

Université de POITIERS
Faculté de Médecine et de Pharmacie

2016

Thèse N°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)

Présentée et soutenue publiquement
Le 13 juillet 2016 à POITIERS
Par Monsieur CONDYLIS Maxime
9 mars 1992

Détermination d'un marqueur de déconjugaison pour l'étude du
métabolisme des perturbateurs endocriniens.

Composition du jury :

Président : Monsieur le Docteur DUPUIS Antoine

Membres : Madame le Docteur GRIGNON Claire

Monsieur le Docteur VENISSE Nicolas

Madame le Docteur BARRIER Laurence

Directeur de thèse : Madame le Docteur GRIGNON Claire



Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année universitaire 2015-2016

PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- GRIGNON Claire, PH
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue – Anglais

- JORDAN Steven

Poste d'ATER

- COSTA Damien

Poste de Moniteur

- VERITE Julie

Remerciements

A Monsieur Antoine Dupuis,

Qui m'a fait l'honneur de présider le jury.

Sincères remerciements.

A Madame Claire Grignon,

Pour m'avoir proposé ce sujet, et m'avoir accompagné tout au long de la rédaction.

Sincères remerciements.

A Monsieur Nicolas Venisse,

Pour son aide avec l'HPLC, ainsi que pour ses corrections.

Sincères remerciements.

A Madame Laurence Barrier,

Qui a fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de thèse.

Sincères remerciements.

A Madame Virginie Migeot,

Pour m'avoir introduit dans l'équipe de recherche.

Sincères remerciements.

A **mes parents**, pour m'avoir soutenu tout au long de mon parcours et me soutenir pour celui à venir.

A **mon frère**, qui a toujours été un véritable exemple à suivre pour moi.

A **Lucille**, d'être toujours présente depuis tant d'années.

A **mes grands parents**.

A mes amis, Foued, Sarah, Mathilde, Rancher, Pierre & Justine, Loïc, Julien, Coco, JB et tous les autres...

A toute l'équipe de la pharmacie de Bellejouanne.

A toute l'équipe du laboratoire de pharmacocinétique et de toxicologie du CHU de Poitiers.

A la mémoire de **Viny**, une princesse toujours dans nos cœurs.

SOMMAIRE

Page de Garde

Remerciements

Sommaire

Liste des abréviations

Introduction

I- Généralités

1) Perturbateurs endocriniens

2) Généralités sur le métabolisme

- *Principe de la déconjugaison enzymatique*

3) Bisphénol A

- a) Généralités
- b) Utilisations
- c) Mécanisme d'action
- d) Effets indésirables

4) Dérivés chlorés du bisphénol A

- a) Formation des dérivés chlorés
- b) Effets des dérivés chlorés

5) Toxicocinétique

- a) Bisphénol A :
 - Absorption
 - Métabolisme
 - Elimination
- b) Dérivés chlorés du Bisphénol A

6) Etude du métabolisme

7) Principe de la déconjugaison enzymatique

8) Marqueur de la déconjugaison : 4-Méthyl-Umbelliférol

- *Quelques informations sur la 4-Méthyl-Umbelliférol utilisée, produite par Sigma-Aldrich*

- *Identification des dangers*
- *Composition / informations sur les composants*
- *Manipulation et stockage*
- *Propriétés physiques et chimiques*
- *Stabilité et réactivité*
- *Informations toxicologiques*

9) β -glucuronidase d'Helix Pomatia

- a) Actions
- b) Quelques informations sur la β -glucuronidase d'Helix Pomatia utilisée, provenant de Sigma-Aldrich
 - *Identification des dangers*
 - *Manipulation et stockage*
 - *Stabilité et réactivité*
 - *Informations toxicologiques*

10) Mise au point du dosage 4MU, 4MUG et 4MUS dans l'urine par LC-MS/MS

- *Recherches Bibliographiques*

II- Partie expérimentale

1) Matériel & Méthode

- a) Réactifs
- b) Préparations communes aux dosages dans l'urine et le plasma
 - *Préparation du formiate d'ammonium à 1M*
 - *Préparation des phases mobiles*
 - *Préparation des solutions-mères*
 - *Préparation des solutions-filles*
 - *Préparation de la solution de référence*
- c) Préparations spécifiques à la méthode de dosage dans l'urine
 - *Préparation de l'enzyme inactivée*
 - *Préparation de la gamme*
 - *Préparation des contrôles*
 - *Préparation finale des échantillons*
- d) Préparations spécifiques à la méthode de dosage dans le plasma
 - *Préparation de l'enzyme inactivée*

- *Préparation de la gamme*
 - *Préparation des contrôles*
 - *Préparation finale des échantillons*
- e) Conditions chromatographiques et spectrométriques
- *Chromatographie*
 - *Conditions du spectromètre de masse*

2) Validation

- a) Spécificité
- b) Linéarité
- c) Fidélité
- *La répétabilité*
 - *La fidélité inter-séries*
- d) Justesse
- *Limite de détection*
 - *Limite de quantification*
- e) Effet matrice de l'enzyme

III- Résultats

1) Spécificité et Chromatogrammes

- a) Dans l'urine
- b) Dans le plasma

2) Linéarité

- a) Dans l'urine
- *Linéarité 4MUG*
 - *Linéarité 4MUS*
 - *Linéarité 4MU*
- b) Dans le plasma
- *Linéarité 4MUG*
 - *Linéarité 4MUS*
 - *Linéarité 4MU*

3) Répétabilité

- a) Dans l'urine

b) Dans le plasma

4) Fidélité inter-séries

a) Dans l'urine

b) Dans le plasma

5) Fidélité

6) Justesse

7) Limite de détection

8) Limite de quantification

9) Effet matrice

a) Dans l'urine

b) Dans le plasma

IV- Discussion

Conclusion

Bibliographie

Résumé

Serment

Liste des abréviations

4MU = 4-Méthyl-Umbelliféron

4MUG = 4-Méthyl-Umbelliféron-Glucuronide

4MUS = 4-Méthyl-Umbelliféron-Sulfate

ANSES = Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire, de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

BPA = Bisphénol A

BPA-G = Bisphénol A Glucuronide

BPA-S = Bisphénol A Sulfate

CAD = Collision Gas

CAS = Chemical Abstracts Service

CD = Compact Disc

CE = Collision Energy

CEP = Cell Entrance Potential

CHU = Centre Hospitalier Universitaire

ClxBPA = Dérivés chlorés du Bisphénol A

COOH = Groupes carbonyles

CUR = Curting Gas

CV = Coefficient de Variation

CXP = Cell Exit Potential

Cyp450 = Cytochrome P450

DcBPA = Bisphénol A di-chloré

DL50 = Dose létale pour 50% des sujets

DP = Declustering Potential

DVD = Digital Versatile Disc

E.Coli = Escherichia Coli

EI = Etalon Interne

EP = Entrance Potential

GS1 = Ion Source Gas 1

GS2 = Ion Source Gas 2

HPLC = High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance)

HPLC-UV = High Performance Liquid Chromatography coupled to Ultra-Violet detector (Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultra-violet)

IARC = International Agency for Research on Cancer

ID = Identification molécule

IHE = Interface Heater

IS = Ion Spray voltage

LC/MS = Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (Chromatographie Liquide couplée à une Spectrométrie de Masse)

LC-MS/MS ou LC/MS/MS = Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry (Chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem)

McBPA = Bisphénol A mono-chloré

MRM = Multiple Reaction Monitoring

NAD = Nicotamide Adénine Dinucléotide

NADP = Nicotamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NH₂ = Groupes amines

OH = Groupes hydroxyles

OMS = Organisation Mondiale de la Santé

PAPS = Phosphoadénylylphosphosulfate

PE = Perturbateurs Endocriniens

Q1 = Quadripôle 1

Q3 = Quadripôle 3

QSP = Quantité Suffisante Pour

RPM = Rotation Par Minute

SF_c = Solution Fille de Contrôle

SF_d = Solution Fille de Dosage

TcBPA = Bisphénol A tri-chloré

TEM = Température

TR = Temps de Rétention

TtBPA = Bisphénol A tétra-chloré

UDP-Glucuronyltransférase = Uridine-Di-Phosphate-Glucuronyltransférase

UE = Union Européenne

ULC/MS = Ultrapformance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (Chromatographie Liquide Ultrapperformante couplée à une Spéctrométrie de Masse)

Xi = Produit Irritant

Xn = Produit Nocif

Introduction

Un perturbateur endocrinien (PE), est, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), « une substance ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous)-populations » (OMS, 2002). Plus d'une centaine de produits chimiques produits par l'homme ont montré qu'ils perturbaient le système endocrinien de l'animal et de l'homme dont le bisphenol A (BPA). Le BPA est utilisé comme monomère dans la fabrication de plastiques polycarbonates et de résines époxydes. Le BPA est retrouvé dans l'environnement à l'état de traces et notamment dans l'eau.

Lors de l'étape de chloration des eaux dans les usines de traitement d'eau potable, il se forme des sous-produits du BPA, ce sont les dérivés chlorés du BPA (ClxBPA). Il en existe 5, qui sont le BPA-mono-chloré (McBPA), deux isomères du BPA-di-chloré (DcBPA), le BPA-tri-chloré (TcBPA) et le BPA-tétra-chloré (TtBPA).

Dans les matrices biologiques comme le plasma et l'urine, les micropolluants comme les perturbateurs endocriniens ou certains médicaments apparaissent en formes conjuguées et non conjuguées. La forme non-conjuguée (également appelée à tort forme « libre ») est la forme qui peut avoir une action et/ou s'accumuler dans certains tissus humains du fait de leur nature lipophile. La conjugaison durant le métabolisme dans le foie est considérée comme un mécanisme de détoxification, la forme conjuguée, hydrophile, étant éliminée dans les urines.

Ainsi au sein de l'organisme, le métabolisme du BPA entraîne des conjugaisons qui produisent du BPA-Glucuronide (par une Uridine-Di-Phosphate-Glucuronyltransférase ou UDP-Glucuronyltransferase) et du BPA-Sulfate (par une Sulfurotransférase).

Le métabolisme des dérivés chlorés du BPA dans l'organisme n'est pas encore parfaitement connu. Pour étudier ce métabolisme, il faut pouvoir doser les dérivés chlorés du BPA à la fois sous forme non conjuguée et à la fois sous forme conjuguée. Actuellement, il est possible de doser les dérivés chlorés du BPA sous forme non conjuguée, mais le dosage de la forme conjuguée pose problème, car il

faudrait avoir les produits conjugués purs pour pouvoir réaliser un dosage, or pour le moment ces produits ne sont pas disponibles. L'alternative est de déconjuguer la fraction conjuguée par action d'une enzyme, ce qui permet d'obtenir les dérivés chlorés du BPA totaux (forme non-conjuguée à laquelle s'ajoute la forme conjuguée hydrolysée). La quantité des ClxBPA conjugués est égale à la quantité des ClxBPA totaux à laquelle on soustrait la quantité des ClxBPA non conjugués.

L'enzyme la plus utilisée et la mieux adaptée selon la littérature est la β -glucuronidase/sulfatase d'*Helix Pomatia*, car elle possède à la fois une action sulfatase et une action glucuronidase (*Calafat et Al.*, 2010 ; *Carrasco-Correa et Al.*, 2015 ; *Chen et Al.*, 2012 ; *Cunha et Fernandes*, 2010 ; *Garcia-Prieto et Al.*, 2008 ; *Ito et Al.*, 2009 ; *Kawaguchi et Al.*, 2008 ; *Kawaguchi et Al.*, 2008 bis ; *Liao et Kannan*, 2012 ; *Ouchi et Watanabe*, 2002 ; *Schoringumer et Cichna-Markl*, 2007 ; *Shirai et Al.*, 2013 ; *Vela-Soria et Al.*, 2014 ; *Vela-Soria et Al.*, 2014 bis ; *Zhou et Al.*, 2012).

Afin de vérifier que la déconjugaison par cette enzyme est complète, il faut utiliser un marqueur qui dans la littérature est le plus souvent la 4-Méthyl-Umbellifénone (4MU) et ses conjugués glucuronide (4-Méthyl-Umbellifénone-Glucuronide ou 4MUG) et sulfate (4-Méthyl-Umbellifénone-Sulfate ou 4MUS) (*Carrasco-Correa et Al.*, 2015 ; *Chen et Al.*, 2012 ; *Frederiksen et Al.*, 2013 ; *Genuis et Al.*, 2012 ; *Vela-Soria et Al.*, 2014 bis ; *Zhou et Al.*, 2012).

Cependant, les articles sélectionnés utilisant la 4MU et ses conjugués n'apportent aucune information sur la méthode de dosage de ce dernier, ni ne citent de références de dosage.

L'objectif de ce travail est de développer et valider une méthode d'analyse du 4MU, 4MUG et 4MUS en utilisant une chromatographie liquide ultraperformance couplée à une spectrométrie de masse en tandem.

La première partie aborde les généralités sur le métabolisme des perturbateurs endocriniens et en particulier du BPA.

La deuxième partie est dédiée aux travaux réalisés pour la mise au point et la validation du dosage du 4MU, 4MUG et 4MUS.

I – Généralités

1) Perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont définis comme « une substance ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous)- populations » (OMS, 2002).

2) Généralités sur le métabolisme (Ciccolini, 2010 ; Loichot et Grima, 2004)

Le métabolisme est la transformation par réaction enzymatique d'une substance en un ou plusieurs composés appelés des métabolites, qui peuvent soit avoir une action pharmacologique, soit être inertes ou encore être toxiques.

Le métabolisme conduit le plus souvent à la formation de substances hydrosolubles qui sont plus facilement éliminées dans les milieux aqueux tels que l'urine ou la bile. La transformation chimique des xenobiotiques est essentiellement catalysée par des enzymes qui fonctionnent avec des co-facteurs endogènes (INSERM, 2011).

Selon la substance, le métabolisme peut avoir lieu dans de nombreux organes ou tissus, notamment le foie ou les reins.

Le métabolisme est divisé en 2 phases, les réactions de phase I et les réactions de phase II. Ces réactions prennent en charge à la fois les xénobiotiques et à la fois les composés endogènes tel que les stéroïdes, les prostaglandines, certaines vitamines... (INSERM, 2011).

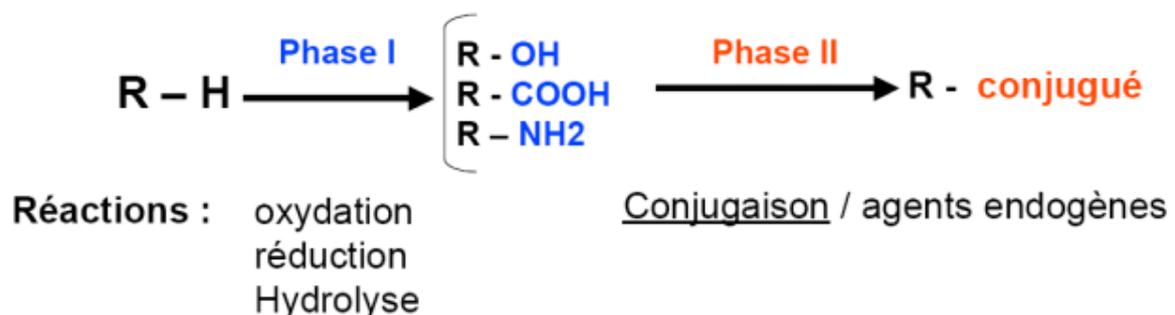


Figure 1 : Récapitulatif des réactions de phase I et II.

Les réactions de phase I sont des réactions de fonctionnalisation avec ajout ou modification d'un groupement fonctionnel sur la molécule. Les différentes réactions de phase I sont :

- L'oxydation : qui correspond à une perte d'électron(s).
- La réduction : qui est un gain d'électron(s).
- L'hydrolyse : qui est la rupture d'une liaison covalente par une molécule d'eau.

Les réactions d'oxydation et de réduction se produisent en simultanée, c'est ce que l'on appelle une oxydoréduction, ainsi le réducteur gagne un ou plusieurs électron(s) provenant(s) de l'oxydant. Dans le corps humain les couples oxydo-réducteurs les plus souvent rencontrés sont : NAD⁺/NADH,H⁺ (Nicotamide Adénine Dinucléotide) et NADP⁺/NADPH (Nicotamide Adénine Dinucléotide Phosphate).

Dans l'organisme, le principal complexe responsable de réaction de phase I est le cytochrome P450 constitué d'une hémoprotéine (Cytochrome P450 ou Cyp450), d'une enzyme (NADPH cytochrome P450 réductase) et d'un phospholipide.

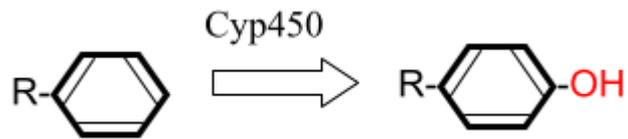
Les monooxygénases à Cyp450, enzymes membranaires localisées dans le reticulum endoplasmique, jouent un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques (*INSERM*, 2011).



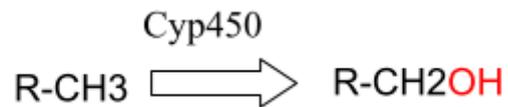
Il existe de nombreuses réactions d'oxydation, de réduction, et d'hydrolyse dont voici une liste non exhaustive :

*Oxydation

Hydroxylation aromatique :



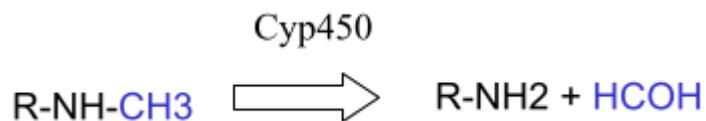
Hydroxylation aliphatique :



N-Hydroxylation :



N-Désalkylation :



O-Désalkylation :



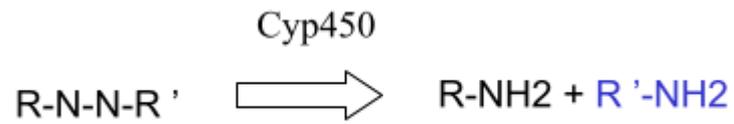
S-Désalkylation :



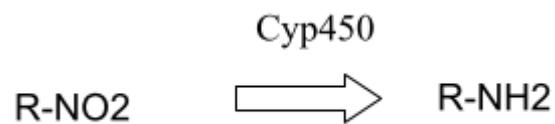
Désamination, S-Oxydation...

*Réduction

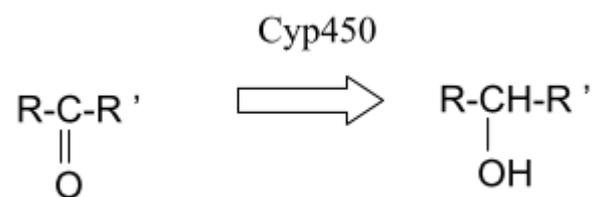
Azoréduction :



Nitroréduction :

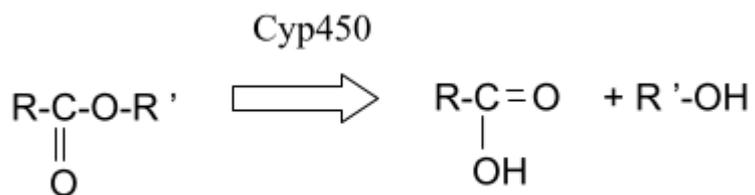


Carbonylréduction :

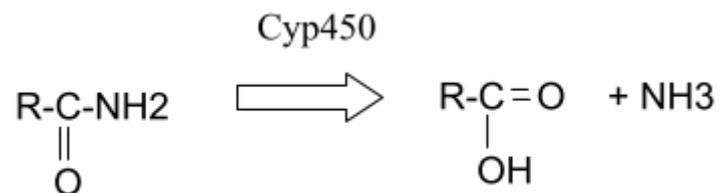


*Hydrolyse

Hydrolyse d'un ester :



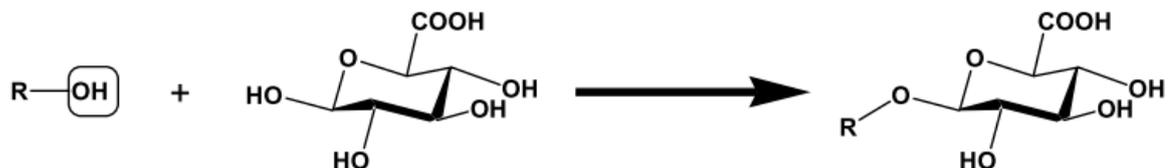
Hydrolyse d'un amide :



Ces réactions engendrent des métabolites qui possèdent des groupes hydroxyles (OH), amines (NH₂) ou carbonyles (COOH). Ces derniers sont soit éliminés, soit subissent des réactions de phase II. Toutefois, les réactions de phase I ne sont pas obligatoires, et il est possible qu'une substance subisse directement une réaction de phase II.

