

Développement de méthodes pour l'analyse des métabolites de HAP et de phtalates dans les tissus de poissons

Marie-Jeanne Teil, Martine Blanchard, Elodie Moreau-Guigon, Anne-Sophie Valton, Natacha Marchis, Fabrice Alliot, Marc Chevreuil.

Laboratoire Hydrologie et Environnement, Ecole Pratique des Hautes Etudes-UMR 7619 Sisyphe, Université Paris VI, Tour 56-46, case courrier 105, 4 place Jussieu 75252 Paris Cedex 05.
Correspondant : marie-jeanne.teil@upmc.fr

1. Introduction

La mesure des contaminants dans les tissus des organismes vivants est utilisée classiquement pour évaluer leur imprégnation chimique. A l'heure actuelle, l'étude des produits de dégradation dans différents organes cibles se développe. Utilisée conjointement aux niveaux de présence, elle permet d'affiner l'estimation de l'impact de la contamination sur la physiologie des organismes qui n'est pas nécessairement traduit par la bioaccumulation (Blount et al., 2000a).

Nous avons focalisé notre étude sur deux classes de contaminants, les phtalates et les HAP, connus pour leurs effets toxiques (perturbateurs endocriniens ou cancérigènes), leur caractère lipophile et leur présence dans les eaux de surface ainsi que sur 3 espèces piscicoles ubiquistes (Gardon, Perche et Chevesne).

2. Métabolites des phtalates

2.1. Objectifs scientifiques

Les phtalates sont des molécules organiques synthétisées pour leurs propriétés plastifiantes et utilisées dans de nombreux produits de consommation courante (cosmétiques, jouets, équipements médicaux). Ce sont des additifs non liés chimiquement aux polymères et qui peuvent de ce fait, être facilement libérés dans l'environnement. Les phtalates se trouvent ainsi présents dans tous les compartiments de l'environnement (air, eau, sol) (Blanchard et al., 2003 ; Labadie et al., 2009 ; Teil et al., 2012) et les organismes vivants y sont exposés de façon chronique essentiellement par la voie digestive et secondairement par la voie respiratoire, la voie transcutanée étant a priori, moins importante (Kock et al., 2003).

Depuis la fin du 20^{ème} siècle, les phtalates ont attiré l'attention des scientifiques car ils sont soupçonnés d'exercer sur les êtres vivants des effets toxiques, notamment des perturbations endocriniennes.

Certains sont particulièrement préoccupants pour les écosystèmes et la santé humaine, tels que le di-(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP), le di-butylphtalate (DnBP) et le butylbenzylphtalate (BBP), impliqués au niveau de l'action des stéroïdes sexuels (Moore et al., 2002 ; Saillenfait et Laudet-Hesbert, 2005). Sultan et al. (2001) a proposé un mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens sur les cellules cibles, à 4 niveaux subcellulaires possibles : liaison du polluant au récepteur cytosolique spécifique à l'hormone de départ (compétition entre le xénobiotique et l'hormone naturelle), changement de conformation du complexe polluant-récepteur, au niveau du transfert vers le noyau de la cellule et enfin induction de l'activité transcriptionnelle. Un autre mécanisme de perturbation endocrinienne oestrogénique a été décrit pour le DEHP par Akingbemi et al. (2003), chez les Rongeurs, par induction de l'activité de l'aromatase, qui correspond à la dernière étape de la synthèse des oestrogènes.

Erkekoglu et al. (2010) ont rapporté que la toxicité du MEHP était supérieure à celle du DEHP pour des effets anti-androgènes chez l'Homme.

Or, si les Mammifères ont été à cet égard assez bien étudiés notamment par des études expérimentales chez les Rongeurs (Kessler et al., 2004) et des études épidémiologiques chez l'Homme (Mortensen et al., 2005), la contamination des organismes piscicoles exposés aux phtalates par l'eau des rivières est à ce jour, peu documentée.

Les phtalates sont biodégradables chez les Eucaryotes où ils sont majoritairement métabolisés, leur élimination directe restant très limitée. La première étape est l'hydrolyse conduisant à un monoester et un alcool libre. La suite des biotransformations a lieu essentiellement dans le tissu hépatique et consiste en une oxydation à différents niveaux de la chaîne carbonée (phase I) afin de détruire les propriétés toxiques des molécules. Cette première phase est suivie par la phase II de conjugaison, notamment avec l'acide glucuronique, qui représente la phase ultime de la biodégradation (Barron et al., 1995). Cette conjugaison rend la molécule plus polaire donc plus soluble ce qui facilite son élimination par voie biliaire et par voie urinaire (Figure 1).

Par ailleurs, même si le métabolisme des organismes est capable de dégrader et éliminer ces molécules xénobiotiques, les réactions d'oxydoréduction de la phase I peuvent parfois engendrer des radicaux libres (anion superoxyde O_2^- et radical hydroxyle OH.), dangereux pour l'organisme car capables d'attaquer notamment les constituants membranaires.

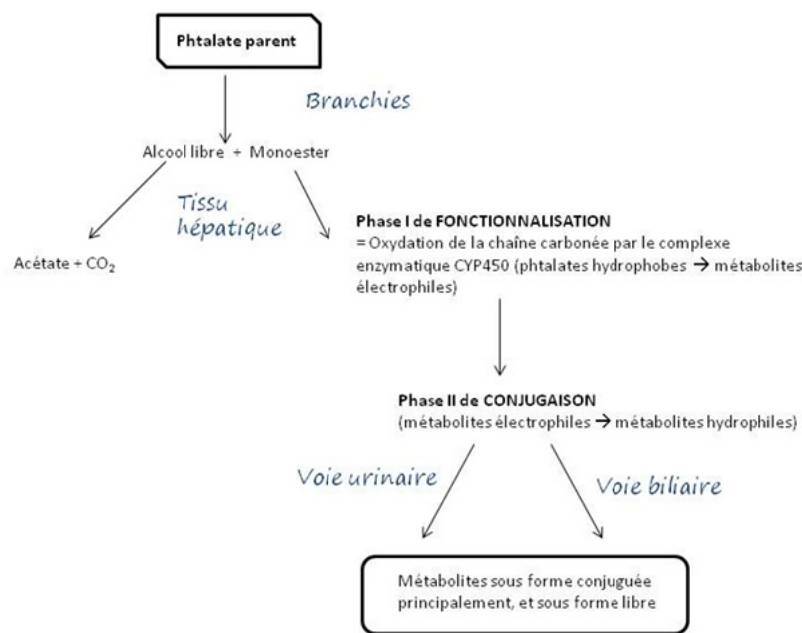


Figure 1. Schéma des biotransformations hépatiques des phtalates par les espèces piscicoles

Cette étude a concerné la mise au point d'une méthode d'extraction puis d'analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem des métabolites de phtalates. L'étude des métabolites, présente l'intérêt de mieux rendre compte de la contamination chez des individus car ils reflètent le niveau d'assimilation des polluants au sein même des organismes et, la capacité de biodégradation. La recherche des métabolites dans les poissons permet ainsi une estimation de l'exposition aux xénobiotiques et de leur impact réel, de façon plus précise que celles apportées par les niveaux d'accumulation des molécules parentes. De plus, les analyses étant faites sur des échantillons prélevés in situ, la caractérisation des métabolites de phtalates présente l'avantage de correspondre aux conditions environnementales naturelles.

La méthodologie développée chez les rongeurs (Silva et al, 2007), a été appliquée à différents tissus de poissons afin d'évaluer le niveau de présence des phtalates et de leurs métabolites. Un poisson cyprinidé, le gardon (*Rutilus rutilus*) abondant et ubiquiste a été choisi comme matériel d'étude. Les résultats seront discutés en fonction des tissus considérés et de leur teneur en composés parents.

