmar, L.; Klasson-Wehler, E.; Kronholm-Diab, K.; Jakobsson, E.; Bergman, A. Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. Environ Health Perspect. 107: 643-8; 1999.
- Sjodin, A.; Hagmar, L.; Klasson-Wehler, E.; Bjork, J.; Bergman, A. Influence of the consumption of fatty Baltic Sea fish on plasma levels of halogenated environmental contaminants in Latvian and Swedish men. Environ Health Perspect. 108: 1035-41; 2000.
- Sjodin, A.; Carlsson, H.; Thuresson, K.; Sjölin, S.; Bergman, A. Flame retardant in indoor air at an electronics recycling plant ant at other work environments. Environ Sci Technol. 35: 448-454; 2001.
- Sjodin, A.; Patterson, D. G., Jr.; Bergman, A. A review on human exposure to brominated flame retardants--particularly polybrominated diphenyl ethers. Environ Int. 29: 829-39; 2003.
- Soderstrom, G.; Sellstrom, U.; De Wit, C. A.; Tysklind, M. Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209). Environ Sci Technol. 38: 127-32; 2004.
- Stapleton, H. M.; Alae, M.; Letcher, R. J.; Baker, J. E. Debromination of the flame retardant decabromodiphenyl ether by juvenile carp (*Cyprinus carpio*) following dietary exposure. Environ Sci Technol. 38: 112-9; 2004.
- Stapleton, H. M.; Dodder, N. G.; Offenber, J. H.; Schantz, M. M.; Wise, S. A. Polybrominated diphenyl ethers in house dust and clothes dryer lint. Environ Sci Technol. 39: 925-31; 2005.
- Stapleton, H. M.; Brazil, B.; Holbrook, R. D.; Mitchelmore, C. L.; Benedict, R.; Konstantinov, A.; Potter, D. In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. Environ Sci Technol. 40: 4653-8; 2006a.
- Stapleton, H. M.; Harner, T.; Shoeib, M.; Keller, J. M.; Schantz, M. M.; Leigh, S. D.; Wise, S. A. Determination of polybrominated diphenyl ethers in indoor dust standard reference materials. Anal Bioanal Chem. 384: 791-800; 2006b.

- Staskal, D. F.; Diliberto, J. J.; Birnbaum, L. S. Disposition of BDE 47 in developing mice. *Toxicol Sci.* 90: 309-16; 2006.
- Stoker, T. E.; Laws, S. C.; Crofton, K. M.; Hedge, J. M.; Ferrel, J. M.; Cooper, R. L. Assessment of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture, in the EDSP male and female pubertal protocols. *Toxicol Sci.* 78: 144-155; 2004.
- Stoker, T. E.; Cooper, R. L.; Lambright, C. S.; Wilson, V. S.; Furr, J.; Gray, L. E. In vivo and in vitro anti-androgenic effects of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 207: 78-88; 2005.
- Strandberg, B.; Dodder, N. G.; Basu, I.; Hites, R. A. Concentrations and spatial variations of polybrominated diphenyl ethers and other organohalogen compounds in Great Lakes air. *Environ Sci Technol.* 35: 1078-83; 2001.
- Strandman, T.; Koistinen, J.; Vartiainen, T. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in placenta and human milk. *Organohal. Compds.* 47: 61-64; 2000.
- Susan, A.B.; Ebert, D.A.; Duncan, W.P. Synthesis of ¹⁴C-labelled flame retardants. ¹⁴C-labelled tétrabromophtalic anhydride and tétrabromobisphenol-A. *J. Labell. Compd. Radioph.* 16: 579-589.
- Szymanska, J. A.; Sapota, A.; Frydrych, B. The disposition and metabolism of tetrabromobisphenol-A after a single i.p. dose in the rat. *Chemosphere.* 45: 693-700; 2001.
- Talsness, C. E.; Shakibaei, M.; Kuriyama, S. N.; Wichert Grande, S.; Sterner-Kock, A.; Schnitker, P.; De Souza, C.; Grote, K.; Chahoud, I. ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicology Letters.* 157: 189-202; 2005.
- Ter Schure, A. F.; Larsson, P.; Agrell, C.; Boon, J. P. Atmospheric transport of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls to the Baltic Sea. *Environ Sci Technol.* 38: 1282-7; 2004.
- Thomsen, C.; Janak, K.; Lundanes, E.; Becher, G. Determination of phenolic flame-retardants in human plasma using solid-phase extraction and gas chromatography-electron-capture mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 750: 1-11; 2001a.
- Thomsen, C.; Lundanes, E.; Becher, G. Brominated flame retardants in plasma samples from three different occupational groups in Norway. *J Environ Monit.* 3: 366-70; 2001b.
- Thomsen, C.; Lundanes, E.; Becher, G. Brominated flame retardants in archived serum samples from Norway: a study on temporal trends and the role of age. *Environ Sci Technol.* 36: 1414-8; 2002.
- Thomsen, C.; Liane, V.; Froshaug, M.; Becher, G. Levels of brominated flame retardant in human samples fom Norway through three decades. *Organohal. Compds.* 658-661; 2005.