Les réactions de phase II, sont des réactions de conjugaison avec formation de liaisons covalentes entre la substance exogène et une molécule endogène. Les réactions de phase II rencontrées sont :

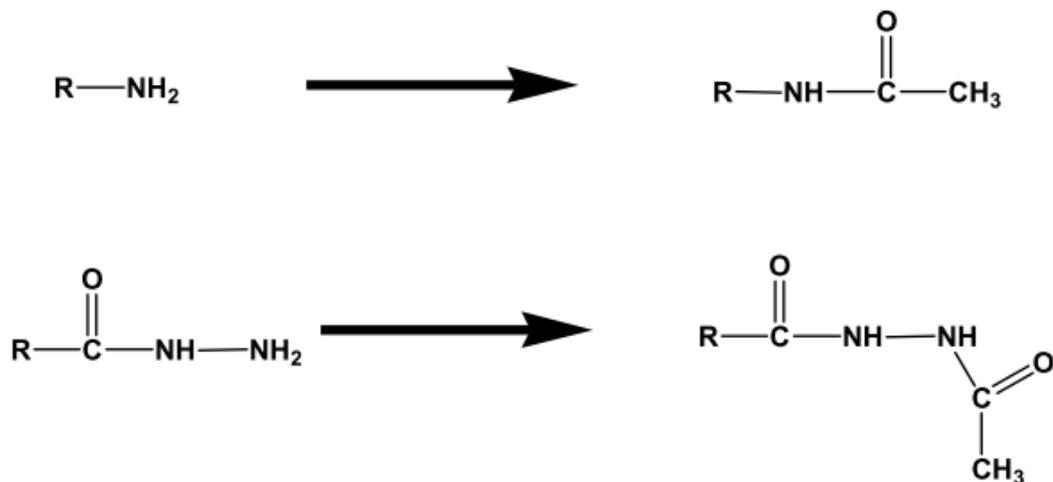
- Glucuro- ou glucurono- ou encore glycuco-conjugaison : c'est l'addition d'acide glucuronique à une molécule grâce à une glucuronyl-transférase.



- Sulfo-conjugaison : c'est l'addition d'un sulfate à une molécule grâce à l'action d'une sulfotransférase, par exemple la Phosphoadénylphosphosulfate (PAPS) dans le foie.



- Acétylation : c'est l'ajout par une acétyltransférase d'un groupement acétyle sur une molécule à la place d'un hydrogène.



Les réactions de phase II sont un transfert d'un composé sulfate, glucuronide, méthyl ou autre, sur un groupe OH, NH ou COOH. Elles permettent la formation de substances conjuguées, et plus hydrosolubles, et par conséquent facilement éliminées dans l'urine.

3) Bisphénol A (ANSES, 2011 ; ANSES, 2013)

Les informations sur le BPA proviennent de l'Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire, de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES).

a) Généralités

Le Bisphénol A ou BPA, dont la formule est $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$, est, selon de nombreuses études publiées, un composé perturbateur endocrinien oestrogénomimétique. Il appartient à la famille des diphenylalcanes hydroxylés ou bisphénols. Sa masse moléculaire est de $228,29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

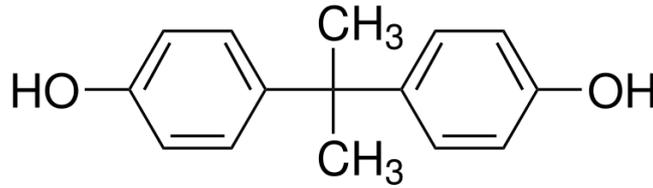


Figure 2 : Structure chimique du Bisphénol A.

Le bisphénol A est utilisé comme monomère dans la production de plastiques de type polycarbonates et de résines époxy (INSERM, 2011).

b) Utilisations

Les polycarbonates sont utilisés dans l'industrie du plastique pour fabriquer un très grand nombre d'objets tels que les CD (Compact Disc), les DVD (Digital Versatile Disc), les lunettes, les bouteilles plastiques, les toits et phares de voitures,...

Les résines époxydes se retrouvent majoritairement dans le revêtement intérieur des canettes et boîtes de conserve.

Il existe d'autres usages du BPA :

- révélateur dans les papiers thermiques, comme les tickets de caisse ;
- fabrication de retardateurs de flamme tel que le tétrabromobisphénol A et le bisphénol A bis ;
- agent antioxydant dans le secteur automobile ;
- additif dans la fabrication de polyamides.

Enfin, quelques utilisations ont été identifiées en dehors de la France tels que composant de fluides caloporteurs et de lubrifiant, agent de traitement pour le resurfaçage du béton, formulant de fongicides (ANSES, 2011).

c) Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action du BPA connu est un effet agoniste faible des récepteurs aux œstrogènes α et β (ER α et ER β) et PPAR γ (ANSES, 2011).

Cependant l'ensemble des mécanismes d'action du BPA ne sont pas tous clairement définis.

d) Effets indésirables

Les effets « avérés » chez l'animal sont selon l'ANSES (ANSES, 2011 ; ANSES, 2013) :

- Une augmentation de la survenue de kystes ovariens.
- L'apparition d'hyperplasie de l'endomètre.
- L'avancement de l'âge de la puberté lors d'expositions prénatale et post-natale.
- Des effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadotrope.
- L'altération de la production spermatique lors d'expositions à l'âge adulte.
- Des modifications histologiques sur la neurogenèse lors d'expositions pré ou périnatale.
- Des effets sur la lipogenèse suite à une exposition prénatale, périnatale ou à l'âge adulte induisant une augmentation de la lipidémie, une tendance à la surcharge pondérale et une activation de la lipogenèse.
- Des effets sur la glande mammaire dont l'accélération de la maturation architecturale de la glande mammaire à l'âge adulte et développement de lésions hyperplasiques intracanalaires en lien avec une exposition pré ou périnatale au BPA.

Toutefois, ces effets n'ont pas tous été démontrés chez l'Homme et à ce jour l'ANSES considère que :

- L'insuffisance de données disponibles ne permet pas de conclure à un effet « avéré ».
- Sur la base des données disponibles, les effets du BPA sur le système reproducteur masculin sont considérés comme « controversés ».
- Sur la base des données disponibles, les effets suivants sont considérés comme « suspectés » : anomalies de la maturation ovocytaire dans un contexte de procréation médicalement assistée ; pathologies cardiovasculaires et diabète.
- Le groupe de travail a considéré que les données humaines disponibles étaient insuffisantes à ce jour pour conclure sur les effets suivants : effets sur l'endomètre (endométriase, hyperplasie), ovaires polykystiques et issue de la

grossesse (fausse-couches et prématurité) ; troubles du comportement chez l'enfant ; effets sur la thyroïde ; cancer du sein.

4) Dérivés chlorés du Bisphénol A

a) Formation des dérivés chlorés

Les dérivés chlorés du BPA sont des sous-produits du BPA formés notamment pendant l'étape de chloration lors du traitement de l'eau potable dans les usines. Il en existe 5, qui sont le BPA-mono-chloré (McBPA), deux isomères du BPA-di-chlorés (DcBPA), le BPA-tri-chloré (TcBPA) et le BPA-tétra-chloré (TtBPA).

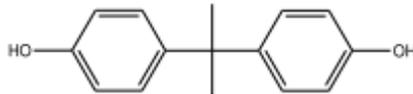


Figure 3 : Structure chimique du BPA.

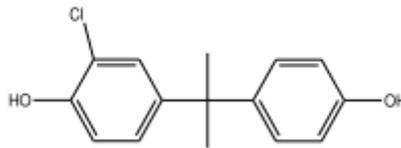


Figure 4 : Structure chimique du McBPA ou 2-chloro-4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-méthyl-éthyl]-phénol.

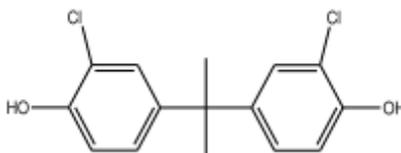


Figure 5 : Structure chimique du 2,2' DcBPA ou 2-chloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxyphényl)-1-méthyl-éthyl]-phénol.

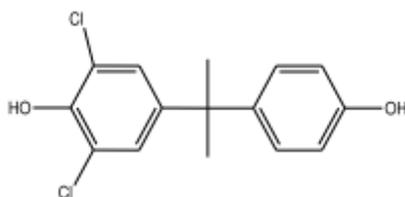


Figure 6 : Structure chimique du 2,6 DcBPA ou 2,6-Dichloro-4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-méthyl-éthyl]-phénol.

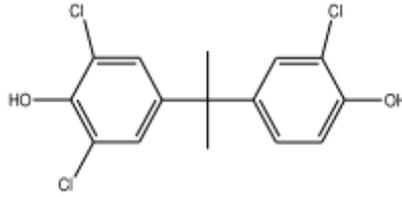


Figure 7 : Structure chimique du TcBPA ou 2,6-Dichloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)-1-méthyl-ethyl]-phenol.

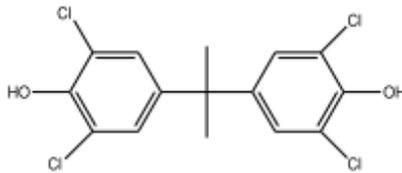


Figure 8 : Structure chimique du TtBPA ou 2,6-Dichloro-4-[1-(3,5-dichloro-4-hydroxy-phenyl)-1-méthyl-ethyl]-phenol.

b) Effets des dérivés chlorés

Il apparaît que parmi les ClxBPA, le 2'2-DcBPA possède une affinité pour les récepteurs oestrogéniques in-vitro plus importante que le BPA (*Hu et Al.*, 2002), et il possède également une activité oestrogénique supérieur au BPA et aux autres dérivés chlorés (*Takemura et Al.*, 2005).

5) Toxicocinétique

a) Bisphénol A

a. Absorption

Le BPA est intégralement absorbé par voie digestive tandis que l'absorption par voie cutanée ne serait que de 10% de la dose appliquée (*INSERM*, 2010).

b. Métabolisme

Le BPA subit une résorption digestive de 100%, puis sous l'effet d'un premier passage hépatique, 1 à 8% du BPA reste sous forme non conjuguée, et 92 à 99% du BPA se conjugue principalement sous forme glucuronide (BPA-Glucuronide ou BPA-G), sous l'action d'UDP-glucuronyl-transférase ; et sous forme sulfate (BPA-Sulfate ou BPA-S), grâce à une sulfotransférase (*INERIS*, 2010). De plus, d'autres

métabolites minoritaires se forment dans l'organisme comme l'Hydroxy-BPA-Glucuronide ou encore le Catéchol-BPA-Glucuronide.

Ainsi, le BPA est majoritairement éliminé sous forme BPA-G dans l'urine après un passage dans le sang. Le BPA-S et le BPA non conjugué, sont également retrouvés mais à des concentrations inférieures (*Liao et Kannan, 2012*).

Le BPA non conjugué, va soit se lier aux protéines plasmatiques (90 à 95%), soit être sous forme de BPA libre (5 à 10%) distribué dans les tissus.

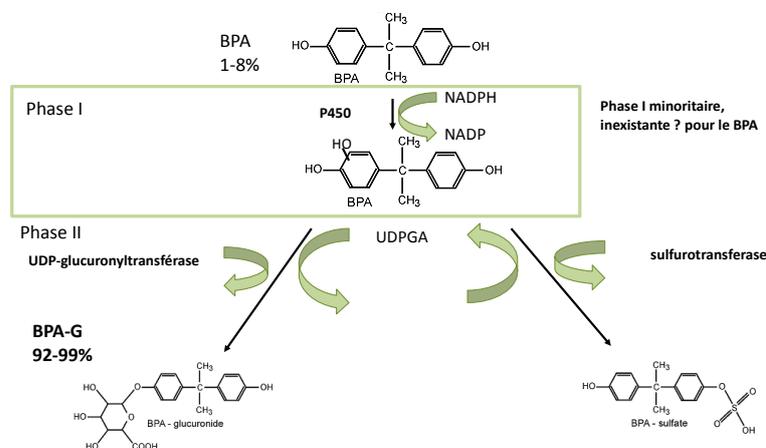


Figure 9 : Métabolisme du BPA.

c. élimination

L'élimination se fait par voie urinaire, où le BPA est retrouvé à l'état conjugué et non conjugué.

b) Dérivés chlorés du Bisphénol A

A ce jour, le métabolisme des ClxBPA n'est que très peu connu. Une étude (*Riu et Al., 2010*) de biotransformation de plusieurs dérivés chlorés du BPA dans des hépatocytes de rat, montre qu'ils subissent une oxydation P450-dépendante entraînant leur coupure et la formation de chlorophénol hydroxylé.

6) Etude du métabolisme

Pour explorer le métabolisme, deux approches complémentaires sont envisagées :

1 – Approche in-vitro avec des microsomes hépatiques par ajout de BPA et ClxBPA ainsi que de substrat dans le milieu réactionnel. Puis identification et dosage des conjugués formés dans le milieu.

2 – Approche in-vivo, avec identification et dosage des conjugués formés dans l'urine de volontaires. Les conjugués sont en effet éliminés dans les urines où on va les rechercher.

Pour cela, on peut réaliser, soit :

- Un dosage direct : des conjugués ce qui nécessite de disposer des produits purs.
- Un dosage indirect : déconjugaison non enzymatique à l'acide chlorhydrique (*Mao et Al.*, 2004) ou enzymatique (β -glucuronidase/sulfatase d'*Helix Pomatia*, β -glucuronidase d'*Escherichia Coli*...) pour doser la somme des dérivés conjugués et non conjugués auquel on soustrait le non conjugué. Dans le cas d'une déconjugaison enzymatique, pour prouver que l'enzyme a bien transformé les conjugués en non-conjugués, il faut utiliser un marqueur de transformation. C'est le cas de la 4-Méthyl-Umbelliférol (4MU) et de ses conjugués 4-Méthyl-Umbelliférol-Glucuronide (4MUG) et 4-Méthyl-Umbelliférol-Sulfate (4MUS), mais il existe d'autres marqueurs comme le p-Nitrophenyl- β -D-glucuronide et le phenolphthalein- β -D-glucuronide (*Fishman et Al.*, 1967 ; *Rao et Flynn*, 1990 ; *Szasz*, 1967).

7) Principe de la déconjugaison enzymatique

A l'inverse d'une réaction de conjugaison, une enzyme peut induire une réaction de déconjugaison. Celle-ci produit donc une séparation entre la substance et le conjugué (glucuronide, sulfate...). Un produit sous forme non-conjugué est obtenu, identique à sa forme avant de subir une réaction de phase II.

8) Marqueur de la déconjugaison : 4-Méthyl-Umbelliferone

Ce marqueur permet ainsi de vérifier que l'action de l'enzyme est complète (action glucuronidase et sulfatase), et que celle-ci transforme bien les dérivés glucuronide et sulfate (4MUG et 4MUS) en 4MU.

Grâce à cela, nous pourrions conclure que les conjugués du BPA (le BPA-Glucuronide ou BPA-G et le BPA-Sulfate ou BPA-S) et des ClxBPA ont bien été transformés en BPA et ClxBPA.

Le principe que nous allons mettre en œuvre est le suivant :

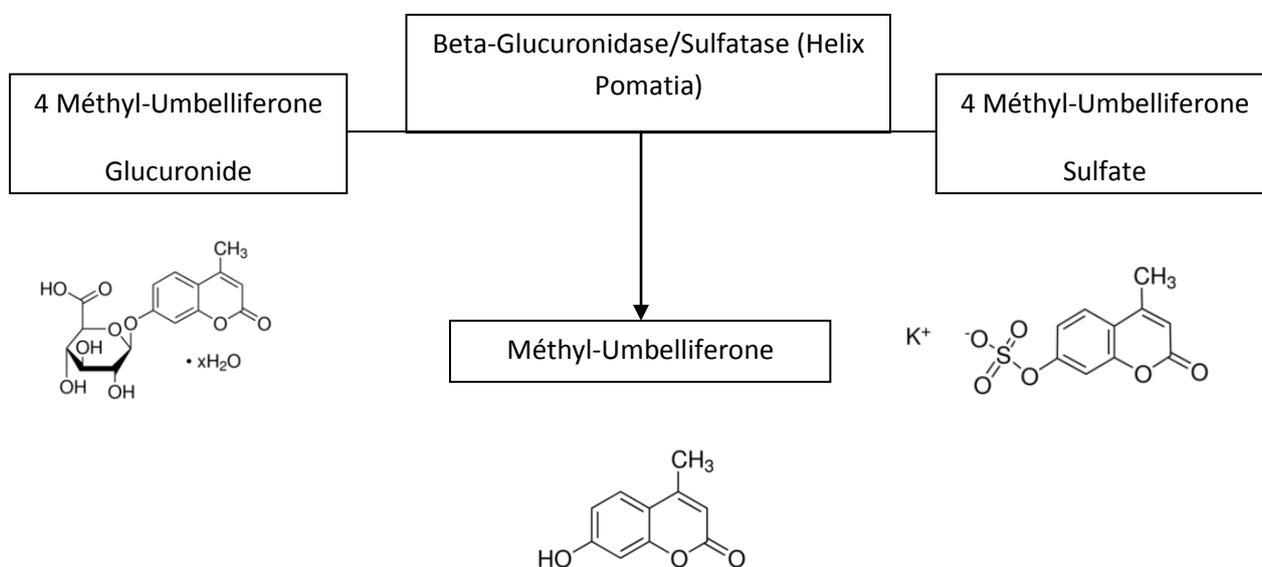


Figure 10 : Schéma simplifié de l'action de l'enzyme sur les conjugués de la 4MU pour provoquer la déconjugaison.

- *Quelques informations sur la 4-Méthyl-Umbelliferone utilisée, produite par Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich 4MU)*

- *Identification des dangers*

La 4-Méthyl-Umbelliferone provoque des irritations cutanées, des irritations oculaires, des toxicités spécifiques à certains organes cibles après exposition unique.

Ce produit est donc classé selon les directives de l'Union Européenne (UE) 67/548/CEE ou 1999/45/CE comme produit irritant (Xi).

- *Composition / informations sur les composants*

La substance est un produit naturel, les synonymes pour la caractériser sont 4MU, β -Methylumbelliferone ou encore 7-Hydroxy-4-methylcoumarin.

Sa formule chimique est $C_{10}H_8O_3$, et son poids moléculaire est de 176,17 g/mol.

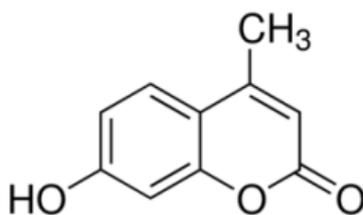


Figure 11 : Structure chimique de la 4MU.

- *Manipulation et stockage*

Lors de la manipulation, il faut éviter les contacts avec les yeux et la peau, de plus il faut éviter la formation de poussières ou d'aérosols qui pourraient être inhalés. L'idéal étant d'avoir une ventilation adéquate lors des manipulations.

Le produit doit être stocké au frais, dans un endroit sec. Le récipient doit rester fermé.

- *Propriétés physiques et chimiques*

Il s'agit d'une poudre de couleur beige, qui possède une point/intervalle de fusion de 190 – 192°C.

- *Stabilité et réactivité*

La substance est stable dans les conditions recommandées de stockage.

Les matières incompatibles sont les oxydants forts et les bases fortes.

- *Informations toxicologiques*

Tableau 1 : Informations toxicologiques sur la 4MU.

Type de toxicité	Espèce	Dose	Voie d'administration	Conséquences
Toxicité aiguë	Rat	3,850 mg/kg		DL50
Toxicité reproduction	Rat		Orale	Modification de la croissance du nouveau-né
	Souris		Orale	Mort à la naissance
Toxicité pour le développement	Souris		Orale	Foetotoxicité
Toxicité spécifique pour certains organes cibles		Exposition unique	Inhalation	Irritation des voies respiratoires
		Exposition répétée		Pas de donnée disponible

La dose létale pour 50% des sujets (DL50) correspond à la dose létale médiane, qui est la dose d'une substance causant la mort de 50% d'une population animale expérimentale.

Concernant la cancérogénicité, aucun composant de ce produit présent à des concentrations plus grandes que ou égales à 0,1% n'a été identifié comme cancérigène probable, possible ou reconnu pour l'Homme par l'International Agency for Research on Cancer (IARC).

9) β -Glucuronidase d'Helix Pomatia (*Sigma-Aldrich β -Glucuronidase/Sulfatase d'Helix Pomatia*)

a) Actions

Cette enzyme possède une action glucuronidase supérieure à 100 000 unités/mL, ainsi qu'une action sulfatase inférieure à 7 500 unités/mL.

Cette enzyme possède donc une double action, qui en fait l'enzyme de choix, comparé à la β -glucuronidase d'Escherichia Coli (E.Coli) qui elle ne possède qu'une action glucuronidase.

b) Quelques informations sur la β -glucuronidase d'Helix Pomatia utilisée, provenant de Sigma-Aldrich

La substance est la β -Glucuronidase de Helix Pomatia, qui provient de Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l, L'Isle D'Abeau Chesnes F-38297 ST. QUENTIN FALLAVIER.

▪ *Identification des dangers*

Cette substance provoque une sensibilisation respiratoire et une sensibilisation cutanée. Elle est donc classée selon les directives de l'UE dans les produits nocifs (Xn).

▪ *Manipulation et stockage*

Lors des manipulations, il faut éviter les contacts avec les yeux ou la peau, de plus il faut éviter de respirer les vapeurs ou les brouillards.

Pour le stockage, le produit doit être entreposé dans un endroit frais et sec. Le récipient doit être maintenu fermé lors du stockage. La température idéale de conservation est entre 2 et 8°C.

