

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ANALYSE DE CONTAMINANTS ENVIRONNEMENTAUX ET LEURS MÉTABOLITES
DANS L'URINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA
SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ(E)

COMME EXIGENCE PARTIELLE

À LA MAITRISE EN CHIMIE

PAR

IKRAM BENHADJI SERRADJ

JUIN 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers ma directrice de recherche, professeure Lekha Sleno, pour son soutien indéfectible tout au long de mes études et de ma recherche. Sa confiance en moi et son ouverture envers son laboratoire ont été des éléments clés de ma réussite. Sa générosité intellectuelle, sa disponibilité et sa passion pour la science ont été une source constante de motivation et d'inspiration pour moi. Je lui suis extrêmement reconnaissante de m'avoir permis d'apprendre auprès d'elle et d'avoir partagé son expertise.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux professeurs Jacques Lesage et Isabelle Marcotte pour avoir consacré leur temps et leur expertise à l'évaluation de mon travail.

Je souhaite également exprimer ma gratitude envers tous les membres de laboratoire pour leur accueil chaleureux, leur soutien. Leur expertise et leurs conseils ont contribué de manière significative à l'avancement de ma recherche. Je tiens tout particulièrement à exprimer ma gratitude à mon amie et collègue qui m'a accueillie en tant que stagiaire Ons Ousji. Nous avons partagé nos réussites, célébré nos avancées et soutenu l'un l'autre.

Je tiens à adresser un remerciement spécial à ma famille autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance pour votre soutien constant et votre amour inconditionnel tout au long de cette période. Malgré la distance, Votre présence morale et vos attentions m'ont apporté un réconfort précieux et m'ont encouragée à persévérer dans la réalisation de mes objectifs.

Je tiens à prendre un moment pour exprimer mes sincères remerciements à mon fiancé Wasim qui a été toujours mon pilier, mon meilleur ami et mon soutien indéfectible.

Enfin, je souhaite dédier cette recherche en mémoire à ma regrettée cousine et meilleure amie Loubna Benachenhou, une personne chère à mon cœur. Tu resteras à jamais dans mes pensées et dans mon cœur. Je sais que tu me regardes de là-haut et que tu es fière de moi. Repose en paix je t'aime.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	9
RÉSUMÉ.....	11
ABSTRACT	12
CHAPITRE 1	13
Introduction	13
1.1 Les xénobiotiques	14
1.1.1 Les plastifiants	15
1.1.2 Les pesticides	17
1.1.3 Les antioxydants synthétiques.....	19
1.1.4 Les produits pharmaceutiques et de soins personnels.....	20
1.2 Métabolisme d'un xénobiotique dans le foie.....	22
1.3 L'urine comme matrice biologique	23
1.4 Méthodes d'analyse LC-MS/MS	23
1.5 Objectifs de l'étude.....	28
CHAPITRE 2	30
La méthode ciblée développée d'analyse de contaminants d'intérêt	30
2.1 Composés d'intérêt	30
2.2 Méthode d'analyse ciblée LC-MRM.....	34
2.3 Traitement de données	37
CHAPITRE 3	42
Développement d'une méthode d'extraction pour les contaminants environnementaux	42
3.1 Matériels et méthodes	43
3.1.1 Produits chimiques.....	43
3.1.2 La matrice biologique	43
3.2 Les méthodes d'extraction utilisées.....	44
3.2.1 La mini-QuEChERS.....	44

3.2.2	Extraction en phase solide SPE.....	46
3.2.3	La précipitation des protéines	47
3.3	Résultats.....	48
3.3.1	La méthode d'extraction mini-QuEChERS	49
3.3.1.1	Solvant d'extraction	49
3.3.1.2	Optimisation de la poudre d'extraction.....	50
3.3.1.3	Poudre d-SPE	51
3.3.1.4	Validation de la méthode mini-QuEChERS.....	53
3.3.2	Extraction en phase solide (SPE).....	55
3.3.3	Comparaison des méthodes optimisées de précipitation de protéines et d'extraction sur phase solide	56
CHAPITRE 4		58
Analyse de contaminants environnementaux dans l'urine par LC-MS/MS ciblé et non ciblé		58
4.1	Matériels et méthodes	59
4.1.1	Produits chimiques	59
4.2	Méthodes utilisées	59
4.2.1	Préparation d'échantillons.....	59
4.2.2	Les incubations de métabolisme <i>in vitro</i>	61
4.2.3	Méthodes d'analyse.....	63
4.2.3.1	Analyse non-ciblée par LC-HRMS/MS	63
4.2.4	Traitement de données	64
4.3	Résultats de l'analyse des échantillons avec et sans hydrolyse par méthode ciblée	65
4.4	Identification de contaminants environnementaux dans l'urine par screening non-ciblé	68
4.5	Identification de contaminants environnementaux et leurs métabolites dans l'urine par dépistage non ciblé à l'aide de base de données spectrales.....	76
CONCLUSION		83
ANNEXE		86
BIBLIOGRAPHIE		89

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Schéma général des différentes caractéristiques de l'exposome (Wild, 2012).....	14
Figure 1.2 Utilisation mondiale des plastiques par secteur industriel (Fuhr & Franklin, 2020)....	15
Figure 1.3 Structures chimiques du bisphénol A (BPA), et plusieurs exemples de ses dérivés, incluant le bisphénol F (BPF), bisphénol S (BPS), cumylphénol (CUMY), tetraméthylbisphénol F (TMBPF) et bisphénol AF (BPAF).....	17
Figure 1.4 Structures chimiques d'antioxydants synthétiques utilisés en industrie et sujet de cette étude; butylhydroxytoluène (BHT), butylhydroxyanisole (BHA), tert-butylhydroquinone (TBHQ), di-tert-butylphénol (DBP, métabolite du BHT), gallate de propyle (PG), gallate d'éthyle (EG), gallate de butyle (BG).....	20
Figure 1.5 Structures chimiques de l'oxybenzone (OXY) et le triclosan (TCS)	21
Figure 1.6 Structures de médicaments inclus dans la méthode d'analyse ciblée : acétaminophène (APAP), sulfaméthoxazole (SULFA), carbamazépine (CARBA), caféine (CAF), ibuprofène (IBU), éthinylestradiol (EE), estrone (EN), estradiol (ES), diclofénac (DICLO), triméthoprim (TRIM), bupropion (BUP), hydroxy-bupropion (OH-BUP).....	22
Figure 1.7 Schéma du métabolisme des xénobiotiques par les voies de phase I et II dans le foie	23
Figure 1.8 Schéma simplifié d'un système LC-MS/MS	25
Figure 1.9 Schéma du mode MRM dans un triple quadripôle, où plusieurs ions précurseurs rentrent dans le premier quadripôle (Q1). Le précurseur de l'analyte d'intérêt est sélectionné et envoyé à la cellule de collision (q2) et un fragment spécifique est filtré par le deuxième analyseur (Q3)	26
Figure 1.10 Schéma général d'un spectromètre de masse en tandem quadripôle-temps de vol (QqTOF).....	27
Figure 2.1 Spectres MS et MS/MS, ainsi qu'un chromatogramme LC-MRM de l'oxybenzone montrant le choix des deux transitions MRM de m/z 229-151 et m/z 229-105.....	37
Figure 3.1 Protocole de base de la méthode QuEChERS	44
Figure 3.2 Protocole utilisé d'extraction sur phase solide	47
Figure 3.3 Protocole utilisé pour la précipitation des protéines.....	48
Figure 3.4 Les différentes tendances de rendements d'extraction avec différents pourcentages d'acide acétique (AA), en utilisant la condition de 0% AA comme référence (100%)	49
Figure 3.5 Pourcentages de rendement avec les différentes poudres d'extraction.....	50

Figure 3.6 Pourcentages de rendement avec les différentes poudres de purification avec la méthode mini- QuEChERS méthode 1	Erreur ! Signet non défini.
Figure 3.7 Pourcentages de rendement avec les différentes poudres de purification avec la méthode mini- QuEChERS méthode 2	52
Figure 3.8 Protocole mini-QuEChERS optimisé	53
Figure 3.9 Rendements d'extraction des contaminants dans l'urine avec la méthode optimisée de mini-QuEChERS	54
Figure 3.10 Rendements d'extraction des contaminants dans l'urine avec différentes cartouches SPE	55
Figure 3.11 Rendements d'extraction des contaminants dans l'urine avec la méthode SPE et la avec la méthode protéine précipitation.....	57
Figure 4.1 Les étapes de préparation des échantillons d'urine, incluant l'étape d'hydrolyse A,B,C	61
Figure 4.2 Protocole de préparation d'échantillons pour la formation de métabolites <i>in vitro</i>	63
Figure 4.3 Flux de travail de la méthode ciblée pour les échantillons d'urine	65
Figure 4.4 Prévalence des composés détectés par LC-MRM dans 16 échantillons d'urine (avec ou sans hydrolyse).....	66
Figure 4.5 Quatre composés ciblés (BHA, TCS, BPS, CAF) détectés dans les échantillons d'urine de 16 personnes différents, montrant la variance de leur détection par LC-MRM et l'effet de l'hydrolyse.....	67
Figure 4.6 Chromatogramme de triclosan des échantillons préparés avec ou sans hydrolyse (en présence de β -glucuronidase et d'aryl-sulfatase) par LC-MRM.....	68
Figure 4.7 Chromatogramme d'ion extrait de l'échantillon du OXY et les métabolites glucuronidés détectés dans l'échantillon contrôle et pic d'OXY parent avec hydrolyse	69
Figure 4.8 Chromatogrammes d'ions extraits de l'APAP parent et les métabolites glucuronidé et sulfaté, ainsi que l'adduit NAC et cysteine détectés dans un échantillon d'urine sans et avec le traitement d'hydrolyse.....	70
Figure 4.9 Chromatogrammes des ions extraits des métabolites du BPS formés dans l'échantillon de contrôle, et le BPS détecté dans l'échantillon avec hydrolyse	71
Figure 4.10 Chromatogrammes des ions extraits des métabolites du BHA formés dans l'échantillon A) contrôle et B) après traitement d'hydrolyse, avec le schéma de formation des métabolites de BHA trouvés dans les échantillons d'urine	72

Figure 4.11 Chromatogramme d'ion extrait de BPAF dans l'échantillon contrôle (a) et après hydrolyse (b)	73
Figure 4.12 Chromatogrammes des ions extraits des métabolites du BPF dans un échantillon urinaire avec et sans hydrolyse.....	74
Figure 4.13 Chromatogrammes des ions extraits des métabolites glucuronide et sulfatés du EG formé dans l'échantillon contrôle et dans l'échantillon hydrolysé	75
Figure 4.14 Chromatogrammes des ions extraits de métabolites glucuronide (TCS+gluc) et formés dans l'échantillon A) contrôle et TCS parent dans l'échantillon B) avec hydrolyse	76
Figure 4.15 Le flux de travail pour la production de notre base de données spectrales à l'aide d'incubations <i>in vitro</i> et l'identification de contaminants environnementaux et leurs métabolites dans l'urine par dépistage non ciblé automatisé	77
Figure 4.16 Chromatogramme des métabolites issus des incubations <i>in vitro</i> d'éthinylestradiol avec les microsomes de rat, en présence de NADPH et NAC (en haut) et NADPH et UDPGA (en bas)	78
Figure 4.17 Schéma des voies possibles pour la formation des métabolites de BHT trouvés dans les échantillons d'urine.....	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 Exemple de pesticides et leurs applications	19
Tableau 1-2 Comparaison entre les analyseurs quadripolaires et temps de vol pour l'analyse ciblée et non-ciblée dans le cadre de ce mémoire	26
Tableau 2-1 Liste des 32 composés ciblés, leurs formules chimiques, masses molaires moyennes et structures	31
Tableau 2-2. Les composés chimiques, et leurs concentrations respectives, présents dans le mélange de 32 standards	34
Tableau 2-3 Conditions chromatographiques des méthodes d'analyse ciblée LC-MRM.....	35
Tableau 2-4 Liste de composés analysés en mode positif avec la méthode 1, incluant leur temps de rétention et leurs transitions MRM avec les énergies de collision (CE) optimisées	38
Tableau 2-5 Liste de composés analysés en mode négatif avec les méthodes 1 ou 2, incluant leur temps de rétention et leurs transitions MRM avec les énergies de collision (CE) optimisées	39
Tableau 3-1 Résumé de expériences d'optimisation de la méthode mini-QuEChERS	45
Tableau 4-1 Représente les groupes d'incubation pour l'étude du métabolisme <i>in vitro</i> des contaminants ciblés.....	62
Tableau 4-2 Conditions chromatographiques des méthodes d'analyse non ciblée.....	64
Tableau 4-3 Liste des métabolites détectés dans les 85 échantillons d'urine non hydrolysés et la fréquence qu'ils ont été identifiés par comparaison de spectres MS/MS de la base de données.....	80

LISTE DES ABRÉVIATIONS. DES SIGLES ET DES ACRONYMES

Acétaminophène	APAP
ACN	Acétonitrile
ACT	Acétochlore
AF	Acide Formique
ATZ	Atrazine
BG	Butyle gallate
BHA	Hydroxyanisole butylé
BHT	Hydroxytoluène butylé
BPA	Bisphénol A
BPAF	Bisphénol AF
BPAP	Bisphénol AP
BPF	Bisphénol F
BPS	Bisphénol S
BUP	Bupropion
CAF	Caféine
CE	Énergie de collision
CLP	Chlorpyrifos
CUMY	Cumylphénol
DBP	Di-tert-butylphénol
DDA	Acquisition dépendante des données (<i>data-dependent acquisition</i>)
DIA	Acquisition indépendante des données (<i>data-independent acquisition</i>)
DICLO	Diclofénac
EE	Éthinylestradiol
EG	Éthyle gallate
EN	Estrone
ES	Estradiol
ESI	Électronébulisation (<i>electrospray</i>)
GCB	Noir de carbone graphite
G6P	Glucose-6-phosphate
G6PDH	Glucose-6-phosphate déhydrogénase
HLM	Microsomes de foie humain (Human liver microsomes)

HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution (<i>High resolution mass spectrometry</i>)
IBU	Ibuprofène
LC-HRMS/MS	Chromatographie liquide spectrométrie de masse en tandem à haute résolution (<i>Liquid chromatography high-resolution tandem mass spectrometry</i>)
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
MeOH	Méthanol
MET	Métolachlore
MRM	Méthode à réactions multiples (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NAC	N-acétyl-L-cystéine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OH-BUP	OH-bupropion
OXY	Oxybenzone
PG	Propyl gallate
PG	Gallate de propyle
PSA	Amine secondaire primaire
Qqq	Triple quadripôle
Qqtof	Quadripôle-temps de vol (<i>Quadrupole time of flight</i>)
QTRAP	Quadripôle-trappe ionique linéaire
QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe
RLM	Microsomes de foie de rat (<i>Rat liver microsomes</i>)
SIM	Simazine
SPE	Extraction en phase solide (<i>Solid phase extraction</i>)
SULFA	Sulfaméthoxazole
TBHQ	Tert-butylhydroquinone
TCS	Triclosan
TMBPF	Tetraméthylbisphénol F
TOF	Temps de vol (<i>Time of flight</i>)
TRIM	Triméthoprim
UDPGA	Uridine 5'-diphosphate acide glucuronique
UHPLC	Chromatographie liquide ultra-haute performance (<i>Ultrahigh performance liquid chromatography</i>)

RÉSUMÉ

L'exposome désigne l'ensemble des expositions environnementales qui induisent des réponses biologiques chez l'individu tout au long de sa vie. L'évolution de l'exposome est influencée par la présence de substances xénobiotiques dans notre environnement, comprenant des produits synthétiques issus de l'industrie agrochimique et pharmaceutique, des additifs alimentaires, des produits de soins personnels et des plastifiants.

Dans notre étude, nous avons développé une méthode ciblée pour détecter plus de 30 contaminants environnementaux dans des échantillons d'urine de volontaires, en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem à réaction multiples (LC-MRM). Une hydrolyse enzymatique avec la β -glucuronidase et la sulfatase a été réalisée pour cliver les conjugués glucuronidés et sulfatés présents dans l'urine, suivie d'une précipitation des protéines avant la séparation chromatographique. La méthode LC-MRM bimodale a été développée pour cibler les composés parents avant et après l'hydrolyse enzymatique. De plus, une analyse non ciblée a été effectuée à l'aide d'une plateforme LC-MS/MS à haute résolution pour détecter les contaminants et leurs métabolites. Afin de détecter les composés parents, de nombreux métabolites conjugués ont été clivés. Pour l'analyse non ciblée, une base de données spectrales des métabolites de ces contaminants a été créée en incubant *in vitro* les composés d'origine avec des microsomes hépatiques et les cofacteurs nécessaires. Cette bibliothèque de métabolites a été utilisée pour analyser les échantillons d'urine afin d'identifier les composés parents et leurs métabolites.

Ce travail de recherche nous a permis de mettre en place une méthode ciblée et une approche non ciblée pour détecter et caractériser les contaminants environnementaux et leurs métabolites dans les échantillons d'urine. Ces résultats contribuent à une meilleure évaluation de l'exposome et de son évolution dans le contexte des xénobiotiques présents dans notre environnement.

Mots clés :

Exposome, xénobiotiques, contaminants environnementaux, métabolites, urine, spectrométrie de masse, chromatographie liquide, analyse ciblée et non-ciblée.

ABSTRACT

The exposome refers to the cumulative environmental exposures that induce biological responses in an individual throughout their lifetime. The evolution of the exposome is influenced by the presence of xenobiotic substances in our environment, including synthetic products from the agrochemical and pharmaceutical industries, food additives, personal care products, and plasticizers.

In our study, we developed a targeted method to detect over 30 environmental contaminants in urine samples from volunteers using liquid chromatography coupled with multiple reaction monitoring tandem mass spectrometry (LC-MRM). Enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase and sulfatase was performed to cleave the glucuronide and sulfate conjugates present in the urine, followed by protein precipitation prior to chromatographic separation. The bimodal LC-MRM method was developed to target the parent compounds before and after enzymatic hydrolysis. Additionally, untargeted analysis was conducted using a high-resolution LC-MS/MS platform to detect the contaminants and their metabolites. Numerous conjugated metabolites were cleaved to detect the parent compounds. An in-house MS/MS spectral database of metabolites for these contaminants was created by incubating the original compounds with liver microsomes and the necessary cofactors *in vitro*. This library was used to screen for the presence of the parent compounds and their *in vitro* metabolites in urine samples without the hydrolysis step.

This research allowed us to establish a targeted method and an untargeted approach to detect and characterize environmental contaminants and their metabolites in urine samples. These results contribute to a better understanding of the exposome and its evolution in the context of xenobiotics present in our environment.

Keywords:

Exposome, xenobiotics, environmental contaminants, metabolites, urine, mass spectrometry, liquid chromatography, targeted and untargeted analysis.

CHAPITRE 1

Introduction

L'exposition environnementale est une entité dynamique et variable ayant un impact significatif à la fois sur la santé humaine et sur notre environnement. Actuellement, de nombreuses recherches sont menées qui illustrent ces expositions dans le domaine de la santé, de la toxicologie et de l'épidémiologie environnementale. (Biborchi, 2023)

L'exposome englobe toutes les expositions environnementales ainsi que les réponses biologiques qui accompagnent l'individu au courant de la vie et qui ne sont pas génétiques. (Miller, 2014) Ce concept a été défini, il y a plus de dix ans, par le directeur du Centre International de Recherche sur le Cancer, Christopher Wild. (Wild, 2012) L'exposome évolue dans le temps en fonction des facteurs d'exposition auxquels nous sommes confrontés. L'exposome inclut les expositions endogènes (par exemple, les hormones, un déséquilibre glycémique) et exogènes (pollution, radiation, pesticides, produits pharmaceutiques, *etc.*), mais aussi le mode de vie (régime alimentaire, exposition à l'alcool, le tabac, *etc.*). (Athersuch, 2012)

Certaines de ces expositions peuvent être liées aux xénobiotiques telles que les médicaments, les pesticides, et les produits spécifiques issus de notre profession ou mode de vie. En outre, selon l'endroit où nous vivons, nous serons soumis à des expositions caractéristiques. Par exemple, les personnes vivant à proximité des terres agricoles sont plus susceptibles d'être exposées directement aux pesticides. De même, les individus vivant sur des continents différents n'auront pas les mêmes habitudes alimentaires et ne seront donc pas exposés aux mêmes produits. De plus, l'exposome dépend de la réaction immunitaire suite aux multiples expositions externes et celles-ci diffèrent d'une personne à une autre. Par exemple, une exposition environnementale peut causer des dommages au niveau de l'ADN, et affecter l'expression d'un gène. Les mécanismes de réparation peuvent varier selon le mode de vie (activités sportives, physiques et saines habitudes de vie), des facteurs de stress et des processus endogènes. Ces derniers produisent de nombreux sous-produits pouvant influencer l'état de santé. Par exemple, des réactions biochimiques peuvent générer des

radicaux libres pouvant endommager les macromolécules, mais aussi agir sur des molécules de signalisation impliquées dans certaines maladies inflammatoires chroniques. (Vieujean, 2022)

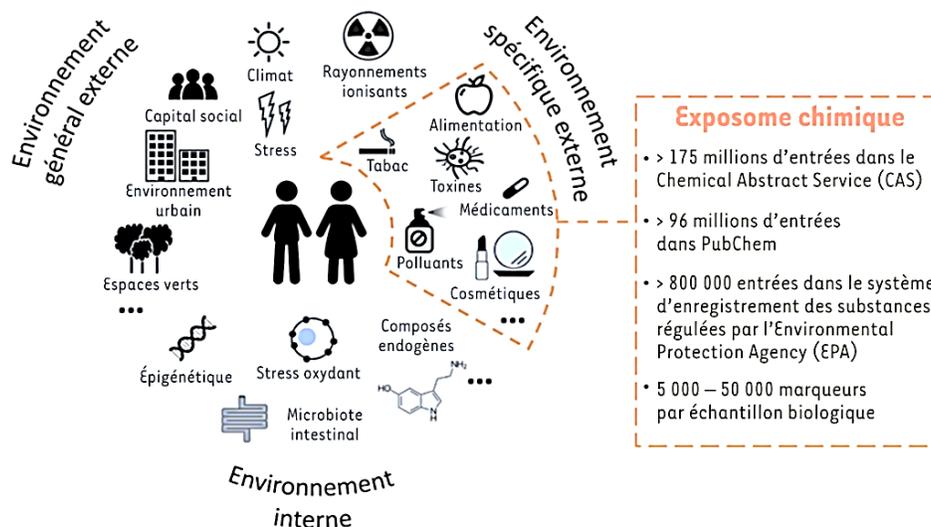


Figure 1.1 Schéma général des différentes caractéristiques de l'exposome (Wild, 2012)

1.1 Les xénobiotiques

Le terme « xénobiotique » désigne une substance étrangère à l'organisme, par opposition aux composants endogènes. (Buatois, 2014) Les xénobiotiques comprennent les médicaments, les produits chimiques industriels, les poisons naturels et les polluants environnementaux. Ils sont généralement de nature organique, et peuvent exercer des effets toxiques en fonction de la durée et la dose d'exposition. (Duarte, Huc et al., 2019) Ils ne sont ni produits par l'organisme ni issus d'une alimentation naturelle. Les xénobiotiques pénètrent dans l'organisme notamment par ingestion, inhalation, absorption cutanée ou par injection. Certains xénobiotiques ont peu d'effets mesurables sur la santé humaine, alors que d'autres sont toxiques, mutagènes, cancérigènes ou encore de puissants perturbateurs endocriniens.

Ce projet de recherche traite principalement sur les xénobiotiques provenant de différentes catégories, tel que les plastifiants, les produits de soin personnels, les médicaments, les additifs

alimentaires et les pesticides. Ces composés peuvent entraîner une exposition volontaire ou non, et influencer notre santé.

1.1.1 Les plastifiants

Pendant la Deuxième Guerre mondiale, l'essor de l'industrie de plastiques a conduit à la production de nombreux produits chimiques. Environ 70 000 produits ont été utilisés à des fins commerciales au Canada (Santé Canada, 2023). Au fil du temps, un bon nombre de ces produits chimiques, y compris les plastifiants (phthalates et le bisphénol A), se sont retrouvés dans l'environnement. (Balicco, 2017) Les plastifiants se caractérisent par l'ajout d'une substance à un autre matériau afin d'augmenter sa souplesse, sa flexibilité, et sa résistance. La Figure 1.2 illustre la répartition des plastiques produits dans le monde selon les différents secteurs industriels.

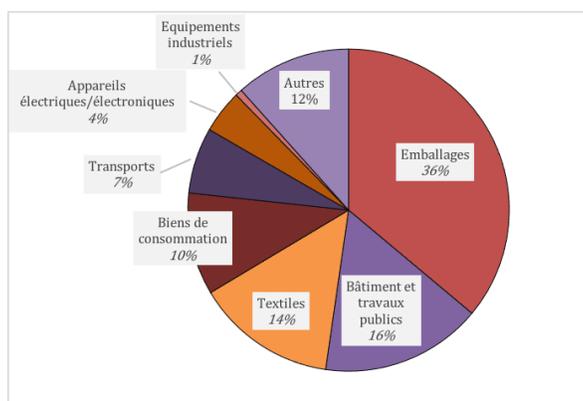


Figure 1.2 Utilisation mondiale des plastiques par secteur industriel (Fuhr & Franklin, 2020)

Le bisphénol A (BPA) est un exemple d'un composé chimique utilisé dans la synthèse de plastiques et de résines. Il est présent dans de nombreux produits dans notre quotidien, dont les contenants alimentaires. Ainsi, il peut être ingéré par le consommateur. (Balaguer, 2022) Le BPA est un œstrogène mimétique, c'est-à-dire qu'il a la capacité de se lier aux récepteurs alpha et bêta des œstrogènes. Depuis quelques années, la communauté scientifique est animée d'un débat sur les risques liés à l'exposition à de faibles doses de BPA dans les produits de consommation courante. En tant que perturbateur endocrinien, il est impliqué dans l'apparition de troubles de reproduction,

l'obésité, le diabète, les dysfonctionnements thyroïdiens et les cancers du sein ou de la prostate, cependant les données disponibles à ce jour n'ont pas permis d'affirmer sa cancérogénicité (Balaguer, 2022). Selon des études expérimentales sur des animaux, le BPA serait à l'origine d'un large éventail d'effets néfastes sur la santé. Des résultats similaires ont été obtenus chez l'homme suite à une exposition au BPA dans des études épidémiologiques (Trasande, 2012), avec une association entre les niveaux urinaires de BPA et des mesures d'obésité chez les adultes aux États-Unis. En octobre 2008, le Canada a été le premier pays à interdire l'utilisation du BPA dans les biberons en réaction à un rapport sur le BPA du National Toxicology Program (Environnement Canada, 2008) (Shelby et CERHR, 2008) suivi par l'UE et les États-Unis en 2011 et 2013, respectivement. (Kubwabo, 2009; National Institute of Environmental Health Sciences, 2010) La France est le seul pays à interdire l'utilisation du BPA dans les revêtements des boîtes de conserve (European Commission, 2011).