2.2. Méthodologie

2.2.1 Choix des matrices (espèces piscicoles et tissus analysés) et des métabolites analysés

Trois campagnes de pêche scientifique par courant électrique ont été menées en juillet et octobre 2009 ainsi qu'en avril 2010 à l'exutoire de l'Orge à Viry-Châtillon. Des échantillons de plasma

sanguin, de bile, de foie et de muscle ont été prélevés lors des trois campagnes de pêche (Tableau 1).

Tableau 1: Echantillonnage des organes des gardons prélevés

Campagnes de pêche	08/04/10	21/10/09	09/07/09
Viry-Châtillon	plasma	bile	foie
1		X	X
3		X	
4		X	
5		X	
7			X
Gardon			
8	X		
9	X		X
10	X	X	X
11	X	X	
12			X
Total Echant.	poils divisés en triplicates	1	4

Des analyses de phtalates parents ont été réalisées dans le foie et le muscle des mêmes gardons.

Les tissus étudiés ont été choisis pour représenter les étapes du devenir des phtalates, le foie intervenant entre les apports par voie digestive et le passage dans la circulation générale, la bile étant une des deux voies d'excrétion et le plasma représentant la contamination systémique puisqu'il irrigue tous les tissus de l'organisme.

Le foie assure un certain nombre de fonctions métaboliques, indispensables au maintien de l'intégrité de l'organisme:

- Il a pour rôle principal de détoxifier ce que l'organisme a ingéré, par le biais d'un système circulatoire qui lui est propre (système porte hépatique). La composition du sang évolue au cours de son parcours à travers le foie, modifiée par l'action des cellules hépatiques. Le foie va en effet épurer le sang d'une certaine quantité de substances (déchets azotés issus du catabolisme des acides aminés, médicaments, micropolluants...) toxiques pour l'organisme.
- C'est aussi un organe de stockage et de régulation. Il prélève et relargue vers le sang des sucres (glucose/glycogène) afin de maintenir la glycémie à une concentration constante.
- Enfin, il possède une fonction d'excrétion. Les cellules hépatiques sécrètent la bile, qui a un rôle émulsifiant des lipides, et qui de plus, exporte une certaine proportion de contaminants conjugués.

Selon les taxons, la structure anatomique du foie est variable, celui-ci est bien développé chez les poissons et constitue ainsi une matrice intéressante pour les études comparatives.

D'autre part, le plasma sanguin est la composante liquide qui transporte les éléments figurés du sang et son étude permet de rendre compte du niveau d'imprégnation de l'organisme par les contaminants.

C'est donc dans ces matrices que 9 métabolites seront recherchés :

- 7 monoesters issus de l'hydrolyse, le MMP (monométhylphtalate), le MEP (monoéthylphtalate), le MiBP (mono-iso-butylphtalate), le MnBP (mono-n-butylphtalate), le MBzP (monobenzylphtalate), le MnOP (mono-n-octylphtalate), le MEHP (mono (2-éthylhexyl) phtalate),
- et 2 métabolites oxygénés issus de la phase I de la biotransformation du DEHP, le MEOHP (mono (2-éthyl-5-oxohexyl) phtalate), le MEHHP (mono (2-éthyl-5-hydroxyhexyl) phtalate).

2.2.2 Technique d'analyse par HPLC-MS/MS

Tous les échantillons ont été analysés par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC), couplée à la spectrométrie de masse en tandem triple quadripôle (MS/MS). L'ionisation par électrospray en mode négatif a conduit à la formation d'ions moléculaires $[M-H]^-$ correspondant à la déprotonation des monoesters.

Quatre standards internes : la 4-méthyl umbelliférone- $^{13}C_{12}$ (4-MU- $^{13}C_{12}$), le MnBP- $^{13}C_{12}$, le MEHP- $^{13}C_{12}$, et le MiNP- $^{13}C_{12}$ ont été ajoutés sous forme d'un mélange à raison de 250 ng chacun, après déconjugaison de l'échantillon par la β -glucuronidase (Figure 2).

2.2.3 Mise au point des méthodes

Le développement de la méthodologie d'extraction a été effectué sur l'ensemble des métabolites fournis par le laboratoire Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (U.K.). Plusieurs mises au point ont été réalisées à différents étapes avec du plasma et la bile bovine lyophilisés (Sigma-Aldrich) en adaptant les méthodes décrites par Blount et al., 2000b ; Frederiksen et al., 2010 ; Mortensen et al., 2005 et Silva et al., 2004.

Déconjugaison des composés glucuro-conjugués

Blount et al. (2000) ont montré que l'enzyme β -glucuronidase d'*Escherichia Coli* (Roche Biomedical) avait une activité glucuronidase satisfaisante et qu'elle était la mieux adaptée car exempte d'activité estérase pouvant générer des monoesters de phtalates en plus de ceux présents dans les échantillons. Ils ont également montré que les monoesters glucuro-conjugués étaient les métabolites de phtalates les plus abondants, d'où notre objectif de les rechercher.

Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des composés phtaliques glucuro-conjugués (Figure 2). De ce fait, nous ne prendrons pas en compte les sulfo-conjugués

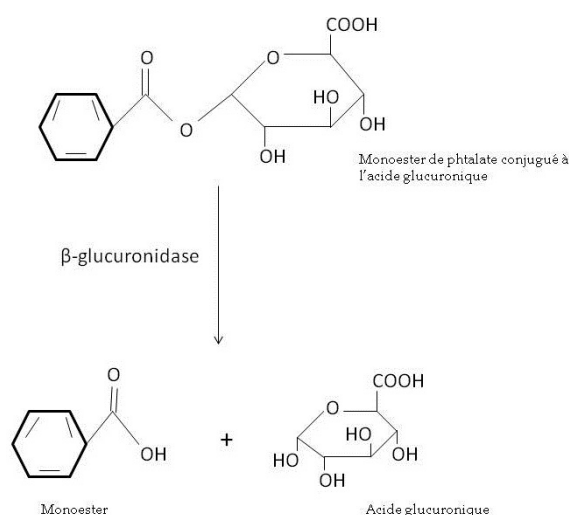


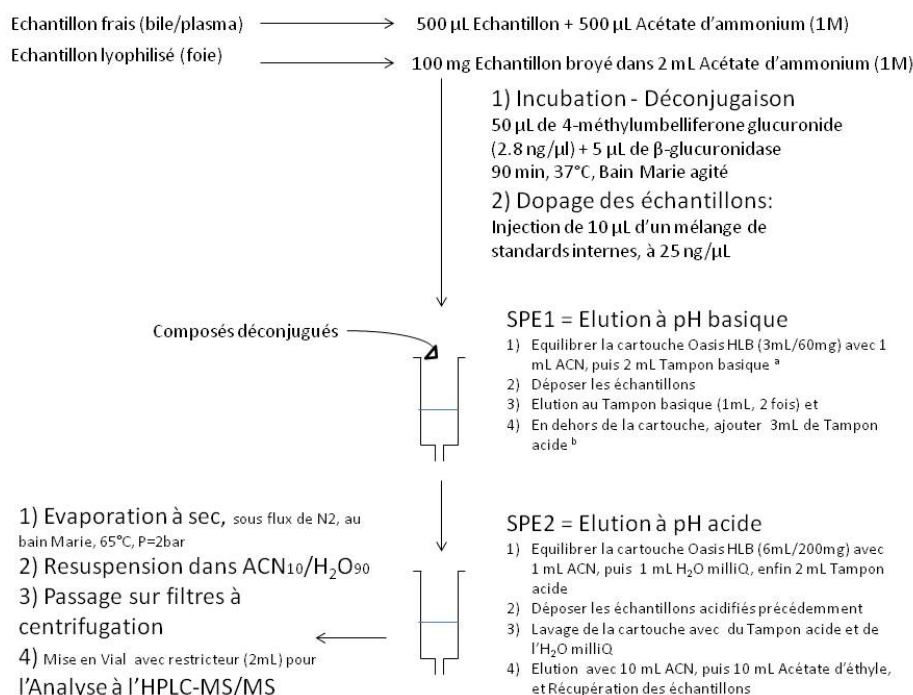
Figure 2. Réaction de déconjugaison d'un métabolite sous forme glucuroconjuguée (formule générale)

Le composé glucuro-conjugué de la 4-methylumbellifénone, le 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide, a été utilisé à raison de 140 mg, afin de contrôler l'activité de l'enzyme β -glucuronidase pour chaque incubation.