▪ *Stabilité et réactivité*

La substance est stable dans les conditions de stockages recommandées.

Les matières incompatibles sont les oxydants forts.

- *Informations toxicologiques*

Une exposition prolongée ou répétée peut provoquer des réactions allergiques chez les individus sensibles.

Concernant la cancérogénicité, aucun composant de ce produit présent à des concentrations plus grandes ou égales à 0,1% n'a été identifié comme cancérigène probable, possible ou reconnu pour l'Homme par l'International Agency for Research on Cancer (IARC).

10) Mise au point du dosage 4MU, 4MUG et 4MUS dans l'urine par Chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS)

Après recherches dans la littérature (*Brock et Al.*, 2001 ; *Calafat et Al.*, 2010 ; *Carrasco-Correa et Al.*, 2015 ; *Casas et Al.*, 2013 ; *Chen et Al.*, 2012 ; *Cunha et Al.*, 2010 ; *Frederiksen et Al.*, 2013 ; *Frederiksen et Al.*, 2013 bis ; *Garcia-Prieto et Al.*, 2008 ; *Geens et Al.*, 2009 ; *Genuis et Al.*, 2012 ; *Herrero et Al.*, 2015 ; *Inoue et Al.*, 2003 ; *Ito et Al.*, 2009 ; *Jing et Al.*, 2011 ; *Kang et Al.*, 2013 ; *Kawaguchi et Al.*, 2008 ; *Kawaguchi et Al.*, 2008 bis ; *Leng et Al.*, 2014 ; *Meeker et Al.*, 2013 ; *Ouchi et Watanabe*, 2002 ; *Quiros-Alcala et Al.*, 2013 ; *Schoringhumer et Cichna-Markl*, 2007 ; *Shirai et Al.*, 2013 ; *Smith et Al.*, 2012 ; *Tsukioka et Al.*, 2003 ; *Vela-Soria et Al.*, 2014 bis ; *Wolff et Al.*, 2010 ; *Zhou et Al.*, 2012), aucune des publications retenues n'expliquent comment le dosage de la 4MU a été réalisé, et aucune méthode en LC-MS/MS n'est décrite. L'objectif du travail était de mettre au point une méthode de dosage de la 4MU et de ses conjugués dans l'urine et le plasma, afin de pouvoir l'utiliser comme marqueur de la déconjugaison.

- *Recherches bibliographiques*

Une recherche dans la littérature a été effectuée dans PubMed pour trouver des articles en lien avec le sujet et pour pouvoir définir la méthodologie de la déconjugaison (enzyme utilisée, temps d'incubation, température, marqueurs...).

Après recherche sur PubMed, 29 articles ont été retenus. Parmi ces articles, 23 expliquent une déconjugaison enzymatique en précisant la méthode. 13 articles utilisent la glucuronidase/sulfatase d'*Helix Pomatia* (*Calafat et Al.*, 2010 ; *Carrasco-*

Correa et Al., 2015 ; *Chen et Al.*, 2012 ; *Cunha et Fernandes*, 2010 ; *Garcia-Prieto et Al.*, 2008 ; *Ito et Al.*, 2009 ; *Kawaguchi et Al.*, 2008 ; *Kawaguchi et Al.*, 2008 bis ; *Ouchi et Watanabe*, 2002 ; *Schoringhumer et Cichna-Markl*, 2007 ; *Shirai et Al.*, 2013 ; *Vela-Soria et Al.*, 2014 bis ; *Zhou et Al.*, 2012) et 6 (*Carrasco-Correa et Al.*, 2015 ; *Chen et Al.*, 2012 ; *Frederiksen et Al.*, 2013 ; *Genuis et Al.*, 2012 ; *Vela-Soria et Al.*, 2014 bis ; *Zhou et Al.*, 2012) utilisent la 4MU comme marqueur de la déconjugaison enzymatique. Au final, 4 articles utilisent à la fois la β -glucuronidase/sulfatase d'*Helix Pomatia* et la 4MU (*Carrasco-Correa et Al.*, 2015 ; *Chen et Al.*, 2012 ; *Vela-Soria et Al.*, 2014 bis ; *Zhou et Al.*, 2012).

Le protocole de déconjugaison a été initialement déterminé selon cette littérature et adapté en fonction des résultats expérimentaux obtenus.

Tableau 2 : Synthèse bibliographique de la déconjugaison des perturbateurs endocriniens.

Articles	Matrice (Volume échantillon)	Enzyme	Quantité enzyme (conc./ volume)	Température	Temps d'incubation	Marqueurs (ex 4MUG/4MUS/ 4MU)
<i>Brock et Al.</i> , 2001	Urine (1mL)	β -Glucuronidase d' <i>E.Coli</i>	5 μ L à 200U/mL	37°C	90 min	
<i>Ouchi et Watanabe</i> , 2002	Urine (0,5mL)	β -Glucuronidase d' <i>Helix Pomatia</i> type H2	20 μ L à 10 000 U/mL glucuronidase et 5000 U/mL de Sulfatase	37°C	3h	
<i>Inoue et Al.</i> , 2003	Urine (1mL)	β -Glucuronidase d' <i>E.Coli</i>	10 μ L à 89 U mL ⁻¹	37°C	3h	
<i>Tsukioka et Al.</i> , 2003	Urine (2mL)	Solution de 1% de β -Glucuronidase par dissolution de β -Glucuronidase dans 1M d'acétate ammonium ajusté par acide acétique glacial à pH6,5.		37°C	90 min	
<i>Zhou et Al.</i> 2005	Urine ou Sérum (50 μ L)	β -Glucuronidase/ Sulfatase d' <i>Helix Pomatia</i> type H1	50 μ L	37°C	4h	50 μ L de 4MUG + 4MUS + C4-4-MU à 500 ng/mL chacun
<i>Schoringhumer et Cichna-Markl</i> , 2007	Urine (10mL)	β -Glucuronidase/ Arylsulfatase d' <i>Helix Pomatia</i>	315 μ L à 43 mg protéines /mL	37°C		
<i>Garcia-Prieto et Al.</i> , 2008	Urine (7mL)	β -Glucuronidase d' <i>Helix Pomatia</i> type H1 > ou = à 300 000 U g ⁻¹ . Préparation d'une solution à 20 mg/mL en diluant 0,1g d'enzyme dans 5mL de tampon de d'acétate d'ammonium à 400 U mL ⁻¹		37°C	La nuit	
<i>Kawaguchi et Al.</i> , 2008	Urine (1mL)	<i>E.Coli</i> β -Glucuronidase (25 000 unites/0,4mL, 62 500 units mL ⁻¹) ET <i>Helix Pomatia</i> Sulfatase (3 540 units mL ⁻¹) + 0,1M acétate ammonium		37°C	3h	

<i>Kawaguchi et Al., 2008 bis</i>	Urine (1mL)	E.Coli β -Glucuronidase (25 000 unites/0,4mL , 62 500 unites mL-1) ET Helix Pomatia Sulfatase (3 540 unites mL-1) + 0,1M acétate ammonium	10 μ L d'E.Coli β -Glucuronidase à 10 000 unites mL-1 + 10 μ L d'Helix Pomatia Sulfatase à 3540 unites mL-1	37°C	3h	
<i>Geens et Al., 2009</i>	Sérum (1mL) ou Urine (3mL)	β -Glucuronidase/Arylsulfatase	50 μ L + 750 μ L de Na-acetate (1M) à pH4,5	40°C	30 min	
<i>Ito et Al., 2009</i>	Urine (1mL)	E.Coli β -Glucuronidase (25 000 U 0,4 mL-1) ET Helix Pomatia sulfatase (3650 U mL-1) + 0,1M acétate ammonium	10 μ L d'E.Coli β -Glucuronidase à 10 000 unites mL-1 + 10 μ L d'Helix Pomatia Sulfatase à 3640 unites mL-1	37°C	3h	
<i>Calafat et Al., 2010</i>	Urine (100 μ L)	β -Glucuronidase/Sulfatase d'Helix Pomatia type H1				
<i>Cunha et Fernandes, 2010</i>	Urine (5mL)	β -Glucuronidase d'Helix Pomatia de type 1 > ou = 300 000 U/g solid glucuronidase et > ou = 10 000 U/g solid sulfatase.		37°C	La nuit	
<i>Wolff et Al., 2010</i>	Urine	PAS DE PRECISION SUR LA METHODE				
<i>Jing et Al., 2011</i>	Urine (1mL)	β -glucuronidase/sulfatase (β -glucuronidase 30 U/mL, Arylsulfatase 60U/mL)	10 μ L	37°C	3h	
<i>Chen et Al., 2012</i>	Urine (200 μ L)	β -glucuronidase/sulfatase from Helix Pomatia H1	20 μ L	37°C	3h	4MU et 4MUG
<i>Genus et Al., 2012</i>	Sang / Urine / Sueur	β -glucuronidase d'E.Coli K12	10 μ L	37°C	La nuit	4MU et 4MUG
<i>Smith et Al., 2012</i>	Urine	PAS DE PRECISION SUR LA METHODE				
<i>Casas et Al., 2013</i>	Urine	PAS DE PRECISION SUR LA METHODE				

<i>Frederiksen et Al., 2013</i>	Urine (100µL)	β-glucuronidase d'E.Coli K12	10 µL	37°C	2h	4MU/4MUG/4MUS
<i>Frederiksen et Al., 2013 bis</i>	Urine	PAS DE PRECISION SUR LA METHODE				
<i>Kang et Al., 2013</i>	Urine (100µL)	β-glucuronidase/sulfatase	10 µL	37°C	4h	
<i>Meeker et Al., 2013</i>	Urine	PAS DE PRECISION SUR LA METHODE				
<i>Quiros-Alcala et Al., 2013</i>	Urine	PAS DE PRECISION SUR LA METHODE				
<i>Shirai et Al., 2013</i>	Urine (1mL)	β-Glucuronidase/Sulfatase from Helix Pomatia type HP2 (activité glucuronidase > 100 000 unités/mL et activité sulfatase > 7 500 unités/mL)	50 µL	37°C	4h - 4h30	
<i>Leng et Al., 2014</i>	Urine (1mL)	β-Glucuronidase d'E.Coli K12	10 µL	37°C	La nuit	
<i>Vela-Soria et Al., 2014 bis</i>	Urine (5mL)	β-Glucuronidase/Sulfatase from Helix Pomatia type H1	100 µL	37°C	24h	4MUG/4MUS/C 4-4-MU 125 µL
<i>Herrero et Al., 2015</i>	Urine (0,5mL)	β-Glucuronidase from E.Coli (140 unités/mL)	5,3 µL	37°C	2h	
<i>Carrasco-Correa et Al., 2015</i>	Sérum (1mL) ou Urine (5mL)	β-Glucuronidase/Sulfatase from Helix Pomatia type H1	50 µL avec sérum et 100 µL avec urine	37°C	24h	4MUS/4MUG/C 4-4-MU

II - Partie expérimentale

1) Matériel & Méthode

a) Réactifs

Les réactifs utilisés sont :

- De l'eau de qualité HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) LC/MS (Chromatographie Liquide Couplée à une Spectrométrie de Masse) Grade de chez VWR Prolabo Chemicals (Chemical Abstracts Service ou CAS : 7732-18-5).
- Du méthanol (Absolute) de qualité ULC/MS (Chromatographie Liquide Ultraproformante couplée à une spectrométrie de Masse) de chez Biosolve (99,98%)
(CAS : 67-56-1).
- De l'acétonitrile de qualité LC/MS de chez Dasit Group Carlo Erba Reagents (99,95%)
(CAS : 75-05-8).
- De l'acide formique de chez Sigma-Aldrich (95%)
(CAS : 64-18-6).
- Du formiate d'ammonium de chez Sigma-Aldrich (99,995%)
(CAS : 540-69-2).
- De l'acétate d'ammonium de chez Sigma-Aldrich (99,999%)
(CAS : 631-61-8).
- De l'acide acétique glacial de chez Carlo Erba Reagents (99,7%)
(CAS : 64-19-7).
- Du 4-Méthyl-Umbelliférone de chez Sigma-Aldrich (98%)
(CAS : 90-33-5)
- Du 4-Méthyl-Umbelliférone- β D-glucuronide hydrate de chez Sigma-Aldrich (99%)
(CAS : 881005-91-0).
- Du 4-Méthyl-Umbelliférone potassium salt de chez Sigma-Aldrich
(CAS : 15220-11-8).

- De l'umbelliferone (Etalon Interne) de chez Sigma-Aldrich (99%) (CAS : 93-35-6).
- De l'enzyme β -Glucuronidase Helix Pomatia de chez Sigma-Aldrich (CAS : 9001-45-0).
- De l'urine de donneurs volontaires a été utilisée.
- Du plasma de donneurs volontaires a été utilisé.

b) Préparations communes aux dosages dans l'urine et le plasma

▪ *Préparation du formiate d'ammonium à 1M*

La solution du formiate d'ammonium à 1M est préparée par dissolution de 6,3 g de poudre de formiate d'ammonium (63,06 g/mol) dans 100 mL d'eau distillée. La solution est conservée 6 mois à température ambiante.

▪ *Préparation des phases mobiles*

Préparation de deux phases mobiles A et B.

La phase A est préparée à partir d'eau distillée, de 0,2% de formiate d'ammonium 1M et de 0,2% d'acide formique.

Soit :

- 498 mL d'eau
- 1 mL de formiate d'ammonium 1M
- 1 mL d'acide formique

La phase B est préparée à partir d'acétonitrile, de 0,2% de formiate d'ammonium 1M et de 0,2% d'acide formique.

Soit :

- 498 mL d'acétonitrile
- 1 mL de formiate d'ammonium 1M
- 1 mL d'acide formique

- *Préparation des solutions mères*

Préparation de 4 solutions-mères individuelles :

- Solution-mère de 4-Méthyl-Umbelliferone à 1 mg/mL (5676,34 nmol/mL) :
Peser 10 mg de poudre de 4MU, puis les placer dans une fiole de 10 mL, complétée par du méthanol.
- Solution-mère de 4-Méthyl-Umbelliferone-Glucuronide à 0,2 mg/mL (567,71 nmol/mL) :
Peser 11,5 mg de poudre de 4MUG (car la poudre est sous forme hydratée), puis les placer dans une fiole de 50 mL, complétée par de l'eau.
- Solution-mère de 4-Méthyl-Umbelliferone-Sulfate à 1 mg/mL (3921,5 nmol/mL) :
Peser 11.5 mg de poudre de 4MUS (car la poudre contient des sels de potassium), puis les placer dans une fiole de 10 mL, complétée par de l'eau.
- Solution-mère d'umbelliferone (Etalon Interne ou EI) à 1 mg/mL (6163,71 nmol/mL) :
Peser 10 mg de poudre d'Umbelliferone, puis les placer dans une fiole de 10 mL, complétée par du méthanol.

Toutes les pesées sont effectuées avec une balance Excellence XS204 Delta Range de Mettler Toledo.

- *Préparations des solutions filles*

Préparation de trois solutions filles :

Solution-fille de dosage SFd :

Dans une fiole de 5 mL : préparer la solution fille SFd à 200 nmol/mL de 4MUG ; 200 nmol/mL de 4MUS et 400 nmol/mL de 4MU :

- 1750 µL de solution de 4MUG à 0,2 mg/mL (567,71 nmol/mL)
- 250 µL de solution de 4MUS à 1 mg/mL (3921,5 nmol/mL)
- 350 µL de solution de 4MU à 1 mg/mL (5676,34 nmol/mL)

Complétée avec de l'eau (Quantité Suffisante Pour ou QSP 5 mL).

Solution-fille de contrôle SFc :

Dans une fiole de 5 mL : préparer la solution fille SFc à 200 nmol/mL de 4MUG ; 200 nmol/mL de 4MUS et 400 nmol/mL de 4MU :

- 1750 µL de solution de 4MUG à 0,2 mg/mL (567,71 nmol/mL)
- 250 µL de solution de 4MUS à 1 mg/mL (3921,5 nmol/mL)
- 350 µL de solution de 4MU à 1 mg/mL (5676,34 nmol/mL)

Complétée avec de l'eau (QSP 5 mL).

Solution fille d'étalon interne (EI) à 100 µg/mL (616,37 nmol/mL) :

Dans une fiole de 10 mL, mettre :

- 1 mL de solution d'umbelliférol à 1 mg/mL (6163,71 nmol/mL)

Complétée avec de l'eau (QSP 10 mL)

- *Préparation de la solution de référence*

Il est nécessaire de préparer une solution de référence (10/10/20 nmol/mL de 4MUS/4MUG/4MU) passée en premier sur la LC MS/MS, afin de vérifier la réponse et le bon fonctionnement de la LC MS/MS.

La solution de référence comporte :

- 50 µL de SF de 4MUS/4MUG/4MU (200/200/400 nmol/mL)
- 950 µL d'eau.

c) Préparations spécifiques à la méthode de dosage dans l'urine

- *Préparation de l'enzyme inactivée*

L'enzyme utilisée est la β -glucuronidase/sulfatase d'*Helix Pomatia*.

Pour la préparer, on pèse :

3,76 mg de glucuronidase/sulfatase d'Helix Pomatia

1,54 g d'ammonium acétate (afin de tamponner la solution)

Dissolution de l'enzyme et de l'ammonium acétate dans 20 mL d'eau, puis ajustement du pH à 5 avec de l'acide acétique.

La préparation est ensuite chauffée à 100°C pendant 10 minutes avec un bain-marie (Isotemp 210 de Fisher Scientific) tout en fermant le tube.

La concentration de l'enzyme est de 0,188mg/mL (56,4 U/mL de glucuronidase et 1,88 U/mL de sulfatase).

▪ *Préparation de la gamme*

Préparation d'une gamme en 6 points (incluant le point blanc).

Réalisation dans un premier temps d'une dilution géométrique de SFd, jusqu'à SFd/16 (12,5/12,5/25 nmol/mL de 4MUS/4MUG/4MU).

L'objectif étant d'obtenir une gamme avec des points allant de 0,625 à 10 nmol/mL pour la 4MUG et 4MUS ; et de 1,25 à 20 nmol/mL pour la 4MU.

Les points de gamme sont préparés dans des tubes à hémolyse en verre, en ajoutant les composés de la façon suivante :

Tableau 3 : Préparation des points de gamme dans l'urine.

Nom du tube	10	5	2,5	1,25	0,625	0
4MUS/4MUG	10 nmol/mL	5 nmol/mL	2,5 nmol/mL	1,25 nmol/mL	0,625 nmol/mL	blanc
4MU	20 nmol/mL	10 nmol/mL	5 nmol/mL	2,5 nmol/mL	1,25 nmol/mL	
Urine	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
Eau	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL
4MUS/4MUG/4MU	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	
SFd = 200/200/400nmol/mL	SFd	SFd/2	SFd/4	SFd/8	SFd/16	
EI (umbelliferone)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Eau (blanc)						50 µL

- *Préparation des contrôles*

Trois points de contrôles sont réalisés, d'une part avec de l'eau et de l'autre avec de l'enzyme inactivée.

Les contrôles sont préparés de la manière suivante :

Réalisation d'une dilution géométrique de la solution-fille de contrôle (SFc), jusqu'à SFc/16 (12,5/12,5/25 nmol/mL de 4MUS/4MUG/4MU).

Les 3 concentrations souhaitées de point de contrôle sont :

7,5 nmol/mL de 4MUS et de 4 MUG - 15 nmol/mL de 4MU

5 nmol/mL de 4MUS et de 4 MUG - 10 nmol/mL de 4MU

0,625 nmol/mL de 4MUS et de 4 MUG – 1,25 nmol/mL de 4MU

Les points de contrôle sont réalisés selon le tableau suivant :

Tableau 4 : Préparation des contrôles avec de l'eau et avec de l'enzyme inactivée dans l'urine.

Nom du tube	C7,5 Eau	C5 Eau	C0,625 Eau	C7,5 Enz	C5 Enz	C0,625 Enz
4MUS/4MUG 4MU	7,5 nmol/mL 15 nmol/mL	5 nmol/mL 10 nmol/mL	0,625 nmol/mL 1,25 nmol/mL	7,5 nmol/mL 15 nmol/mL	5 nmol/mL 10 nmol/mL	0,625 nmol/mL 1,25 nmol/mL
Urine	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
Eau	600 µL	600 µL	600 µL			
Glucuronidase/sulfatase inactivée				600 µL	600 µL	600 µL
4MUS/4MUG/4MU SFc = 200/200/400 nmol/mL	37,5 µL SFc	50 µL SFc/2	50 µL SFc/16	37,5 µL SFc	50 µL SFc/2	50 µL SFc/16
EI (umbelliferone)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Eau (blanc)	12,5 µL			12,5 µL		

- *Préparation finale des échantillons*

Avant d'analyser les échantillons par LC MS/MS, ceux-ci sont passés au vortex (Genie 2 de Scientific Industries), puis placés dans des inserts mis dans des vials. Ces derniers sont placés dans le portoir de l'injecteur automatique au niveau du 3200 QTRAP à une température de 8°C où 30 µL sont injectés.

- d) Préparations spécifiques à la méthode de dosage dans le plasma

- *Préparation de l'enzyme inactivée*

L'enzyme utilisée est la β -glucuronidase/sulfatase d'Helix Pomatia.