- Thuresson, K.; Hoglund, P.; Hagmar, L.; Sjodin, A.; Bergman, A.; Jakobsson, K. Apparent half-lives of hepta- to decabrominated diphenyl ethers in human serum as determined in occupationally exposed workers. *Environ Health Perspect.* 114: 176-81; 2006.
- Tohka, A.; Zevenhoven, R. Brominated flame retardant - a nuisance in thermal waste processing? Extraction and processing division meeting on recycling and waste treatment in mineral and metal processing: technical and economic aspects. 2002.
- Utrecht, J. P. The role of leukocyte-generated reactive metabolites in the pathogenesis of idiosyncratic drug reactions. *Drug Metab Rev.* 24: 299-366; 1992.
- Valters, K.; Li, H.; Alae, M.; D'sa, I.; Marsh, G.; Bergman, A.; Letcher, R. J. Polybrominated diphenyl ethers and hydroxylated and methoxylated brominated and chlorinated analogues in the plasma of fish from the Detroit River. *Environ Sci Technol.* 39: 5612-9; 2005.
- Van Bavel, B.; Sundelin, E.; Lillback, J.; Dam, M.; Lindstrom, G. Supercritical fluid extraction of polybrominated diphenyl ethers, PBDEs, from long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) from the atlantic. *Organohalogen Compounds.* 40: 359-362; 1999.
- Verreault, J.; Gabrielsen, G. W.; Letcher, R. J.; Muir, D. C.; Chu, S. New and established organohalogen contaminants and their metabolites in plasma and eggs of glaucous gulls from Bear Island. Report 914/2004, Norwegian Pollution Control Authority (SFT), Oslo, Norway. Available from: <<http://www.sft.no/publikasjoner/overvaking/2057/ta2057.pdf>>. 2004.
- Verslycke, T. A.; Vethaak, A. D.; Arijs, K.; Janssen, C. R. Flame retardants, surfactants and organotins in sediment and mysid shrimp of the Scheldt estuary (The Netherlands). *Environ Pollut.* 136: 19-31; 2005.
- Viberg, H.; Fredriksson, A.; Jakobsson, E.; Orn, U.; Eriksson, P. Neurobehavioral derangements in adult mice receiving decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) during a defined period of neonatal brain development. *Toxicol Sci.* 76: 112-20; 2003.
- Viberg, H.; Fredriksson, A.; Eriksson, P. Investigations of strain and/or gender differences in developmental neurotoxic effects of polybrominated diphenyl ethers in mice. *Toxicol Sci.* 81: 344-53; 2004.
- Viberg, H.; Johansson, N.; Fredriksson, A.; Eriksson, J.; Marsh, G.; Eriksson, P. Neonatal Exposure to Higher Brominated Diphenyl Ethers, Heptabromo- (PBDE 183), Octabromo- (PBDE 203) or Nonabromodiphenyl Ether (PBDE 206), Impairs Spontaneous Behaviour, and Learning and Memory Functions of Adult Mice. *Toxicol Sci.* 2006.
- Voordeckers, J. W.; Fennell, D. E.; Jones, K.; Haggblom, M. M. Anaerobic biotransformation of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and bisphenol A in estuarine sediments. *Environ Sci Technol.* 36: 696-701; 2002.
- Voorspoels, S.; Covaci, A.; Lepom, P.; Escutenaire, S.; Schepens, P. Remarkable findings concerning PBDEs in the terrestrial top-predator red fox (*Vulpes vulpes*). *Environ Sci Technol.* 40: 2937-43; 2006.