Méthode d'extraction

La mise au point de l'étape d'extraction des métabolites a été réalisée sur de la bile et du plasma de bœuf ainsi que sur du foie de chevesne, en dopant les échantillons avec un mélange des 10 molécules natives, à raison de 200 ng chacune (Figure 3).

La quantité optimale de matrice, à partir de tissu lyophilisé, a été de 100 mg broyé à l'Ultra-Turrax dans 2 mL d'acétate d'ammonium (1 M).



a : Tampon basique (pour 100 mL) : 0.5 mL de NH₄OH + 50 mL ACN + 50 mL H₂O milliQ

b : Tampon acide (pour 200 mL, pH₂) : 0.14 M, soit 3.86 g pesé de Na₂HPO₄ + 2 mL H₃PO₄ à 85% + 198 mL H₂O milliQ

Figure 3. Protocole d'extraction des métabolites avant analyse à l'HPLC

Méthode d'analyse

Les ions produits pour chaque monoesteret les énergies de fragmentation et de collision les plus efficaces pour chaque composé ont été déterminées avec le logiciel Optimizer de MassHunter (Agilent®) (Tableau 2).

Tableau 2 Résultat de l'analyse à l'HPLC-MS/MS Optimizer, mode électrospray négatif

Composé	Poids moléculaire	Ion précurseur	Ion produit	Energie de fragmentation (V)	Energie de collision (V)	Temps de rétention (min)
MiNP-C13	296	295	250	80	8	24
MEHHP	294	293	145	110	16	19.8
MEHHP			121	110	16	
MEOHP	292	291	143	110	8	19.9
MEOHP			121	110	12	
MEHP-C13	282	281	137	80	8	23.8
MEHP	278	277	134	50	25	23.9
MnOP	278	277	125	110	12	24.1
MBzP	256	255	77	80	16	20.4
MnBP-C13	226	225	79	80	12	19.9
MnBP	222	221	77	80	8	19.9
MiBP	222	221	77	110	16	19.7
MEP	194	193	77	110	20	11.4
4-MU-C13	180	179	152	80	24	9.1
			136	80	20	
			125	80	20	
MMP	180	179	77	80	16	7.9
4-MU	176.2	175.2	147	110	20	9.1
			133.1	110	20	
			119.1	110	24	

Un gradient de phase mobile selon le protocole de Silva et al. (2004) a été appliqué (Tableau 3).

Tableau 3 Gradient de la phase mobile

Temps (min)	0	1	14	21	22	23	30
% A	5	15	25	35	100	5	5
% B	95	85	75	35	0	95	95

Phase mobile A : acétonitrile + 0.1% acide formique

Phase mobile B : H₂O + 0.1% acide formique + 5% MeOH ; Débit= 0.3 ml/min ; Volume injecté= 10 µl ; T=40°C ; P= 220 bar.

Deux colonnes ont été testées : la colonne Zorbax Eclipse XB-C18, 4.6x50 mm, 1.8 µm de Agilent et la colonne Silice Upti-prepStrategy 100A, C18-2, 2x100 mm, 2.2 µm de Interchim, qui a été retenue pour ses propriétés plus polaires.

2.2.4 Expression des résultats

Les teneurs en phtalates et en métabolites ont été exprimés dans le foie et le muscle en ng/g de poids sec et leurs concentrations plasmatiques et biliaires en ng /mL. Les corrélations ont été recherchées par le coefficient r de Spearman, lu dans la table de Fisher et Yates.

2.3. Résultats

2.3.1 Rendements d'extraction, Limites de quantification

Des rendements d'extraction, en duplicates pour toutes les matrices, ont été déterminés au cours de la validation de la méthode (Tableau 4)

Tableau 4 Rendements moyens d'extraction des métabolites et de l'umbelliférone)

Rendements (%)	4MU	MMP	MEP	MEHHP	MEOHP	MiBP	MnBP	MBzP	MEHP	MnOP
Plasma	56.5	12	30.9	51	60	61.3	59.6	39.8	36.2	40.4
Plasma + 1ml ACN	61.2	22.3	40.8	159.1	92.9	62.2	60.5	29.9	33.8	30.7
Foie	40.1	5.3	12.2	55.9	64.5	65.8	63.9	38.4	10.5	2.3
Foie + 1ml ACN	66.4	5.4	5.9	29.9	41	18	17.5	24.1	40	62.2
Bile	67.3	51.9	187			64.6	62.7	14.2	42.3	81.7
Bile + 1ml ACN	58	50.8	123			65.7	63.9	90	32.6	65.6

Deux méthodes : l'une, appliquée uniquement aux 3 matrices, plasma, foie et bile et l'autre, appliquée à ces mêmes matrices supplémentées avec 1ml d'ACN n'ont pas montré de différence significative pour le plasma et la bile, la 2^{ème} méthode avec l'ajout d'ACN a donc été abandonnée.

Les valeurs de LQ montrent que le bruit de fond est élevé pour la bile (Tableau 5). La LQ a été calculée à partir de la teneur moyenne en ng pour chaque métabolite rapportée à 5 fois le bruit de fond.

Elle varie selon la nature de l'échantillon et montre une influence importante de la matrice sur le bruit de fond.

Tableau 5 : Valeurs moyennes des limites de quantification de la méthode pour chaque composé

LQ moyenne	MU	MMP	MEP	MEHHP	MEOHP	MiBP	MnBP	MBzP	MEHP	MnOP
pg/mL plasma	1.2	0.9	0.8	1.9	1.5	1.6	1.6	0.4	1.6	2.8
bile	1.1	12.4	243.7	5.9	5.6	22.3	21.7	5.2	7.3	4.9
ng/g PS foie	4.8	1.6	2.6	14	3.6	6.3	6.1	1.7	13	24.5

2.3.2 Contamination des tissus du Gardon

Les résultats de l'analyse des métabolites de phtalates chez le Gardon sont présentés dans le Tableau 6 et la Figure 4. A l'issue de l'analyse, il apparaît que tous les métabolites des diesters sont caractérisés, ce qui traduit la contamination des gardons de l'Orge par les différents diesters de phtalates.

Quel que soit le tissu considéré, le MiBP est le métabolite majoritaire, suivi par le MnBP. Ensuite le 3^{ème} métabolite varie selon les tissus : MEHHP dans le plasma, MEP dans la bile et MEHP dans le foie. Dans l'ensemble, des concentrations plus élevées dans le plasma que dans la bile, reflètent la contamination systémique du Gardon.

L'étude des métabolites des phtalates chez les organismes piscicoles est assez peu développée à ce jour, contrairement aux études des métabolites chez les Mammifères et l'Homme. Cependant, une étude de Barronet *al.* (1995) du métabolisme hépatique du DEHP chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), a démontré la prépondérance du MEHP et de son glucuroconjugué (41.6 % des métabolites du DEHP), ce qui est en accord avec nos données.

Nos résultats pour le plasma du Gardon ont été comparés à ceux d'une étude du sérum humain (Frederiksen *et al.*, 2010). Le profil des métabolites était différent : le MEHP était prépondérant (6.74 ng/ml), suivi du MEP (4.15 ng/ml), du MiBP (0.72 ng/ml), et du MnBP (0.43 ng/ml). La différence des niveaux de présence des métabolites de phtalates entre l'Homme et le Gardon semble refléter un niveau d'exposition beaucoup plus élevé pour le poisson (d'un facteur 20). Une seconde hypothèse est que les activités métaboliques de détoxification sont plus importantes chez l'Homme (Staples *et al.*, 1997).