D'autres études récentes font état d'une exposition généralisée à une variété de produits chimiques présentant une similarité structurelle ou fonctionnelle avec le BPA, souvent appelé analogues ou dérivés du BPA (Figure 1.3). (Cacho, 2012) Ces analogues du BPA ont été détectés dans des denrées alimentaires (Zhou, 2013), la poussière domestique (Liao, 2012), les sédiments fluviaux et lacustres (Liao, 2012), les produits de soins personnels (Liao, 2014) et le papier thermique. (Becerra, 2013) Bien que ces analogues aient été proposés comme des alternatives moins dangereuses que le BPA, des études récentes ont montré que certains d'entre eux peuvent avoir des effets similaires ou même plus nocifs que le BPA. Par exemple, le BPS a des effets sur la reproduction et le développement chez les animaux, tandis que le BPF cause des troubles métaboliques, tels que l'obésité et le diabète. Il est important de noter que ces analogues ont également été détectés dans des échantillons biologiques humains. (Cacho, 2012)

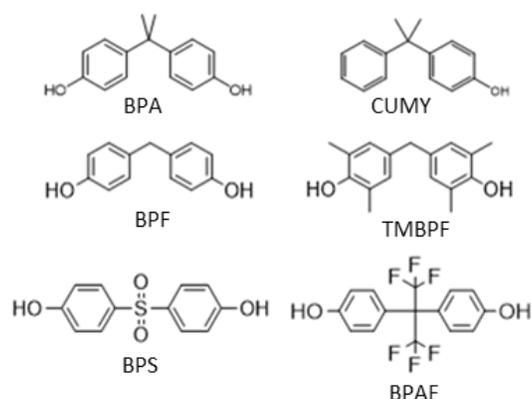


Figure 1.3 Structures chimiques du bisphénol A (BPA), et plusieurs exemples de ses dérivés, incluant le bisphénol F (BPF), bisphénol S (BPS), cumylphénol (CUMY), tetraméthylbisphénol F (TMBPF) et bisphénol AF (BPAF)

1.1.2 Les pesticides

Le Code international pour la distribution et l'utilisation des pesticides (également appelé le Code de conduite) fut adopté en 1985 par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Il établit des normes volontaires de conduites destinées à toutes les entités publiques et privées, engagées ou associées à la distribution et à l'utilisation des pesticides, en particulier lorsque la législation nationale de réglementation des pesticides est insuffisante ou inexistante. En 2002, une version révisée du Code de conduite a été adoptée et représente une norme de conduite acceptée à l'échelle mondiale en matière de distribution et d'utilisation des pesticides. (FAO, 2002)

Les pesticides sont utilisés comme régulateurs de croissance des plantes, défoliants, agent de dessiccation, agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée des fruits. Ils sont également appliqués sur les cultures, avant ou après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport. (FAO, 2002) Les pesticides présentent tous un potentiel de toxicité à différents degrés et peuvent malheureusement être toxiques pour des organismes non visés, y compris l'Homme. (Son, 2017) Ainsi, les utilisateurs ou la population peuvent courir des risques secondaires sur leur santé tels que le cancer, la suppression du système

immunitaire et un déséquilibre hormonal ou cognitif. (Abhilash, 2009) L'exposition aux organophosphorés, par exemple, affecte la qualité du spermatozoïde. (Le Goff, 2005) En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre annuel d'intoxications par les pesticides se situe entre 1 et 5 millions, dont plusieurs milliers de cas ont provoqué la mort des fœtus, des enfants, des nourrissons et des personnes âgées. L'exposition aux pesticides peut se faire par les voies cutanées, respiratoires et orales, dont le risque s'accroît généralement en augmentant la dose. Aucun pesticide ne devrait être utilisé sans le port de vêtements de protection individuels en bon état (Eddaya, 2015).

L'homme et les animaux, en général, sont exposés aux pesticides et à leurs produits dérivés par contact direct avec la nourriture et l'eau, ou encore par inhalation. Une étude conduite aux États-Unis a mis en évidence la présence de résidus de pesticides dans différentes matrices, telles que l'urine, le sang, les tissus adipeux et même le lait maternel. (Ireland, 1980) Les résultats issus de différentes études indiquent que les pesticides sont cytotoxiques, neurotoxiques, embryotoxiques, mutagènes, tératogènes ou carcinogènes. (Meyer, 2003) Ils peuvent exercer leur action toxique par génotoxicité directe, subir une activation métabolique pour former des intermédiaires électrophiles capables d'interagir avec les acides nucléiques, ou par d'autres moyens indirects, tels que le stress oxydatif, l'inhibition de la communication intercellulaire et la formation de récepteurs activés.

Les pesticides disponibles sur le marché aujourd'hui ont une variété complexe de structures chimiques, de groupements fonctionnels et d'activités. Le tableau 1-1 montre les différents pesticides qui seront abordés dans ce projet de recherche, ainsi que leurs applications :

Tableau 1-1 Exemple de pesticides et leurs applications

Type	Famille chimique	Exemple de molécules	Formule chimique	Application
herbicide	triazines	atrazine	$C_8H_{14}ClN_5$	<ul style="list-style-type: none"> • Détruit les mauvaises herbes (maïs, lin) • Détruit la végétation dans les secteurs non cultivés et dans les zones industrielles.
		simazine	$C_7H_{12}ClN_5$	<ul style="list-style-type: none"> • Agent de stérilisation du sol. • Agit contre les mauvaises herbes dicotylédones et graminées infestant plusieurs cultures.
	chloroacétamides	métolachlore	$C_{15}H_{22}ClNO_2$	<ul style="list-style-type: none"> • Agit contre les graminées annuelles et certaines dicotylédones (cultures de soja, pommes de terre) • Suppression sélective des mauvaises herbes
		acétochlore	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle les mauvaises herbes en inhibant la croissance des pousses de semis • Appliqué avant la germination des mauvaises herbes pour être efficace
		chlorpyrifos	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	<ul style="list-style-type: none"> • Agit contre les insectes en milieu agricole. • Agit sur le système nerveux des insectes en inhibant l'enzyme acétylcholinestérase

1.1.3 Les antioxydants synthétiques

Les grands enjeux du système alimentaires aujourd'hui sont de rendre accessible à tous une alimentation durable, saine et sûre. Pour y parvenir, il est parfois nécessaire de faire évoluer le système de production des aliments (approvisionnement en matières premières, formulation, procédés, méthodes de conservation du produit fini). (FAO, 2002)

Il y a souvent l'ajout de produits pour conserver les aliments. Par exemple, les antioxydants prolongent la durée de vie des substances en empêchant leur oxydation, tout en gardant la qualité du produit. Ils peuvent être endogènes, exogènes, naturels ou synthétiques. Les principaux antioxydants sont la vitamine C (acide ascorbique, antioxydant naturel) et les antioxydants phénoliques synthétiques. Ces antioxydants synthétiques, utilisés depuis environ 60 ans, résistent bien aux températures atteintes lors de la cuisson ou de la friture. (Yehye, Rahman et al., 2015) Ils sont synthétisés efficacement et pour un coût moindre que les antioxydants naturels. Ils sont donc largement utilisés dans les aliments contenant des graisses insaturées. Actuellement, les

antioxydants synthétiques les plus utilisés sont le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), tert-butylhydroquinone (TBHQ), di-tert-butylphénol (DBP), ainsi que les esters de gallates, tels que les gallates de butyle, éthyle ou propyle (BG, EG et PG).

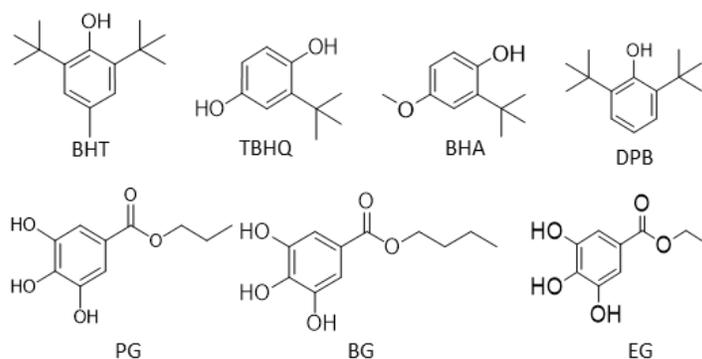


Figure 1.4 Structures chimiques d'antioxydants synthétiques utilisés en industrie et sujet de cette étude; butylhydroxytoluène (BHT), butylhydroxyanisole (BHA), tert-butylhydroquinone (TBHQ), di-tert-butylphénol (DBP, métabolite du BHT), gallate de propyle (PG), gallate d'éthyle (EG), gallate de butyle (BG)

1.1.4 Les produits pharmaceutiques et de soins personnels

Les produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPSP) comprennent de nombreuses classes chimiques. Les produits pharmaceutiques sont principalement utilisés pour prévenir ou traiter les maladies humaines et animales, tandis que les produits de soins personnels sont des produits utilisés pour nettoyer, hydrater, protéger ou traiter la peau ou les cheveux tels que, les hydratants, les rouges à lèvres, les shampooings et les colorants capillaires. (Ternes, Joss et al., 2004) Les PPSP sont un groupe diversifié de produits chimiques utilisés en médecine vétérinaire, les pratiques agricoles, la santé humaine et les soins cosmétiques. Cependant, la préoccupation croissante concernant les risques environnementaux conduit à un besoin de réglementation concertée.la

L'oxybenzone (Figure 1.5), un agent souvent ajouté dans les écrans solaires et les produits cosmétiques, est reconnu comme un perturbateur endocrinien qui peut endommager les cellules. Il a été prouvé qu'il diminuait le nombre de spermatozoïdes et allongeait le cycle œstral chez la souris.

De plus, il est potentiellement cancérigène chez l'homme. (Ebeling, 2008) Des études menées par le *Groupe de Travail Environnemental* ont constaté que dans certains cas, l'oxybenzone était absorbé par la peau. L'absorption de ce composé chimique présente un danger, conduisant éventuellement aux déséquilibres hormonaux, des dommages aux cellules et peut-être même au cancer de la peau. Certains dermatologues ont également noté une augmentation du nombre de patients prétendant avoir une allergie solaire, mais qui pourrait plutôt être associé à une allergie à l'oxybenzone. (Keyes, 2019)

Le triclosan (TCS) est un composé antibactérien que l'on retrouve dans de nombreux produits d'hygiène, notamment le dentifrice, le savon et les détergents. Le TCS (Figure 1.5) est couramment détecté dans les écosystèmes aquatiques, car il n'est que partiellement éliminé au cours du processus de traitement des eaux usées. Il a également été détecté dans le lait maternel, l'urine et le plasma. Les niveaux mesurés dans le sang corrélaient avec les habitudes d'utilisation de l'antimicrobien par les consommateurs. (Dann et Hontela., 2011)

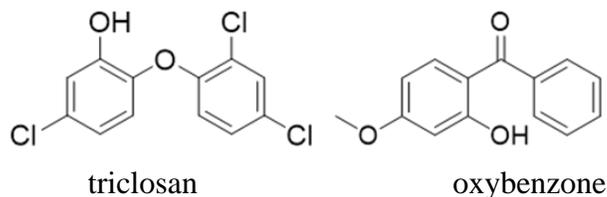


Figure 1.5 Structures chimiques de l'oxybenzone (OXY) et le triclosan (TCS)

Dans le cadre de ce projet, différents produits utilisés couramment comme médicaments (analgésiques, antibiotiques, hormones, des antidépresseurs) seront analysés de façon ciblée. Nous avons sélectionné 11 médicaments, ainsi qu'un métabolite (hydroxy-bupropion) disponible commercialement, et leur structure et nom sont indiqués dans la Figure 1.6 ci-dessous.

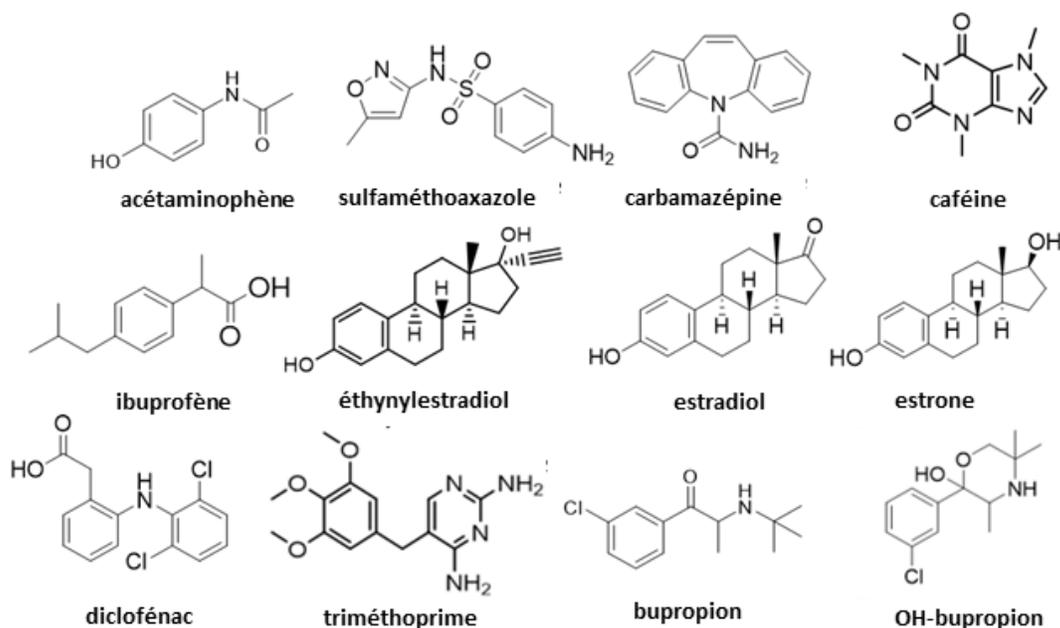


Figure 1.6 Structures de médicaments inclus dans la méthode d'analyse ciblée : acétaminophène (APAP), sulfaméthoxazole (SULFA), carbamazépine (CARBA), caféine (CAF), ibuprofène (IBU), éthynylestradiol (EE), estrone (EN), estradiol (ES), diclofénac (DICLO), triméthoprime (TRIM), bupropion (BUP), hydroxy-bupropion (OH-BUP)

1.2 Métabolisme d'un xénobiotique dans le foie

Le métabolisme d'un xénobiotique correspond à la transformation enzymatique en un ou plusieurs produits de biotransformation (métabolites) qui peuvent être aussi actifs que la molécule originale, et même potentiellement toxique.

En général, le métabolisme d'un xénobiotique (Figure 1.7) conduit à la formation de substances plus hydrosolubles et favorise leur élimination dans l'urine ou les fèces. Il se fait essentiellement dans le foie par des réactions enzymatiques de biotransformations, mais également dans les reins, les poumons, et les intestins. Les réactions de biotransformation des xénobiotiques sont généralement divisées en phase I et phase II. (Parkinson, 2008) Les réactions de phase I impliquent principalement l'oxydation, l'hydrolyse, la désalkylation et la réduction. Ces réactions introduisent un groupement fonctionnel (OH, NH₂, ou COOH, par exemple) qui augmente la polarité du

xénobiotique. Les réactions de biotransformation de phase II comprennent la glucuronidation, la sulfatation, l'acétylation, la méthylation et la conjugaison au glutathion. Les réactions sont catalysées par des enzymes, telles que les cytochromes P450 et les flavines monooxygénases en phase I, ainsi que les uridines 5'-diphospho-glucuronosyltransferases (UGT), les sulfo-, acétyl-ou méthyl-transférases, et les glutathions transférases (GST). Ces enzymes sont largement distribuées dans le corps, mais se retrouvent majoritairement dans le foie. (Nebert et Russell., 2002)

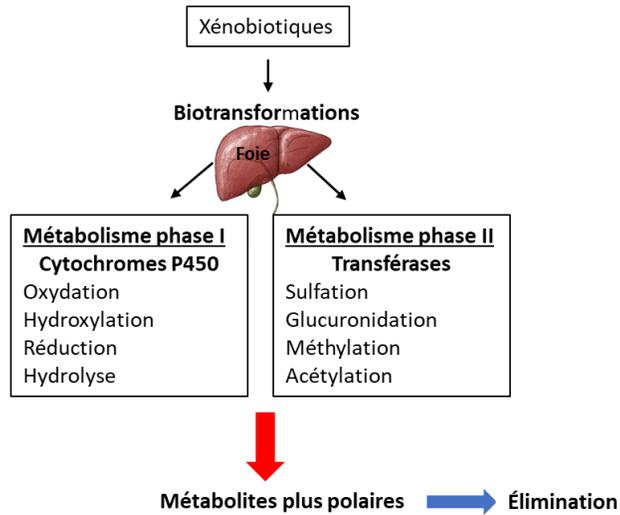


Figure 1.7 Schéma du métabolisme des xénobiotiques par les voies de phase I et II dans le foie

1.3 L'urine comme matrice biologique

L'urine est un fluide biologique produit par les reins et excrété par l'organisme. Elle est composée d'eau, et de diverses substances chimiques, notamment les xénobiotiques et leurs métabolites polaires. (Humbert, 2012) La collecte d'urine est non invasive et relativement simple, ce qui la rend pratique pour les études épidémiologiques, les essais cliniques et les tests de dépistage. De plus, ces composés sont souvent excrétés dans l'urine rapidement après une exposition.

1.4 Méthodes d'analyse LC-MS/MS

Afin de caractériser l'exposome, un grand nombre de composés bioactifs à forte diversité chimique doivent être identifiés dans un échantillon. Les plateformes analytiques doivent être spécifiques et

capables de mesurer un grand nombre d'analytes, et ce souvent à l'état de traces avec une très haute sensibilité. Dans le cadre de ce projet de maîtrise, les échantillons ont été analysés à l'aide de deux plateformes de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Un système de triple quadripôle (QqQ) et quadripôle temps de vol (QqTOF), qui sont très complémentaires (Tableau 1-2). Le système triple quadripôle fonctionne à basse résolution, alors ne donne pas la possibilité de mesurer des masses exactes, mais en mode MRM (*multiple reaction monitoring*), il est bien adapté pour l'analyse sélective et robuste de petites molécules dans les échantillons complexes, incluant les matrices biologiques. Il est alors plutôt dédié à des analyses quantitatives et donc les approches ciblées. Le système hybride de quadripôle-temps de vol, à haute résolution, est préférentiellement utilisé pour des analyses qualitatives pour l'identification de molécules organiques. Il permet la mesure de masses exactes monoisotopiques pour les molécules ionisées ainsi que leurs ions fragments, aidant à l'élucidation des structures de contaminants et leurs métabolites. La haute résolution nous donne la possibilité d'analyser des échantillons très complexes, car on peut distinguer des masses très proches, et ayant une bonne calibration de l'analyseur, les masses exactes mesurées nous confirment les formules chimiques des ions détectés.

La chromatographie liquide à haute pression (HPLC) est cruciale pour la séparation d'échantillons complexes, selon leurs propriétés physicochimiques, incluant leur polarité, avant l'analyse par spectrométrie de masse. Cette séparation aide à minimiser les interférences et les effets de matrice, incluant la suppression ionique en spectrométrie de masse. (Menet, 2011) L'électronébulisation (ESI), ou l'*electrospray*, est la méthode d'ionisation la plus couramment utilisée en LC-MS, grâce à sa grande versatilité pour l'analyse de molécules biologiques, incluant les métabolites de xénobiotiques ainsi que la grande majorité de contaminants environnementaux. Cette ionisation est douce, alors nous donne la possibilité de mesurer les molécules protonées et déprotonées (selon le mode d'ionisation choisi) intactes sans avoir trop de fragmentation des ions durant cette étape de l'analyse. Par la suite, la spectrométrie de masse en tandem sépare les ions selon leurs rapports masse/charge et induit une fragmentation contrôlée des ions précurseurs d'intérêts, donnant un spectre MS/MS ayant des informations structurales sur la molécule ionisée, pour élucider sa structure.

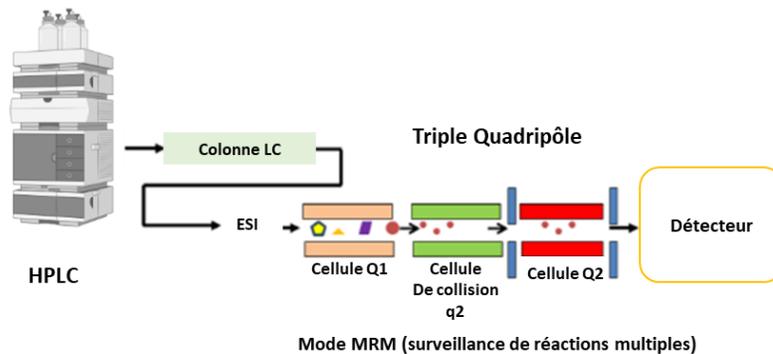


Figure 1.8 Schéma simplifié d'un système LC-MS/MS

Dans le domaine de la métabolomique, le développement et l'amélioration des systèmes de LC-MS/MS (figure 1.8) ont permis la possibilité de faire des analyses multiplexes rapides, permettant d'accéder à des informations précises et spécifiques. Aussi important que le système analytique lui-même est le traitement des données, afin d'extraire les informations utiles selon le but d'une étude. Dans le cadre de ce mémoire, plusieurs logiciels de traitement de données ont été utilisés, pour l'intégration des pics, la validation des données, la visualisation des résultats et la confirmation des données obtenues à partir de nos analyses.

Tableau 1-2 Comparaison entre les analyseurs quadripolaires et temps de vol pour l'analyse ciblée et non-ciblée dans le cadre de ce mémoire

Avantages	Analyseur quadripolaire	Analyseur temps de vol (TOF)
résolution	basse, unitaire	20,000-40,000 (et plus sur certains appareils à multi-rélectrons)
analyse ciblée	Avec un système de triple quadripôle, le mode MRM donne une excellente sensibilité pour la détection des contaminants ciblés.	permet la confirmation de formule chimique (avec la mesure de masse exacte) de contaminants dans les échantillons urinaires
analyse non-ciblée	moins adaptée pour l'analyse non ciblée de contaminants inconnus dans l'urine	grande flexibilité pour la découverte de nouveaux contaminants ou métabolites inconnus, grâce à sa haute sensibilité en mode TOF-MS pour mesurer tous les m/z simultanément à haute résolution

Une méthode en mode MRM se compose de trois étapes (Figure 1.9). Tout d'abord, les ions formés dans la source arrivent dans le premier quadripôle (Q1), où les ions précurseurs sont sélectionnés (filtrés). Ces ions sont ensuite envoyés sélectivement dans la cellule de collision (q2), un gaz inerte (N_2 , He ou Ar) là où ils subissent une fragmentation par application d'une énergie de collision. Puis, le troisième quadripôle (Q3) sélectionne un ion produit (fragment) spécifique et l'envoie sélectivement au détecteur. Chaque paire d'ions (m/z précurseur - m/z produit) donne une transition MRM. Le mode MRM est la méthode préférentielle pour la quantification de contaminants traces dues à sa grande sensibilité et sélectivité.

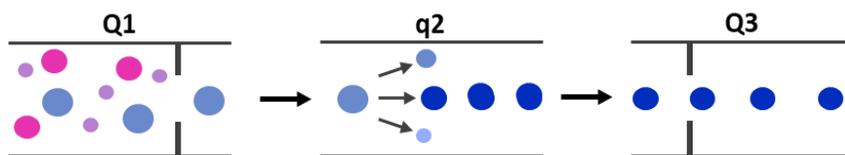


Figure 1.9 Schéma du mode MRM dans un triple quadripôle, où plusieurs ions précurseurs rentrent dans le premier quadripôle (Q1). Le précurseur de l'analyte d'intérêt est sélectionné et envoyé à la cellule de collision (q2) et un fragment spécifique est filtré par le deuxième analyseur (Q3)

Le spectromètre de masse en tandem de type quadripôle-temps de vol (QqTOF) est couramment utilisé pour l'analyse non ciblée à haute résolution. La méthode de séparation des ions dans l'analyseur TOF par leur m/z se fait par la mesure le temps mis par une particule chargée pour atteindre un détecteur localisé à une distance connue. Les ions de même charge électrique acquièrent la même énergie cinétique au début à l'aide d'un pulse d'accélération, mais la vitesse des ions dépend du rapport masse/charge (m/z). Ainsi, les particules ayant des poids moléculaires élevés auront une vitesse plus basse que les molécules de faibles poids moléculaires.

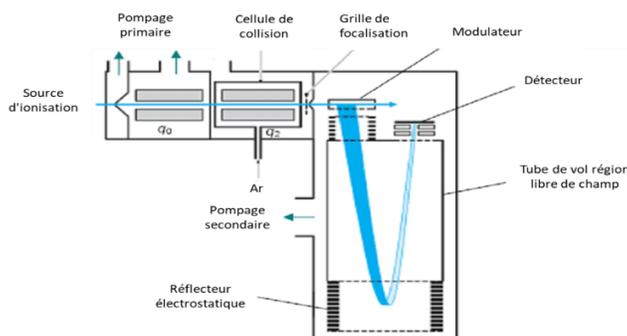


Figure 1.10 Schéma général d'un spectromètre de masse en tandem quadripôle-temps de vol (QqTOF)

Contrairement aux analyses ciblées, où seuls les ions spécifiques des molécules visées sont détectés, les analyses non-ciblées en LC-HRMS sont réalisées pour découvrir les analytes détectables dans un échantillon donné. On mesure une large gamme de m/z afin d'acquérir le maximum d'informations pour l'identification des molécules. (Kind, 2007)

L'acquisition de spectres MS/MS en mode non-ciblée peut se faire en mode DDA (dépendant des données, *data-dependent acquisition*). En DDA, les ions précurseurs sont sélectionnés par le quadripôle (Q1) selon des critères établis dans la méthode, souvent selon leur intensité, et ensuite sont dirigés vers la cellule de collision, et les m/z des ions fragments formés sont mesurés par l'analyseur TOF. Le risque, ici, serait de ne pas sélectionner un ion d'intérêt dont l'intensité est trop faible, ce qui est assez souvent dans le cas des échantillons très complexes (Figure 1.14).