- Watanabe, I.; Kashimoto, T.; Tatsukawa, R. Confirmation of the presence of the flame retardant decabromobiphenyl ether in river sediment from Osaka, Japan. *Bull Environ Contam Toxicol.* 36: 839-42; 1986.
- Watanabe, I.; Tatsukawa, R. Formation of brominated dibenzofurans from the photolysis of flame retardant decabromobiphenyl ether in hexane solution by UV and sun light. *Bull Environ Contam Toxicol.* 39: 953-9; 1987.
- Watanabe, I.; Sakai, S. Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environ Int.* 29: 665-82; 2003.
- WHO. Environment Health Criteria 162. Brominated diphenyl ethers. International program on chemical safety. Geneva, Switzerland: World Health Organisation.; 1994.
- WHO. Environment Health Criteria 172. Tetrabromobisphenol A and derivatives. International program on chemical safety. Geneva, Switzerland: World Health Organisation.; 1995.
- WHO. Environment Health Criteria 192. Flame retardants: a general introduction. International program on chemical safety, World Health Organisation; Geneva, Switzerland.; 1997.
- Wilford, B. H.; Shoeib, M.; Harner, T.; Zhu, J.; Jones, K. C. Polybrominated diphenyl ethers in indoor dust in Ottawa, Canada: implications for sources and exposure. *Environ Sci Technol.* 39: 7027-35; 2005.
- Wong, S. M.; Kellaway, I. W.; Murdan, S. Enhancement of the dissolution rate and oral absorption of a poorly water soluble drug by formation of surfactant-containing microparticles. *Int J Pharm.* 317: 61-8; 2006.
- WWF. Detox Campaign. Chemical check up: An analysis of chemicals in the blood of members of the European Parliament. 2004.
- Zalko, D.; Soto, A. M.; Dolo, L.; Dorio, C.; Rathahao, E.; Debrauwer, L.; Faure, R.; Cravedi, J. P. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environ Health Perspect.* 111: 309-19; 2003.
- Zhou, T.; Taylor, M. M.; Devito, M. J.; Crofton, K. M. Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption. *Toxicol Sci.* 66: 105-16; 2002.

ANNEXES

ANNEXE 1:

Numérotation IUPAC des 209 congénères PBDE

Numéro IUPAC (à gauche) et numéros des carbones substitués (à droite). Les congénères soulignés et en gras sont les PBDE habituellement recherchés et les plus présents dans les matrices alimentaires et milieux biologiques.