Tableau 6 Concentrations des métabolites (moyennes ± écart-type) des tissus analysés

		MMP	MEP	MEHHP	MiBP	MnBP	MEOHP	MBzP	MEHP	MnOP
plasma ng/mL	moyenne	0.836	28.6	214	308	287	24.5	17.1	122	
	écart-type	0.49	4.95	88.6	61.9	57.6	9.61	0.136	7.69	
bile ng/mL	moyenne	3.52	53		123	114		0.807	15.5	
	écart-type		15.3		12.4	11.6		0.0945		
foie ng/g PS	moyenne	18.9	263	146	1607	1496	5.75	19.7	1315	17.7
	écart-type	4.99	154	138	2709	2522	3.94	4.91	2411	39.4

Parmi les métabolites analysés, trois sont issus de la dégradation du DEHP : le MEHP, le MEHHP, et le MEOHP. Le MEHP est le principal métabolite dans la bile et le foie tandis que, dans le plasma sanguin, le MEHHP est prépondérant.

Il est observé une grande variabilité des métabolites oxydés de phtalates suivant les espèces considérées qui augmente en fonction de leur niveau dans l'échelle zoologique (poissons < rongeurs < primates) (Staples *et al.*, 1997).

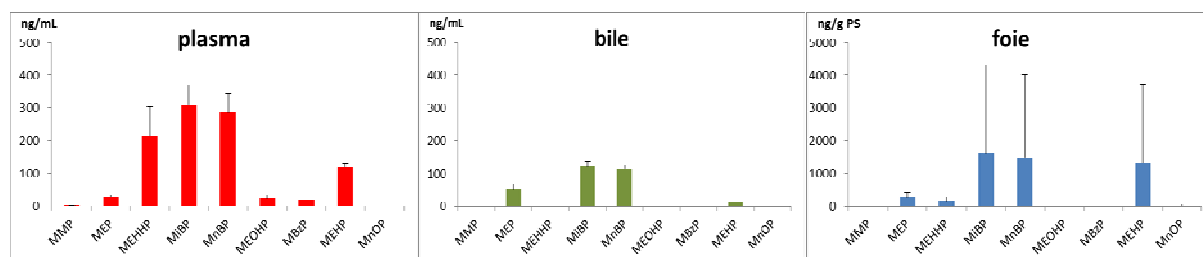


Figure 4 : Concentration des métabolites dans les 3 matrices (plasma, bile, foie)

2.3.3 Relations entre phtalates parents et leurs métabolites

Une comparaison entre les phtalates parents et leurs métabolites respectifs a été réalisée afin de rendre compte du degré d'exposition des gardons. Les résultats sont présentés dans le Tableau 7 et dans la Figure 5.

On observe une prépondérance du DiBP dans le foie et le muscle et de son métabolite dans le foie. Le DEHP ainsi que le DnBP et leurs monoesters sont également présents à des teneurs élevées dans le foie.

Le muscle, qui n'est pas un organe de stockage ni de biotransformation, présente des teneurs beaucoup plus basses. Cependant, l'étude du muscle permet d'estimer le risque lié à la consommation

de la chair de poisson. D'un point de vue législatif, la dose journalière admissible du DEHP selon l'EFSA (Europe), est de 50 µg/kg de poids corporel.

Tableau 7: Teneurs moyennes et écart-types en ng/g de PS des métabolites de phtalates dans le foie, ainsi que leurs diesters correspondants dans le foie et muscle de Gardon

ng/g PS	MMP	MEP	MiBP	MnBP	MBzP	MEHP	MnOP	
moyenne	18.9	263	1907	1496	19.7	1315	17.7	
écart-type	4.99	154	2709	2522	4.91	2411	39.4	
foie	DMP	DEP	DiBP	DnBP	BBP	DEHP	DnOP	
moyenne	386	2001	2126	1204	1082	2876	653	
écart-type	667	2440	4099	2146	1267	3361	1285	
muscle	moyenne	21.7	256	1456	451	155	523	245
écart-type	43.4	486	374	275	20	309	239	

Le DiBP est retrouvé dans le foie et le muscle à raison de 1500-2000 ng/g environ, alors que le DEHP est 6 fois moins concentré dans le muscle que dans le foie. Le DiBP est le phtalate prépondérant dans le muscle (Figure 5).

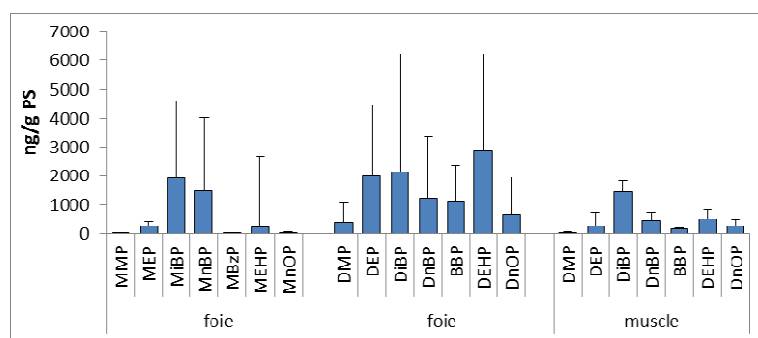


Figure 5 : Comparaison des teneurs moyennes dans le foie et le muscle de gardons en ng/g PS

Nous avons déterminé un facteur 2 entre les teneurs du DEHP et MEHP dans le foie du Gardon. A titre de comparaison, chez les Mammifères, Inoue *et al.* (2005) ont montré qu'il y avait un facteur 10 entre les concentrations de DEHP et celles du MEHP, dans le plasma humain.

Kessler *et al.* (2004) ont suivi la dégradation du DEHP chez le Rat, à 3 doses différentes *per os*. Le MEHP a été retrouvé dans le sang à raison de 2.8 µg/ml pour une dose de DEHP administrée de 30 mg/kg. De plus, Silva *et al.* (2007) ont administré du DnBP *per os* chez le Rat. Le MnBP est apparu comme le métabolite le plus abondant dans le sérum, à une concentration de 40 µg/ml pour une dose administrée de 100 mg/kg/j.

Nous observons que le MEHP est le métabolite le plus abondant dans le foie du gardon, suivi du MEHHP, puis du MEOHP (Tableau 8).

Tableau 8: Teneurs en DEHP et métabolites (ng/g de PS) dans le foie

DEHP	MEHP	MEHHP	MEOHP
266	208	128	6.1
8606	327	145	11.1
2704	274	373	5.9
635	140	8	5.6

Nous avons recherché une relation entre le DEHP et ses métabolites dans le foie (Figure 6). Seule la teneur en MEOHP a été significativement corrélée à celle du DEHP ($p < 0.05$). La même tendance a été rapportée par Frederiksen *et al.* (2010) que les métabolites oxydés reflétaient mieux la contamination par les phtalates parents que les monoesters. De plus, Kato *et al.* (2004) indiquent que les concentrations de monoesters dans le plasma étant facilement issus de l'hydrolyse des phtalates

parents sont un marqueur de la contamination moins fiable que les concentrations des métabolites oxydés.