(Allen, 2019) On peut ajouter d'autres critères d'inclusion ou d'exclusion pour la sélection des ions précurseurs, qui aide à pallier le manque d'acquisition de spectres d'intérêt.

1.5 Objectifs de l'étude

Ce mémoire est axé sur le développement de méthodes bioanalytiques pour identifier et analyser plusieurs xénobiotiques différents ainsi que leurs métabolites dans des échantillons d'urine à l'aide de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem à haute résolution.

Le chapitre 2 de notre étude présente deux méthodes d'analyse ciblée qui ont été développées pour détecter une liste de 32 contaminants environnementaux avec des composés standards commerciaux. Nous avons utilisé la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode de réaction multiple (LC-MRM) sur une plateforme de type triple quadripôle pour cette méthode, avec deux méthodes chromatographiques complémentaires. L'objectif principal était d'établir une méthode sensible, sélective et précise pour l'analyse de ces contaminants par la suite dans les échantillons d'urine.

Dans le chapitre 3, l'optimisation de la méthode d'extraction des échantillons d'urine est présentée. L'objectif était d'évaluer différentes méthodes d'extraction afin de trouver celle qui offrait le meilleur rendement d'extraction des contaminants ciblés dans la matrice biologique d'urine. Nous avons étudié des techniques d'extraction, telle que la méthode de mini-QuEChERS, l'extraction en phase solide (SPE), et la précipitation des protéines avec un solvant organique, en les comparant avec les deux méthodes chromatographiques LC-MRM développées.

Après l'optimisation de la méthode d'analyse LC-MRM et la méthode de préparation d'échantillons, nous avons procédé avec l'analyse d'une série d'échantillons urinaires pour le dépistage de contaminants environnementaux (Chapitre 4). Une partie des échantillons ont subi une hydrolyse enzymatique avec la β -glucuronidase et la aryl-sulfatase pour cliver les conjugués glucuronides et sulfatée présente dans l'urine. L'objectif de cette étape était de convertir les métabolites conjugués présents dans les échantillons d'urine en leurs formes libres, afin de faciliter la détection des molécules non-conjuguées avec la méthode ciblée. Nous avons également utilisé des approches non-ciblés, pour détecter et caractériser les mêmes composés ainsi que d'autres contaminants présents dans les échantillons d'urine. L'objectif était d'élargir la portée de notre

étude en explorant des contaminants potentiels supplémentaires et en fournissant une vision plus globale de la contamination environnementale dans les échantillons d'urine. Une base de données spectrale des métabolites des contaminants ciblés a aussi été créée en incubant *in vitro* chacun des composés avec des microsomes hépatiques et les cofacteurs nécessaires pour les réactions de métabolisme de phase I et II. Cette bibliothèque contenant des centaines de métabolites a été utilisée pour aider à identifier les composés d'origine et leurs métabolites dans les échantillons d'urine analysés. Les résultats de chacune des méthodes ont été comparés et plusieurs pistes de recherche futures se sont révélées.

CHAPITRE 2

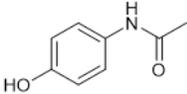
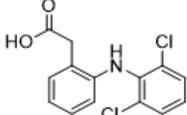
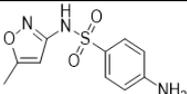
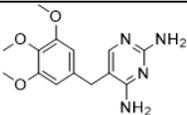
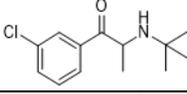
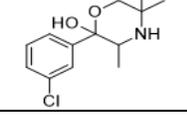
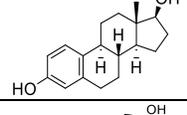
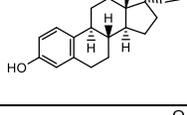
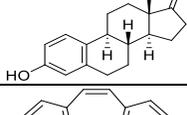
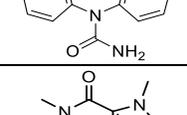
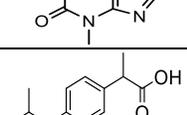
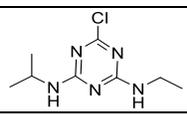
La méthode ciblée développée d'analyse de contaminants d'intérêt

Dans ce chapitre, on présente le développement de la méthode d'analyse ciblée. Notre objectif principal était de développer une méthode utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode de réaction multiple (LC-MRM) pour détecter 32 contaminants environnementaux spécifiques, afin de pouvoir par la suite comparer plusieurs méthodes d'extractions pour ces 32 contaminants dans la matrice biologique complexe urinaire. Pour atteindre cet objectif, nous avons mis en place un processus de développement méthodologique rigoureux. Tout d'abord, nous avons sélectionné les 32 contaminants environnementaux d'intérêt en fonction de leur prévalence, de leur toxicité potentielle et de leur pertinence pour notre étude, ainsi que leur présence dans notre inventaire de produits chimiques. Ces composés comprenaient des herbicides, des produits pharmaceutiques et de soins personnels, des plastifiants, et des antioxydants synthétiques. Nous avons développé deux méthodes d'analyse ciblée basées sur la LC-MRM, dû au fait qu'une seule méthode n'a pas bien détecté tous nos composés d'intérêt.

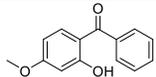
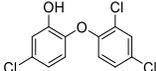
2.1 Composés d'intérêt

Le Tableau 2-1 montre la liste des contaminants environnementaux d'une variété de classes de molécules, incluant des médicaments, des plastifiants, des antioxydants et des pesticides. Possiblement relâchés dans l'environnement. Ainsi, nous avons ciblé les 32 composés suivants répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2-1 Liste des 32 composés ciblés, leurs formules chimiques, masses molaires moyennes et structures

Analyte	Formule chimique	Type	Masse molaire (g/mol)	Structure
acétaminophène (APAP)	$C_8H_9NO_2$	analgésique	151.16	
diclofénac (DICLO)	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	analgésique anti-inflammatoire	296.15	
sulfaméthoxazole (SULFA)	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	antibiotique	253.28	
triméthoprim (TRIM)	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	antibiotique	290.32	
bupropion	$C_{13}H_{18}ClNO$	antidépresseur	239.75	
hydroxy-bupropion (OH_BUP)	$C_{13}H_{17}NO_2$	antidépresseur	219.28	
estradiol (ES)	$C_{18}H_{24}O_2$	hormone œstrogène	272.38	
éthynylestradiol (EE)	$C_{20}H_{24}O_2$	hormone œstrogène synthétique	296.41	
estrone (EN)	$C_{18}H_{22}O_2$	hormone œstrogène	270.38	
carbamazépine (CARBA)	$C_{15}H_{12}N_2O$	anticonvulsivant	236.27	
caféine (CAF)	$C_8H_{10}N_4O_2$	herbicide	194.19	
ibuprofène (IBU)	$C_{13}H_{18}O_2$	herbicide	206.28	
atrazine (ATZ)	$C_8H_{14}ClN_5$	herbicide	215.68	

acétochlore (ACT)	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	herbicide	269.77	
métolachlore (MET)	$C_{15}H_{22}ClNO_2$	herbicide	291.8	
simazine (sim)	$C_7H_{12}ClN_5$	herbicide	201.66	
chlorpyrifos (CLP)	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	herbicide	350.59	
bisphénol A (BPA)	$C_{15}H_{16}O_2$	plastifiant	228.29	
bisphénol AF (BPAF)	$C_{18}H_{16}F_3NO_2$	plastifiant	353.32	
bisphénol F (BPF)	$C_{12}H_{10}O_2$	plastifiant	186.21	
bisphénol S (BPS)	$C_{12}H_{10}$	plastifiant	258.27	
cumylphénol (CUMY)	$C_{14}H_{14}O$	plastifiant	198.27	
TMBPF	$C_{25}H_{20}F_6O_4P$	plastifiant	520.39	
DBP	$C_{14}H_{22}O$	antioxydant synthétique (métabolite de BHT)	206.33	
gallate de butyle (BG)	$C_{11}H_{14}O_5$	antioxydant synthétique	226.23	
gallate d'éthyle (EG)	$C_9H_{10}O_5$	antioxydant synthétique	198.18	
gallate de propyle (PG)	$C_{12}H_{16}O_5$	antioxydant synthétique	240.25	
BHA	$C_{11}H_{16}O_2$	antioxydant synthétique	180.25	
TBHQ	$C_{10}H_{14}O_2$	antioxydant synthétique	166.22	
BHT	$C_{15}H_{24}O$	antioxydant synthétique	220.36	

Oxybenzone (OxY)	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	produit de soin personnel (écran solaire)	228.25	
Triclosan (TCS)	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	produit de soin personnel (antibactérien)	289.54	

La majorité des molécules que nous avons sélectionnées correspondent aux molécules parentes et non aux métabolites possiblement retrouvés dans l'urine, à l'exception de l'hydroxy-bupropion et DBP qui sont issus du métabolisme du bupropion et le BHT, respectivement. Ce choix est dû à un manque de standards de métabolites disponibles commercialement ou à leurs prix très chers.

Les 32 contaminants environnementaux (APAP, DIC, IBU, CARBA, BUP, OH-BUP, EE, ES, EN, SULFA, TRIM, CAF, ATZ, ACT, SIM, MET, CLP, BHT, TBHQ, BHA, BPS, CUMY, TMBPF, DBP, BPA, BPAF, BPF, EG, BG, PG, OXY, TCS) ont été achetés à Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH), l'acide formique (AF) et l'acétate d'ammonium (AmAc) de qualité LC-MS ont tous été achetés à Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). L'eau utilisée était de qualité ultra-pure qui provenait d'un système Millipore Synergy UV (Billerica, MA, USA).

Une solution contenant les 32 standards à différentes concentrations a été préparée, à partir de solutions mères préparé à 1 mM (Tableau 2-2). Les concentrations ont été choisies par rapport à leur différence de sensibilité par la méthode LC-MRM pour éviter que certains analytes n'aient pas des intensités trop faibles, ni trop intenses durant l'optimisation des méthodes d'extraction. Le tableau ci-dessous indique trois niveaux de concentrations finales choisis dans le mélange 32 standards.

Tableau 2-2. Les composés chimiques, et leurs concentrations respectives, présents dans le mélange de 32 standards

0,06 μM	3 μM	11 μM
BG, EG, PG, BPS, ATZ, CARBA, OXY, DIC, ACT, TRIM, SULFA, CAF, BUP, OH-BUP, BPAF, MET, SIM	APAP, IBU, TCS, ES, EE, EN, CLP	TBHQ, BHT, TMBPF, DBP, CUMY, BPA, BPF, BHA

2.2 Méthode d'analyse ciblée LC-MRM

L'optimisation des paramètres chromatographiques et de la spectrométrie de masse est cruciale pour la détection et l'identification précise des contaminants environnementaux dans les échantillons analysés par la méthode ciblée LC-MRM. La séparation par chromatographie liquide est réalisée sur un système UHPLC (chromatographie liquide ultra-haute performance, Shimadzu Nexera) couplé à un spectromètre de masse en tandem de triple quadripôle (Sciex QTRAP 5500) équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI).

Pour détecter tous les composés ciblés, il a été important de prendre en compte leurs propriétés physico-chimiques, telles que leur polarité et leur ionisabilité. (Lordel, 2011) Finalement, deux méthodes ont été optimisées, ayant des différences au niveau de la phase mobile. La première méthode utilise les deux modes d'ionisation (positif et négatif) et de l'acide formique dans la phase mobile aqueuse, ainsi qu'une deuxième méthode en mode négatif et l'acétate d'ammonium au lieu de l'acide formique. Il y a eu plusieurs des contaminants d'intérêt dans notre étude qui nécessitaient ce changement de phase mobile, dû à leur grande différence de sensibilité entre les deux phases mobiles.

La séparation chromatographique a été effectuée en utilisant une colonne biphenyl en mode inverse et un gradient augmentant le pourcentage d'acétonitrile. Le choix de cette colonne et les phases mobiles ont été motivés par leurs utilisations préalables dans d'autres recherches menées sur les contaminants environnementaux au sein de notre laboratoire, dont l'étude sur le métabolisme in vitro du BPA et ces analogues (Ousji, 2020a), le BHT et ces analogues (Ousji, 2020b), le triclosan et plusieurs écrans solaires (Guesmi, 2020), incluant l'oxybenzone. Cette colonne a bien retenu

tous les composés d'intérêts, avec des pics chromatographiques reproductibles. Basée sur des particules à noyau dur (core-shell) avec une couche externe poreuse, elle offre des performances élevées à des pressions plus basses que les colonnes poreuses.

Le tableau 2-3 indique les paramètres utilisés pour les deux méthodes chromatographiques. Le gradient HPLC pour la première méthode a commencé à 5 % acétonitrile (B), maintenu pendant 0.2 minute, puis augmenté linéairement à 50 % à 8 minutes et 98 % à 12 minutes, qui a été maintenu pendant 3 minutes supplémentaires. Pour la deuxième méthode, la condition initiale du gradient d'élution était de 10 % B, maintenue pendant 0.2 min avant de se rendre à 50 % à 3 minutes, puis à 98 % à 8 minutes, et maintenue pour une autre minute. Dans le processus d'analyse, il est essentiel de procéder à une étape de rééquilibrage de la colonne afin de la ramener à ses conditions initiales optimales dans notre cas ça a duré 7 minutes. Pour un temps d'analyse total de 22 et 16 min pour les méthodes 1 et 2, respectivement.

Tableau 2-3 Conditions chromatographiques des méthodes d'analyse ciblée LC-MRM

	Méthode 1	Méthode 2
Mode d'ionisation	ESI positif et négatif	ESI négatif
Colonne	Phenomenex Kinetex Biphenyl (100 x 2.1 mm. 2.6 µm)	
Température de la colonne	40 °C	
Volume d'injection	25 µL	
Débit de la phase mobile	0.25 mL/min	
Phases mobiles	A : 0.1 % acide formique dans l'eau B : acétonitrile à 100 %	A : 5 mM acétate d'ammonium dans l'eau B : acétonitrile à 100 %
Gradient d'élution		

La phase d'optimisation de la méthode MRM pour la détection des composés implique plusieurs sous-étapes, pour ajustement des conditions d'ionisation et de la fragmentation de chacun des composés d'intérêt de la méthode ciblée. (Mouton, 2020) Dans le cas de l'analyse des 32 composés ciblés, les critères d'identification des composés se sont basés sur le temps de rétention, et les transitions MRM (CE). Pour chaque composé, un temps de rétention spécifique a été déterminé. Ce temps correspond à la période nécessaire à un composé pour traverser la colonne et utilisée pour identifier et distinguer ce composé des autres présents dans l'échantillon. Les transitions MRM sont choisies par rapport à la masse de l'ion précurseur (protoné ou déprotoné, selon le mode utilisé) ainsi que les fragments les plus intenses suivant la dissociation par collision (CID) qu'on peut déterminer avec un balayage d'ions produits. Pour chacune de ces transitions, la sensibilité est optimisée en changeant l'énergie de collision.

Deux transitions MRM ont été choisies pour chaque composé, une pour l'analyse quantitative avec la plus basse limite de détection et l'autre pour l'analyse qualitative qui sert à confirmer l'identification du composé. La co-élution des deux transitions est nécessaire pour cette confirmation. Cela renforce la fiabilité et la spécificité de l'analyse, en permettant de distinguer les composés d'intérêt des interférences potentielles. Les spectres MS et MS/MS, ainsi qu'un chromatogramme représentatif LC-MRM de l'oxybenzone sont dans la Figure 2.2.

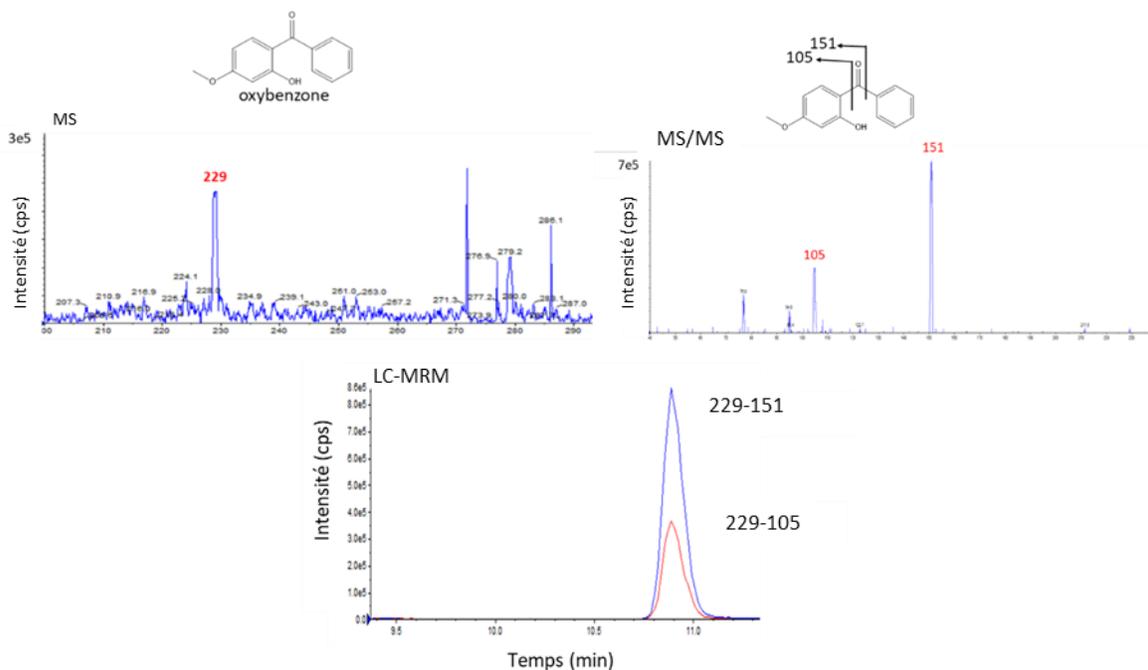


Figure 2.1 Spectres MS et MS/MS, ainsi qu'un chromatogramme LC-MRM de l'oxybenzone montrant le choix des deux transitions MRM de m/z 229-151 et m/z 229-105

2.3 Traitement de données

Le traitement des données pour la méthode ciblée a été effectué à l'aide du logiciel MultiQuant (v3.0.2) de Sciex. Ce logiciel est conçu pour l'intégration des aires sous les pics pour l'analyse quantitative des analytes d'intérêt. Le logiciel PeakView (v2.2) a également été utilisé pour la visualisation des résultats LC-MRM. Il facilite l'interprétation des chromatogrammes et permet de détecter d'éventuelles interférences ou anomalies dans les données.

Pour chaque composé ciblé, le temps de rétention (t_r) et les ions précurseurs et fragments choisis pour les transitions MRM, ainsi que leurs énergies de collision (CE), sont répertoriés dans les tableaux 2.4 et 2.5. La Figure 2.3 montre les deux chromatogrammes LC-MRM du mélange des standards de la méthode LC-MRM en mode positif et négatif utilisant la phase mobile d'acide formique, et la Figure 2.4 montre les résultats obtenus pour les standards qui ont été mieux détectés avec la deuxième méthode en mode négatif avec la phase mobile d'acétate d'ammonium.

Tableau 2-4 Liste de composés analysés en mode positif avec la méthode 1, incluant leur temps de rétention et leurs transitions MRM avec les énergies de collision (CE) optimisées

Composé	t_r (min)	m/z précurseur (M+H) ⁺	m/z (frag 1)	CE (V)	m/z (frag 2)	CE (V)
acétaminophène (APAP)	2.7	152	110	20	65	20
diclofénac (DIC)	10.7	296	215	26	214	40
sulfaméthoxazole (SULFA)	7.8	254	156	20	108	30
triméthoprime (TRIM)	5.7	291	230	30	123	30
carbamazépine (CARBA)	9.0	237	194	25	193	40
bupropion (BUP)	7.9	240	184	15	131	35
OH-bupropion (OH-BUP)	7.7	256	238	15	139	35
caféine (CAF)	5.5	195	110	30	138	27
estradiol (ES)	9.6	255	159	20	133	20
ethinylestradiol (EE)	9.9	279	133	20	157	20
estrone (EN)	10.2	271	159	30	133	30
simazine (SIM)	8.3	202	132	25	104	35
chlorpyrifos (CLP)	11.9	350	198	30	322	15
atrazine (ATZ)	9.1	216	174	25	96	30
acétochlore (ACT)	10.7	270	224	20	148	30
métolachlore (MET)	10.6	284	252	20	176	30
oxybenzone (OXY)	10.9	229	151	40	105	25

Tableau 2-5 Liste de composés analysés en mode négatif avec les méthodes 1 ou 2, incluant leur temps de rétention et leurs transitions MRM avec les énergies de collision (CE) optimisées

Composé	Méthode	t _r (min)	m/z précurseur (M-H) ⁻	m/z (frag 1)	CE (V)	m/z (frag 2)	CE (V)
ibuprofène (IBU)	1	10.3	205	161	-8	159	-10
triclosan (TCS)	1	11.3	287	35	-40	142	-35
BPA	2	8.3	227	212	-24	133	-28
BPAF	1	10	335	265	-30	69	-65
BPF	2	8.8	199	105	-28	77	-31
BPS	1	7.9	249	108	-34	92	-44
cumylphénol (CUMY)	2	10.6	211	196	-21	133	-32
TMBPF	2	10.1	255	121	-35	105	-35
DBP	2	11.2	205	189	-30	205	-20
gallate de butyle (BG)	1	8.4	225	124	-32	169	-20
gallate d'éthyle (EG)	1	5.9	197	161	-30	169	-20
gallate de propyle (PG)	1	7.5	211	35	-20	125	-32
BHA	2	10.1	179	212	-20	149	-30
TBHQ	2	8.6	165	265	-30	108	-30
BHT	2	10.2	219	203	-34	205	-30

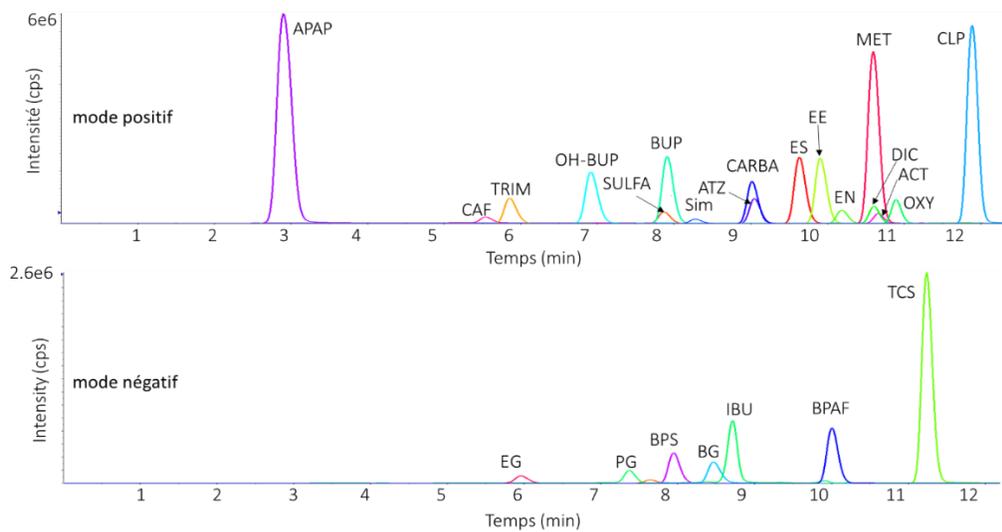


Figure 2.3 Chromatogramme LC-MRM des 32 composés standards utilisant la méthode 1, avec la phase mobile d'acide formique et l'ionisation en mode positif et négatif

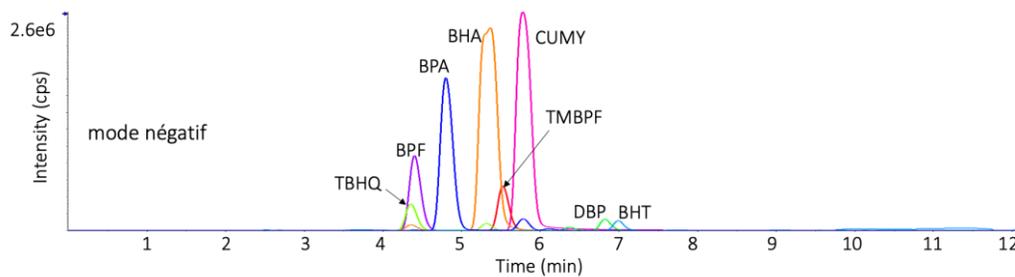


Figure 2.4 Chromatogramme LC-MRM des composés standards utilisant la méthode 2, avec la phase mobile d'acétate d'ammonium et l'ionisation en mode négatif

Dans ce chapitre, nous avons développé et optimisé deux méthodes LC-MRM pour l'analyse de contaminants environnementaux. Nous avons par la suite réalisé une comparaison de plusieurs

méthodes de préparation d'échantillons, abordée dans le chapitre 3, pour déterminer la méthode la plus appropriée qui vont permettre de détecter les analytes d'intérêt dans les échantillons urinaires.

CHAPITRE 3

Développement d'une méthode d'extraction pour les contaminants environnementaux

L'extraction des échantillons urinaires pour l'analyse de contaminants est une étape importante en raison de la complexité de la matrice biologique et de la diversité des analytes d'intérêt pouvant être présents. La préparation des échantillons avant l'analyse LC-MS/MS a pour but d'enlever les interférences, de diminuer l'effet de matrice et, souvent, de concentrer les analytes d'intérêts dans les extraits. Dans ce projet, nous nous sommes intéressées à plusieurs méthodes d'extraction pour surmonter ces défis.

La première est la méthode d'extraction QuEChERS (Quick Easy.Cheap Effective Rugged and Safe) qui a été développée pour l'analyse de résidus de pesticides dans les matrices alimentaires, mais qui a depuis été étendue à l'analyse de divers autres contaminants. (Schmidt, 2015) Elle a été développée en 2003 par Anastassiades dans le but de remplacer les méthodes de préparation d'échantillons plus complexes et coûteuses. (Anastassiades, 2003) Elle se compose de deux étapes principales l'extraction et la purification. Dans la première étape, l'échantillon est mélangé avec l'acétonitrile pour extraire les contaminants ciblés. Ensuite, une solution saline ainsi que des sels tels que le sulfate de magnésium ($MgSO_4$) et le chlorure de sodium ($NaCl$) sont ajoutés. Ces sels sont utilisés pour améliorer la séparation de la phase aqueuse et organique et pour éliminer l'eau de la phase organique. (Xiong, 2009) Dans la deuxième étape, une technique de purification appelée extraction solide en phase dispersée (d-SPE) est utilisée pour éliminer les impuretés et les interférences de l'échantillon extrait. Des sorbants spécifiques tels que le C18, et le PSA (amine secondaire primaire) sont utilisés pour éliminer les impuretés et les interférences. Le mélange est centrifugé et la phase liquide est récupérée puis analysé par HPLC/MS pour la détection et la quantification des contaminants. (Molina-Ruiz, 2015). C'est une approche rapide, efficace, sécuritaire et peu coûteuse par rapport à d'autres méthodes d'extraction d'échantillons. Elle est largement utilisée dans les laboratoires d'analyse des contaminants alimentaires et environnementaux à travers le monde.