monoBDE		tétraBDE		pentaBDE		hexaBDE		heptaBDE	
1	2	40	2,2',3,3'	82	2,2',3,3',4	128	2,2',3,3',4,4'	170	2,2',3,3',4,4',5
2	3	41	2,2',3,4	83	2,2',3,3',5	129	2,2',3,3',4,5	171	2,2',3,3',4,4',6
3	4	42	2,2',3,4'	84	2,2',3,3',6	130	2,2',3,3',4,5'	172	2,2',3,3',4,5,5'
		43	2,2',3,5	85	2,2',3,4,4'	131	2,2',3,3',4,6	173	2,2',3,3',4,5,6
		44	2,2',3,5'	86	2,2',3,4,5	132	2,2',3,3',4,6'	174	2,2',3,3',4,5,6'
diBDE		45	2,2',3,6	87	2,2',3,4,5'	133	2,2',3,3',5,5'	175	2,2',3,3',4,5',6
4	2,2'	46	2,2',3,6'	88	2,2',3,4,6	134	2,2',3,3',5,6	176	2,2',3,3',4,6,6'
5	2,3	47	2,2',4,4'	89	2,2',3,4,6'	135	2,2',3,3',5,6'	177	2,2',3,3',4,5',6'
6	2,3'	48	2,2',4,5	90	2,2',3,4,5	136	2,2',3,3',6,6'	178	2,2',3,3',5,5',6
7	2,4	49	2,2',4,5'	91	2,2',3,4,6	137	2,2',3,4,4,5	179	2,2',3,3',5,6,6'
8	2,4'	50	2,2',4,6	92	2,2',3,5,5'	138	2,2',3,4,4,5'	180	2,2',3,4,4,5,5'
9	2,5	51	2,2',4,6'	93	2,2',3,5,6	139	2,2',3,4,4,6	181	2,2',3,4,4,5,6
10	2,6	52	2,2',5,5'	94	2,2',3,5,6'	140	2,2',3,4,4,6'	182	2,2',3,4,4,5,6'
11	3,3'	53	2,2',5,6'	95	2,2',3,5,6	141	2,2',3,4,5,5'	183	2,2',3,4,4,5',6
12	3,4	54	2,2',6,6'	96	2,2',3,6,6'	142	2,2',3,4,5,6	184	2,2',3,4,4,6,6'
13	3,4'	55	2,3,3',4	97	2,2',3,4,5'	143	2,2',3,4,5,6'	185	2,2',3,4,5,5',6
14	3,5	56	2,3,3',4'	98	2,2',3,4,6'	144	2,2',3,4,5,6	186	2,2',3,4,5,6,6'
15	4,4'	57	2,3,3',5	99	2,2',4,4',5	145	2,2',3,4,6,6'	187	2,2',3,4',5,5',6
		58	2,3,3',5'	100	2,2',4,4',6	146	2,2',3,4',5,5'	188	2,2',3,4',5,6,6'
		59	2,3,3',6	101	2,2',4,5,5'	147	2,2',3,4',5,6	189	2,3,3',4,4',5,5'
triBDE		60	2,3,4,4'	102	2,2',4,5,6'	148	2,2',3,4',5,6'	190	2,3,3',4,4',5,6
16	2,2',3	61	2,3,4,5	103	2,2',4,5',6	149	2,2',3,4',5',6	191	2,3,3',4,4',5',6
17	2,2',4	62	2,3,4,6	104	2,2',4,6,6'	150	2,2',3,4',6,6'	192	2,3,3',4,5,5',6
18	2,2',5	63	2,3,4',5	105	2,3,3',4,4'	151	2,2',3,5,5',6	193	2,3,3',4,5,5',6
19	2,2',6	64	2,3,4',6	106	2,3,3',4,5	152	2,2',3,5,6,6'		
20	2,3,3'	65	2,3,5,6	107	2,3,3',4,5	153	2,2',4,4',5,5'	octaBDE	
21	2,3,4	66	2,3',4,4'	108	2,3,3',4,5'	154	2,2',4,4',5,6'	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
22	2,3,4'	67	2,3',4,5	109	2,3,3',4,6	155	2,2',4,4',6,6'	195	2,2',3,3',4,4',5,6
23	2,3,5	68	2,3',4,5'	110	2,3,3',4',6	156	2,3,3',4,4',5	196	2,2',3,3',4,4',5,6'
24	2,3,6	69	2,3',4,6	111	2,3,3',5,5'	157	2,3,3',4,4',5'	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
25	2,3',4	70	2,3',4',5	112	2,3,3',5,6	158	2,3,3',4,4',6	198	2,2',3,3',4,5,5',6
26	2,3',5	71	2,3',4',6	113	2,3,3',5',6	159	2,3,3',4,5,5'	199	2,2',3,3',4,5,5',6'
27	2,3',6	72	2,3',5,5'	114	2,3,4,4',5	160	2,3,3',4,5,6	200	2,2',3,3',4,5,6,6'
28	2,4,4'	73	2,3',5',6	115	2,3,4,4',6	161	2,3,3',4,5',6	201	2,2',3,3',4,5',6,6'
29	2,4,5	74	2,4,4',5	116	2,3,4,5,6	162	2,3,3',4',5,5'	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
30	2,4,6	75	2,4,4',6	117	2,3,4',5,6	163	2,3,3',4',5,6	203	2,2',3,4,4',5,5',6
31	2,4',5	76	2,3',4',5'	118	2,3',4,4',5	164	2,3,3',4',5',6	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
32	2,4',6	77	3,3',4,4'	119	2,3',4,4',6	165	2,3,3',5,5',6	205	2,3,3',4,4',5,5',6
33	2,3',4'	78	3,3',4,5	120	2,3',4,5,5'	166	2,3,4,4',5,6		
34	2,3',5'	79	3,3',4,5'	121	2,3',4,5',6	167	2,3',4,4',5,5'	nonaBDE	
35	3,3',4	80	3,3',5,5'	122	2,3,3',4',5'	168	2,3',4,4',5',6	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6
36	3,3',5	81	3,4,4',5	123	2,3',4,4',5'	169	3,3',4,4',5,5'	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
37	3,4,4'			124	2,3',4,5,5'			208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
38	3,4,5			125	2,3',4',5',6				
39	3,4',5			126	3,3',4,4',5			decaBDE	
				127	3,3',4,5,5'			209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'