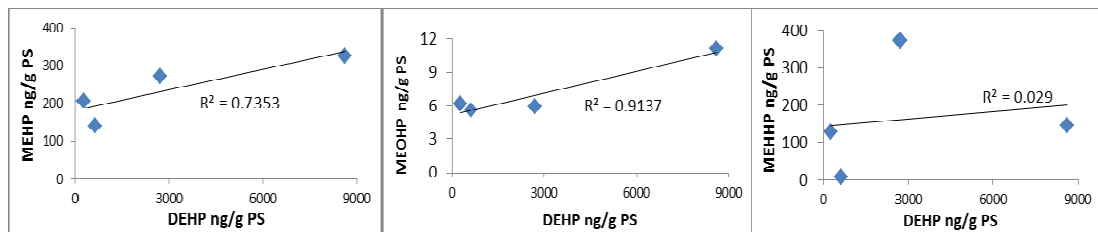


Figure 6 : Relations entre le DEHP et ses métabolites dans le foie de Gardon (ng/g de PS)

3. Métabolites des HAP

3.1. Objectifs scientifiques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) appartiennent à la famille des hydrocarbures benzéniques. Les composés de 2 à 7 cycles sont ceux retrouvés le plus abondamment dans l'environnement (Mazeas, 2004). Leur origine est en très grande majorité pyrolytique résultant de la combustion incomplète de la matière organique et ils sont présents dans les gaz d'échappement des véhicules, les gaz de combustion des foyers domestiques, les centrales thermiques et également la fumée de tabac ou les grillades alimentaires. Ces composés ont également une origine pétrogénique fossile (pétrole, charbon et produits qui en sont issus comme les huiles minérales, les bitumes, le goudron ou la suie). Enfin, on leur connaît une origine diagénétique lors de la maturation de la matière organique sous le gradient géothermique dans le milieu sédimentaire profond (Biefert & Perraud, 2001). Donc, l'essentiel des HAP présents dans notre environnement a une origine anthropique.

Ces composés neutres et apolaires possèdent une faible tension de vapeur (Biefert & Perraud, 2001). Leurs propriétés dépendent du nombre de cycles et les molécules les plus lourdes sont les moins volatiles, moins solubles et les plus lipophiles. Largement introduits dans l'environnement, ils possèdent un caractère ubiquiste du fait de leur rémanence et de leur stabilité. De par leurs propriétés hydrophobes, ils s'accumulent dans les sols et dans les sédiments des cours d'eau ainsi que dans le biote et à travers la chaîne trophique.

Les organismes aquatiques sont exposés aux HAP par le biais de la respiration et de la consommation d'aliments contaminés. L'intérêt de quantifier la contamination des poissons repose sur le principe de biodisponibilité ce concept général intégrant tous les phénomènes mis en jeu depuis la pénétration d'un composé indésirable dans un organisme vivant jusqu'à son métabolisme puis son élimination ou son stockage (Melquiot & Bertolini, 2003).

Cette biodisponibilité peut être évaluée par la quantification directe des composés dans les tissus lorsqu'ils sont bioaccumulables, la bioaccumulation désignant la capacité des organismes vivants à absorber et concentrer certaines substances chimiques dans tout ou partie de leur organisme (Melquiot & Bertolini, 2003). Cependant, contrairement aux invertébrés chez qui on observe chez ces derniers une forte bioaccumulation, les vertébrés sont en mesure de métaboliser les HAP et on observe peu de bioaccumulation et par conséquent de bioamplification le long de la chaîne trophique (Lacoste, 2008).

La biotransformation des HAP passe par l'activité d'enzymes de phase I, telles que le cytochrome P450 essentiellement présent dans le foie mais aussi dans d'autres tissus. La métabolisation s'établit en deux phases : la phase de fonctionnalisation entraîne la formation de composés intermédiaires hautement réactifs ensuite transformés lors de la phase II de conjugaison, en composés plus solubles propres à être excrétés (Figure 7). Cependant, les métabolites primaires peuvent se lier aux protéines, à l'ARN et à l'ADN par des liaisons covalentes (Tarantini, 2009). Ces processus sont à l'origine de dommages cellulaires ainsi que d'effets tératogènes, mutagènes et cancérogènes (Tuvikene, 1995).

Ainsi la seule quantification des HAP dans des organismes tels que le poisson n'est pas révélatrice de leur exposition, l'identification des métabolites présents notamment dans le foie étant une approche

plus pertinente prenant en compte les capacités de biotransformation de ces espèces (Johnson-Restrepo, 2008).

Cette étude concerne le développement d'une méthode de quantification de métabolites des HAP dans le foie, les gonades, les branchies et la bile de trois espèces de poissons (Gardon, Perche, Chevesne) du bassin de l'Orge. L'objectif est d'estimer le niveau de contamination et d'apprécier les variations intra et inter-espèces. Les teneurs en métabolites des différents organes sont comparées aux concentrations en molécules parentes dans l'eau et le sédiment.

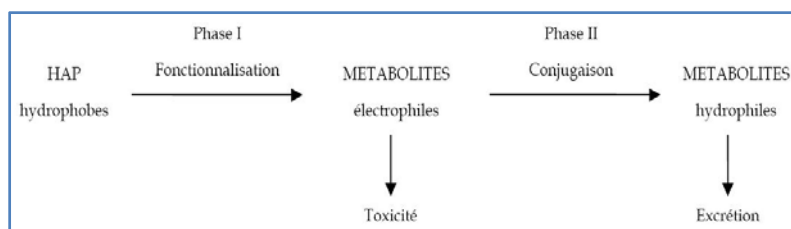


Figure 7 : Voies de métabolisation des HAP

3.2. Méthodologie

3.2.1 Choix des matrices : espèces piscicoles et tissus analysés

Des échantillons de sédiment, eau, gardon, perche et chevesne, ont été prélevés dans l'Orge, à Viry-Châtillon, le 9 juillet 2009, le 21 octobre 2009 et le 8 avril 2010. Après dissection, le foie, les branchies et les gonades de poisson ont été prélevés et lyophilisés.

Concernant les matrices abiotiques, eau et sédiment, les concentrations de 16 HAP considérés comme prioritaires par l'US-EPA ont été déterminées.

Concernant les matrices animales, la liste des métabolites de HAP étudiés, a été définie selon plusieurs contraintes. La rare disponibilité de ces composés dans le commerce nous a orientés vers des composés mono-hydroxylés. De plus, les recherches ont été naturellement ciblées sur les métabolites de composés parents identifiés dans l'eau de l'Orge à Viry-Châtillon (Tableau 13 : Concentrations des HAP dans l'eau et le sédiment de l'Orge).

Trois métabolites ont donc été retenus : le 2-hydroxynaphtalène (car le composé parent le naphthalène est difficile à quantifier dans l'eau), le 9-hydroxyphenanthrène et le 1-hydroxypyrene.

3.2.2 Technique d'analyse par HPLC-MS/MS

Les métabolites ont été analysés par HPLC/MS-MS (Mazeas, 2004 ; Johnson-Restrepo et al., 2008 ; Budzinski & Garrigues, 2003) en mode d'ionisation par électrospray négatif.

Deux standards internes : la 4-MU-¹³C₁₂ (LGC-Standards) et le 1-hydroxypyrene-d₉ (Cluzeau Infolabo) ont été ajoutés sous forme d'un mélange à raison de 100 ng chacun (Figure 2), après déconjugaison de l'échantillon par la β -glucuronidase (Type HP-2, de *Helix Pomatia* : 104130 unités/ml de β -Glucuronidase pour 835 unités/ml de sulfatase). Ce type de glucuronidase a été retenue qui permet de prendre en compte à la fois les métabolites glucuro et sulfo-conjugués.

3.2.3 Mise au point des méthodes

La solution d'acétate d'ammonium 7,5M, la β -glucuronidase, l'umbellifénone, l'umbellifénone glucuronidée, le 9-hydroxyphenanthrène et le 1-hydroxypyrene ont été commandés chez Sigma-Aldrich ; le 1-hydroxynaphtalène, le 1-hydroxychrysène et le 3-hydroxybenzo(a)pyrène chez LGC-Standards ; l'acide ascorbique Normapur et l'acide acétique Normapur 100% pour HPLC chez VWR.

Les cartouches SupelcleanTM ENVITM-18 SPE tube - 6 ml - phase 0,5g, cartouches SupelcleanTM LC-NH2 SPE tube 6 ml - phase 0,5g sont fournies par SUPELCO.