L'extraction en phase solide (SPE) est une technique couramment utilisée dans le traitement d'échantillons complexes. Elle permet de séparer, purifier et concentrer des composés ciblés en utilisant une phase solide (résine ou sorbant) ayant une affinité pour les analytes d'intérêt. La précipitation des protéines est une méthode aussi couramment utilisée pour extraire les contaminants dans les échantillons biologiques lors de la préparation d'échantillons. Cette technique utilise un solvant (comme le méthanol) qui provoque la dénaturation et la coagulation des protéines. Les métabolites d'intérêt solubles dans le solvant se retrouvent ainsi dans le surnageant. (Ferec, 2020) Dans ce projet trois méthodes d'extraction (QuEChERS, SPE, et précipitation des protéines) ont été testées afin d'extraire une série de contaminants des échantillons urinaires dosés. L'optimisation et les résultats de la méthode d'extraction d'échantillons urinaires seront discutés dans ce chapitre.

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Produits chimiques

Les cartouches pour la méthode SPE OASIS de type HLB, la MAX et la MCX ont été achetées chez Waters Ltd. Le kit commercial de QuEChERS avec la poudre (240 mg MgSO_4 , 60 mg NaCl) et le mélange d-SPE (30 mg PSA, 30 mg C18, 4,5 mg GCB (noir de carbone graphité), 90 MgSO_4) était d'Agilent Technologies. Le MgSO_4 , NaCl , NaOAc était de Fisher Scientific et le NaOAc a été acheté de chez BioBasic. Les différentes résines individuelles de PSA, C18 et C4 ont été de chez United Chemical Technologies. L'acide acétique et l'acétonitrile de grade HPLC venaient de Sigma-Aldrich.

3.1.2 La matrice biologique

L'urine utilisée pour l'extraction des échantillons biologiques, et l'analyse LC-MRM, ont été collectés auprès de volontaires masculins et féminins de différentes tranches d'âge. Les échantillons ont été prélevés sans l'ajout d'agents de conservation, directement dans des tubes Falcon de 50 mL, puis conservés à une température de $-80\text{ }^\circ\text{C}$ pour assurer leur stabilité. Ultérieurement, les échantillons ont été aliquotés dans des tubes de 1,5 mL et conservés à la même température avant d'être soumis à l'extraction.

3.2 Les méthodes d'extraction utilisées

3.2.1 La mini-QuEChERS

Dans le but d'optimiser une version miniaturisée de la méthode QuEChERS nous avons entrepris une série de tests systématiques à partir d'un plan initial basé sur la méthode originale (Figure 3.1) qui nous permet d'obtenir des résultats similaires tout en utilisant des quantités plus faibles de solvant et de réactifs. Cela nous a permis de réduire les coûts et les déchets générés lors de notre étude. Notre objectif était d'améliorer la performance et l'efficacité.

La miniaturisation de la méthode QuEChERS peut également réduire les temps d'extraction et de purification, ce qui est avantageux pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons ou pour les analyses en temps réel. De plus, elle peut faciliter l'automatisation des étapes d'extraction et de purification, ce qui peut augmenter la reproductibilité et la précision de l'analyse. (Lofe *et al.*, 2014)

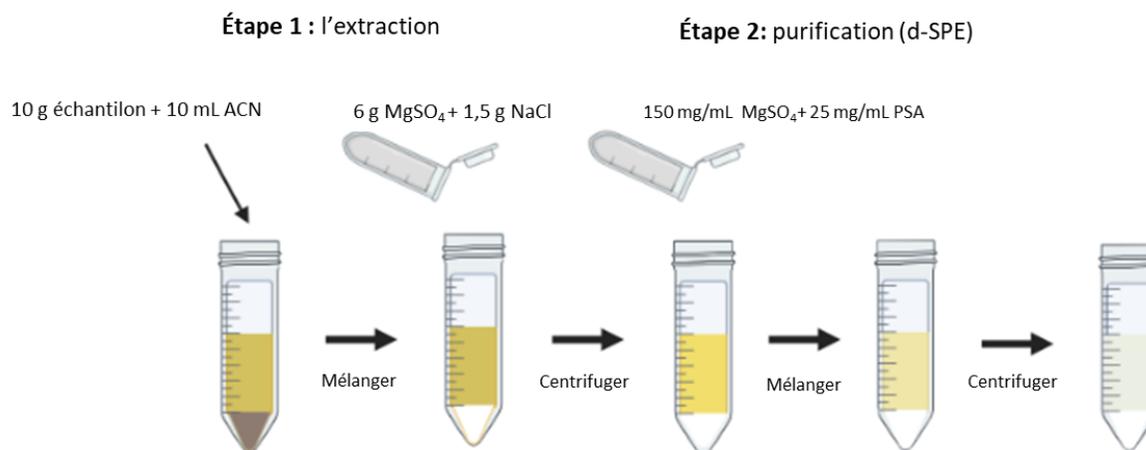


Figure 3.1 Protocole de base de la méthode QuEChERS

Dans chaque expérience (tableau 3-1), les échantillons ont été préparés en mélangeant 9 mL d'urine de cinq personnes avec 100 μ L de mélanges de 32 standards et 900 μ L de MeOH (50 %). La première étape consistait à l'extraction des analytes d'intérêt réalisée à l'aide d'un solvant organique et d'une poudre contenant des sels. L'acétonitrile (ACN) a été utilisé comme solvant avec des différentes concentrations d'acide acétique, pour tester l'efficacité de l'extraction.

Après l'optimisation de la concentration d'acide acétique, nous avons procédé à l'optimisation d'un deuxième paramètre avec des différentes formulations de sels. Ces poudres contiennent du sulfate de magnésium (MgSO₄), de l'acétate de sodium (NaOAc) ou du chlorure de sodium (NaCl). Par la suite, nous avons entrepris l'étape de purification d-SPE en testant et combinant différentes formulations de sorbants : PSA, C18, C4, GCB et MgSO₄.

Tableau 3-1 Résumé de expériences d'optimisation de la méthode mini-QuEChERS

Tests	Étapes	Paramètres	Conditions testées
1	Extraction	Solvant d'extraction	0, 0.25, 0.5, 0.75 et 1 % acide acétique dans l'acétonitrile
2		Poudre d'extraction	A : 300 mg sachet QuEChERS (240 mg MgSO ₄ , 60 mg NaCl) B : 240 mg MgSO ₄ , 60 mg NaCl (mélange préparée au laboratoire) C : 240 mg MgSO ₄ , 60 mg NaOAc
3	Purification	Poudre d-SPE	A : 30 mg PSA, 30 mg C18, 4.5 mg GCB, 90 MgSO ₄ (sachet) B : 60 mg PSA, 90 mg MgSO ₄ C : 60 mg C18, 90 mg MgSO ₄ D : 45 mg C18, 90 mg MgSO ₄ E : 60 mg C18, 120 mg MgSO ₄ F : 15 mg PSA, 45 mg C18, 90 MgSO ₄ G : 60 mg C4, 90 mg MgSO ₄ H : 45 mg C4, 90 mg MgSO ₄

Pour assurer la fiabilité de notre méthode d'extraction, nous avons effectué chaque expérience avec des échantillons en triplicata. Nous avons procédé à la consolidation des résultats pour chaque condition expérimentale pour avoir des valeurs moyennes et une mesure sur la répétabilité de la méthode.

Après les expériences initiales de la méthode mini-QuEChERS, nous avons procédé à un test de recouvrement de nos analytes dans la matrice d'urine avec la méthode optimisée. Pour ce faire, un

échantillon contenant 0.54 mL d'urine avec et sans l'ajout de 60 µL de la solution de 32 standards. On a ajouté la même quantité de standards à l'échantillon contrôle (échantillon 100% recouvrement) après l'extraction, juste avant l'étape d'évaporation. Les échantillons ont été évaporés à sec et reconstitués avec 100 µL 10% ACN avant de les analyser avec les deux méthodes LC-MRM. Les rendements d'extraction des contaminants ont été calculés en comparant les aires de pics LC-MRM pour chaque composé d'intérêt avec celui de l'échantillon contrôle. La formule pour calculer le rendement d'extraction est la suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \left(\frac{\text{aire d'échantillon extrait}}{\text{aire d'échantillon contrôle}} \right) \times 100\%$$

3.2.2 Extraction en phase solide SPE

L'extraction en phase solide (SPE) est la technique la plus utilisée pour purifier et/ou concentrer un échantillon. (Abe, 2010) Le principe de la SPE est de laisser passer un volume connu d'échantillon à travers une cartouche (Buszewski, 2012) contenant un adsorbant approprié. (Abe, 2010) Le principe d'extraction est ainsi basé sur la distribution sélective entre la phase stationnaire et le solvant. (Buszewski, 2012) Le mode d'utilisation consiste à retenir les différents analytes sur l'adsorbant et ensuite par rinçage, les constituants sont éliminés de la matrice n'ayant pas d'affinité avec la résine. Finalement, les composés d'intérêts sont récupérés. (Rouessac, 1992) Il existe différents types d'adsorbants (cartouches SPE) disponibles commercialement. Le choix de la cartouche dépend des analytes ciblés, des interférences potentielles et de la matrice de l'échantillon. Dans cette étude, trois différents cartouches Oasis ont été testés, la MCX, HLB et la MAX. La cartouche MCX est une phase solide chargée positivement pour les composés cationiques. La HLB utilisée pour l'extraction des composés hydrophiles et lipophiles. (Humbert, 2010) La cartouche MAX a une phase solide combinant différentes interactions chimiques (échange d'ions, rétention hydrophobe, rétention électrostatique).

La méthode SPE (Figure 3.2) a préalablement été optimisée pour l'analyse des contaminants environnementaux dans les échantillons d'urine. Tout d'abord, 225 µL d'urine + 25 µL de solution 32 standards ont été dilués dans l'eau [1:4], puis chargé sur les cartouches préconditionnées (MeOH,

eau) pour permettre la rétention des analytes d'intérêt. Un premier lavage a été effectué avec de l'eau (cartouches HLB) ou avec eau et MeOH pour les cartouches MAX et MCX. Ensuite, les analytes ont été élués en utilisant le MeOH et une solution 2% acide formique (AF) dans le MeOH pour la MAX et 2% NH₄OH (pH 7) dans le MeOH pour la MCX. Les échantillons ont été évaporés, reconstitués avec du méthanol ou de la solution de 32 standards plus de l'eau puis centrifugés avant l'analyse en LC-MRM. Il n'y avait pas de pH mesurable dans la solution lors du chargement.

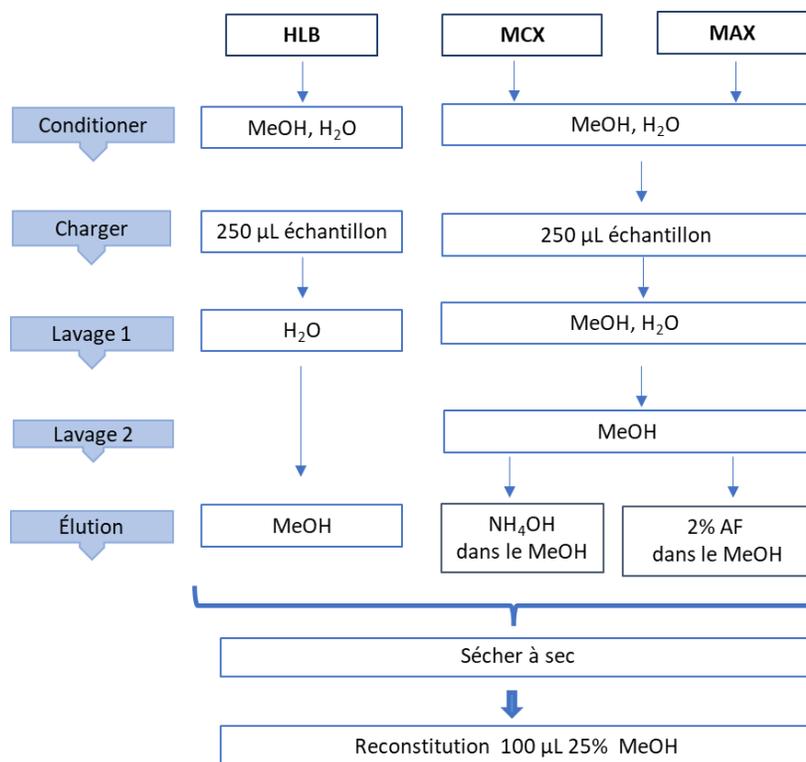


Figure 3.2 Protocole utilisé d'extraction sur phase solide

3.2.3 La précipitation des protéines

La précipitation des protéines est une méthode simple, rapide et efficace pour extraire et concentrer les protéines dans les échantillons biologiques à l'aide d'un solvant, par exemple l'acétonitrile, l'acétone ou le méthanol (MeOH). L'échantillon contenant les protéines est mélangé avec généralement trois fois le volume de solvant et après la centrifugation, les protéines forment un culot, le surnageant est récupéré dans un autre tube.

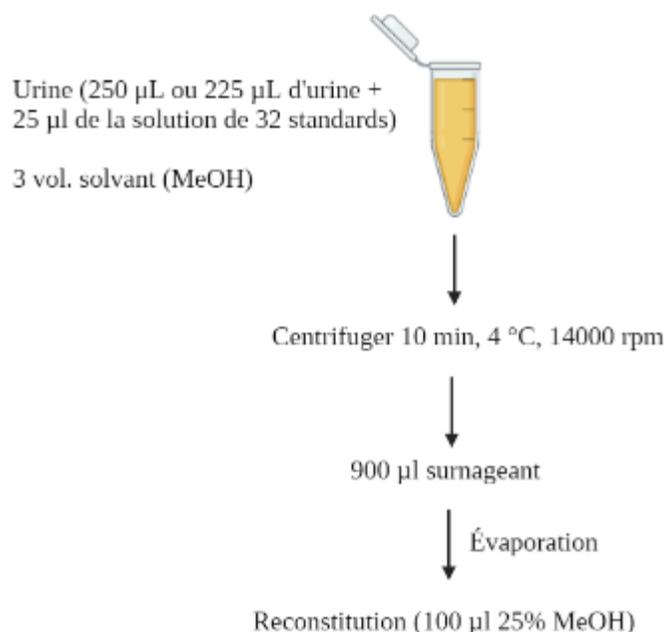


Figure 3.3 Protocole utilisé pour la précipitation des protéines

Pour la précipitation des protéines, les échantillons sont préparés selon la Figure 3.3, avec 225 µL d'urine et 25 µL solution de 32 standards sont mélangés avec le solvant (3:1), et mis à -20°C pendant 10 min pour favoriser la précipitation. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 14 000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant (900 µL) a été séché, puis reconstitué avec 100 µL de 25% MeOH (incluant la solution de 32 standards pour les échantillons contrôles).

3.3 Résultats

Dans notre étude sur l'optimisation de la méthode d'extraction, il est important de noter que les composés simazine et chlorpyrifos n'ont pas été inclus dans la mini QuEChERS ni la SPE, car ils n'étaient pas encore incorporés dans l'étude.

3.3.1 La méthode d'extraction mini-QuEChERS

3.3.1.1 Solvant d'extraction

La première étape l'optimisation de la méthode d'extraction mini-QuEChERS consistait à déterminer les concentrations appropriées d'acide acétique.

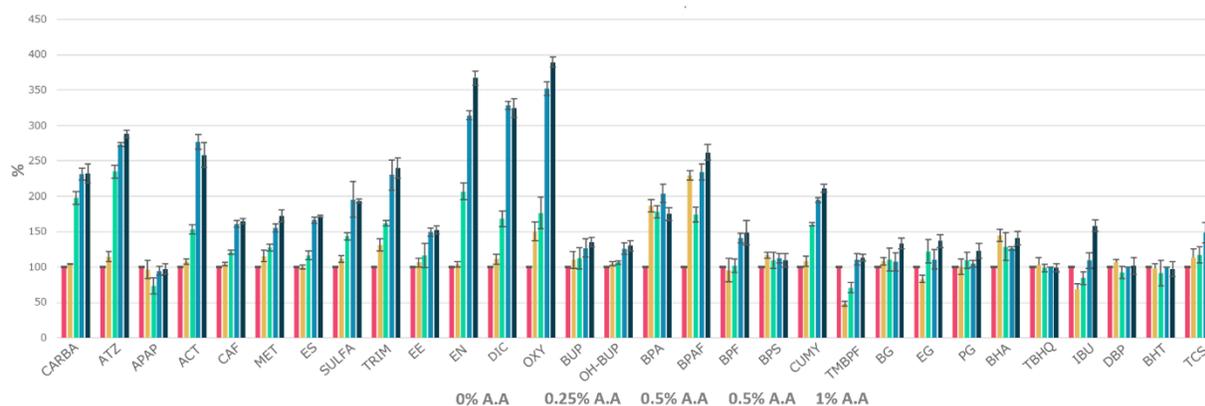


Figure 3.4 Les différentes tendances de rendements d'extraction avec différents pourcentages d'acide acétique (AA), en utilisant la condition de 0% AA comme référence (100%)

Nous avons testé cinq différentes concentrations d'acide acétique, allant de 0 à 1 %, pour évaluer l'impact sur le recouvrement et l'intensité des signaux des composés d'intérêt. L'analyse des résultats représentés dans la Figure 3.4 a révélé que certains composés ont montré un meilleur rendement avec l'augmentation du pourcentage d'acide acétique. Cela indique que l'augmentation de l'acidité de la solution d'extraction a favorisé une meilleure extraction de ces composés. L'acide acétique, en tant qu'acide faible, peut influencer le pH de la solution d'extraction, ce qui peut avoir un impact sur la solubilité des analytes et leur interaction avec la matrice d'échantillon. Pour certains composés, une augmentation de l'acidité a probablement facilité leur dissociation des matrices et leur transfert vers la phase organique, ce qui a amélioré leur récupération. Cependant, pour d'autres composés, l'augmentation de la concentration d'acide acétique n'a pas eu d'effet significatif sur leur recouvrement. Cela peut être dû à plusieurs facteurs, tels que les propriétés

chimiques spécifiques des composés, leur solubilité dans la phase organique ou leur interaction avec la matrice d'échantillon. Ces composés peuvent être moins sensibles à l'acidité de la solution d'extraction et peuvent être extraits efficacement même à des concentrations d'acide acétique plus faibles. Sur la base de ces résultats, la concentration de 1 % d'acide acétique a été choisie pour les prochains tests.

3.3.1.2 Optimisation de la poudre d'extraction

Lors de notre étude comparative, trois différentes compositions de poudre d'extraction ont été testées et sont présentées dans le tableau 3-1.

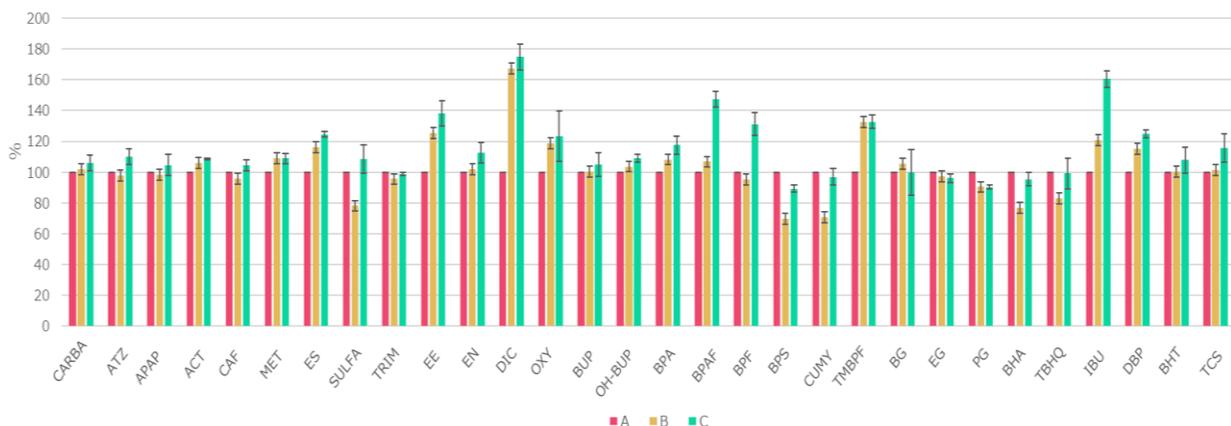


Figure 3.5 Pourcentages de rendement avec les différentes poudres d'extraction

Les résultats obtenus ont révélé des différences significatives entre les trois poudres. La formulation préparée au laboratoire (B) a montré des performances supérieures par rapport au sachet QuEChERS de chez Agilent (A) cela peut s'expliquer par le fait que les réactifs de laboratoire peuvent être de pureté supérieure, ce qui a permis d'obtenir des rendements d'extraction plus élevés pour la plupart des composés ciblés. Ensuite, l'utilisation de l'NaOAc (C) a apporté des avantages supplémentaires, car il favorise la formation d'une phase aqueuse, ce qui peut faciliter la dissolution des analytes polaires, par exemple l'APAP, et leur transfert dans la phase organique lors de

l'extraction ce qui augmente la récupération des analytes d'intérêts. Les résultats obtenus ont clairement indiqué que la formulation C, contenant de l'acétate de sodium (NaOAc), a été plus efficace pour extraire les composés d'intérêt par rapport aux autres formulations testées.

3.3.1.3 Poudre d-SPE

Après avoir validé les deux tests précédents. Nous avons entamé la deuxième étape qui est la purification d-SPE, et avons testé différentes (tableau 3-1) formulations de poudre de purification afin de déterminer la plus efficace pour nos échantillons qui agissent en synergie pour piéger et éliminer les composés indésirables.

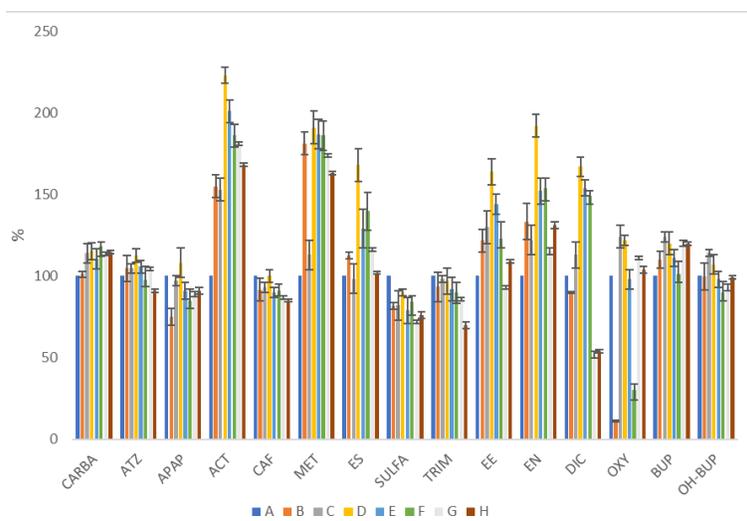


Figure 3.6 Pourcentages de rendement avec les différentes poudres de purification avec la méthode mini-QuEChERS pour les composés analysés en mode positif

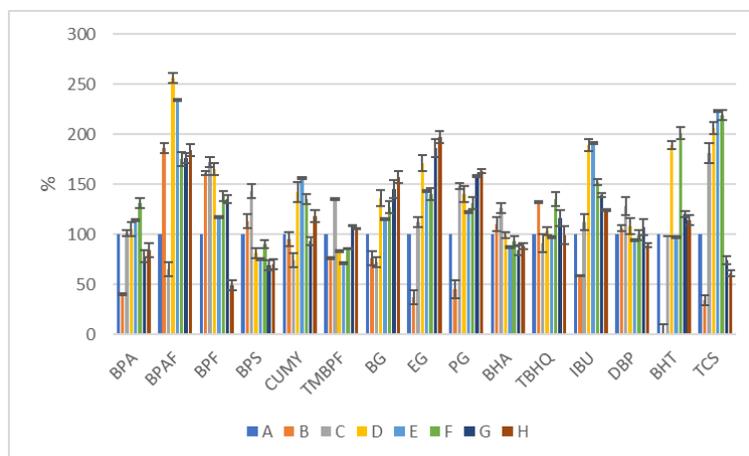


Figure 3.7 Pourcentages de rendement avec les différentes poudres de purification avec la méthode mini- QuEChERS pour les composés analysés en mode négatif

Dans les Figures 3.6 et 3.7, les résultats indiquent que la poudre D, composée de 45 mg de C18 et de 90 mg de $MgSO_4$, a donné les meilleurs résultats en termes de purification des échantillons pour la plupart des analytes. Cette conclusion est basée sur une comparaison des valeurs obtenues pour chaque composé dans différentes conditions expérimentales (A à H).

L'utilisation du C18 dans la poudre D a été bénéfique pour favoriser la rétention des contaminants. D'autre part, le $MgSO_4$ présent dans la poudre joue un rôle important dans l'amélioration de l'efficacité de la purification. Pour les combinaisons de poudres C, D, E, la différence entre ces trois combinaisons réside dans la quantité relative de C18 et de $MgSO_4$ utilisées. La poudre D a donné les meilleurs résultats en termes de purification des échantillons par rapport aux autres combinaisons. Cela peut s'expliquer par plusieurs facteurs : tout d'abord l'équilibre entre rétention et efficacité une quantité excessive de C18 peut entraîner une rétention excessive des analytes d'intérêt, entraînant une perte de rendement et une faible efficacité de purification. Ainsi qu'une quantité plus élevée de $MgSO_4$, comme dans la poudre E, peut capturer davantage d'humidité, mais cela peut également entraîner une augmentation de la viscosité de l'échantillon, entraînant une manipulation plus difficile.