ANNEXE 2:

Principe de la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI)

L'APPI est une technique récente sélective et sensible complémentaire de l'ESI et APCI, permettant l'analyse en spectrométrie de masse à pression atmosphérique, de composés hydrophobes, tels que les PBDE. Un flux de photons d'énergie environ égale à 10 eV est à l'origine de la formation d'un plasma d'ions qui va interagir avec les molécules d'analytes notées M. L'échantillon liquide est vaporisé à pression atmosphérique par un capillaire d'insertion chauffé, puis irradié par des photons (Fig. 24).

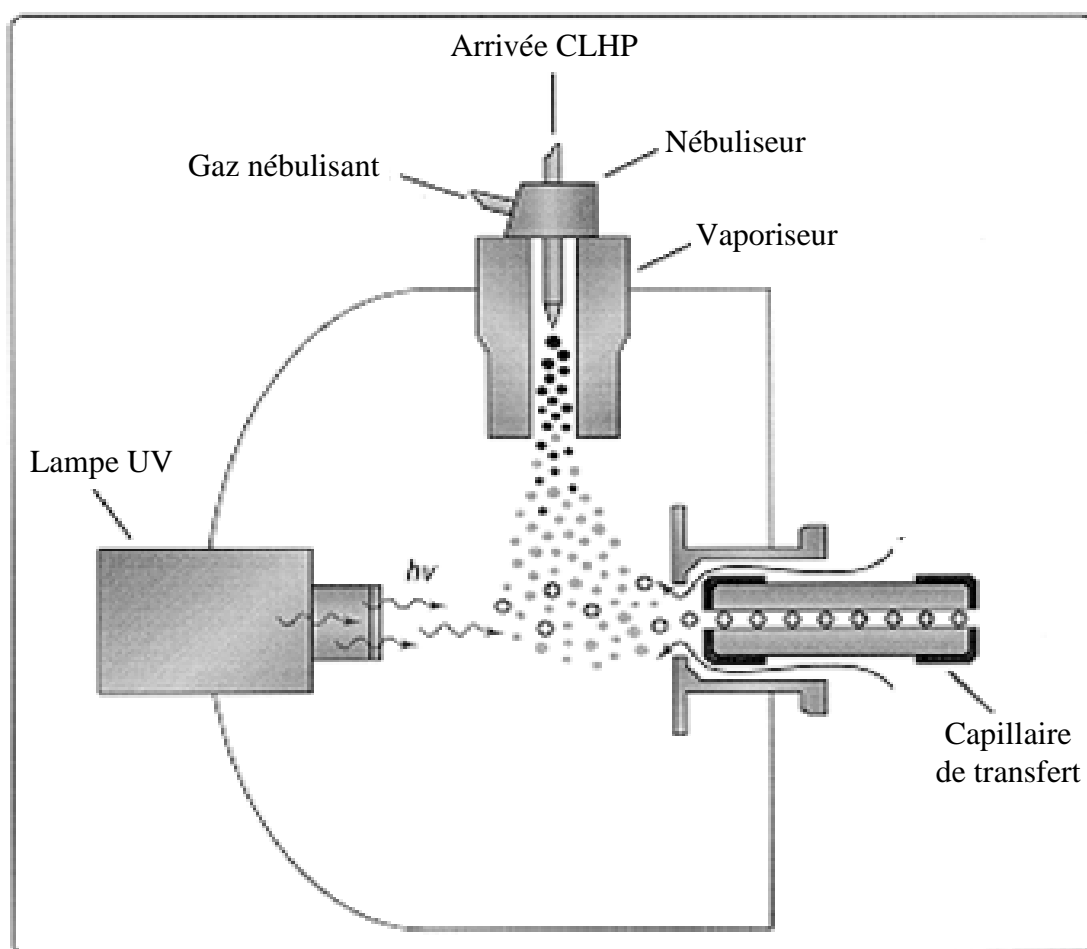


Fig. 24: Source orthogonale de photo-ionisation à pression atmosphérique

Pour être ionisé un élément doit avoir un potentiel d'ionisation inférieur à l'énergie des photons.