Extraction des échantillons

L'étape d'extraction des métabolites de HAP décrite par Mazeas&Budzinski(2005) a été testée en triplicates sur de la bile bovine reconstituée (Figure 8).

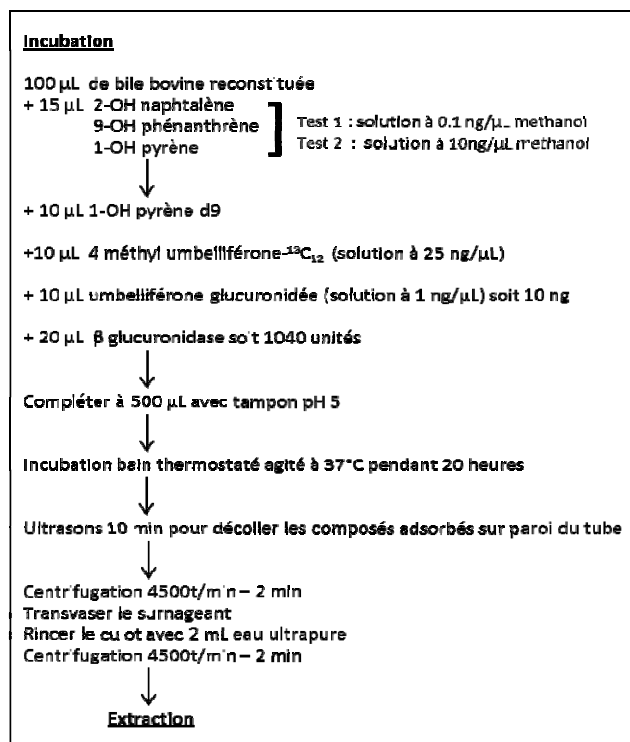


Figure 8 : Etapes d'incubation de la bile

La méthode a ensuite été appliquée aux tissus lyophilisés de poisson après broyage dans le tampon d'acétate d'ammonium à pH 5 (Figure 9).

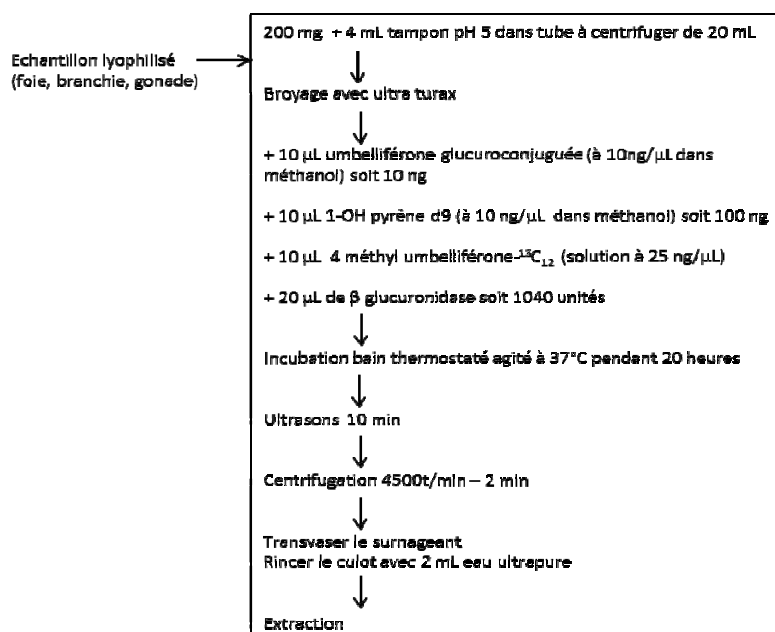


Figure 9 : Etapes d'incubation des échantillons de tissus lyophilisés

Les métabolites de HAP sont ensuite extraits sur des cartouches C18 (6 mL, 0,5 g) après conditionnement avec 2 mL de méthanol puis 4 mL d'eau ultrapure.

Le surnageant est déposé sur la cartouche puis rincé successivement avec 2 ml d'eau ultrapure et 2 ml du mélange eau/éthanol (70v/30v).

Les cartouches sont ensuite congelées 1 heure puis lyophilisées.

L'élué des composés est effectuée avec 6 ml de méthanol. L'éluat est concentré à la goutte sous flux d'azote puis dilué dans 500 µl d'un mélange dichlorométhane/méthanol (80v/20v).

Purification des échantillons

La purification des extraits se fait sur cartouches LC-NH2 après conditionnement avec 3 mL dichlorométhane/méthanol (80v/20v). L'extrait est déposé sur la cartouche et les composés élués par 6 mL du mélange de conditionnement.

L'extrait est évaporé à la goutte et transféré sur un filtre à centrifuger et le flacon rincé avec 2 x 100 µL de méthanol/eau (60v/40v). Après 2 minutes de centrifugation, le volume final du filtrat est quantifié à la seringue et l'échantillon déposé dans un vial munid'un restricteur à fond plat de 400 µl.

Méthode d'analyse

Les analyses sont réalisées en ESI négatif, sur un CLHP 1200 couplé à un spectromètre de masse 6410 triple quadripôle LC/MS/MS, équipé d'une colonne Zorbax SB-C18, 2,1x100mm, 1,8µm (Agilent Technologies) (Tableau 9).

Tableau 9: Paramètres de détection du système

Débit N₂	11 L/mn
Pression de nébulisation	35 psi
Température N₂	350°C
Voltage du capillaire	4500 V jusqu'à 22 min, puis 5500 V
Fragmentation	de 0 à 6 min : 90 V, de 6 à 8 min : 15 V, 90 V jusqu'à 12,5 min, puis 120 V
Acquisition du SM	1,28 cycle/sec

Le gradient de la phase mobile est présentée dans le Tableau 10

Tableau 10: Gradient et débit de la phase mobile

Temps (min)	% méthanol dans eau	Débit (mL/min)
0	60	0.15
9	60	0.15
12	75	0.15
15	75	0.15
17	85	0.15

Les ions produits pour chaque monoester ont été recherchés à l'aide du logiciel Optimizer de MassHunter (Agilent®) et les énergies de fragmentation et de collision les plus efficaces pour chaque composé ont été déterminées (Tableau 11).

Tableau 11: Paramètres d'analyse en HPLC-MS-MS des métabolites de HAP

Composés	Ions parents m/z	Ions fils m/z	Energie de collision	Energie de fragmentation	Temps de rétention (min)
1-hydroxypyrene-d9	226,3	198,1	36	170	4,57
2-hydroxynaphtalène	143,2	115,1	24	110	1,83
9-hydroxyphenantrene	193,2	165,1	28	170	3,6
1-hydroxypyrene	217,2	189,1	36	140	4,7

3.2.4 Expression des résultats

Les concentrations en HAP dans l'eau et dans le sédiment ont été exprimées en ng /L et en ng/g PS. Les concentrations en métabolites ont été exprimées dans la gonade, la branchie et le foie en ng/g de poids sec.

3.3. Résultats

3.3.1 Rendements d'extraction, limites de quantification

La méthode d'extraction a été testée 3 fois avec des échantillons de bile bovine dopée afin d'obtenir le rendement du protocole utilisé pour chacun des métabolites recherchés. On note ici que les rendements restent faibles, notamment pour le 9-OH phénanthrène (Tableau 12).