Toutefois, nous avons constaté que l'utilisation de poudres telles que le PSA ou le GCB n'était pas nécessaire, car ils sont utilisés principalement pour éliminer les pigments, les matières grasses et d'autres composés indésirables présents dans les échantillons de fruits ou autres aliments. Dans notre cas, l'urine n'a pas une présence importante de pigments ou d'autres substances qui nécessitent leur utilisation ni n'aurait apporté d'avantages supplémentaires à notre étude.

3.3.1.4 Validation de la méthode mini-QuEChERS

Une fois les tests validés et la méthode optimisée (Figure 3.7), une vérification de l'efficacité d'extraction a été effectuée sur des échantillons d'urine.

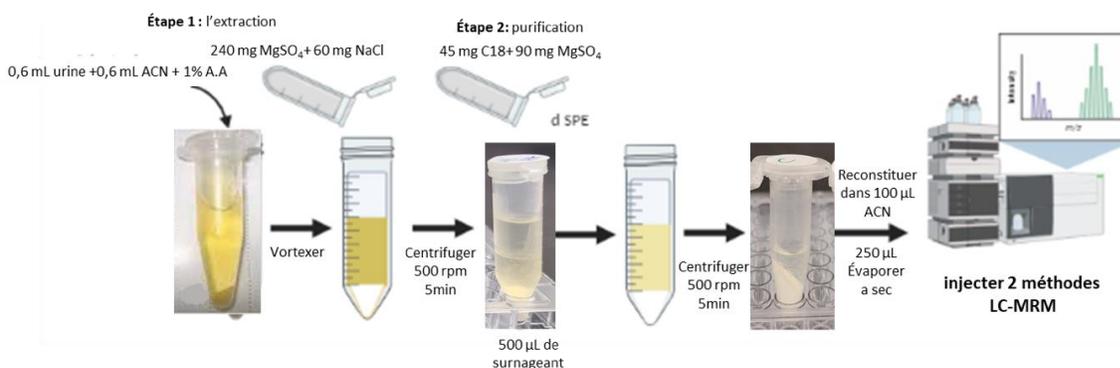


Figure 3.8 Protocole mini-QuEChERS optimisé

Les résultats de rendement d'extraction ont été comparés pour évaluer l'efficacité de la méthode optimisée. Un rendement proche de 100 % indique une bonne efficacité d'extraction (l'intervalle accepté dans la littérature est habituellement de 70 à 120 %). (Anastassiades, 2003) La Figure 3.8 montre le résultat du rendement obtenu pour les analytes analysés avec notre méthode LC-MRM ciblée.

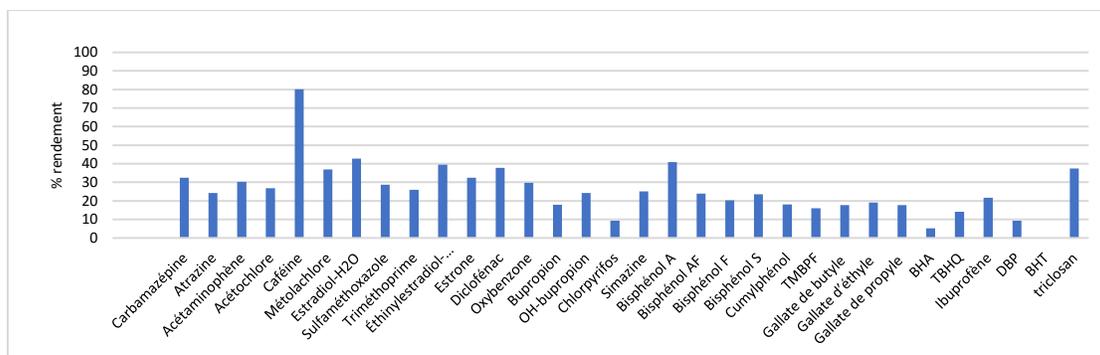


Figure 3.9 Rendements d'extraction des contaminants dans l'urine avec la méthode optimisée de mini-QuEChERS

Les résultats du rendement d'extraction des contaminants dans l'urine varient entre 0 et 80 %. Le rendement de la caféine est à 80 %. Tandis que, pour le BPA, l'éthinylestradiol, l'estradiol, le métolachlore, le diclofénac et le triclosan a diminué vers 40 %, ainsi que la carbamazépine, l'acétyaminophène, la sulfaméthoxazole, le triméthoprime et l'oxybenzone et l'estrone à 30 %. L'atrazine, l'acétochlore, le hydroxy-bupropion, le bupropion, la simazine, le bisphénol AF, le bisphénol F, le bisphénol S, le cumylphénol ont vu des rendements vers 20 %, le TMBPF, les gallates et l'ibuprofène environ à 10 %, le TBHQ, le DBP, le chlorpyrifos et BHA à 5 %. La méthode n'a pas permis la détection du BHT cela s'explique que le BHT se soit évaporé pendant l'étape d'évaporation, entraînant ainsi sa perte et l'incapacité de le détecter. Tant dit que que le l'échantillons standard n'a pas subi d'étape d'évaporation.

Bien que la QuEChERS est une technique connue et largement utilisée pour l'extraction et l'analyse des contaminants présents dans les échantillons alimentaires. Cependant, lorsqu'on l'applique à des échantillons d'urine, pour les contaminants d'intérêt, la méthode n'a pas été efficace. Cela a entraîné une perte importante de récupération de la plupart des composés ciblés (Figure 3.8). Bien que cette méthode soit rapide et facile, cette perte de recouvrement est un paramètre critique dans l'analyse, car il peut y avoir une sous-estimation des niveaux d'expositions à ces xénobiotiques. Cette perte de récupération peut être due aux interactions de la matrice de

l'urine avec les solvants et les sels utilisés dans la méthode, ou à une extraction incomplète des composés d'intérêt.

De plus, cette méthode était relativement longue, ce qui rend la méthode peu pratique et limite les possibilités de préparer plusieurs échantillons à la fois. En conséquence, la mini-QuEChERS a été écarté et d'autres méthodes d'extraction ont été testées par la suite pour l'analyse des contaminants environnementaux présents dans les échantillons d'urine.

3.3.2 Extraction en phase solide (SPE)

Les résultats de rendement d'extraction pour la méthode SPE sont présentés dans la Figure 3.9 où les performances des trois cartouches Oasis (HLB, MAX, MCX) ont été comparées.

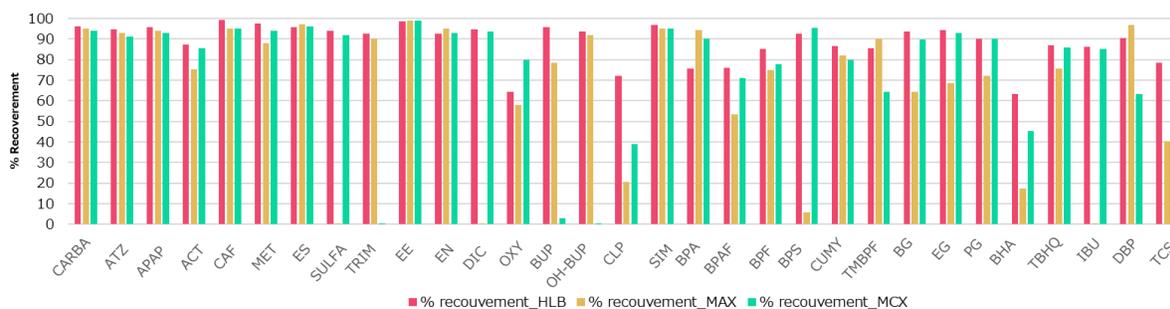


Figure 3.10 Rendements d'extraction des contaminants dans l'urine avec différentes cartouches SPE

Les résultats dans la Figure 3.9 montrent que les performances des cartouches d'extraction varient en fonction des composés chimiques étudiés. La cartouche HLB semble être la plus efficace pour la récupération de la plupart des composés, avec des taux de récupération allant de 64% à 99% pour tous composés, et 24 composés avec plus de 80%.

Lors de l'utilisation de la cartouche MAX, les résultats varient de 0 à 99% pour les différents composés, avec une moyenne de recouvrement de 58%. Les valeurs les plus élevées sont obtenues pour les composés triméthoprimine, BPA, EE, DBP avec des taux supérieurs à 90%. Cependant, pour certains composés, tels que CLP, BHA, BPS le recouvrement est très faible.

La cartouche MCX montre également des taux de récupération élevés pour la plupart des composés, allant de 39% à 99%, avec une moyenne de recouvrement de 68%. Certains composés, tels que le bupropion et son métabolite hydroxylé, présentent des taux de récupération plus bas. Les valeurs les plus élevées sont obtenues pour l'estrone, l'estradiol, la sulfaméthoxazole, avec des taux de recouvrement supérieurs à 90 %.

Pour le BHT, les trois cartouches n'ont pas donné de pic détectable en raison de sa dégradation ou sa volatilisation pendant le processus d'extraction et l'évaporation. Ce phénomène a déjà été vu lors des expériences préalables au laboratoire. (Ousji, 2020b)

3.3.3 Comparaison des méthodes optimisées de précipitation de protéines et d'extraction sur phase solide

Pour cette partie, nous avons comparé les résultats des échantillons avec la méthode SPE-HLB et la méthode protéine précipitation avec le méthanol, avec des échantillons en triplicata. Nous avons préalablement testé deux solvants pour la précipitation, le méthanol et l'acétonitrile, et les résultats étaient meilleurs avec le méthanol.

Les résultats dans la Figure 3.10 montrent des pourcentages de récupération élevés allant de 71 % à 98 % pour la précipitation des protéines avec le MeOH. La SPE-HLB a aussi bien fonctionné pour la plupart des composés ciblés, mais certains analytes, comme le BHT et le BHA n'ont pas eu de bons résultats. L'oxybenzone a aussi un rendement moins élevé pour la SPE-HLB comme l'indique la figure 3.9.

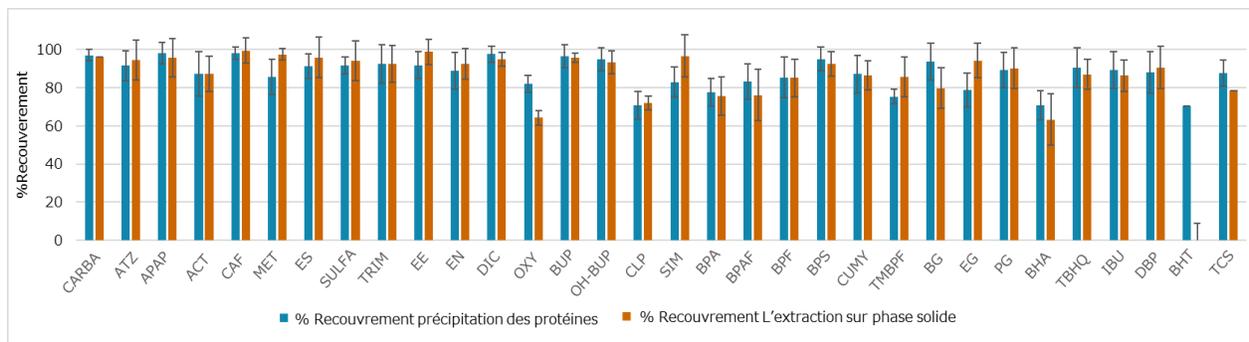


Figure 3.11 Rendements d'extraction des contaminants dans l'urine avec la méthode SPE et la avec la méthode protéine précipitation

Le choix final de la méthode d'extraction par la précipitation des protéines avec le MeOH a été motivé par plusieurs facteurs. Le coût est un aspect important à prendre en compte lors du choix d'une méthode d'extraction. Les cartouches SPE sont beaucoup plus dispendieuses. Aussi, la précipitation des protéines avec le MeOH est une méthode simple et rapide, ce qui est particulièrement bénéfique lorsqu'il faut traiter un grand nombre d'échantillons. La précipitation des protéines avec méthanol a alors été choisie comme méthode d'extraction pour la suite du projet de recherche.

CHAPITRE 4

Analyse de contaminants environnementaux dans l'urine par LC-MS/MS ciblé et non ciblé

Les contaminants environnementaux présents dans notre environnement peuvent avoir un impact significatif sur la santé humaine. Ces substances chimiques, provenant de diverses sources telles que les produits chimiques industriels, les pesticides agricoles et les produits de consommation, peuvent contaminer l'air, l'eau et les aliments que nous consommons. L'évaluation de l'exposition de la population à ces contaminants est essentielle pour comprendre leurs effets potentiels sur la santé. Dans ce chapitre, nous nous concentrons sur l'analyse des contaminants environnementaux dans l'urine en utilisant deux techniques LC-MS/MS, voir l'analyse ciblée et l'analyse non-ciblée. Notre objectif est d'identifier de manière précise ces contaminants, fournissant ainsi des informations détaillées sur l'exposition potentielle des individus à ces substances nocives. Nous avons utilisé notre méthode de préparations des échantillons urinaires par précipitation de protéines avec le méthanol, étant la méthode choisie selon les critères établis dans le Chapitre 3. Nous avons également intégré une étape d'hydrolyse dans la préparation des échantillons pour les métabolites conjugués afin de les convertir en forme parent pour une détection des contaminants ciblés à l'aide de notre méthode LC-MRM optimisée (Chapitre 2). En plus de l'approche ciblée, nous avons utilisé une méthode non ciblée par LC-HRMS/MS pour explorer l'exposome plus large, dans le contexte de ces contaminants, ayant accès à la détection de leurs métabolites et sans avoir besoin de l'étape d'hydrolyse. Cette approche nous permet d'identifier de dresser un profil global de l'exposition à ces contaminants environnementaux. Nous avons mené des incubations *in vitro* de nos 32 composés, afin de simuler les processus métaboliques qui se produisent dans le corps. Cela nous a permis de compiler une base de données de spectres MS/MS des métabolites conjugués et oxydatifs ainsi les adduits *N*-acétylcystéine (NAC) qui a été utilisée pour traiter les données de l'analyse non ciblée. Les résultats obtenus à partir des analyses ciblées et non ciblées des échantillons d'urine nous permettent d'évaluer l'exposition de la population à ces contaminants et d'identifier les composés préoccupants.

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 Produits chimiques

Pour l'hydrolyse, les enzymes de clivage le β -glucuronidase 300 000 U/g et l'aryl-sulfatase 10 000 U/g ont été achetés en forme de poudre, ainsi que l'acétate d'ammonium (grade HPLC) chez Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Pour les incubations de métabolisme *in vitro*, l'acide uridine 5'-diphosphoglucuronique (UDPGA), nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺), glucose-6 -phosphate, MgCl₂ et glucose-6-phosphate déshydrogénase, ainsi que de l'acétonitrile (ACN) du méthanol et de l'acide formique (tous de qualité HPLC), ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les microsomes de foie humain et de rat (HLM et RLM) ont été achetés chez Corning (Corning, NY, USA). L'eau ultra-pure provenait d'un système UV Millipore Synergy (Billerica, MA, USA).

4.2 Méthodes utilisées

4.2.1 Préparation d'échantillons

Pour la préparation d'échantillons urinaires (Figure 4.1), une hydrolyse enzymatique a été ajoutée. Le but de réaliser cette étape c'est qu'une fois que ces contaminants entrent en contact avec l'organisme, ils se métabolisent dans le foie. Puis, ils se conjuguent pour favoriser leur élimination dans l'urine. L'hydrolyse enzymatique a été réalisée en utilisant des enzymes spécifiques telle que, la beta-glucuronidase et l'aryl-sulfatase, qui permettent la déconjugaison des composés glucuronidés ou sulfatés présents dans les échantillons. Ces enzymes catalysent la réaction d'hydrolyse, qui consiste en la rupture d'une liaison chimique par l'ajout d'une molécule d'eau. Cette réaction permet de libérer les composés parents de leurs formes conjuguées facilitant ainsi leur détection par la méthode ciblée optimisée.

Initialement, nous avons testé les réactions d'hydrolyse avec les deux enzymes séparément pour quelques échantillons urinaires (Figure 4.1). La préparation des enzymes était comme suit 7 mg β -glucuronidase (300,000 U/g) + 360 mg aryl-sulfatase (10,000 U/g) ont été dissoutes dans 3,7 mL de tampon d'acétate d'ammonium 1 M (pH 5) pour ajuster le pH créant ainsi un environnement favorable à l'activité enzymatique. Quand les échantillons urinaires de plusieurs volontaires ont été testés, nous avons décidé d'utiliser les deux enzymes en combinaison, ce qui va offrir un moyen efficace de cliver les groupements sulfatés et glucuronidés présents dans les échantillons, facilitant

ainsi leur analyse et leur identification ultérieures, ainsi que réduire le nombre d'échantillons à traiter.

Pour la préparation des échantillons, on ajoute 200 μL d'urine de volontaires dans des tubes, on ajoute ensuite 200 μL d'enzyme de clivage et 100 μL d'ammonium d'acétate qui va permettre d'initier la réaction d'hydrolyse et de créer des conditions optimales pour la déconjugaison des composés conjugués. Les échantillons sont ensuite mélangés puis incubés pendant 4 h à 37 °C en mélangeant à l'aide d'un thermomixeur (Eppendorf) à une vitesse de 650 rpm. Les échantillons incubés sont soumis à l'extraction par précipitation des protéines (Chapitre 3) par l'ajout de 3 volumes de MeOH froid, qui sert aussi à arrêter l'activité enzymatique. Les échantillons ont été centrifugés (8 min à 4°C, 14 000 rpm), puis le surnageant a été séché et reconstitué avec 150 μL de 25% MeOH.

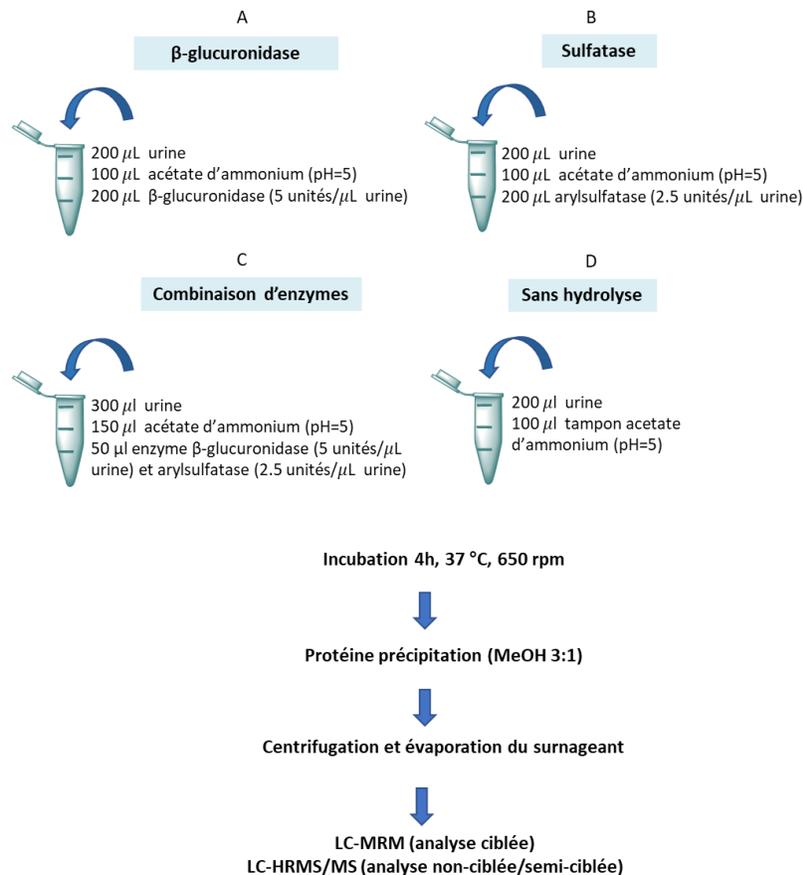


Figure 4.1 Les étapes de préparation des échantillons d'urine, incluant l'étape d'hydrolyse A,B,C

4.2.2 Les incubations de métabolisme *in vitro*

Les incubations *in vitro* permettent de simuler les mêmes réactions métaboliques qui se produisent dans un organisme vivant, au niveau du foie. Les composés sont incubés avec des enzymes hépatiques et des cofacteurs, tels que le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), l'UDPGA (uridine 5'-diphosphate acide glucuronique) et le NAC (*N*-acétylcystéine). Le NADPH sert comme co-facteur pour la formation de métabolites oxydatifs (phase I), le UDPGA pour la formation des glucuronides (phase II) et le NAC pour piéger les métabolites réactifs pour former des adduits stables. Ces échantillons ont été ensuite analysés par LC-HRMS/MS pour créer une base de données de spectres de tous les métabolites détectés.

Pour l'étude du métabolisme *in vitro* des contaminants ciblés, les échantillons (Figure 4.2) ont été incubés dans 5 groupes différents (Tableau 4-1) (pour éviter les interférences entre les composés et réduire le nombre d'échantillons), avec les cofacteurs nécessaires. Pour les métabolites oxydatifs, les composés (20 µM) ont été incubés avec des microsomes hépatiques de rat (1 mg/mL de protéine), avec le NAC (2 mM) et un système de régénération de NADPH qui contient 5 mM de MgCl₂, 0,5 mM de NADP⁺, 5 mM de glucose-6-phosphate et 2 unités/mL de glucose-6-phosphate déshydrogénase, à 37 °C pendant 1 heure, dans un tampon phosphate 100 mM à pH 7,4. Les incubations sans NADPH ont été utilisées comme contrôles. La réaction a été arrêtée par l'ajout d'un volume égal d'acétonitrile froid, puis centrifugée pendant 8 minutes à 14000 rpm, à 4 °C. Les surnageants ont ensuite été évaporés à sec et reconstitués avec 375 µL d'acétonitrile à 10 %.

Tableau 4-1 Les groupes d'incubations pour l'étude du métabolisme *in vitro* des contaminants ciblés

Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5
estradiol	estrone	éthinyloestradiol	BG	bupropion
EG	acétaminophène	acétochlore	atrazine	OH-bupropion
BHA	BHT	BPA	BPAF	chlorpyrifos
BPF	BPS	caféine	carbamazépine	simazine
CUMY	diclofénac	ibuprofène	TMBPF	
métolachlore	oxybenzone	PG	sulfaméthoxazole	
triclosan	triméthoprime	TBHQ	DBP	

Pour la glucuronidation, les mêmes composés (20 µM) ont été incubés avec des microsomes de foie de rat (1 mg/mL de protéine), 2 mM d'UDPGA, 5 mM de MgCl₂, 0,5 mM de NADP⁺, 5 mM de glucose-6-phosphate et 2 unités/mL de glucose-6-phosphate déshydrogénase et à 37 °C pendant 1 h. Des contrôles sans ajout d'UDPGA ont également été préparés. La réaction a été arrêtée et centrifugée comme indiqué ci-dessus, et le surnageant a été évaporé et reconstitué.

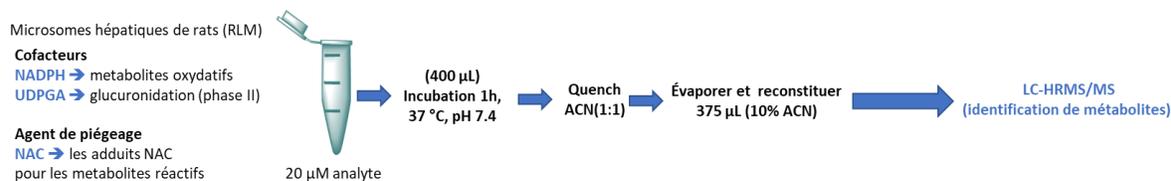


Figure 4.2 Protocole de préparation d'échantillons pour la formation de métabolites *in vitro*

4.2.3 Méthodes d'analyse

Dans notre étude, nous avons utilisé différentes stratégies pour analyser les échantillons d'urine et détecter les composés d'intérêt. Nous avons utilisé plusieurs méthodes de dépistage qui nous ont permis d'explorer de manière approfondie la composition des échantillons. Ces méthodes comprennent le dépistage ciblé (chapitre 2), et le dépistage non ciblé.

4.2.3.1 Analyse non-ciblée par LC-HRMS/MS

Les analyses LC-HRMS/MS ont été réalisées à l'aide d'une UHPLC (Shimadzu Nexera) couplée à un système Sciex 5600 TripleTOF® (*quadrupole-time-of-flight*) (Concord, ON, Canada), équipé d'une source DuoSpray, en mode électrospray positif et négatif. La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide de la même colonne Phenomenex Kinetex® biphényle (100 × 2,1 mm, 2,6 µm) à 0,25 mL/min et une température de la colonne de 40 °C avec les phases mobiles comportant 0,1 % d'acide formique (AF) dans l'eau (A) et 100 % acétonitrile (ACN) (B) pour la méthode 1 en mode positif, ainsi que 5 mM acétate d'ammonium dans l'eau (A) et 100 % ACN (B) pour la méthode 2 en mode négatif. Le volume d'injection était de 25 µL. Le gradient pour les deux différentes méthodes débute à 5 % B et est maintenu pendant 0,5 min, puis augmente linéairement à 50 % à 15 min, jusqu'à 95 % à 18 min (tableau 4-2) et maintenus pendant 3 min supplémentaires. Les paramètres de la source d'ionisation comprenaient une tension d'ionisation de 5 000 V, un gaz de rideau de 35 psi, des gaz de séchage et de nébulisation de 50 psi, une température de source de 450 °C et un potentiel DP (declustering) de 60 V. Des spectres TOF-MS ont été acquis (avec un temps d'accumulation de 250 ms), suivis par des analyses MS/MS en mode d'acquisition dépendant de l'information (DDA) sur les 5 ions les plus intenses en utilisant une soustraction dynamique du bruit de fond (150 ms chacun). La dissociation induite par l'énergie de collision a

été réalisée avec un décalage de tension de collision de 30 ± 10 V. L'azote a été utilisé comme gaz de collision. Pendant toutes les analyses effectuées, une étape de calibration automatique a été intégrée dans la séquence d'injections après chaque groupe de quatre échantillons. Cette étape de calibration consiste à introduire automatiquement dans le spectromètre de masse (MS) un mélange de composés standards à intervalles réguliers pendant que la procédure est en cours. Le calibrant, qui est une solution contenant des ions de masse connues, est alimenté directement dans le MS à l'aide d'une pompe à seringue ou d'un injecteur connecté à la pompe de chromatographie liquide (LC). La calibration nécessite une série d'ions espacés dans la plage de masses d'intérêt. Cette procédure de calibration garantit la fiabilité du système pour mesurer avec exactitude les masses des ions d'intérêt, à condition qu'ils soient bien distingués des autres ions présents simultanément lors de l'analyse. Les résultats des normes sont automatiquement vérifiés par le logiciel afin d'évaluer les performances du système, permettant ainsi un contrôle rigoureux de la qualité des signaux obtenus.