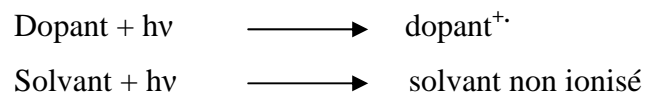


De la même façon qu'en ESI et en APCI, peu de fragmentations se produisent en source et un grand nombre de produits peut-être analysé avec une bonne sensibilité

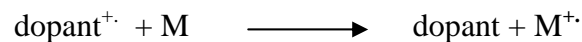
L'efficacité de la photo-ionisation directe est en fait assez faible et nécessite l'utilisation d'un dopant tel que l'Acétone ou le Toluène qui va augmenter la production d'ions au départ. Les mécanismes réactionnels d'ionisation sont encore très mal connus (que ça soit en mode positif ou négatif) et font actuellement l'objet d'études fondamentales.

Dopant : acétone, toluène : pI ~ 8-9 eV

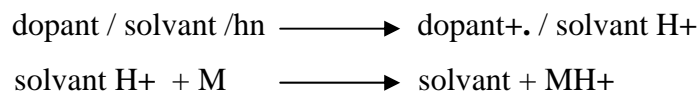
Solvant : H₂O, MeOH, MeCN : pI > 10 eV



Ionisation par transfert de charge favorisé si affinité protonique faible:



Ionisation du solvant et transfert de proton favorisé si affinité protonique élevée:



ANNEXE 3:

Publications et communications

PUBLICATIONS

- Debrauwer L., Riu A., Jouahri M., Rathahao E., Jouanin I., Antignac J.P., Cariou R., Le Bizec B., Zalko D.; *Probing new approaches using atmospheric pressure photo ionisation for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by liquid chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1082 (2005), 98-109. (Acceptée)
- Zalko D., Prouillac C., Riu A., Perdu E., Dolo L., Jouanin I., Canlet C., Debrauwer L., Cravedi JP.; *Biotransformation of the flame retardant tetrabromo-bisphenol A by human and rat sub-cellular liver fractions*, Chemosphere, 64 (2006), 318-327. (Acceptée)
- Riu A., Zalko D., Debrauwer L.; *Study of polybrominated diphenyl ethers using both positive and negative atmospheric pressure photoionization and tandem mass spectrometry*, Rapid Communication in Mass spectrometry, 20 (2006), 2133-2142. (Acceptée)
- Riu A., Debrauwer L., Garcia A., Jouanin I., Cravedi JP., Zalko D.; *Disposition of [¹⁴C]-Decabrominated diphenyl ether in pregnant Wistar rats*, Environment International, (2006). (soumise pour publication)
- D. Zalko, E. Perdu, T. Reistad, A. Riu, A. Garcia, E. Mariussen. *Biotransformation of the flame retardant tetrabromobisphenol-A by human neutrophil granulocytes*, Organohalogen Compounds (2006). (en cours de numérotation)

COMMUNICATIONS ORALES

- L. Debrauwer, A. Riu, M. Jouahri, E. Rathahao, I. Jouanin, J.P. Antignac, R. Cariou, B. LeBizec, D. Zalko.
"Probing new approaches for the analysis of brominated flame retardants and their related metabolites and/or degradation products using LC-MS."
21st LC/MS Montreux Symposium
Montreux, 10-12 Novembre 2004.
- L. Debrauwer, A. Riu, E. Rathahao, R. Cariou, J.P. Antignac, B. LeBizec, D. Zalko.
"La photo-ionisation à pression atmosphérique : une alternative pour l'analyse des retardateurs de flamme polybromés et leurs produits de dégradation ?"
1^{er} Symposium de Chimie et Biologie Analytique
Montpellier, 26-29 Septembre 2005.
- Riu A, Debrauwer L, Garcia A, Jouanin I, Cravedi JP, Zalko D
Disposition of [¹⁴C]-DBDE in pregnant rats
26TH International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants
Oslo, 21-25 Août 2006