Tableau 12 : Rendements d'extraction moyens (n=3) sur bile dopée à 1,5 ng et 150 ng

Bile dopée	1,5 ng	150 ng
2-OH naphthalène	50	61
9-OH phénanthrène	14	19
1-OH pyrène	33	47

3.3.2 Contamination de l'eau et du sédiment en composés parents

Tableau 13 : Concentrations des HAP dans l'eau et le sédiment de l'Orge

	Eau ng/L						Sédiment ng/g PS	
	dissous		particulaire		total		moyenne	sd
	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD		
Naphtalène							30	
Acénaphthylène	<LD		1.00	0.17	1.00	0.17	260	16
Acénaphthène	1.27	0.95			1.27	0.95	32	4
Fluorène	4.20	2.58	0.66	0.15	4.85	2.66	61	4
Phénanthrène	10.31	5.06	6.65	2.62	16.96	7.01	999	51
Anthracène	0.66	0.25	0.89	0.33	1.55	0.53	185	18
Fluoranthène	5.92	3.55	19.09	7.58	25.01	10.81	2804	189
Pyrène	5.88	2.57	16.24	3.20	22.12	5.54	2367	128
Benzo(a)anthracène	0.51	0.27	7.93	3.87	8.34	4.16	1764	99
Chrysène	1.76	1.05	15.28	7.42	17.04	8.30	1588	207
Benzo(b)fluoranthène	0.07	0.05	6.33	2.86	6.36	2.89	1307	155
Benzo(k)fluoranthène	<LD		1.78		1.78			
Benzo(a)pyrène	<LD		11.83	4.85	11.83	4.85	2113	179
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	<LD		3.21	1.92	3.21	1.92		
Dibenzo(ah)anthracène	<LD		1.39	0.75	1.39	0.75		
Benzo(ghi)perylène	0.06		10.28	5.15	10.30	5.16	1860	199

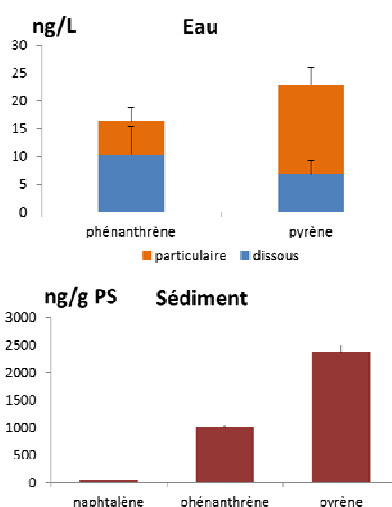


Figure 10 : Concentrations des composés parents dans l'eau et le sédiment de l'Orge

3.3.3 Contamination des tissus du Gardon

Les concentrations des métabolites de HAP dans les tissus de poisson sont présentées dans le Tableau 14 et la Figure 11.

Globalement les concentrations restent souvent proches des limites de détection voire non détectables. Le foie est l'organe présentant les valeurs les plus élevées. Différentes études consistant à exposer des poissons aux HAP ont montré que leurs métabolites se distribuaient principalement dans la bile et le foie, suivis des branchies et des gonades (Mazéas, 2004). De plus cet auteur a montré que les poissons transformaient les HAP en métabolites similaires à ceux produits par les rongeurs.

Les métabolites peuvent ensuite se retrouver sous forme libre dans les organismes mais la forme conjuguée est prépondérante avec cependant, des pourcentages de conjugaison variables selon les composés (Mazéas, 2004). Concernant le naphthalène, 77 à 93 % des métabolites biliaires sont des glucuroconjugués.

De plus, il a été observé chez les organismes aquatiques que la demi-vie des métabolites dans les tissus était plus longue que celle des composés parents.

Les cinq échantillons issus de la première campagne, présentent des concentrations élevées en 9-OH phénanthrène dans le foie bien que les concentrations en phénanthrène de l'eau et du sédiment soient plus faibles que celles du pyrène (Figure 10). Cependant, une hypothèse serait la demi-vie plus longue du composé parent dans les organismes. En effet, l'exposition de la truite arc-en-ciel au phénanthrène a montré que son temps de résidence dans l'organisme était l'un des plus longs parmi les HAP (Mazéas, 2004). De plus, le métabolite majoritaire était le 1,2 dihydrodiol.

Le 1-OH pyrène est le métabolite le plus abondant chez les individus de la deuxième pêche et de la troisième campagne ce qui est en accord avec la littérature. En effet, contrairement aux autres HAP, le pyrène avec un schéma de biotransformation moins complexe, ne présente qu'un seul métabolite de phase I détectable, le 1-OH pyrène et son glucuronide est majoritaire (Mazéas, 2004). Ainsi, le 1-OH pyrène a été utilisé chez la sole comme biomarqueur de l'exposition aux HAP dans le contexte d'une marée noire (Budzinski et al., 2004).

Nos premiers résultats sont à considérer avec précaution et ne permettent pas de mettre en évidence d'éventuelles variations relatives au sexe, à la période de ponte ou inter-espèces.

Le-dû Lacoste (2008) a montré que les jeunes stades de poisson produisent plus de métabolites que les adultes et que des différences notables existent selon les espèces en termes de métabolisation selon le niveau trophique. D'autre part, Roche (2003) a rapporté une évolution saisonnière avec une gradation croissante de la contamination de janvier à novembre en particulier pour les HAP les plus légers.

Concernant la contamination par les HAP, le 1-OH pyrène semble donc être le biomarqueur le plus fiable.

Tableau 14: Teneurs en métabolites de HAP du tissu de poisson (PEI : Etalon Interne non détecté; ND : composé non détecté ; <LQ : Composé Non Quantifié)

Pêche	Espèces	Organe	2-OH naphthalène	9-OH phénanthrène	1-OH pyrène
09-08-2009 (P1)	Gardon	Foie	<LQ	3,35	ND
	Gardon	Foie	1,18	12,51	1,20
	Gardon	Foie	2,16	3,1	ND
	Gardon	Gonades	ND	0,64	0,46
	Gardon	Branchies		PEI	
	Gardon	Branchies		NQ	
21-10-2009 (P2)	Gardon	Gonades	ND	ND	ND
	Gardon	Branchies	<LQ	ND	ND
	Chevesne	Foie	ND	1,0	2,32
	Chevesne	Gonades	ND	ND	<LQ
	Perche	Foie		PEI	
	Perche	Gonades	0,50	0,51	5,0
08-04-2010 (P3)	Gardon	Foie		PEI	
	Gardon	Gonades		PEI	
	Gardon	Branchies		PEI	
	Chevesne	Foie	0,67	0,66	1,07
	Chevesne	Gonades		PEI	
	Chevesne	Branchies	<LQ	<LQ	2,15

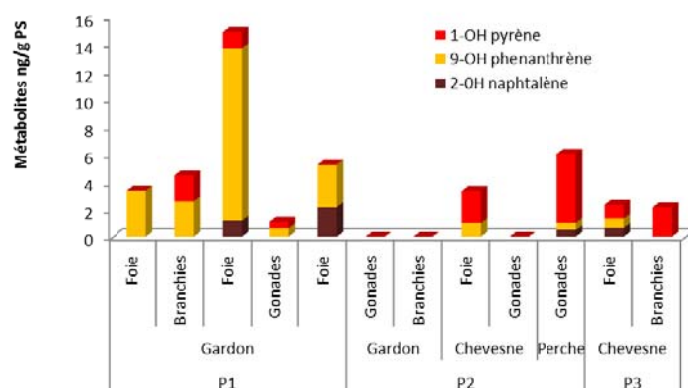


Figure 11 : Teneurs en métabolites de HAP du tissu de poisson

4. Conclusions – Perspectives

Cette étude a permis la mise au point au laboratoire de la caractérisation des métabolites de phtalates chez le Gardon par l'analyse en HPLC-MS/MS. Les résultats sont dans l'ensemble en accord avec ce qui est décrit chez les Mammifères, les poissons étant très peu documentés à ce jour. Le MEOHP paraît être le métabolite oxydé le plus fiable pour représenter la contamination par le DEHP.

Elle constitue également une première approche du métabolisme des HAP chez les poissons dans le bassin de la Seine.

