



Identification de substances chimiques à activité de perturbation endocrinienne dans des matrices environnementales : développement d'une approche couplant tests biologiques *in vitro* et méthodes physico-chimiques d'analyse

Nom du doctorant : Saïd KINANI - said@dcmr.polytechnique.fr

Thèse suivie à l'INERIS par : S. AÏT-AÏSSA (Direction des Risques Chroniques)

Directeur de thèse : S. BOUCHONNET (Département de Chimie, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, Ecole Polytechnique de Palaiseau)

Généralités

Les effets des polluants chimiques sur les systèmes endocriniens sont devenus une préoccupation majeure en toxicologie environnementale et humaine. Les polluants perturbateurs endocriniens peuvent potentiellement agir sur l'ensemble des étapes de la régulation endocrine depuis la synthèse des hormones jusqu'à la réponse des cellules cibles (Kavolock *et al.*, 1996) et causer des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou de sa descendance à la suite de changements de la fonction endocrine (OCDE, 1997). Un des mécanismes d'action les plus étudiés réside dans leur capacité à se fixer aux récepteurs hormonaux, comme le récepteur des oestrogènes (ER), des androgènes (AR) ou de la dioxine (AhR), et à moduler les réponses des cellules cibles médiées par ces récepteurs.

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont des substances d'origines et de classes chimiques très diverses : stéroïdes naturels et synthétiques, retardateurs de flammes, pesticides, alkylphénols, phtalates, etc. ; ils contaminent divers compartiments de l'environnement aquatique.

Objectif et démarche

L'objectif de cette thèse est de mettre en place une méthodologie permettant d'isoler et d'identifier des molécules à activité PE dans des mélanges complexes (effluents, eaux de surface, sédiments, etc.). Pour cela, une approche combinant outils bio-analytiques (tests *in vitro*, récepteur recombinant fixé sur colonne) et méthodes physico-chimiques d'analyse (chromatographie, spectrométrie de masse) est proposée. A chaque étape de concentration et de fractionnement de l'échantillon par chromatographie semi-préparative, l'activité biologique sera suivie par des tests *in vitro*, orientant ainsi l'isolement des molécules actives et facilitant leur identification par des méthodes physico-chimiques.

État de l'avancement des travaux

Pour répondre aux objectifs de la thèse, une importante étude bibliographique nous a permis d'établir la liste de molécules ("standards") devant être séparées par chromatographie liquide semi-préparative. Cette liste recense des composés parmi les produits à caractère PE les plus fréquemment retrouvés dans l'environnement, à savoir les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les stéroïdes naturels et synthétiques, les alkylphénols, les polybromodiphényl éthers (PBDE), les polychlorobiphényles (PCB), les pesticides, ainsi que certains polluants émergents tels que les filtres anti-UV (dérivés de benzophénone), les prabènes, les phyto-oestrogènes et les mycotoxines.

Méthode de fractionnement

L'appareil de chromatographie semi-préparative utilisé est de marque Varian ; il comporte un passeur d'échantillons, une pompe ternaire, un détecteur UV et un collecteur de fractions nécessaire à la récupération des fractions sortantes de la colonne chromatographique. La colonne la plus appropriée au vu des propriétés physico-chimiques de nos produits est une colonne apolaire de type C18. La colonne choisie est la "Poursuit-C18" (250 x 4,6 mm, 5 µm) de la société Varian.

Pour optimiser notre méthode de fractionnement, un mélange de PE a été préparé à différentes concentrations. Plusieurs programmations d'élution ont été testées. Le méthanol, l'acétonitrile et l'eau ont été utilisés comme solvants d'élution ; ils ont été testés à différents gradients. La méthode la plus performante en termes de séparation chromatographique implique un mélange binaire eau/acétonitrile ; elle est décrite ci-dessous (Tableau 2). Le détecteur UV a été utilisé à une longueur d'onde de 280 nm.

Temps (min)	Débit (mL/min)	% ACN	% H ₂ O
0,00	1	80	20
10,00	1	80	20
60,00	1	55	45
100,00	1	0	100
110,00	1	0	100
100,01	1	20	20
125,00	1	20	20

Tableau 2 : Paramètres de séparation chromatographique

Un test de faisabilité de notre approche est nécessaire préalablement à l'étude d'échantillons réels. Un mélange de 30 PE a été fractionné. Le chromatogramme résultant est comparé aux résultats des tests bio-analytiques réalisés sur chaque fraction (cellules MELN, activité oestrogénique). Les résultats sont très satisfaisants, car ils montrent une bonne corrélation entre la séparation chromatographique (fractions récupérées) et l'activité biologique.

Développement des méthodes de séparation chromatographique et de détection par spectrométrie de masse

Polybromodéphenyl ethers (PBDE) :

Plusieurs méthodes de détection des PBDE ont été développées et comparées, certaines sur des spectromètres de type simple quadripôle et trappe ionique (financièrement les plus abordables sur le marché actuel), d'autres sur un spectromètre de type triple quadripôle (a priori le plus performant dans ce contexte analytique).

Nos résultats montrent sans ambiguïté la supériorité des méthodes réalisées en SIM et MRM, en termes de sensibilité, de répétabilité et de reproductibilité. La méthode de SIM est plus sensible mais moins sélective que la méthode de MRM. Le choix pourra judicieusement s'opérer lorsque l'on disposera d'un protocole d'extraction valide.

Hydrocarbures aromatiques polycyclique (HAP) :

Une méthode de couplage GC-MS (Saturn 2000, Varian) en mode balayage (ou "Fullscan") avec impact électronique à 70 eV a été développée. La méthode est très sensible et permet la détection et la quantification des 16 HAPs prioritaires à des seuils inférieurs à 5 ng/mL (Liste EPA : Environmental Protection Agency).

Oestrogènes naturels et synthétiques :

Une méthode de détection et de quantification des œstrogènes (E1, (α,β)-E2, E3, EE2, E3, Mestranol et Diéthylstilbestrol) a été développée. Les œstrogènes sont chimiquement dérivés avec un mélange BSTFA (1 % TMCS) : Pyridine (1 :1, v/v) avant d'être analysés par GC-MS/MS (Saturn 2000, Varian) en impact électronique à 70 eV. Le seuil de détection est inférieur à 10 ng/mL.

Pour éviter la dérivation chimique et améliorer le seuil de détection, une seconde méthode d'analyse par MS/MS a été développée. Les œstrogènes sont séparés par chromatographie liquide (HPLC) avec une colonne Pursuit-C18 (2 x 125 mm, 5 μ m) avant d'être détectés avec un spectromètre type Q-ToF (Micromass, Waters). Le mode d'ionisation utilisé est l'électrospray en mode négatif. Les seuils de détection sont 10 fois inférieurs à ceux obtenus en GC-MS/MS.