COMMUNICATION PAR POSTERS

- L. Debrauwer, A. Riu, M. Jouahri, I. Jouanin, J.P. Antignac, R. Cariou, D. Zalko.
"New analytical approaches using LC-MS for the analysis of brominated flame retardants and their related metabolites and/or degradation products."
9th FECS Conference on Chemistry and Environment.
Bordeaux, 29 aout -1 septembre 2004.
- A. Riu, I. Jouanin, L. Debrauwer, E. Perdu-Durand, L. Dolo, D. Zalko.
"Analytical strategies for the study of tetrabromobisphenol A biotic and abiotic transformations."
9th FECS Conference on Chemistry and Environnement.
Bordeaux, 29 aout -1 septembre 2004.
- A. Riu, M. Jouahri, I. Jouanin, R. Cariou, J.P. Antignac, D. Zalko, L. Debrauwer.
"La photo-ionisation à pression atmosphérique : une alternative pour l'analyse des retardateurs de flamme polybromés par LC/MS."
21^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse.
Strasbourg, 14-17 septembre 2004.
- L. Debrauwer, A. Riu, I. Jouanin, D. Zalko.
"Investigation of atmospheric pressure photo-ionization for the analysis of polybromodiphenylethers and their related biotic or abiotic degradation products."
53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics.
San Antonio, TX, 5-9 Juin 2005.
- L. Debrauwer, A. Riu, D. Zalko.
"Development of an LC-MS method using APPI for the analysis of highly brominated polybromodiphenylether congeners."
2nd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis.
Prague, 2-4 novembre 2005.
- L. Debrauwer, A. Riu, R. Cariou, J.P. Antignac, B. Le Bizec, D. Zalko.
"Mass Spectrometric Analysis of Highly Brominated PBDE Congeners in Adipose Tissues Using GC-EI-HRMS and LC-APPI-MS/MS : a Comparative Study."
17th International Mass Spectrometry Conference.
Prague, 27 Aout - 1^{er} septembre 2006.
- A. Riu, D. Zalko, L. Debrauwer.
"Identification de métabolites de retardateurs de flamme polybromés formés in vivo ou in vitro."
23^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse.
Nantes, 11-14 septembre 2006.

DEVENIR DES RETARDATEURS DE FLAMMES BROMÉS CHEZ LE RAT ET L'HOMME: CARACTÉRISATION DES MÉTABOLITES ET ÉVALUATION DE L'EXPOSITION FŒTALE

Les retardateurs de flammes bromés (RFB) sont des composés chimiques incorporés dans différents matériaux (plastiques, textiles) pour leur conférer des propriétés ignifuges. Les plus couramment utilisés dans le monde sont le tétrabromobisphénol A et le décabromodiphényle éther. Ces polluants retrouvés dans l'environnement, chez l'animal et chez l'homme, sont susceptibles de jouer un rôle dans la perturbation des fonctions endocrines. Cependant, les données permettant d'évaluer le risque qu'ils représentent pour la santé humaine sont peu nombreuses. Compte tenu de ces éléments, des études de métabolisme du tétrabromobisphénol A et du décabromodiphényle éther ont été réalisées *in vitro* chez le rat et l'homme, et *in vivo* chez des rates gestantes. Le développement de méthodes analytiques appropriées a permis de quantifier puis d'identifier les produits de biotransformation de ces deux RFB, et de donner accès à des informations relatives à l'exposition fœtale chez le rat. La complexité structurale des RFB et leurs biotransformations chez l'homme jouent vraisemblablement un rôle important dans l'expression de leur toxicité.

Mots clés : Retardateurs de flammes bromés, biotransformations, métabolisme, rat, Homme, fœtus, perturbateurs endocriniens, *in vivo*.

METABOLIC FATE OF BROMINATED FLAME RETARDANTS IN RAT AND IN HUMAN: STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF BIOTRANSFORMATION PRODUCTS AND EVALUATION OF FOETAL EXPOSURE

Brominated flame retardants (BFR) are chemical compounds widely used for the manufacture of different equipments (plastics, textiles...), to prevent fire damage. Tetrabromobisphenol A and decabromodiphenyl ether are the largest sell BFR worldwide. These pollutants are found in the environment, in animals and in human. They could act as endocrine disruptors. Due to the limited amount of information available, it is currently difficult to assess the threat associated with human exposure to brominated flame retardants, one major knowledge gap being the lack of data regarding the metabolic fate of these compounds. We carried out detailed *in vivo* studies in pregnant rats, and compared human/rat metabolic *in vitro* studies, to investigate the biotransformation of tetrabromobisphenol A and decabromodiphenyl ether. Our results show that the biotransformations of BFR are a key point to understand their potential toxicity towards human.

Key Words: Brominated flame retardants, biotransformation, metabolism, rat, Human, foetus, endocrine disrupters, *in vivo*.