Elle présente à la fois un intérêt fondamental par l'exploration des voies métaboliques des phtalates chez les poissons, qui sont peu étudiés en regard des Rongeurs et de l'Homme et également un intérêt appliqué. Du fait de la bioaccumulation limitée des phtalates, le suivi de leurs métabolites chez le poisson constitue un biomarqueur de la contamination plus performant que l'analyse des diesters pour évaluer la qualité des eaux de surface.

Le développement de méthodes de détermination des métabolites de phtalates et de HAP représente une approche fondamentale en matière d'évaluation et de gestion du risque sanitaire.

En effet, l'expression des niveaux de présence des contaminants dans différents tissus biologiques et leur accumulation à partir du milieu ambiant (facteurs de bioaccumulation à partir de l'eau et du sédiment, BAF et BSAF et le facteur de bioamplification trophique, TMF) reflète le stockage correspondant aux affinités particulières des molécules concernées (vers les lipides pour les composés hydrophobes ou vers les protéines pour les composés amphiphiles).

Ils ne prennent pas en compte l'induction des voies de la biodégradation, notamment l'oxydation en phase I qui peut engendrer des effets délétères comme l'apparition de radicaux libres ou de métabolites intermédiaires capables de former des adduits à l'ADN.

Or, le système du cytochrome P-450, généralement impliqué en phase I, a été particulièrement bien conservé au cours de l'évolution des espèces depuis les cyanobactéries jusqu'aux niveaux les plus différenciés. Ainsi, les métabolites issus de son activité peuvent être étudiés à travers l'ensemble des chaînes trophiques.

Le poisson représente une ressource halieutique donc une source de contamination possible pour l'Homme. Les perspectives seraient d'étendre cette étude à d'autres métabolites et à d'autres espèces aquatiques, en relation avec le sexe des individus et les différents stades du cycle reproductif.

Sans toutefois changer le concept d'évaluation du risque sanitaire par les mesures de bioaccumulation des contaminants, la perspective est de lui associer lorsque cela est possible, la recherche de métabolites de phase I comme un nouvel outil permettant une approche plus précise de l'impact toxique.

5. Références bibliographiques

- Akingbemi, Benson T., Ren-shanGe, Gary R. Klinefelter, Barry R. Zirkin, et Matthew P. Hardy "Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 101(3): 775–780.
- Barron M.G., Albro P.W., Hayton W.L. Biotransformation of di(2-ethylhexyl) phthalate by rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1995, Vol.14: 873-876.
- Biefert, C., et Perraud, R., 2001. Chimie de l'environnement : air, eau, sols, déchets. De Boeck diffusion s.a, Paris.
- Blanchard M., Garban B., Ollivon D., Teil M.-J., Tiphagne K., Chevreuil M. Sources, devenir et écotoxicité des phtalates dans l'environnement. Comparaison avec les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les polychlorobiphényles. Rapport GDR PIREN-SEINE, 2003, Thème V, 18 p.
- Blount B.C., Milgram K.E., Silva M.J., Malek N.A., Reidy J.A., Needham L.L., Brock J.W. Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 2000b, 72: 4127-4134.
- Blount B.C., Silva M.J., Caudill S.P., Needham L.L., Pirkle J.L., Sampson E.J., Lucier G.W., Jackson R.J., Brock J.W. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environmental Health Perspectives*, 2000a, Vol. 108, Number 10.
- Budzinski, H. & Garrigues P., 2003. Etude des métabolites des composés aromatiques et de la testostérone chez divers organismes biologiques de l'estuaire de la seine. Compte rendu des travaux effectués par le laboratoire de physico et toxico-chimie des systèmes naturels (LPTC) de Bordeaux.
- Budzinski, H., Mazeas O., Tronczynski J., Désaunay Y., Bocquené G., Claireaux G. Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites : application to the "Erika" oil spill. *Aquat. Living Resour.* 2004, 17, 329-334.
- Erkekoglu P, Rachidi W, Yuzugullu OG, Giray B, Favier A, Ozturk M, Hincal F (2010) Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phtalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicology and Applied Pharmacology* 248 : 52-62
- Frederiksen H, Jorgensen N, Andersson AM (2010) Correlations between phthalate metabolites in urine, serum and seminal plasma from young Danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 34 : 400-410.
- Inoue K., Kawaguchi M., Yamanaka R., Higuchi T., Ito R., Saito K., Nakazawa H. Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. *Clinica Chimica Acta*, 2005, 159-166.
- Johnson-Restrepo, B., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in fish bile and sediments from coastal waters of Colombia. *Environmental Pollution* 151 : 452-459.
- Kato K., Silva M.J., Reidy J.A., Hurtz III D., Malek N.A., Needham L.L., Nakazawa H., Barr D.B., Calafat A.M. Mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phtalate and Mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phtalate as biomarkers for human exposure assessment to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112 : 327-330.
- Kessler W., Numtip W., Grote K., Csanady G.A., Chahoud I., Filser J.G. Blood burden of di(2-ethylhexyl)phthalate and its primary metabolite mono(2-ethylhexyl)phthalate in pregnant and nonpregnant rats and marmosets. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 195 : 142-153.
- Labadie P., Blanchard M., Dagnat C., Desportes A., Teil M.-J., Tlili K., Chevreuil M. Bioaccumulation des phtalates et des éthers de biphényles polybromés par le gardon et le goujon. Rapport GDR PIREN-SEINE 2009.
- Le-Dû- Lacoste, M., 2008. Etude des phénomènes de biotransformation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons). Relation exposition – génotoxicité. Thèse de Doctorat, Bordeaux, 398 pages.
- Mazeas O., 2004. Evaluation de l'exposition des organismes aux Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans le milieu marin par le dosage des métabolites de HAP. Thèse de Doctorat Bordeaux I, 17 décembre 2004.
- Mazeas O. & Budzinski H. Solid-phase extraction and purification for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 383, 985-990.

- Melquiot, P., et Bertolini, G.,2003. 1.001 mots et abréviations de l'Environnement et du Développement Durable. Recyconsult.
- Moore J, Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, FaustmanE,Foster P, Golub M, Henderson R, Hinberg I, Little R, Seed J, Shea K, Tabacova S, Tyl R, Williams P, Zacharewski T NTP center for the evaluation of health risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate. *ReprodToxicol*, 2002, 5454: 1-39.
- Mortensen G.K., Main K.M., Andersson A.-M., Leffers H., Shakkebaek N.E. Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 382: 1084-1092.
- Saillenfait A.-M., Laudet-Hesbert A. Phtalates. *EMC-ToxicologiePathologie 2*, 2005, 1-13.
- Silva M.J., Slakman A.R., Reidy J.A., Preau Jr. J.L., Herbert A.R., Samandra E., Needham L.L., Calafat A.M. Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 2004, 805: 161-167.
- Silva M.J., SamandarE., ReidyJ.A., Hauser R., NeedhamL.L., CalafatA.M. Metabolite Profiles of Di-n-butyl Phthalate in Humans and Rats. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41 : 7576–7580.
- Staples, Peterson D.R., Parkerton T.F., Adam W.J. The Environmental Fate of Phtalates esters.A literature review *Chemosphere*, 1997, 35: 667-749.
- Sultan C., Balaguer P., Terouanne B., Georget V., Paris F., Jeandel C., Lumbroso S. & Nicolas J.C. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001, 178, 99-105.
- Tarantini A. Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges. Thèse de l'Ecole doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement de l'Université de Grenoble, 5 Novembre 2009, 176 pages.
- Teil M.-J., Tlili K., Blanchard M., Chevreuil M., Alliot F., & Labadie P. Occurrence of PolybrominatedDiphenyl Ethers, Polychlorinated Biphenyls, and Phthalates in Freshwater Fish From the Orge River (Ile-de France). *Arch Environ ContamToxicol*, 2012, 63 : 101-113.
- Tuvikene, A., 1995. Responses of fish polycyclic aromatic hydrocarbons.*Ann. Zool. Fennici*32 : 295-309.