Pour la préparer, on pèse :

- 7,52 mg de glucuronidase/sulfatase d'Helix Pomatia
- 1,54 g d'ammonium acétate (afin de tamponner la solution)

Dissolution de l'enzyme et de l'ammonium acétate dans 20 mL d'eau, puis ajustement du pH à 5 avec de l'acide acétique.

La préparation est ensuite chauffée à 100°C pendant 10 minutes avec un bain-marie (Isotemp 210 de Fisher Scientific) tout en fermant le tube avec du papier d'aluminium.

La concentration de l'enzyme est de 0,376 mg/mL (112,8 U/mL de glucuronidase et 3,76 U/mL de sulfatase).

- *Préparation de la gamme*

Préparation d'une gamme en 6 points (incluant le point blanc).

Réalisation dans un premier temps d'une dilution géométrique de SFd, jusqu'à SFd/16 (12,5/12,5/25 nmol/mL de 4MUS/4MUG/4MU).

L'objectif étant d'obtenir une gamme avec des points allant de 0,52 à 8,33 nmol/mL pour la 4MUG et 4MUS ; et de 1,04 à 16,67 nmol/mL pour la 4MU.

Les points de gamme sont préparés dans des tubes à hémolyse en verre, en ajoutant les composés de la façon suivante :

Tableau 5 : Préparation des points de gamme dans le plasma.

Nom du tube	8,33	4,17	2,08	1,04	0,52	0
4MUS/4MUG	8,33 nmol/mL	4,17 nmol/mL	2,08 nmol/mL	1,04 nmol/mL	0,52 nmol/mL	blanc
4MU	16,67 nmol/mL	8,33 nmol/mL	4,17 nmol/mL	2,08 nmol/mL	1,04 nmol/mL	
Plasma	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
Eau	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
4MUS/4MUG/4MU	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	
SF _d = 200/200/400 nmol/mL	SF _d	SF _d /2	SF _d /4	SF _d /8	SF _d /16	
EI (umbelliféron)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Eau (blanc)						50 µL
Acétonitrile	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL

- *Préparation des contrôles*

Trois points de contrôles sont réalisés, d'une part avec de l'eau et de l'autre avec de l'enzyme inactivée.

Les contrôles sont préparés de la manière suivante :

Réalisation d'une dilution géométrique de la solution-fille de contrôle (SF_c), jusqu'à SF_c/16 (12,5/12,5/25 nmol/mL de 4MUS/4MUG/4MU).

Les 3 concentrations souhaitées de point de contrôle sont :

6,25 nmol/mL de 4MUS et de 4 MUG – 12,50 nmol/mL de 4MU

4,17 nmol/mL de 4MUS et de 4 MUG – 8,33 nmol/mL de 4MU

0,52 nmol/mL de 4MUS et de 4 MUG – 1,04 nmol/mL de 4MU

Les points de contrôle sont réalisés selon le tableau suivant :

Tableau 6 : Préparation des contrôles avec de l'eau et avec de l'enzyme inactivée dans le plasma.

Nom du tube	C6,25 Eau	C4,17 Eau	C0,52 Eau	C6,25 Enz	C4,17 Enz	C0,52 Enz
4MUS/4MUG 4MU	6,25 nmol/mL 12,50 nmol/mL	4,17 nmol/mL 8,33 nmol/mL	0,52 nmol/mL 1,04 nmol/mL	6,25 nmol/mL 12,50 nmol/mL	4,17 nmol/mL 8,33 nmol/mL	0,52 nmol/mL 1,04 nmol/mL
Plasma	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
Eau	300 µL	300 µL	300 µL			
Glucuronidase/sulfatase inactivée				300 µL	300 µL	300 µL
4MUS/4MUG/4MU SFc = 200/200/400 nmol/mL	37,5 µL SFc	50 µL SFc/2	50 µL SFc/16	37,5 µL SFc	50 µL SFc/2	50 µL SFc/16
EI (umbellifèrone)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Eau (blanc)	12,5 µL			12,5 µL		
Acétonitrile	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL

▪ *Préparation finale des échantillons*

Avant d'analyser les échantillons par LC MS/MS, ceux-ci sont passés au vortex (Genie 2 de Scientific Industries), puis placés dans la centrifugeuse (CR3i de Jouan) à 3000 RPM (Rotation Par Minute) pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite récupéré (500 µL), puis placé dans un nouveau tube à hémolyse en verre. Ces tubes sont de nouveau placés dans la centrifugeuse à 3000 RPM pendant 10 minutes. Le surnageant (400 µL) est de nouveau récupéré et placé dans un troisième tube à hémolyse. Cette dernière série de tube à hémolyse est évaporée sous azote à 37°C (Liebisch Labortechnik), jusqu'à évaporation complète.

Le culot est récupéré avec 1 mL de la phase mobile A, puis agité par vortex. Enfin 150 µL sont prélevés puis placés dans un vial pour l'injection. 30 µL sont injectés.

e) Conditions chromatographiques et spectrométriques

L'appareil d'analyse utilisé est une chromatographie liquide ultra performante couplée à un spectromètre de masse en tandem, qui est un modèle 3200 QTRAP LC/MS/MS system par Applied Biosystems MDS Sciex.

Le logiciel pour piloter le spectromètre de masse est Analyst version 1.5.2 Software (du 02/2011).

▪ *Chromatographie*

La chaîne (Shimadzu) est utilisée avec une colonne Synergi 4µm Fusion RP 80A colonne de type C18 de chez Phenomenex chauffée à 40°C.

Le gradient des phases mobiles évolue de la façon suivante au cours du temps.

- Au temps 0, le gradient est composé de 100% de phase A et de 0% de phase B.
- Entre 0 et 5 minutes, le gradient passe à 0% de phase B à 25%. (et donc de 100% de phase A à 75%)
- Entre 5 et 7 minutes, le gradient évolue jusqu'à 60% de phase B. (et 40% de phase A)
- Puis à partir de 7 minutes 30, le gradient retourne à l'état initial, c'est-à-dire 100% de phase A et 0% de phase B. Ces conditions initiales sont maintenues jusqu'à 12 minutes.

Le débit de phase mobile est de 0,4 mL/min tout au long du run de chromatographie.

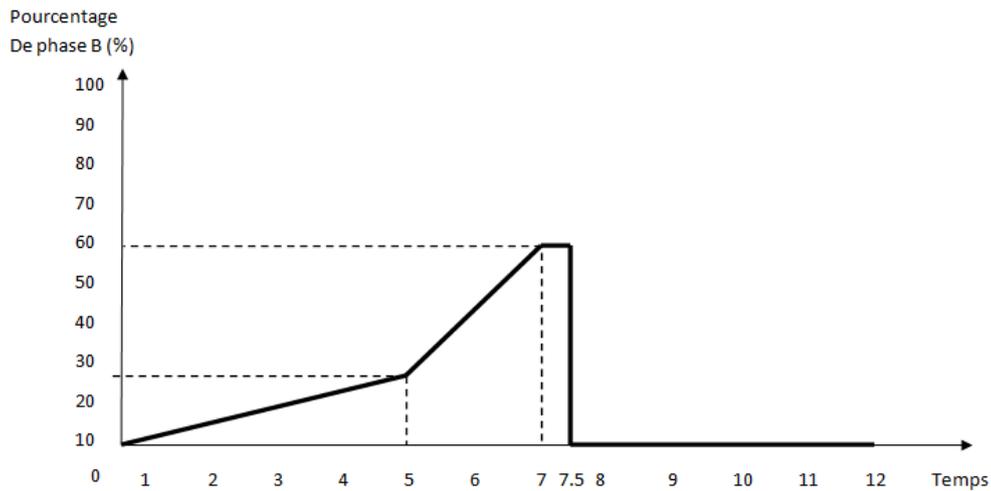


Figure 12 : Evolution du gradient au cours du temps (min).

- *Conditions du spectromètre de masse*

Les conditions du spectromètre de masse ont été mises au point et optimisées en amont par méthode d'infusion.

Un spectromètre de masse sélectionne des espèces ionisées, positivement ou négativement, selon leur masse moléculaire. Après élution dans la colonne, le composé d'intérêt arrive au niveau de la source, où il subit son ionisation par application d'une tension électrique. L'ion parent formé se retrouve alors au niveau d'un premier quadripôle (Q1) pour y être sélectionné selon sa masse. Puis par la suite, au niveau d'un second quadripôle qui correspond à la cellule de collision, où il se retrouve fractionné en différents fragments fils. L'ion fils d'intérêt est enfin sélectionné selon sa masse par un troisième quadripôle (Q3) et quantifié.

Le spectromètre fonctionne en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) en ionisation négative, en utilisant 2 transitions par composé à détecter. Pour chacun des composés, la première transition (4MUS1, 4MUG1 et 4MU1) sert à la quantification, tandis que la seconde (4MUS2, 4MUG2, 4MU2) est utilisée pour confirmer la nature du composé parent quantifié.

Les paramètres du 3200 QTRAP sont :

Tableau 7 : Réglages du spectromètre de masse.

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Time (msec)	ID	DP (Volts)	EP (Volts)	CEP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
254,86	174,9	100	4MUS 1	-30	-4	-26	-32	0
254,86	118,9	100	4MUS 2	-30	-4	-26	-58	0
174,8	118,97	100	4MU 2	-55	-3,5	-16	-34	0
174,8	132,99	100	4MU 1	-55	-3,5	-16	-30	-2
350,87	175,06	100	4MUG 1	-25	-6,5	-38	-34	-2
350,87	112,96	100	4MUG 2	-25	-6,5	-38	-24	-2
160,86	132,92	100	U	-45	-2,5	-18,132	-26	-2

(Q1 pour Quadripôle 1 qui est le premier filtre de la masse / Q3 pour Quadripôle 3 qui est le second filtre de la masse / ID pour identité de la molécule / DP pour Declustering Potential au niveau de l'orifice / EP pour Entrance Potential / CEP pour Cell Entrance Potential / CE pour Collision Energy /CXP pour Cell Exit Potential)

Les paramètres de la source sont les suivants :

- Curting gas (CUR) : 20,0 PSI
- Collision gas (CAD) : High
- Ion Spray Voltage (IS) : -4000,0 Volt
- Temperature (TEM) : 500,0°C
- Ion Source Gas 1 (GS1) : 40,0 PSI
- Ion Source Gas 2 (GS2) : 70,0 PSI
- Interface Heater (ihe) : On

2) Validation

Les critères de validation ont suivi la littérature (*Bressole et Al.*, 1996 ; *Krouwer et Rabinowitz*, 1984 ; *Peters et Al.*, 2007).

a) Spécificité

La spécificité est la capacité de pouvoir visualiser l'analyte souhaité, sans interférence par d'autres substances présentes dans l'échantillon. Elle est déterminée par l'absence de pic dans les blancs à l'exception de celui de l'étalon interne.

b) Linéarité

La gamme est réalisée avec 5 points en excluant le point zéro, soit 6 points de gamme. Il est possible d'exclure un point en cas de valeur aberrante à condition qu'il ne s'agisse ni du point de gamme le plus haut, ni du point le plus bas. L'objectif pour notre gamme est d'obtenir un coefficient de détermination (r^2) compris entre 0,995 et 1. Le type de régression choisi pour notre étude est de type linéaire, pondérée en $1/x$. Les concentrations calculées ne doivent avoir qu'un écart de 15% avec les concentrations théoriques, excepté le point le plus bas où un écart de 20% est toléré.

c) Fidélité

La fidélité comprend les études de répétabilité et de fidélité inter-series. La fidélité correspond à l'obtention de résultats proches les uns des autres. C'est-à-dire que chaque échantillon à une même concentration doit avoir un écart acceptable avec les autres de la même concentration.

▪ *La répétabilité*

L'étude de répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon dans des conditions standardisées, ce qui signifie, le même opérateur, le même matériel, les mêmes réactifs et le même jour.

Les niveaux de concentrations étudiées dans l'urine sont :

- 0,625 nmol/mL de 4MUS et de 4MUG associé à 1,25 nmol/mL de 4MU.
(Qui correspond à la limite de quantification.)
- 5 nmol/mL de 4MUS et de 4MUG associé à 10 nmol/mL de 4MU.
- 7,5 nmol/mL de 4MUS et de 4MUG associé à 15 nmol/mL de 4MU.

Les niveaux de concentrations étudiées dans le plasma sont :

- 0,52 nmol/mL de 4MUS et de 4MUG associé à 1,04 nmol/mL de 4MU.
(Qui correspond à la limite de quantification.)

- 4,17 nmol/mL de 4MUS et de 4MUG associé à 8,33 nmol/mL de 4MU.
- 6,25 nmol/mL de 4MUS et de 4MUG associé à 12,50 nmol de 4MU.

Les répétitions de chacun des niveaux de concentrations sont au nombre de 5.

La mesure de la répétabilité de la méthode consiste à calculer le coefficient de variation (CV).

$$CV = \left(\frac{\text{Ecart Type}}{\text{Moyenne}} \right) \times 100$$

Le CV maximum admissible est de 15%, à l'exception du contrôle le plus bas pour lequel le CV est accepté jusqu'à 20%.

- *La fidélité inter-séries*

L'étude de fidélité inter-séries consiste à effectuer l'analyse d'un échantillon à la même concentration dans des conditions standardisées à des jours différents, afin de s'assurer que le résultat est reproductible plusieurs fois.

Pour la fidélité inter-séries, ce sont les mêmes niveaux de contrôles qualités que pour l'étude de répétabilité qui sont utilisés.

Le coefficient de variation acceptable est identique à celui de l'étude de répétabilité.

d) Justesse

La justesse comprend les études de répétabilité et de reproductibilité. La justesse est l'obtention de résultats proches de la valeur théorique. C'est-à-dire, que chaque résultat obtenu à une concentration donnée, ne doit pas être éloigné de façon significative de la valeur théorique.

La justesse est exprimée par le biais en pourcentage (%).

$$\text{Biais} = \frac{(\text{Valeur expérimentale} - \text{Valeur cible})}{\text{Valeur cible}} \times 100$$

Le biais est admissible, si celui-ci n'est que de 15% au maximum, à l'exception du point le plus bas, pour lequel un biais allant jusqu'à 20% est toléré.

- *Limite de détection*

La limite de détection correspond à la valeur de la concentration la plus basse pour laquelle le spectromètre donne un signal. Cette limite est basée sur l'analyse de la différence observée entre les signaux du blanc et ceux des échantillons.

Pour cette étude la limite de détection n'est pas définie, car des résultats inférieurs à la limite de quantification ne seront pas interprétables.

- *Limite de quantification*

La limite de quantification est la plus petite valeur exprimée en concentration acceptable, c'est-à-dire avec un CV et un biais inférieurs à 20%.

e) Effet matrice de l'enzyme

L'effet matrice est l'influence du milieu analysé sur l'élément dosé. Cet effet matrice est particulièrement important à de faibles doses, et peut conduire à de très fortes erreurs par excès ou par défaut si l'on ne les prend pas en compte (*Pinta et Riandey, 1968*)

Celui-ci est évalué en calculant :

$$\left(1 - \left(\frac{\text{signal échantillon avec enzyme}}{\text{signal échantillon sans enzyme}} \right) \right) \times 100$$

Les effets matrice sont considérés comme négligeable s'ils sont compris entre -20% et 20%.

III - Résultats

1) Spécificité et Chromatogrammes

a) Dans l'urine

Le chromatogramme du blanc, laisse apparaître le pic de l'étalon interne qui possède un temps de rétention (TR) de 5,62 min. Il n'y a pas de pic aux temps de rétention des analytes (4MU, 4MUG et 4MUS).

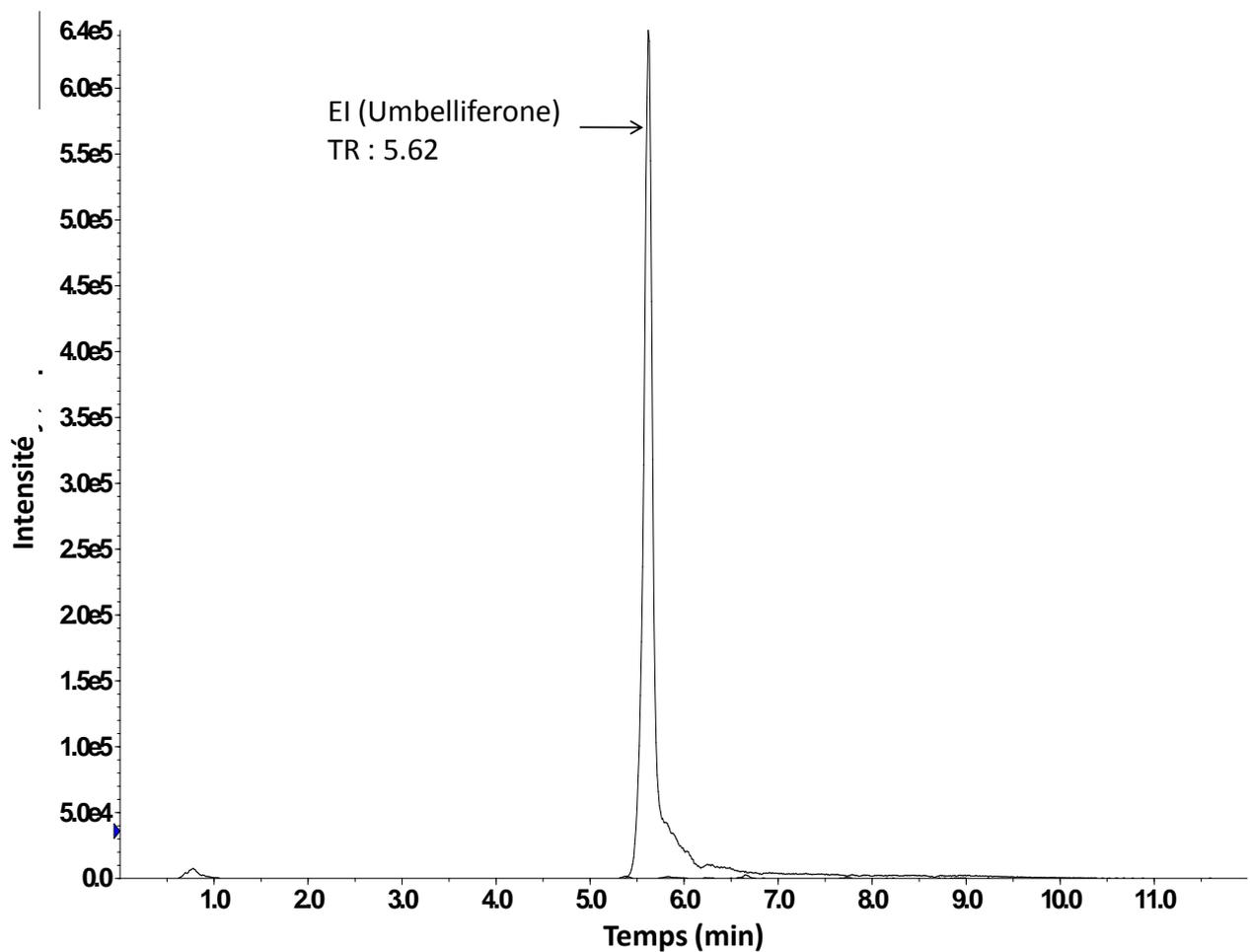


Figure 13 : Chromatogramme du blanc dans l'urine.

Sur le point correspondant à la limite de quantification, les pics correspondant au 4MUG, 4MUS et 4MU se distinguent du bruit de fond.