Tableau 4-2 Conditions chromatographiques des méthodes d'analyse non ciblée

	Méthode 1	Méthode 2
Mode d'ionisation	ESI +	ESI -
Colonne	Phenomenex Kinetex biphenyle (100 x 2,1 mm, 2,6 µm)	
Température	40°C	
Volume d'injection	25 µL	
Débit	0,25 mL/min	
Phases mobiles	A : 0,1 % d'acide formique dans l'eau B : Acétonitrile	A : 5mM acétate d'ammonium dans l'eau B : Acétonitrile
Gradient		

4.2.4 Traitement de données

Le logiciel MetabolitePilot 2.0 (Sciex) a été utilisé pour retrouver de façon automatisée les métabolites des composés parents dans les échantillons d'incubations *in vitro*. Ce logiciel compare les incubations contrôles avec ceux incluant les co-facteurs pour confirmer la présence de

métabolites en utilisant la masse exacte mesuré à haute résolution de l'ion précurseur. Il utilise une liste de biotransformations connues pour le métabolisme de médicaments (par exemple, l'hydroxylation, la désalkylation, la glucuronidation et la formation d'adduits NAC). La bibliothèque spectrale avec des spectres MS/MS obtenue par les incubations *in vitro* a été créée à l'aide du logiciel Sciex OS. Ce dernier a été utilisé pour traiter les données brutes des analyses d'échantillons urines (avec et sans hydrolyse) pour la recherche des contaminants et leurs métabolites qui se retrouvaient dans la base de données spectrales créée.

4.3 Résultats de l'analyse des échantillons avec et sans hydrolyse par méthode ciblée

Le dépistage ciblé des échantillons d'urine a été effectué par la méthode ciblée (LC-MRM) que nous avons optimisée dans le chapitre 2 qui correspond à détecter les 32 composés à partir de notre liste définie au préalable suivant le flux de travail dans la Figure 4.3.

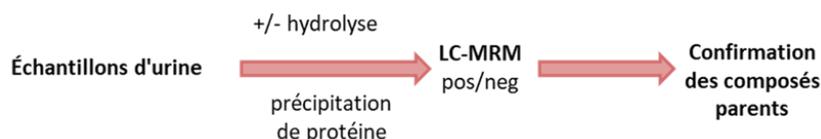


Figure 4.3 Flux de travail de la méthode ciblée pour les échantillons d'urine

Seize échantillons d'urine provenant de 16 volontaires ont été analysés par LC-MRM, suite à leur hydrolyse par le β -glucuronidase et l'aryl sulfatase suivant le protocole de la Figure (4.1). Chaque échantillon est une combinaison de 3 échantillons ou plus de la même personne. Les résultats du dépistage des échantillons ont été comparés entre les échantillons traités avec une étape d'hydrolyse enzymatique et ceux sans hydrolyse. La Figure 4.4 résume la détection des composés ciblés de ces échantillons.

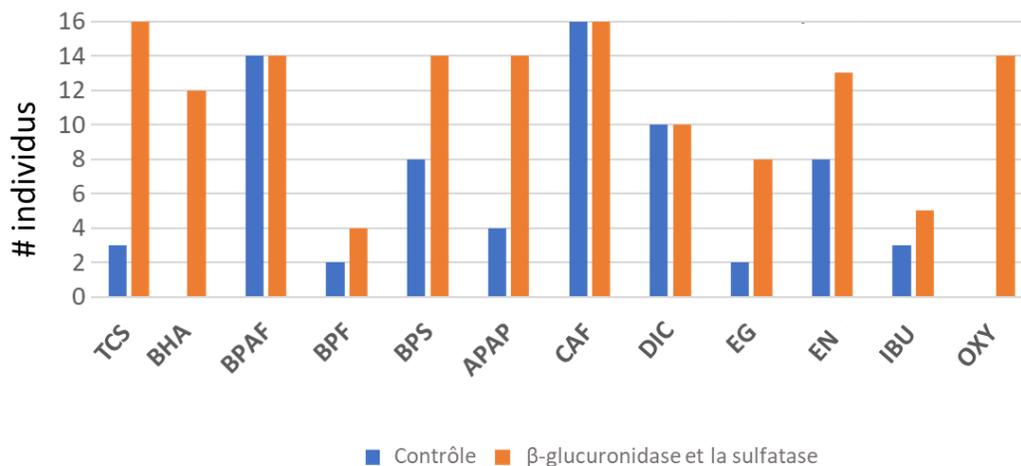


Figure 4.4 Prévalence des composés détectés par LC-MRM dans 16 échantillons d'urine (avec ou sans hydrolyse)

Les résultats obtenus indiquent que sur la liste des composés ciblés, 12 d'entre eux ont été détectés avec l'hydrolyse enzymatique et que 10 ont été détectés sans hydrolyse. Parmi eux se retrouvent l'APAP, la CAF, le DIC, l'EG, l'EN, l'IBU, le TCS, le OXY, le BPAF et le BPF et le BPS. En ce qui concerne l'oxybenzone et le BHA, la présence d'enzymes de clivage a été nécessaire pour les détecter. Cela indique que ces composés existent sous une forme conjuguée dans l'urine, et l'hydrolyse enzymatique est nécessaire pour les convertir en leur forme non conjuguée afin de pouvoir les détecter. La Figure 4.5 montre pour les 16 échantillons la distribution des aires de pics LC-MRM détectés pour quatre de ces composés, le BHA, le triclosan, la caféine et le BPS, ainsi que l'effet l'hydrolyse.

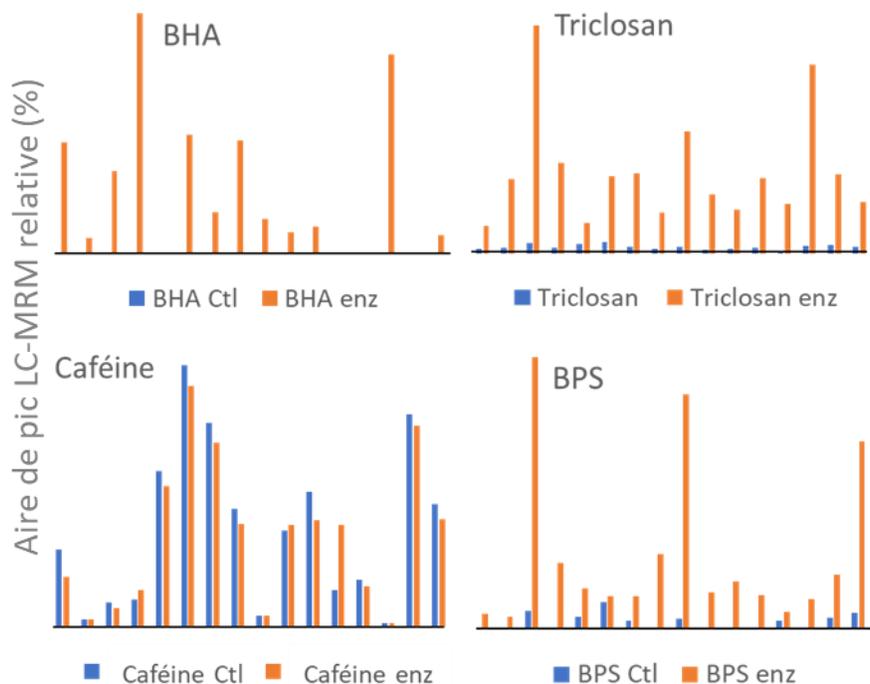


Figure 4.5 Quatre composés ciblés (BHA, TCS, BPS, CAF) détectés dans les échantillons d'urine de 16 personnes différents, montrant la variance de leur détection par LC-MRM et l'effet de l'hydrolyse

Le BHA a été détecté uniquement après une hydrolyse enzymatique dans les 16 échantillons d'urine. Cela montre qu'il était présent sous une forme conjuguée qui nécessitait une conversion enzymatique pour être détectée. Pour la caféine, la quantité détectée (Figure 4.5) dans les échantillons contrôle (Ctl) était supérieure à celle détectée dans les échantillons avec le clivage enzymatique, ce qui a conduit à une diminution légère de la quantité détectée, sauf pour un échantillon. Cela peut s'expliquer que la caféine n'a pas de métabolites conjugués qui vont reformés le composé parent lors de l'hydrolyse. Il est intéressant aussi de voir que le triclosan a été détecté dans 100% des échantillons d'urine lorsque l'hydrolyse enzymatique a été effectuée, tandis que le signal détecté était beaucoup plus faible sans hydrolyse. Nous voyons la même situation pour le BPS, que même si on le détecte dans plusieurs échantillons non-hydrolysés avec la méthode ciblée, le signal augmente beaucoup et on peut le confirmer dans 100% des échantillons après hydrolyse.

Le chromatogramme de la Figure 4.6 montre l'exemple du triclosan dans un même échantillon urinaire avec et sans le traitement enzymatique pour cliver les conjugués glucuronidés et sulfatés quand nous avons testé les enzymes d'hydrolyse séparément. Lorsque l'enzyme β -glucuronidase est ajoutée à l'échantillon, on remarque un pic plus grand observé dans le chromatogramme. Cela a donc permis de mieux détecter le triclosan intact dans l'échantillon. Pour l'échantillon hydrolysé avec l'aryl-sulfatase, on observe un pic plus prononcé de triclosan, comparé aux deux autres échantillons. Cette différence nous indique que le triclosan est probablement présent principalement sous forme de sulfate dans l'échantillon d'urine.

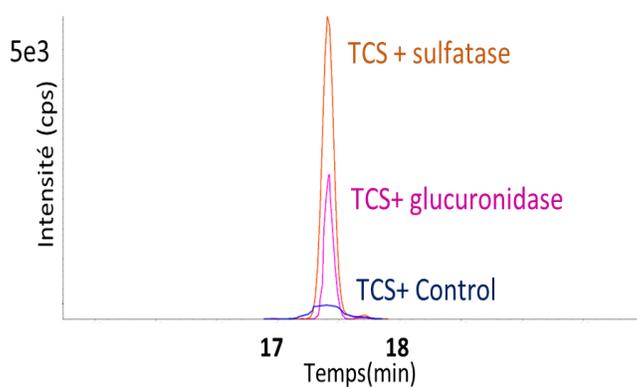


Figure 4.6 Chromatogramme de triclosan des échantillons préparés avec ou sans hydrolyse (en présence de β -glucuronidase et d'aryl-sulfatase) par LC-MRM

4.4 Identification de contaminants environnementaux dans l'urine par screening non-ciblé

Après l'analyse ciblée, nous avons examiné les échantillons qui présentaient des signaux positifs pour les composés parents. Nous avons exploré d'avantage la composition des échantillons, par l'analyse des données de manière semi-ciblée. Elle repose sur les résultats du dépistage ciblé. En fonction des résultats obtenus, nous avons pu identifier une liste de 12 composés parents pour les 16 volontaires par la suite par le dépistage non-ciblés. L'analyse non-ciblée nous ont permis non seulement de détecter les composés parent mais aussi leurs différents métabolites présents dans les échantillons. Les résultats représentatifs de ces analyses LC-HRMS/MS sont présentés pour plusieurs des composés confirmés par LC-MRM. Ces résultats sont issus de l'analyse à l'aide du

logiciel PeakView (Sciex) en prenant compte des formules chimiques de chacun des parents et leurs métabolites formés ou non dans nos incubations *in vitro*. Chaque pic représente un composé confirmé avec une masse exacte ayant une erreur de moins de 5 ppm.

Pour l'oxybenzone, le chromatogramme d'ions extraits de l'échantillon de contrôle (Figure 4.7a) montre plusieurs pics qui correspondent à des métabolites conjugués. Trois glucuronides ont été détectés, à savoir le OXY+gluc, OXY+O+gluc et OXY-CH₂+gluc. Après l'hydrolyse enzymatique (Figure 4.7b), nous voyons un pic intense correspondant l'OXY et la disparition des pics de métabolites conjugués ce qui indique que l'enzyme a pu rompre la liaison entre le parent et l'adduit. Aussi, il y a la présence de deux autres métabolites, l'oxybenzone déméthylé (OXY-CH₂) et l'oxybenzone hydroxylé (OXY+O). L'hydrolyse enzymatique est donc importante pour la détection directe de ce composé.

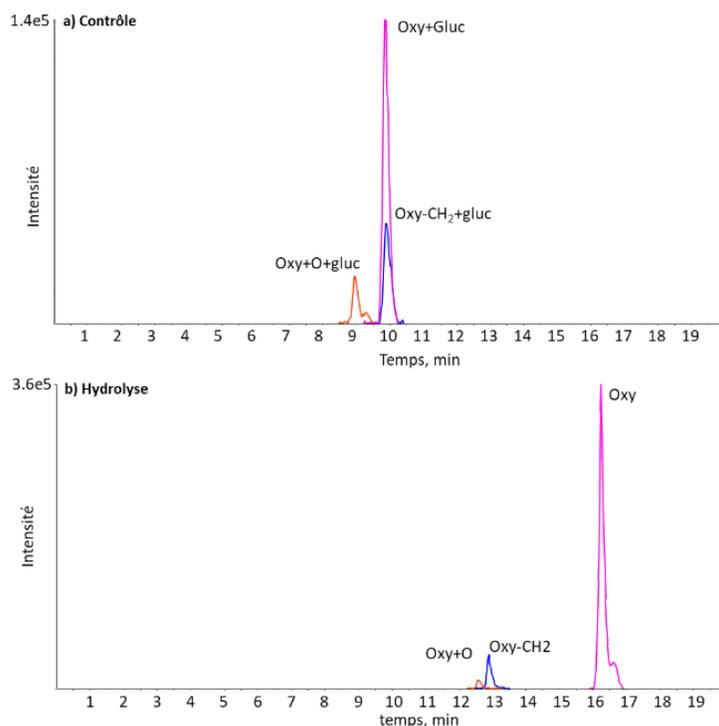


Figure 4.7 Chromatogramme d'ion extrait de l'échantillon du OXY et les métabolites glucuronidés détectés dans l'échantillon contrôle et pic d'OXY parent avec hydrolyse

L'échantillon d'urine non-hydrolysé (Figure 4.8a) montre la présence de métabolites conjugués glucuronide et sulfate de l'APAP, APAP+gluc à 1,6 min et l'APAP+SO₃ à 1,8 min. Il y a présence aussi d'autres métabolites d'un adduit NAC, le APAP-2H+NAC à 3.9 min, ainsi que l'adduit de cystéine, l'APAP-2H+Cys à 2,2 min. Avec le traitement enzymatique, les conjugués ont été hydrolysés pour former plus d'APAP (Figure 4.8b). On observe aussi une diminution de l'adduit NAC, ce qui indique que cet adduit n'est probablement pas complètement stable durant les conditions d'hydrolyse.

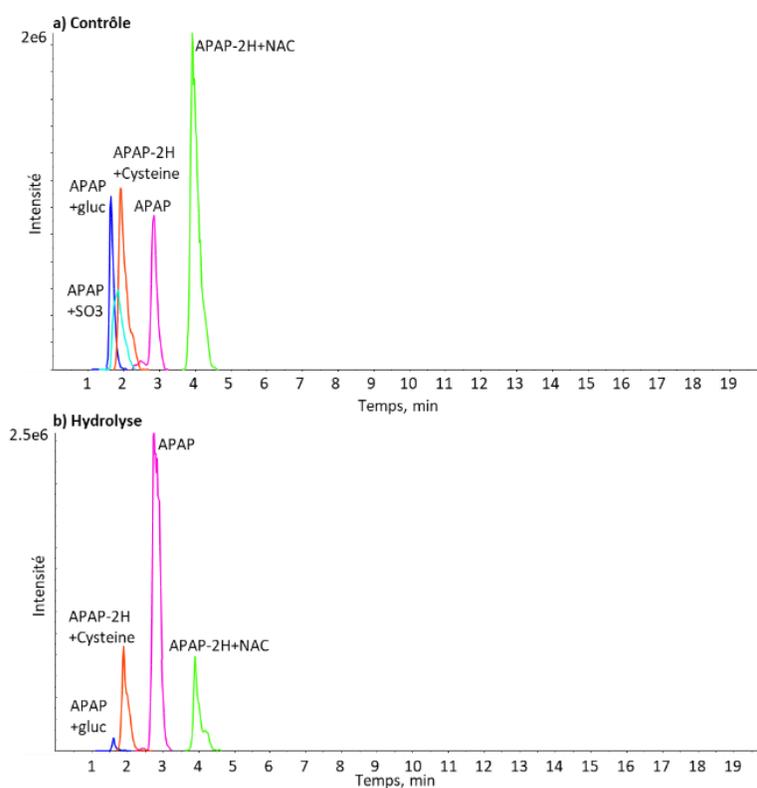


Figure 4.8 Chromatogrammes d'ions extraits de l'APAP parent et les métabolites glucuronidé et sulfaté, ainsi que l'adduit NAC et cystéine détectés dans un échantillon d'urine sans et avec le traitement d'hydrolyse

Pour le BPS, le chromatogramme d'ion extrait de l'échantillon de contrôle (Figure 4.9a) montre la présence de deux métabolites conjugués, le mono-glucuronide et le di-glucuronide, le BPS+gluc à 5,6 min et le BPS+2 gluc à 4,2 min. Après l'hydrolyse enzymatique (Figure 4.9b), nous observons la présence d'un petit pic correspondant au mono-glucuronide, et d'un pic correspondant au BPS en forme parente à 8,5 min, beaucoup plus clair que dans l'échantillon contrôle. Cependant, le pic du BPS est moins intense que les pics des métabolites détectés dans le contrôle. Il est possible aussi que les métabolites conjugués s'ionisent mieux que le BPS parent. Dans ce cas, si on cherche à avoir la meilleure détectabilité pour la confirmation d'une exposition au BPS, c'est probablement mieux de ne pas hydrolyser l'échantillon et viser la détection des métabolites connus.

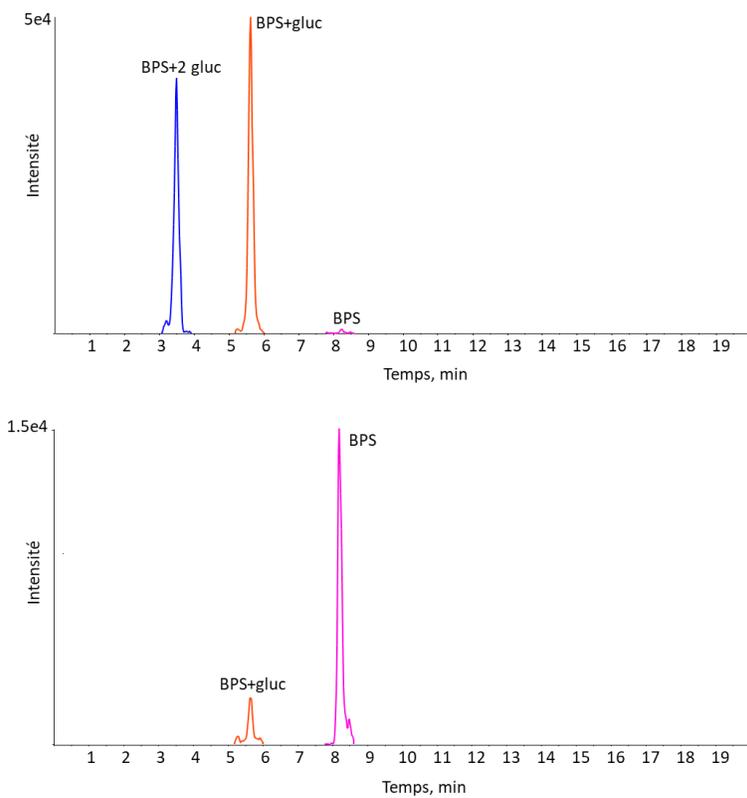


Figure 4.9 Chromatogrammes des ions extraits des métabolites du BPS formés dans l'échantillon de contrôle, et le BPS détecté dans l'échantillon avec hydrolyse

Pour le BHA, le chromatogramme d'ions extraits de l'échantillon de contrôle (Figure 4.10a) montre plusieurs pics qui correspondent à différents métabolites glucuronidés et sulfatés du BHA. Cinq conjugués glucuronidés ont été détectés, incluant deux métabolites BHA+O+gluc à 5,6 min et à 6,1 min, le BHA+gluc à 5,2 min, et deux TBHQ+gluc à 4,9 min et à 5,8 min. Trois conjugués sulfatés ont été détectés, dont deux correspondants au BHA+SO₃ à 5,1 min et BHA+O+SO₃ à 7,6 min, le troisième est un conjugué de sulfate du TBHQ, le TBHQ + SO₃ et à 5,1 min. Le TBHQ peut être formé par une simple *O*-déméthylation du BHA. Pour le chromatogramme de l'échantillon traité avec l'enzyme d'hydrolyse (Figure 4.10b), un pic correspondant au BHA est détecté. Deux conjugués glucuronidés du BHA ont aussi été détectés, à savoir le BHA+O+gluc, ainsi que le BHA+gluc avec un signal plus faible que dans l'échantillon sans hydrolyse. Deux conjugués sulfatés ont été détectés, le BHA+SO₃ et BHA+O+SO₃. La présence de ces métabolites indique que l'enzyme n'a pas clivé complètement tous les métabolites de phase II présents dans l'échantillon. Les conjugués du BHA ont donc l'air d'être assez résistants au clivage enzymatique. Ceci est un phénomène intéressant qui devrait être étudié d'avantage.

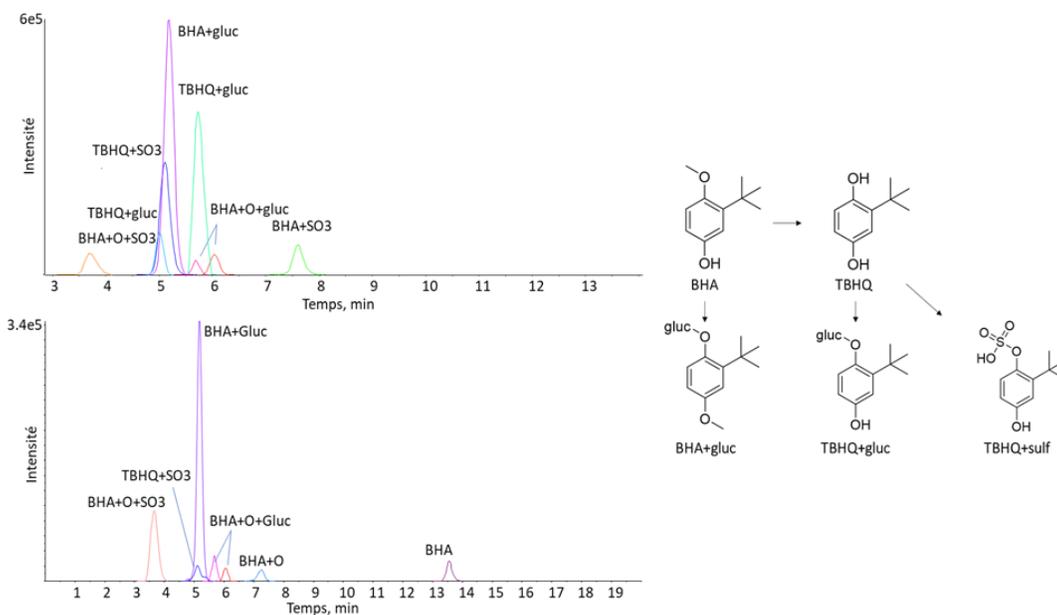


Figure 4.10 Chromatogrammes des ions extraits des métabolites du BHA formés dans l'échantillon A) contrôle et B) après traitement d'hydrolyse, avec le schéma de formation des métabolites de BHA trouvés dans les échantillons d'urine

Pour le BPAF, en examinant les deux chromatogrammes de la Figure 4.11, nous n'avons pas détecté de métabolites, et seul le composé BPAF parent à 14.1 min est présent avec un petit pic dans l'échantillon avec l'hydrolyse, et un pic encore plus faible dans l'échantillon contrôle. Aucun métabolite glucuronidé ou sulfaté n'a été détecté, probablement en raison de leur très faible concentration et possiblement leur sensibilité moindre que le composé parent en présence de la matrice biologique qui entraîne souvent une suppression ionique pour les métabolites plus polaires.

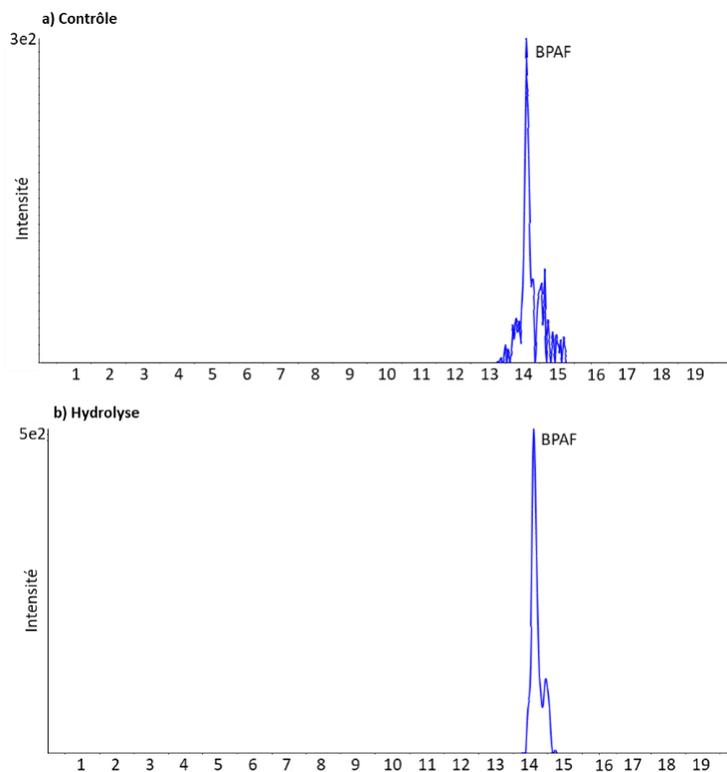


Figure 4.11 Chromatogramme d'ion extrait de BPAF dans l'échantillon contrôle (a) et après hydrolyse (b)

Pour le BPF, le chromatogramme de l'échantillon de contrôle (Figure 4.12a) montre un pic correspondant à un métabolite glucuronidé, BPF+gluc à 4,6 min, et deux conjugués sulfatés, correspondant au BPF+SO₃ à 6,0 min et au BPF+O+SO₃ à 5,0 min. Après l'hydrolyse, nous pouvons constater que la déconjugaison s'est bien fait pour cette molécule, et on voit la formation de deux pics du BPF hydroxylé (BPF+O). Le BPF intact est moins sensible après le traitement enzymatique, que les métabolites avant l'hydrolyse, ce qui était similaire dans le cas du BPS.

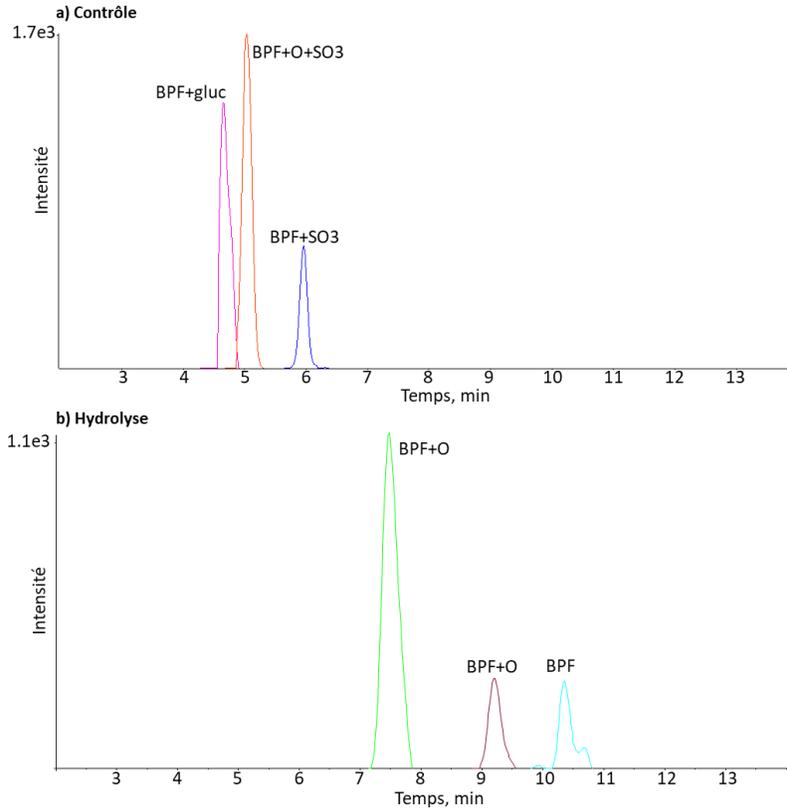


Figure 4.12 Chromatogrammes des ions extraits des métabolites du BPF dans un échantillon urinaire avec et sans hydrolyse

Pour le EG, le chromatogramme de la Figure 4.13a montre des pics pour plusieurs métabolites sulfatés. Quatre de ces conjugués ont été détectés, dont trois correspondent à EG+SO₃ à 2,5 min, 3,2 min et 4,5 min, dû au fait qu'il y a plusieurs sites possibles pour l'ajout d'un groupement sulfate, et le troisième est un conjugué de sulfate méthylé (EG+CH₂+SO₃) à 4,3 min. La méthylation est connue comme réaction de métabolisme de ces types de composés. (Ousji, 2022c) La présence d'un petit pic de EG à 5,7 min est détectable dans cet échantillon, ainsi que l'acide gallique (le métabolite déséthylé) à 1,6 min.

Pour l'échantillon traité avec les enzymes d'hydrolyse (Figure 4.13b), un pic intense correspondant au EG est observé, et l'apparition d'un pic d'EG méthylé, dû au clivage du conjugué sulfaté. Deux pics de conjugués sulfatés, le EG+O+SO₃ à 4,3 min et un petit pic EG+SO₃ à 3,2 min, restent

déTECTÉS. Le méTABOLITE méthylé et sulfaté (EG+CH₂+SO₃) a l'air d'être résistant à l'hydrolyse comme l'exemple du BHA, ayant aussi un cycle aromatique avec un groupement methoxy. L'acide gallique (EG déséthylé) a également été détecté dans l'échantillon hydrolysé, semblable à l'échantillon contrôle.

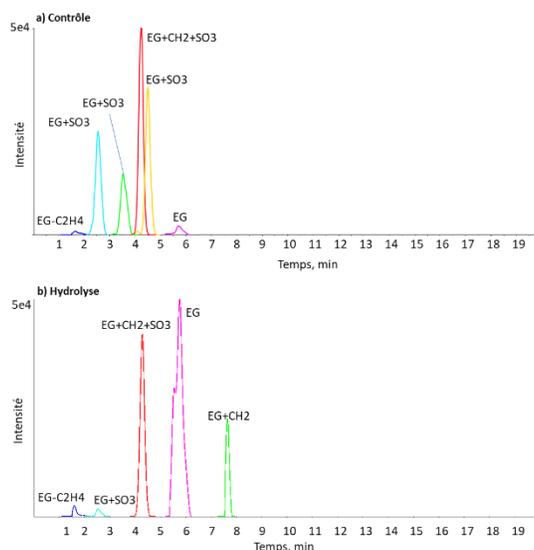


Figure 4.13 Chromatogrammes des ions extraits des méTABOLITES glucuronide et sulfatés du EG formé dans l'échantillon contrôle et dans l'échantillon hydrolysé

Dans le cas du triclosan, le chromatogramme de l'échantillon de contrôle (Figure 4.14a) montre un seul pic correspondant au méTABOLITE glucuronidé TCS+gluc à 8.4 min. Aucune trace du triclosan parent n'est observée, ni présence d'autres méTABOLITES. En comparant aux résultats de la méthode ciblée pour la détection du triclosan, nous avons vu que le traitement avec l'aryl-sulfatase a augmenté la détection du TCS, alors nous devons voir le méTABOLITE sulfaté avec la méthode non-ciblée sans hydrolyse. En ce qui concerne l'absence de méTABOLITES sulfatés, cela peut être dû à la composition de la phase mobile A, qui était dans ce cas l'acide formique à 0.1% dans l'eau. Il est recommandé d'utiliser la phase mobile contenant de l'acétate d'ammonium, dû principalement au

pH neutre, qui peut favoriser l'ionisation en interaction avec la colonne chromatographique. mode négatif mais aussi améliore l'allure des pics sulfatés dû à une meilleure détection. (Guesmi, 2020) Pour l'échantillon hydrolysé (Figure 4.14b), on observe un seul pic correspondant au TCS à 17,3 min après le traitement enzymatique. Cela indique que le traitement a clivé complètement le métabolite TCS+gluc, libérant ainsi le triclosan non conjugué.

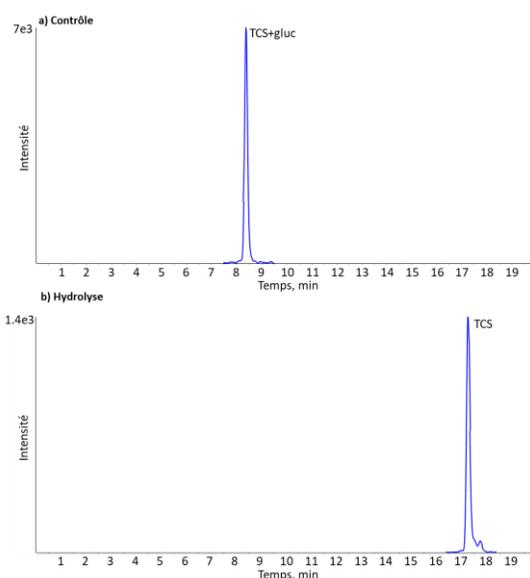


Figure 4.14 Chromatogrammes des ions extraits de métabolites glucuronide (TCS+gluc) et formés dans l'échantillon A) contrôle et TCS parent dans l'échantillon B) avec hydrolyse

4.5 Identification de contaminants environnementaux et leurs métabolites dans l'urine par dépistage non ciblé à l'aide de base de données spectrales

Dans la section 4.4, nous avons effectué les recherches manuellement avec le logiciel PeakView pour les composés ciblés ainsi que leurs métabolites possibles par la masse exacte de leurs ions précurseurs. Avec un autre batch d'échantillon non hydrolysé de 85 échantillons urinaires, nous avons procédé à un dépistage non ciblé en utilisant le logiciel Sciex OS et la recherche automatisée des pics à l'aide de la base de données spectrales établie avec les résultats des incubations de

métabolisme *in vitro*. Ces deux approches sont complémentaires, car pas tous les métabolites ont pu donner des spectres MS/MS de haute qualité dans les échantillons d'urines, dû au fait que l'acquisition de spectres MS/MS est basée sur l'intensité des pics et la méthode IDA pour sélectionner les précurseurs à fragmenter dans la cellule de collision du QqTOF. L'identification putative avec l'approche automatisé de Sciex OS est basée sur la comparaison entre le spectre dans la base de données et celui du métabolite détecté dans l'urine. Dans le cadre de ce projet, c'était intéressant de comparer ce que nous pouvons identifier avec des approches de traitements de données différentes. (Fernández-Peralbo, 2012)

Pour cette étude, nous avons utilisé les échantillons non hydrolysés. L'identification des composés a été réalisée suivant le flux de travail présenté dans la Figure 4.15. Avec le logiciel Sciex OS, les données brutes ont été prétraitées pour extraire les informations pertinentes puis ces données ont ensuite été utilisées pour générer une liste de pics avec les données de masse-sur-charge (m/z) à haute résolution et les temps de rétention. Ensuite, la liste des pics trouvés a été soumise à une recherche avec notre base de données de spectres MS/MS, avec les métabolites retrouvés lors des incubations *in vitro*. Cette recherche permet d'associer les pics détectés aux composés correspondants avec une identification putative. L'identification certaine doit être confirmée ayant le temps de rétention du métabolite standard dans chacun des cas et la masse exacte du précurseur.

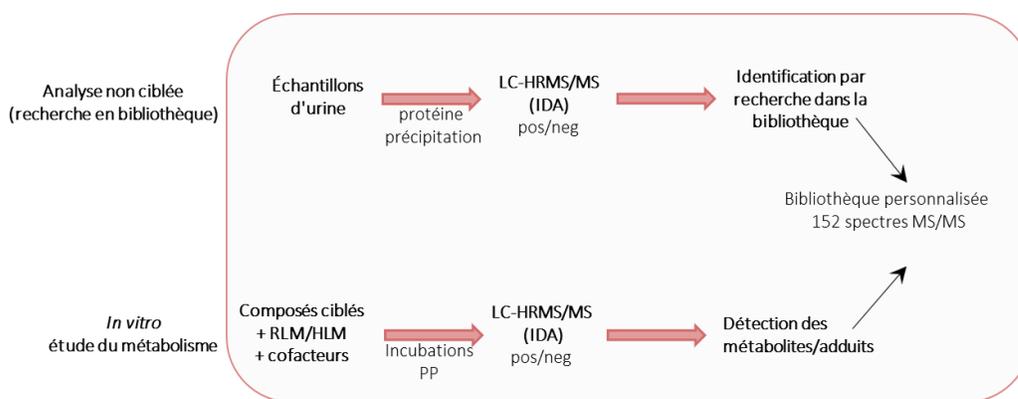


Figure 4.15 Le flux de travail pour la production de notre base de données spectrales à l'aide d'incubations *in vitro* et l'identification de contaminants environnementaux et leurs métabolites dans l'urine par dépistage non ciblé automatisé

En réalisant des incubations *in vitro* sur les composés ciblés, une base de données de spectres MS/MS personnalisée a été créée, contenant 152 spectres HR-MS/MS. Un exemple de résultat représentatif des incubations *in vitro* pour le composé éthinylestradiol est présenté dans la Figure 4.16. Les pics de métabolites ayant des spectres MS/MS de haute qualité ont été ajoutés à la base de données.

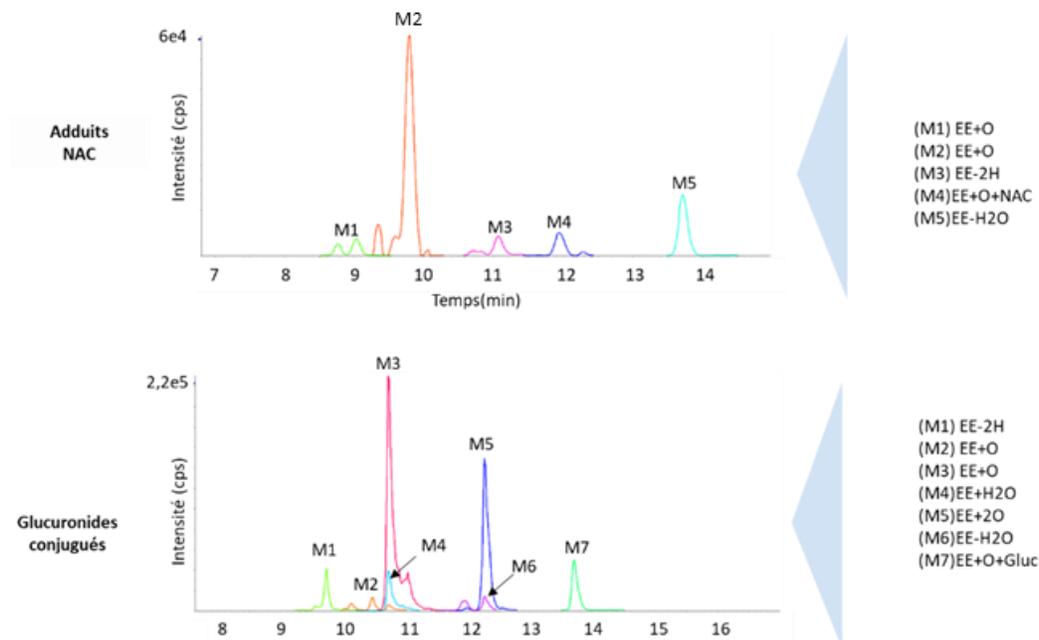


Figure 4.16 Chromatogramme des métabolites issus des incubations *in vitro* d'éthinylestradiol avec les microsomes de rat, en présence de NADPH et NAC (en haut) et NADPH et UDPGA (en bas)

Différents métabolites ont été formés lors des incubations *in vitro* de l'EE avec des microsomes de foie de rat (RLM). D'abord un adduit NAC a été observé, étant le EE+O+NAC à 10,9 min. La formation de métabolites oxydatifs a été confirmée dont deux métabolites d'hydroxylés (EE+O) à 9 min et 9,8 min, et un métabolite EE-2H, issu d'un hydroxylation suivi par une réaction de

déshydratation, et le métabolite déshydraté EE-H₂O. Ces métabolites ont déjà été observés lors des études préalables. (Chabi, 2022) Lors des incubations de l'EE avec le NADPH et l'UDPGA, un conjugué glucuronidé a été détecté, correspondant au EE+O+gluc à 10,7 min. Nous avons également détecté la formation des métabolites hydroxylés (EE+O) à 10,5 et 10,8 min, et un métabolite dihydroxylé (EE+2O) à 12,3 min.

L'objectif principal de cette étape était la détection automatisée de métabolites sans avoir besoin de passer par l'étape d'hydrolyse des échantillons d'urines. Cela permet d'identifier les composés en fonction de leur spectre de fragmentation caractéristique. (Zhao, 2013)

Nous avons préparé 85 échantillons urinaires venant de plusieurs volontaires différents avec une simple étape de précipitation de protéines (sans l'hydrolyse). Avec les données LC-HRMS/MS brutes, nous avons effectué une recherche non ciblée avec notre base de données, ayant les composés cibles et leurs métabolites (voir l'Annexe pour la liste de composés dans la base de données spectrales). La liste de métabolites détectés dans les échantillons à l'aide de cette recherche automatisée est illustrée dans le Tableau 4-3. Les résultats obtenus pour l'analyse des échantillons d'urine sans hydrolyse enzymatique ont révélé la présence de plusieurs métabolites.

Tableau 4-3 Liste des métabolites détectés dans les 85 échantillons d'urine non hydrolysés et la fréquence qu'ils ont été identifiés par comparaison de spectres MS/MS de la base de données

<i>m/z</i>	RT (min)	Recherche dans la bibliothèque	Adduits/ charge	# échantillons
179.1083	13.5	BHA	[M-H] ⁻	22
355.1372	5.2	BHA+Gluc	[M-H] ⁻	45
275.0567	5.9	BHA+O+SO ₃	[M-H] ⁻	39
259.065	7.6	BHA+SO ₃	[M-H] ⁻	55
221.1544	16.4	BHQ	[M-H] ⁻	71
235.1698	17	BHT+O	[M-H] ⁻	49
339.0547	6.8	BPA+2O+SO ₃	[M-H] ⁻	31
277.1443	17.2	DBP	[M-H] ⁻	51
197.046	5.7	EG	[M-H] ⁻	15
207.138	14.7	Ibuprofen	[M+H] ⁺	6
381.1557	7.6	Ibuprofen+Gluc	[M-H] ⁻	62
221.118	4.5	Ibuprofen+O	[M-H] ⁻	35
221.119	11.2	Ibuprofen+O	[M-H] ⁻	60
235.098	3.8	Ibuprofen-carboxy	[M-H] ⁻	19
229.086	9.9	Oxybenzone	[M+H] ⁺	61
405.118	9.9	Oxybenzone+Gluc	[M+H] ⁺	58
421.113	9.0	Oxybenzone+O+Gluc	[M+H] ⁺	9
213.056	12.6	Oxybenzone-CH ₂	[M-H] ⁻	41
341.124	3.0	TBHQ+Gluc	[M-H] ⁻	71
341.124	5.3	TBHQ+Gluc	[M-H] ⁻	71
245.0488	5.1	TBHQ+SO ₃	[M-H] ⁻	38
245.0488	3.6	TBHQ+SO ₃	[M-H] ⁻	67

Parmi ces métabolites, nous avons trouvé plusieurs venant des antioxydants synthétiques, d'abord l'EG qui a été détecté à 5.7 min, identifié dans une quinzaine d'échantillons. On trouve aussi, le BHA et le TBHQ. Plusieurs métabolites du BHA ont été détectés, incluant le BHA+gluc à 5.2 min dans 45 échantillons et deux isomères de TBHQ+gluc à 3.0 et 5.1 min ont été détectés dans 71 échantillons. De plus, plusieurs conjugués sulfatés ont été détectés, incluant le BHA+O+SO₃ 39 échantillons, le BHA+SO₃ dans 55 d'échantillons et deux TBHQ+SO₃ dans 38 et 67 échantillons, respectivement.

Plusieurs métabolites du BHT ont été détectés par cette méthode d'analyse des données automatisée. Ceci est un résultat assez important, car le BHT lui-même n'a jamais pu être détecté

par l'analyse ciblée avec ou sans hydrolyse. Le schéma dans la Figure 4.17 montre la formation des métabolites détectés dans les échantillons d'urine. La voie métabolique majeure du BHT est initiée par l'oxydation du groupe p-méthyle, conduisant à la formation de BHT+O puis la BHT-acide par oxydation progressive (+2O-2H). La forme acide peut par la suite être décarboxylé pour former le métabolite DBP, à partir duquel le BHQ peut être formé par hydroxylation. (Thompson, 2002, Ousji, 2020b) Le DBP a été détecté dans 51 échantillons et le BHQ à 16,4 min dans 71 échantillons. Le BHT hydroxylé (BHT+O) a aussi été détecté dans 49 des 85 échantillons.

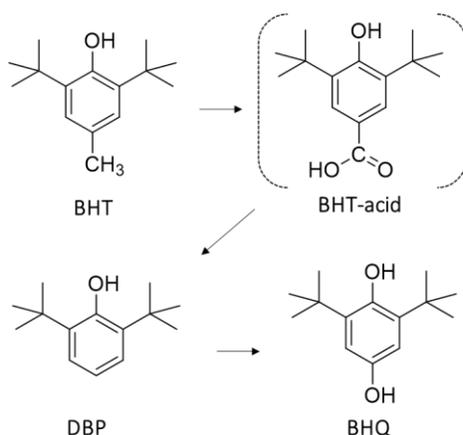


Figure 4.17 Schéma des voies possibles pour la formation des métabolites de BHT trouvés dans les échantillons d'urine

Dans le cas des médicaments, l'IBU a été détecté à 14.7 min dans 6 échantillons. L'IBU conjugué au glucuronide (IBU+gluc) à 7.6 min a été retrouvé dans 62 échantillons. D'autres métabolites de l'IBU ont également été détectés, tels que deux isomères de l'IBU hydroxylé (IBU+O). Le carboxy-ibuprofen a été détecté dans 19 échantillons.

En ce qui concerne l'oxybenzone, il a été détecté dans 61 échantillons. Plusieurs conjugués glucuronidés ont été détectés, tels que l'oxybenzone+gluc dans 58 échantillons, et l'oxybenzone+O+gluc dans 9 échantillons. Ces résultats montrent une diversité de métabolites détectés dans les échantillons d'urine, ce qui souligne une bonne performance de cette analyse de données automatique pour la caractérisation des contaminants et de leurs métabolites. Nous devons

souligner la complémentarité de toutes les méthodes utilisées lors de nos expériences. Chaque méthode a ces forces et ces faiblesses, et ce n'est pas toujours la même méthode qui fonctionne le mieux pour tous les contaminants, selon leurs métabolites formés, la facilité de leur hydrolyse pour former la molécule parent et la sensibilité nécessaire pour leur détection. Les résultats issus de ces travaux montrent une diversité importante même dans une liste assez restreinte de contaminants.

CONCLUSION

Les contaminants environnementaux et leurs métabolites suscitent une préoccupation croissante en matière de santé. Il est primordial de comprendre l'impact de ces substances, car leur présence peut perturber les voies métaboliques et hormonales, augmentant ainsi le risque de maladies. De ce fait, il est essentiel de détecter et identifier ces contaminants afin de mieux comprendre leur impact sur notre vie quotidienne et l'environnement. Le concept d'exposome met en évidence la nécessité de développer des méthodologies analytiques à haute sensibilité et sélectivité. Les études actuelles se concentrent souvent que sur l'exposition d'un contaminant, alors que l'individu est exposé à une multitude de contaminants. Ce travail porte différentes stratégies qui ont pour but de fournir plus de connaissances sur l'exposition à des contaminants et leur métabolisme. L'urine a été choisie comme matrice biologique dans notre recherche, car elle contient une multitude de métabolites et des produits de dégradation des substances absorbées par l'organisme. La recherche bibliographique a joué un rôle essentiel en identifiant les outils et les stratégies nécessaires pour évaluer l'exposome, tout en soulignant le manque actuel de lignes directrices spécifiques dans ce domaine. Ces informations ont été utilisées comme point de départ pour sélectionner les stratégies analytiques appropriées à notre étude. En premier lieu, nous avons concentré nos efforts sur le développement de la méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode de réaction de surveillance ciblée (LC-MRM). Ces travaux étaient axés sur la détection et l'analyse d'une trentaine de contaminants environnementaux ciblés, appartenant à diverses familles chimiques. Nous avons utilisé un spectromètre de masse de type triple quadripôle qui offre une grande sensibilité et sélectivité pour la détection des composés parents. Plusieurs paramètres ont été optimisés, notamment les phases mobiles, les modes d'ionisation et les conditions de fragmentation.

En complément, nous avons exploré différentes stratégies de préparation d'échantillons en testant plusieurs méthodes d'extraction. Initialement, nous avons développé une méthode d'extraction basée sur la technique QuEChERS. Nous avons optimisé cette méthode en effectuant plusieurs tests, cependant, le rendement d'extraction de la méthode mini-QuEChERS optimisée n'était pas satisfaisant. Nous avons par la suite décidé d'évaluer deux autres méthodes, à savoir l'extraction en

phase solide (SPE) et la précipitation des protéines. Cette dernière a été choisie en raison de sa simplicité, de son faible coût et de sa capacité à extraire efficacement nos composés ciblés.

La seconde approche envisagée était le dépistage de plusieurs échantillons par LC-MRM en utilisant la méthode de préparation optimisée. Nous avons également intégré une étape d'hydrolyse dans la préparation des échantillons pour les métabolites conjugués pour les convertir en forme libre pour une détection plus précise. L'application de ces méthodes à des échantillons d'urines de volontaires a permis de mettre en évidence que des contaminants environnementaux étaient bien présents dans l'urine humaine. L'analyse ciblée LC-MRM a permis d'identifier 12 composés non-métabolisés (parents) dans les échantillons d'urine de volontaires.

En plus de l'approche ciblée, nous avons exploré d'avantage la composition des échantillons, par l'analyse par LC-HRMS/MS pour identifier non seulement les composé parent mais aussi leurs métabolites formés. Nous avons observé la formation de plusieurs métabolites conjugués et des adduits NAC. Par la suite nous avons mené des incubations *in vitro* de nos composés cibles afin de simuler les processus métaboliques qui se produisent dans le corps humain. Cela nous a permis d'avoir une centaine de spectres MS/MS des métabolites conjugués et oxydatifs, ainsi que des adduits N-acétylcystéine (NAC). Nous avons créé une bibliothèque spectrale personnalisée qui a été utilisée pour l'analyse non ciblée. Les résultats obtenus grâce à l'analyse non ciblée par LC-HRMS/MS ont permis d'identifier un large éventail de composés et leurs métabolites présents dans les échantillons d'urine de façon très automatisé sur un grand nombre d'échantillons. La combinaison de ces différentes approches nous a permis de dresser un profil global de l'exposition des individus aux différents composés chimiques. L'utilisation d'un spectromètre de masse hybride quadripôle-temps de vol a offert une grande sensibilité et versatilité pour une large gamme d'analytes et leurs métabolites. La haute résolution permet une sélectivité grâce à la mesure de masse exacte, pour confirmer les formules chimiques des métabolites détectés dans les échantillons d'urine et dans les incubations *in vitro*.

Les stratégies analytiques développées dans ce manuscrit peuvent être appliquées à d'autres matrices environnementales, comme le sang ou les tissus adipeux, pour évaluer les expositions humaines environnementales de manière plus globale, afin d'obtenir des informations sur les contaminants présents et leur impact sur la santé humaine.

Une perspective aussi prometteuse consiste à développer des méthodes analytiques pour l'ensemble des composés ciblés, ainsi que pour leurs métabolites. Cela devrait permettre d'obtenir une image plus complète de l'exposition aux contaminants et de mieux comprendre leur état dans l'organisme. En développant des courbes de calibration pour chaque composé, pour quantifier précisément les concentrations de contaminants dans les échantillons d'urine. Déterminer aussi les limites de détection (LOD) pour chaque composé afin d'établir des seuils de détection fiables. Cela nous aiderait à évaluer les niveaux d'exposition et à estimer les risques potentiels pour la santé.

Enfin, l'intégration des approches omiques, telles que la métabolomique ou la transcriptomique, permet de comprendre les réponses biologiques globales à l'exposition aux contaminants environnementaux. Cela nous aiderait à identifier des signatures métaboliques ou génétiques spécifiques associées à l'exposition et aux effets des contaminants.

En mettant en œuvre ces perspectives, nous pourrions développer une approche analytique plus complète, multidisciplinaire et holistique pour évaluer l'exposition humaine aux contaminants environnementaux. Cela contribuera à une meilleure compréhension des risques pour la santé, à l'élaboration de recommandations préventives et à l'adoption de politiques de gestion plus efficaces pour protéger la santé humaine et l'environnement.

ANNEXE

Tableau A1. La liste des composés parents et métabolites ajoutés dans la base de données personnalisée de spectres MS/MS issus des incubations *in vitro*

Nom du composé	Formule	Nom du composé	Formule
Antioxydant 2246	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	BHT-acid	C ₁₅ H ₂₂ O ₃
Antioxydant 2246+2O	C ₂₃ H ₃₂ O ₄	BHT-acid+gluc	C ₂₁ H ₃₀ O ₉
Antioxydant 2246+2O	C ₂₃ H ₃₂ O ₄	BHT-aldehyde	C ₁₅ H ₂₂ O ₂
Antioxydant 2246+2O-4H	C ₂₃ H ₂₈ O ₄	BHT-aldehyde+O	C ₁₅ H ₂₂ O ₃
Antioxydant 2246+3O-4H	C ₂₃ H ₂₈ O ₅	BHT-CH ₂ +Glu	C ₂₀ H ₃₀ O ₇
Antioxydant 2246+3O-4H	C ₂₃ H ₂₈ O ₅	BPA	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Antioxydant 2246+4O-4H	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	BPA +2 O	C ₁₅ H ₁₆ O ₄
Antioxydant 2246+O	C ₂₃ H ₃₂ O ₃	BPA +O+ Gluc	C ₂₁ H ₂₄ O ₉
Antioxydant 2246+O-2H	C ₂₃ H ₃₀ O ₃	BPA C-C dimer	C ₃₀ H ₃₀ O ₄
APAP+S-Cysteine Conjugation	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	BPA C-O dimer	C ₃₀ H ₃₀ O ₄
APAP-2H+NAC	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₅ S	BPA+2O+SO ₃	C ₁₅ H ₁₆ O ₇ S
Atrazine- C2H4+NAC	C ₈ H ₁₂ ClN ₅ O	BPA+gluc	C ₂₁ H ₂₄ O ₈
Atrazine+NAC	C ₁₃ H ₂₂ N ₆ O ₃ S	BPA+O	C ₁₅ H ₁₆ O ₃
Atrazine+O	C ₈ H ₁₄ ClN ₅ O	BPA+O+SO ₃	C ₁₅ H ₁₆ O ₆ S
Atrazine+O	C ₈ H ₁₄ ClN ₅ O	BPA+O-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₉ S
Atrazine+O+Gluc	C ₁₄ H ₂₂ ClN ₅ O ₇	BPA+O-2H+NAC	C ₂₀ H ₂₃ NO ₆ S
Atrazine-2H	C ₈ H ₁₂ ClN ₅	BPA+O-2H+NAC	C ₂₀ H ₂₃ NO ₆ S
Atrazine-C2H4	C ₆ H ₁₀ ClN ₅	BPA+O-4H+2NAC	C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₉ S ₂
Atrazine-C2H4+2O	C ₆ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	BPA+SO ₃	C ₁₅ H ₁₆ O ₅ S
Atrazine-C2H4+NAC	C ₁₁ H ₁₈ N ₆ O ₃ S	BPA-2H+NAC	C ₂₀ H ₂₃ NO ₅ S
Atrazine-C2H4+NAC	C ₈ H ₁₂ ClN ₅ O	BPA-2H+S-Cysteine Conjugation	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄ S
Atrazine-C3H6+NAC	C ₁₀ H ₁₆ N ₆ O ₃ S	BPAP	C ₂₀ H ₁₈ O ₂
BG	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	BPAP+2O	C ₂₀ H ₁₈ O ₄
BHA	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	BPAP+O	C ₂₀ H ₁₈ O ₃
BHA dimer	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	BPAP+O-4H+2NAC	C ₂₅ H ₂₃ O ₆ S
BHA+Gluc	C ₁₇ H ₂₄ O ₈	BPAP-2H+NAC	C ₂₅ H ₂₅ O ₅ NS

BHA+O	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	BPAP-2H+S-Cysteine Conjugation	C ₂₃ H ₂₃ NO ₄ S
BHA+O+Gluc	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	BPB	C ₁₆ H ₁₈ O ₂
BHA+O+SO3	C ₁₁ H ₁₆ O ₆ S	BPB+O	C ₁₆ H ₁₈ O ₃
BHA+SO3	C ₁₁ H ₁₆ O ₅ S	BPB+O-2H+NAC	C ₂₁ H ₂₅ NO ₆ S
BHA-CH2-2H+NAC	C ₁₅ H ₂₁ NO ₅ S	BPB-2H+NAC	C ₂₁ H ₂₅ NO ₅ S
BHA-CH2-2H+NAC	C ₁₅ H ₂₁ NO ₅ S	BPS	C ₁₂ H ₁₀ O ₄ S
BHA-CH2-4H+2NAC	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₈ S ₂	BPS dimer	C ₂₄ H ₁₈ O ₈ S ₂
BHA-CH2-4H+O+2NAC	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₉ S ₂	BPS+2O	C ₁₂ H ₁₀ O ₆ S
BHQ	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	BPS+2O	C ₁₂ H ₁₀ O ₆ S
BHQ+Gluc	C ₂₀ H ₃₀ O ₈	BPS+2O + Cysteine	C ₁₅ H ₁₅ NO ₇ S ₂
BHQ+SO3	C ₁₄ H ₂₂ O ₅ S	BPS+Gluc	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₀ S
BHT	C ₁₅ H ₂₄ O	BPS+O	C ₁₂ H ₁₀ O ₅ S
BHT+2O	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	BPS+O	C ₁₂ H ₁₀ O ₅ S
BHT+O	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	BPS+O+Gluc	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₁ S
BHT+O+Gluc	C ₂₁ H ₃₂ O ₈	BPS+O+Gluc	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₁ S
BHT+O-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₉ N ₃ O ₈ S	BPS+O-2H+GSH	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₁₁ S ₂
BHT+O-2H+NAC	C ₂₀ H ₃₁ NO ₅ S	BPS+O-2H+NAC	C ₁₇ H ₁₇ NO ₈ S ₂
BHT-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₉ N ₃ O ₇ S	Carbamazepine+Gluc	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₇
BHT-2H+NAC	C ₂₀ H ₃₁ NO ₄ S	Carbamazepine+O	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂
Carbamazepine+O+ H2O	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃	Ibuprofen+O	C ₁₃ H ₁₈ O ₃
Carbamazepine+O+Gluc	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₈	Ibuprofen-2H+NAC	C ₁₈ H ₂₅ O ₅ NS
Carbamazepine-2H+NAC	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	Ibuprofen-4H+2NAC	C ₂₃ H ₃₂ O ₇ N ₂ S ₂
Carbamazepine-CHNO-CH3	C ₁₃ H ₉ N	Ibuprofen-carboxy	C ₁₃ H ₁₆ O ₄
DBP	C ₁₄ H ₂₂ O	Isopropylphenol-2H+GSH	C ₁₉ H ₂₇ O ₇ N ₃ S
DBP+2O	C ₁₄ H ₂₂ O ₃	Metolachlor+2O	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₄
DBP+2O	C ₁₄ H ₂₂ O ₃	Metolachlor+O	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₃
DBP+gluc	C ₂₀ H ₃₀ O ₇	Metolachlor+O+Gluc	C ₂₁ H ₃₀ ClNO ₉
DBP+O	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	Metolachlor-C4H8O+NAC	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₄ S
DBP+O+Gluc	C ₂₀ H ₃₀ O ₈	Metolachlor-CH2	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂
DBP+O+Gluc	C ₂₀ H ₃₀ O ₈	Metolachlor-CH2+NAC	C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₅ S
DBP+O-2H+NAC	C ₁₉ H ₂₉ NO ₅ S	Metolachlor-CH3+Desaturation	C ₁₄ H ₁₈ ClNO ₂
DBP-2H+GSH	C ₂₄ H ₃₇ N ₃ O ₇ S	Metolachlor-CH3+Gluc	C ₂₀ H ₂₈ ClNO ₈
DBP-2H+NAC	C ₁₉ H ₂₉ NO ₄ S	Metolachlor-CH3+O	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₃

Diclofenac o-imine methine	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ N	Metolachlor-Cl-H+O+Gluc	C ₂₁ H ₃₁ NO ₉
Diclofenac+2O	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₄	Metolachlor-Cl-H-CH ₂ +O	C ₁₄ H ₂₁ NO ₃
Diclofenac+Gluc	C ₂₀ H ₁₉ Cl ₂ NO ₈	Octyl Gallate (OG)	C ₁₅ H ₂₂ O ₅
Diclofenac+O	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₃	Oxybenzone	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Diclofenac+O+Gluc	C ₂₀ H ₁₉ Cl ₂ NO ₉	Oxybenzone+2O-2H+Cysteine	C ₁₇ H ₁₇ NO ₆ S
Diclofenac+O+Gluc	C ₂₀ H ₁₉ Cl ₂ NO ₉	Oxybenzone+Gluc	C ₂₀ H ₂₀ O ₉
Diclofenac+O-2H+NAC	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₆ SCl ₂	Oxybenzone+O	C ₁₄ H ₁₂ O ₄
Diclofenac+O-2H+NAC	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₆ SCl ₂	Oxybenzone+O+Gluc	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀
Diclofenac-C ₆ H ₂ Cl ₂ +NAC	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₅ S	Oxybenzone+O-2H+NAC	C ₁₉ H ₁₉ NO ₇ S
Diclofenac-C ₆ H ₂ Cl ₂ +S-Cysteine Conjugation	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	Oxybenzone-2H+NAC	C ₁₉ H ₁₉ NO ₆ S
EE	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	Oxybenzone-CH ₂	C ₁₃ H ₁₀ O ₃
EE+2O+Gluc	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₀	Oxybenzone-CH ₂ +O	C ₁₃ H ₁₀ O ₄
EE+O+Cysteine Conjugation	C ₂₃ H ₂₉ NO ₄ S	Oxybenzone-CH ₂ +O	C ₁₃ H ₁₀ O ₄
EE-2H	C ₂₀ H ₂₂ O ₂	Oxybenzone-CH ₂ +O-2H+NAC	C ₁₈ H ₁₇ NO ₇ S
EE-H ₂ O	C ₂₀ H ₂₂ O	Oxybenzone-CH ₂ +O-2H+NAC	C ₁₈ H ₁₇ NO ₇ S
EG	C ₉ H ₁₀ O ₅	Phenol+NAC	C ₁₁ H ₁₃ O ₄ NS
EG+Bis-Gluc	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₇	Phenol-2H+GSH	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₇ S
EG+Gluc	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₁	TBBPA-2H+NAC	C ₂₀ H ₁₉ Br ₄ NO ₅ S
EG+H ₂ O+2O	C ₉ H ₁₂ O ₈	TBHQ+Gluc	C ₁₆ H ₂₂ O ₈
EG+NAC	C ₁₄ H ₁₇ NO ₈ S	TBHQ+SO ₃	C ₁₀ H ₁₄ O ₅ S
EG-CH ₃ +Gluc	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₁	TBHQ-4H+2NAC	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₈ S ₂
Estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	Triclocarban	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O
Estrone	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	Triclocarban+O	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O ₂
Estrone+Gluc	C ₂₄ H ₃₀ O ₈	Triclosan	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂
Estrone+O+Gluc	C ₂₄ H ₃₀ O ₉	Triclosan+Gluc	C ₁₈ H ₁₅ Cl ₃ O ₈
Estrone+O-2H+NAC	C ₂₃ H ₂₉ NO ₆ S	Triclosan+O-2H+NAC	C ₁₇ H ₁₄ Cl ₃ NO ₆ S
Estrone-2H	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	Triclosan-C ₆ H ₂ Cl ₂ +NAC	C ₁₁ H ₁₃ NO ₅ S
Estrone-H ₂ O	C ₁₈ H ₂₀ O	Triclosan-C ₆ H ₂ Cl ₂ +NAC	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄ S
Ethinyl estradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	Triclosan-C ₆ H ₂ Cl ₂ +NAC	C ₁₁ H ₁₂ ClNO ₅ S
Ethyl gallate	C ₉ H ₁₀ O ₅	Triclosan-C ₆ H ₃ ClO+Gluc	C ₁₂ H ₁₂ Cl ₂ O ₇
Ibuprofen+3O + Gluc	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₁	Triclosan-C ₆ H ₃ ClO+O	C ₆ H ₄ Cl ₂ O ₂

BIBLIOGRAPHIE

Abe, E., Delyle, S. G. et Alvarez, J. C. (2010). Extraction liquide-liquide: théorie, applications, difficultés. *Annales de Toxicologie Analytique*, EDP Sciences, p. 51-59.

Abhilash, P. et Singh, N. (2009). Pesticide use and application: an Indian scenario. *Journal of hazardous materials*, 165(1-3), 1-12.

Allen, D. R. et McWhinney, B. C. (2019). Quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a paradigm shift in toxicology screening applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 135.

Allwood, JW et Goodacre, R. (2010). Une introduction à l'instrumentation de chromatographie liquide-spectrométrie de masse appliquée aux analyses métabolomiques des plantes. *Analyse phytochimique : une revue internationale des techniques chimiques et biochimiques des plantes*, 21 (1), 33-47.

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D. et Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*, 86(2), 412-431.

Athersuch, T. J. (2012). The role of metabolomics in characterizing the human exposome. *Bioanalysis*, 4(18), 2207-2212.

Balicco, A., Oleko, A., Szego, E., Boschat, L., Deschamps, V., Saoudi, A., Zeghnoun, A. et Fillol, C. (2017). Protocole Esteban: une Étude transversale de santé sur l'environnement, la biosurveillance, l'activité physique et la nutrition (2014–2016). *Toxicologie analytique et clinique*, 29(4), 517-537.

Becerra, V. et Odermatt, J. (2013). Interferences in the direct quantification of bisphenol S in paper by means of thermochemolysis. *Journal of chromatography A*, 1275, 70-77.

Biborchi, H., Bounhar, S., Nokra, M. et Amro, L. (2023). Les pneumopathies infiltrantes diffuses et exposition environnementale: y a t'il une corrélation? *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*, 15(1), 249.

Buatois, S., Le Merdy, M., Labat, L., Scherrmann, J.-M. et Decleves, X. (2014). Principales modifications pharmacocinétiques chez l'enfant. *Toxicologie analytique et clinique*, 26(3), 156-164.

Chabi, K. et Sleno, L. (2022). Estradiol, Estrone and Ethinyl Estradiol Metabolism Studied by High Resolution LC-MS/MS Using Stable Isotope Labeling and Trapping of Reactive Metabolites. *Metabolites*, 12(10), 931.

Blaženović, I., Kind, T., Ji, J. et Fiehn, O. (2018). Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. *Metabolites*, 8(2), 31.

Buszewski, B. et Szultka, M. (2012). Past, present, and future of solid phase extraction: a review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(3), 198-213.

Cacho, J., Campillo, N., Viñas, P. et Hernández-Córdoba, M. (2012). Stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the determination of bisphenols in canned beverages and filling liquids of canned vegetables. *Journal of chromatography A*, 1247, 146-153.

Carwile, J. L. et Michels, K. B. (2011). Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003–2006. *Environmental research*, 111(6), 825-830.

Dann, A. B. et Hontela, A. (2011). Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of applied toxicology*, 31(4), 285-311.

Duarte-Hospital, C., Huc, L., Bortoli, S., & Coumoul, X. (2019). Les xénobiotiques, quel impact sur les maladies métaboliques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 54(5), 286-293.

Eddaya, T., Boughdad, A., Becker, L., Chaimbault, P. et Zaïd, A. (2015). Utilisation et risques des pesticides en protection sanitaire de la menthe verte dans le Centre-Sud du Maroc (Use and risks of pesticides in sanitary protection of spearmint in south-central Morocco). *J. Mater. Environ. Sci*, 6(3), 656-665.

Environnement, Canada. (2008). Approche de gestion des risques proposée pour le Phénol, 4,4'-(1-méthyléthylidène) bis (ou Bisphénol A). Gouvernement du Canada, consulté en mars 2023. Accessible à l'adresse <https://www.ec.gc.ca/ese-ees/default.asp?lang=Fr&n=6fa54372-1>

European Commission (2011) Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Journal of the European Union* 12: 1-89.

FAO. (2002). Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides. <http://www.fao.org/agriculture/crops/corethemes/theme/pests/pm/code/en/>

Ferec, S., Bruneau, C., Drevin, G., Abbara, C., Compagnon, P., Deguigne, M. et Lelievre, B. (2020). Un cas d'intoxication avec une cathinone substituée: la N-éthylhexedrone. *Toxicologie analytique et clinique*, 32(4), S46-S47.

Fernández-Peralbo, M. et De Castro, M. L. (2012). Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 41, 75-85.

Fuhr, L. et Franklin, M. Atlas du Plastiques. Heinrich Böll Stiftung, 979-10-97395-01-8

Giroux, É. (2021). L'exposome: entre globalité et précision. *Bulletin d'histoire et d'épistémologie des sciences de la vie*, 28(2), 119-148.

Guesmi, A. et Sleno, L. (2020). In vitro metabolism of triclosan studied by liquid chromatography–high-resolution tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412, 335-342.

Guo, J. et Huan, T. (2020). Comparison of full-scan, data-dependent, and data-independent acquisition modes in liquid chromatography–mass spectrometry based untargeted metabolomics. *Analytical Chemistry*, 92(12), 8072-8080.

Humbert, L. (2010). Extraction en phase solide (SPE): théorie et applications. In *Annales de Toxicologie Analytique* 22 (2), 61-68.

Humbert, L., & Richeval, C. (2012). Analyse toxicologique avec mesure par « masse exacte». Caractérisation de métabolites urinaires par couplage UPLC/QTOF: apports et intérêts dans le cadre de la soumission chimique. In *Annales de toxicologie analytique*. 24 (2),87-96.

Ireland, J. S., Mukku V. R., Robison A. K., Stancel G. M. (1980) Stimulation of Uterine Deoxyribonucleic Acid Synthesis by 1,1,1 trichloro 2 (p,chlorophenyl) 2 (o,chlorophenyl) ethane (o,p'DDT). *Biochem. Pharmacol.* 29: 1469-1474.

Keyes, E., Werth, V. P. et Brod, B. (2019). Potential allergenicity of commonly sold high SPF broad spectrum sunscreens in the United States, from the perspective of patients with autoimmune skin disease. *International Journal of Women's Dermatology*, 5(4), 227-232.

Kubwabo, C., Kosarac, I., Stewart, B., Gauthier, B., Lalonde, K. et Lalonde, P. (2009). Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Additives and Contaminants*, 26(6), 928-937.

Kupfer, R., Dwyer-Nield, L. D., Malkinson, A. M. et Thompson, J. A. (2002). Lung toxicity and tumor promotion by hydroxylated derivatives of 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) and 2-tert-butyl-4-methyl-6-iso-propylphenol: correlation with quinone methide reactivity. *Chemical research in toxicology*, 15(8), 1106-1112.

Le Goff, J., Andre, V., Lebailly, P., Pottier, D., Perin, F., Perin, O. et Gauduchon, P. (2005). Seasonal variations of DNA-adduct patterns in open field farmers handling pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 587(1-2), 90-102.

Leblanc, Y. (2022). Caractérisation de protéines thérapeutiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse [Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay]. theses <https://www.theses.fr/2022UPASF041>.

Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Sonavane, M., Porcher, J.-M., Balaguer, P., Cravedi, J.-P., Zalko, D. et Brion, F. (2017). In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicology and environmental safety*, 142, 150-156.

Liao, C. et Kannan, K. (2013). Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(19), 4655-4662.

Liao, C. et Kannan, K. (2014). A survey of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from nine cities in China. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(2), 319-329.

Liao, C., Liu, F., Guo, Y., Moon, H.-B., Nakata, H., Wu, Q. et Kannan, K. (2012). Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environmental science & technology*, 46(16), 9138-9145.

Liao, C., Liu, F., Moon, H.-B., Yamashita, N., Yun, S. et Kannan, K. (2012). Bisphenol analogues in sediments from industrialized areas in the United States, Japan, and Korea: spatial and temporal distributions. *Environmental science & technology*, 46(21), 11558-11565.

Varela-Martinez, DA, Gonzalez-Salamo, J., Gonzalez-Curbelo, M. Á., & Hernandez-Borges, J. (2020). Extraction rapide, facile, bon marché, efficace, robuste et sûre (QuEChERS). Dans *Extraction en phase liquide* (399-437). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00014-1>

Lofe, M. P., Saudreau, M., Guyot, S., & Biron, D. G. (2014, February). Effet de l'infection par la microsporidie *Nosema Ceranae* sur la régulation de la température par l'abeille domestique. In *2ème Journées de la recherche apicole* (p. 19). ITSAP.

Lordel, S. (2011). Synthèse et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de résidus d'explosifs pour le développement de dispositifs de terrain [Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI]. HAL pastel. <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00631350/>

Louis, G. M. B., Chen, Z., Kim, S., Sapra, K. J., Bae, J. et Kannan, K. (2015). Urinary concentrations of benzophenone-type ultraviolet light filters and semen quality. *Fertility and sterility*, 104(4), 989-996.

Menet, M. C. (2011). Principes de la spectrométrie de masse. *Revue francophone des laboratoires*, 2011(437), 41-53.

Meyer, A., Chrisman, J., Moreira, J. C. et Koifman, S. (2003). Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental research*, 93(3), 264-271.

Miao, X., Gong, P., Pu, R., Carruthers, R. I. et Heaton, J. S. (2007). Applying class-based feature extraction approaches for supervised classification of hyperspectral imagery. *Canadian Journal of Remote Sensing*, 33(3), 162-1

Molina-Ruiz, JM, Cieslik, E., Cieslik, I. et Walkowska, I. (2015). Détermination des résidus de pesticides dans les tissus des poissons par la méthode QuEChERS modifiée et le nettoyage dual-d-SPE couplé à la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *Sciences environnementales et recherche sur la pollution*, 22, 369-378.75.

Mouton, N. (2020). Développement d'une nouvelle approche par spectrométrie de masse ciblée pour la caractérisation de la virulence et des résistances aux antibiotiques chez les bactéries [Doctoral dissertation, Université de Lyon]. theses.hal. <https://theses.hal.science/tel-03779595/>

Nebert, D. W. et Russell, D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*, 360(9340), 1155-1162.

Ousji, O. et Sleno, L. (2020a) Identification of in vitro metabolites of synthetic phenolic antioxidants BHT, BHA, and TBHQ by LC-HRMS/MS. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9525.

Ousji, O., Ohlund, L. et Sleno, L. (2020b) Comprehensive in vitro metabolism study of bisphenol a using liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry. *Chemical research in toxicology*, 33(6), 1468-1477.

Ousji, O., & Sleno, L. (2022c). Éluclation structurale de nouveaux métabolites stables et réactifs des catéchines de thé vert et des gallates d'alkyle par LC-MS/MS. *Antioxydants*, 11 (9), 1635.

Parkinson, A. et Ogilvie, B. W. (2008). Biotransformation of xenobiotics. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*, 7, 161-304.

Payá, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J. et Barba, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389, 1697-1714.

National Toxicology Program (2008). Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A. U.S. Department of Health and Human Services, consulté en avril 2023. <https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/ntp/ohat/bisphenol/bisphenol.pdf>

Schmidt, M. L. (2015). QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, And Safe) Extraction-Gas Chromatography for the Analysis of Drugs. Seton Hall University.

Shelby, D. M. D. et CERHR. (2008). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A».

Silbergeld, E. K.). Chapitre 33-La toxicologie.

Soglia JR, W. S., Goldsmith MR, et al. (2019). Profilage de la biotransformation du trichloroéthylène et de ses métabolites à l'aide d'un modèle hépatique in vitro à haut débit. *Sciences toxicologiques*. <https://doi.org/10.1093>

Son, D., Somda, I., Legreve, A. et Schiffers, B. (2017). Pratiques phytosanitaires des producteurs de tomates du Burkina Faso et risques pour la santé et l'environnement. *Cahiers Agricultures*, 26(2).

Srivastava, A., Rai, S., Kumar Sonker, A., Karsauliya, K., Pandey, C. P. et Singh, S. P. (2017). Simultaneous determination of multiclass pesticide residues in human plasma using a mini QuEChERS method. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409, 3757-3765.

Ternes, T. A., Joss, A. et Siegrist, H. (2004). Peer reviewed: scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental science & technology*, 38(20), 392A-399A.

Thayer, K. A., Heindel, J. J., Bucher, J. R. et Gallo, M. A. (2012). Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review. *Environmental health perspectives*, 120(6), 779-789.

Thurman, E. M. et Mills, M. S. (1998). *Solid-phase extraction: principles and practice* (vol. 16). Wiley New York.

Trasande, L., Attina, T. M. et Blustein, J. (2012). Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *Jama*, 308(11), 1113-1121.

Vieujean, S., Caron, B., Haghnejad, V., Jouzeau, J.-Y., Netter, P., Heba, A.-C., Ndiaye, N. C., Moulin, D., Barreto, G. et Danese, S. (2022). Impact of the exposome on the epigenome in inflammatory bowel disease patients and animal models. *International journal of molecular sciences*, 23(14), 7611.

Wild, C. P. (2012). The exposome: from concept to utility. *International journal of epidemiology*, 41(1), 24-32.

Xiong, X., Ouyang, J., Zhai, S. et Baeyens, W. R. (2009). Chemiluminescence-based detection technologies for biomolecules, mainly in gel electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(8), 961-972.

Yehye, W. A., Rahman, N. A., Ariffin, A., Abd Hamid, S. B., Alhadi, A. A., Kadir, F. A. et Yaeghoobi, M. (2015). Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European journal of medicinal chemistry*, 101, 295-312.

Zhou, F., Zhang, L., Liu, A., Shen, Y., Yuan, J., Yu, X., Feng, X., Xu, Q. et Cheng, C. (2013). Measurement of phenolic environmental estrogens in human urine samples by HPLC–MS/MS and primary discussion the possible linkage with uterine leiomyoma. *Journal of Chromatography B*, 938, 80-85.