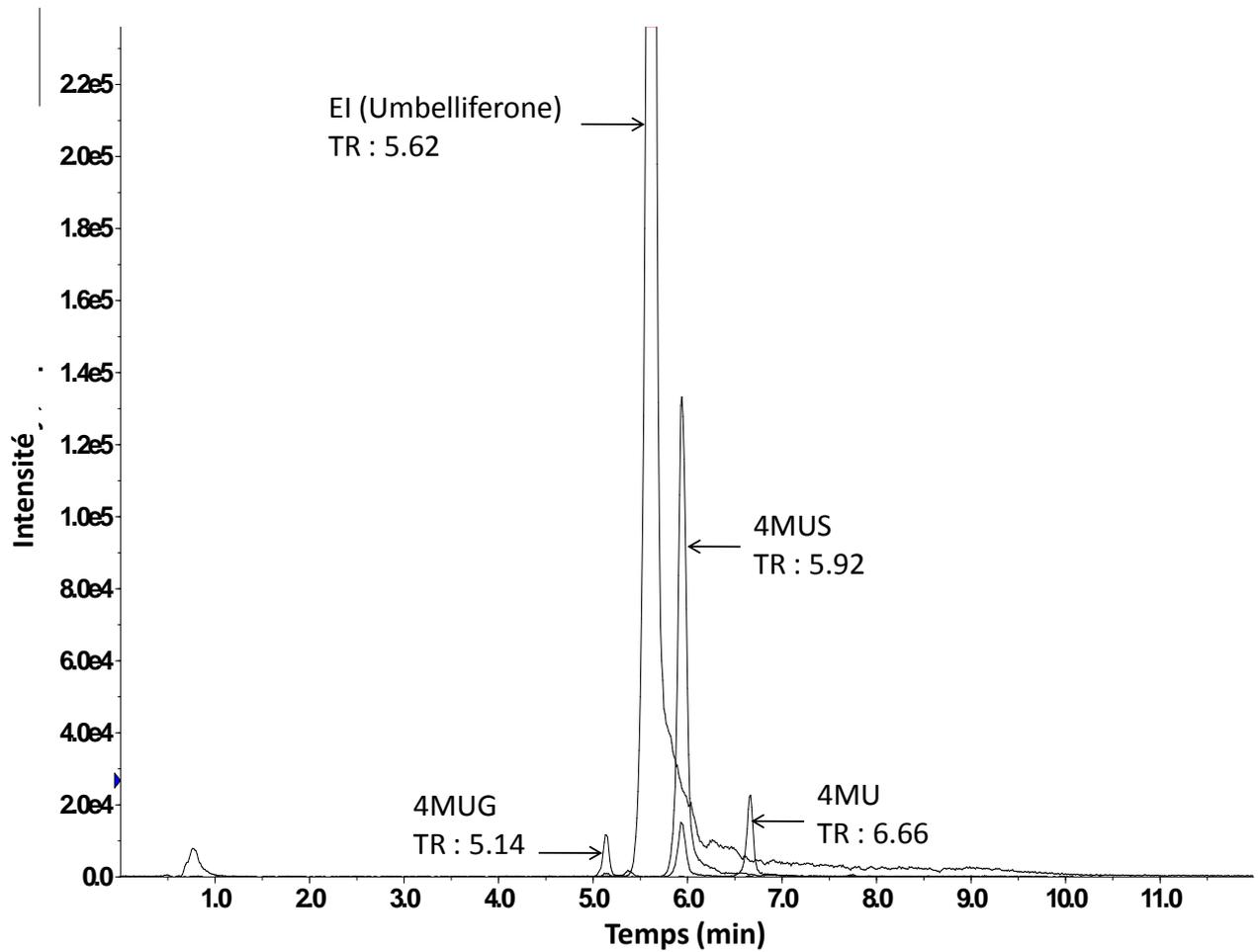


Figure 14 : Chromatogramme au point de gamme le plus bas (4MUG et 4MUS 0.625 / 4MU 1.25 nmol/mL).

Les temps de rétention pour les 3 molécules étudiées, c'est-à-dire la 4MUG, la 4MUS et la 4MU sont respectivement de 5,14 min, 5,92 min et 6,66 min. (Figure 14 et 15).

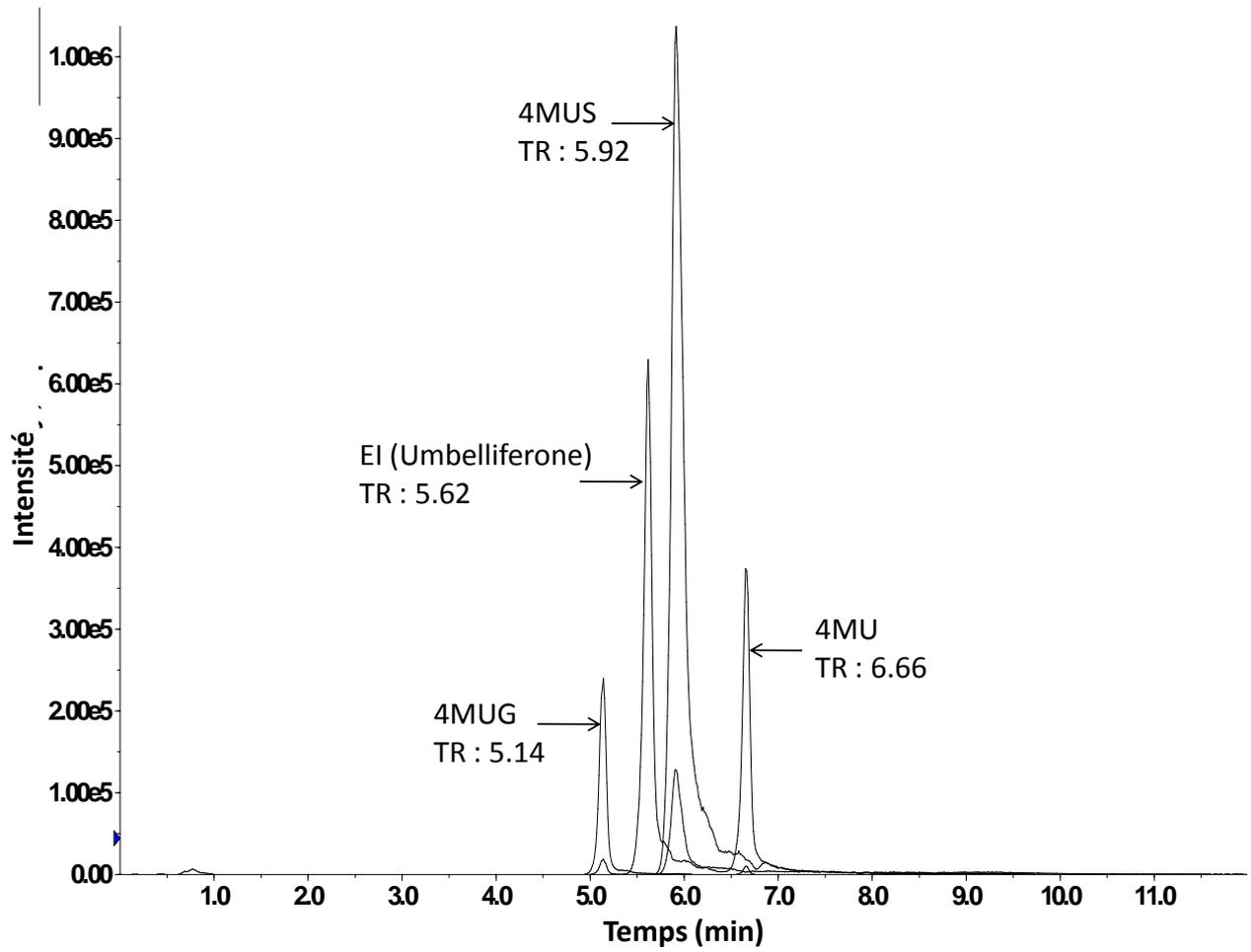


Figure 15 : Chromatogramme au point de gamme le plus haut (4MUG et 4MUS 10 / 4MU 20 nmol/mL).

b) Dans le plasma

Le chromatogramme du blanc, laisse apparaître le pic de l'étalon interne qui possède un temps de rétention (TR) de 5,40 min. Il n'y a pas de pic aux temps de rétention des analytes (4MU, 4MUG et 4MUS).

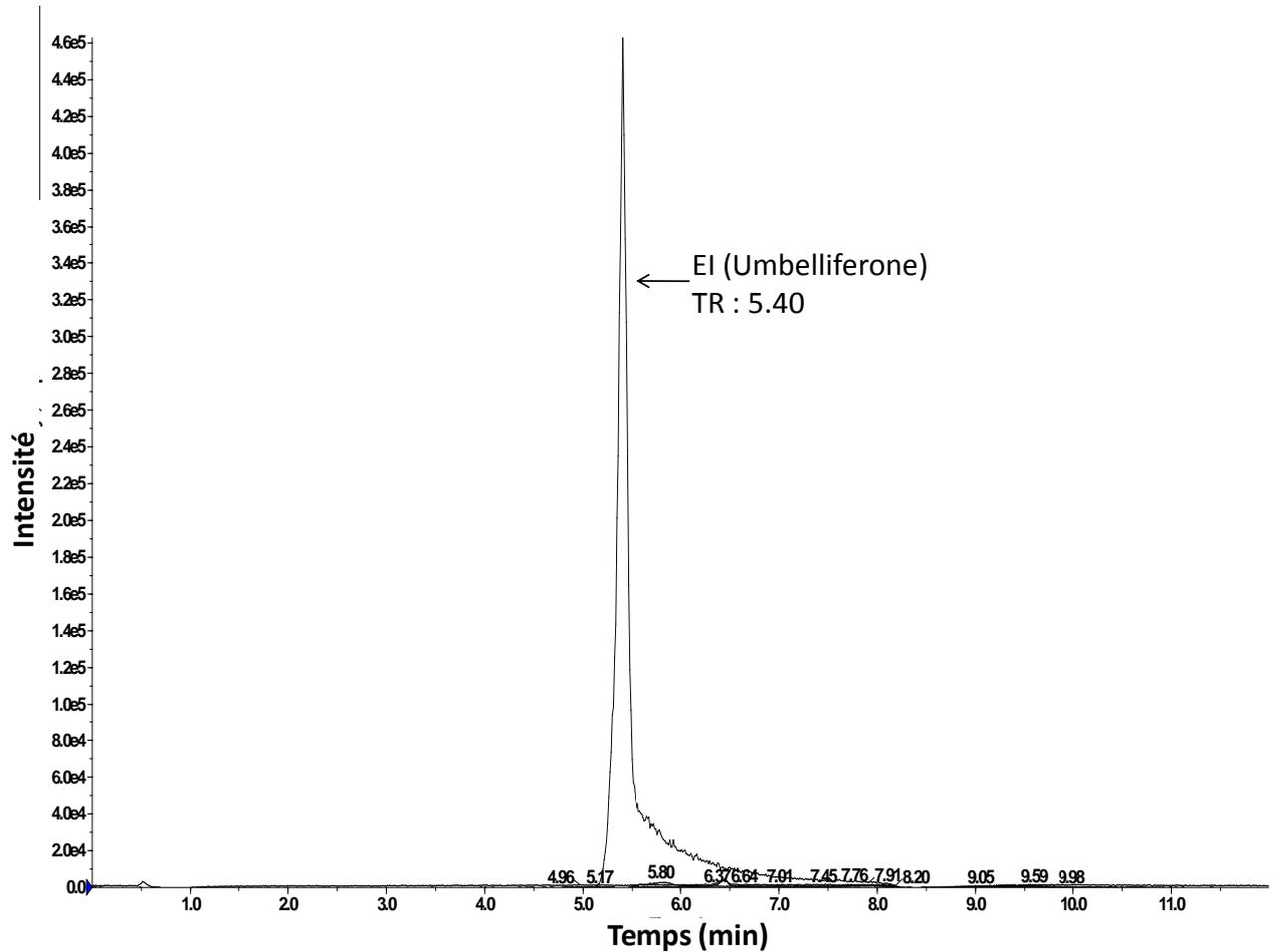


Figure 16 : Chromatogramme du blanc dans le plasma.

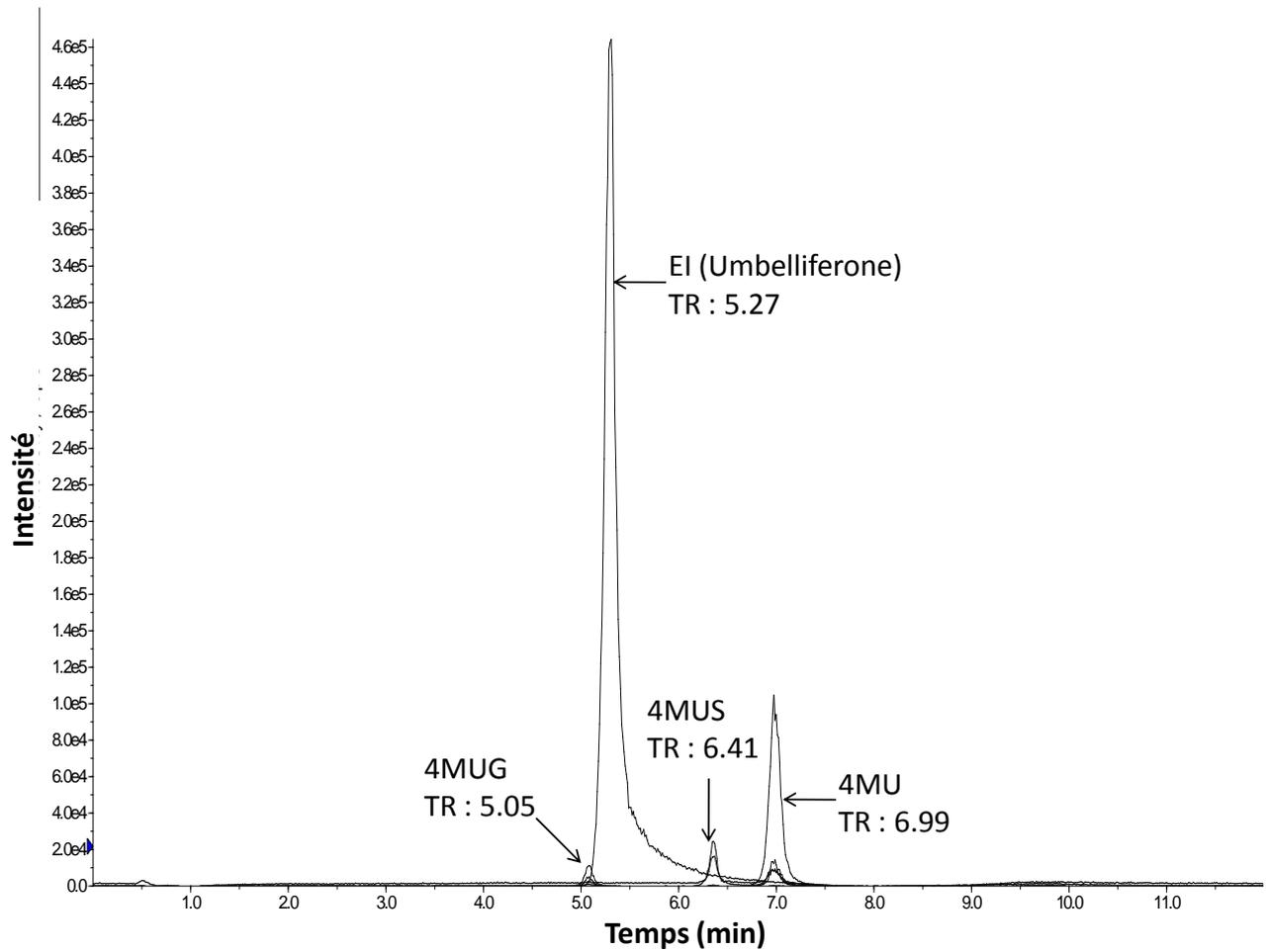


Figure 17 : Chromatogramme au point de contrôle le plus bas avec enzyme inactivée (4MUG et 4MUS 0,52 / 4MU 1,04 nmol/mL).

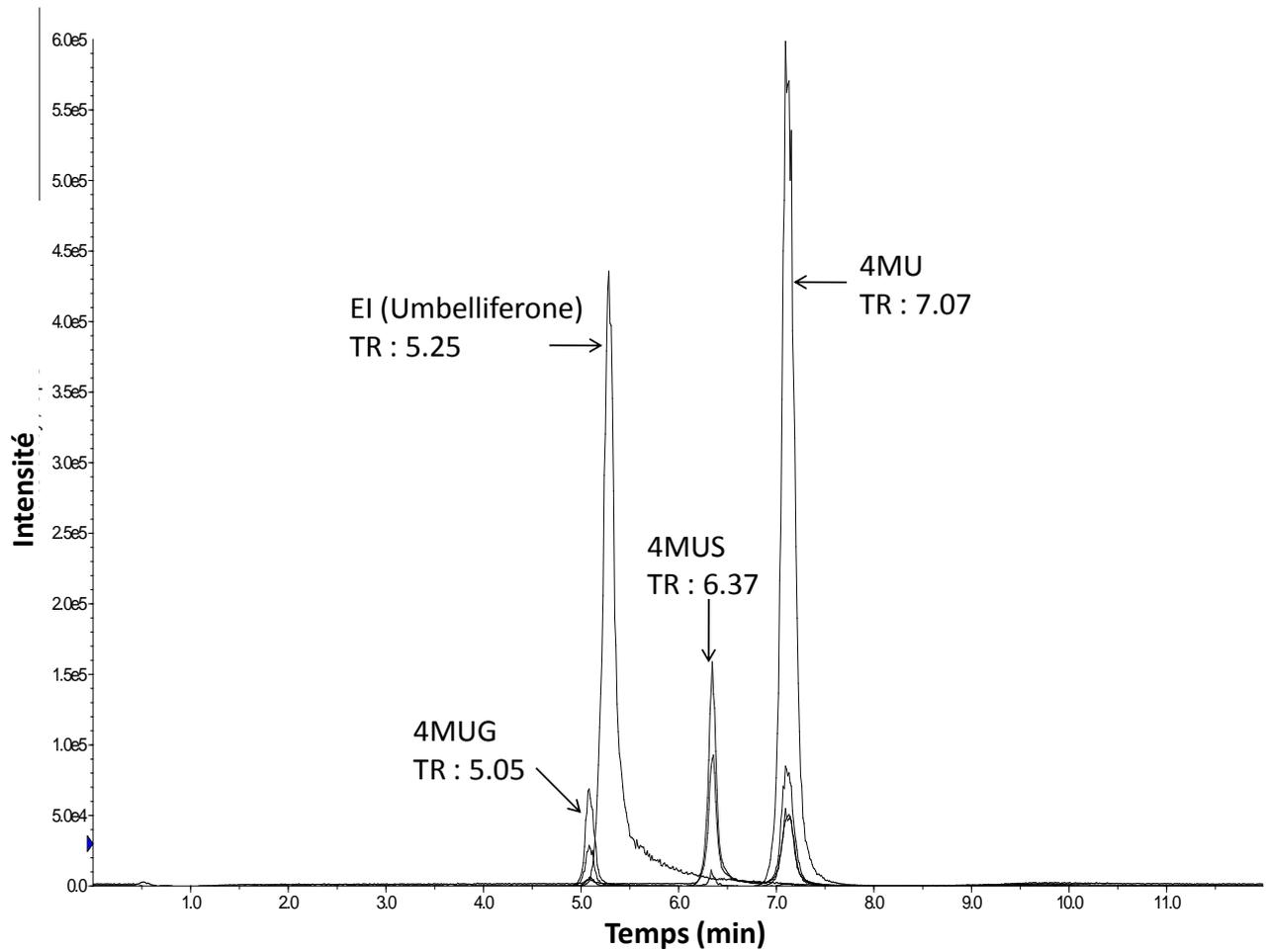


Figure 18 : Chromatogramme au point de contrôle intermédiaire avec enzyme inactivée (4MUG et 4MUS 4,17 / 4MU 8,33 nmol/mL).

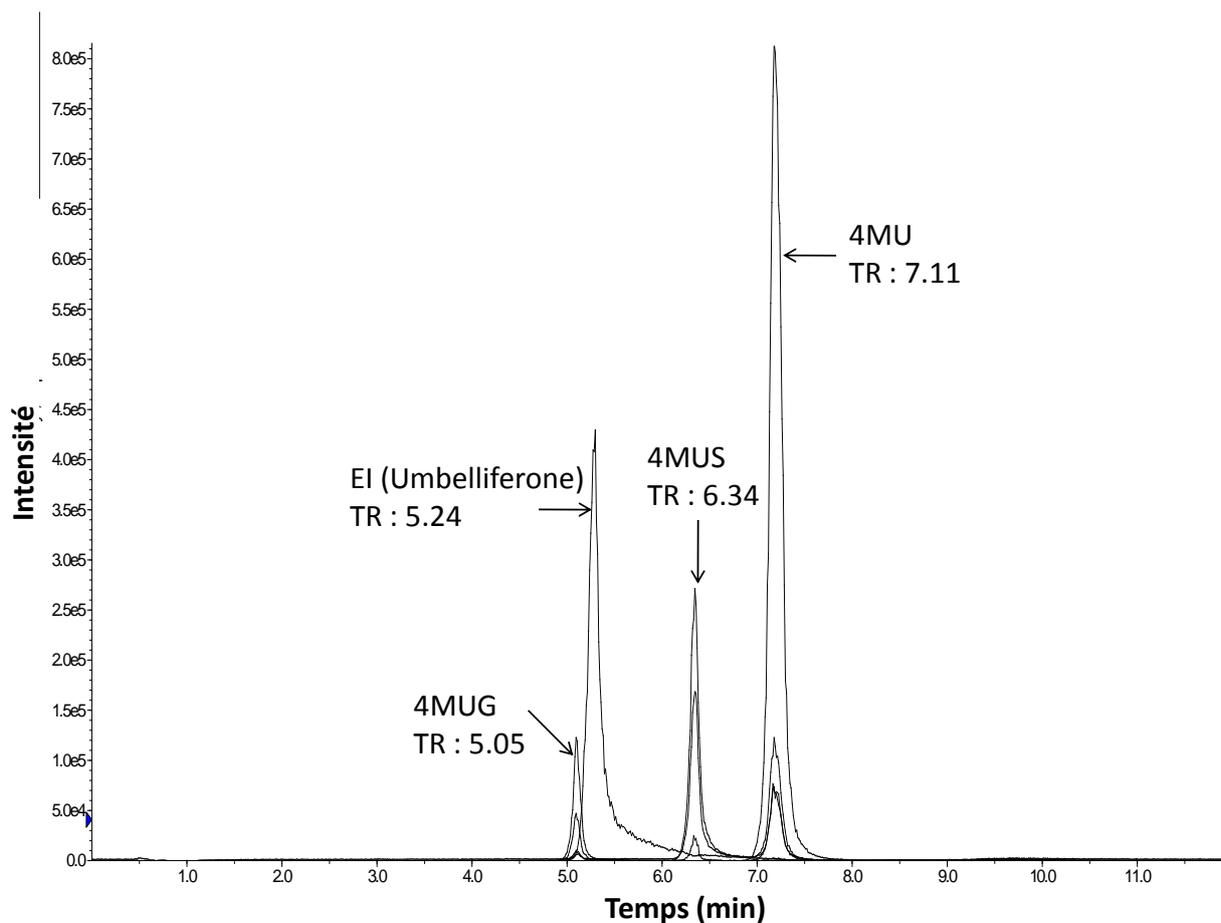


Figure 19 : Chromatogramme au point de contrôle le plus haut avec enzyme inactivée (4MUG et 4MUS 6,25 / 4MU 12,50 nmol/mL).

Dans le plasma, les analytes ainsi que l'étalon interne se détachent bien du bruit de fond également. Nous pouvons noter une légère variation des temps de rétention entre les points dans l'urine et ceux dans le plasma.

2) Linéarité.

Aucun point de gamme sur l'ensemble des gammes et pour tous les analytes, que ce soit dans le plasma ou dans l'urine, n'a été exclue.

a) Dans l'urine

- *Linéarité 4MUG*

Tableau 8 : Résultats de linéarité pour la 4MUG dans l'urine. (n=5)

4MUG	slope	R	r ²	ordonnée	régression
Moyenne	0,019	0,999	0,999	0,001	1/x weighting
écart type	0,0087	0,0006	0,0011	0,0008	1/x weighting

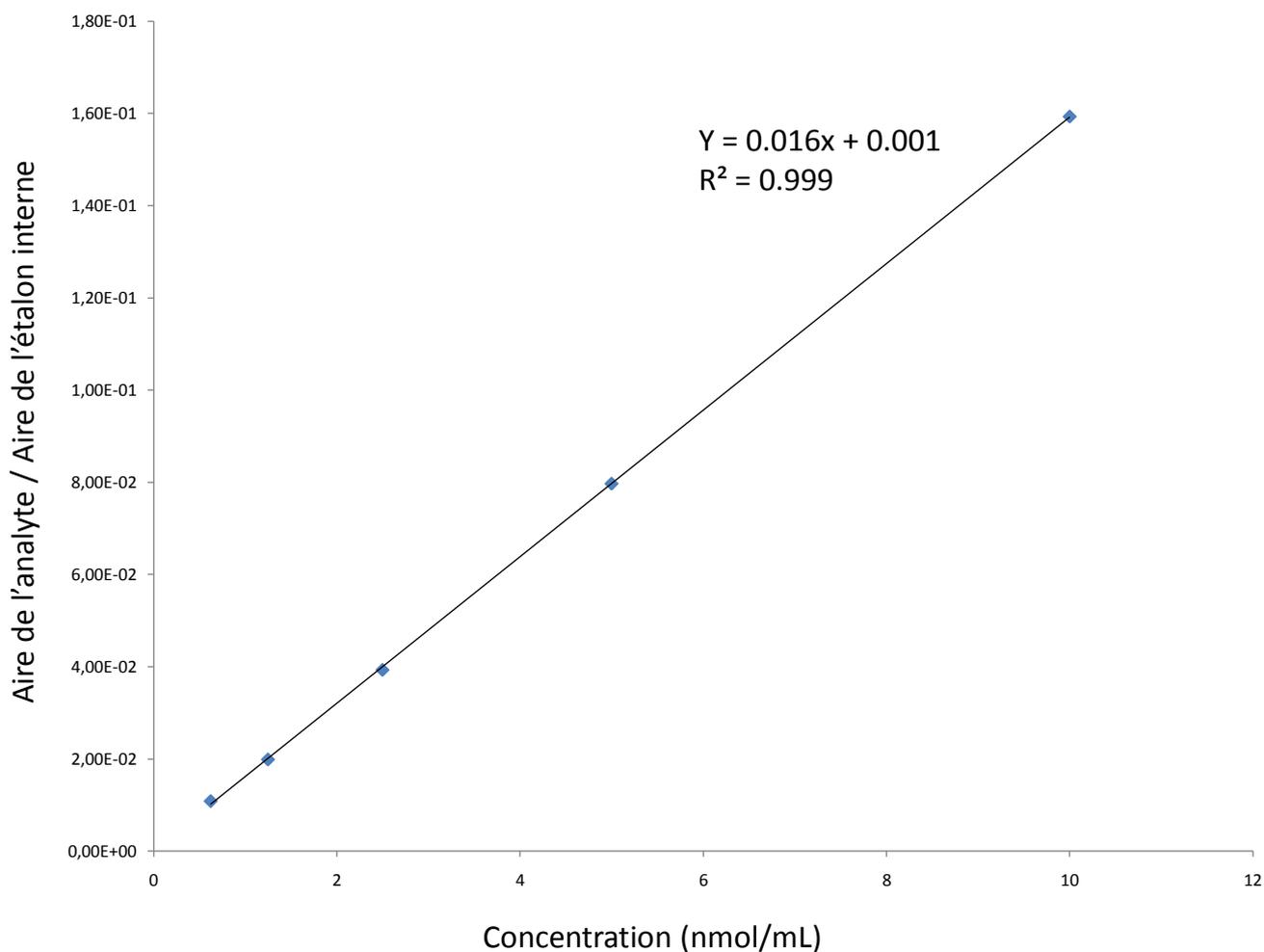


Figure 20 : Courbe de calibration de la 4MUG (19/06/2015).

La moyenne des r^2 des droites de régression linéaire pour la 4MUG sont de 0,999 dans l'urine, le r^2 le plus bas étant à 0,997 et le plus haut à 1.

- *Linéarité 4MUS*

Tableau 9 : Résultats de linéarité pour la 4MUS dans l'urine. (n=5)

4MUS	Slope	R	r^2	ordonnée	régression
Moyenne	0,242	0,997	0,995	0,261	1/x weighting
écart type	0,0085	0,0004	0,0008	0,057	1/x weighting

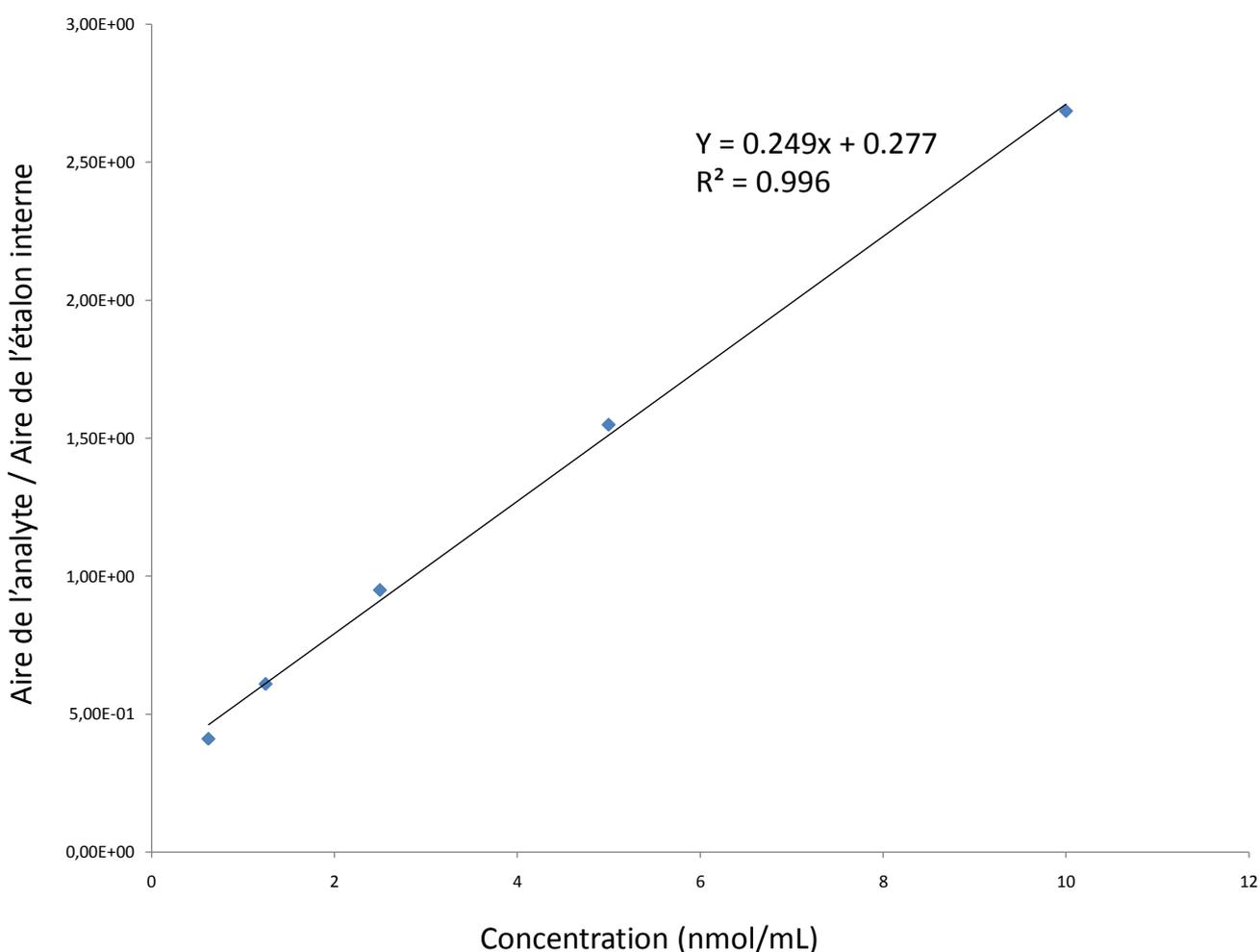


Figure 21 : Courbe de calibration de la 4MUS (19/06/2015).

La moyenne des r^2 des droites de régression linéaire pour la 4MUS sont de 0,995 dans l'urine, le r^2 le plus bas étant à 0,994 et le plus haut à 0,996.

- *Linéarité 4MU*

Tableau 10 : Résultats de linéarité pour la 4MU dans l'urine. (n=5)

4MU	slope	R	r ²	ordonnée	régression
Moyenne	0,031	0,999	0,998	0,012	1/x weighting
écart type	0,0016	0,0003	0,0007	0,002	1/x weighting

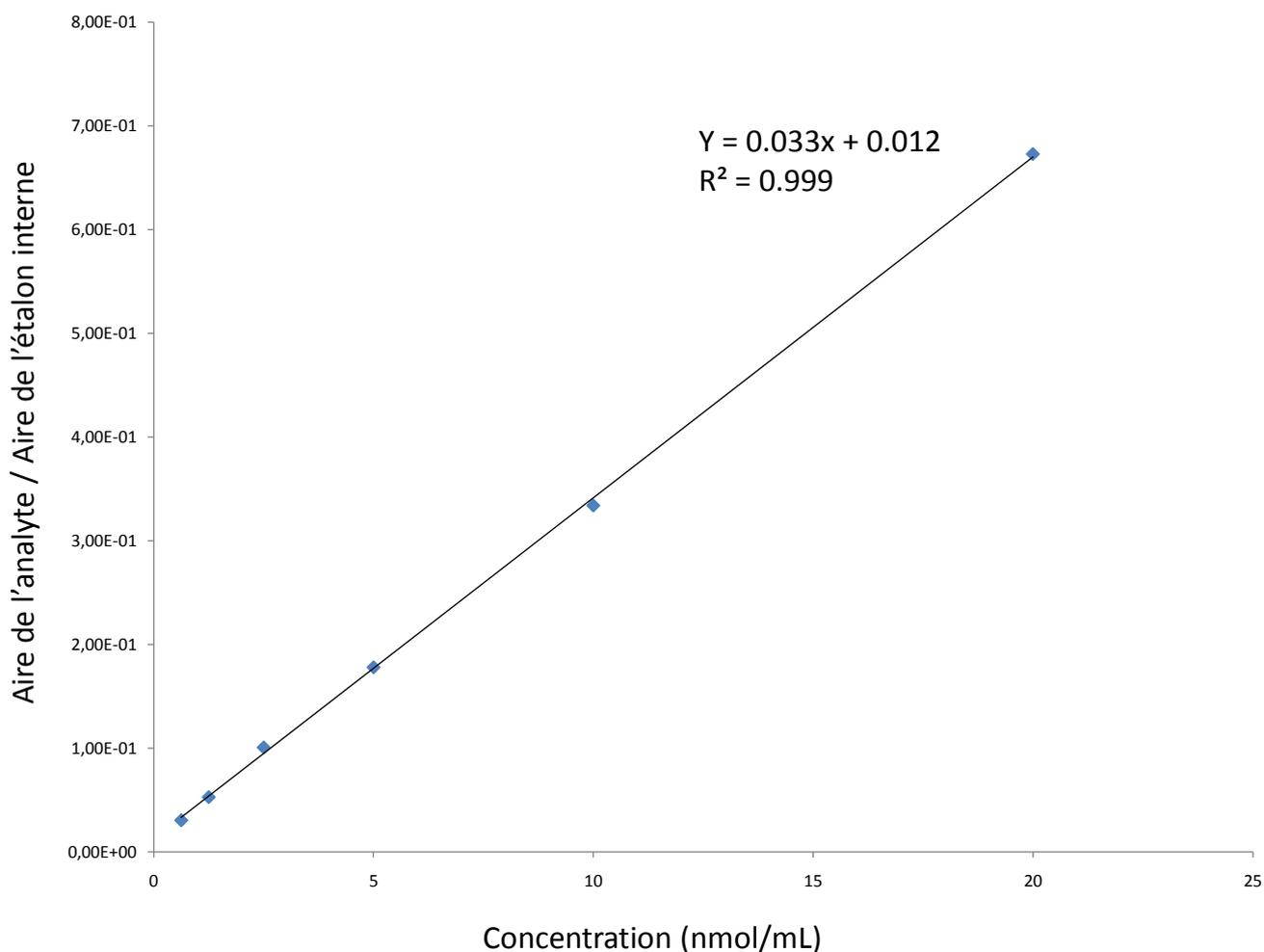


Figure 22 : Courbe de calibration de la 4MU. (23/06/2015)

La moyenne des r² des droites de régression linéaire pour la 4MU sont de 0,998 dans l'urine, le r² le plus bas étant à 0,998 et le plus haut à 0,999.

Le r² pour les 3 molécules est proche de 1, le plus bas étant à 0,995 pour la 4MUS. Le modèle de régression linéaire est donc adapté pour la méthode dans l'urine.

b) Dans le plasma

- *Linéarité 4MUG*

Tableau 11 : Résultats de linéarité pour la 4MUG dans le plasma. (n=5)

4MUG	slope	R	r ²	ordonnée	régression
Moyenne	0,019	0,997	0,995	-0,002	1/x weighting
écart type	0,0019	0,0009	0,0019	0,0007	1/x weighting

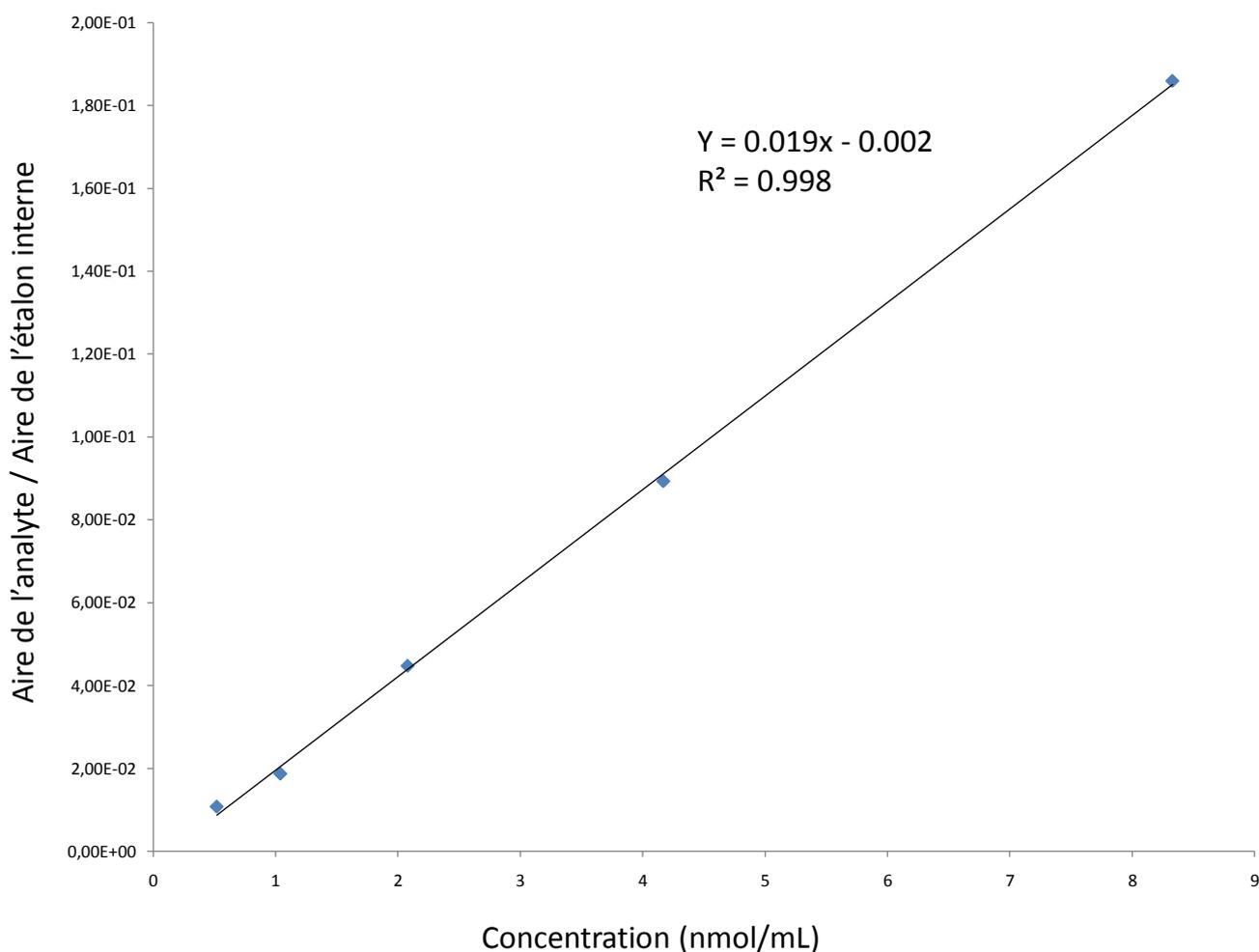


Figure 23 : Courbe de calibration de la 4MUG. (31/12/2015)

La moyenne des r² des droites de régression linéaire pour la 4MUG sont de 0,995 dans le plasma, le r² le plus bas étant à 0,993 et le plus haut à 0,998.

- *Linéarité 4MUS*

Tableau 12 : Résultats de linéarité pour la 4MUS dans le plasma. (n=5)

4MUS	Slope	R	r ²	ordonnée	régression
Moyenne	0,317	0,998	0,996	0,633	1/x weighting
écart type	0,0779	0,0009	0,0018	0,183	1/x weighting

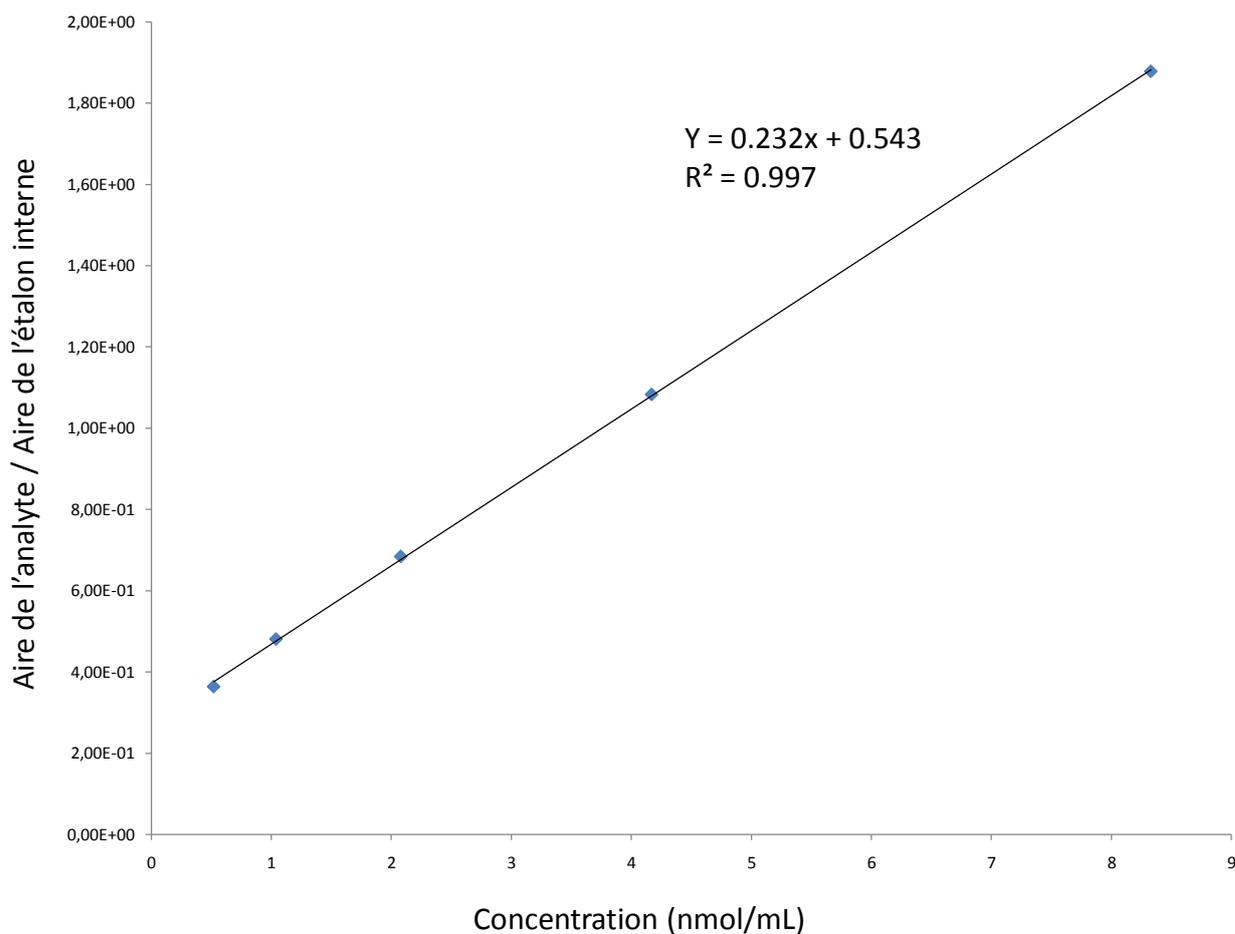


Figure 24 : Courbe de calibration de la 4MUS. (18/01/2016)

La moyenne des r² des droites de régression linéaire pour la 4MUS sont de 0,996 dans le plasma, le r² le plus bas étant à 0,992 et le plus haut à 0,997.

- *Linéarité 4MU*

Tableau 13 : Résultats de linéarité pour la 4MU dans le plasma. (n=5)

4MU	slope	R	r ²	ordonnée	régression
Moyenne	0,033	0,997	0,995	0,042	1/x weighting
écart type	0,0068	0,0016	0,0032	0,012	1/x weighting

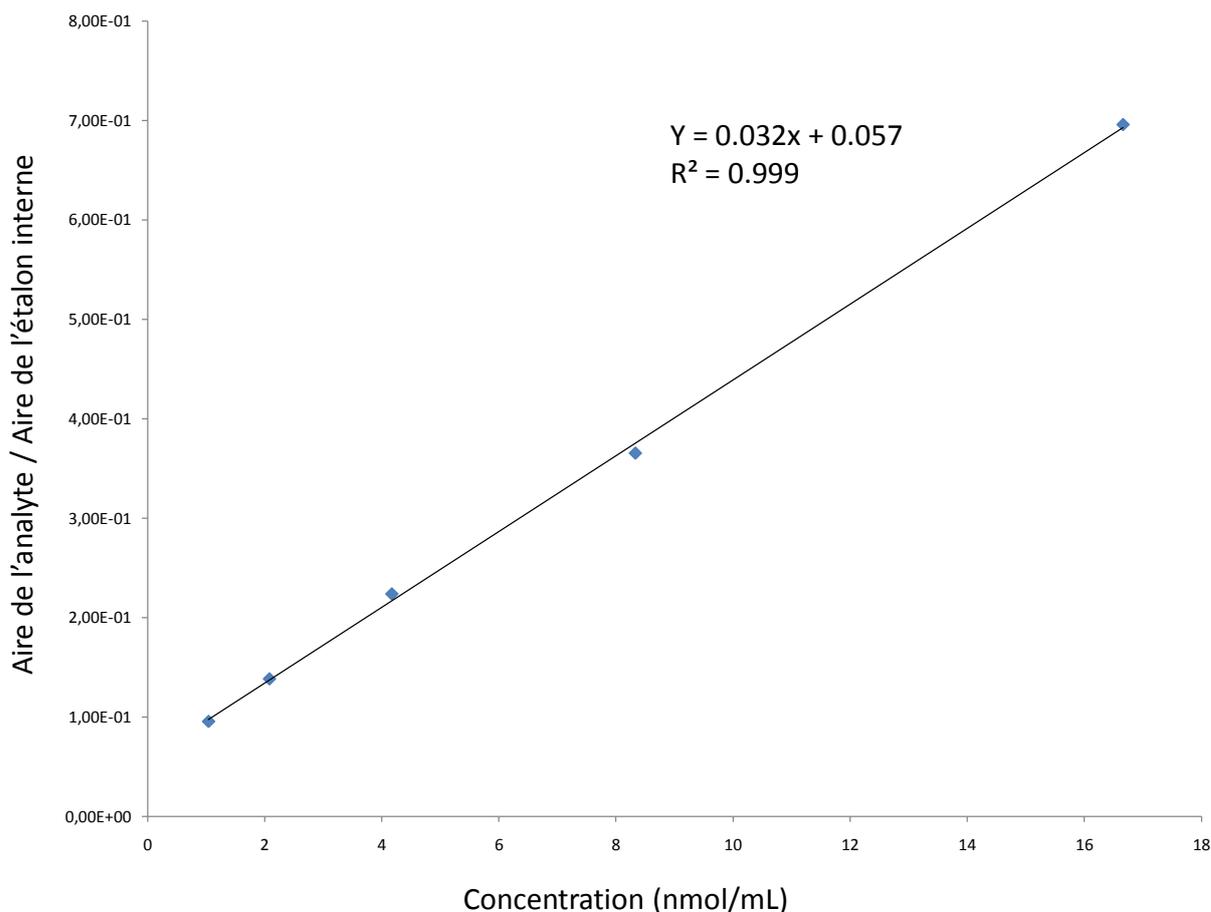


Figure 25 : Courbe de calibration de la 4MU. (31/12/2015)

La moyenne des r² des droites de régression linéaire pour la 4MU sont de 0,995, le r² le plus bas étant à 0,991 et le plus haut à 0.999.

Le r² pour les 3 molécules est proche de 1, le plus bas étant à 0,995 pour les moyennes du 4MU et 4MUG. Le modèle de régression linéaire est donc adapté pour la méthode dans le plasma.

3) Répétabilité

a) Dans l'urine

Les résultats de l'étude de répétabilité dans l'urine sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Résultats de l'étude de répétabilité dans l'urine

Répétabilité		MUG 0,625/MUS 0,625/MU 1.25	MUG 5/MUS 5/MU 10	MUG 7,5/MUS 7,5/MU 15
4MUG	Moyenne (nmol/mL)	0,62	4,76	6,62
	Ecart type	0,02	0,26	0,13
	CV (%)	2,78	5,47	2,02
	Biais (%)	-0,42	-4,84	-11,76
4MUS	Moyenne (nmol/mL)	0,57	5,16	6,76
	Ecart type	0,03	0,07	0,26
	CV (%)	5,76	1,45	3,82
	Biais (%)	-8,26	3,16	-9,90
4MU	Moyenne (nmol/mL)	1,33	10,09	13,48
	Ecart type	0,05	0,63	0,33
	CV (%)	3,93	6,30	2,43
	Biais (%)	6,24	0,90	-10,10

Les coefficients de variation sont tous inférieurs à 15%, l'étude de répétabilité dans l'urine est donc validée.

b) Dans le plasma

Les résultats de l'étude de répétabilité dans le plasma sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Résultats de l'étude de répétabilité dans le plasma.

Répétabilité		MUG 0,52/MUS 0,52/MU 1,04	MUG 4,17/MUS 4,17/MU 8,33	MUG 6,25/MUS 6,25/MU 12,50
4MUG	Moyenne (nmol/mL)	0,59	4,33	6,65
	Ecart type	0,01	0,11	0,20
	CV (%)	1,89	2,44	2,97
	Biais (%)	12,47	3,72	6,37
4MUS	Moyenne (nmol/mL)	0,49	4,51	6,40
	Ecart type	0,03	0,23	0,14
	CV (%)	5,57	5,19	2,18
	Biais (%)	-4,90	8,03	2,37
4MU	Moyenne (nmol/mL)	0,98	7,84	12,12
	Ecart type	0,06	0,54	1,00
	CV (%)	6,13	6,84	8,26
	Biais (%)	-6,09	-5,92	-3,07

Les coefficients de variation sont tous inférieurs à 15%, l'étude de répétabilité dans le plasma est donc validée.

4) Fidélité inter-séries

a) Dans l'urine

Les résultats de l'étude de fidélité inter-séries dans l'urine sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 16 : Résultats de l'étude de fidélité inter-séries dans l'urine.

Fidélité Inter-séries		MUG 0,625/MUS 0,625/MU 1,25	MUG 5/MUS 5/MU 10	MUG 7,5/MUS 7,5/MU 15
4MUG	Moyenne (nmol/mL)	0,67	4,92	7,41
	Ecart type	0,02	0,16	0,04
	CV (%)	3,28	3,17	0,48
	Biais (%)	6,62	-1,68	-1,25
4MUS	Moyenne (nmol/mL)	0,58	5,19	7,44
	Ecart type	0,04	0,33	0,20
	CV (%)	6,52	6,39	2,73
	Biais (%)	-7,46	3,80	-0,75
4MU	Moyenne (nmol/mL)	1,36	10,23	14,74
	Ecart type	0,06	0,47	0,30
	CV (%)	4,74	4,58	2,07
	Biais (%)	9,12	2,34	-1,73

Les coefficients de variation sont tous inférieurs à 15%, l'étude de fidélité inter-séries dans l'urine est donc validée.

b) Dans le plasma

Les résultats de l'étude de fidélité inter-séries dans le plasma sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Résultats de l'étude de fidélité inter-séries dans le plasma.

Fidélité Inter-séries		MUG 0,52/MUS 0,52/MU 1,04	MUG 4,17/MUS 4,17/MU 8,33	MUG 6,25/MUS 6,25/MU 12,5
4MUG	Moyenne (nmol/mL)	0,60	4,10	6,36
	Ecart type	0,02	0,28	0,32
	CV (%)	3,63	6,84	5,08
	Biais (%)	15,06	-1,76	1,73
4MUS	Moyenne (nmol/mL)	0,51	4,44	6,49
	Ecart type	0,05	0,28	0,44
	CV (%)	8,89	6,27	6,75
	Biais (%)	-2,03	6,36	3,79
4MU	Moyenne (nmol/mL)	1,11	8,66	12,87
	Ecart type	0,06	0,71	1,03
	CV (%)	5,02	8,19	7,97
	Biais (%)	6,57	3,92	2,93

Les coefficients de variation sont tous inférieurs à 15% ou 20% pour le point le plus bas, l'étude de fidélité inter-séries dans le plasma est donc validée.

5) Fidélité

D'après les tableaux 14, 15, 16 et 17 les résultats des CV sont bien inférieurs à 15% (ou 20% pour le point le plus bas) dans l'urine et dans le plasma. La fidélité des méthodes est donc validée.

6) Justesse

D'après les tableaux 14, 15, 16 et 17 les résultats des biais sont bien inférieurs à 15% (ou 20% pour le point le plus bas) dans l'urine et dans le plasma. La justesse des méthodes est donc bien validée.

7) Limite de détection

Dans cette étude elle est égale à la limite de quantification puisqu'un résultat inférieur à la limite de quantification n'est pas interprété.

8) Limite de quantification

La limite de quantification dans l'urine est de 0,625 nmol/mL pour la 4MUG et la 4MUS. Elle est de 1,25 nmol/mL pour la 4MU.

La limite de quantification dans le plasma est de 0,52 nmol/mL pour la 4MUG et la 4MUS. Elle est de 1,04 nmol/mL pour la 4MU.

9) Effet matrice

a) Dans l'urine

Tableau 18 : Résultats en pourcentage des effets matrice selon les concentrations dans l'urine.

Analytes	Concentrations			
		0,625/1,25 nmol/mL	5/10 nmol/mL	7,5/15 nmol/mL
4MU		0,9	3,3	-7,4
4MUS		-4,4	-1,6	-8,2
4MUG		-0,1	1,5	-14,4

Les effets matrice sont négligeables (inférieurs à 20%), donc l'enzyme ne modifie pas la réponse des différents analytes par rapport à l'eau dans l'urine.

b) Dans le plasma

Tableau 19 : Résultats des effets matrice selon les concentrations dans le plasma.

	Concentrations			
Analytes		0,52/1,04 nmol/mL	4,17/8,33 nmol/mL	6,25/12,5 nmol/mL
	4MU	1,3	3,5	28,8
	4MUS	-16,0	-4,8	-2,7
	4MUG	-0,6	3,1	8,7

De même, dans le plasma, les effets matrice sont négligeables (inférieurs à 20%). A l'exception du 4MU pour le point de contrôle le plus haut. Dans l'idéal, il faudrait refaire la manipulation pour savoir s'il s'agit d'un problème sur cette manipulation ou s'il s'agit d'un problème récurrent dont il faut tenir compte lors des calculs.

IV - Discussion

Deux méthodes de dosage, dans l'urine et dans le plasma, de la 4-Méthyl-Umbelliféron et de ses conjugués glucuronide et sulfate ont été mises au point et validées.

A la différence de Fishman et Al. (*Fishman et Al.*, 1967) et Szasz (*Szasz*, 1967) qui ont déterminé l'activité β -glucuronidase en utilisant le p-Nitrophenyl- β -D-glucuronide et le phenolphthalein- β -D-glucuronide comme substrat dans cette étude la 4MUG a été choisit comme substrat car c'est la plus utilisée dans les études de biomonitoring (*Carrasco-Correa et Al.*, 2015 ; *Chen et Al.*, 2012 ; *Frederiksen et Al.*, 2013 ; *Genuis et Al.*, 2012 ; *Vela-Soria et Al.*, 2014 bis ; *Zhou et Al.*, 2012). Wu et Al. (*Wu et Al.*, 1998) et Sperker et Al. (*Sperker et Al.*, 1996), ont utilisé le 4MUG comme substrat mais ne déterminent que l'activité β -glucuronidase et non l'activité sulfatase comme dans notre étude. Zimmerman et Al. (*Zimmerman et Al.*, 1991) ont développé et validé une méthode d'analyse du 4MU/4MUG/4MUS en utilisant une HPLC-UV, qui est aujourd'hui de moins en moins utilisée dans les laboratoires, au profit des LC-MS/MS.

Plusieurs modifications ont eu lieu lors du développement des méthodes de dosage.

Initialement, l'objectif était de mettre au point une méthode de dosage de la 4MU et de ses conjugués dans l'urine et le plasma.

Pour mettre au point cette méthode de dosage, il était nécessaire de réaliser des gammes de 4MU, 4MUS et 4MUG. Nous avons choisi de réaliser ces gammes avec de l'eau, qui remplace l'enzyme afin de s'assurer de leur stabilité. En parallèle de ces gammes, des contrôles qualités ont été réalisés à la fois avec de l'eau et à la fois avec de l'enzyme. Les résultats de ces contrôles ont ensuite été comparés pour s'assurer que l'enzyme ne provoquait pas d'effet matrice, et ainsi conclure que des gammes avec de l'eau était appropriée pour doser la 4MU et ses conjugués. Pendant cette mise au point, il a été mis en évidence que l'enzyme non dénaturée déconjuguait la 4MUG et 4MUS même en manipulant dans un bain marie froid, ce qui ne permettait pas d'obtenir des résultats interprétables. Nous avons donc décidé

d'inactiver l'enzyme. Deux idées ont été étudiées, soit l'ajout d'une substance venant la dénaturer tel que le méthanol, ou alors, une dénaturation par la chaleur. La désactivation par le méthanol nécessitait de travailler à froid, c'est-à-dire que l'ensemble des constituants étaient stockés au froid avant la préparation, et cette dernière était réalisée dans un bain-marie d'eau glacée. Sans ce travail à froid, il a été démontré que le méthanol seul n'arrivait pas à stopper entièrement la réaction enzymatique, ce qui était problématique pour la réalisation des gammes pour les conjugués de la 4MU. L'alternative qui a été choisie a été la dénaturation de l'enzyme par la chaleur (enzyme chauffée 10 minutes à 100°C). Cette nouvelle méthode de désactivation enzymatique s'est avérée plus efficace et moins contraignante, il a été décidé de la conserver.

Dans la littérature (*Brock et Al., 2001 ; Frederiksen et Al., 2013 ; Genuis et Al., 2012 ; Herrero et Al., 2015 ; Inoue et Al., 2003 ; Leng et Al., 2011*), une autre enzyme est citée, il s'agit de la β -glucuronidase d'*E. Coli*, cette enzyme ne possède qu'une action glucuronidase et aucune action sulfatase, comparée à la β -glucuronidase/sulfatase d'*Helix Pomatia* qui possède la double action (*Calafat et Al., 2010 ; Carrasco-Correa et Al., 2015 ; Chen et Al., 2012 ; Cunha et Fernandes, 2010 ; Garcia-Prieto et Al., 2008 ; Ito et Al., 2009 ; Kawaguchi et Al., 2008 ; Kawaguchi et Al., 2008 bis ; Liao et Kannan, 2012 ; Ouchi et Watanabe, 2002 ; Schoringumer et Cichna-Markl, 2007 ; Shirai et Al., 2013 ; Vela-Soria et Al., 2014 ; Vela-Soria et Al., 2014 bis ; Zhou et Al., 2012*). C'est pour cela que nous avons choisi de ne finalement pas utiliser cette enzyme, et nous lui avons préféré celle d'*Helix Pomatia*.

Concernant la préparation des échantillons de plasma il fallait faire précipiter les protéines, car ces dernières obstruent la LC-MS/MS. Il a donc été nécessaire de trouver une solution pour faire précipiter les protéines du plasma, pour cela deux produits ont été essayés, le méthanol et l'acétonitrile. Après essai, il s'est avéré que l'acétonitrile permettait une meilleure précipitation des protéines tout en conservant le signal. De plus des essais avec des volumes de 300 contre 600 microlitres d'acétonitrile ont permis de conclure qu'un volume de 600 microlitres était idéal pour une précipitation des protéines tout en conservant un signal permettant la lecture. Pour éliminer les protéines, une étape de centrifugation a été ajoutée, cependant, une seule centrifugation ne s'est pas montrée suffisante pour centrifuger l'ensemble des protéines du plasma, ce qui provoquait une perturbation des résultats par LC-

MS/MS. Ainsi, une seconde centrifugation identique à la première a été ajoutée dans le protocole et a permis de pallier à ce problème. Une étape d'évaporation sous azote suivi d'une récupération par la phase mobile permet d'obtenir un signal optimal.

La préparation des échantillons est très simple, surtout pour l'urine, ce qui a l'avantage d'avoir une préparation courte dans le temps. Les variations de manipulations sont limitées avec l'utilisation d'un étalon interne (umbelliferone), qui est le même que celui utilisé par Zimmerman et Al. (*Zimmerman et Al.*, 1991).

Les chromatogrammes obtenus par LC/MS/MS montrent que les analytes ainsi que l'étalon interne se détachent du bruit de fond. Il est à noter une variation des temps de rétention due principalement au changement du milieu entre l'urine et le plasma. En effet les temps de rétention dans l'urine sont de 5,14, 5,62, 5,92 et 6,66 minutes correspondant respectivement au 4MUG, Umbelliferone, 4MUS et 4MU. Dans le plasma les temps de rétention passent à 5,05, 5,27, 6,41 et 6,99 minutes correspondant respectivement au 4MUG, Umbelliferone, 4MUS et 4MU.

Les critères d'acceptation pour la validation des méthodes analytiques ont suivi la littérature (*Bressole et Al.*, 1996 ; *Krouwer et Rabinowitz*, 1984 ; *Peters et Al.*, 2007).

Pour la linéarité, l'ensemble de nos résultats, que ce soit dans l'urine où dans le plasma, ont des moyennes des r^2 supérieures à 0,995, ce qui était notre limite inférieure d'acceptation. Les courbes de calibration sont linéaires sur toute la gamme de concentration (0,625 ; 1,25 ; 2,5 ; 5 ; 10 nmol/mL de 4MUG/4MUS et 1,25 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 nmol/mL de 4MU dans l'urine. 0,52 ; 1,04 ; 2,08 ; 4,17 ; 8,33 nmol/mL de 4MUG/4MUS et 1,04 ; 2,08 ; 4,17 ; 8,33 ; 16,67 nmol/mL de 4MU dans le plasma).

Concernant la fidélité et la justesse ; pour les études de répétabilité (analyse d'un même échantillon dans des conditions standardisées) montrent des coefficients de variation inférieurs à 7% dans l'urine et à 9% dans le plasma pour les trois niveaux de contrôle de chaque analyte. De plus, les biais calculés lors de cette étude sont tous inférieurs à 12% dans l'urine et 13% dans le plasma. De même, pour l'étude de fidélité inter-séries, les coefficients de variation sont inférieurs à 7% dans l'urine et 9% dans le plasma, et les biais sont inférieurs à 10% dans l'urine ; et 16%

dans le plasma pour le point de contrôle le plus bas, tandis que les biais sont inférieurs à 7% pour les autres points de contrôle dans le plasma. Donc les coefficients de variation et les biais sont en dessous des normes de validation que nous avons définies, c'est-à-dire 20% pour les points de contrôle les plus bas, et 15% pour les autres points de contrôle. Nos résultats sont ainsi considérés comme fidèles et justes.

La limite de détection est ici égale à la limite de quantification puisqu'aucun résultat inférieur à la limite de quantification n'est interprété. Les limites de quantification ont été validées à 0,625 nmol/mL pour la 4MUG et 4MUS ; et à 1,25 nmol/mL pour la 4MU dans l'urine ; et dans le plasma à 0,52 nmol/mL pour la 4MUG et 4MUS ; et 1,04 nmol pour la 4MU. Il s'agit de résultats expérimentaux obtenus lors de la réalisation de nos gammes, en effet la limite de quantification initiale souhaitée était de 0,312 nmol/mL pour la 4MUG et 4MUS dans l'urine. Cependant, la reproductibilité à cette concentration pour la 4MUS n'a pas été possible. La limite de quantification a été mesurée à 0,625 nmol/mL pour la 4MUS et par conséquent, les limites de quantification pour la 4MUG et la 4MU sont passées à 0,625 nmol/mL et 1,25 nmol/mL.

Dans le plasma, les limites de quantification souhaitées étaient de 0,26 nmol/mL pour la 4MUG et la 4MUS, et de 0,52 nmol/mL pour la 4MU. Cependant les répétabilités pour ces points à ces concentrations n'ont également pas été possibles, ainsi, les limites de quantification ont été évaluées à 0,52 nmol/mL pour la 4MUG et 4MUS, et à 1,04 nmol/mL pour la 4MU.

Il a été décidé de choisir des points de gamme deux fois plus concentrés pour la 4MU que pour la 4MUG et 4MUS, car étant donné que l'objectif est de déconjuguer ces deux molécules en 4MU, la concentration de 4MU formée est égale à l'addition des deux concentrations de la 4MUG et 4MUS déconjugés.

Enfin, il existe peu d'effet matrice que ce soit dans l'urine ou dans le plasma. Les effets matrice sont tous inférieurs à 15% dans l'urine et à 16% dans le plasma pour le point le plus bas, or la limite d'acceptation était un effet matrice de 20% maximum. Cependant dans le plasma, un point de contrôle haut se situe à 28,8%, à ce moment, il faudrait soit refaire la manipulation pour voir s'il s'agit d'une erreur, ou voir s'il s'agit d'un effet récurrent dont il faut tenir compte lors des calculs. Il est donc

possible de remplacer l'enzyme par de l'eau dans les gammes sans que cela n'affecte nos résultats.

Les perspectives sont d'utiliser ces dosages pour mesurer l'activité de l'enzyme sur nos molécules d'intérêts (4MU/4MUG/4MUS) en dosant ces composés avant et après action de l'enzyme. A plus long terme, il s'agit de valider la déconjugaison complète des dérivés chlorés du BPA grâce au contrôle de la déconjugaison du 4MUG et du 4MUS en 4MU, ce contrôle pouvant se faire grâce aux méthodes de dosage validées dans ce travail.

Conclusion

Les études sur les perturbateurs endocriniens se multiplient, notamment celles qui se concentrent spécifiquement sur le Bisphénol A et ses conjugués.

Pour cela, certaines études utilisent comme marqueur de déconjugaison la 4-Méthyl-Umbelliférol et ses conjugués glucuronide et sulfate, cependant jusqu'à présent, aucune de ces études n'avaient mis au point une méthode de dosage de ce marqueur par LC-MS/MS.

Nos méthodes pour doser ces marqueurs dans l'urine et le plasma par HPLC-MS/MS ont été validées, ainsi l'utilisation de la 4MU, 4MUS et 4MUG est adaptée comme marqueur de la déconjugaison des conjugués du BPA, mais aussi des autres perturbateurs endocriniens.

Bibliographie

- ANSES, 2011 : Effet sanitaire du bisphénol A. Connaissance relatives aux usages du bisphénol A.
ANSES - 2011
- ANSES, 2013 : Evaluation des risques du Bisphénol A pour la santé humaine.
ANSES – 2013
- Bressole *et Al.*, 1996 : Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics.
Bressolle F., Bormet-Petit M., Audran M.J. chromatogr B Biomed Appl. – 1996 ; 8;686(1):3-10
- Brock *et Al.*, 2001: Measurement of bisphenol A levels in human urine.
Brock J.W., Yoshimura Y., Barr J.R., Maggio V.L., Graiser S.R., Nakazawa H., Needham L.L. - J Expo Anal Environ Epidemiol – 2001 ; 11(4):323-8
- Calafat *et Al*, 2010 : Urinary Concentrations of Four Parabens in the U.S. Population: NHANES 2005–2006
Calafat A.M., Ye X., Wong L.Y., Bishop A.M., Needham L.L. - Environ Health Perspect – 2010 ; 118(5):679-85
- Carrasco-Correa *et Al.*, 2015 : Sensitive determination of parabens in human urine and serum using methacrylate monoliths and reversed-phase capillary liquid chromatography–mass spectrometry.
Carrasco-Correa E.J., Vela-Soria F., Ballesteros O., Ramis-Ramos G., Herrero-Martínez J.M. - J Chromatogr A – 2015 ; 1379:65-73
- Casas *et Al.*, 2013 : Dietary and sociodemographic determinants of bisphenol A urine concentrations in pregnant women and children.
Casas M., Valvi D., Luque N., Ballesteros-Gomez A., Carsin A.E., Fernandez M.F., Koch H.M., Mendez M.A., Sunyer J., Rubio S., Vrijheid M. - Environ Int – 2013 ; 56:10-8
- Chen *et Al.*, 2012 : Simultaneous determination of multiple phthalate metabolites and bisphenol-A in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.
Chen M., Tao L., Collins E.M., Austin C., Lu C. - J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci – 2012 ; 904:73-80
- Ciccolini, 2010 : Cours de Métabolisme de Pharmacie.
Ciccolini J. - Laboratoire de Toxicocinétique et Pharmacocinétique Faculté de Pharmacie de Marseille – 2010

- *Cunha et Fernandes, 2010* : Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography–mass spectrometry (MD–GC/MS)
Cunha S.C., Fernandes J.O. – *Talanta* – 2010 ; 83(1):117-25
- *Fishman et Al., 1967* : Human serum β -glucuronidase ; its measurement and some of its properties.
Fishman W.H., Kato K., Anstiss C.L, Green S. – *Clinica Chimica Acta* - 1967 ; 15(3):435-47
- *Frederiksen et Al., 2013* : Bisphenol A and other phenols in urine from Danish children and adolescents analyzed by isotope diluted TurboFlow-LC–MS/MS.
Frederiksen H., Aksglaede L., Sorensen K., Nielsen O., Main K.M., Skakkebaek N.E., Juul A., Andersson A.M. - *Int J Hyg Environ Health* – 2013 ; 216(6):710-20
- *Frederiksen et Al., 2013 bis* : Urinary excretion of phthalate metabolites, phenols and parabens in rural and urban Danish mother-child pairs.
Frederiksen H., Nielsen J.K., Mørck T.A., Hansen P.W., Jensen J.F., Nielsen O., Andersson A.M., Knudsen L.E. - *Int J Hyg Environ Health* – 2013 ; 216(6):772-83
- *Garcia-Prieto et Al., 2008* : Determination of urinary bisphenol A by coacervative microextraction and liquid chromatography–fluorescence detection.
García-Prieto A., Lunar M.L., Rubio S., Pérez-Bendito D. - *Anal Chim Acta* – 2008 ; 630(1):19-27
- *Geens et Al., 2009* : Sensitive and selective method for the determination of bisphenol-A and triclosan in serum and urine as pentafluorobenzoate-derivatives using GC-ECNI/MS.
Geens T., Neels H., Covaci A. - *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* – 2009 ; 877(31):4042-6
- *Genuis et Al., 2012* : Human Excretion of Bisphenol A : Blood, Urine, and Sweat (BUS) Study.
Genuis S.J., Beesoon S., Birkholz D., Lobo R.A. - *J EnvironPublic Health* – 2012 ; 2012:185731
- *Herrero et Al., 2015* : Feasibility of ultra-high performance liquid and gas chromatography coupled to mass spectrometry for accurate determination of primary and secondary phthalate metabolites in urine samples.
Herrero L., Calvarro S., Fernández M.A., Quintanilla-López J.E., González M.J., Gómara B. - *Anal Chim Acta* – 2015 ; 853:625-36

- *Hu et Al.*, 2002 : Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity.
Hu J.Y., Aizawa T., Ookubo S. – Environ Sci Pollut – 2002 ; 36,1980-7
- *INERIS*, 2010 : Rapport d'Etude sur le BPA : DRC-10-109972-01125C.
INERIS - 2010
- *Inoue et Al.*, 2003 : Size-exclusion flow extraction of bisphenol A in human urine for liquid chromatography-mass spectrometry.
Inoue K., Kawaguchi M., Funakoshi Y., Nakazawa H. - J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci – 2003 ; 798(1):17-23.
- *INSERM*, 2010 : Bisphenol A Effets sur la reproduction.
INSERM – 2010
- *INSERM*, 2011 : Reproduction et environnement.
INSERM - 2011
- *Ito et Al.*, 2009 : Development of miniaturized hollow-fiber assisted liquid-phase microextraction with in situ acyl derivatization followed by GC-MS for the determination of benzophenones in human urine samples.
Ito R., Kawaguchi M., Koganei Y., Honda H., Okanouchi N., Sakui N., Saito K., Nakazawa H. - Anal Sci – 2009 ; 25(8):1033-7
- *Jing et Al.*, 2011 : A study on bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol in human urine amples detected by SPE-UPLC-MS.
Jing X., Bing S., Xiaoyan W., Xiaojie S., Yongning W. - Biomed Environ Sci – 2011 ; 24(1):40-6
- *Kang et Al.*, 2013 : Urinary paraben concentrations among pregnant women and their matching newborn infants of Korea, and the association with oxidative stress biomarkers.
Kang S., Kim S., Park J., Kim H.J., Lee J., Choi G., Choi S., Kim S., Kim S.Y., Moon H.B., Kim S., Kho Y.L., Choi K. - Sci Total Environ – 2013 ; 461-462:214-21
- *Kawaguchi et Al.*, 2008 : Measurement of Benzophenones in Human Urine Samples by Stir Bar Sorptive Extraction and Thermal Desorption-Gas Chromatography–Mass Spectrometry.
Kawaguchi M., Ito R., Honda H., Endo N., Okanouchi N., Saito K., Seto Y., Nakazawa H. - Anal Sci – 2008 ; 24(11):1509-12
- *Kawaguchi et Al.*, 2008 bis : Miniaturized hollow fiber assisted liquid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography–mass spectrometry for analysis of bisphenol A in human urine sample.
Kawaguchi M., Ito R., Okanouchi N., Saito K., Nakazawa H. - J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci – 2008 ; 870(1):98-102

- *Krouwer et Rabinowitz*, 1984 : How to improve estimates of imprecision.
Krouwer J.S., Rabinowitz R. - Clin. Chem – 1984 ; 30/2:290-292
- *Leng et Al.*, 2014 : Urinary metabolite excretion after oral dosage of bis(2-propylheptyl) phthalate (DHPH) to five male volunteers- characterization of suitable biomarkers for human biomonitoring.
Leng G., Koch H.M., Gries W., Schütze A., Langsch A., Brüning T., Otter R. - Toxicol Lett – 2014 ; 231(2):282-8
- *Liao et Kannan*, 2012 : Determination of Free and Conjugated Forms of Bisphenol A in Human Urine and Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.
Liao C., Kannan K. - Environ. Sci. Technol – 2012 ; 46(9):5003–5009
- *Loichot et Grima*, 2004 : Métabolisme des médicaments
Loichot C., Grima M. - Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Générale DCEM1 – 2004
- *Mao et Al.*, 2004 : Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride.
Mao L., Sun C., Zhang H., Li Y., Wu D. – Analytica Chimica Acta – 2004 ; 241:246
- *Meeker et Al.*, 2013 : Distribution, variability, and predictors of urinary concentrations of phenols and parabens among pregnant women in Puerto Rico.
Meeker J.D., Cantonwine D.E., Rivera-González L.O., Ferguson K.K., Mukherjee B., Calafat A.M., Ye X., Anzalota Del Toro L.V., Crespo-Hernández N., Jiménez-Vélez B., Alshawabkeh A.N., Cordero J.F. - Environ Sci Technol – 2013 ; 47(7):3439-47
- OMS, 2002 :
<https://www.anses.fr/fr/content/perturbateurs-endocriniens-1> (Version du 22/05/2014, consulté le 02/06/2016)
- *Ouchi et Watanabe*, 2002 : Measurement of bisphenol A in human urine using liquid chromatography with multi-channel coulometric electrochemical detection.
Ouchi K., Watanabe S. - J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci – 2002 ; 780(2):365-70
- *Peters et Al.*, 2007 : Validation of new methods.
Peters F.T., Drummer O., Mushoff F. - Forensic sci. int – 2007 ; 165:216-224
- *Pinta et Riandey*, 1968 : Les effets de matrice sur le dosage des traces par absorption atomique.
Pinta M., Riandey C. – Editions du Centre National de la Recherche Scientifique - 1968

- *Quiros-Alcala et Al.*, 2013 : Determinants of urinary bisphenol A concentrations in Mexican/Mexican—American pregnant women. Quirós-Alcalá L., Eskenazi B., Bradman A., Ye X., Calafat A.M., Harley K. - *Environ Int* - 2013;59:152-60
- *Rao et Flynn*, 1990 : A quantitative assay for beta-D-glucuronidase (GUS) using microtiter plates. Rao A.G., Flynn P. – *Biotechniques* – 1990 ; 8(1):38-40.
- *Riu et Al.*, 2010 : In Vitro Biotransformations of Chlorinated Bisphenol A by Human and Rat Sub-Cellular Liver Fractions. Riu A., Perdu E., Jamin E., Ty V., Bruel S., Hillenweck A., Zalko D. - *Drug Metab. Rev.* 42 – 2010
- *Schoringhumer et Cichna-Markl*, 2007 : Sample clean-up with sol–gel enzyme and immunoaffinity columns for the determination of bisphenol A in human urine. Schoringhumer K., Cichna-Markl M. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* – 2007 ; 850(1-2):361-9
- *Shirai et Al.*, 2013 : Urinary excretion of parabens in pregnant Japanese women Shirai S., Suzuki Y., Yoshinaga J., Shiraishi H., Mizumoto Y. - *Reprod Toxicol* – 2013 ; 35:96-101
- *Sigma-Aldrich 4MU* : <http://www.sigmaaldrich.com/> (CAS : 90-33-5) (Version 03/07/2013, consulté le 02/06/2016)
- *Sigma-Aldrich β -glucuronidase d'Helix Pomatia* : <http://www.sigmaaldrich.com/> (CAS : 9001-45-0) (Version 08/04/2014, consulté le 02/06/2016)
- *Smith et Al.*, 2012 : Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women, including before and during pregnancy. Smith K.W., Braun J.M., Williams P.L., Ehrlich S., Correia K.F., Calafat A.M., Ye X., Ford J., Keller M., Meeker J.D., Hauser R. - *Environ Health Perspect* – 2012 ; 120(11):1538-43
- *Sperker et Al.*, 1996 : High-performance liquid chromatographic quantification of 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide as a probe for human beta-glucuronidase activity in tissue homogenates. Sperker B., Schick M., Kroemer H.K. – *J Chromatogr B Biomed Appl* – 1996 ; 11;685(1):181-4

- Szasz, 1967 : Comparison between p-nitrophenyl glucuronide and phenolphthalein glucuronide as substrates in the assay of beta-glucuronidase.
Szasz G. – Clin. Chem. – 1967 ; 13(9):752-9.
- *Takemura et Al., 2005* : In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A.
Takemura H, Ma J, Sayama K, Terao Y, Zhu BT, Shinoi K. – Toxicology – 2005 ; 207:215-21.
- *Tsukioka et Al., 2003* : Determination of trace amounts of bisphenol A in urine by negative-ion chemical-ionization-gas chromatography/mass spectrometry.
Tsukioka T., Brock J., Graiser S., Nguyen J., Nakazawa H., Makino T. - Anal Sci – 2003 ; 19(1):151-3
- *Vela-Soria et Al., 2014* : UHPLC-MS/MS Method for the Determination of Bisphenol A and Its Chlorinated Derivates, Bisphenol S, Parabens, and Benzophenones in Human Urine Samples.
Vela-Soria F., Ballesteros O., Zafra-Gomez A., Ballesteros L., Navalon A. - Anal Bioanal Chem – 2014 ; 406:3773-3785
- *Vela-Soria et Al., 2014 bis* : A multiclass method for the analysis of endocrine disrupting chemicals in human urine samples. Sample treatment by dispersive liquid–liquid microextraction.
Vela-Soria F., Ballesteros O., Zafra-Gómez A., Ballesteros L., Navalón A. - Talanta – 2014 ; 129:209-18
- *Wolff et Al., 2010* : Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls.
Wolff M.S., Teitelbaum S.L., Pinney S.M., Windham G., Liao L., Biro F., Kushi L.H., Erdmann C., Hiatt R.A., Rybak M.E., Calafat A.M. - Environ Health Perspect – 2010 ; 118(7):1039-46
- *Wu et Al., 1998* : Sensitive method for the quantification of beta-glucuronidase activity in human urine using capillary electrophoresis with fluorescence detection.
Wu X., Loganathan D., Linhardt R.J. – J Chromatogr B Biomed Sci Appl – 1998 ; 24;708(1-2):61-6
- *Zhou et Al., 2012* : Automated on-line column-switching HPLC–MS/MS method for the quantification of triclocarban (TCC) and its oxidative metabolites in human urine and serum.
Zhou X., Ye X., Calafat A.M. - J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci - 2012 ; 881-882:27-33

- *Zimmerman et Al.*, 1991 : High-performance liquid chromatographic method for the direct determination of 4-methylumbelliferone and its glucuronide and sulfate conjugates. Application to studies in the single-pass in situ perfused rat intestine-liver preparation.
Zimmerman C.L., Ratna S., Leboeuf E., Panq K.S. – J Chromatogr – 1991 ; 18;563(1):83-94

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Dans l'urine et le plasma, les micropolluants peuvent apparaître sous deux formes, la forme conjuguée et la forme non conjuguée, à cause du métabolisme hépatique. Dans les études de biomonitoring, afin de déterminer l'ensemble des micropolluants, c'est-à-dire conjugués et non conjugués, une étape d'hydrolyse enzymatique est requise. Notre choix d'enzyme s'est porté sur une enzyme avec une activité glucuronidase mais aussi sulfatase. Pour vérifier cette déconjugaison par l'enzyme, la 4-méthyl-umbelliférolone (4MU), ainsi que la 4-méthyl-umbelliférolone-glucuronide (4MUG) et la 4-méthyl-umbelliférolone-sulfate (4MUS) ont été proposés comme marqueurs. Dans la littérature, seule une étude de Zimmerman et Al. explique le développement et la validation d'une méthode d'analyse du 4MU, 4MUG, 4MUS afin de mesurer la concentration de 4MU formée, et la diminution des concentrations de 4MUG et 4MUS. Cependant cette dernière utilise une chromatographie liquide couplée à un détecteur ultra-violet (LC-UV), qui est aujourd'hui de moins en moins utilisée dans les laboratoires, au profit des chaînes de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS). L'objectif de cette étude était de développer et valider une méthode de dosage par LC-MS/MS de ces marqueurs dans l'urine et le plasma. Dans notre méthode, nous avons désactivé l'enzyme par la chaleur, puis celle-ci a été ajoutée au plasma ou à l'urine, avec des concentrations connues de 4MU, 4MUG, 4MUS et de l'umbelliférolone utilisé comme étalon interne. Pour le plasma, les concentrations finales de nos points de gamme dans les tubes vont de 0,52 à 8,33 nmol/mL de 4MUG et de 4MUS, et de 1,04 à 16,67 nmol/mL de 4MU. Tandis que dans l'urine, les concentrations vont de 0,625 à 10 nmol/mL de 4MUG et de 4MUS, et de 1,25 à 20 nmol/mL pour la 4MU. Les concentrations de nos marqueurs ont été déterminées par LC (Shimadzu) couplée à un spectromètre de masse à triple quadripôle (3200 QTRAP Applied Biosystems). La justesse et la précision ont été déterminées par des contrôles qualités à 3 concentrations différentes. Les conditions chromatographiques permettent la séparation de nos 4 composés (4MU, 4MUG, 4MUS et umbelliférolone). La linéarité de la méthode a été démontrée avec des $r^2 > 0,995$ dans le plasma et dans l'urine. La méthode est juste (biais < 16% pour le point le plus bas) et précise (CV < 9%) dans les deux matrices.

En conclusion, les formes conjuguées et non conjuguées des micropolluants possèdent des propriétés et caractéristiques chimiques différentes, c'est pour cela qu'il est important d'identifier les deux formes séparément. La méthode analytique développée dans cette étude est utilisable pour permettre la déconjugaison des micropolluants en utilisant 4MU, 4MUG et 4MUS comme marqueur de déconjugaison.

Mots-Clés : Perturbateurs endocriniens – Bisphénol A - 4-Méthyl-Umbelliférolone – 4-Méthyl-Umbelliférolone-Glucuronide – 4-Méthyl-Umbelliférolone-Sulfate – Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse.